



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS ANIMALES**

PROGRAMA, GUIA DE TRABAJOS Y DEMOSTRACIONES PRÁCTICAS

ESPACIO CURRICULAR A

**BASES MOLECULARES Y CELULARES
DEL ORGANISMO ANIMAL**

***JOSE LUIS ARIAS
SERGIO BUCAREY
SOLEDAD FERNÁNDEZ
EDUARDO KESSI
ANDRÓNICO NEIRA
LEONARDO SAENZ***

**UNIDAD 3
BASES CELULARES**

2018



Escuela de Ciencias Veterinarias
Departamento de Ciencias Biológicas Animales

CURSO BASES CELULARES
Secciones AU3-1 y AU3-2
2018

I. IDENTIFICACION

Nombre del curso	: CURSO BASES CELULARES AU3-1 y AU3-2
Requisitos	:
▪ Horas semanales	: 6
▪	
▪ Créditos	: 10 créditos
▪ Días	: Lunes (AU3-2) y Jueves (AU3-1)
▪ Horario	: Lunes : 9:00-12:50; 14:30-16:20 y Jueves 11:00-12:50; 14:30-18:20 (Sala 5)
▪ Profesor encargado	: José Luis Arias
▪ Prof. Participantes	: José Luis Arias; Sergio Bucarey; María Soledad Fernández; Eduardo Kessi; Andrónico Neira; Leonardo Sáenz

DESCRIPCION

La carrera de Medicina Veterinaria impartida por la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile se ha estructurado sobre la base de un curriculum basado en la obtención de competencias por parte del estudiantado. Para el logro de este objetivo, los contenidos de las asignaturas tradicionales se han organizado en espacios curriculares conformados por unidades. El espacio A denominado "Bases Moleculares y Celulares del Organismo Animal", está conformado por tres unidades denominadas (1) Bases Moleculares (2) Bases Moleculares y Celulares (3) Bases Celulares. Su propósito es que cada estudiante domine el conocimiento básico de los fenómenos biológicos relacionados con los diversos campos de la formación profesional. En esta tercera unidad, que disciplinariamente se corresponde con los contenidos tradicionalmente desarrollados en un curso de Biología Celular, el estudiantado integra las competencias y conocimientos adquiridos en las unidades 1 y 2, con aquellas de la unidad 3 para comprender el origen, organización, estructura y funcionalidad de las células con énfasis en las células animales.

OBJETIVO GENERAL

Conocer y comprender el fundamento científico de los fenómenos y procesos celulares que rigen la organización, estructura y funcionalidad de los seres vivos, con especial referencia a los animales.

OBJETIVOS ESPECIFICOS/LOGROS DE APRENDIZAJE

Al completar las actividades de esta Unidad cada estudiante debería ser capaz de:

1. Comprender, usando las células como modelo de ser vivo, qué son los organismos vivos y como se originan. Reconocer y describir los distintos grados de organización de la materia relevantes para la descripción de los seres vivos.
2. Comprender el concepto de membrana y explicar los fenómenos asociados con las membranas en términos de las propiedades de las moléculas y macromoléculas que las conforman.

3. Comprender el significado de la existencia de compartimentos intracelulares, y las relaciones de producción que existen entre algunos de estos compartimentos.
4. Reconocer la existencia del citoesqueleto y de su relación con distintos procesos intra, inter, y extracelulares.
5. Comprender y explicar qué es el ciclo celular y las consecuencias de su correcto funcionamiento. Comprender el significado de la muerte celular programada en el contexto de la diferenciación celular.
6. Reconocer el rol evolutivo y ontogénico de la matriz extracelular como componente esencial de la metacelularidad.
7. Reconocer los fundamentos de la manipulación genética y entender sus bases celulares y moleculares

COMPETENCIAS

1. Reconocer la naturaleza científica de las disciplinas que confluyen al desarrollo de los conceptos fundamentales de la Biología Celular, identificando sus estructuras, límites, métodos de estudio y especificidad de sus lenguajes.
2. Comprender los procesos celulares a través de conocer el enfoque integrado de diversas disciplinas científicas que concurren a descifrar la fenomenología celular.
3. Reconocer la existencia de modelos y su utilidad como herramientas para la comprensión de los fenómenos celulares.
4. Reconocer fuentes de información válidas, seleccionar información de acuerdo al tema de interés y organizarla para comunicarla adecuadamente

VI. PROGRAMA

UNIDAD 3, BASES CELULARES AMBAS SECCIONES CALENDARIO DE ACTIVIDADES 2018

S E P T I E M B R E	FECHA	HORARIO	ACTIVIDAD	MATERIA
S E P T I E M B R E	Lunes 24	9:00 – 12:50	TEORICO SECCION 2	Introducción, definición y origen de los seres vivos (JLA)
		14:30 -16:30	TEORICO SECCION 2	Métodos de estudio de las células, fraccionamiento celular (AN)
	Jueves 27	11:00 -12:50	TEORICO SECCION 1	Introducción, definición y origen de los seres vivos (JLA)(1)
		14:30 – 16:00	TEORICO SECCION 1	Introducción, definición y origen de los seres vivos (JLA) (2)
		16:00 - 18:20	TEORICO SECCION 1	Métodos de estudio de las células, fraccionamiento celular (AN)
	Lunes 1	9:00 – 11:00	PRACTICO SECCION 2 (Grupos V y VI)	T.P.1 : Microscopía y Métodos de estudio de las célula
11:00 – 12:50		PRACTICO SECCION 2 (Grupos VII y VIII)		
14:30 -16:30		TEORICO SECCION 2	Teoría Celular, organización general de las células procarióticas y eucarióticas (JLA)	

O C T U B R E	Jueves 4	11:00 – 12:50	TEORICO SECCION 1	Teoría Celular, organización general de las células procarióticas y eucarióticas (JLA)
		14:30 -16:30	PRACTICO SECCION 1 (Grupos I y II)	T.P. 1: Microscopía y Métodos de estudio de las células
		16:30 - 18:20	PRACTICO SECCION 1 (GRUPOS III y IV)	
	Lunes 8	9:00 -12:50	TEORICO SECCION 2	Organización de las membranas celulares (JLA)
		14:30 – 16:30	TEORICO SECCION 2	Equilibrio iónico y transporte (JLA)
	Jueves 11	11:00 -12:50	TEORICO SECCION 1	Organización de las membranas celulares (JLA)
		14:30 - 18:20	TEORICO SECCION 1	Equilibrio iónico y transporte (JLA)
	Jueves 18	11:00 – 12:50	TEORICO SECCION 1	Biogénesis de mitocondrias y peroxisomas (EK)
		14:30 – 16:30	PRACTICO SECCION 1 (Grupos I y II)	T.P.2 : Fraccionamiento celular y separación de moléculas
		16:30 -18:20	PRACTICO SECCION 1 (GRUPOS III y IV)	
	Lunes 22	9:00 – 11:00	PRACTICO SECCION 2 (Grupos V y VI)	T.P.2 : Fraccionamiento celular y separación de moléculas
		11:00 – 12:50	PRACTICO SECCION 2 (Grupos VII y VIII)	
		14:30 – 16:30	TEORICO SECCION 2	Biogénesis de mitocondrias y peroxisomas (EK)
	Jueves 25	11:00 – 12:50	TEORICO SECCION 1	Núcleo interfásico y cromatina (EK)
		14:30 -18:20	TEORICO SECCION 1	Citoesqueleto y uniones celulares (SF)
	Lunes 29	9 :00– 12: 50	TEORICO SECCION 2	Núcleo interfásico (EK)
14:30 – 17:00		TEORICO SECCION 2	Ciclo celular (EK)	
N O V I E M B R	Lunes 5	9:00 – 11:00	PRACTICO SECCION 2 (Grupos V y VI)	T.P.3:Transporte a través de membranas
		11:00 – 12:50	PRACTICO SECCION 2 (Grupos VII y VIII)	
		14:30 – 16:20	TEORICO SECCIÓN 2	Citoesqueleto y uniones celulares (SF)
	Jueves 8	11:00 – 12:50	TEORICO SECCIÓN 1	Ciclo celular (EK)
		14:30 - 18:20	TEORICO SECCIÓN 1	Transducción de señales, exocitosis y endocitosis (LS) Biogénesis de Membranas y síntesis de proteínas (LS)
	Lunes 12	9:00 –11:00	PRACTICO SECCIÓN 2 (Grupos V y VI)	T.P.4:Citoesqueleto y uniones celulares
		11:00 – 12:50	PRACTICO SECCIÓN 2 (Grupos VII y VIII)	
		14:30 – 16:20	TEORICO SECCION 2	Transducción de señales, exocitosis y endocitosis (LS)
	Jueves 15	11:00 -12:50	TEORICO SECCIÓN 1	Mitosis 1 (EK)
		14:30 – 16:30	PRACTICO SECCION 1 (Grupos I y II)	T.P.3:Transporte a través de membranas
16:30- 18:20		PRACTICO SECCION 1 (Grupos III y IV)		

E	Lunes 19	9:00 - 12:50	TEORICO SECCION 2	Biogénesis de Membranas y síntesis de proteínas (LS) Replicación, transcripción y traducción (LS)	
		14:30 -16:20	TEORICO SECCION 2	Mitosis 1 (EK)	
	Jueves 22	11:00 – 12:50	TEORICO SECCION 1	Mitosis 2 (EK)	
		14:30 -16:30	PRACTICO SECCION 1 (Grupos I y II)	T.P.4:Citoesqueleto y uniones celulares	
		16:30 -18:30	PRACTICO SECCION 1 (Grupos III y IV)		
	Lunes 26	9:00 - 12:50	TEORICO SECCION 2	Mitosis 2 (EK)	
		14:30 -16:20		Recombinación en el DNA (SB)	
	Jueves 29	17:0 – 18:30	PRUEBA 1 AMBAS SECCIONES	PRUEBA 1	
	D I C I E M B R E	Lunes 3	9:00 – 11:00	PRACTICO SECCIÓN 2 (Grupos V y VI)	T.P.: 5 Mitosis y Meiosis
			11:00 -12:50	PRACTICO SECCIÓN 2 (Grupos VII y VIII)	
14:30 -16:20			TEORICO SECCION 2	Secuenciación y amplificación del material genético (SB)	
Jueves 6		11:00-12:50	TEORICO SECCION 1	Replicación, transcripción y traducción (LS)	
		14:30 – 16.30	TEORICO SECCION 1	Secuenciación y amplificación del material genético (SB)	
		16.30 – 17.30	TEORICO SECCION 1	Mitosis 2 (EK)	
Lunes 10		9:00 – 11:00	TEORICO SECCION 2	Transducción señales, exocitosis y endocitosis (LS)	
		11:00 -12:50	TEORICO SECCION 2)	Matriz extracelular y diferenciación (JLA)	
		14:30 -16:20	TEORICO SECCION 2	Apoptosis (JLA)	
Jueves 13		11:00 – 12:50	TEORICO SECCION 1	Matriz extracelular y diferenciación (JLA)	
		14:30 – 16:30	PRACTICO SECCION 1 Grupos I y II	T.P.: 5 Mitosis y Meiosis	
		16:30 -18:20	PRACTICO SECCION 1 Grupos III y IV		
Lunes 17		9:00 – 11:00	TEORICO SECCION 2	Libre	
		14:30 -16:20	TEORICO SECCION 2	Vectores y Terapia Génica (SB)	
Jueves 20		17:00 – 18:30	PRUEBA 2 AMBAS SECCIONES	PRUEBA 2	
Jueves 27		11:00 – 12:50	TEORICO SECCION 1	Apoptosis (JLA)	
		14:30 -16:30	TEORICO SECCION 1	Recombinación en el DNA (SB)	
		16:30-18:20	TEORICO SECCION 1	Vectores y Terapia Génica (SB)	

E N E R O				
	Lunes 7		PRUEBA 3 (Integrativa) AMBAS SECCIONES	PRUEBA 3 (Integrativa)
	Jueves 10	11:00 – 12:30	PRUEBA RECUPERATIVA AMBAS SECCIONES	PRUEBA RECUPERATIVA)

VII. METODOLOGIA Y MEDIOS

Las actividades comprenden clases expositivas y trabajos prácticos.

VIII. EVALUACION

Se realizarán dos pruebas teóricas que incluirán los temas tratados en las clases y en las actividades prácticas y una prueba integrativa que abarcará toda la materia teórica y práctica. Al término de cada actividad práctica se realizará una evaluación breve de ésta (Quiz).

Las clases teóricas, pruebas y trabajos prácticos son de asistencia obligatoria. Sin embargo, la asistencia mínima reglamentaria a las clases teóricas y trabajos prácticos es de 75% siempre que las inasistencias sean debidamente justificadas ante la Secretaría de Estudios. El incumplimiento de cualquiera de estos requisitos será motivo de **reprobación automática con nota 1 final**, independientemente de las notas parciales acumuladas. Las pruebas parciales pendientes, debidamente justificadas, serán reemplazadas con la nota obtenida en la Prueba Integrativa. Los Quiz no serán recuperados.

Ponderaciones:

Prueba 1 35-%

Prueba 2 35%

Promedio de pruebas prácticas 30%

El promedio ponderado de las notas indicadas constituirá la nota de presentación a la prueba final integrativa. La nota final de la Unidad se obtendrá de la siguiente manera:

Promedio ponderado 75%

Prueba final integrativa 25%

Estudiantes repitentes no harán trabajos prácticos por lo que las notas de las pruebas 1 y 2 se ponderan en 50% cada una, como promedio ponderado para la nota de presentación a la prueba integrativa,

Estudiantes cuya nota en la prueba final integrativa sea inferior a 4,0 deberán rendir una prueba recuperativa, cuya ponderación será de 30% de la nota final de la Unidad.

Aprobarán la Unidad quienes hayan obtenido una nota final igual o superior a 4,0. Cuando la nota resultante de las ponderaciones indicadas más arriba sea inferior a 4,0 se podrá rendir una prueba recuperativa, cuya ponderación será de 30% de la nota final de la unidad.

Por instrucciones de la Dirección de Escuela de Pregrado, el procedimiento a seguir en el caso que alguien no asista a pruebas programadas para su Unidad será el siguiente:

1. Estudiante que falte a una prueba parcial, deberá presentar el justificativo correspondiente en la Secretaría de Estudios, en el plazo (48 horas de producida la inasistencia) y en la forma prevista para ello.
2. En el caso que la Secretaría de Estudios apruebe el justificativo, la nota de la Prueba Integrativa reemplazará la nota de la prueba no rendida. Luego de efectuada la Prueba Integrativa no habrá más alternativas de recuperar pruebas no rendidas.
3. Estudiante que no se presente a la Prueba Integrativa y justifique esta inasistencia en Secretaría de Estudios, deberá rendir la Prueba Recuperativa, que reemplazará, si esto fuese necesario, ambas notas (Integrativa y Recuperativa)
4. Cabe señalar, que la inasistencia a la Prueba Recuperativa es una situación inaceptable. En el caso que existan razones atendibles y verificables, por las que no pudo rendirla, puede pedir que su situación sea evaluada por la Dirección de Escuela, para lo que deberá presentar en Secretaría de Estudios la documentación de respaldo y elevar la respectiva solicitud detallando claramente la exigencia académica que no rindió y el motivo de la inasistencia. La Dirección de Escuela se guarda el derecho de aceptar o rechazar su solicitud.
5. Frente a la inasistencia a otras actividades obligatorias, como: pruebas cortas, seminarios, etc., el docente tiene las atribuciones de establecer las medidas que estime convenientes, las que deben informarse a los estudiantes al inicio del curso.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Básica:
 1. De Robertis, E.M.F., Hib, J. (2012). Fundamentos de Biología Celular y Molecular de De Robertis. Editorial El Ateneo, 16ª. Ed., Buenos Aires.
- Especializada:
 2. Alberts, B. et al. (2006). Introducción a la Biología Celular. 2ª Ed., Editorial Médica Panamericana, Madrid.
 3. Maillet, M. (2003). Biología Celular. Masson S.A., Barcelona.
 4. Lodish, H. et al. (2005) Biología Celular y Molecular. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
 5. <http://www.accessexcellence.org>
 6. www.cellbio.com
 7. www.biology.arizona.edu/cell_bio/cell_bio.html
 8. www.cellsalive.com
 9. <http://www.udel.edu/biology/ketcham/microscope/>

¡Cada estudiante deberá llevar la guía de trabajos prácticos impresa cuando le corresponda realizar la actividad!

EJERCICIO Nº 1

MICROSCOPIA OPTICA Y METODOS DE ESTUDIO DE LAS CÉLULAS

El **microscopio óptico**, o de luz, corresponde a un instrumento formado esencialmente por varias lentes que permiten observar imágenes aumentadas hasta 1.000 veces. Existen varios tipos de microscopios que introducen técnicas ópticas especiales con el fin de aumentar el contraste del objeto observado o el poder de resolución; éstos serán tratados en sus detalles diferentes más adelante. No obstante, todos ellos en esencia están formados por los mismos componentes básicos.

1. Componentes del sistema mecánico

1.1. Pie: Corresponde a la base de sustentación del aparato. Su forma varía, siendo la más usada la de herradura por su menor peso y porque proporciona mayor estabilidad.

1.2. Columna: Corresponde a un vástago vertical que parte del pie y se pone en relación con el tubo del microscopio. La columna sostiene el espejo o el sistema de iluminación, el condensador, platina y el tubo con el sistema óptico de amplificación.

1.3. Platina: Corresponde a una plataforma horizontal con un orificio central que permite el paso de los rayos luminosos que atravesarán la preparación. Esta se encuentra sujeta por pinzas y es desplazada por un carro móvil.

1.4. Tubo o Cañón: Lleva en su extremo superior la lente ocular y en el inferior la lente objetiva. Cuando el tubo posee dos lentes oculares, se denomina tubo binocular.

1.5. Revólver o Tambor: Corresponde a una pieza giratoria en el extremo inferior que por su rotación moviliza los diferentes objetivos de que dispone el microscopio.

1.6. Tornillo de Focalización: El enfoque de la preparación u objeto se logra variando la distancia entre el objetivo y la platina. Para conseguir esto, los microscopios tienen dos tornillos llamados macrométrico y micrométrico (en algunos modelos de microscopio la parte móvil son las lentes objetivas, mientras que en otros es la platina). El macrométrico se utiliza para un enfoque aproximado, mientras que el micrométrico completa el enfoque de precisión. El tornillo micrométrico trae una escala graduada y cada marca indica un avance de dos micrómetros (μm)

2. Componentes del sistema de Iluminación.

2.1. Fuente luminosa: Puede ser natural o artificial (luz blanca, ultravioleta, monocromática, etc.).

2.2. Condensador: Está formado por un sistema de lentes que enfoca la luz en el plano superior de la preparación. Existen condensadores de Abbe compuestos de dos lentes (N. A. = 1,20), condensadores de tres lentes (N. A. = 1,40) y condensadores acromáticos corregidos de sus aberraciones esféricas y cromáticas.

2.3. Diafragma Iris: Por debajo del condensador se dispone un diafragma regulable que gradúa la cantidad de luz que llega a la preparación.

2.4. Anillo porta filtro: Corresponde a un anillo de metal situado bajo el condensador en el cual puede colocarse un filtro de color. Al usar luz artificial rica en radiaciones rojas y amarillas de mayor longitud de onda, es recomendable el uso de filtros azules o verdes que absorban las radiaciones de mayor longitud de onda aumentando así el poder de resolución del aparato.

3. Componentes del Sistema de Amplificación.

3.1. Lentes oculares. Son sistemas ópticos ubicados en la parte superior del tubo del microscopio. Consistentes en un cilindro hueco que lleva dos lentes (simples o compuestos). La lente superior se denomina ocular y la inferior, de campo o colectora. A veces se usan también los oculares de compensación, que en combinación con los objetivos apocromáticos corrigen la aberración cromática restante de los objetivos. Así el objetivo apocromático corregido concentra más los rayos azules, en tanto que los oculares compensadores concentran más los rojos. Como resultado de la interacción la imagen aparece incolora. Los oculares se designan por su aumento (6X, 8X, 10X, 15X, 20X). Esto es importante por cuanto el aumento del microscopio es igual al producto del aumento del ocular por el del objetivo. En resumen, la función de los oculares es aumentar la imagen real e invertida dada por el objetivo y corregir algunos defectos de la misma, de manera que el ocular actúa como una lupa formando una imagen virtual, aumentada y derecha de la imagen real dada por el objetivo.

3.2. Lentes Objetivos: Corresponden a sistemas de lentes ubicados inmediatamente encima del objeto o preparación. Estas lentes dan una imagen aumentada, real e invertida. Existen diversos tipos de objetivos, los que se clasifican como sigue:

3.2.1. Según el medio interpuesto entre la lente y el objeto:

- **Objetivos a seco:** En estas lentes el medio interpuesto entre la lente y el objeto (preparación) es aire. Pueden ser apocromáticos o corrientemente acromáticos.

- **Objetivos de inmersión:** El medio interpuesto es un líquido viscoso transparente con un índice de refracción mayor que el del aire. Existen lentes de inmersión en agua o aceite (comúnmente aceite de cedro; $n = 1,515$). En general este aceite tiene un n semejante al del vidrio que cubre la preparación (cubreobjetos) ($n = 1,52$). Su función es concentrar los rayos que se habrían perdido por refracción en el portaobjetos.

3.2.2. Según la corrección de aberraciones: al pasar por las lentes esféricas los rayos sufren refracción y forman las imágenes. Debido a que las lentes no son perfectas, estos rayos no siempre convergen en el mismo punto por lo que la imagen puede mostrarse defectuosa en su forma (aberración esférica) o en su colorido (aberración cromática), debido a que las lentes tienden a descomponer la luz en sus componentes monocromáticos. Según la corrección de estas aberraciones podemos distinguir:

- **Objetivos acromáticos:** Son los objetivos más comunes. Tienen la aberración cromática corregida para el amarillo o verde, en tanto que la esférica está corregida para un sólo color.

- **Objetivos apocromáticos:** son corregidos para tres colores: rojo, verde y violeta, mediante lentes de espato flúor. La aberración esférica se encuentra corregida para dos colores; se utilizan especialmente para micrografía.

- **Objetivos semi apocromáticos o a fluorita (fluoruro cálcico):** No llegan a corrección cromática como los anteriores, pero dan imágenes muy luminosas, Son más baratos, por lo que su empleo es frecuente.

- **Objetivos monocromáticos:** son construidos con lentes de cuarzo y corregidos para una sola longitud de onda. Se usan en micrografía con luz ultravioleta. Se obtienen buenas imágenes incluso en objetos frescos o sin teñir dado el desigual poder de absorción de los diferentes elementos de una preparación histológica (de tejido biológico) a los rayos ultravioleta. A igual apertura numérica estos lentes poseen el doble de poder de resolución.

- **Objetivos de corrección:** Tienen un dispositivo (tornillo) que permite acercar o alejar la lente superior de la frontal con lo que se consigue captar más, o menos, los rayos periféricos.

3.2.3. Según la magnitud de campo del campo de imagen:

-**Objetivos corrientes:** Originan imágenes que aparecen en una superficie abombada con respecto al objetivo. Este abombamiento aumenta con el aumento de los objetivos. Dan focos distintos en el centro que en el borde de la imagen.

-**Objetivos planos:** se elimina el abombamiento, dando una imagen enfocada y plana en todo el campo.

3.3. Cualidades de un Objetivo

3.3.1. Poder de aumento. Es la razón entre el tamaño de la imagen que produce el objetivo y el tamaño real del objeto observado. El aumento es función de la distancia entre al objeto y la lente.

3.3.2. Distancia libre de trabajo. Es el espacio libre entre el lente frontal del objetivo y el objeto cuando este último se encuentra enfocado. Es menor mientras más aumento tenga la lente. Para un objetivo de 100X esta distancia es 0,1 mm.

3.3.3. Profundidad de foco. Es la distancia en que se ven nítidos un plano próximo y otro plano más alejado del objeto a un enfoque dado.

Tabla Nº 1 Valores para objetivos tipo

AUMENTO (X)	DISTANCIA LIBRE DE TRABAJO (mm)	PROFUNDIDAD DE FOCO (μM)
10	4 - 8	10
40	0,2 - 0,6	1 - 2
100	0,11 - 0,16	0,5

En la figura 1 se presenta la interpretación de los distintos signos y números que llevan grabados los objetivos acromáticos (ver fig. 1). 0,17 indica que el cubreobjetos de la preparación debe tener un espesor de 0,17 mm. Un guión (-) grabado en ese lugar indica que el objetivo puede usarse también sin cubreobjetos. Un cero (0) grabado en ese lugar indica que sólo debe usarse sin cubreobjetos. Además de esta designación se utiliza delante del aumento las iniciales FI o FI Ac si son objetivos de fluorita secos o de inmersión en aceite; Apo y Apo Ac en el caso de apocromáticos y PI o PI Ac si son planos.

Se denomina **PODER DE RESOLUCIÓN (PR)** a la máxima capacidad del microscopio de dar imágenes bien definidas de dos puntos situados muy próximos entre sí, en un mismo plano focal.

Se denomina **LÍMITE DE RESOLUCIÓN (LR)** a la mínima distancia que puede existir entre dos puntos situados muy próximos entre sí, en un mismo plano focal, para que el microscopio los pueda distinguir como independientes. Es función de la longitud de onda utilizada y de la apertura numérica del objetivo usado.

Como

$$LR = \frac{\lambda}{2 AN}$$

Para mejorar el Poder de Resolución (PR) hay que disminuir el Límite de Resolución y para disminuir el Límite de Resolución se debe disminuir la longitud de onda (λ) y aumentar la Apertura Numérica (AN).

Apertura numérica es la capacidad de la lente de captar el mayor número de rayos que vienen desde el objeto. ($AN = n \sin \alpha$), siendo n = índice de refracción.

Observe, usando el aumento mayor, distintos planos focales de su preparación. Note que cuando enfoca también se ven estructuras que están en otros planos (fuera de foco). Esto es una indicación del **PODER DE PENETRACIÓN** del instrumento que es la máxima capacidad de dar imágenes bien definidas de puntos situados muy próximos entre sí pero en distintos planos focales.

LR ojo humano = 0.2 mm

LR microscopio óptico = 0.2 μm

LR microscopio electrónico = 2 nm

Tabla Nº 2.- Conversiones de unidad de longitud

1 m/10	$10^{-1}m=1$ decímetro (dm)
1 m/100	$10^{-2}m=1$ centímetro (cm)
1 m/1000	$10^{-3}m=1$ milímetro (mm)
1 m/1000.000	$10^{-6}m=1$ micrómetro (μm)

1 m/1000.000.000	$10^{-9m}=1$ nanómetro (nm)
1 m/100.000.000.000	$10^{-10m}=1$ Angstrom (A°)
1 m/1.000.000.000.000	$10^{-12m}=1$ picómetro (pm)
1 m/1.000.000.000.000.000	$10^{-15m}=1$ fentómetro (fm)

LENTE OBJETIVA



4. USO DEL MICROSCOPIO

4.1. Saque la cubierta plástica del microscopio

4.2. Iluminación:

- Encienda la fuente de luz
- Abra completamente el diafragma
- Coloque la lente objetivo de menor aumento en posición de enfoque y aproxímela a la platina hasta su tope.
- Suba el condensador hasta su tope (la lente frontal del condensador se usa con objetivos mayores de 10X).
- Mire por el ocular y afine la iluminación moviendo el condensador

4.3 Colocación de la preparación:

- Cuidar que la preparación este limpia y **con el cubreobjetos hacia arriba**.
- Alejar la lente objetivo de la platina.
- Abrir la pinza de la platina.
- Depositar la preparación en el borde fijo y ajustar con la pinza.
- Centrar el objeto de manera que quede en el centro del orificio de la platina.

4.4. Enfoque de la preparación:

- Acercar la lente objetivo (**de aumento menor**) a la preparación, sin que ésta sea tocada por la lente.
- Mirar por el ocular y mover el macrométrico subiendo la platina hasta lograr el enfoque de la preparación (**Tope**).
- Afinar enfoque mediante el micrométrico ejecutando un movimiento leve de éste.

- d) Para enfocar con aumentos mayores basta con girar el revólver y colocar otra lente de mayor aumento, pues las lentes son parafocales. Cada vez que cambia de lente y haya enfocado abra y cierre el diafragma hasta obtener la mejor iluminación.

4.5. Enfoque con objetivo de inmersión:

- a) Enfocar la zona que se desea observar con el objetivo seco de aumento mayor.
- b) Girar el revólver de modo que quede en una posición intermedia entre el objetivo mayor seco y el de inmersión.
- c) Depositar cuidadosamente una gota de aceite sobre la preparación.
- d) Llevar el objetivo de inmersión al eje óptico.
- e) Girar suavemente el micrométrico hasta obtener foco apropiado. Después de usar aceite, una vez retirada la preparación, se debe limpiar ésta y el objetivo con un **pañó apropiado humedecido con alcohol isopropílico.**

4.6. Luego de usado, el microscopio debe ser cubierto, con el condensador abajo y en el eje óptico el objetivo de aumento menor.

5. CUIDADO Y LIMPIEZA DEL MICROSCOPIO

5.1. Componentes Mecánicos:

- a) Trasladar el microscopio cuidadosamente evitando golpearlo.
- b) Ubicar el instrumento en lugares no cercanos a lavatorios o mecheros
- c) No se debe forzar ningún control que esté aparentemente atascado.
- d) Mantener el instrumento cubierto cuando no está en uso.

5.2. Componentes Ópticos: Se debe tener cuidado de:

- a) No rayar la superficie de las lentes (el polvo ambiente puede actuar como abrasivo).
- b) No disolver el cemento con que se pegan las lentes en sus costuras (eliminar al máximo el uso de xilol, bencina, etc.).

5.3. Limpieza de los objetivos

- a) **Partículas de polvo.** Calentar un pincel de pelo limpio sin grasa y acercarlo a una ampolleta. Su carga electrostática atraerá fácilmente pequeñas partículas de polvo. Se puede usar también un chorro de aire seco proveniente de una perilla de goma. No se debe usar aire húmedo (soplar), ni frotar el lente con un paño seco, pues las partículas de polvo son suficientemente duras como para rayar las lentes.
- b) **Película de grasa y Humedad.** Humedecer con una mínima cantidad de alcohol isopropílico un paño suave o papel de lentes. Limpiar y luego secar. Por ningún motivo se debe sumergir una lente en un solvente orgánico (xilol, bencina, éter, alcohol, etc.).
- c) **Limpieza de los oculares.** El problema más frecuente de encontrar es polvo o grasa. Para comprobar donde están las manchas se debe retirar parcialmente el ocular del tubo y rotar la lente superior. La limpieza se realiza igual que las lentes objetivas.
- d) **Condensador.** Se limpia igual que las lentes objetivas.

5.4. Recomendaciones generales

- a) Sí necesita trasladar el instrumento tómelo siempre por la columna.
- b) Traslade el instrumento siempre en posición vertical para evitar la caída de los oculares.
- c) Mantenga las lentes limpias usando sólo el paño. dispuesto para este efecto.
NUNCA USE LOS DEDOS.
- d) No deje el microscopio al borde del mesón de trabajo.
- e) Evite el traslado innecesario del microscopio.
- f) **NO SAQUE LOS OCULARES.** Su caída puede significar su destrucción. Además esto evita la entrada de polvo al tubo.
- g) No mueva pieza alguna si no conoce exactamente su uso. En caso de duda dirijase al encargado del trabajo práctico.
- h) No ponga el mechero de gas encendido cerca del microscopio.
- i) No moje el microscopio. Si ello sucede, séquelo inmediatamente.
- j) Los movimientos de enfoque deben ser suaves, en especial con el tornillo micrométrico.
- k) Excepto para el caso del microscopio invertido, las preparaciones se ponen sobre la platina **con el cubreobjetos hacia arriba.**

AL TERMINAR SUS OBSERVACIONES:

- a) Desenchufar el microscopio de la red y **NO enrollar el cable de conexión.**
- b) Dejar limpios los objetivos y oculares usando el material que se le indique.
- c) Dejar limpia la platina
- d) Dejar el microscopio en posición de reposo:
 - d.1) Objetivo de menor aumento en posición de enfoque.
 - d.2) Diafragma abierto.
 - d.3) Condensador en el tope inferior
- e) Cubrir el microscopio con la funda plástica.
- f) Dejar limpios los materiales y el mesón de trabajo



ACTIVIDADES

Experiencia Nº 1: Instale su microscopio de la siguiente forma:

- a) el tubo dirigido hacia Ud.
- b) el revolver con el objetivo de menor aumento dirigido hacia la preparación. El revolver se mueve siempre en sentido contrario a los punteros de un reloj análogo
- c) el condensador en su posición más alta

Quien observe debe sentarse cómodamente frente al microscopio, con el cuerpo erguido y la cabeza inclinada sobre el ocular. No se aproxime demasiado a las lentes (la pupila de salida se encuentra un poco por encima de la lente ocular); recuerde que Ud. está observando **a través** del microscopio y no **en el** microscopio. Mientras observa, una mano maneja el tornillo micrométrico y la otra desplaza la platina. Observe con los dos ojos abiertos. (Si su microscopio posee sólo un ocular procure alternar ambos ojos para efectuar las observaciones)

Conecte el enchufe del microscopio a la red de 220 V; Al encender la lámpara el campo visual se iluminará de manera homogénea

Técnicas de preparación de células y tejidos para microscopía.

1. Observación a fresco o *in vivo*. La observación de células o tejidos puede realizarse *in vivo* o al estado fresco. Sin embargo, la información que es posible obtener a través de estos métodos es escasa. Con el fin de poder apreciar mejor algunos detalles estructurales suelen usarse los llamados **colorantes vitales** que aumentan el contraste, y que se usan sobre células vivas.

Experiencia Nº2: Con una **espátula** de madera raspe suavemente la mucosa de su boca, y luego frote la espátula sobre un portaobjetos (frotis). Agregue una gota de Azul

de Toluidina, espere algunos minutos y lave con gotas de agua destilada. Ponga un cubreobjetos y observe registrando sus observaciones.

2. Preparación permanente: es aquella que puede ser guardada indefinidamente. Para realizar una preparación de este tipo el tejido debe someterse a los siguientes tratamientos:

Fijación. Para obtener preparaciones permanentes es necesario detener la función y preservar las estructuras celulares lo más parecidas a las de las células vivas. Esto se consigue con los procesos de fijación. La fijación puede lograrse usando agentes **químicos o físicos.**

Inclusión. Una vez que el tejido ha sido fijado, debe tener la consistencia apropiada para poder cortarlo. Para ello resulta indispensable intercambiar el agua intra e intercelular por algún compuesto que se solidifique. Así el tejido fijado se somete a deshidratación y posterior impregnación, es decir incluir en el tejido, compuestos que le confieren mayor consistencia y dureza. Estos procedimientos constituyen la inclusión. Para microscopía óptica se usan en la inclusión la parafina y la celoidina o colodión. Para microscopía electrónica se usan plásticos polivinílicos como medios de inclusión. Entre ellos el Epón, Araldita, Spurr, etc.

Corte. Para poder observar en el microscopio es necesario disminuir el espesor del material biológico. Esto se consigue cortando el material en láminas de 5-10 μm para el M.O. Los instrumentos usados para efectuar los cortes se conocen como micrótomos (M.O.) o ultramicrótomos (M.E.). Los micrótomos usan cuchillas metálicas mientras que los ultramicrótomos utilizan cuchillas de vidrio o diamante.

Tinción: Las estructuras celulares presentan propiedades muy semejantes con respecto a la absorción de luz. Para aumentar la absorción de luz en forma diferencial se usan colorantes que tiñen diferencialmente algunas estructuras. El proceso por el cual se realiza esta etapa de la preparación del material se denomina **tinción.**

Experiencia Nº 3. Realice cortes transversales, longitudinales y sagitales de algunas frutas que le serán solicitadas previamente.

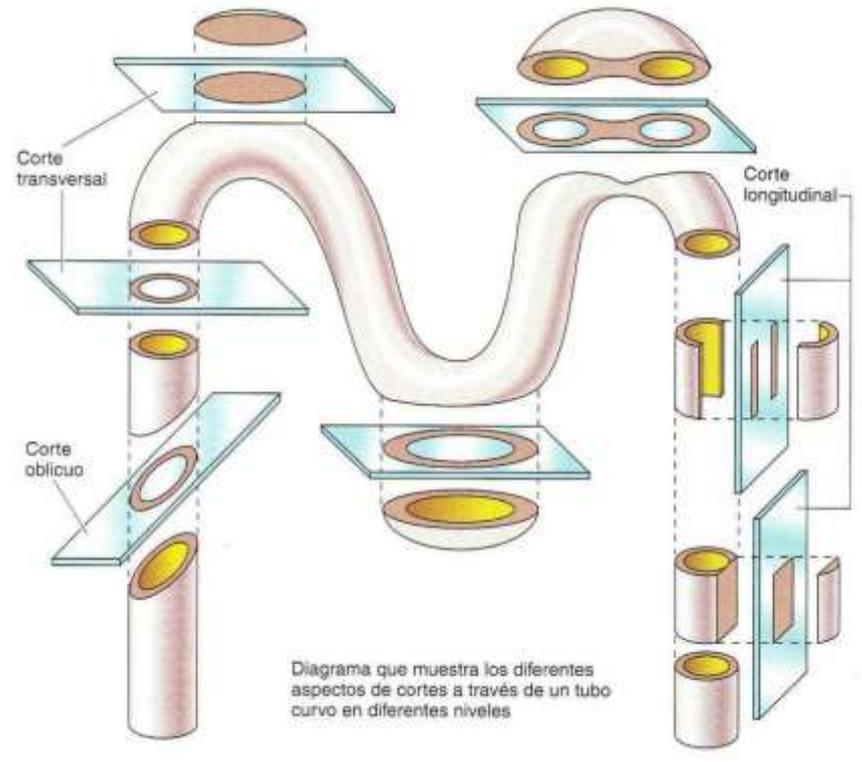
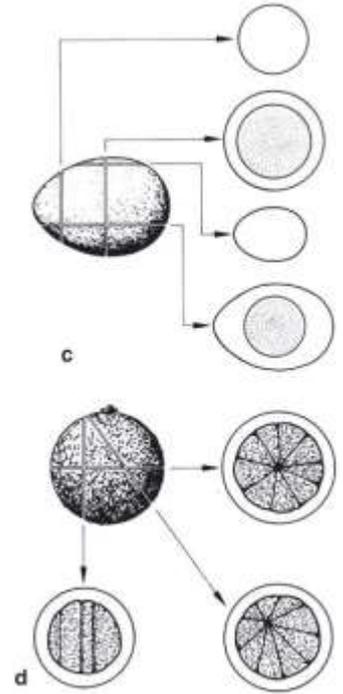
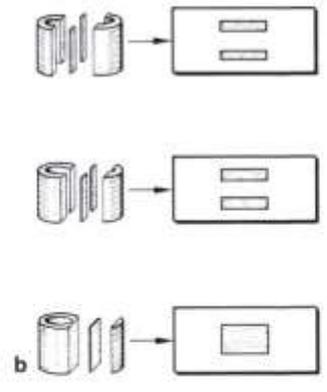
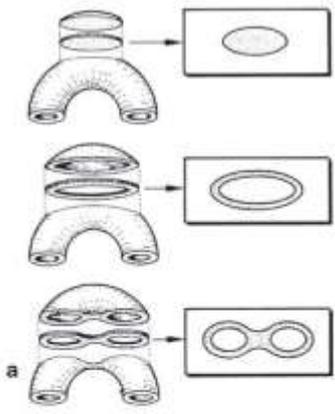


Diagrama que muestra los diferentes aspectos de cortes a través de un tubo curvo en diferentes niveles

Experiencia Nº 4. Observe una preparación permanente: Ej. Hígado

4.1. Descripción de una Preparación Microscópica. Toda descripción debe ser sistemática, es decir debe seguir un esquema ordenado y categorizado, indicando el aumento usado en su observación.

Observaciones específicas.

Células:

a) Descripción de la forma celular: células cúbicas, esféricas, cilíndricas, etc..

b) Relaciones. Se trata de establecer relaciones de células entre sí o con estructuras extracelulares o amorfas vecinas.

c) Características del núcleo.

Forma (esférico, lobulado, ovoideo, etc.).

Posición (central, basal, periférico).

Densidad óptica del núcleo (compactos o intermedios).

Número.

Nucléolo o nucléolos.

Relación núcleo-citoplasma.

d) Características del citoplasma. Según la técnica histológica empleada, el citoplasma se presentará homogéneo o estructurado.

CUESTIONARIO:

- 1.- ¿Cuáles son los componentes y función del sistema mecánico del microscopio?
- 2.- ¿Cuáles son los componentes y función del sistema de iluminación del microscopio?
- 3.- ¿Cuáles son los componentes y función del sistema de amplificación del microscopio?
- 4.- ¿Qué es un objetivo a seco?
- 5.- ¿Qué es un objetivo de inmersión?
- 6.- ¿Qué es distancia libre de trabajo?
- 7.- ¿Qué es profundidad de foco?
- 8.- Diferencie Poder de Resolución de Límite de Resolución. ¿Cómo se mejora el Poder de Resolución?

Tabla Nº 4.- Tamaño de algunas estructuras biológicas y químicas

ESTRUCTURA	TAMAÑO
Célula nerviosa humana (longitud)	1 m
Huevo de avestruz	11 cm
Huevo de gallina	70,0
Huevo de rana chilena	2,7
Huevo humano	140 µm
Célula nerviosa gigante de jibia (diámetro)	285 µm
Ameba	80 µm
Célula muscular lisa	60 µm
	18 µm

Célula hepática	7 μm
Glóbulo rojo (humano)	5 – 10 μm
Cloroplasto (longitud)	6 μm
Núcleo de célula hepática	0,7 μm (700 nm)
Mitocondria (longitud)	2 μm
<i>Escherichia Coli</i> (longitud)	600 nm
Lisosoma	200 – 300 nm
Cilio	100 nm
Virus grandes	80 nm
Membrana plasmática (espesor)	40 nm
Proteína globular (diámetro)	25 nm
Ribosoma (diámetro)	2 nm
Molécula de ADN (espesor)	600 pm
α -hélice (proteínas)	100 pm
Átomo de hidrógeno (diámetro)	1 A°

MICROSCOPIO ESTEREOSCOPICO (Lupa)

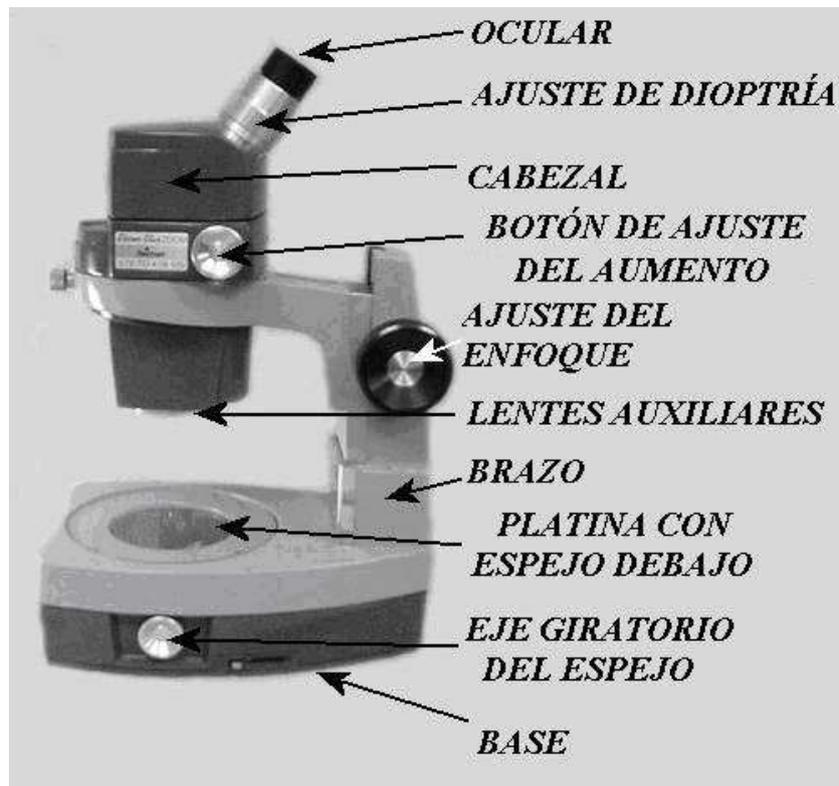
El microscopio estereoscópico está diseñado para producir una imagen tridimensional (estereoscópica). En realidad son dos lupas, colocadas una al lado de la otra y con cierta oblicuidad entre sí (15 grados), que da a la imagen el efecto de profundidad. La lupa posee una capacidad de aumento limitada, que oscila entre 1,5x a 50x, y forma una imagen aumentada y derecha.

Partes de la lupa:

- 1.-Oculares.
- 2.-Anillo para ajustar la visión personal.
- 3.-Tubo binocular
- 4.-Dispositivo para ajustar la distancia interpupilar del observador, a veces esto se logra moviendo los oculares.
- 5.-Tambor para cambio de aumento.
- 6.-Control de enfoque.
- 7.-Pilar ajustable.
- 8.-Luz.
- 9.-Base con placa, con una cara blanca y la otra negra, para la colocación del material.

Cómo enfocar una lupa:

- 1.-Seleccione la luz incidente, ajuste el control de la luz para proporcionar una iluminación uniforme sobre la placa.
- 2.-Ajuste los oculares a la separación entre los ojos.
- 3.-Coloque el ejemplar a observar sobre la placa.
- 4.-Enfoque mediante el control de enfoque, usando sólo el ojo izquierdo.
- 5.-Usando el ojo derecho enfoque moviendo el anillo de ajuste de visión personal. Después observe con los dos ojos.
- 6.-El aumento se varía, cuando es necesario, mediante el cambio de oculares y/o el tambor de cambio de aumento. El aumento de la lupa se calcula multiplicando el aumento del ocular por el aumento que indica el tambor de cambio.



MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA



Averigüe y describa brevemente en que consiste y la utilidad del microscopio de fluorescencia.

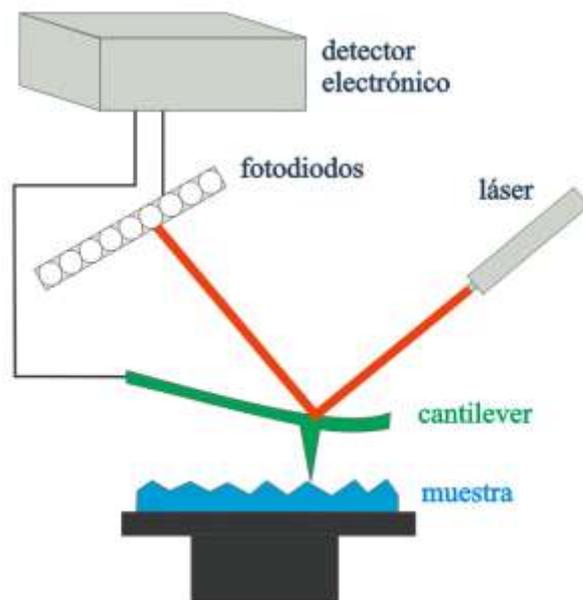
MICROSCOPIOS ELECTRÓNICOS DE TRANSMISIÓN (TEM) Y DE BARRIDO (SEM)



*SEM

Averigüe y describa brevemente en qué consisten y cuál es la diferencia entre TEM y SEM

MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA (AFM)



Averigüe y describa brevemente en qué consiste y la utilidad del microscopio de fuerza atómica (AFM)

EJERCICIO Nº 2

FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR Y SEPARACIÓN DE MOLÉCULAS

La materia viviente puede entenderse como el resultado de la interacción de múltiples componentes, los cuales se organizan y definen una red de componentes perteneciente a una clase de una unidad particular. Por lo tanto, resulta importante separar e identificar estos componentes y sus respectivas propiedades. De acuerdo con la naturaleza, número de unidades constituyentes y tamaño de los componentes, es posible reconocer distintos niveles de organización de la materia viva.

Para estudiar los distintos componentes de la materia viva se requiere frecuentemente la separación, aislamiento y la determinación de sus propiedades mediante el uso de distintos métodos. Los procedimientos de separación de moléculas relativamente pequeñas, metabolitos, organelos celulares y de macromoléculas son importantes en biología celular, y para ello existe hoy una creciente batería de métodos que permiten el estudio *in situ* e *in vivo* de las células y sus componentes.

1. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

El análisis bioquímico de los componentes celulares requiere de la ruptura de la célula, pero esta debe realizarse conservando sus estructuras y funciones. El fraccionamiento subcelular constituye una de las técnicas más utilizadas para la separación y estudio de los componentes celulares. Se basa en la separación de organelos (núcleo, mitocondrias, peroxisomas, lisosomas etc.) por centrifugación de acuerdo a sus tamaños.

El fraccionamiento subcelular se inicia con la homogeneización del tejido, lo cual puede realizarse por métodos mecánicos (mortero, homogenizador de pistón) y/o químicos (detergentes), para asegurar la ruptura de la membrana plasmática y obtener una suspensión de organelos subcelulares, membranas y restos celulares, que se denomina **HOMOGENEIZADO (H)**. El homogeneizado debe realizarse en un medio que permita conservar la estructura y función de los distintos organelos, es decir a temperatura, pH, fuerza iónica y osmolaridad adecuadas. Para células animales normalmente se utiliza Sacarosa 0,25M, pH 7,4. Una vez obtenido el homogeneizado, este se separa en sus distintos componentes aplicando un campo gravitacional centrífugo, lo que se denomina **FRACCIONAMIENTO**. La separación de los componentes subcelulares está dada por su velocidad de sedimentación.

El fraccionamiento subcelular se puede realizar por dos métodos:

1.1. Fraccionamiento Subcelular por centrifugación diferencial: Se basa en la aplicación de un campo centrífugo creciente al homogenizado. La primera centrifugación, de menor valor de centrifugación, permite separar un sedimento nuclear (**fracción N**) de un sobrenadante postnuclear que se denomina extracto (**fracción E**), que contiene los organelos subcelulares y componentes solubles que posteriormente se irán sedimentando a diferentes velocidades de centrifugación. La centrifugación del extracto permite separar un nuevo sedimento de mitocondrias pesadas (**fracción M**) y un sobrenadante, que al ser centrifugado a mayor valor de centrifugación decanta un sedimento que corresponde a organelos aún más pequeños (**fracción L**) y un sobrenadante que finalmente es separado como un

sedimento de microsomas (**fracción P**) y un sobrenadante final que corresponde a la fracción soluble o citosol (**fracción S**).

1.2. Fraccionamiento Subcelular por centrifugación isopícnica: Se basa en la separación de los componentes celulares de acuerdo a su densidad. Se requiere de la formación de un gradiente de densidad en el tubo de centrifuga, para lo que se utilizan distintos medios, como: Sacarosa, Percoll, Metrizamida, etc. El extracto se coloca sobre este gradiente y se somete a centrifugación, los componentes subcelulares migrarán en este gradiente y se detendrán al alcanzar su densidad de equilibrio, de manera que las distintas fracciones quedan separadas en el tubo de centrifuga en distintas bandas del gradiente pudiendo posteriormente ser colectadas individualmente.

Caracterización de las fracciones: La eficiencia de la separación, aislamiento y purificación de los distintos componentes subcelulares en el proceso de fraccionamiento subcelular (fracciones **E, N, M, L, P y S**) se evalúa mediante la determinación de proteínas en las distintas fracciones y la determinación de enzimas marcadoras que se localizan sólo en un organelo.

Puesto que durante el fraccionamiento subcelular los organelos están sometidos a procedimientos que pueden dañarlos (centrifugaciones, resuspensiones etc.), la propiedad de latencia enzimática que exhiben algunos de estos organelos permiten estimar el grado de conservación que presentan después del fraccionamiento. La **actividad latente** se define como aquella fracción de enzima que está en el interior de un organelo con una membrana impermeable al sustrato, es decir la enzima es inaccesible al sustrato a menos que la membrana del organelo sea destruida por acción de un agente lítico (detergente, choque osmótico etc.).

La actividad medida en condiciones **no líticas** (organelo intacto) corresponde a la **actividad libre**, es decir la fracción de enzima que es accesible para el sustrato, ya sea porque ha salido del organelo y se encuentra en solución o bien porque la barrera de permeabilidad que impide la interacción enzima-sustrato no es lo suficientemente efectiva. La actividad medida en condiciones **líticas**, que destruyen la membrana del organelo y permiten una eficaz interacción enzima-sustrato, se denomina **actividad total** y es la que se mide en las distintas fracciones.

2. CROMATOGRAFIA LIQUIDA.

La cromatografía es un procedimiento que permite la separación para fines analíticos, o preparativos, de diversas moléculas y macromoléculas de una mezcla. Las moléculas, o macromoléculas que serán separadas se disuelven en un solvente que constituye la **fase móvil** del sistema cromatográfico. Esta mezcla se aplica a una columna de vidrio, o columnas de polímeros insolubles pero altamente hidratados (dextranos, agarosa o poli(acrilamida)), que se encuentran rellenas con una matriz sólida y porosa, en equilibrio con un solvente apropiado, que se denomina **fase estacionaria**. El método se basa en que las interacciones de la molécula a separar con la fase estacionaria retardan su migración a través de la columna en una manera que depende de su naturaleza (carga, tamaño, etc.). De este modo, la recolección de fracciones de un volumen definido de una mezcla permite la separación y el aislamiento (o el enriquecimiento) de una determinada molécula que se encontraba mezclada con otras originalmente.

Los tipos de cromatografía líquida más usados para aislar y caracterizar moléculas de interés biológico son: **Cromatografía de exclusión molecular** (o de filtración en gel), **Cromatografía de afinidad** y **Cromatografía de intercambio iónico**. Además existen otros tipos de cromatografía como por ejemplo, cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía en papel, cromatografía de fase reversa y cromatografía de gases. Actualmente, la resolución (eficiencia de separación) de los procedimientos cromatográficos ha sido mejorada con la introducción de columnas casi capilares en las cuales la fase móvil circula a una presión determinada que es generada por una bomba (High Performance Liquid Chromatography, o HPLC)

2.1. Cromatografía de exclusión molecular. Es una técnica basada en la migración diferencial de solutos (moléculas) disueltos a través de geles que tienen poros de tamaños definidos, los cuales son separados de acuerdo con su tamaño y forma. Las moléculas que van a ser separadas idealmente no interactúan con la fase estacionaria, la que presenta una porosidad definida que permite discriminar distintos intervalos de peso molecular (tamaño) debido a que las moléculas penetran los poros de la matriz y son retenidas diferencialmente. Así, moléculas de tamaño mayor que los poros de la fase estacionaria migrarán más rápido a través de la columna puesto que son excluidas de los poros, en tanto que las moléculas más pequeñas penetrarán libremente los poros resultando más y por lo tanto su migración a través de la columna será más lenta. Los medios de soporte comúnmente encontrados en el mercado son geles hechos de bolitas (esferas) de un polímero de hidrato de carbono y conocidos como dextrano (serie Sephadex: (polisacáridos de origen bacteriano), poliacrilamida (serie Bio-Gel P) y agarosa (serie Sepharose), respectivamente.

2.2. Cromatografía de afinidad. Es un método específico y conveniente para realizar la purificación de proteínas. Se basa en la propiedad que tienen algunas moléculas de unirse específicamente a otras de manera no covalente. En este caso la fase estacionaria se ha derivatizado (unido) covalentemente con una molécula (el ligando) que es reconocida por ejemplo, por una proteína o varias proteínas. De este modo todos los demás componentes de una mezcla que no tengan afinidad por el ligando no serán retenidos en la columna cromatográfica. La obtención (anglicismo: elución) de las moléculas de interés, es decir, la eliminación de su interacción con la resina, se hace cambiando la fuerza iónica de la fase móvil o agregando el ligando libre en la fase móvil.

2.3. Cromatografía de intercambio iónico. La separación que ocurre en esta clase de cromatografía, se basa en las propiedades ácido/base de las moléculas que se quiere separar. En este caso, la fase estacionaria está derivatizada con grupos cargados, cuya naturaleza determina los tipos de iones con los cuales interactúan y la fuerza con que lo hacen. La elución en este caso se hace modificando el pH y/o la fuerza iónica de la fase móvil. Entre las resinas más usadas para este tipo de cromatografía se encuentra la DEAE-Celulosa (dietilaminoetil-celulosa, intercambiador aniónico) y la CM-Celulosa (carboximetil-celulosa, intercambiador catiónico). Existen además otros intercambiadores como DEAE-Sephadex, CM- Sephadex, Dowex, MonoQ y MonoS (los dos últimos se emplean en los procedimientos de HPLC).

3. ELECTROFORESIS

Una de las técnicas más usadas en la separación y caracterización de una amplia variedad de moléculas cargadas como aminoácidos, polipéptidos, proteínas y ácidos nucleicos es la electroforesis. La electroforesis se basa en la movilidad diferencial de moléculas cargadas en un campo eléctrico que se aplica sobre una

matriz porosa (no obstante, los primeros sistemas de electroforesis no contemplaban una matriz porosa, y en los sistemas más recientes de electroforesis capilar tampoco se usa dicha matriz). Entre los soportes comúnmente empleados se encuentran la agarosa, el acetato de celulosa, el almidón y, principalmente, la **poliacrilamida**. Esta última es un polímero de acrilamida y bisacrilamida; el uso de distintas relaciones de acrilamida: bisacrilamida, así como variaciones en la concentración de acrilamida, permiten controlar muy precisamente el tamaño del poro formado durante la polimerización lo cual mejora notablemente la resolución de esta técnica.

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE- polyacrylamide gel electrophoresis) puede hacerse en condiciones **nativas** o **desnaturantes**. En la primera las moléculas migrarán en el campo eléctrico fundamentalmente en función de su carga. En condiciones desnaturalantes en cambio, la migración dependerá principalmente del peso molecular (tamaño). El agente desnaturalante más empleado es el dodecil sulfato de sodio (SDS), el cual se une a las proteínas confiriéndoles una carga neta negativa. Otro agente desnaturalante usado es la urea; algunas técnicas electroforéticas emplean una mezcla de ambos agentes. Uno de los usos frecuentes de la electroforesis desnaturalante es la determinación del peso molecular relativo de proteínas, así como también la longitud (tamaño en pares de bases) de fragmentos pequeños de ácidos nucleicos.

La detección de las proteínas en el gel se hace tiñendo éste con Azul de Coomassie o con un procedimiento que involucra la unión de plata (Ag) a las proteínas. Las moléculas de DNA se evidencian por tinción con bromuro de etidio. Otros métodos implican la detección por autorradiografía de moléculas que han sido marcadas, con algún compuesto radiactivo, previamente para este efecto. Finalmente, cuando se dispone de anticuerpos dirigidos contra la proteína de interés, las proteínas separadas durante la electroforesis se transfieren hacia una membrana de nitrocelulosa (electrotransferencia o blotting) la cual se hace reaccionar con el anticuerpo el que es posteriormente reconocido ya sea porque tiene unida alguna enzima (para lo cual se agrega el sustrato de dicha enzima), alguna sustancia fluorescente o algún isótopo radiactivo.

La electroforesis puede ser uni- o bidireccional según se aplique un campo eléctrico en una sola dirección o seguido de otro campo eléctrico en 90° con respecto del primero.

4.- ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS (*Western Blot*)

La purificación de una proteína, o de cualquier otra molécula, requiere de un método específico capaz de detectar la molécula de interés. En el caso de las proteínas, estos ensayos de detección, dependen de alguna característica particular de la proteína que se desea estudiar. Ejemplos de esto son la capacidad de unir un ligando de manera específica, la capacidad de catalizar una reacción química, o de ser reconocida por un anticuerpo específico.

Uno de estos métodos es el denominado *Western blot* (también referido como *Inmuno blot*). Este procedimiento permite identificar una proteína de interés, entre aquellas que han sido separadas previamente por electroforesis. El método se basa en el uso de dos anticuerpos diferentes: el primero (primer anticuerpo) específico para la proteína de interés y el segundo (segundo anticuerpo) específico para reconocer la fracción Fc del primero y unido a una molécula marcadora que permita detectarlo.

En términos generales, luego de realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida, el gel se pone en contacto con una membrana y las proteínas se transfieren del gel a la membrana de nitrocelulosa aplicando corriente continua (electrotransferencia), la cual se incuba con una solución del anticuerpo específico para una proteína. Sólo a la banda que contiene la proteína se unirá el anticuerpo específico. Posteriormente se lava, para eliminar el exceso de anticuerpo, y se incuba con un segundo anticuerpo que corresponde a un anti-IgG del organismo en que fue producido el primer anticuerpo. Este segundo anticuerpo se unirá específicamente al primero y además está unido a alguna molécula que puede ser detectada. Por ejemplo, puede estar unido covalentemente a fosfatasa alcalina, de manera que al agregar el sustrato se cataliza una reacción que forma un precipitado de color púrpura oscuro, el cual quedará depositado específicamente en la banda donde se encuentra la proteína buscada.

Las etapas que típicamente deben efectuarse para llevar a cabo una electrotransferencia seguida por una detección con anticuerpos son las siguientes:

4.1. Preparación del gel y transferencia a membrana de nitrocelulosa

Se prepara un gel de poliacrilamida-SDS. Se cargan las muestras que se desea analizar y estándares de pesos moleculares pre-teñidos y se desarrolla la electroforesis

Luego de efectuada la electroforesis, se debe preparar el "*sandwich*" para la transferencia, el cual está compuesto por dos esponjas plásticas, dos láminas de papel Whatman 3MM, una lámina de membrana de nitrocelulosa y el gel de poliacrilamida-SDS, todo entre dos soportes de plástico perforado.

El conjunto descrito más arriba se pone en una cámara de transferencia con la **membrana de nitrocelulosa hacia el polo positivo (+)**. La cámara se llena con una solución amortiguadora de pH que típicamente contiene Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%, pH 8,4. Generalmente la transferencia se hace a temperatura ambiente a 200 mA durante 30 min. La eficiencia de la transferencia se determina por el traspaso de los estándares preteñidos del gel a la nitrocelulosa.

4.2. Incubación con anticuerpos

El papel de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se incuba con una mezcla que contiene PBS 1X y leche 3%, para bloquear los sitios de unión libres, a temperatura ambiente con agitación durante 30 min.

Posteriormente la membrana se incuba con una dilución apropiada del suero de conejo que contiene el anticuerpo contra la proteína de interés (primer anticuerpo) en PBS 1X-Leche 3% por 30 min, en las mismas condiciones anteriores. Luego se lava tres veces con una solución PBS 1X-Tween 20 0.05%, 1 min cada vez.

Luego se incuba con el segundo anticuerpo por 1 hora. Este anticuerpo es un conjugado de anti-IgG de conejo producido en cabra y que está unido a una enzima. Posteriormente se lava tres veces con PBS 1 X-Tween 20 0,05%, 1 min cada vez.

4.3. Detección del anticuerpo

Se detecta la reacción catalizada por la enzima conjugada con el segundo, poniendo la membrana en un medio que contiene los sustratos de la enzima en

condiciones apropiadas para que la enzima funcione. Una de las enzimas más usadas en estos procedimientos es la fosfatasa alcalina.

Experiencia Nº 1 Conocer los componentes de un aparato de electroforesis y de electrotransferencia

- a) Observe los distintos componentes de un aparato de electroforesis para geles planos; recibirá una explicación del funcionamiento del sistema.
- b) En geles previamente teñidos observe la migración diferencial de las proteínas y estime, los pesos moleculares de las proteínas observadas; recibirá las instrucciones de su profesor.
- c) Observe los distintos componentes de un aparato de electrotransferencia.

Experiencia Nº 2 Cromatografía de Exclusión

Observe el comportamiento cromatográfico de una mezcla de Azul Dextrano y Ferricianuro de Potasio en columnas Sephadex G25.

Materiales:

Columnas de Sephadex 25

40 µl de Solución de Azul Dextrano-Ferricianuro de Potasio, glicerol.

Tris 10 mM pH 7.5

Tubos de ensayo

1. La columna se encuentra con solución amortiguadora
2. Deposite la mezcla Azul Dextrano-Ferricianuro de Potasio
3. Permita que esta escurra
4. Recolecte en los tubos de ensayo

¿Qué componente sale primero, discuta por qué con sus compañeros?

Experiencia Nº 3 Cromatografía de capa fina (TLC)

Determinar la composición de una mezcla de aminoácidos usando la técnica cromatográfica TCL en láminas de Silica gel 60 F₂₅₄

Materiales comunes en una TCL:

Fase estacionaria: Placas de Silica gel 60 F₂₅₄

Fase móvil: solvente, mezcla de solvente.

Mezcla de compuestos: azúcares simples, aminoácidos, polipéptidos, etc.

Agentes reveladores: Lámpara UV; Vainillina, ácido fosfomolibdico, Permanganato de potasio, Ninhidrina en atomizador

- a) Para el desarrollo y cuidados de esta técnica recibirá una explicación del Profesor.
1. Identifique el número de aminoácidos que componen la mezcla desconocida.
 2. Determine y explique el orden de migración de aminoácidos?
 3. Calcule el R_f de los distintos componentes de su mezcla problema
 4. Dibuje su placa cromatográfica, identificando sus componentes en ella.

EJECUCIÓN:

Determinación de R_f

$$R_f = \frac{\text{Distancia de la muestra}}{\text{Distancia del solvente}}$$

Identificación Muestra problema	N° componentes de la mezcla	Distancia recorrida	R _f
1			
2			
3			
4			

Distancia recorrida por el frente móvil (solvente): _____

CUESTIONARIO:

1. ¿En que se basa la técnica de fraccionamiento subcelular?
2. Distinga entre fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial y fraccionamiento subcelular por centrifugación isopícnica.
3. En la técnica de Cromatografía líquida ¿qué se entiende por fase móvil y fase estacionaria?
4. Distinga entre Cromatografía de Exclusión Molecular, de Afinidad y la de Intercambio Iónico.
5. ¿Cuál de los procedimientos cromatográficos tratados anteriormente permite la determinación del peso molecular nativo de una proteína?
6. Con respecto a la electroforesis:
 - a) en qué se basa
 - b) ¿Qué significa que la electroforesis pueda hacerse en condiciones nativas o desnaturalantes?
7. Averigüe que diferencia hay entre un anticuerpo policlonal y un anticuerpo monoclonal
8. Averigüe que otros métodos de detección, además de la fosfatasa alcalina, se usan para la detección

EJERCICIO Nº 3

BIOLOGIA DE MEMBRANAS TRANSLOCACION CELULAR

Los seres vivos operan como sistemas termodinámicamente abiertos, esto es, intercambian continuamente materia y energía con su medio. Este intercambio se realiza especialmente a través de la membrana celular por un proceso que llamaremos **translocación**. Este proceso puede ser el resultado de varios mecanismos: flujo influenciado por una diferencia de presión; difusión debida a una diferencia de potencial químico; migración a través de un campo eléctrico o a la intervención directa de la membrana celular a través del transporte.

TRANSLOCACION:

1. - Pasiva o física

1.1. – Difusión

1.2. – Osmosis

2. – Activa o transporte

2.1. – Facilitado (Down hill)

2.2. – Activo (Up hill)

La actividad práctica a realizar consistirá en:

1. Demostración del fenómeno de difusión
2. Selectividad de membrana

DIFUSION.

La difusión es un proceso debido al movimiento al azar de las moléculas en solución. Si se establece una diferencia de concentración de moléculas en una zona de la solución, habrá movimiento neto de moléculas desde la zona de mayor a la de menor concentración. El movimiento de las moléculas en la solución depende de la temperatura.

DIFUSION A TRAVES DE MEMBRANA. SELECTIVIDAD.

Algunas moléculas, dependiendo de su tamaño, pueden atravesar membranas porosas por difusión. La rapidez del movimiento depende de la diferencia de concentración entre ambas caras de la membrana, y de la naturaleza físico-química de la sustancia que difunde (tamaño, carga eléctrica, espesor, superficie, estructura).

Para que una molécula atravesase una membrana debe pasar, en primer lugar, desde la solución a la membrana. Luego debe moverse en el espesor de ella para salir finalmente a la solución que baña el otro lado de la membrana. Una membrana porosa, por ejemplo el celofán, seleccionará las moléculas que le atraviesan de acuerdo a su tamaño. La selectividad de esta membrana estará entonces dada por el tamaño relativo de sus poros al de la molécula que la atraviesa. En una membrana compleja, como la membrana celular, la estructura química de ella será otro factor de selectividad. La membrana celular está compuesta de lípidos (en gran porcentaje) y por lo tanto el paso de moléculas desde la solución a la membrana dependerá de su solubilidad en lípidos.

Experiencia N° 1 Transporte a través de membrana usando un modelo animal

(Se sugiere que cada estudiante replique este experimento en su casa)

Proceda a sumergir huevos de codorniz, desmineralizados en ácido acético 5% por al menos 48 hrs., en los siguientes medios:

- I. 50 ml de una mezcla compuesta de almidón 0,5% y NaCl 1.0 M
- II. 50 ml de agua destilada
- III. 50 ml. de miel de maíz (*corn syrup*).

Espere al menos una hora y haga las determinaciones que se detallan a continuación. Observe lo que sucede con el huevo sumergido en las tres soluciones.

Determinación de Almidón. Tome cuatro tubos de ensayo y márkelos; agregue volúmenes aproximados de las soluciones que se indican en las siguientes tablas:

Tubo	1	2	3	4
Solución interna huevo en agua destilada	1 ml	-	-	-
Solución interna huevo en mezcla	-	1 ml	-	-
Solución externa huevo en agua destilada	-	-	1ml	-
Solución externa huevo en mezcla	-	-	-	1ml
Reactivo Lugol	1 gota	1 gota	1 gota	1 gota
Resultado (+, -)				

Los volúmenes son aproximados

Determinación de Cl⁻. Tome tres tubos de ensayo y trabaje de acuerdo a lo indicado en la siguiente tabla.

Tubo	1	2	3	4
Solución interna huevo en agua destilada	1 ml	-	-	-
Solución interna huevo en mezcla	-	1 ml	-	-
Solución externa huevo en agua destilada	-	-	1ml	-
Solución externa huevo en mezcla	-	-	-	1ml
AgNO ₃ 2%	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Resultado (+, -)				

Los volúmenes son aproximados

1. ¿En qué se basa el reconocimiento de almidón con lugol?
2. Analice el resultado obtenido con Lugol
3. Escriba la reacción que se produce entre Cl⁻ y AgNO₃.
4. Analice el resultado obtenido con AgNO₃
5. Prediga que sucederá a un huevo que se sumerge en una solución 2 M NaCl. Explique.

OSMOSIS Y TONICIDAD CELULAR

Osmosis es el proceso por el cual el solvente se mueve espontáneamente de una región en la que su actividad es alta, hacia otra donde la actividad es menor. El proceso tiene lugar cuando una membrana semipermeable ideal separa una solución de solvente puro de otra que contiene un soluto (o dos soluciones con distintas concentraciones de soluto).

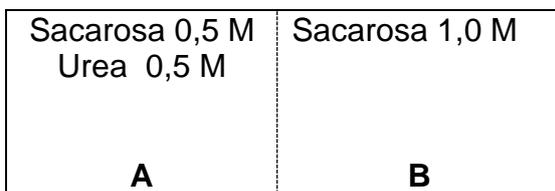
La mayor parte de las membranas presentan permeabilidad selectiva, esto es algunas moléculas de soluto no pueden atravesar la membrana mientras que otras si pueden hacerlo. La presión osmótica en un sistema como el descrito, que se mantiene a una temperatura dada, se define como la presión que debe ejercerse sobre la solución para impedir cualquier movimiento neto de solvente entre la solución y el solvente puro, cuando ambas están separadas por una membrana semipermeable ideal.

La **presión osmótica** en un sistema en que los solutos son no-electrolitos, es directamente proporcional a la suma de las concentraciones molares de todas los solutos. De aquí, sistemas ideales de igual molaridad son isosmóticos (poseen la misma presión osmótica). Este potencial osmótico es expresado completamente cuando, a una temperatura dada, la solución se encuentra separada del solvente puro por una membrana semipermeable ideal. Si la membrana es selectivamente permeable (como es el caso de las membranas biológicas) y permite el paso del solvente mientras que impide el paso de otros solutos, el sistema expresará sólo aquella **fracción del potencial osmótico debido a los solutos para los cuales la membrana es impermeable**. Esta fracción de la presión osmótica total del sistema es lo que conocemos con el nombre de **tonicidad**.

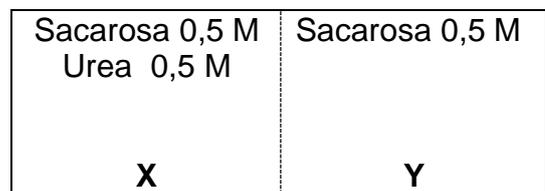
Por lo tanto, la tonicidad de una solución no puede predecirse exclusivamente a partir de su composición (lo que sí puede hacerse en el caso de la presión osmótica) (ver figura más adelante)

MEMBRANA SELECTIVAMENTE PERMEABLE

(Permeable a la urea e impermeable a la sacarosa)



A es Isosmótico con B
A es Hipotónico respecto de B



X es Hiperosmótico respecto de Y
X es Isotónico con Y

CUESTIONARIO GENERAL

- 1.- ¿Qué es traslocación?. Tipos de traslocación.
- 2.- ¿Qué es difusión?
- 3.- ¿Qué es osmosis?
- 4.- ¿Qué es tonicidad celular?
- 5.- Distinga entre isosmótico e hiperosmótico.
- 6.- Distinga entre hipotónico e isotónico.

EJERCICIO N° 4

CITOESQUELETO Y UNIONES CELULARES

El movimiento celular y de las estructuras subcelulares, el batimiento de cilios y flagelos, el movimiento de cromosomas y la migración de células por un sustrato involucran la interacción entre componentes del citoesqueleto. En este trabajo práctico se mostrarán ejemplos en que esta interacción ocurre.

Experiencia N°1:

Presentación de modelos preparados por los estudiantes (Instrucciones y distribución entregada con anterioridad)

- A) componentes del citoesqueleto
- B) cilios y flagelos
- C) uniones celulares

Movimiento citoplasmático: En el citoplasma de las células, además del movimiento browniano, se observan movimientos direccionales de los organelos que están en general asociados a microtúbulos aunque algunos ocurren a lo largo de microfilamentos.

Experiencia N° 2:

Coloque una hoja de *Elodea*, previamente iluminada, en una gota de agua sobre un portaobjetos, cubra y observe con aumento menor. Describa el movimiento de los cloroplastos.

Movimiento ciliar: Los cilios tienen aproximadamente $0.25\mu\text{m}$ de diámetro y están constituidos por microtúbulos. Producto de su movimiento se produce el desplazamiento de fluido sobre la superficie de las células (ej. células epiteliales) o el movimiento de células en un fluido (ej. protozoos).

Experiencia N° 3:

Coloque sobre un portaobjeto en una gota de agua de mar artificial un trozo de branquia de molusco, cubra presionando suavemente y observe con aumento menor las estructuras de las células epiteliales. Con aumento mayor observe las características del movimiento ciliar.

Cuestionario:

1. Averigüe qué es el movimiento browniano
2. Caracterice cilios y flagelos
3. Componentes de las microvellosidades
4. Caracterice las siguientes uniones celulares: Tight Junctions, Gap junctions, desmosomas y hemidesmosomas

EJERCICIO N° 5

MITOSIS, INDICE MITOTICO Y MEIOSIS

I.-MITOSIS

Para poder observar las distintas fases de la mitosis es necesario el uso de un tejido que esté en proliferación, donde se encuentran células en división activa. Por esta razón uno de los tejidos más usados es el meristema apical de las raíces en crecimiento que ofrece, además, facilidad en la obtención y observación.

OBJETIVOS

1. Observar preparaciones temporales de tejidos vegetales en los que se encuentran células en división.
2. Observar el efecto de drogas que interfieren el curso normal de la división celular
3. Observar al microscopio las diferentes etapas de la mitosis e interpretarlas.

Experiencia N° 1. Observación de preparaciones

El meristema radicular es un tejido altamente proliferativo, de modo que presenta gran cantidad de células en división. Por esta razón resulta ser muy útil a la hora de realizar preparaciones que nos permitan observar células en las distintas etapas de la división celular. Para ello se toma una raíz de cebolla (*Allium cepa*) de unos 5-10 mm. de longitud. la que se corta a 3 mm del extremo y se coloca en un vidrio reloj que contenga colorante (orceína aceto-clorhídrica). El vidrio se calienta a la llama hasta que comience a salir vapor. Luego se deja enfriar. Una vez frío, el tejido se coloca en trozos transversales lo más finos posible, sobre un portaobjetos, que ya contenga una gota de colorante.

La preparación se cubre con un cubreobjetos para hacer el aplastado o "squash", apretando suavemente el cubreobjetos contra el portaobjetos, usando el dedo pulgar o la punta de un lápiz. Se debe tener cuidado de que la superficie donde se realiza esta operación sea lisa a fin de no romper la preparación; así mismo, el cubreobjetos puede romperse si el corte es demasiado grueso. Es conveniente colocar el papel filtro entre el cubreobjetos y el dedo, para no mancharse con el colorante que es irritante para la piel. De esta manera las preparaciones están listas para ser observadas.

Se le proporcionarán aplastados de raicillas de cebolla preparados previamente de la manera antes indicada. Identifique y dibuje los estados mitóticos según la clave que aparece a continuación:

- | | | |
|--|-------|-------------------------|
| I) Cromosomas no visibles (II) | | Interfase |
| A) Células de tamaño normal | | Interfase |
| B) Dos células ocupando el espacio de una | | Células hijas |
| II) Cromosomas visibles | | |
| A) Membrana nuclear visible (B) | | |
| 1) Núcleo visible | | Profase temprana |
| 2) Dos núcleos visibles | | Telofase tardía |

- B)** Membrana nuclear no visible
- 1) Un conjunto de cromosomas (2)
 - a) Cromosomas esparcidos por el huso **Profase tardía**
 - b) Cromosomas en línea recta en el huso **Metafase**
 - 2) Dos conjuntos de cromosomas visibles unidos por el centrómero
 - a) Dos conjuntos levemente separados (b) **Anafase temprana**
 - b) Dos conjuntos totalmente separados
 - b*) Cromosomas individualizables **Anafase tardía**
 - b**) Cromosomas no individualizables **Telofase**

Experiencia Nº 2. Tratamiento con colchicina

La colchicina es un compuesto que interfiere con la organización de los microtúbulos (un microtúbulo es una estructura dinámica en la que permanentemente están entrando y saliendo moléculas de tubulina). Por tanto la exposición de células en división a este agente resulta en que los cromosomas metafásicos no se separan para migrar hacia los polos de la célula en división. En otras palabras, la división se detiene en la etapa de metafase. Se le proporcionarán preparaciones de raicilla de cebolla tratadas con colchicina en las que usted deberá identificar células en distintas etapas mitóticas.

Experiencia Nº 3. Tratamiento con cafeína

La cafeína es un compuesto que interfiere la citoquinesis, impidiendo la fusión de vesículas producidas en el Golgi que van a formar la nueva membrana. El resultado de esto es la formación de células binucleadas. Se le proporcionarán preparaciones de raicillas de cebolla tratadas con cafeína en las que usted deberá identificar células binucleadas.

Experiencia Nº 4. Duración del ciclo celular y evaluación del índice mitótico

La duración relativa de cada una de las etapas del Ciclo Celular, se encuentra en relación directa con el número de células que pueden observarse en cada etapa en un momento dado. De este modo, si el número de células observadas en una etapa es alto indica que, proporcionalmente, el tiempo requerido para que dicha etapa se complete es mayor que aquellas que presentan un menor número de células. Estos valores pueden cuantificarse de forma que es posible calcular lo que se ha denominado el Índice Mitótico. Este valor representa el porcentaje de células que en un determinado momento se encuentran en división. El mismo razonamiento puede aplicarse para el cálculo del Índice de Fase que representa el porcentaje de células que en un determinado momento se encuentran en una etapa dada de la Mitosis.

La duración total del Ciclo Celular varía en los diferentes tejidos de acuerdo con la actividad proliferativa. En tejidos de activa proliferación el ciclo es en general de corta duración, pero en tejidos diferenciados las células pueden detenerse indefinidamente en una etapa.

En la siguiente tabla se muestran valores de etapas del ciclo celular para diferentes tipos celulares.

TIPO CELULAR	FASE, Horas			
	M	G ₁	S	G ₂
Epitelio intestinal de ratón	1	9	7	1-5
Meristema radicular*	2-6	1-15	10-30	3-9
Células osteoprogenitoras	3	25	8	2,5-3
rFibroblasto en cultivo	0,5-2	6	8	5

* Valores dependientes de condiciones ambientales como por ejemplo la temperatura.

Al igual que las preparaciones anteriores Ud. deberá reconocer células interfásicas y en diferentes etapas de la mitosis. Además, calculará el Índice Mitótico e Índice de Fases del tejido meristemático apical de raíz de cebolla.

En la preparación que Ud. usó en la experiencia N°1, cuente un total aproximado de 500 células anotando la etapa del ciclo en que se encuentra cada una de ellas. Anote sus resultados en la Tabla que se encuentra a continuación. Calcule el Índice Mitótico de acuerdo a la expresión:

$$IM = (\text{N}^\circ \text{ CELULAS EN MITOSIS} / \text{N}^\circ \text{ TOTAL DE CELULAS}) \times 100$$

Utilizando los mismos datos calcule el Índice de Fases de acuerdo a la expresión:

$$IF = (\text{N}^\circ \text{ CELULAS EN LA FASE} / \text{N}^\circ \text{ CELULAS EN MITOSIS}) \times 100$$

Suponiendo que la duración del ciclo en el tejido analizado es de 16 horas, calcule el tiempo aproximado de duración de cada estado en horas y minutos. Compare sus datos con los del total general de su grupo y discuta la discrepancias (si las hubiera) entre los resultados.

ETAPA	N° células	% células	Indice fase	Tiempo fase
Interfase				
Profase				
Metafase				
Anafase				
Telofase				
TOTAL				

II.- MEIOSIS

La meiosis no es un tipo habitual de reproducción celular sino que consiste en un tipo especial de división de la célula, íntimamente relacionado con la reproducción sexual (destinado a mantener la constancia numérica de los cromosomas, que de otro modo se duplicarían en número en cada generación, después de cada fecundación) .Como consecuencia, se forman células hijas (haploides, n)portadoras de tan sólo ,la mitad de los cromosomas de la célula madre (diploide, 2n). En las plantas superiores y en los animales, la meiosis tiene lugar antes de la formación de los gametos, y las células) resultantes (gametos quedan localizadas en órganos específicos.

Que una especie sea útil para el estudio de la meiosis, depende de muchos factores: que sea fácilmente localizable y conservable; que posea un $2n$ bajo y con cromosomas grandes; o el hecho de que sea posible observar todas las etapas de la meiosis en una misma inflorescencia o gónada son algunos aspectos importantes de considerar.

ETAPAS DE LA MEIOSIS

En la meiosis se aparean los cromosomas homólogos y cada célula hija recibe sólo una cromátida de las 4 de cada par de cromosomas homólogos al final del proceso. Una meiosis típica consta de dos fases o divisiones, una primera reduccional, en la que se separan los cromosomas homólogos (los miembros de cada par entre las dos células hijas) y una segunda, similar a una mitosis. La primera división meiótica (división I) empieza en una profase I, que es larga y diferente de la profase mitótica.

DIVISIÓN MEIOTICA I

- **PROFASE I:** Esta fase se caracteriza por presentar las siguientes subfases:

- **leptonema:** Se comienzan a hacer visibles los filamentos cromosómicos, aunque todavía aparecen muy delgados y largos. El núcleo se aprecia como un ovillo de lana.
- **zigonema:** durante esta fase los cromosomas homólogos se aparean a todo lo largo gracias a la formación del complejo sinaptonémico en el proceso denominado sinapsis.
- **paquinema:** al entrar en esta fase los cromosomas homólogos se van acortando y engrosando; en esta fase aparece claramente visible el hecho de que cada cromosoma está formado por dos cromátidas. Durante esta fase se producen, si no lo han hecho ya, intercambios de material genético entre las cromátidas homólogas, (recombinación génica).
- **diplonema:** los cromosomas homólogos se separan y es factible que en esta etapa los quiasmas sean fácilmente visibles.
- **diacinesis:** los cromosomas son cada vez más cortos y gruesos, por lo que destacan fácilmente al usar colorantes cromosómicos. Las cromátidas hermanas permanecen unidas por el centrómero. Los bivalentes se desplazan hacia la periferia nuclear, desaparecen los nucleolos y en esta fase o la que sigue se desensambla la envoltura nuclear, se forma el huso y los centrómeros se adhieren a él.

Una vez terminada esta larga profase I, la célula continúa su división con las fases siguientes:

- **METAFASE I:** los cromosomas están más condensados aún y aparecen ordenados en el plano ecuatorial.

- **ANAFASE I:** los cromosomas comienzan a moverse hacia los polos.

- **TELOFASE I:** en muchos organismos esta etapa es tan rápida que es difícil de observar; en otros se pasa rápidamente desde la anafase I a la profase II y en otros se logra apreciar una corta interfase aunque el núcleo no presenta el aspecto interfásico típico.

DIVISION MEIOTICA II

- **PROFASE II:** es una profase similar a la profase mitótica

METAFASE II: los cromosomas se ordenan en el plano ecuatorial del modo que lo hacen en una metafase típica.

ANAFASE II: se separan los centrómeros hermanos y los cromosomas (cromátidas en la metafase), se dirigen a los polos.

TELOFASE II: es una telofase típica; durante ella o inmediatamente después, se produce la citodíéresis. El resultado final, a partir de la única célula que ha entrado en el proceso meiótico, es la formación de cuatro células haploides.

OBJETIVOS:

- 1.-Identificación de las figuras meioticas típicas

Experiencia Nº 5

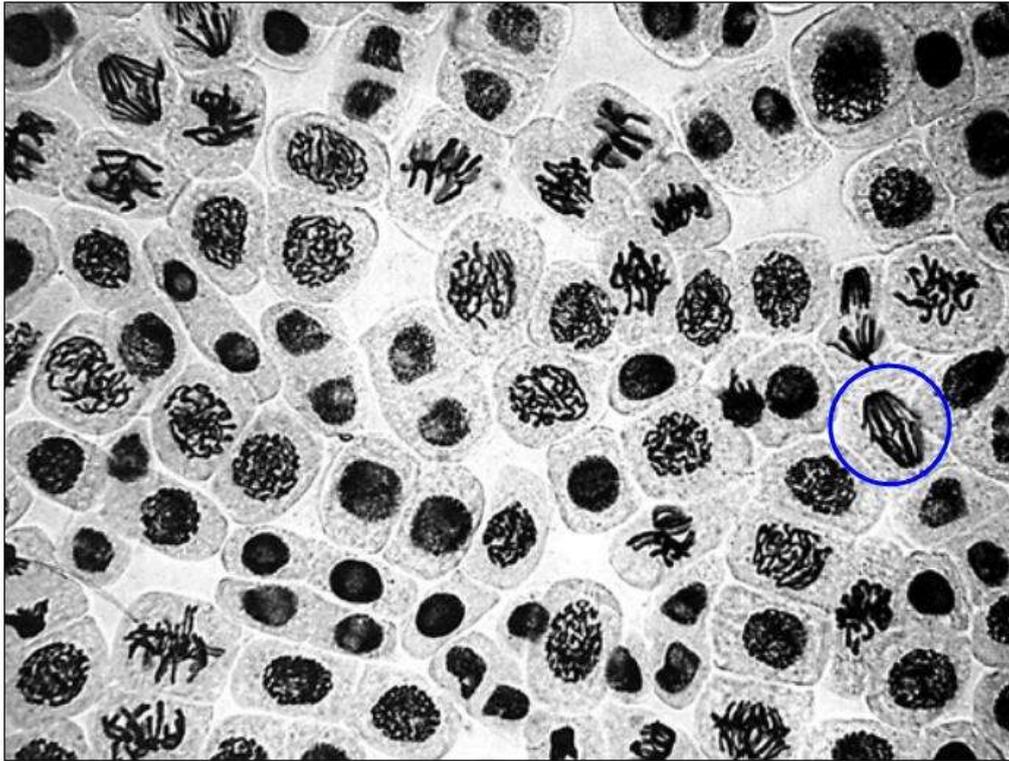
Se mostrará video de meiosis de los siguientes sitios

<http://www.youtube.com/watch?v=vA8aMpHwYh0&feature=related>

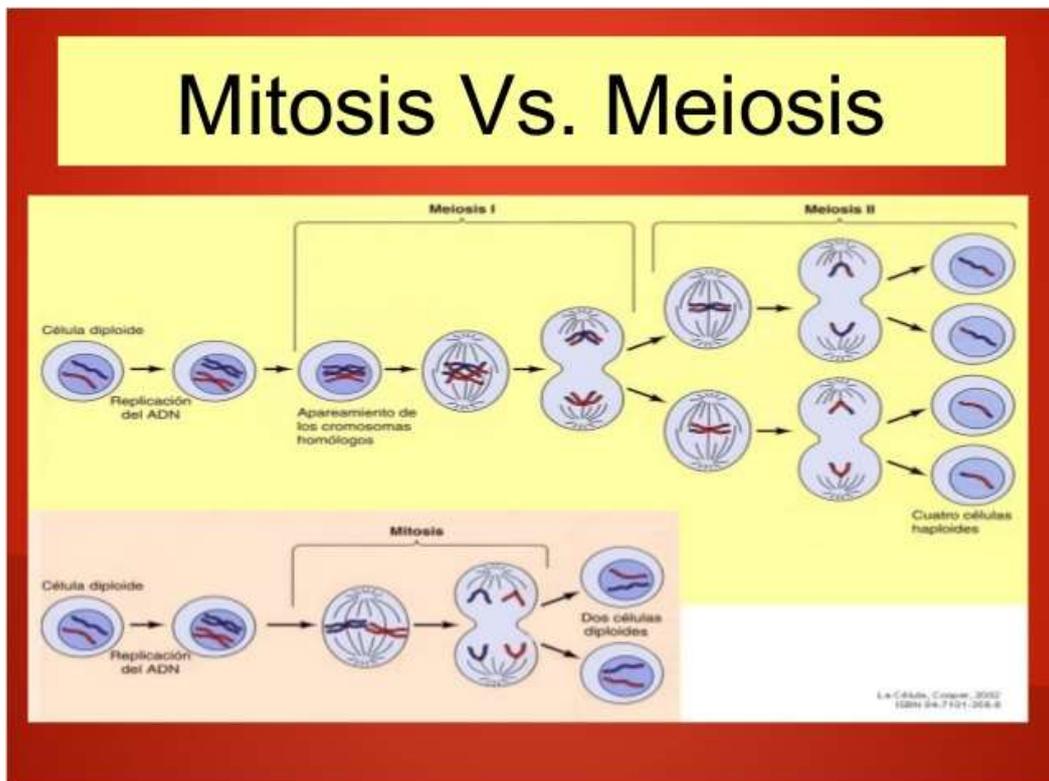
www.youtube.com/watch?v=EsHfBINTWuE

Cuestionario.

1. ¿En que consiste la mitosis? Dibuje cada una de sus etapas para una célula $2N=4$
2. ¿Cual es el efecto de la colchicina en la división celular?
3. ¿Cuál es el efecto de la cafeína?
4. ¿Cuántos cromosomas tiene una célula durante la anafase mitótica?
5. ¿Qué tejido utilizaría para observar células en diferentes estados de la mitosis?
6. ¿En que consiste la meiosis? Dibuje cada una de sus etapas para una célula $2N=4$
7. Enumere y explique 4 diferencias y 4 similitudes entre la mitosis y la meiosis
8. ¿Qué es el índice mitótico?
9. Conociendo la duración total del ciclo celular ¿cómo calcularía la duración de cada fase?



Células de meristema apical de raicillas de cebolla en distintas etapas de la mitosis



EJERCICIO Nº 6

RECOMBINACIÓN EN EL DNA

La tecnología del DNA recombinante *in vitro* o ingeniería genética es un término general que engloba todos aquellos protocolos experimentales que conducen a la transferencia de información genética (DNA) desde un organismo a otro.

Tanto en eucariontes como procariontes, la información presente en los genes se expresa gracias a una serie de macromoléculas que participan coordinadamente en los fenómenos de transcripción y traducción.

El flujo de la información génica, DNA → mRNA → Proteínas, si bien es cierto es regulado finamente a través de un gran número de procesos, básicamente necesita de algunos elementos claves para que ocurra:

- Para que un gen se exprese, se necesita la presencia de una secuencia promotora acompañándolo, donde se unen los factores de transcripción y la maquinaria transcripcional.
- Para que un gen se exprese, el DNA de este y su promotor debe estar lo suficientemente descondensado para ser accesible a la maquinaria transcripcional.
- El RNA mensajero formado en la transcripción, debe poseer todos los elementos necesarios para una correcta traducción (secuencia iniciadora, codón de inicio, codón de termino)

Según esta premisa, se pueden transferir genes de un organismo a otro y estos pueden ser expresados cada vez que mantengamos las condiciones antes señaladas. Los virus son un fiel reflejo de esto, ya que son capaces de perpetuar sus genomas en el tiempo, gracias a que cumplen con estos requerimientos.

Un experimento de DNA recombinante generalmente sigue el siguiente formato:

- 1.- El DNA es extraído desde un organismo y **purificado** o liberado de todos los componentes a los cuales normalmente se encuentra asociado (Histonas y RNA).
- 2.- El DNA es **cortado** enzimáticamente y unido o **ligado** enzimáticamente a otro DNA, normalmente un vector, formando una molécula de **DNA recombinado**.
- 3.- El DNA recombinado se **introduce** dentro de una célula eucarionte o procarionte para que el o los genes se **expresen**.

Purificación

El DNA puede ser purificado gracias a sus características fisicoquímicas, por ejemplo es insoluble en solventes orgánicos por lo cual puede ser separado desde proteínas y lípidos en mezclas de fenol y cloroformo. Precipita en alcohol ya que es capaz de deshidratarse en él y formar sales de DNA.

Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción o endonucleasas de restricción fueron descubiertas por Werner Aber, Hamilton Smith y Daniel Nathans. Estas son enzimas sumamente específicas que catalizan la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster de los ácidos

nucleicos y son capaces de cortar ambas hebras del DNA reconociendo secuencias específicas, creando de esta manera una serie de fragmentos.

Se ha visto que ciertas cepas de *E. coli* degradan (cortan) el DNA de ciertos virus fagos infectivos, a menos que los ácidos nucleicos presenten metilación (adición de grupos metilo) en algunos residuos de adenina o citosina del sitio de corte.

La función de las enzimas de restricción es proteger al organismo de DNA extraño. Cuando una porción de DNA foráneo ingresa a la célula, las enzimas de restricción se encargan de degradarlo cortándolo en pequeños fragmentos, siempre y cuando éste no esté modificado.

Actualmente se conocen unas 200 enzimas de restricción las cuales se nombran de acuerdo al organismo del cual se extraen, como por ejemplo *EcoRI* y *EcoRII*, que se extraen de *E. coli* o *HaeIII* que se extrae de *Haemophilus aegyptius*.

El lugar donde se produce el corte se denomina sitio de restricción y producen dos tipos de corte: (1) corte con extremos cohesivos y (2) corte con extremos romos

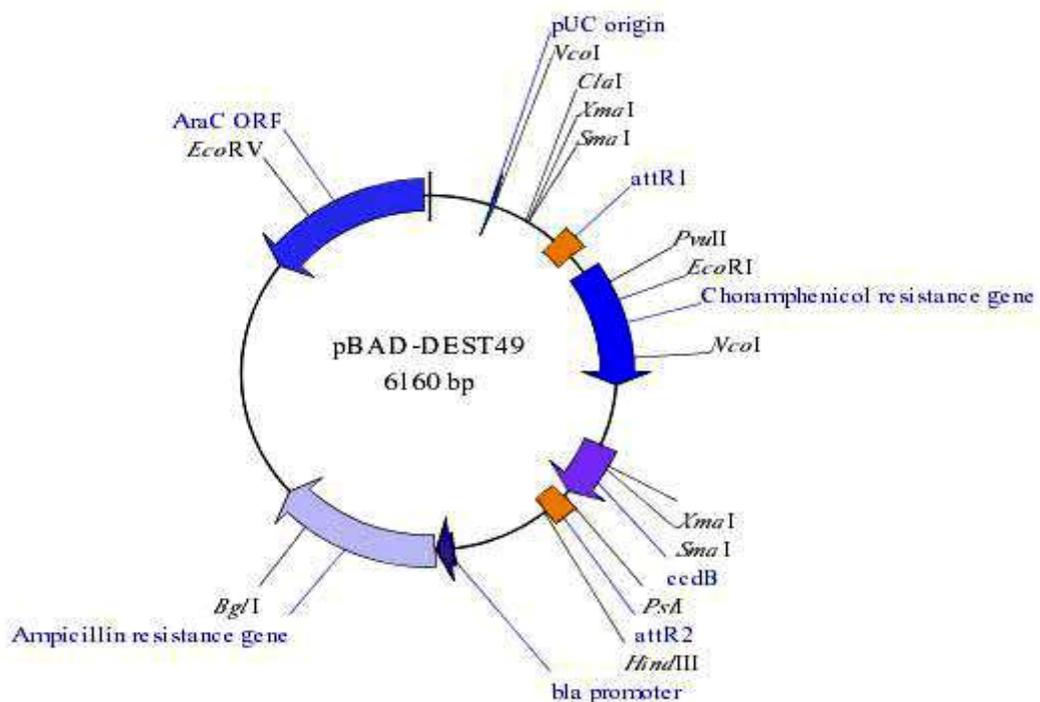
Ligasa

Enzima que cataliza la formación de uniones fosfodiéster entre yuxtapuestos de DNA o RNA con terminaciones 5' fosfato y 3' hidroxil. La enzima es capaz de unir extremos romos o con terminaciones cohesivas, además es capaz de reparar hebras de DNA dañadas con segmentos abiertos

Vectores

La transferencia de genes entre organismos no se puede realizar sin la utilización de un vehículo que proteja al DNA de su destrucción, sea fácil de manejar y que además, pueda entregar algunas características para la selección de las células que captan el vector

Al ser elementos genéticos autónomos y autorreplicativos, los plásmidos poseen las cualidades necesarias para ser utilizarlos como vectores



ACTIVIDADES

1.- Extracción del DNA plasmídico

Si bien existen kits comerciales para preparar DNA plasmídico, la realización de este protocolo se considera formativo, sencillo y permite obtener de modo rutinario DNA plasmídico con un grado de pureza aceptable. El material que entre en contacto con el cultivo de bacterias deberá desecharse en un recipiente con cloro.

1. Se toma 1 ml del cultivo de bacterias y se centrifuga en un tubo eppendorf durante 2 min (14000 rpm). Se elimina el sobrenadante por inversión del tubo o con ayuda de una pipeta, dejando el sedimento lo más seco posible.
2. Se resuspende el sedimento de bacterias en 250 µl de tampón de resuspensión empleando una pipeta (aspirar y expulsar el líquido varias veces sobre el sedimento hasta que desaparezca éste). Se incuba 2 min a temperatura ambiente.
3. Se añaden al tubo 250 µl de la solución de desnaturalización NaOH/SDS. Se agita el tubo por inversión suave (observar el aspecto y viscosidad de la disolución). Posteriormente se incuba durante 5 min a temperatura ambiente.
4. Se añaden a continuación 300 µl de acetato potásico 3 M y se mezcla el contenido del tubo (observar el aspecto del tubo, aparecerá una turbidez blanca al precipitar las proteínas y el DNA cromosómico). Se incuba 10 min en hielo.
5. Se centrifuga 10 min (14000 rpm).
6. Con ayuda de una pipeta se transfiere cuidadosamente la fase acuosa sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo. Si la fase acuosa no está suficientemente limpia, y contiene restos del precipitado blanco, volver a centrifugar los tubos.
7. En este sobrenadante se encuentra RNA y el DNA plasmídico. Estos ácidos nucleicos se precipitan con 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Mezclar bien por inversión y guardar a -20°C durante al menos 10 min (congelador).
8. Pasado este tiempo, se centrifuga durante 10 min a 14000 rpm.
9. Se elimina todo el sobrenadante volcando el tubo con cuidado. El precipitado se lava de nuevo con 0,5 ml de etanol 70% frío
10. El precipitado casi invisible, que contiene DNA plasmídico y RNA, se debe secar completamente para eliminar los restos de etanol que pueden interferir con procesos posteriores. El precipitado se disuelve en 25 µl agua estéril.

2.- Electroforesis en gel de agarosa: Una vez transcurrido el tiempo de incubación, realice el análisis de las restricciones según el siguiente protocolo.

- Utilizando puntas independientes, agregue 5 ul de la tinción de carga (LD) a cada tubo.
- Mezcle.
- Cargue 10 ul del marcador de tamaño molecular en el carril 1 de su gel
- Cargue 20 ul de cada una de sus muestras en los carriles 2 al 7 del gel.
- Cuidadosamente cierre la cámara de electroforesis y conecte los cables de energía a la fuente de poder
- Encienda la fuente de poder y realice la electroforesis a 100 V por 30 minutos
- Transcurrido el tiempo de corrida, desconecte la fuente de poder

Cuestionario

¿Por qué tienen carga negativa las moléculas de DNA?

¿Cuál es el papel de cada componente del tampón de carga?

Dibujar un esquema con el resultado obtenido en el gel y razone los resultados.

En caso de tener las formas superenrollada y relajada del plásmido indicar si:

¿Tienen el mismo peso molecular?

¿Y la misma longitud en pares de bases?

¿Cómo se podría convertir una forma en otra?. ¿Cuál en cual?