

Manual de la experiencia educativa Biología Celular

Rocío Coutiño
Socorro Fernández
Beatriz Palmeros



Esta obra se encuentra disponible en Acceso Abierto para copiarse, distribuirse y transmitirse con propósitos no comerciales. Todas las formas de reproducción, adaptación y/o traducción por medios mecánicos o electrónicos deberán indicar como fuente de origen a la obra y su(s) autor(es).

Se debe obtener autorización de la Universidad Veracruzana para cualquier uso comercial.

La persona o institución que distorsione, mutile o modifique el contenido de la obra será responsable por las acciones legales que genere e indemnizará a la Universidad Veracruzana por cualquier obligación que surja conforme a la legislación aplicable.

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

Sara Ladrón de Guevara
Rectora

Leticia Rodríguez Audirac
Secretaria Académica

Clementina Guerrero García
Secretaria de Administración y Finanzas

Octavio Ochoa Contreras
Secretario de la Rectoría

Édgar García Valencia
Director Editorial

Diseño de portada: Enriqueta del Rosario López Andrade

Diseño de interiores: Pedro Gaspar

Clasificación LC: QH583.2 C687 2015

Clasif. Dewey: 571.6078

Autor: Coutiño Rodríguez, Rocío.

Título: Manual de la experiencia educativa Biología Celular / Rocío Coutiño, Socorro Fernández y Beatriz Palmeros.

Edición: Primera edición

Pie de imprenta: Xalapa, Veracruz : Universidad Veracruzana, Dirección Editorial, 2015

Descripción física: 132 páginas : ilustraciones ; 23 cm.

Serie: Textos universitarios.

ISBN: 9786075023878

Materias: Citología--Manuales de laboratorio.

Citología-- Estudio y enseñanza (Superior)--México--Veracruz--Llave (Estado).

Autores adicionales: Fernández, María del Socorro.

Palmeros Sánchez, Beatriz.

DGBUV 2015/12

Este libro ha sido publicado con el financiamiento de la Dirección General de Desarrollo Académico e Innovación Educativa, como resultado del programa de Fortalecimiento de Cuerpos Académicos.

Primera edición, 23 de marzo de 2015

© Universidad Veracruzana

Dirección Editorial

Hidalgo 9, Centro, Xalapa, Veracruz

Apartado postal 97, CP 91000

diredit@uv.mx

Tel/fax (228) 818 59 80; 818 13 88

ISBN: 978-607-502-387-8

Impreso en México

Printed in Mexico

PRESENTACIÓN

La biología celular es una disciplina que surge en los años cincuenta del siglo XX, cuando la célula se estudió incorporando métodos de microscopía óptica y electrónica, citoquímicos, bioquímicos, electrofisiológicos, fisicoquímicos, cultivo de células *in vitro* y de biología molecular. Estos estudios proporcionaron información sobre la estructura celular, molecular y de cómo se llevan a cabo los procesos bioquímicos que caracterizan la vida.

La biología celular, como disciplina científica, continúa en desarrollo, incorporando el conocimiento que surge con las nuevas metodologías –como las derivadas de la aplicación de la biología molecular: el estudio del genoma, proteoma, metaboloma, etc.– con las cuales se han descrito los mecanismos que permiten explicar la integración de la función y la regulación de los procesos celulares.

Como la Biología Celular es una experiencia educativa (EE) teórico-práctica, el criterio de selección de las prácticas incluidas en este manual ha tomado como referencia el diseño curricular del MEIF actual, centrado en el estudiante. Por lo tanto, además de buscar la habilitación del estudiante de biología en el manejo del equipo del laboratorio, también incentiva a que, después de realizar una práctica prototipo, el futuro biólogo investigue los conceptos relacionados con el tema en la literatura especializada y se pueda plantear problemas concretos, además de que diseñe su propia metodología para generar información y lleve a cabo la interpretación de ésta. El objetivo es que el proceso enseñanza-aprendizaje no sólo sea informativo sino también formati-

vo y habilite a los estudiantes en la utilización de las técnicas actuales de la biología celular.

El orden de las prácticas sigue, hasta donde es posible, la secuencia del programa teórico de la EE y, también, se ha considerado que con estas prácticas se pueda hacer la investigación de las prácticas de campo o extramuros.

REGLAMENTO DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR

- Art. 1. Al inicio de la EE el maestro dará a conocer las medidas generales de seguridad del laboratorio y presentará el personal de apoyo autorizado.
- Art. 2. Durante la permanencia en el laboratorio es obligatorio el uso de bata. Cuando se maneje material tóxico por contacto o biológico infeccioso se deberán usar guantes y lentes de protección.
- Art. 3. Durante la estancia en el laboratorio queda estrictamente prohibido fumar, beber, comer, aplicarse cosméticos, el uso de celular y aparatos de música.
- Art. 4. Está prohibido sentarse en las mesas de trabajo y éstas deberán conservarse limpias, secas y ordenadas.
- Art. 5. Es obligación del alumno traer el material requerido para realizar cada práctica, como: portaobjetos, cubreobjetos, pipetas Pasteur, pinzas, etiquetas autoadheribles o cinta *masking tape*, un marcador indeleble y un lienzo de algodón para mantener limpia su área de trabajo.
- Art. 6. Es responsabilidad del alumno tener limpio y seco el material que usará en la sesión de trabajo en el laboratorio, desde el inicio.
- Art. 7. Es obligación del alumno revisar y contar el material de cristalería, así como cualquier otro que le sea prestado. Cualquier anomalía presentada en el material o equipo debido al uso negligente (pérdida, rotura o descompostura), será responsabilidad del alumno y deberá ser repuesto.

Art. 8. Es obligación del alumno seguir todas las recomendaciones que indique el profesor, técnico académico o quien coordine la práctica correspondiente sobre el uso correcto de aparatos e instrumentos del laboratorio.

Art. 9. La(s) persona(s) que sea(n) sorprendida(s) haciendo mal uso de los equipos, materiales, instalaciones, etc., será(n) sancionada(s) conforme a la falta cometida.

Art. 10. Cada alumno firmará este reglamento:

Yo _____, matrícula _____, como alumno de la EE de Biología Celular, he leído y estoy de acuerdo con respetar todos los artículos de este reglamento.

Sección: _____

Fecha: _____

PRÁCTICA 1

FUENTES DE INFORMACIÓN

Objetivo

Que el alumno aprenda a buscar información especializada en biología celular utilizando los métodos de investigación documental convencionales o los medios electrónicos para revisar las bases de datos disponibles en internet.

Introducción

La biología celular es una de las disciplinas que generan gran cantidad de información, misma que se publica en más de 500 revistas científicas, algunas especializadas en un área en particular y otras, multidisciplinarias. Los avances de la biología celular también son difundidos en revistas de divulgación científica.

Gran cantidad de información se puede obtener del *Current Contents: Life Sciences*, publicación semanal que compila toda la información publicada en las revistas con arbitraje de especialistas sobre los diversos temas de las ciencias de la vida. En esta base de datos se puede obtener el título, volumen, número, fecha e índice de los artículos publicados, así como el nombre y dirección de los autores. Sin embargo, el costo elevado de las suscripciones y el número de revistas especializadas sobre cada área de conocimiento dificultan el acceso a este material impreso.

No obstante, los adelantos de las vías de comunicación electrónica han resuelto estas limitantes y la búsqueda de información actualizada es eficiente y competitiva, utilizando buscadores de información como Google, AltaVista, PubMed, Science Direct, diferentes sitios en internet de revistas electrónicas y bibliotecas electrónicas de acceso libre.

Material y equipo

- Equipo de cómputo que tenga conexión a internet y acceso a la Unidad de Servicios Bibliotecarios y de Información (USBI)
- Ejemplares del *Current Contents: Life Science*
- Revistas científicas de la biblioteca de la Facultad de Biología
- Revistas científicas de la biblioteca de la USBI

Métodos

A. Manejo del *Current Contents: Life Science*

1. Busque en su ejemplar el índice de revistas y anote los nombres de diez revistas relacionadas con la biología celular. Registre el nombre completo y la abreviatura correspondiente.
2. Busque en el índice de palabras el tema de biología celular que se le asignó, anotando la numeración de las dos columnas que aparecen en el registro. La columna de la izquierda le indica la página en la cual se encuentra el título e índice de la revista; el número de la derecha corresponde a la página de la revista en la que aparece el artículo del tema que usted busca.
3. Haga un mínimo de cinco citas bibliográficas para que se le revisen y se le hagan los señalamientos correspondientes.
4. De las citas encontradas, busque en el índice de autor y comente las referencias que dan de él y para qué le sirven a usted.
5. Compare con los otros equipos las citas bibliográficas que encontró, busque en las hemerotecas de la Facultad de Biología, USBI e InEcol y

reporte cuántas revistas encontró. Fotocopie por lo menos un artículo relacionado con el tema que se le asignó de entre los que identificó y localizó.

B. Búsqueda por vía electrónica

1. Utilizando buscadores de información en internet, como: Google, Navigator, AltaVista, etc. Al solicitar la búsqueda de un tema en particular, se desplegará en la pantalla un número grande de trabajos relacionados con el tema de interés.
2. Seleccione aquellos que sean más adecuados para su investigación y, si la página es de acceso libre, despliéguela e imprima el trabajo. En caso de que sea un resumen y aparezcan los correos electrónicos de los autores, solicite una copia en extenso del trabajo enviando un correo electrónico.
3. Busque cuando menos 10 páginas de internet que traten aspectos de biología celular.
4. Ingrese a ScienceDirect.com e indique cuáles revistas permiten el acceso al artículo completo.
5. Si les es posible localizar la información, registre cuáles son las políticas de la revista en cuanto al acceso a la información que manejan.
6. Imprima tres trabajos de un tema que sea de su interés y que esté relacionado con la biología celular.

Investigación extramuros

1. Acuda a las hemerotecas locales: Facultad de Biología, Instituto de Ecología, USBI, etc. y consulte ejemplares de *Current Contents* del 2002 a la fecha.
2. Escoja un tema del programa de Biología Celular y busque información sobre éste o sobre el tema asignado. Si encuentra las revistas realice las siguientes actividades:

PRÁCTICA 2

EL ESTUDIO DE LA CÉLULA: MICROSCOPIO ÓPTICO

Objetivo

En relación con las técnicas para la observación de muestras y preparaciones en el microscopio compuesto:

- a) El alumno aprenderá a utilizar la iluminación según Köhler o luz transmitida –campo claro y luz transmitida– contraste de fases
- b) Aplicará técnicas de fijación y tinción
- c) Realizará preparaciones temporales y permanentes

Introducción

Sin el desarrollo y uso del microscopio en la observación de microorganismos y tejidos no habría surgido la Teoría celular (Schleiden y Schwann, Virchow, 1838-1855) y, muy probablemente, no habría iniciado el estudio detallado de la célula. El microscopio es un instrumento óptico y mecánico que modula la energía luminosa y amplifica el ángulo de la visión humana permitiendo visualizar las células y algunos de sus componentes que, por su tamaño pequeño (de 1 a 20 μm en diámetro), quedan fuera de la resolución del ojo humano.

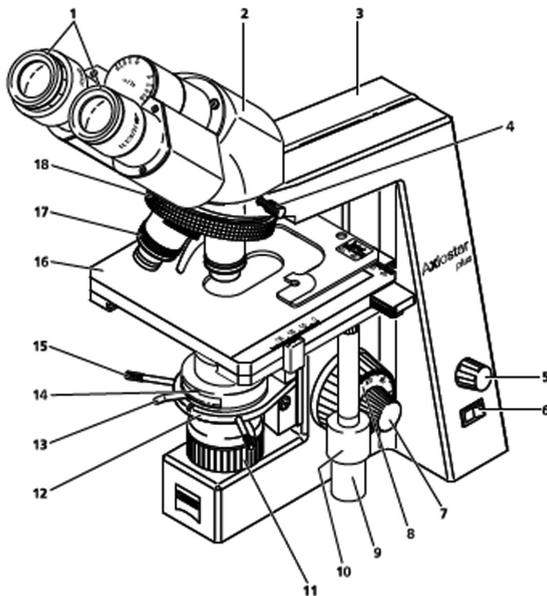
El microscopio compuesto (MC) de la figura 1 corresponde al modelo Axiostar *plus* de la compañía Carl Zeiss, y es el equipo que usted

usará en la práctica. Es un microscopio de luz visible transmitida y de campo claro. El sistema óptico proporciona imágenes amplificadas y consta de tres juegos de lentes: oculares, objetivos y condensador.

Los objetivos representan la parte esencial del MC, en ellos se indican los datos de aumento, apertura numérica (AN), la distancia fococromática y el grosor de los cubreobjetos que permite una buena observación. El microscopio Axiostar *plus* tiene cuatro objetivos: 5X/0.12, 10X/0.25, 40X/0.65 y 100X/1.25, que requiere utilizar aceite de inmersión.

Los lentes oculares con los que cuenta son: un ocular PL 10X/18 Br fijo en el portaocular derecho y un ocular enfocable PL 10X/18 Br.foc en el lado izquierdo. El ocular enfocable sirve para compensar la ametropía.

El tercer elemento óptico del microscopio es el condensador Abbe 0.9/1.25, el cual dirige los rayos procedentes de la fuente luminosa hacia la preparación en la parte enfocada por el objetivo.



1. Oculares
2. Tubo binocular
3. Estativo del microscopio
4. Tornillo para fijar el tubo
5. Regulador de intensidad de iluminación
6. Interruptor prendido/apagado con bombilla de control integrada
7. Botón de enfoque micrométrico
8. Botón de enfoque macrométrico
9. Mando coaxial para desplazar la platina en dirección x
10. Mando coaxial para desplazar la platina en dirección y
11. Diafragma de campo luminoso
12. Portacondensador
13. Palanca para regular diafragma de apertura
14. Condensador
15. Tornillos para centrar el condensador
16. Platina con portaobjetos
17. Objetivo
18. Revólver portaobjetivos, 4 o 5

Figura 1. Partes del microscopio Axiostar *plus*

Equipo

- Microscopio compuesto de campo claro
- Microscopio estereoscópico (de disección)

Colorantes

- Verde de metilo (solución acuosa al 1%)
- Azul de metileno (solución acuosa al 1%)
- Aceto orceína

Materiales

- Portaobjetos y cubreobjetos
- Aguja de disección
- Pipeta Pasteur
- Vidrio de reloj
- Abatelenguas
- Epidermis y meristemo de cebolla
- Epitelio de mucosa oral
- Preparaciones fijas

Métodos

Componentes del microscopio óptico

1. Identifique cada una de las partes del microscopio señalados en la figura 1 con la explicación del maestro.
2. Observe cuidadosamente los objetivos y anote las indicaciones grabadas en cada uno de ellos. Tenga claro qué dato indica el aumento, cuál la apertura numérica (AN), la distancia focal y el tipo de cubreobjetos. Recuerde que la AN depende del índice de refracción del

medio y del seno del ángulo de la luz colectada por el lente del objetivo (η seno del ángulo Θ). La AN es un factor que permite calcular el poder de resolución del microscopio y depende de la amplitud del cono de iluminación que se forma entre la lente del condensador. Se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Resolución} = \frac{0.61 \lambda}{\text{AN del objetivo} + \text{AN del condensador}}$$

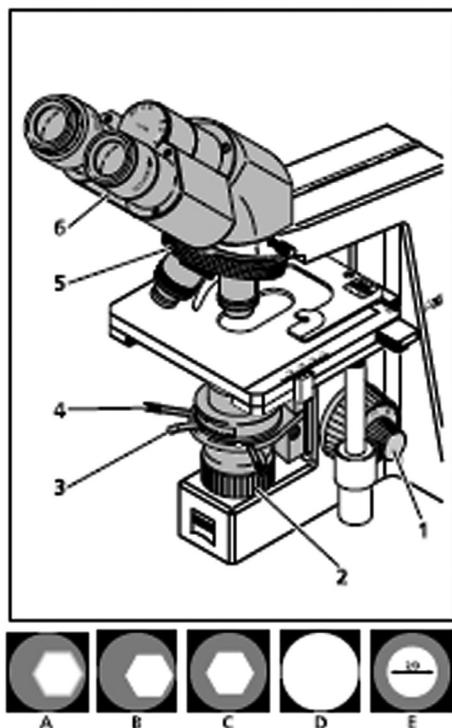
3. Calcule la resolución de cada uno de los objetivos de su microscopio con la fórmula anterior. El aumento útil (eficaz) también se obtiene multiplicando AN \times 1000. Haga el cálculo para cada uno de los objetivos que tiene el MC con el que está trabajando.
4. Ajuste la distancia entre los oculares de acuerdo con la distancia interpupilar individual. La distancia interpupilar está ajustada cuando se ve sólo una imagen circular durante la observación por ambos oculares. Para adaptar la altura de observación individual desplace suavemente los portaoculares hacia arriba o hacia abajo.

Iluminación Köhler

La microscopia de luz transmitida-campo claro es el método de microscopia óptica más usual, ya que con su ayuda se pueden observar sin complicaciones ni mayores esfuerzos las preparaciones bien contrastadas o previamente teñidas.

Para obtener la resolución óptima cuando se ilumina por completo el campo visual es indispensable ajustar el condensador, el diafragma de campo luminoso y el diafragma según el principio de Köhler para ajustar la iluminación. En este caso el cono luminoso que parte de la fuente de iluminación se adapta al cono de abertura del objetivo para aprovechar la apertura numérica del sistema óptico y se evita la luz innecesaria que se manifiesta como luz difusa perturbante. Para lograr este tipo de iluminación se siguen los siguientes pasos:

- a. Coloque en la platina una preparación bien contrastada con el cubreobjetos hacia arriba.
- b. Gradúe la luminosidad de la imagen con el regulador de intensidad de iluminación (parte 5 de la figura 1) en el estativo del microscopio.
- c. Desplace el condensador de Abbe hasta el tope superior con el botón de mando y coloque en posición central la palanca (parte 3 de la figura 2). De aquí en adelante identificar las partes del microscopio en la figura 2) para regular el diafragma de apertura.
- d. Con el anillo del revólver portaobjetivos (5) intercale el objetivo 10X en la trayectoria de luz.
- e. Mire en el tubo binocular por el ocular fijo (6) y enfoque nítidamente la preparación con el botón de enfoque micrométrico (1).
- f. Gradúe la nitidez de la imagen para el otro ojo con el anillo de enfoque del ocular enfocable.
- g. Cierre el diafragma de campo luminoso (2) hasta el punto que se pueda ver el campo visual (A) sin importar la nitidez.
- h. Gradúe el condensador con el botón de mando del condensador (3) hasta enfocar nítidamente el borde del diafragma del campo luminoso (B).
- i. Centre el diafragma con ambos tornillos de centrado (4) del condensador (C) y luego ábralo hasta el punto que el borde desaparezca del campo visual (D).
- j. Regule el diafragma de apertura (contraste). Para esto retire el ocular y mire. Gradúe el diafragma de apertura (3) a 2/3-4/5 del diámetro de pupila de salida del objetivo (E) con ayuda de la palanca (3). En la mayoría de las aplicaciones este ajuste proporciona el mejor contraste con máxima resolución y lo mejor para los ojos humanos. Coloque de nuevo el ocular.
- k. Una vez que obtenga la iluminación correcta, haga la preparación de las muestras que va a observar.



1. Mando de enfoque
2. Diafragma del campo luminoso
3. Palanca para regular el diafragma de apertura
4. Tornillos para centrar del condensador
5. Anillo moleteado del revólver portaobjetivos
6. Tubo binocular

Figura 2. Ajustes para luz transmitida-campo claro

Iluminación para luz transmitida-contraste de fases

El contraste de fases es el método de microscopía ideal para examinar preparados delgados y sin coloración, tales como cultivos de células. Con ayuda de los moduladores ópticos "diafragma anular de fases y anillo de fases", así como de los procedimientos de interferencia en la formación de la imagen intermedia, el método de contraste de fases convierte las diferencias tenues de fases en diferencias de intensidad y de colores que se pueden advertir con los ojos.

Como este sistema de iluminación exige un grado alto de limpieza es necesario limpiar los restos de grasa, consecuencia de la manipula-

ción, del lente frontal del objetivo, de las superficies visibles del condensador, del cubreobjetos y de la superficie inferior del portaobjetos.

Los ajustes que se realizan al microscopio Axiostar *plus* para la iluminación por luz transmitida-contraste de fases son los siguientes:

- a. Ajustar el microscopio para iluminación de luz transmitida-campo claro.
- b. Intercalar en el trayecto de los rayos de luz el objetivo de contraste de fases, por ejemplo 40X/0.65 Ph2.
- c. Abrir el diafragma de campo visual (7 en figura 3) y el diafragma de apertura.
- d. Introducir la corredera para contraste de fases en el condensador (8). Cerciorarse de que tenga la misma inscripción que el objetivo de contraste de fases, por ejemplo Ph2. Adaptar la intensidad de la iluminación.
- e. Centrar los diafragmas anulares (figura 4) quitando un ocular y poniendo en su lugar un dioptra (11) o un microscopio auxiliar (3). El anillo de fases se enfoca nítidamente en el microscopio auxiliar regulando con el anillo de enfoque (2) de la lente ocular (1).
- f. De ser necesario, centrar el diafragma anular (figura 4/A), regular los dos tornillos dispuestos para centrar los diafragmas anulares (6) con la llave angular hexagonal de macho SW 1.5
- g. El contraste de fases total sólo se obtiene cuando el anillo de fases oscuro (en el objetivo) coincide exactamente con el diafragma anular claro (en el condensador) en la trayectoria de los rayos de luz (fig. 4/B)
- h. Quitar el dioptra o el microscopio auxiliar y colocar de nuevo el ocular.

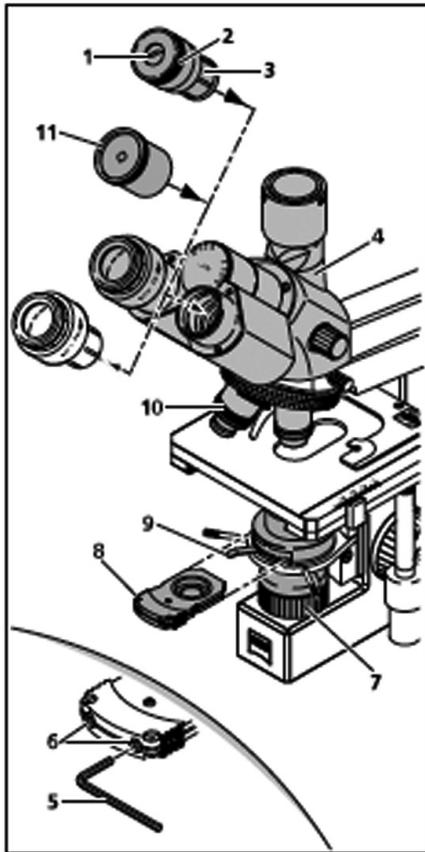


Figura 3. Luz transmitida-contraste de fases

1. Lente ocular - microscopio auxiliar
2. Anillo moleteado - microscopio auxiliar
3. Microscopio auxiliar
4. Tubo binocular/fototubo
5. Llave angular de macho hexagonal SW 2
6. Tornillos para centrar diafragmas anulares
7. Diafragma de campo luminoso
8. Corredera para contraste de fases
9. Palanca para regular el diafragma de apertura
10. Objetivo para contraste de fases
11. Dioptra

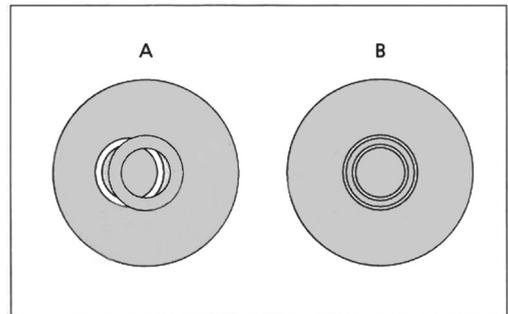


Figura 4. Centraje del diafragma anular

Preparación de muestras para observar al microscopio

I. Preparación de epidermis y meristemo de cebolla

1. Cortar un fragmento de 1-3 mm de epidermis, colóquelo en un portaobjetos y cubra con verde de metilo. Deje teñir durante 5 minutos.

2. Enjuague con agua y coloque encima un cubreobjetos.
3. Colocar en la platina y observar al microscopio.
4. Corte un fragmento de 1 cm del meristemo en la parte apical de las raíces de cebolla (crecimiento celular).
5. Coloque en un vidrio de reloj y agregue unas gotas de aceto orceína para teñir durante 15 minutos.
6. Transfiera a un portaobjetos y haga cortes de 2-3 mm; ponga una gota de Xilol, coloque encima un cubreobjetos y realice la dispersión del tejido presionando con el dedo pulgar o la goma del lápiz hasta obtener una mono capa. Observe al microscopio.

II. Preparación de epitelios de mucosa oral

1. Enjuague la boca tres veces con agua.
 2. Con un abatelenguas, raspe suavemente la mucosa oral y haga un frotis.
 3. Fije levemente a la flama y después con alcohol por 1 minuto.
 4. Cubra con azul de metileno por 10 minutos; lave, seque al aire y observe al microscopio.
- l. Analice las preparaciones que elaboró. En caso de analizar preparaciones sin tinción, se requiere de iluminación de luz transmitida-contraste de fases.

Investigación extramuros

1. ¿Qué necesita incorporar en el microscopio Axiostar *plus* para tener un microscopio de contraste de fases? y, ¿cuál es su función?
2. ¿Cuáles son las ventajas y las desventajas de la técnica de fijación por calor con respecto a la fijación con sustancias químicas?
3. Busque en la literatura qué fijadores se recomiendan para:
 - a. ácidos nucleicos
 - b. proteínas

c. lípidos

d. carbohidratos

4. ¿Qué técnica es específica para teñir DNA?
5. ¿Por qué no hizo el paso de fijación previa en la preparación que tiñó con aceto orceína?

PRÁCTICA 3

DIVERSIDAD CELULAR: FORMA, TAMAÑO Y NÚMERO

Objetivo

El alumno reconocerá la diversidad del organismo humano a nivel celular. Al mismo tiempo se habilitará en la medición de los diferentes tipos de células utilizando el micrómetro. Además aprenderá el uso de la cámara de Neubauer para contar células.

Introducción

Se reconoce que la biodiversidad actual tiene su origen a partir de un ancestro celular común que a través del proceso evolutivo se diversificó en la variedad amplia que existe en la morfología, tamaño y número de células que caracterizan a los diferentes integrantes de esta biodiversidad.

Estas mismas diferencia celulares pueden ser observadas en un mismo organismo donde, a través de la adquisición de rutas metabólicas propias (diferenciación celular), se tiene una gran variedad de células con morfología y funciones diferentes, aunque cada una de ellas conserven el mismo genoma.

Las células tienen diferentes rangos de tamaño. Sin embargo, esta medida se conserva más o menos constante en un mismo tipo celular y organismo. Esta característica se ha tomado también como referencia

para la clasificación de los distintos tipos celulares. Los cambios en el tamaño y número de células también han servido para correlacionar y arrojar información en algunas patologías, para varios estudios de la biología y de otras ciencias.

Equipo

- Microscopio compuesto de campo claro
- Centrífuga clínica
- Ocular micrométrico y rejilla micrométrica
- Cámara de Neubauer

Reactivos

- Solución acuosa de azul de metileno al 1%
- Solución de Wright o colorante de Giemsa
- Solución isotónica de NaCl (0.85%)
- Solución para diluir leucocitos: ácido acético al 3% y 1 gota de violeta de genciana al 1%.

Materiales

- Portaobjetos y cubreobjetos
- Jeringa desechable heparinizada
- Lámpara de alcohol
- Aguja de disección
- Pipeta Pasteur
- Cajas Petri
- Vasos Koplín
- Tubos
- Pipetas de Thomas para eritrocitos y linfocitos
- Muestras de sangre y de semen

Método

Siguiendo con cuidado las indicaciones, obtenga una muestra de sangre venosa por medio de punción: ligue el brazo del donador arriba del antebrazo, limpie la parte anterior del codo con una torunda humedecida con alcohol. Cuando la vena se haga visible, unos minutos después de colocar la ligación, introduzca la aguja y jale el émbolo de la jeringa para obtener 4 mL de sangre. Con cuidado, vacíe la sangre en un tubo de 5 mL que contenga anticoagulante. Tape con el tapón de corcho o caucho.

A. Preparación de frotis de sangre

1. Agite suavemente el tubo con la sangre. Destape y, con ayuda de la pipeta Pasteur, tome una gota de sangre y póngala en el extremo de un portaobjetos limpio.
2. Coloque otro portaobjetos sobre la gota de sangre permitiendo que ésta se extienda por capilaridad a todo lo ancho del extremo del portaobjetos colocado en ángulo. Extienda suavemente y sin detenerse hacia el otro extremo. El frotis debe quedar translúcido (monocapa de células).
3. Seque el frotis al aire y fije ligeramente a la flama de la lámpara de alcohol.
4. Fije con alcohol metílico por 1-2 minutos y tiña con colorante de Giemsa. Si utiliza colorante de Wright no necesita fijar, ya que este contiene alcohol. En ambos casos teñir durante 15-20 minutos.
5. Lave con agua de la llave para eliminar el exceso de colorante. Deje secar al aire y observe al microscopio con el objetivo de 40X y 100X.
6. Compare la que observa en sus preparaciones al microscopio con la figura 1.

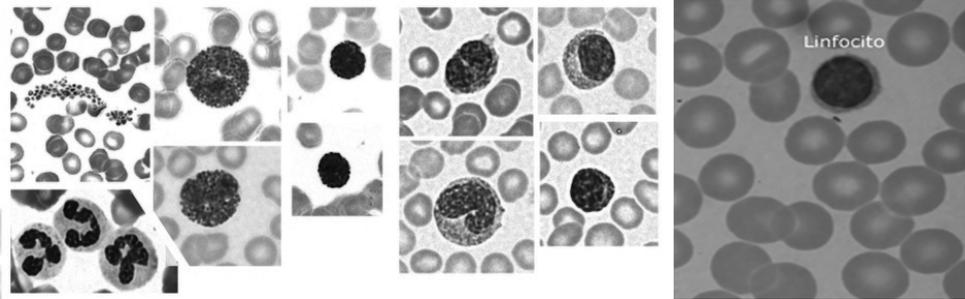


Figura 1. Leucocitos (izquierda), Eritrocitos y Linfocito (derecha)

B. Frotis de semen

1. Con una pipeta Pasteur ponga una gota de semen en un portaobjetos limpio y haga un frotis semejante al de sangre.
2. Fije suavemente a la flama y después con alcohol, como la muestra de sangre.
3. Tiña con azul de metileno durante 8 minutos. Lave con agua de la llave para eliminar el exceso de colorante. Deje secar al aire y observe al microscopio con el objetivo de 40X y 100X. Compare su preparación con la figura 2.

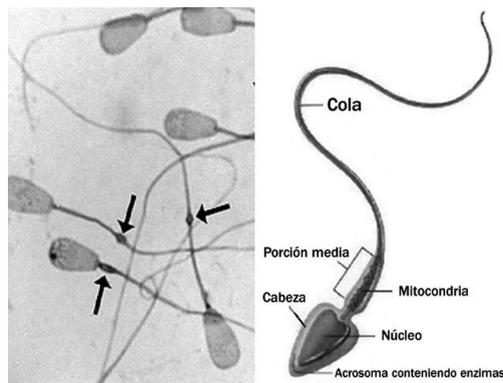


Figura 2. Espermatozoides

Resultados

Realizar esquemas de los distintos tipos de células observadas, compararlos con las fotografías de los libros. No olvidar colocar en sus esquemas el aumento con el que realizó sus observaciones.

Medición del diámetro y longitud de las células observadas al microscopio

Para medir los distintos tipos de células se requiere utilizar dos aditamentos:

- a. El micrómetro de objeto (portaobjeto graduado, por ejemplo 5 + 100/100)
 - b. El micrómetro reticular para oculares (10:100, diámetro del ocular en mm)
1. Quite un ocular del microscopio del lado del ojo con el que usted acostumbra observar y coloque el ocular que tiene la escala micrométrica. Observe con detalle ésta y gire su ocular para que posteriormente ubique la escala.

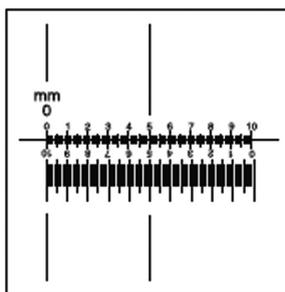


Figura 3. Escala del micrómetro del ocular

2. Coloque el micrómetro de objeto –también conocido como objetivo micrométrico– en la platina. Utilizando el objetivo 10X enfoque has-

ta que vea la escala. Compruebe que, tanto la escala del ocular como la del objetivo inicien en cero y difieran en tamaño y número de divisiones.

3. Haga coincidir los ceros de ambas escalas poniéndolas en paralelo. Ubique otra división donde ambas escalas coincidan y cuente cuántas divisiones corresponden a la escala del ocular y cuántas a las del objetivo. Anótelas.
4. La equivalencia de divisiones de la escala del ocular con respecto a la del objetivo es de 10 micras, por lo que 10 es una constante.

Cálculos para obtener el coeficiente micrométrico

1. Divida el número de divisiones del objetivo entre las divisiones del ocular que obtuvo en el paso 4 de la sección anterior y multiplique por 10. El número que obtenga es el coeficiente micrométrico para el microscopio y para el objetivo que está utilizando, en este caso de 10X. Para obtener el coeficiente micrométrico a 40X siga los mismos pasos y haga las mismas operaciones.
2. Una vez que ha obtenido los coeficientes micrométricos, retire de la platina la escala y coloque en su lugar el frotis de sangre o el de semen.
3. Con la escala del ocular mida sus células y anote cuántas divisiones de su escala son necesarias para medir el diámetro o longitud, para posteriormente multiplicar por el coeficiente micrométrico que Ud. obtuvo con el objetivo con el que realiza su observación actual. La multiplicación del número de divisiones de la escala del ocular con el coeficiente del objetivo, le dan el tamaño en micras (μm).
 - a. Mida 25 células de cada una de las preparaciones que realizó y saque el valor medio de cada tipo celular.
 - b. ¿A qué grupo de la diversidad celular de sus muestras correspondió el tamaño celular más pequeño y el más grande que determinó?

Conteo con la cámara de Neubauer

1. La cámara de Neubauer permite contar células que están suspendidas en una solución, como es el caso de las células sanguíneas. Para tomar la muestra de sangre se requiere una pipeta de Thomas para eritrocitos (cuenta roja) y la una pipeta de Thomas para leucocitos (cuenta blanca); ambas pipetas se distinguen porque en su interior tienen un aditamento rojo o blanco (ver figura 4).

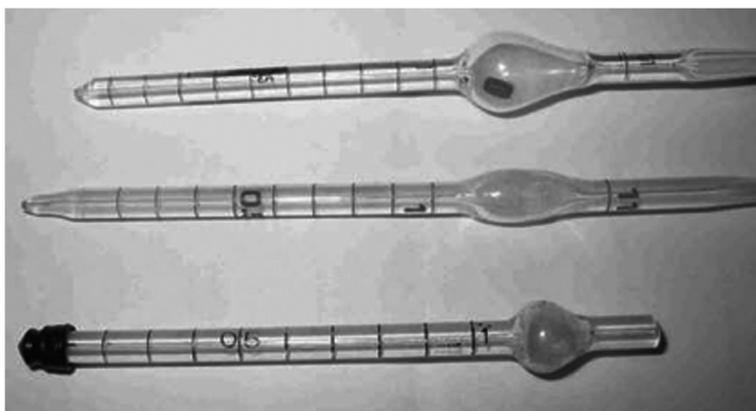


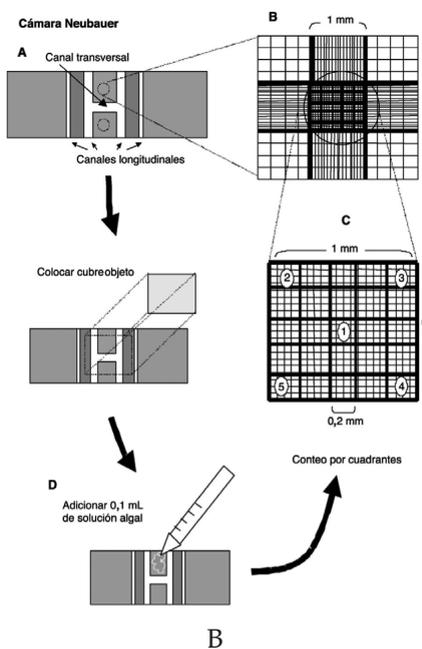
Figura 4. Pipetas de Thomas para leucocitos (centro) y para eritrocitos (arriba)

2. Cuando se utiliza la pipeta de Thomas para contar eritrocitos, la muestra de sangre debe llegar a la marca de 0.5. Dependiendo de la dilución que se quiera hacer de la muestra, con la pipeta que ya contiene sangre se toma solución isotónica hasta la marca de 101 para obtener una dilución de 200 veces. Si se toma solución hasta la marca de 1, entonces la dilución será de 100 veces.
3. Reconocimiento de la cámara de Neubauer. Coloque la cámara de Neubauer en la platina de su microscopio y localice la cuadrícula con su objetivo de 10X. Observe que la cámara tiene una cuadrícula dividida en nueve cuadrantes grandes, cada uno de los cuales tiene un área de 1 mm^2 y una profundidad de 0.1 mm^3 . Los cuadrantes grandes de los extremos están divididos en 16 cuadros que se utili-

zan para el conteo de leucocitos. El cuadrante central está dividido en 25 cuadros y se utiliza para el conteo de los eritrocitos (figura 5).



A

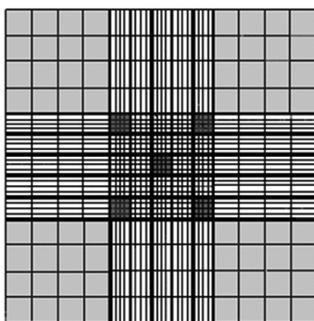


B

Figura 5. A. Cámara de Neubauer. B. Esquema que muestra la disposición de la retícula para el conteo de eritrocitos y linfocitos

4. Observe que en la retícula de la cámara de Neubauer las áreas de recuento de eritrocitos y linfocitos son diferentes (figura 6). Los glóbulos rojos se cuentan en las áreas coloreadas de rojo en el cuadrante central, mientras que los glóbulos blancos se cuentan en las áreas coloreadas de azul (cuadrantes de las esquinas).

■ áreas en donde se cuentan glóbulos blancos



■ áreas en donde se cuentan eritrocitos

Figura 6. Áreas de conteo en la cámara de Neubauer

5. Los nueve cuadrantes tienen un superficie de 1 mm^2 , pero el central está subdividido en 25 cuadros que miden 0.2 mm de lado, por lo que la superficie de cada uno es de 0.04 mm^2 y 0.10 mm de profundidad (figura 7). El factor de dilución es, por tanto, de 1:200 y convierte el número de glóbulos rojos contados en 5 cuadrados a número de glóbulos rojos/ μL , $1 \mu\text{L}$ (microlitro) = 1 mm^3

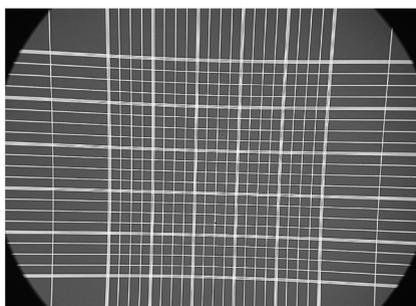


Figura 7. Vista de la cámara de Neubauer con el objetivo 10X

La siguiente imagen muestra el campo que se ve al microscopio con el objetivo de 40X. Sólo es visible el centro de la retícula. Intenta verificar esto al ir moviendo el campo de derecha a izquierda y de arriba a abajo.

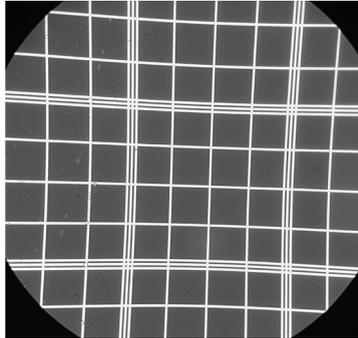


Figura 8. Vista de la cámara de Neubauer con el objetivo 40X. Observe la doble o triple línea, que separa cada uno de los 25 cuadros

6. Llenado de la cámara: Coloque encima de la cámara un cubreobjetos, esto da una profundidad constante de 0.1 mm, de tal forma que al llenarla se tendrá un volumen en la cámara de 0.1 mm^3 y en cada uno de los 25 cuadros, un volumen de 0.004 mm^3 . Tenga en cuenta estos datos para que entienda la fórmula que se da más adelante para conocer el número de células por mm^3 .
7. Llène con la muestra de sangre una pipeta para eritrocitos hasta la marca de 0.5, limpie la pipeta y llénela por completo hasta la marca 101 con solución salina. Ha diluido 200 veces su muestra.
8. Antes de llenar la cámara, agite la pipeta en forma horizontal; deseche tres gotas y con la cuarta llene la cámara por capilaridad (recuerde que hay que poner el cubreobjetos sobre ella antes de llenar), como se muestra en la figura 9.



Figura 9. Llenado de la cámara después de poner el cubreobjetos

Conteo de eritrocitos

1. Deje reposar la cámara llena por cinco minutos en un ambiente húmedo, puede utilizar una caja de Petri tapada y que tenga adherido un papel humedecido con agua.

Lea 80 cuadritos de la cámara en una distribución homogénea. Cuenta los glóbulos rojos en los cinco cuadrados mencionados anteriormente para determinar el recuento de eritrocitos. Anote sus datos.

Muy importante: Cuando un eritrocito se sitúa en mitad de las líneas superior y/o de la izquierda, entonces es contabilizado. Pero no se contabiliza cuando se sitúa en mitad de las líneas inferior y/o de la derecha.

2. Con los datos del número total de células (en los cuatro extremos y al centro) aplique la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células} = \frac{\text{Núm. de células contadas} \times \text{dilución} \times 4000}{\text{Núm. de cuadros donde se contó (80)}}$$

Conteo de leucocitos

1. Llène con sangre la pipeta para leucocitos, que es parecida a la de eritrocitos, pero de menor volumen. Está dividida en 10 partes, señaladas como 0.5 y 1; arriba del bulbo está la señal de 11. Cuando se toma sangre en 0.5 y se llena con la solución para diluir leucocitos hasta la marca 11, se tiene una dilución de 20. Si llena con sangre hasta 1, se tendrá una dilución de 10.
2. Llène la cámara de Neubauer como se explicó anteriormente y cuente los leucocitos en los cuatro cuadrados grandes de las esquinas (1 mm de lado).
3. Si llamamos B el número de leucocitos en 4 cuadros grandes, existen B glóbulos blancos en $4 \times 1 \times 0.1 = 0.4 \text{ mm}^3$, o sea

$$\frac{B \times 10}{4} \text{ glóbulos blancos ocupan } 1 \text{ mm}^3$$

Como la sangre está diluida 20 veces, el núm. de células por mm^3 es:

$$\frac{B \times 10 \times 20}{4} = 50 \times B$$

4. Al terminar, lave con agua y jabón su cámara, sin rayarla, lo mismo que sus pipetas.

Conteo de espermatozoides

1. En un tubo de ensaye ponga 0.9 mL de solución salina isotónica.
2. Agite la muestra de semen que ha tomado y con una pipeta tome 0.1 mL y mezcle con los 0.9 ml de la solución salina.
3. Agite la muestra de semen diluido y tome con una pipeta Pasteur el volumen necesario para llenar la cámara de Neubauer.
4. Siga los pasos que utilizó para el conteo de eritrocitos.

Resultados

1. Haga un cuadro con los tipos de células que observó. Indique su nombre, morfología y número por mm^3 , calcule su tamaño promedio.
2. ¿Qué diferencias encontró entre el número de eritrocitos y leucocitos que contó?
3. ¿Qué diversidad celular encontró en el frotis de sangre?
4. ¿Qué diversidad celular se encuentra en el frotis de semen?
5. Indique el número de eritrocitos y de leucocitos en dos organismos diferentes al humano.
6. Haga una tabla en donde indique el número de eritrocitos y de leucocitos de cada uno de los equipos y discuta los resultados.

Investigación extramuros

1. Consulte libros citología, de bioquímica clínica, hematologías para que conozca los diferentes tipos celulares y su función.
2. ¿Qué función tiene cada una de las células sanguíneas?
3. ¿Cuál es el número normal de eritrocitos y leucocitos por mm^3 ?
4. ¿En qué patologías el número de eritrocitos están disminuidos?
5. ¿En qué patologías los leucocitos están aumentados o disminuidos?
6. ¿Por qué a igual volumen no existe igual número de células?
7. Reporte el número de eritrocitos y leucocitos mm^3 de otras especies.
8. La morfología y motilidad de los espermatozoides, ¿en qué diagnósticos se utiliza?
9. Si no encontró en el conteo de células ni en la medición del tamaño de células los valores reportados, ¿a qué cree que se deba?
10. Metodológicamente, ¿qué propone para mejorar esta práctica?

PRÁCTICA 4

TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA MEMBRANA CELULAR

Objetivo

Que el alumno identifique los diferentes tipos de transporte a través de la membrana celular, tanto transporte pasivo (ósmosis), como transporte activo. Además observará el efecto de diferentes solventes sobre la solubilidad de los lípidos de la membrana.

Introducción

La membrana celular está presente en toda la biodiversidad. Es una estructura dinámica constituida por fosfolípidos, colesterol y alguno de sus derivados, proteínas con residuos de aminoácidos hidrofílicos (lisina, histidina, asparagina) e hidrofóbicos (alanina, valina, glicina) y carbohidratos.

A través de la membrana fluyen diversas sustancias por diferencias de concentración, donde la célula no utiliza energía metabólica (transporte pasivo); y las que lo hacen en contra del gradiente de concentración utilizando ATP (transporte activo). La célula incorpora de su ambiente sustancias e incluso otros organismos por endocitosis, mecanismo por medio del cual los compuestos/organismos que entran al citoplasma lo hacen rodeados por pequeñas unidades de membrana (endosomas). En contraparte, la célula elimina componentes y dese-

chos diversos por exocitosis. La célula a través de la membrana se comunica con su ambiente e intercambia (transporta) materia y energía.

Equipo y materiales

- Microscopio compuesto
- Espectrofotómetro
- Tubos de ensaye de 15x160
- Pipetas volumétricas de 5 mL
- Matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapón y tubo de aireación (tres)
- Jeringas de 1 mL
- Tijeras
- Portaobjetos y cubreobjetos

Material biológico

- Sangre heparinizada
- Betabel
- Intestino de rata o de pollo

Reactivos

- Soluciones de glucosa y cloruro de sodio (NaCl) en concentraciones de 0.01, 0.04, 0.08, 0.12, 0.24 y 0.48 M
- Metanol 22 M, etanol 8.5 M, n-propanol 3.0 M, n-butanol 1.1 M y alcohol amílico 0.38 M.
- Solución de Krebs-Ringer (kr)
- Solución de L-tirosina a una concentración de 12 $\mu\text{M}/\text{mL}$ (micromoles por mililitro)
- Solución acuosa de 2,4-dinitrofenol 1 mM
- Reactivo de ninhidrina al 3% en metil celosolve

Método

A. Procedimiento 1. Soluciones isotónicas, hipotónicas e hipertónicas y ósmosis.

1. En una gradilla ponga una serie de seis tubos y agregue 2 mL de cada una de las soluciones de glucosa y en otros seis tubos las de NaCl. Lo más simultáneo que le sea posible, agregue 1 gota de sangre a cada tubo; mezcle bien, observe, registre el aspecto de su solución y deje reposar.
2. Después de 10 minutos observe nuevamente el aspecto de su solución y determine en qué tubos hubo lisis.
3. Tome una gota de cada una de las suspensiones y, por separado, colóquelas en un portaobjetos limpio.
4. Póngale encima un cubreobjetos y observe al microscopio con el objetivo de 40X. Elabore esquemas de sus observaciones.

Resultados

1. Elabore una tabla: en una columna registre la concentración de la solución empleada y en otra anote en cuál de ellas se presentó hemólisis y si esta es total o parcial. Complemente el registro de los resultados en la tabla con las observaciones al microscopio de la forma que presentan los eritrocitos.
2. Además de dibujar los cambios morfológicos que detectó en cada solución, explique brevemente a qué se deben.
3. Indique cuál es la solución isotónica de NaCl y de glucosa para los eritrocitos humanos.
4. ¿En qué concentraciones ocurrió lisis celular y por qué?
5. ¿Cómo distingue las soluciones hipotónicas de las hipertónicas? Explique.

B. Procedimiento 2. Solubilidad de lípidos de membrana

Las células de betabel contienen alta concentración de un pigmento rojo denominado antocianina. Cuando las células en cortes de betabel son expuestas a compuestos que disuelven los lípidos de la membrana, el pigmento sale del tejido y entonces las células pierden coloración.

1. Con ayuda de un bisturí obtenga cuadros de aproximadamente 2 a 4 mm de lado, tratando que tengan el mismo grosor. Colóquelos en un portaobjetos excavado y, después de colocarles encima el cubreobjetos, observe con el objetivo de 5X.
2. Con ayuda de una pipeta Pasteur adicione alrededor del cubreobjetos 1 mL de uno de los alcoholes que se utilizan en esta práctica, permitiendo que entre en la concavidad por capilaridad. Tenga cuidado de que no se desprenda el cubreobjetos. Este paso se repetirá con cortes diferentes de betabel para cada uno de los alcoholes.
3. Inmediatamente después de adicionar el alcohol inicie el registro del tiempo que transcurre hasta la salida del pigmento, por la solubilidad de los lípidos de la membrana.
4. Repita la observación con toda la serie de alcoholes, después de diluirlos a la mitad.
5. Para cada alcohol y disolución, calcule el coeficiente de penetración dividiendo el tiempo de aparición del pigmento por la concentración molar del alcohol.
6. Grafique el coeficiente de penetración contra el coeficiente de partición de cada alcohol (solubilidad relativa), utilice los datos de los alcoholes dados en la siguiente tabla:

<i>Alcohol</i>	<i>Fórmula</i>	<i>Peso molecular</i>	<i>Coefficiente de partición</i>
Metanol	CH ₃ OH	32.04	0.01
Etanol	C ₂ H ₅ OH	46.07	0.03
n-Propanol	C ₃ H ₇ OH	60.09	0.13
n-Butanol	C ₄ H ₉ OH	74.12	0.58
n-Amílico	C ₅ H ₁₁ OH	88.15	2.0

C. Procedimiento 3. Transporte activo de aminoácidos (L-tirosina)

1. Coloque 150 mL de solución Krebs-Ringer (KR) en un matraz de 250 mL y etiquete como matraz 1. Póngalo a calentar a 37°C y oxigénelo circulando aire con ayuda de una bombita de pecera, cuando menos durante 10 minutos.
2. Mientras se incuba el matraz con solución KR, corte el intestino delgado en fragmentos de 5 a 10 cm de longitud, a partir del estómago y descarte los últimos 10 cm. Requiere 10 segmentos. Una alternativa a este procedimiento es utilizar un fragmento de intestino de 30-35 cm de longitud por cada una de las condiciones experimentales (tres segmentos en total).

Nota: Se puede trabajar con intestinos de pollo o de rata.

3. Transfiera los fragmentos de intestino a un recipiente con solución de KR fría. Con ayuda de una varilla delgada de vidrio invierta los fragmentos de intestino como si volteara un calcetín, para que la parte de adentro quede hacia afuera. Hágalo con mucho cuidado para no romper las paredes.
4. Cierre uno de los extremos con hilo resistente, por ejemplo, de cáñamo, y con una jeringa llene los segmentos de intestino con solución de KR, de forma tal que queden como saquitos llenos de solución. Si decidió utilizar fragmentos largos, después de invertir y llenar cada uno de ellos con solución KR, divídalo en los segmentos necesarios por medio de dos amarres continuos, como se muestra en el siguiente esquema.

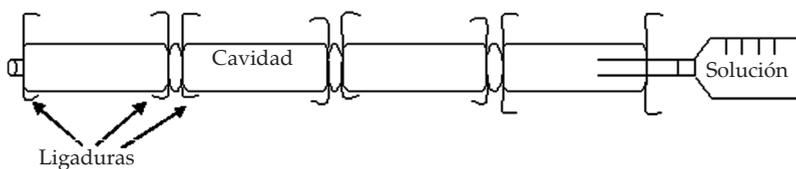


Figura 1.

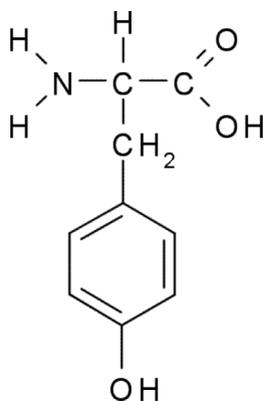
En este caso se requiere uno dividido en tres compartimentos y dos, en tres.

5. Una vez que termine de preparar los 10 saquitos/3 sacos de intestino llenos de solución de KR y estén cerrados por ambos lados, colóquelos en el matraz (1) e incúbelos a 37°C durante 5 minutos, manteniendo la oxigenación.
6. Mientras tanto, prepare los matraces 2 y 3 como sigue:
 - a) Matraz 2. Ponga 150 mL de solución KR + 20 mL de solución de L-tirosina. Mezcle y ajuste el pH a 7.4 con solución 1.0 N de NaOH. Deje estabilizar incubando a 37°C con oxigenación durante 5 a 10 minutos.
 - b) Matraz 3. Coloque 145 mL de solución KR + 20 mL de solución de L-tirosina + 5 mL de solución de 2,4-dinitrofenol. Ajuste el pH a 7.4 con solución 1.0 N de NaOH. Deje estabilizar incubando a 37°C con agitación durante de 5 a 10 minutos.
7. Transcurrido el tiempo de incubación del paso 6 transfiera 3 intestinos al matraz 2, y 3 al matraz 3. En ambos casos mantenga la oxigenación y empiece a tomar el tiempo transcurrido desde que transfirió los segmentos de intestino del matraz 1 a los matraces 2 y 3.
8. Saque un intestino del matraz 1 a los 0, 10, 20 y 40 minutos. Cada vez que saque un saquito vierta la solución que contiene en un tubo de ensaye etiquetado con el tiempo correspondiente. Al iniciar experimento, etiquete un juego de tubos 1/0, 1/10, 1/20 y 1/40 minutos.

Nota: En el caso de trabajar con segmentos de intestino grandes divididos con amarres, con ayuda de una jeringa de insulina se extrae el contenido de cada segmento, se sacan de 1.5 a 2.5 mL en los tiempos correspondientes (0, 10, 20 y 40 minutos).
9. De los matraces 2 y 3 se saca cada uno de los saquitos a los 10, 20 y 40 minutos. Igual que en el paso 8, verter o extraer con la jeringa el contenido del intestino y ponerlo en el tubo de ensaye correspondiente. Recordar que estos fueron etiquetados de acuerdo con el matraz y el tiempo de incubación de cada muestra como: 2/10, 2/20 y 2/40; 3/10, 3/20 y 3/40.
10. Guardar los tubos en congelación para que en la siguiente práctica se cuantifique la cantidad de L-tirosina transportada, para lo cual se requerirá, primeramente, elaborar una curva estándar de L-tirosina.

CONTINUACIÓN DE LA PRÁCTICA 4.
METODOLOGÍA PARA CUANTIFICAR EL TRANSPORTE
DE L-TIROSINA A TRAVÉS DE LA MEMBRANA
(CURVA ESTÁNDAR DE L-TIROSINA)

La determinación de cuanto soluto (L-tirosina) fue transportado a través del intestino se hará por desarrollo de color y extrapolando los resultados obtenidos en las muestras con respecto a la curva estándar. La L-tirosina es uno de los tres aminoácidos aromáticos que sólo sintetizan plantas y microorganismos, por lo que el resto de los organismos (animales) lo adquieren a partir de las proteínas que se ingieren en los alimentos, las cuales se hidrolizan liberando la mayoría de los aminoácidos que las forman y son absorbidos en el intestino.



Fórmula de la L-tirosina

La preparación de la curva estándar de L-tirosina y la cuantificación de este aminoácido en las muestras obtenidas se realizan de la siguiente forma:

1. Los tubos que contienen las muestras congeladas –que se obtuvieron para cuantificar L-tirosina absorbida a través del epitelio intestinal– se ponen a descongelar.
2. Mientras tanto, a partir de una solución de L-tirosina de 12 micromoles por mililitro ($\mu\text{M}/\text{mL}$) se hace una dilución de 1:10 y se le agrega acetato de sodio en una proporción de 200 mg por cada 25 mL de la dilución, para obtener un pH de entre 5 y 7 para que se realice la reacción colorida con ninhidrina.
3. Se marca una serie de tubos de ensaye de 16x160 del 1 al 11.
4. Adicionar a cada uno de los tubos los reactivos necesarios para cuantificar L-tirosina en el orden y cantidades especificados en la tabla siguiente. Agregar los reactivos siguiendo el orden de los tubos y por columna. Mezclar muy bien después de cada reactivo:

Curva patrón de L-tirosina

<i>Tubo</i>	<i>Solución estándar de L-tirosina</i> (12 $\mu\text{M}/\text{mL}$)	<i>Equivalen a μM</i> <i>tirosina</i>	<i>Solución de</i> <i>etanol (1:1)</i>	<i>Ninhidrina</i>	<i>DO</i> _{535nm}
1	0.0 mL	0	1.0 mL	0.5 mL	
2	0.1 mL	0.12	0.9 mL	0.5 mL	
3	0.2 mL	0.24	0.8 mL	0.5 mL	
4	0.3 mL	0.36	0.7 mL	0.5 mL	
5	0.4 mL	0.48	0.6 mL	0.5 mL	
6	0.5 mL	0.60	0.5 mL	0.5 mL	
7	0.6 mL	0.72	0.4 mL	0.5 mL	
8	0.7 mL	0.84	0.3 mL	0.5 mL	
9	0.8 mL	0.96	0.2 mL	0.5 mL	
10	0.9 mL	1.00	0.1 mL	0.5 mL	
11	1.0 mL	1.20	0.0 mL	0.5 mL	

5. Al mismo tiempo que se preparan los tubos para la curva estándar se van a preparar los tubos con las muestras obtenidas a diferentes tiempos de los matraces 1, 2 y 3.

6. Para la cuantificación de L-tirosina transportada por el epitelio intestinal se toma 0.05 mL del sobrenadante obtenido de cada una de las condiciones y se adicionan los reactivos en el orden y cantidades especificadas en la tabla siguiente

Tubo	0.05 mL de los problema	Et(OH)	Ninhidrina	DO a 535 nm	μM de L-tirosina
1	1/0	0.9 mL	0.5 mL		
2	1/10	0.9 mL	0.5 mL		
3	1/20	0.9 mL	0.5 mL		
4	1/40	0.9 mL	0.5 mL		
5	2/10	0.9 mL	0.5 mL		
6	2/20	0.9 mL	0.5 mL		
7	2/40	0.9 mL	0.5 mL		
8	3/10	0.9 mL	0.5 mL		
9	3/20	0.9 mL	0.5 mL		
10	3/40	0.9 mL	0.5 mL		

7. Los tubos de la curva estándar y de las muestras problema se ponen a ebullición en baño de agua (baño maría) durante 15 min., tapados con canicas para evitar la salida del vapor. Cumplido el tiempo de incubación se sacan y se ponen a enfriar en agua con hielo.
8. Adicionar a cada tubo 4.2 mL de mezcla etanol: agua, volumen: volumen.
9. Mezclar el contenido de los tubos perfectamente y leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 535 nm, usando como blanco el tubo 1 de la curva estándar (0 μM de L-tirosina).

Resultados

1. Con los datos obtenidos trazar una gráfica de la curva estándar de L-tirosina. En el eje de las "Y" poner la lectura $\text{DO}_{535\text{nm}}$ y en el de las "X" las μmoles de tirosina. Compare su curva con la que le muestren en el laboratorio.
2. Cuantifique los μmoles de L-tirosina de sus soluciones problemas utilizando la curva estándar. Para esto, extrapolar las DO obtenidas en la recta

sobre el eje de las "X" para obtener el valor de la L-tirosina transportada a través del epitelio intestinal.

3. Grafique los datos obtenidos a partir de los cálculos de las μmoles de L-tirosina en las muestras problemas contra el tiempo que se dejó incubando para que se realizara el transporte.

Investigación extramuros

Leer en libros de biología celular y fisiología sobre los diferentes procesos de transporte a través de la membrana y del transporte de aminoácidos. Investigar los efectos de la molaridad de las soluciones (hipotónicas, hipertónicas e isotónicas) en la presión osmótica y sus repercusiones en el transporte a través de la membrana.

Cuestionario

1. En los procedimientos I, II y III, ¿qué tipo de transporte se puede observar?
2. Una vez que haya establecido el tipo de transporte en los procedimientos I, II y III, especifique las diferencias entre uno y otro.
3. ¿Qué tipo de transporte para la glucosa ocurre en los eritrocitos?
4. ¿Por qué en el procedimiento III se ajusta el pH?
5. Escriba la reacción del aminoácido y la ninhidrina.
6. ¿Para qué se utiliza el 2,4-dinitrofenol?
7. ¿Qué utilidad práctica se tiene con las curvas estándar?
8. Investigue qué otras moléculas se transportan por transporte activo y, por lo tanto, pueden competir con el transporte de glucosa y de aminoácidos.
9. Las concentraciones isotónicas, ¿serán iguales para cada tipo celular que analizó?
10. En general, ¿qué repercusiones tiene sobre el transporte celular la tonicidad del ambiente?

PRÁCTICA 5

SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ORGANELOS CELULARES (TÉCNICA CITOQUÍMICA)

Objetivos

Que el estudiante utilice y comprenda un método de fraccionamiento celular para aislar organelos celulares y que éstos conserven sus propiedades funcionales para su identificación citoquímica.

Introducción

Muchos experimentos de biología celular requieren romper la célula para caracterizar un proceso metabólico o la función de una proteína (enzima) asociada a un organelo. En las células eucariontes los organelos celulares pueden dividirse en: aquellos que están delimitados por una sola membrana como los microcuerpos y lisosomas; organelos con doble membrana como la mitocondria y el cloroplasto; sin membrana como los ribosomas; y el sistema membranal interno que comprende el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. Todos ellos pueden ser separados utilizando métodos de centrifugación diferencial con variación de las revoluciones por minuto y el tiempo de centrifugación (figura 1) o por centrifugación en gradientes de densidad, con sacarosa al 0.25 M, por el hecho de que la mayoría de los organelos tiene peso molecular diferente, viscosidad o densidad diferentes.

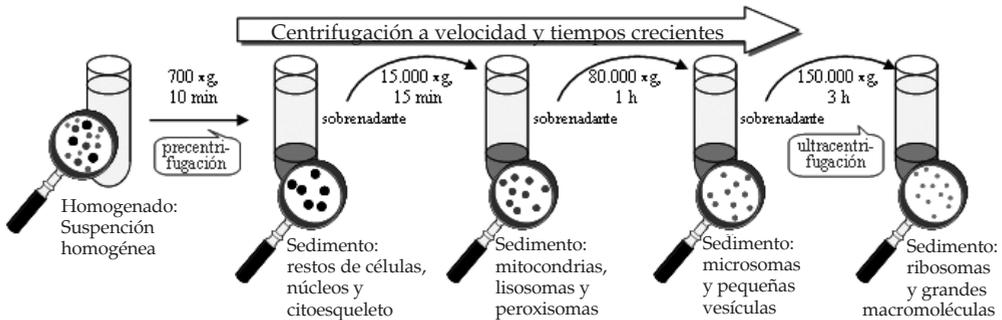


Figura 1. Separación de diferentes componentes en solución por medio de centrifugación

Los organelos separados por cualquiera de los métodos señalados se pueden identificar por dos criterios:

- a) Citoquímicos e inmunoquímicos identificando enzimas marcadoras
- b) Bioquímicos por medio de la actividad de sus enzimas

El alumno debe tener en cuenta que el material biológico es termolábil, por lo que todo el proceso para obtener las fracciones del extracto de hígado y alcanzar los objetivos de la práctica requiere que se hagan con la mayor rapidez posible y a una temperatura de 4°C (soluciones frías y en hielo).

Material biológico

- Hígado de pollo, res o rata (2.5 gr.) en ayuno de 8 hrs.
- Se puede traer una muestra de tejido animal o vegetal, para la extracción de organelos

Equipo y materiales

- Homogenizador, microscopio compuesto, centrífuga
- Tubos Falcon de 15 mL para centrifugar

- Jeringa de 1 mL
- 2 pipetas de 5 mL, 2 pipetas de 1 mL
- Vaso de precipitados de 100 mL
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Estuche de disección

Reactivos

- Medio de extracción de organelos (buffer de fosfatos 10 mM + cloruro de sodio (NaCl) 0.15M + cloruro de potasio (KCl) + 3.3 mM y cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 2.6 mM a pH 7.4)
- Soluciones y colorantes para la identificación de organelos: acetoorceína para núcleos, verde janus para mitocondrias, peróxido de oxígeno al 3% para peroxisomas, azul de bromotimol para lisosomas y uricosomas.

Método

a) Homogenización

1. La muestra de hígado se trabaja rápidamente y a 4°C. Después de sacrificar el organismo, el hígado se disecta y se enjuaga muy bien con agua de la llave.
2. El hígado o muestra de tejido se coloca en un vaso de precipitados de 100 mL y se le agregan de 15 a 20 mL de medio de aislamiento o extracción (buffer de fosfato) y se desmenuza con las tijeras.
3. Reemplazar el medio de extracción de 2 a 3 veces. Verter el contenido del vaso de precipitados al vaso de la licuadora y licuar durante 2-3 minutos para homogenizar bien.

b) Fraccionamiento celular

4. Tomar una alícuota del extracto celular y etiquetar como fracción 0 (Frc 0), la cual contiene todos los componentes celulares. El resto pasarlo a tubos Eppendorf de 1.5 o 2.0 mL y centrifugar a 2,000 rpm durante 10 minutos para sedimentar los núcleos. Separar el sobrenadante y colocarlo en otros tubos limpios. **No** lo tire, para continuar el fraccionamiento.
5. NÚCLEOS. El pellet o sedimento obtenido después de centrifugar contiene los núcleos y células enteras que no lograron romperse. Este precipitado se disuelve con buffer de extracción en una proporción de 1 a 4 mL y se etiqueta como fracción 1 (frc 1). Deberá tener un mínimo de cuatro fracciones 1: tres serán refrigeradas a -20°C para las siguientes prácticas de identificación bioquímica y una será utilizada en esta práctica para la caracterización citoquímica de esta fracción.
6. MITOCONDRIAS. El sobrenadante de la centrifugación anterior (paso 4) se vuelve a centrifugar a 5,000 rpm durante 20 minutos. El pellet formado contiene la fracción en donde están las mitocondrias, el cual se disuelve con buffer de extracción en una proporción de 1 a 4 mL y se etiqueta como fracción 2 (frc 2).
7. URICOSOMAS. El sobrenadante de la centrifugación anterior se vuelve a centrifugar a 7,000 rpm durante 20 minutos. El pellet o sedimento contiene los uricosomas y algunos lisosomas. Resuspéndalo suavemente en buffer en una proporción de 1 a 4. Se etiqueta como fracción 3 (frc 3).
8. LISOSOMAS. Para obtener lisosomas, el sobrenadante del paso 7 se vuelve a centrifugar a 7,000 rpm durante 35 minutos. El precipitado se resuspende con mucho cuidado en forma y será la posible fuente de lisosomas. Etiquetar como fracción 4 (frc 4).
9. RETÍCULO ENDOPLÁSMICO LISO. El sobrenadante de esta última centrifugación generalmente forma parte del sistema microsomal, que constituye los diferentes organelos que se separan después de las mitocondrias y que contiene el retículo endoplásmico liso, algunos peroxisomas o uricosomas. Se etiqueta como fracción 5 (frc 5).

10. Realizar cuatro frotis de cada una de las distintas fracciones (25 en total); separe en cuatro grupos, cada uno con fracción frc 0, frc 1, frc 2, frc 3, frc 4 y frc 5. A cada juego se le agregan los siguientes colorantes y reactivos que nos van a servir para determinar la presencia de:
 - a. Núcleos y material nucleotídico se tiñen con aceto orceína.
 - b. Mitocondrias presentan fluorescencia verde en presencia de verde janus.
 - c. Lisosomas (pH 5) viran el colorante azul de bromotimol de azul a verde o amarillo. El vire de color se realiza con base en el valor de pH, el cambio a amarillo es indicativo de pH 5.0
 - d. Uricosomas, en presencia de peróxido de hidrógeno hay presencia de efervescencia por la liberación de oxígeno, como consecuencia de la actividad de las peroxidases o catalasas.
11. Las fracciones se analizan al microscopio con el objetivo de 40X. Los resultados se reportará en una tabla colocando signos (-) o (+), dependiendo del material analizado donde se encuentran los organelos con base en la centrifugación y con base en la tinción que se utilizó para identificar cada fracción.
12. Todas las fracciones restantes se guardan a 4°C para las siguientes prácticas.

Resultados

Hacer un esquema y una tabla de lo que se observa en cada fracción teñida.

Investigación extramuros

1. Busque las diferencias entre centrifugación preparativa y centrifugación analítica.
2. Indique la diferencia de revoluciones por minuto (rpm), fuerza centrífuga (g) y unidades Svedberg.

3. ¿Cuántos tipos de rotor hay?, ¿qué ventajas te dan? y ¿en qué se utilizan?
4. Indique dos colorantes para teñir núcleo.
5. ¿Qué aplicaciones tiene la técnica de fraccionamiento celular?

PRÁCTICA 6

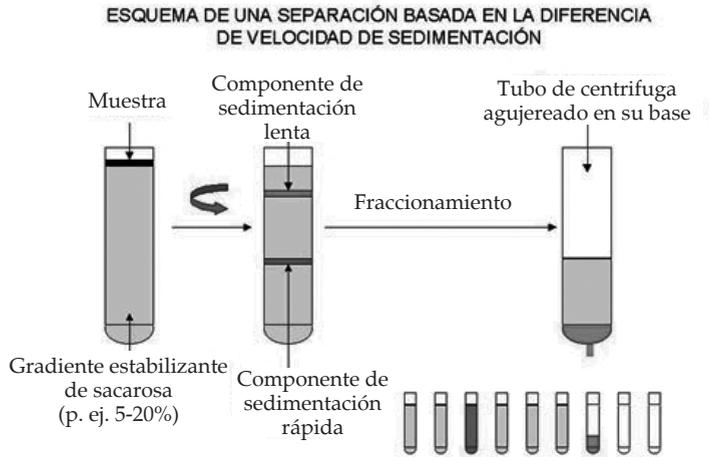
FRACCIONAMIENTO CELULAR POR CENTRIFUGACIÓN EN UN GRADIENTE DE DENSIDAD (GRADIENTE DE SACAROSA)

Objetivo

Separación de organelos celulares utilizando un gradiente de sacarosa e identificación de ellos en cada una de las fracciones obtenidas.

Introducción

En el homogenado de una muestra de tejido hepático hay una mezcla de sus componentes: tejido adiposo y conjuntivo, eritrocitos y hepatocitos, y componentes subcelulares. El fraccionamiento celular se utiliza para separar lo mejor posible todos los componentes en función de sus coeficientes de sedimentación y mediante la técnica de centrifugación diferencial. Esta técnica permite aislar los organelos celulares en fracciones heterogéneas cuando sus coeficientes de sedimentación difieren como mínimo en un orden de magnitud. Cada una de las fracciones está contaminada por los componentes de menor coeficiente de sedimentación y constituyen el punto de partida para continuar el proceso de purificación de un organelo celular con otras metodologías más “limpias”, como la centrifugación en un gradiente de sacarosa.



Material biológico

- 2.5 gr de hígado de pollo, de res o de rata en ayuno de 8 horas
- Una muestra de tejido animal o vegetal, para la extracción de organelos

Equipo y materiales

- Homogenizador
- Microscopio compuesto
- Centrífuga
- Tubos Falcon de 15 mL y tubos Eppendorf de 1.5 o 2.0 mL
- 2 pipetas de 5 mL, 2 pipetas de 1 mL, 1 pipeta Pasteur
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Estuche de disección

Reactivos

- Solución de sacarosa al 0.25M

- Medio de extracción de organelos (buffer de fosfatos 10 mM + cloruro de calcio (CaCl_2) 0.15M + cloruro de potasio (KCl) + 3.3 mM, y cloruro de magnesio (MgCl_2) 2.6 mM a pH 7.4
- Soluciones y colorantes para la identificación de organelos: aceto orceína para núcleos, verde janus para mitocondrias, peróxido de oxígeno al 3% para peroxisomas, azul de bromofenol para lisosomas

Gradiente de sacarosa

1. Se prepara un homegenado de hígado como en la práctica anterior.
2. Coloque en un tubo cónico de centrífuga 6 mL de sacarosa al 0.25 M y agregue lentamente, en la parte superficial, 2 mL del homogenado hepático o celular, cuidando que no se mezclen.
3. Centrifugar a 7,000 rpm durante 40 minutos.
4. Concluido el tiempo de centrifugación, sacar los tubos manipulándolos con sumo cuidado para evitar que el contenido se mezcle. Observe y trate de distinguir los diferentes gradientes.
5. Separe los gradientes de arriba hacia abajo con una pipeta Pasteur. Tenga **mucho cuidado** al manipular la pipeta al momento de absorber cada fracción de solución para que no se mezcle su muestra y transfíralas a tubos numerados como fracción de gradiente (frcg) 1, 2, 3, 4 y 5.
6. Si no le es posible observar las bandas de diferente densidad del gradiente, tome 1.5 mL de su mezcla centrifugada de arriba hacia abajo. Coloque cada fracción en los tubos numerados del 1 al 5.
7. Realizar cuatro frotis de cada una de las fracciones del gradiente. Agregar los siguientes colorantes y reactivos que nos van a servir para determinar la presencia de:
 - a. Núcleos se tiñen con aceto orceína.
 - b. Mitocondrias fluorescencia verde en presencia de verde janus.
 - c. Lisosomas (pH 5) virar color de la solución de azul de bromotimol (azul, verde, amarillo) con base en el valor de pH.
 - d. Uricosomas. En presencia de peróxido hay presencia de efervescencia por la liberación de oxígeno.

8. Los frotis se analizan al microscopio y se reporta en donde presuntamente se encuentran los organelos con base en la centrifugación y en el procedimiento de identificación que utilizó con cada fracción.
9. Todas las fracciones se guardan a 4°C para las siguientes prácticas.

Resultados

Hacer un esquema de lo que se observa en cada fracción teñida.

Cuestionario

1. Investigue en qué rangos de densidad (g/cm^3) se separan: membrana citoplasmática, microsomas, peroxisomas, mitocondrias y lisosomas.
2. Las partículas biológicas son osmómetros muy sensibles a las condiciones de fuerza iónica y viscosidad del medio. Busque tres solutos comerciales, indicando su densidad máxima, fuerza iónica, viscosidad, osmolaridad y su uso.
3. ¿De qué manera se aseguraría de que, efectivamente, esté trabajando con el organelo que le interesa?
4. ¿Cuáles son los principios de la centrifugación?
5. Mencione cuáles son los convenientes e inconvenientes de trabajar con la célula entera y con el fraccionamiento celular.
6. Mencione las aplicaciones donde utilice el fraccionamiento celular.
7. ¿Cuál es el fundamento de la efervescencia en presencia de hidrógeno?
8. ¿Cuál es el fundamento del cambio de color con el azul de bromotimol?

PRÁCTICA 7

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE ORGANELOS

Objetivos

1. Identificación de los diferentes organelos celulares en las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial o centrifugación en gradiente de densidad, utilizando un marcador enzimático específico.
2. Cuantificación de proteínas en organelos celulares.

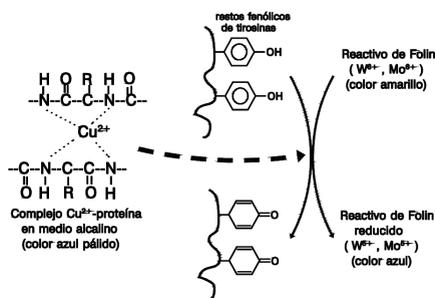
Introducción

Para identificar algunas de las estructuras de la célula, además de hacerlo por su morfología característica o por métodos de tinción diferencial, se utilizan marcadores bioquímicos o compuestos que están ligados específicamente a un organelo celular. Por ejemplo, los núcleos tienen una composición relativa de 90% de proteínas, 9% de ADN y 1% de RNA, en tanto que algunos organelos tienen enzimas específicas como la fosfatasa ácida, que les da identidad a los lisosomas.

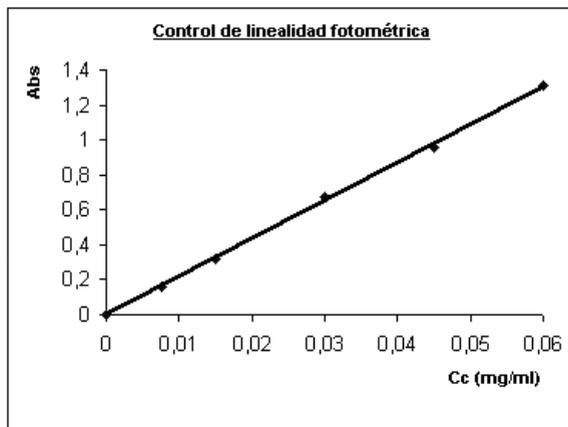
Para evaluar el proceso de separación y purificación de organelos por centrifugación diferencial o en gradiente, se determina la actividad enzimática en cada una de las fracciones. Para ello es necesario determinar la concentración de proteínas en las diferentes fracciones y, con esta información, calcular la actividad específica de cada enzima y así relacionar indirectamente con el grado de pureza.

Para cuantificar proteínas existen varios métodos. Uno de ellos, el de Biuret, requiere de cantidades grandes de proteínas, alrededor de 100 a 400 mgr/mL. En cambio, el de Lowry identifica concentraciones muy bajas de proteínas, aproximadamente 1,000 veces menos que el método de Biuret (tres órdenes de magnitud inferior), es decir de 100 a 400 $\mu\text{gr}/\text{mL}$. El método de Lowry (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. Consiste en añadir a la muestra un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer. Este método consta de dos etapas:

1. En medio alcalino, los iones Cu^{2+} se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de L-tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.
2. También en medio básico la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por los grupos fenólicos de los residuos de L-tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos, da lugar a un complejo de color azul intenso, el cual se puede cuantificar en el espectrofotómetro. Reacción:



Independientemente del método que se utilice para cuantificar proteínas en una muestra problema, es necesario realizar una curva patrón utilizando una solución con una concentración conocida de proteína. Generalmente se utiliza albúmina sérica bovina (BSA), la que está estandarizada en la mayoría de los laboratorios.



Material biológico

- Fracciones de extracto de hígado obtenidas en las prácticas anteriores (5 y 6).

Equipo y materiales

- Espectrofotómetro, Vortex
- 15 tubos de ensaye de 16x150

Reactivos

1. Soluciones estándar de albúmina a 20 mg/mL y 250 µg/mL

2. Reactivo de Biuret: sulfato de cobre 1.5 gr
 tartrato doble de Na y K 6.0 gr
 yoduro de potasio 1.0 gr
 hidróxido de sodio 2.5 N 300 mL
 agua destilada aforar a 1,000 mL
3. Lowry: SOL A: sulfato de cobre (CuSO_4) 1%
 Sol B: tartrato doble de Na y K 2%
 Sol C: carbonato de sodio (Na_2CO_3) 2% en NaOH 0.1N
 Sol D: 1 mL de solución A + 1 mL solución B
 Sol E: 1 mL de solución D + 50 mL sol C
 Reactivo Folin-Ciocalteau diluir en una proporción de 1:4 con agua
Nota: La solución D, solución E y Folin se preparan al momento de hacer la reacción.

Metodología

A. Curva Estándar de Proteína por el método de Biuret

1. Se marca una serie de tubos de ensaye de 16x150 del 1 al 6
2. A cada uno de los tubos se le adicionan los reactivos en el orden y cantidades especificados en la tabla siguiente:

Tubo	Albúmina 400 mgr/mL	Agua	Reactivo de Biuret	DO_{530nm}	Concentración mgr/mL de proteína
1	0.0 mL	2.0 mL	3 mL		
2	0.1 mL	1.9 mL	3 mL		
3	0.25 mL	1.75 mL	3 mL		
4	0.5 mL	1.5 mL	3 mL		
5	1.0 mL	1.0 mL	3 mL		
6	2.0 mL	0.0 mL	3 mL		

Nota: El tubo 1 es el control de reactivos y sirve para calibrar el espectrofotómetro, los tubos 2 al 6 son los que se utilizan para elaborar la curva estándar de concentración de proteínas (BSA).

3. Mezclar bien cada uno de los tubos después de adicionar cada reactivo.
4. Dejar reposar 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente leer la absorbancia a 530nm.

Para determinar la concentración de proteínas de una muestra desconocida –en este caso de sus fracciones se procede de igual manera– sólo que, en lugar de agregar solución de BSA de concentración conocida, se adicionan 0.1 mL de la muestra a la que se le quiere determinar la concentración de proteínas.

1. Se marca una serie de tubos de ensaye de 16x160 del 1 al 6.
2. A cada uno de los tubos se le adicionan los reactivos en el orden y cantidades especificados en la tabla siguiente:

Tubo	Muestra desconocida 0.1 mL	Agua	Biuret	DO _{530nm}	Concentración mgr/mL de proteína	Proteína Total
1	Frc0	1.9 mL	3 mL			
2	Frc1	1.9 mL	3 mL			
3	Frc2	1.9 mL	3 mL			
4	Frc3	1.9 mL	3 mL			
5	Frc4	1.9 m	3 mL			
6	Control reactivos	2.0 mL	3 mL			

Después de que se obtuvieron los valores, se extrapola el valor de la DO que se obtuvo en los tubos directamente sobre la recta de la curva estándar de albúmina. Buscando el valor de la DO en el eje de las Y se extrapola sobre la recta en las X para obtener el valor de la concentración de proteínas. En caso que se haya diluido la muestra se multiplica por el factor de dilución y, si se quiere saber el total de proteína, se multiplica por el total de mililitros que se tienen de cada fracción.

B. Curva estándar de proteína por el método de Lowry

Para la determinación de la concentración de proteína con la metodología de Lowry se sigue el mismo procedimiento, utilizando la solución estándar de BSA de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y, en lugar de reactivo de Biuret, se agregan 5 mL de solución E, **dejando reposar 10-15 minutos en oscuridad**. A continuación se agregan 0.5 mL de reactivo de Folin (diluido 1:4) a cada uno de los tubos. Se mezclan muy bien por agitación y se deja **reposar 20 minutos en oscuridad**, para que se desarrolle completamente la reacción coloreada. Determinar la absorbancia leyendo a 500 nm en el espectrofotómetro. Como ya se mencionó, en esta metodología la concentración de proteína en la solución stock es de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de albúmina.

Resultados

1. Hacer la curva patrón de concentración de proteína, graficando la densidad óptica obtenida con la lectura de los tubos 1-5 en el eje de las Y, contra la concentración de la solución stock de albúmina en el eje de las X, utilizando papel semilogarítmico y conservando la proporción de los datos. Se espera que todos los valores den una recta con cierta proporcionalidad; es decir, que a mayor DO mayor concentración de proteínas.
2. Los resultados de las muestras desconocidas –en este caso fracciones de la centrifugación diferencial y del gradiente de sacarosa– se van a cuantificar extrapolando los valores de la DO sobre el eje de las Y y determinándose la concentración de proteínas que sobre la DO le corresponde al eje de las X dentro de la recta.
3. Hacer un cuadro con las concentraciones por mL de proteínas de cada fracción, tanto de la centrifugación diferencial como de la del gradiente.

Cuestionario

1. ¿Cuál es la concentración de proteínas en las diferentes fracciones?, ¿A qué cree que se deba?
2. ¿Qué utilidad puede dársele a la técnica de cuantificación de proteínas?
3. ¿Cuándo se utiliza el método de Biuret y cuándo el de Lowry para determinar concentración de proteínas?
4. ¿Cuáles son los fundamentos químicos de ambas técnicas?
5. ¿Qué otros métodos existen para cuantificar proteínas? Descríbalos.

PRÁCTICA 8

LISOSOMAS: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA ÁCIDA

Objetivo

Medir la actividad de la fosfatasa ácida total en ausencia y presencia de l-tartrato utilizando un sustrato sintético, el p-nitrofenolfosfato.

Introducción

Los lisosomas son organelos celulares de membrana única y contienen una serie de enzimas hidrolíticas cuya máxima actividad es a pH 4.5. La mayoría de las enzimas que se localizan en los lisosomas se identifican en buffers acetatos pH 4.5.

La fosfatasa ácida se encuentra en casi todas las células, en los lisosomas, pero su actividad está aumentada en glóbulos rojos y en plaquetas. La cantidad de fosfatasa total en suero está formada de una fracción que proviene de los glóbulos rojos y plaquetas y de otra que proviene de la próstata, en el caso de los machos. La fosfatasa ácida de próstata tiene la propiedad de ser inhibida por l-tartrato. El hecho de que la mujer y el hombre tengan cantidades iguales de fosfatasa ácida nos habla que el origen de esta fosfatasa no es la próstata, sino el hígado o, probablemente, el bazo. Cantidades elevadas de fosfatasa ácida suelen considerarse como sinónimo de carcinoma de próstata en

metástasis (por el hecho de que la fosfatasa ácida reportada en sangre no es la prostática, pues esta es vertida al semen y a la orina, no a la sangre). Hay aumento de esta enzima también en hipertiroidismo primario, embolia pulmonar y en lisis plaquetaria (por obstrucción, no por aplasia).

La actividad de fosfatasa (ácida o alcalina) se mide mediante la hidrólisis de los ésteres orgánicos (mononucleótidos) transformándolos en nucleósidos y fosfatos inorgánicos; o bien, con sustratos acoplados a través de unión éster a un cromóforo (como sería el caso del p-nitrofenolfosfato, que se utiliza en esta práctica como sustrato de la enzima).

Equipo

- Estufa
- Espectrofotómetro

Materiales

- 13 tubos de ensayo de 16x150
- 1 pipeta de 5 mL, 1 pipeta de 1 mL
- Celdas para el espectrofotómetro

Reactivos

- Medio para identificar la actividad de fosfatasa ácida en LISOSOMAS: 50 mL de buffer de acetatos 20 mM pH 4.8 con tartrato de sodio 10 mM
- P-nitrofenol fosfato 50 mM como sustrato
- Hidróxido de sodio 100 mM para detener la reacción

Método

La fosfatasa ácida de lisosomas, como la alcalina que se localiza en Golgi, liberan el grupo fosfato del sustrato, liberando p-nitrofenol, el cual en un medio alcalino se transforma en un ion nitrofenol de color amarillo que puede detectarse a 420nm. La intensidad será proporcional a la actividad de la enzima. La reacción se efectúa en 30 minutos y se detiene por adición de hidróxido de sodio que inactiva a la enzima.

Las unidades de fosfatasa se definen como el número de milimoles (mM) de p-nitrofenol formado en 60 min en un mL, ya sea suero o –en este caso– homogenados. El procedimiento se realiza de la siguiente forma:

1. Se marcan una serie de tubos del 1 al 13 y se colocan en hielo (4°C)
2. A cada uno se le agregan los reactivos mostrados en la tabla siguiente:

<i>Tubo</i>	<i>Sustrato (p-nitrofenol fosfato)</i>	<i>Buffer de acetatos 20 mM pH4.5</i>	<i>Homegenado hepático 100 mgr/tubo</i>	<i>DO420nm</i>
1	0.1 mL	4 mL	Frc 0	
2	0	4 mL	Frc 0	
3	0.1 mL	4 mL	Frc 1	
4	0	4 mL	Frc 1	
5	0.1 mL	4 mL	Frc 2	
6	0	4 mL	Frc 2	
7	0.1 mL	4 mL	Frc 3	
8	0	4 mL	Frc 3	
9	0.1 mL	4 mL	Frc 4	
10	0	4 mL	Frc 4	
11	0.1 mL	4 mL	Frc 5	
12	0	4 mL	Frc 5	
13	0.1 mL	4 mL	0	

Nota: La cantidad de proteína que se utiliza en cada tubo de reacción es de 100 mgr. En caso de que la enzima que se está cuantificando es en suero se usan 0.2 mL

3. Después de adicionar todos los reactivos, los tubos se incuban a 30°C durante 20 a 30 minutos.
4. La reacción se detiene agregando 1 mL de hidróxido de sodio 100 mM. Mezclar bien y leer a 420nm. El equipo se calibra con el tubo 13 que es el blanco de reactivos.

Resultados

1. ¿Qué diferencias encontró entre los tubos a los que le agregó sustrato y a los que no? ¿A qué se debe?
2. Investigue cuáles son los valores normales de la fosfatasa ácida en niños y en adultos.
3. Investigue un método citoquímico para el estudio de la fosfatasa ácida en cultivos.
4. ¿Cuál de los pasos del cuadro anterior modificaría para el caso de la cuantificación de la fosfatasa alcalina en nuestro modelo?
5. La fosfatasa alcalina actúa a pH de 8-10; ¿qué compartimientos celulares poseen ese pH?

PRÁCTICA 9

PEROXISOMAS: IDENTIFICACIÓN DE LA URATO OXIDASA

Objetivo

Cuantificar la degradación del ácido úrico por la actividad de la enzima urato oxidasa presente en los uricosomas, determinando la disminución del ácido úrico en el tubo de reacción mediante el coeficiente de extinción de éste.

Introducción

Los peroxisomas son organelos celulares delimitados por una membrana. Se han identificado en hongos, algas, protistas, células vegetales y animales. En estos organelos están presentes flavin oxidasas –como la urato oxidasa– que actúan sobre su sustrato, el ácido úrico; de ahí que se llamen uricosomas. En humanos y en otros primates el producto final de la degradación de las purinas es el ácido úrico, el cual es procesado por la enzima urato oxidasa formando alantoína, para ser excretada. La urato oxidasa es una enzima marcadora de peroxisomas o uricosomas y promitocondrias. Estas oxidasas mixtas son dependientes de FAD y, particularmente, participan en la oxidación de purinas a ácido úrico. Este, a través de la urato oxidasa forma alantoína para que, posteriormente, por la alantoinasa y la alantocainasa se forme urea. En

estos organelos oxidativos se produce peróxido de hidrógeno, el cual inmediatamente se descompone a oxígeno y agua ($O_2 + H_2O$) por acción de las peroxidases o catalasas.

Material biológico

- Fracciones de extracto de hígado obtenidas en las prácticas anteriores

Equipo y materiales

- Estufa
- Espectrofotómetro
- Microcentrífuga
- Vortex
- 15 tubos de ensaye de 16x150

Reactivos

Medio para identificar la actividad de la urato oxidasa en URICOSOMAS o PEROXISOMAS:

1. 50 mL de buffer fosfatos 10 mM con cloruro de sodio 150 mM, cloruro de magnesio 2.6 mM, KCl 3.3 mM y 10 mL de succinato de sodio 0.1 M pH 7.6
2. Sustrato: 5 mL de ácido úrico 0.5 M
3. Reactivos para identificar y cuantificar ácido úrico: carbonato de sodio 10%, reactivo de Folin
4. Reactivos utilizados para desproteínizar: ácido sulfúrico 2/3 N, tartrato de sodio 10% y/o ácido tricloroacético 5%

Método

1. Una serie de tubos de ensaye de 16x150 perfectamente limpios, se marca del 1 al 11.
2. Los tubos se colocan en hielo en hielo (0-4°C) y se mantienen ahí el mayor tiempo posible. Para llevar a cabo la reacción, mezclar en los 4 mL de buffer fosfatos el volumen de cada fracción, que equivale a 100 mgr de proteína. De acuerdo con la siguiente tabla, adicionar a cada tubo el succinato de sodio 100 mM para regenerar el FAD que requiere la urato oxidasa y el ácido úrico (sustrato).

Nota: A cada uno de los tubos se le adicionan los reactivos en el orden y cantidades especificados en la tabla.

Tubo	Homogenado hepático 100 mgr de proteína/Tubo	Buffer fosfatos pH 7.6	Succinato de Na 100 mM	Acido úrico 500 µM	DO640nm
1	Frc 0	4 mL	1.0 mL	0.5 mL	
2	Frc 0	4 mL	1.0 mL	0	
3	Frc 1	4 mL	1.0 mL	0.5 mL	
4	Frc 1	4 mL	1.0 mL	0	
5	Frc 2	4 mL	1.0 mL	0.5 mL	
6	Frc 2	4 mL	1.0 mL	0	
7	Frc 3	4 mL	1.0 mL	0.5 mL	
8	Frc 3	4 mL	1.0 mL	0	
9	Frc4	4 mL	1.0 mL	0.5 mL	
10	Frc 4	4mL	1.0 mL	0	
11	Frc 5	4mL	1.0 mL	0.5 mL	
12	Frc 5	4mL	1.0 mL	0	
13	Control de reactivos	4mL	1.0 mL	0.5 mL	

3. Después de adicionar todos los reactivos, los tubos se sacan del hielo y se incuban a 30°C durante 30 minutos. Después de este tiempo se cuantifica la desaparición de ácido úrico o la aparición de urea.

Cuantificación de ácido úrico

1. En esta técnica se requiere precipitar las proteínas con ácido sulfúrico 2/3 N, para lo cual se agregan 0.25 mL por tubo y, además, se agregan 0.25 mL de tungstato de sodio al 10% o ácido tricloracético (TCA) al 10%.
2. Mezclar bien y dejar reposar 8 minutos. Centrifugar a 3,000 rpm por 10 minutos.
3. Para el desarrollo de color y cuantificar el ácido úrico que se localiza en el sobrenadante de los tubos tratados, como se indica en los pasos 1-2, se toman 2.5 mL de cada tubo y se les agregan 0.5 mL de carbonato de sodio al 10%, mezclando bien.
4. Adicionar 0.5 mL de reactivo de Folin para proteínas, diluido 1/10 (reacciona con el ácido úrico).
5. Cada tubo se mezcla muy bien y se deja reposar 20 minutos a temperatura ambiente.
6. Leer en el espectrofotómetro a 640nm.

Nota: El tubo 11 sirve para calibrar el espectrofotómetro como blanco de reactivos.

Resultados

1. Elabore una tabla con sus resultados.
2. ¿En qué fracciones se encuentra la máxima actividad de la urato oxidasa, xantino oxidasa y la peroxidasa?
3. Los resultados obtenidos, ¿correspondieron a lo esperado en las fracciones que obtuvo en la centrifugación diferencial y con la utilización del peróxido? ¿Por qué?

Investigación extramuros

Consulte libros de bioquímica clínica, bioquímica y manuales de análisis clínicos.

Cuestionario

1. ¿Qué método se utilizaría para cuantificar urea?
2. ¿Qué utilidad médica se le puede dar a esta técnica?
3. ¿Qué fundamento se utilizó para cuantificar el ácido úrico o urea involucrado en la actividad de la urato oxidasa de uricosomas?
4. ¿En qué organismos no existe actividad de urato oxidasa? ¿Por qué?
5. ¿Por qué los peroxisomas están relacionados con deslipidemias?
6. ¿Qué función tienen los PPARS (*proliferation peroxisomes activating receptors*)?

PRÁCTICA 10

RETÍCULO ENDOPLÁSMICO LISO: IDENTIFICACIÓN DE CITOCROMO P450

Objetivo

Identificar el citocromo P450 (CYT P450) en las fracciones celulares obtenidas por centrifugación diferencial y en gradiente como marcador de microsomas.

Introducción

Las enzimas involucradas en el metabolismo de xenobióticos están localizadas en el interior de las células, primordialmente en los hepatocitos del hígado. En la célula hepática la actividad enzimática se ubica en el retículo endoplásmico liso, que corresponde a la fracción microsomal que se conoce como S9, ya que se obtiene al centrifugar el homogenizado hepático a 9,000 rpm.

En la fracción microsomal hay un sistema multienzimático que contiene tanto al CYT P450 como a la oxidasa terminal, la cual participa como transportador de electrones en el sistema enzimático oxidativo. La determinación de la presencia de este citocromo es una manera indirecta de medir enzimas activas en el complejo de oxidasas mixtas, ya que la mayoría se induce por el propio sustrato; una súper inducción se realiza en presencia de barbitúricos como el fenobarbital o pento-

barbital. Esta estrategia experimental se utiliza para obtener fracciones activas inducidas de S9 en ratas, para el estudio de contaminantes ambientales que requieran metabolizarse en las pruebas de identificación de mutagénos y carcinógenos, principalmente en sistemas bacterianos que carecen de este sistema.

El CYT 450 es una hemoproteína como la citocromo oxidasa. Ambas unen al monóxido de carbono, sin embargo, sólo el CYT P450 en presencia de monóxido de carbono modifica su absorción a 450nm.

Materiales y equipo

- Espectrofotómetro
- Estufa

Reactivos

- Buffer de fosfatos 10 mM pH 7.4 con KCl al 1.15%
- Reactivos para cuantificar CYT P450 inducido:
 - o Hidrosulfito de sodio o ditionita (polvo)
 - o Sistema generador de CO (ácido fórmico y pirita) o humo de tabaco

Método

El procedimiento es muy similar a todos los anteriores. Los tubos de ensaye necesarios se enumeran y se les agregan los reactivos que se indican en la tabla siguiente:

<i>Tubo</i>	<i>Hidrosulfito 8 mgr</i>	<i>Buffer fosfatos 10 mM pH 7.4</i>	<i>Homogenado hepático 100 mgr</i>	<i>CO</i>	<i>DO450nm</i>
1	+	4 mL	Frc 0	+	
2	-	4 mL	Frc 0	-	
3	+	4 mL	Frc 1	+	

(continúa)

<i>Tubo</i>	<i>Hidrosulfito 8 mgr</i>	<i>Buffer fosfatos 10 mM pH 7.4</i>	<i>Homogenado hepático 100 mgr</i>	<i>CO</i>	<i>DO₄₅₀nm</i>
4	-	4 mL	Frc 1	-	
5	+	4 mL	Frc 2	+	
6	-	4 mL	Frc 2	-	
7	+	4 mL	Frc 3	+	
8	-	4 mL	Frc 3	-	
9	+	4 mL	Frc 4	+	
10	-	4 mL	Frc 4	-	
11	+	4 mL	Frc 5	+	
12	-	4 mL	Frc 5	-	
13	+	4 mL	Control de reactivos	+	

Nota: el tubo 11 sirve para calibrar el espectrofotómetro.

Resultados

Los valores obtenidos se comparan entre las muestras a las que se les adicionó hidrosulfito contra los que no se les adicionó, y contra los que se obtienen en cada fracción para identificar en qué fracciones se encuentra organelo que se está caracterizando.

1. Señala el mecanismo de acción del CYP 450 en el metabolismo o biotransformación de xenobióticos.
2. ¿Cuál es la finalidad de la biotransformación?
3. ¿Qué otras hemoproteínas conoces? Investigar.
4. ¿Qué otras funciones tienen las hemoproteínas?
5. ¿Cuántas familias de CYP 450 conoces? ¿Cuáles son las más importantes?

PRÁCTICA 11

MITOCONDRIA: IDENTIFICACIÓN DE CITOCROMO C Y DESHIDROGENASA SUCCÍNICA

Objetivo

Identificar indirectamente la actividad de las enzimas deshidrogenasa succínica y citocromo C, las cuales son marcadores de la mitocondria.

Introducción

Los marcadores enzimáticos permiten identificar bioquímicamente a los organelos donde se localiza la enzima o enzimas. El citocromo C es una enzima transmembranal que se encuentra en la membrana interna de la mitocondria y participa en la cadena de electrones; es necesaria para las reacciones de óxido reducción, cuyo aceptor final es el oxígeno para formar H_2O y ATP. La determinación de la presencia del Cyt C reducido es a través de su espectro de absorción, es decir, su capacidad de absorber radiación electromagnética a 550nm.

En general, el proceso en el cual las moléculas orgánicas son oxidadas hasta CO_2 , se le conoce como respiración aeróbica (cuando el aceptor de electrones es el oxígeno). Se llama respiración anaeróbica o glucólisis cuando el O_2 no participa y, generalmente, ocurre en el citoplasma.

Otra enzima marcadora de la mitocondria es la succinato-deshidrogenasa, que cataliza la reducción del Cyt C cuando el succinato es

oxidado a fumarato. En esta reacción se requiere FAD, que se reduce a FADH_2 y facilita la reducción del Cyt C, permitiendo que este transfiera los electrones a otros aceptores de la cadena de electrones.

El cianuro de potasio inhibe el último paso de la cadena de electrones. De esta manera se evita que el flujo de electrones continúe y se lleve a cabo la formación de ATP. Por lo tanto, las moléculas de Cyt C quedan en estado reducido, ya que las otras enzimas que consumen al Cyt C se encuentran inhibidas por efecto del cianuro.

Materiales y equipo

- Microcentrífuga
- Espectrofotómetro
- Tubos de ensaye de 16x160
- Pipetas de 5 mL

Reactivos

- a. Medio de mantenimiento para mitocondrias: 300 mL (sacarosa 69.8 mM, D-manitol 210.2 mM, tris HCl 10 mM, albúmina 0.5% pH 7.4)
- b. Medio para identificar la actividad de la Cyt C en MITOCONDRIAS: 50 mL de medio de aislamiento adicionado con MgCl_2 2.6 mM y KCl 3.3 mM, 10 mL de succinato de sodio 1.0 N, 10 mL de cianuro de potasio 1.0 N y 10 mL de azul de metileno al 0.0005%

Método

1. Numerar 13 tubos o matraces Erlenmeyer de 25 mL y preparar las mezclas de reacción, adicionando en cada uno de ellos los reactivos de acuerdo con la tabla siguiente.

Nota: Es importante que coloque 100 μ gr de proteína por tubo. Si no lo hace, posteriormente se tendrán que estandarizar los datos entre la actividad que se detecte en cada fracción y dividirla entre la concentración de proteína de su fracción correspondiente. De aquí la importancia de determinar la concentración de proteína de cada Frc obtenido en la separación del homogenado hepático para que calcular el volumen de la Frc que equivale a 100 μ gr de proteína.

Tubo	Succinato de Na 1.0 M	Cianuro de Potasio 1 N	Buffer de mitocondrias	100 μ gr de proteína/tubo	DO_{550nm}	
					0 min	30 min
1	0.1 mL	0.2 mL	4 mL	Frc 0		
2	0.1 mL	0	4 mL	Frc 0		
3	0.1 mL	0.2 mL	4 mL	Frc 1		
4	0.1 mL	0	4 mL	Frc 1		
5	0.1 mL	0.2 mL	4 mL	Frc 2		
6	0.1 mL	0	4 mL	Frc 2		
9	0.1 mL	0.2 mL	4 mL	Frc 3		
8	0.1 mL	0	4 mL	Frc 3		
9	0.1 mL	0.2 mL	4 mL	Frc 4		
10	0.1 mL	0	4 mL	Frc 4		
11	0.1 mL	0.2 mL	4 mL	Frc 5		
12	0.1 mL	0	4 mL	Frc 5		
13	0.1 mL	0.2 mL	4 mL	0		

- Después de adicionar todos los reactivos a los tubos y mezclar bien, retírelos del baño frío y adicioneles .02 mL de azul de metileno. Observar con detenimiento para distinguir cuáles tubos presentan mayor coloración.
- Leer en el espectrofotómetro a 550nm y registrar los datos como tiempo 0.
- Incubar a 30°C durante 30 minutos y volver a leer a la misma longitud de onda (550 nm).
- Las unidades de deshidrogenasa succínica se pueden calcular a partir de los μ Moles de Cyt C reducido/minuto. La diferencia entre el

coeficiente de extinción molar (o absorbilidad) del Cyt C reducido y el oxidado es de $18 \times 10^6 \text{ cm}^2$ por mole, esto es $18.5 \times 10^6 \times A/\text{mola}$.

Resultados

Reste a los nones los datos obtenidos de los tubos pares donde no se agregó cianuro. Elabore un cuadro de sus valores e identifique la fracción donde se encuentra la citocromo oxidasa por los valores del Cit C reducido/oxidado.

Compare si equivale a la fracción donde localizó la Citromo C con los cambios de coloración del azul de metileno.

Cuestionario

1. ¿Por qué se requiere adicionar succinato de sodio a la reacción?
2. ¿Cuál es la finalidad de agregar azul de metileno a los tubos? ¿Podría agregar dinitrofenol o verde janus en vez de azul de metileno?
3. ¿En qué fracción celular obtiene la mayor actividad del citocromo C?
4. Grafique la actividad del Citocromo C en función del tiempo.
5. ¿Por qué es necesario estandarizar la concentración de proteína en todos los tubos?
6. Investigue a qué longitud de onda absorbe el Cyt C oxidado. ¿Por qué solo calculamos el reducido?
7. ¿Qué otro organelo, además de la mitocondria, podría presentar actividad de citocromo C?
8. ¿Qué esperaríamos que pasara si agregamos verde janus?, ¿nos podría identificar la fracción de mitocondrias por cambio de color?
9. ¿Qué otros organelos presentan actividad de oxidasas donde participan otros citocromos?

PRÁCTICA 12

SEPARACIÓN DE CLOROPLASTOS: CONTENIDO DE CLOROFILA

Objetivo

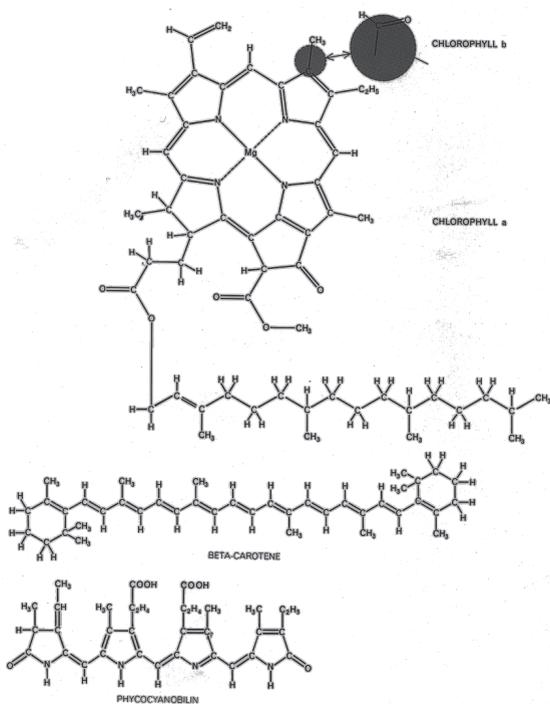
El alumno aislará cloroplastos y calculará los miligramos de clorofila por gramo de tejido.

Introducción

El cloroplasto es el sitio donde se lleva a cabo la fotosíntesis en algas y plantas superiores. La primera indicación de que tenía una función fotosintética fue observada en 1882 por Theodor Englemann, en el alga *Spirogyra*. En las células de vegetales hay desde 1 a 1000 cloroplastos, con un tamaño de aproximadamente 5 μ m y forma elipsoidal. Presentan una membrana externa y una interna, además de una tercera que es la membrana del tilacoide. Esta se organiza en forma de discos que se encuentran interconectados y que, en conjunto, se llaman grana. El estroma es una solución de enzimas, DNA, RNA y ribosomas.

Los lípidos de la membrana del tilacoide tienen una composición diferente al resto de los lípidos de membrana. Sólo 10% son fosfolípidos, aproximadamente 80% no tienen carga y son monogalactosil y digalactosil diacilglicerol; 10% son sulfolípidos (sulfoquinovosil diacilglicerol). La cadena acilo de estos lípidos es insaturada, lo que le da fluidez alta.

El principal fotorreceptor en la fotosíntesis es la clorofila (figura 1), con un anillo tetrapirrólico cíclico, un grupo hemo y un ión Mg^{2+} .



Equipo

- Microscopio compuesto
- Espectrofotómetro
- Centrífuga

Material biológico

- Hojas frescas de espinaca

Materiales y reactivos

- Mortero
- Matraz Erlenmeyer de 500 mL
- Pipetas de 10 y 0.1 mL
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Papel filtro
- Hielo frappé
- NaCl 0.35 M, buffer Tris 0.2 M a pH 8
- Tubos Falcon de 15 mL
- Probeta de 100 mL
- Pipetas Pasteur con bulbo
- Gasa
- Agua destilada
- Acetona al 80%

Método

1. Lave con agua de la llave las hojas de espinaca, séquelas y con una navaja quite el tallo y nervaduras. Mantenga sus muestras en hielo el mayor tiempo posible.
2. Pese 25 gr y muele en el mortero con 50 mL de NaCl frío más 5 ml de buffer Tris frío. Filtre a través de varias capas de gasa y tome 5 mL para centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos. Hágalo por duplicado.
3. Transfiera el sobrenadante a otro tubo y centrifugue a 2500 rpm durante 10 minutos. Deseche el sobrenadante. En el precipitado se encuentran los cloroplastos intactos.
4. Agregue 2.0 mL de NaCl y resuspenda suavemente el precipitado de cloroplastos con ayuda de una pipeta Pasteur. Tome una gota de la suspensión y póngala sobre un portaobjetos y, después de ponerle el cubreobjetos, observe al microscopio a 40X.
5. Al resto agréguele 5 mL más de NaCl y vuelva a centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos.

6. Elimine el sobrenadante y resuspenda el precipitado en 5 mL de NaCl. Etiquete la solución como suspensión de cloroplastos.
7. Coloque 0.1 mL de suspensión de cloroplastos en un tubo de ensaye y agregue 10 mL de acetona al 80%. Agite suavemente y filtre a través de papel filtro Whatman 1. Recoja el filtrado en un tubo o celda de espectrofotómetro y lea a una longitud de onda de 652nm. Use solución de acetona como blanco.
8. Multiplique el valor de absorbancia por 5.8 para obtener los miligramos de clorofila por mililitro de suspensión de cloroplastos.

Resultados

1. ¿Qué características tienen los cloroplastos al observarlos en el microscopio óptico a 40X?
2. ¿Por qué no se utiliza el primer precipitado para la obtención de clorofila?
3. En esta práctica, ¿qué métodos analíticos utilizó?

Investigación extramuros

Consulte libros de fisiología vegetal, bioquímicas y biología celular.

1. ¿Cuántos tipos de clorofila hay en plantas superiores y algas?
2. Compare la estructura molecular de la clorofila con la hemoglobina y comente si hay similitud.
3. ¿Qué aplicación tiene calcular la cantidad de clorofila? ¿En qué tipo de estudios es requisito tener datos de cantidad de clorofila?
4. Busque un esquema de la membrana tilacoide y ubique dónde se realizan los eventos de la fotosíntesis.
5. ¿Cuáles de los eventos antes mencionados requieren energía y cuáles son los productos?
6. Indique en qué parte del cloroplasto se realiza el ciclo de Calvin. ¿Por qué se llaman reacciones oscuras?

7. Investigue cómo los herbicidas inhiben la fotosíntesis.
8. Construya un cuadro que ubique los grupos de la biodiversidad que tienen pigmentos fotosintéticos y su nombre.
9. ¿Por qué la clorofila es el pigmento más eficiente para captar la energía luminosa?

PRÁCTICA 13

CITOESQUELETO: MOVIMIENTO CILIAR

Objetivo

Observar el movimiento ciliar de *Crasostrea spp*, tanto en condiciones fisiológicas como con cambios de temperatura y en presencia de bloqueadores de la cadena respiratoria.

Introducción

El citoesqueleto está formado por cuatro componentes fibrilares: microfilamentos, filamentos intermedios, microtrabéculas y microtúbulos, que están presentes en el citoplasma de células eucariontes, ayudan al soporte y participan en el desplazamiento de moléculas y organelos.

Los microtúbulos, formados por la proteína tubulina, intervienen en diversas funciones tales como transporte intracelular. El movimiento de cromosomas, cilios y flagelos son sensibles a temperatura, presión y drogas como colchicina, vinblastina y taxol. El movimiento ciliar en las células de las branquias de moluscos bivalvos y en la tráquea de varios vertebrados forman ondas metacromáticas; su movimiento necesita la presencia de ATP para proporcionar la energía necesaria para esta función, la cual se obtiene cuando la molécula es degradada por ATP_{asas}, localizadas en el axonema del cilio.

Material biológico

- Ostiones o almejas con valva, recién sacados de su ambiente, 3 ejemplares por equipo

Materiales y equipo

- Microscopio óptico con objetivos de 40X y 100X
- Aceite de inmersión
- Portaobjetos excavados y planos
- Cubreobjetos
- Estuche de disección
- Termómetro
- Caja de Petri
- Matraz Erlenmeyer
- Tapón de hule
- Tubos capilares de vidrio
- Hielo

Reactivos

- Humo de cigarro
- Cianuro de potasio (KCN) 0.05 M en filtrado de ostión

Método I

1. Abrir las valvas del ostión.
2. Cortar el músculo aductor que une al ostión con su valva derecha (ver figura 1).
3. Colocar el organismo en la caja de Petri sobre su valva izquierda, tratando de no derramar el líquido que contiene.

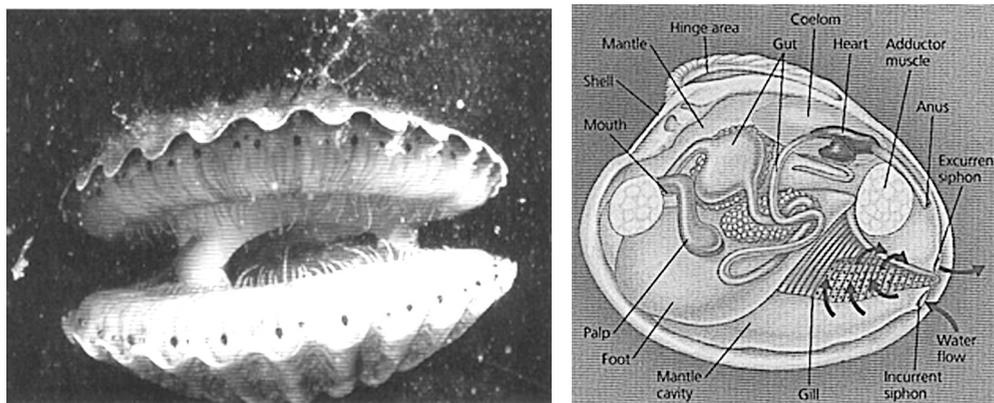


Figura 1. Imagen (izquierda) y estructuras del ostión *Crasostrea spp* (derecha)

4. Depositar el líquido de tres ostiones en un matraz para preparar las soluciones de trabajo:
 - a. Colocar una fracción de la solución en frío,
 - b. A otra fracción adicionarle KCN a una concentración final de 0.05 M
 - c. Adicionarle a la última KCN 0,05 M. Después de disolver la sal, burbujearle humo de cigarro, tal como se muestra en la figura 2.

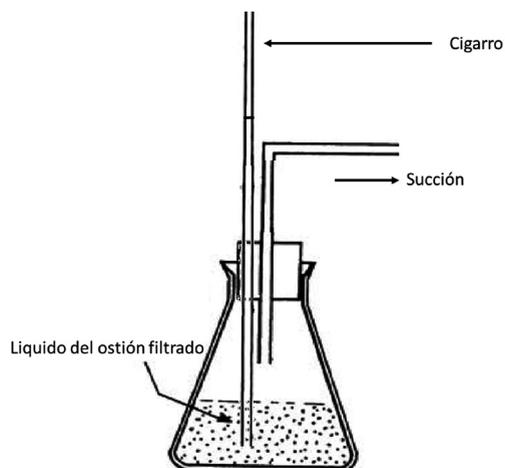


Figura 2.

5. Descubrir el cuerpo del molusco cortando el manto que lo cubre.
6. Tomar 4 trozos, de aproximadamente 5 mm, de la región de las branquias y colocarlos en las excavaciones de los portaobjetos. Etiquetarlos de la "A" a la "D".
7. Al portaobjetos A, agregarle dos gotas del líquido frío y mantenerlo sobre hielo,
8. Al portaobjetos B, agregarle dos gotas de solución de KCN.
9. Al portaobjetos C, agregarle dos gotas de solución de KCN con humo de cigarro.
10. Al portaobjetos D, agregarle dos gotas de solución natural y mantenerlo a temperatura ambiente.
11. Colocar los cubreobjetos y observar a 40X y 100X.
12. Tomar fotomicrografías.

Resultados

1. Anotar lo observado en cada preparación.
2. Comparar el movimiento ciliar y analizar los resultados.

Investigación extramuros

1. ¿En qué se diferencian los cilios de las células procariontes de los de las células eucariontes?
2. Los cilios y los flagelos, ¿son lo mismo?
3. ¿Qué patologías de movimiento ciliar hay en humanos?
4. ¿Cuál es la diferencia entre los microtúbulos del citoesqueleto y los de los cilios?
5. ¿Qué bloqueadores químicos conoce de la polimerización de tubulina?
6. ¿Qué otras proteínas forman parte del axonema del cilio?

PRÁCTICA 14

NÚCLEO

Objetivo

El alumno identificará la estructura del núcleo en interfase.

Introducción

El núcleo en interfase es un compartimento celular delimitado por dos membranas interrumpidas por poros, que contiene el material genético constituido por el ácido desoxirribonucleico (DNA) y los componentes para la transcripción de la información genética, ácido ribonucleico (RNA), para su procesamiento y para la duplicación del DNA. La presencia o ausencia del núcleo como compartimento es uno de los criterios para separar las células en procariontes y eucariontes.

Con el microscopio óptico se pueden distinguir diversas estructuras: la envoltura nuclear, el nucleolo, grumos de cromatina, un espacio no ocupado por el nucleolo ni por la cromatina compactada (a este espacio se le llama región intercromatiniana). Desde 1949 Barr y Bertram observaron, en neuronas de gatos hembras, la presencia de una masa que se teñía intensamente en el núcleo de estas células en interfase. A partir de 1951, Barr reconoció que esta masa no estaba relacionada con el nucléolo –como al principio se consideró–, y se asoció con el sexo

femenino, denominándolo *cromatina sexual* o corpúsculo de Barr. Actualmente se conoce como cromatina X heterocromática.

El estudio de la cromatina X empezó a formar parte de los estudios citogenéticos cuando se comprobó que podía demostrarse su presencia en diferentes tejidos y observarse en frotis de mucosa bucal o linfocitos de sangre periférica. Cuando surgieron las técnicas para el estudio de los cromosomas humanos (1959) se encontró una estrecha relación entre la presencia del corpúsculo de Barr y el número de cromosomas X.

Material biológico

- Meristemos (raíces) de *Allium cepa*, de 3 a 4 cm
- Células del epitelio bucal

Material y equipo:

- Microscopio óptico
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Vidrios de reloj
- Pinzas y aguja de disección
- Lámpara de alcohol
- Microscopio compuesto
- Vasos de Köplin

Reactivos

- Orceína acética al 2%
- HCl 1 M
- Ácido acético al 45%
- Alcohol: absoluto, 96%, 70% y 50%

Método para cromatina sexual-cuerpo de Barr

1. Después de enjuagar varias veces la boca con agua, tome, por raspado suave con un abatelenguas, una muestra de epitelio bucal y colóquela en un portaobjetos perfectamente lavado y sin grasa. Para esto limpie con una mezcla de alcohol etílico absoluto-ácido acético al 45% en proporción 3:1.
2. Después de colocar la muestra, haga un frotis. Cada equipo debe tener, mínimo, una muestra de células del epitelio bucal de mujer y otra de hombre.
3. Adicionándole unas gotas de HCl 1N, hidrolíce durante 30 segundos y absorba rápidamente el ácido, con ayuda de papel secante. Tiña la preparación con orceína acética.
4. Lave con ácido acético por goteo, cubra con un portaobjetos y selle con barniz de uñas. Observe al microscopio a 100X.

Método para identificar células en interfase y mitosis en meristemos

A. Preparaciones temporales

1. Cortar 1 cm de la parte terminal o apical de las raíces y colocar en un vidrio de reloj con orceína acética. Cuidar que los meristemos queden perfectamente cubiertos con el colorante.
2. Calentar a la llama de la lámpara de alcohol y retirar inmediatamente al desprender vapores. Enfriar y volver a calentar suavemente por 2 o 3 veces. Cuide que el colorante no entre en ebullición, ya que los meristemos se dañan y usted daña su aparato respiratorio al respirar los vapores del ácido acético.
3. Enfríe y transfiera cada una de las raíces a un portaobjetos. Corte 2 mm desde el ápice, añada una gota de orceína acética y coloque encima un cubreobjetos.

4. Presione con la punta de un lápiz la zona donde se encuentra el meristemo y, mediante golpes, con la goma del lápiz disperse el tejido hasta obtener una monocapa. Con papel kleenex, quite el exceso de colorante.
5. Observe al microscopio con el objetivo de 10X y 40X.

B. Preparaciones permanentes utilizando el método de hielo seco o de nitrógeno líquido

1. Haga sus preparaciones permanentes utilizando las temporales. Las preparaciones permanentes serán utilizadas en la práctica de ciclo celular.
2. Coloque las preparaciones sobre hielo seco en frappé o en nitrógeno líquido, con el cubreobjetos hacia arriba. Cuando esté perfectamente escarchado retire el cubreobjetos con ayuda de un bisturí o aguja de disección. Si el cubreobjetos quedó con material de la preparación, no lo deseche, y siga los mismos pasos que a continuación se describen.
3. Introducir el portaobjeto en los vasos de Koplín conteniendo soluciones de alcohol en concentración creciente, en el siguiente orden: 50, 70, 96 y absoluto. Deje las preparaciones por un tiempo menor a 30 segundos en cada uno de ellos.
4. Al final, escurrir el exceso de alcohol y poner rápidamente una gota de medio de montar. Cubrir con un portaobjetos limpio. En el caso del cubreobjetos, poner un portaobjetos limpio.
5. Etiquetar y secar en la estufa a 50°C.
6. Observar al microscopio con el objetivo de 40X y 100X.

Resultados

1. Observe de 50 a 100 células epiteliales de hombres y mujeres, ¿en cuántas encontró cuerpos de Barr?
2. Observe núcleos en interfase y localice el nucleolo.

3. En una preparación fija, observe núcleos en interfase en el aumento a 100X.
4. Observe las preparación de meristemas vegetales en 40X, y cuente: ¿cuántas células en interfase encuentra por campo (mínimo 5 campos)? y, ¿cuántas en mitosis?
5. Compare células en interfase de los meristemas vegetales y del epitelio bucal.
 - a) Indique si la forma de la célula es igual o diferente.
 - b) Indique, aproximadamente, cuál es la proporción del tamaño del núcleo con respecto a la célula.
6. ¿Observó células binucleadas? ¿Cuántas?
7. Comparando la preparación de meristemas vegetales y la de epitelio bucal, indique por qué en esta última sólo hay núcleos en interfase.

Investigación extramuros

1. Investigue qué han aportado al estudio del núcleo las técnicas de:
 - a) Microscopio electrónico
 - b) Inmunocitoquímica
 - c) Hibridación *in situ*
 - d) Autorradiografía de alta resolución
 - e) Crío-métodos
2. ¿A qué se refieren los términos eucromatina y heterocromatina?
3. Mary Lyon, en 1961, propuso una hipótesis para explicar la condensación del cromosoma X. ¿Qué puntos consideró?
4. ¿Cuáles son los conceptos actuales de la inactivación del cromosoma X?
5. Complete la siguiente tabla, de acuerdo con lo propuesto por Barr de:

El número de cuerpos de Barr = al número de cromosomas X-1

<i>No. de Cuerpos de Barr</i>	<i>Fenotipo observado</i>	<i>Sexo genético probable</i>	<i>Núm. total de cromosomas</i>
0	H, normal		
0	M, anormal		
1	H, anormal		
1	M, normal		
2	H, anormal		
2	M, anormal		
3	H, anormal		
3	M, anormal		

6. ¿Cuál de los individuos de la tabla es síndrome de Turner clásico?
7. ¿Cuál de los individuos de la tabla es síndrome de Klinefelter clásico?
8. Describa las características clínicas de estos dos síndromes.
9. Los cuerpos de Barr son una prueba presuntiva. Explique cómo puede confirmar los resultados de la tabla.

PRÁCTICA 15

CICLO CELULAR Y ETAPAS DE LA DIVISIÓN CELULAR

Objetivo

El alumno identificará las etapas del ciclo celular en células vegetales y animales.

Introducción

Las células, al reproducirse, tienen que asegurar que todo su material se reparta en forma aproximadamente equitativa entre las células hijas resultantes. Los acontecimientos que ocurren durante la reproducción celular están comprendidos dentro del proceso del ciclo celular, el cual está determinado por cinco fases diferentes: 1) la que asegura que el DNA se duplique o fase S (síntesis); 2) la encargada de que el material genético se reparta exactamente entre dos núcleos o fase M (mitosis); 3) cuando la célula madre se divide en dos células hijas por medio de la fase C (citocinesis). Las dos fases restantes, llamadas G_1 y G_2 (Gap), tienen las siguientes funciones: 4) en G_1 ocurre la síntesis de proteínas y en 5) G_2 se prepara para entrar en mitosis. G_1 y G_2 anteceden a las fases de síntesis del DNA y de mitosis, respectivamente, y son las fases en las que ocurren múltiples procesos regulatorios del ciclo celular. Desde el punto de vista metabólico, el ciclo celular es una sucesión de interfase y mitosis; en la primera ocurren todos los procesos metabólicos y regula-

torios necesarios para la progresión ordenada del ciclo, mientras que en la mitosis se dan los rearrreglos estructurales, tanto citoplasmáticos como nucleares, que permitirán la repartición exacta del material genético.

Materiales

- Se utilizan las preparaciones permanentes de los meristemos de *Allium cepa*.

Equipo

- Microscopio compuesto con objetivos 40X y 100X

Método

1. Utilizando campos al azar observe 1000 células en cada una de las preparaciones de meristemos.
2. Anote cuántas están en interfase y cuántas en mitosis.
3. Anote en qué fase de la mitosis (profase, metafase, anafase y telofase) se encuentran las células que observó.
4. Al terminar de observar las preparaciones realice los siguientes cálculos:

$$\text{Índice mitótico} = \frac{\text{Número de células contadas en mitosis} \times 100}{\text{Número total de células contadas}}$$

$$\text{Índice de fases} = \frac{\text{Número de células en cada fase de la mitosis} \times 100}{\text{Número total de células en mitosis}}$$

Resultados

Con los índices que obtuvo, establezca la duración relativa de los diferentes periodos del ciclo celular, con excepción de los interfásicos (G_1 , S y G_2).

Investigación extramuros

1. Indague cuál es la metodología que actualmente se utiliza para investigar el ciclo celular en interfase (G_1 , S y G_2).
2. Con un esquema de ciclo celular, identifique los eventos bioquímicos y celulares que ocurren en cada etapa.
3. Explique, de acuerdo con la información que ha investigado, ¿por qué el estudio del ciclo celular con la microscopía óptica se ha centrado en las etapas de la mitosis?
4. Investigue cuáles son los puntos de regulación del ciclo celular y cuál es la metodología que se utiliza para su investigación.
5. Investigue cómo puede aplicar lo que aprendió en la práctica para realizar estudios de genotoxicidad.

PRÁCTICA 16

CULTIVO CELULAR EN SUSPENSIÓN

Objetivos

El alumno se habilitará en el cultivo de células en suspensión e investigará su aplicación en biología y otras disciplinas.

Introducción

A los linfocitos, células de la médula u otras células que están separadas y flotan en el medio de cultivo, se les conoce como cultivos en suspensión, por no estar adheridos al recipiente de cultivo.

Las condiciones básicas necesarias para el cultivo celular son:

- a) el medio de cultivo
- b) las condiciones para el cultivo
- c) la célula o tejido a cultivar

Los medios de cultivo, generalmente, contienen sales, glucosa y se suplementan con suero bovino (de 5 a 20 %), L-glutamina, aminoácidos esenciales e indicadores de pH (como el rojo de fenol que se observa de color rojo a pH alcalino, de color amarillo oro cuando el pH es neutro o amarillo cuando el pH es ácido). Los medios más usados para cultivar linfocitos son: MEM, RPMI 1640, McCoy 5A, TC199.

Los recipientes de cultivo pueden ser de plástico o de vidrio, pero es importante que resistan la esterilización en el autoclave a 15 libras de presión durante 15 a 20 minutos. Las condiciones de cultivo requieren una zona de esterilidad, de preferencia en una campana de flujo laminar y esterilizada previamente con fenol.

Los linfocitos son células sanguíneas que se pueden obtener de sangre circulante, del bazo y de la médula ósea, en varios grupos, como peces, aves y mamíferos. La población de linfocitos de sangre circulante está en interfase, pero pueden ser estimulados por mitógenos, compuestos que inducen su división (mitosis). La fitohemaglutinina (PHA) es una glicoproteína que se enlaza a la membrana del linfocito, alterando la permeabilidad y la entrada de moléculas que dispara la síntesis de macromoléculas y estimulan a los linfocitos T, para que entren en mitosis.

Equipo

- Autoclave
- Campana de flujo laminar
- Centrífuga
- Estufa a 37°C
- Microscopio compuesto con objetivos 40X y 100X

Materiales

- Tubos de ensayo de 15 mL, estériles y con tapón de caucho
- Pinzas estériles
- Jeringa heparinizada de 10 mL
- Pipeta Pasteur con bulbo de látex
- Portaobjetos perfectamente limpios y desengrasados

Reactivos

- Soluciones de heparina 1000 UI/mL
- Fitohemaglutinina (PHA) 2.5 µg/mL
- Medio de cultivo MacCoy 5A modificado
- Colchicina 4 µg/mL
- Solución fijadora de Farmer (alcohol metílico y ácido acético glacial 3:1)
- Solución hipotónica de KCl (5.6 g/1000 mL de agua destilada)

Métodos

A. Obtención y siembra de linfocitos

1. Cada equipo esterilizará sus tubos, tapones y pinzas.
2. Obtener una muestra de 5 mL de sangre venosa con una jeringa previamente heparinizada.
3. En el interior de la campana de flujo laminar y con el mechero encendido, colocar 5 mL de medio de cultivo MaCoy 5A modificado en un tubo limpio y estéril y, con una jeringa de insulina, adicionar 0.1 mL de fitohemaglutinina (2.5 mgr/mL de medio).
4. Agite suavemente la sangre contenida en la jeringa, retire la aguja y adicione 1 mL de sangre total a cada tubo conteniendo el medio de cultivo. Cuide que la sangre no toque las paredes del tubo.
5. Tape el tubo con el tapón de corcho y agítelo suavemente. Etiquete e incube durante 71 horas a 37°C.
6. Todo el procedimiento de siembra se repetirá en otro tubo, al cual no se le adicionará la colchicina.

B. Cosecha

1. Después de las 71 horas de incubación, agregar a cada tubo sembrado cuatro gotas de colchicina. Tapar y agitar suavemente. Continuar incubando durante 45 a 60 minutos.
2. Saque los tubos de la estufa y, con la pipeta Pasteur con bulbo, transfiera toda la sangre a un tubo de centrifuga, desprenda la etiqueta y póngaselo a este. Centrifugue a 1,000 rpm por 10 minutos.
3. Elimine el sobrenadante con la pipeta Pasteur con bulbo, teniendo cuidado de no tocar el pellet. Deje aproximadamente 0.5 mL del sobrenadante para resuspender la pastilla de células. Agregue 5 mL de KCl e incube a 37°C durante 15 minutos.
4. Centrifugar a 1,000 rpm durante 10 minutos. Quite la mitad del sobrenadante, resuspenda la pastilla de células y agregue sin dejar de mezclar 5 mL de solución de fijación. Incube el tubo en el refrigerador por 15 minutos.
5. Centrifugue a 1,000 rpm durante 10 minutos. Quite el sobrenadante, resuspenda, agregue 5 mL de fijador y vuelva a centrifugar. Este proceso se repite tantas veces como sea necesario y hasta que el precipitado esté blanco.
6. A partir de la segunda vez que se adiciona solución fijadora, el tubo se puede guardar tapado en el refrigerador hasta el momento de hacer las preparaciones.

C. Preparaciones

1. Si guardó su tubo con células en el refrigerador, agregue fijador hasta la mitad del tubo y centrifugue a 1,000 rpm durante 10 minutos. Elimine el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur, dejando aproximadamente 0.5 mL del sobrenadante. Resuspenda el precipitado y, con la pipeta Pasteur, tome una muestra dejando caer cuatro gotas en el extremo del portaobjetos perfectamente limpio y desengrasado, desde una altura de más de 20 cm.

2. Sople la muestra sobre el portaobjetos hacia el extremo contrario de donde puso las gotas de cultivo. Haga tres preparaciones por muestra.
3. Seque la preparación al aire y tiña con solución de Giemsa por 15 minutos.
4. Lave suavemente al chorro del agua y seque a temperatura ambiente.

D. Observación al microscopio

1. Cuando las preparaciones se sequen, observarlas al microscopio con el objetivo de 40X.
2. Compare las preparaciones del tubo con colchicina con las preparaciones a las que no se les agregó este compuesto. Registre sus resultados y comente sus observaciones.
3. En las preparaciones con colchicina, cuente 100 células e indique cuántas de ellas están en mitosis.
4. Localice mitosis y observe a 100X. Seleccione mitosis completas y con cromosomas bien separados.
5. Tome fotomicrografías de las mitosis seleccionadas.
6. Compare sus fotomicrografías con la fotocopia que se le proporcionó en el laboratorio.

Investigación extramuros

1. Recorte la fotocopia de la fotografía al microscopio de los cromosomas y arme el cariotipo.
2. Busque los siguientes cariotipos en la bibliografía: de chimpancé, de gorila y de orangután y compárelos con el cariotipo humano que elaboró. Comente con cuál compartimos más semejanzas.
3. Investigue de qué vegetal se obtiene la fitohemaglutinina.
4. ¿Qué otros mitógenos están disponibles en el comercio?
5. La colchicina es un alcaloide, investigue de qué vegetal se obtiene y cuál es su fórmula.

6. Explique cómo funciona la colchicina para la obtención de cromosomas en metafase.
7. ¿Qué utilidad tienen los cariotipos en los estudios taxonómicos y por qué han sido cuestionados?
8. ¿Cuáles son los puntos mínimos en la investigación taxonómica, en la actualidad?

PRÁCTICA 17

BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA CÉLULA: ELECTROFORESIS

Objetivos

El alumno se habilitará en el uso de las micropipetas y en la elaboración de geles para realizar separaciones de biomoléculas por electroforesis.

Introducción

Las micropipetas manuales tienen como propósito medir líquido en forma exacta y precisa. El funcionamiento de todas las micropipetas se basa en el principio del desplazamiento del aire y la utilización de puntas desechables. Las pipetas cubren un rango amplio de volumen de trabajo, que va desde 0.1 microlitros (μL) hasta 5 mililitros (mL).

La calidad de las micropipetas es comprobada de acuerdo con la norma ISO 8655/DIN 12650. Los controles de calidad se llevan a cabo mediante pruebas gravimétricas, utilizando agua destilada a 22°C y puntas originales. Las micropipetas con los siguientes rangos de volumen deben utilizar puntas con las siguientes características:

<i>Rango de volumen (μL)</i>	<i>Puntas de polipropileno (μL)</i>	<i>Color:</i>
0.1 – 2.5	10	Generalmente blanco
2.0 - 20	300	Generalmente amarillo
10 - 100	300, 350	Generalmente amarillo
100 - 1000	1000	Generalmente azul
1000 - 5000	5000	Generalmente blanco

El volumen de la pipeta se muestra claramente en una pantalla situada en el mango. El ajuste del volumen se lleva a cabo fácilmente, girando el émbolo en dirección de las agujas del reloj, si se quiere disminuir el volumen; o girando en contra de las manecillas del reloj, si lo que se quiere es seleccionar un volumen mayor.

Material y equipo

1. Micropipetas con diferentes rangos de volumen de trabajo
2. Puntas de las medidas adecuadas a las pipetas
3. Cámara de electroforesis horizontal y vertical
4. Fuente de poder

Reactivos

1. Agarosa
2. TEMED
3. Solución amortiguadora Tris-Boratos-EDTA (TBE)
4. SDS
5. Acrilamida y bis-acrilamida
6. β -mercaptoetanol
7. Glicina

Método

A. Técnica de pipeteado

1. Antes de utilizar cualquiera de las micropipetas disponibles, identifique cada uno de sus componentes, los cuales se muestran en la figura 1.

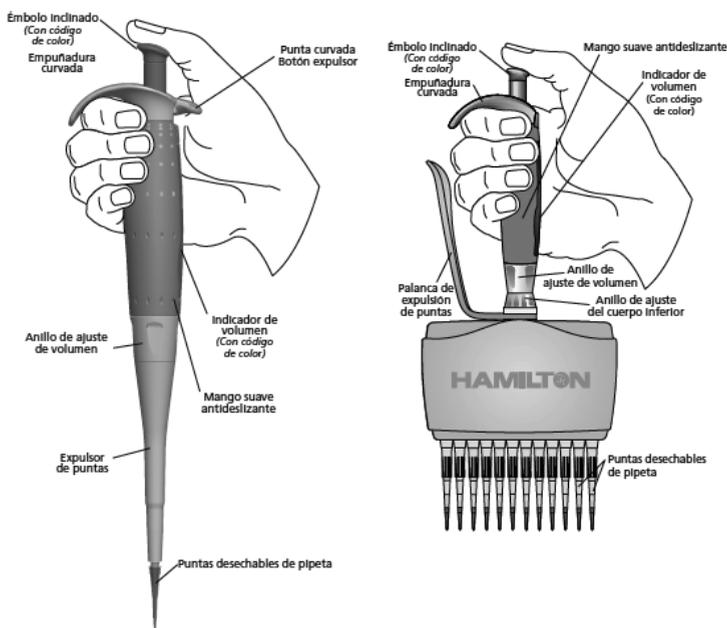


Figura 1. Partes de las micropipetas de un canal y multicanal

2. Coloque la punta correspondiente a la pipeta y seleccione el volumen que desea medir.
3. Las micropipetas se utilizan para medir soluciones acuosas, **nunca las utilice para medir ácidos y solventes**, ya que los vapores de los mismos las dañan. Presione el émbolo de forma suave y lenta, sobre todo con líquidos viscosos.

4. Presione el botón del émbolo hasta el primer tope e introduzca la punta 2-3 mm dentro del líquido. Suavemente, libere el émbolo.
5. Una vez que el émbolo llegó a su posición original, saque la pipeta tocando la pared del recipiente.
6. Presionando el émbolo hasta el primer tope, coloque el líquido que está midiendo. Continúe presionando hasta el segundo tope. Este procedimiento vaciará completamente la punta, asegurando la precisión de la toma (figura 2).

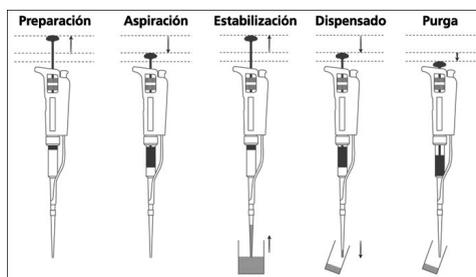


Figura 2. Forma correcta de sostener la micropipeta y pasos para medir el volumen deseado: posición de partida (izquierda), primera parada (centro) y segunda parada (derecha).

B. Para medir líquidos viscosos o un volumen muy pequeño

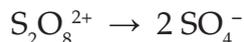
1. Presione el botón del émbolo hasta el segundo tope e introduzca la punta dentro del líquido 2-3 mm. Suavemente, libere el émbolo.
2. Retire la pipeta tocando la pared del recipiente, permitiendo que escurra la solución densa adherida a la parte externa de la punta, ya que no pertenece al volumen que se desea medir.
3. Coloque el líquido presionando el émbolo hasta el primer tope y mantenga esta posición para que el líquido denso que queda en la punta escurra lo más posible. Entonces presione el émbolo hasta el segundo tope.
4. Repita varias veces hasta que logre que en su punto no permanezcan restos de la solución que está midiendo.

C. Electroforesis

La electroforesis es una técnica analítica con poder de resolución muy amplio. Existen diversos tipos de electroforesis, dependiendo de los medios de soporte. Los geles de celulosa son usados para moléculas de bajo peso molecular, como los aminoácidos y los carbohidratos; los geles de poliacrilamida y agarosa se utilizan para moléculas de mayor peso molecular, como DNA, RNA y proteínas.

Desde el punto de vista instrumental, la electroforesis se realiza en un soporte vertical (geles de poliacrilamida-PAGE), horizontal (geles de agarosa) y capilar. En la electroforesis, en un gel de poliacrilamida, el soporte está constituido por una red tridimensional formada por la polimerización de la acrilamida con N,N'-metilen-bis-acrilamida, controlada por un sistema de catálisis con el persulfato de amonio y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED). Para elaborar los geles de poliacrilamida se utilizan los siguientes reactivos:

- 1) Monómeros de acrilamida ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH}_2$)
- 2) N,N'-metilen-bis-acrilamida ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CO} - \text{CH} = \text{CH}_2$)
- 3) El iniciador de la reacción puede ser persulfato amónico o riboflavina que, en presencia de luz, se descomponen, dando radicales libres en solución.



- 4) El catalizador o reactivo TEMED, que forma radicales libres estables y permite que se propague la reacción de polimerización.
- 5) La solución de buffer para estabilizar el pH y como electrolito, para que el medio sea conductor.

La relación acrilamida: bisacrilamida suele ser constante y caracteriza la dureza del gel. El tamaño del poro está determinado por la concentración total de monómeros acrilamida + bis-acrilamida, que definen el grado de reticulado del gel. Los porcentajes habitualmente utilizados están entre 3-30% y se escogen atendiendo al tamaño de las moléculas que se desean separar. Generalmente, los geles que se utilizan para se-

parar moléculas con diferentes rangos de peso molecular se muestran en la tabla siguiente:

<i>Acrilamida (% peso/volumen)</i>	<i>Margen de peso molecular (kDa)</i>
5	200-60
10	75-18
12.5	60-15
15	45-12

Las biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos en solución acuosa y bajo la acción de un campo eléctrico se moverán hacia el cátodo o el ánodo en función de su tamaño, forma y carga eléctrica.

La electroforesis de zona representa la migración de una partícula cargada en una disolución de electrolitos que están embebidos en un soporte microporoso y bajo la acción de un campo eléctrico. Es una técnica analítica y preparativa que se realiza con diversas metodologías, en función del equipo de electroforesis, sistema de buffer, voltaje, tipo de soporte y naturaleza del revelado. En la electroforesis vertical se usan geles de poliacrilamida y, en la horizontal, geles de agarosa.

Un equipo de electroforesis de zona consta de las siguientes unidades:

1. La fuente de poder, que proporciona el campo eléctrico cuando se establece una diferencia de potencial entre los electrodos.
2. La cámara de electroforesis, con los recipientes donde se sitúa el buffer que moja los electrodos.
3. El soporte electroforético.

Para realizar un corrimiento electroforético, siga los siguientes pasos:

1. Arme la cámara siguiendo los pasos de la figura 3. Arme las placas de vidrio en la cámara. Después de poner los peines, adicione la mezcla de acrilamida-bisacrilamida para hacer el gel y cargue la muestra. Conecte a la fuente de poder.

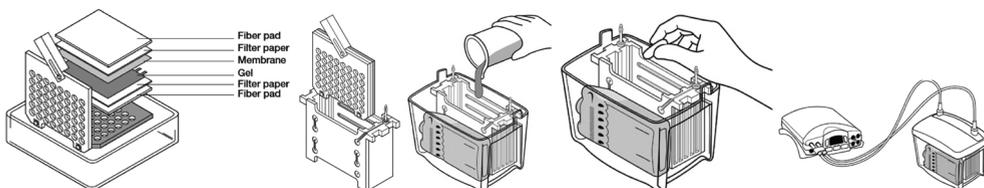


Figura 3.

2. Ensamble la cámara como se muestra en la figura 4 e identifique el ánodo y el cátodo para conectar la cámara correctamente a la fuente de poder.
3. Después de conectar la cámara de electroforesis a la fuente de poder identifique el botón de encendido y el del voltaje para seleccionar la intensidad de la corriente que va a utilizar.

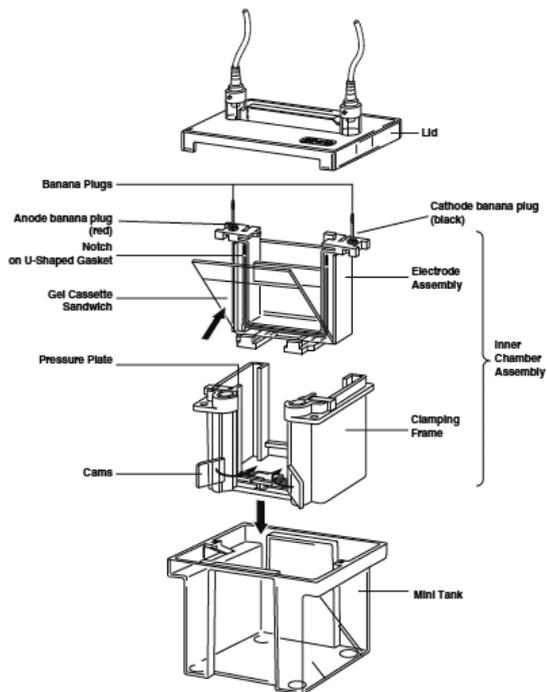


Figura 4. Ensamblado final de la cámara de electroforesis

PRÁCTICA 18

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO Y DE PLÁSMIDO

Objetivo

Habilitar al alumno en la extracción de DNA de un cultivo celular puro.

Introducción

El aislamiento del ácido desoxirribonucleico (DNA) se puede complicar por la presencia de enzimas nucleasas, como la $\text{DNA}_{\text{SA}'}$ y de otras macromoléculas que son aisladas simultáneamente durante el proceso de extracción del DNA. Las nucleasas se pueden inhibir por falta de cationes que actúen como cofactores como el Magnesio (Mg^{+2}), para esto se utilizan agentes quelantes como el etilendiamino tetracético (EDTA). Los detergentes como el dodecil sulfato de sodio (SDS), además de inhibir las nucleasas disocian las proteínas del DNA y las hace más accesibles a la degradación. Otro reactivo que desplaza las proteínas asociadas al DNA y que previene la degradación de ácidos nucleicos es el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB).

Material y reactivos

A. Procedimiento 1

1. Buffer de extracción. Sacarosa 20%, Tris 25 mM, EDTA 10 mM. A 1 mL de buffer extracción agregar 500 μ L de SDS 10 % y ajustar el pH a 8. Agregar 2 mg/mL de lisozima y/o 20 mgr/mL de proteinasa K (opcional)
2. Precipitación del DNA. Acetato de amonio 7.5 M, etanol al 95%

B. Procedimiento 2

1. Solución de extracción de DNA. Buffer TE 10/1 (10 mM de Tris-HCl y 1 mM de EDTA pH 8); dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%; bromuro de cetiltrimeti amonio (CETAB) 2X, 1 gr de CETAB en 50 mL de H₂O ; 5.0 mL de Tris 1M pH8 (100 mM final); 2.0 mL de EDTA 0.5 M (20 mM final); 14 mL de NaCl 5M (1.4 M final).
2. Precipitación del DNA. 10 mL de solución cloroformo-alcohol-isoamílico (24:1); isopropanol frío; acetato de sodio 3 M pH .5.2; etanol 70%

C. Procedimiento 3

1. Solución de CTAB. Se prepara 2 o 3 días antes de la extracción. Para 1 L de solución mezclar 100 mL de Tris 1M pH 8, 128 mL de NaCl 5M, 40 mL de EDTA 0.5M y 20 gr de CETAB.
2. Buffer TE 10/1 (10 mM de Tris pH8 + 1 mM de EDTA).
3. Preparar esta solución al momento. Por cada 5 mL de CTAB, adicionar 0.2 gr de polivinilpirrolidona (PVP) y 25 μ L de β -mercaptoetanol.

Métodos

A. Procedimiento 1. Como muestra biológica para extraer el DNA se puede utilizar la fracción nuclear que se obtuvo de los hepatocitos o linfocitos de sangre periférica.

1. Centrifugar los cultivos celulares a 12,000 rpm durante 3 minutos. Decantar el sobrenadante y agregar a la pastilla de células 200 μ L de solución de extracción fría (1).
2. Agitar vigorosamente e incubar 30 minutos a temperatura ambiente y durante 2 hrs a 65°C.
3. Centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos.
4. Con una pipeta, transferir el sobrenadante a otro tubo y precipitar el DNA, adicionando 100 μ L de SDS al 10%, 100 μ L de acetato de amonio 7.5 M y 600 μ L de etanol al 95%, frío.
5. Dejar precipitar en hielo por 1 hora. Centrifugar a 12,000 rpm, decantar el sobrenadante y dejar secar el pellet a temperatura ambiente.
6. Disolver el pellet de DNA en 50 a 100 μ L de agua destilada y tomar una alícuota para checar la concentración del DNA midiendo DO a 230, 260 y 280nm.
7. Divida las lecturas 269/280. La proporción debe ser de 1.8 a 2 y, la de 230/260, debe ser de 2.2. Estos valores nos dan una estimación de la pureza y cantidad del DNA.

B. Procedimiento 2. Purificación de DNA de plásmido

1. Centrifugar el cultivo a 1,200 rpm en frío y durante 20 minutos. Retirar el sobrenadante y agregarle al pellet 60 μ L de té 10/1 y 60 μ L de SDS al 10% (ojo: se pueden añadir 2 gotas de proteinasa K y 40 μ L de lisozima para tener un volumen final de 200 μ L).
2. Incubar a 37°C durante 1 hora. Para desnaturalizar proteínas, adicionar 100 μ L de NaCl 5M y 80 μ L de CETAB, agitando vigorosamente con el vortex (de 2 a 5 minutos).

3. Incubar la muestra a 65°C por 10 minutos y agregar 0.8 mL de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1). Mezclar con el vortex y centrifugar la muestra a 12,000 rpm durante 5 minutos.
4. Se forman tres fases. Recuperar la fase acuosa superior y colocarla en un tubo limpio. Agregarle 0.6 mL de isopropanol frío. Mezclar durante 5 minutos y centrifugar nuevamente a 12,00 rpm por 5 minutos más.
5. La pastilla que se forma es el DNA, lavar lo agregando 1 mL de etanol al 70%, frío, y centrifugar a 12,000 rpm.
6. Decantar el sobrenadante, dejar secar y resuspender la muestra en 50 µL de té o agua destilada. Tomar alícuota para determinar concentración e integridad del DNA.

Nota: El DNA también se puede precipitar de la fase acuosa con 100 µL acetato de sodio 3M y 600 µL de etanol al 95%, frío. Centrifugar a 12,00 rpm por 10 minutos.

C. Procedimiento 3

1. Moler 10 a 20 mgr de muestra de plantas secas y agregarle 500 µL de buffer CETAB. Incubar a 55°C durante 60 minutos y adicionar 500 µL de mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1.
2. Centrifugar 10 minutos a 12,000 rpm. Se forman tres fases. Tomar la fase acuosa y transferirla a un Eppendorf estimando el volumen de la fase acuosa, ya que se le adicionaran 0.08 volúmenes de acetato de amonio frío 7.5 M y 0.54 volúmenes de isopropanol frío.
3. Mezclar bien y dejar de 15 minutos a toda la noche, en frío. Centrifugar a 14,000 rpm de 3 a 5 minutos.
4. Extraer el sobrenadante con una pipeta y el pellet de DNA, lavar lo con 700 µL de etanol al 70%, frío. Mezclar muy bien y centrifugar de 1 a 3 minutos a 13,000 rpm.
5. Eliminar el sobrenadante y al pellet agregarle 700 µL de etanol al 95%, frío. Mezclar y centrifugar de 1 a 3 minutos.
6. Dejar secar el pellet al vacío y agregarle 50 µL de agua destilada o buffer té 10/1.

D. Procedimiento 4. Extracción de DNA a partir de linfocitos

1. Obtener una muestra de sangre periférica en tubos con EDTA.
2. Adicionar hasta 50 mL con solución de lisis 1 a 4°C. Tapar y mezclar por inversión cuidadosamente.
3. Centrifugar durante 10 minutos a 4,500 rpm y 4°C. Decantar cuidadosa y rápidamente el sobrenadante a otro tubo, sin levantar la pastilla formada. **No** tirar el sobrenadante.
4. Resuspender la pastilla obtenida con 3 mL de buffer de lisis 2, 125 µL de SDS 10% y 550 µL de perclorato de sodio 5 M.
5. Agitar durante 10 minutos a temperatura ambiente, con agitación mecánica.
6. Pasado el tiempo, adicionar 3.5 mL de NaCl 6M a cada tubo. Agitar muy fuertemente con la mano durante 15 segundos. Centrifugar a 3,500 rpm por 30 minutos.
7. Recuperar el sobrenadante en otro tubo. Adicionarle 7 mL de isopropanol absoluto a temperatura ambiente, tapar el tubo y agitar suavemente en posición horizontal hasta la formación de una medusa (DNA).
8. Fijar la medusa obtenida en la pared del tubo con ayuda de una pipeta Pasteur y desechar el líquido. Lavar el DNA 2 veces con etanol al 70%, teniendo precaución en el lavado.
9. Finalmente, resuspender el DNA con 0.2-0.5 mL de solución amortiguadora té. Dejar en agitación suave toda la noche a 4°C o incubar a 37°C por una hora.

PRÁCTICA 19

ELECTROFORESIS DE DNA

Objetivo

Aplicar el método de electroforesis para la separación de biomoléculas en un campo eléctrico.

Introducción

La separación de ácido desoxirribonucleico (DNA) de doble cadena, se hace utilizando como soportes geles de agarosa (horizontal) y de poli-acrilamida (vertical). En ambos casos, en función del tamaño de los fragmentos de DNA que se quieren separar, el gel se prepara a distintas concentraciones. Los fragmentos más pequeños, ≤ 100 pb, se pueden separar adecuadamente en geles poli-acrilamida. Los medianos, $\leq 1,000$ pb, pueden resolverse en geles de acrilamida de concentración baja (7%), o de agarosa a concentración alta (1.7-2.0%). Tamaños mayores, hasta 20 kpb, se separan en geles de agarosa. Las moléculas lineales de DNA de doble cadena migran en la electroforesis a una velocidad inversamente proporcional a su tamaño. Una vez separadas, las moléculas de DNA normalmente se visualizan por fluorescencia de distintos compuestos que se unen a ellas, como el bromuro de etidio. Este intercalante químico está siendo sustituido por otros fluorocromos con mayor poder de detección o menor toxicidad.

Material y equipo

- Micropipetas y puntas
- Cámara de electroforesis horizontal y vertical
- Fuente de poder
- Transiluminador de luz UV
- Horno de microondas
- Baño con temperatura regulada
- Vortex
- Microtubos
- Estufa de incubación
- DNA de plásmido y cromosómico, extraído en la práctica 18

Reactivos

- Enzima de restricción *Pst*1
- Agua tridestilada estéril
- Agarosa
- Amortiguador Tris.acetato-EDTA 1X (TAE)
- Bromuro de etidio 10 mg/mL
- TAE 50X (Tris-acetato-EDTA):
 - Tris base 24.20 gr
 - Ácido acético glacial 5.71 mL
 - EDTA 0.5 M pH 8 10.00 mL
 - H₂Ocbp 100 mL

Método

A. Restricción del DNA

1. A la muestra de DNA contenida en un microtubo de 500 μ L (Eppendorf). Adicionarle los siguientes reactivos:

DNA (plásmido)	10 μ L
Amortiguador 10X	2 μ L
<i>Pst</i> 1 40 U/ μ L	1 μ L
Agua estéril	6 μ L

2. Incubar la reacción de restricción durante 12 horas a 37°C.

B. Preparación de geles de agarosa

1. Pesar 2 gr de agarosa en un matraz Erlenmeyer y fundirla con 20 mL de TAE 1X, en el horno de microondas, por 50 segundos.
2. Preparar el molde de la cámara de electroforesis y, después de asegurarse de recuperar el volumen perdido por la ebullición, vaciar aproximadamente 10 mL de la agarosa fundida en el molde. Colocar el peine.
3. Dejar enfriar a temperatura ambiente durante 20 a 30 minutos. Retirar el peine y poner el molde en la cámara de electroforesis. Llenar con el volumen necesario de amortiguador TAE 1X hasta cubrir el gel, entre 100-120 mL.
4. Preparar las muestras agregándoles 2 μ L de amortiguador de muestra y 15 μ L de la reacción de restricción.
5. Colocar las muestras en el gel y correr durante 30 minutos a 100 volts.
6. Verificar los resultados de la separación electroforética en el transiluminador, después de sumergir el gel en una solución de bromuro de etidio durante 5 minutos.

BIBLIOGRAFÍA

- AIZPURU AKEL, Victoria E. y Susana Kofman-Alfaro. "Cromatina X y compensación de dosis, Cromatina Y", J. Guízar-Vázquez (ed.), *Genética Clínica. El Manual Moderno*, México, 1994, pp. 79-88.
- ALBERTS, Bruce y otros. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, Taylor & Francis Group, Nueva York, 2002, 1464 pp.
- . y otros. *Biología molecular de la célula*. Omega, Barcelona, 2008, 1602 pp.
- . y otros. *Introducción a la biología celular*. Editorial Médica Panamericana, México, 2011, 732 pp.
- ARAKAKI, David y Robert S. Sparkes. "Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood", *Cytogenetic and Genome Reserch*, 2(2-3), Karger Medical and Scientific Publishers, Suiza, 1963, pp. 57-60.
- AVERS, Charlotte Jo. *Biología celular*. Grupo Editorial Iberoamérica, México, 1991, 748 pp.
- BARCELÓ MAIRATA, Francisca. *Técnicas instrumentales en bioquímica y biología*. Vol. 105, Col·lecció materials didàctics, Universitat de les Illes Balears, Servei de Publicacions i Intercanvi Científic, Palma de Mallorca, España, 2003, 307 pp.
- BARRIENTOS-SALCEDO, Carolina. Efecto citogenético de la resina de la raíz de *Ipomea purga* (Convolvaceae) en linfocitos humanos de sangre periférica. Tesis de licenciatura, Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, 1993.
- BECKER, Wayne M. y otros. *El mundo de la célula*. Pearson, Addison Wesley, Madrid-México, 2007, 1008 pp.

- BISHOP, Michael L. y otros. *Clinical Chemistry: principles, techniques and correlations*. Wolters Kluwer Health: Lippincott Williams and Wilkins, Filadelfia, 2013, 754 pp.
- BRITTON, Caroline y otros. *Disorders of blood. Diagnosis, Pathology, Treatment and Technique*. J. & A. Churchill, Londres, 1979, 850 pp.
- CALVIN, Melvin. "Path of carbon in photosynthesis", *Science* 135 (3507), 1962, pp. 879-889.
- CALLEN, Jean-Claude. *Biología Celular: de las moléculas a los organismos*. Grupo Patria Cultural/Compañía Editorial Continental, México, 2000, 488 pp.
- CAMPBELL, Neil A. y Jane B Reece. *Biology*. Pearson Education: Benjamin Cummings, San Francisco, 2004, 1312 pp.
- CASSIMERIS, Lynne y otros. *Lewin's Cells*. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury, Massachusetts, 2010, 1053 pp.
- CHANDAR, Nalilni y Susan Viselli. *Biología molecular y celular*. Wolters Kluwer: Lippincott Williams & Wilkins, México, 2011, 236 pp.
- CHRISTENSEN, K. y otros. *Técnicas en histología y biología celular*. Elsevier, España, 2009.
- Cooper, Geoffrey M. *La Célula*. Marbán libros, Madrid, 2002, 685 pp.
- DARNELL, James E. y otros. *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books, Nueva York, 1990, 1105 pp.
- DEAN, Roger T. *Lisomas*. Omega, Barcelona, 1979, 62 pp.
- DE WITT, William. *Biology of the Cell: an Evolutionary Approach*. Saunders Co, Filadelfia, 1977, 568 pp.
- DREISBACH, Robert H. y William O. Robertson. *Manual de toxicología clínica: prevención, diagnóstico y tratamiento*. El Manual Moderno, México, 1988, pp. 232-244.
- DUVE, C. *Microbodies in the living cells*. Scientific American, 1982, 248 (5), pp. 52-62.
- GARTNER, Leslie. P. y otros. *Biología celular e histología*. Board review series, Wolters Kluwer: Lippincott Williams & Wilkins, Barcelona, 2007, 356 pp.
- GONZÁLEZ-QUIRASCO, I. Efecto citogenética del insecticida Baygón (Pro-poxur) sobre cultivo de linfocitos. Tesis de licenciatura, Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, 1991.
- GONZÁLEZ-MORÁN, M. Genoveva. *Técnicas de laboratorio en biología celular y molecular*. AGT Editor, México, 2008, 349 pp.

- GRANT, W. F. *Chromosome aberrations assay in *Allium cepa*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Gene-Tox Program. Mutat. Res.* 1982, 99: 273-291.
- HALL, James L. y Dennis A. Backer. *Membranas celulares y transporte de iones.* CECSA, México, 1982, 151 pp.
- HENRY, Richard Joseph y otros. *Clinical Chemistry: principles and techniques.* Harper & Row, Nueva York, 1984, 1006 pp.
- HERBERT DOCTOR, Luis Alfredo. Actividad Citotóxica del extracto proteico del mesocarpio de mango (*Mangifera indica* L var. Manila), con actividad de lectina en linfocitos humanos en cultivo. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, 2011.
- HINKLE, A. "How the cells make ATP", *Sci.Am*, 1978, 238:104-121.
- HODGSON, Ernest y Joyce A. Goldstein. "Metabolism of Toxicantes: Phase 1 Reactions and Pharmacogenetics", *Introduction to Biochemical Toxicology.* Wiley Inter-Science, Nueva York, 2001, pp. 67-112.
- KARP, Gerald. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos.* McGraw-Hill/Interamericana, México, 2014, 783 pp.
- KIERSZENBAUM, Abraham L. y Laura L. Tres. *Histología y biología celular: introducción a la anatomía patológica.* Elsevier, Barcelona, 2012, 700 pp.
- KRUPP, Marcus Abraham, y otros. *Manual de diagnóstico clínico y laboratorio.* El Manual Moderno, México, 1986, 792 pp.
- LEHNINGER, Albert. *Bioenergética: La base molecular de las transformaciones biológicas de energía.* Fondo Educativo Interamericano, Bogotá, Caracas, México, 1978, 242 pp.
- LEÓN-CAZARES, J. M. *Conservación de cultivo de sangre periférica con refrigeración para la obtención de cromosomas humanos.* An. Inst. Biol., Serie Biol. Exp., UNAM, México, 1967, 38(1): 1-4.
- LOWRY, O. H., y otros. *Biol. Chem.* 1951, 193 (1): 265-275.
- LYNCH, Matthew J. y otros. *Métodos de Laboratorio.* Nueva Editorial Interamericana, México. 1988, pp. 223-226.
- LUQUE CABRERA, José y Miguel A. Herráez S. *Biología molecular e ingeniería genética.* Elsevier, Madrid, 2001, 512 pp.
- MCCLUNG JONES, Ruth. *Basic Microscopic Technics.* The University of Chicago Press, 1966, 334 pp.
- Manual del usuario de cámara de electroforesis mini-PROTEAN, BIO-RAD Inc.

- Manual del usuario del microscopio de luz transmitida. Carl Zeiss, Göttingen, Alemania, 2001.
- Manual del usuario de pipetas Genex Beta.
- NICHOLLS, David G. y Stuart J. Ferguson. *Bioenergetics*. Academic Press, Nueva York, 2013.
- OROZCO ESTHER y Patricio Gariglio Vidal. *Genética y Biomedicina Molecular*. Limusa/IPN, México, 2000, 458 pp.
- ROSS, Michael H. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires-México, 2012, 974 pp.
- SCHARTER y Pollack. *Anal. Biochemistry*, 1993. 21:654-655.
- SHEELER, Phillip y Donald Bianchi. *Biología celular: estructura, bioquímica y función*. Limusa Wiley, México, 1993, 672 pp.
- Saavedra, Sepúlveda, Julio y Rosa María Medina Hernández. *Histología: biología celular y tisular : instructivo de laboratorio*. McGraw-Hill/Interamericana, México, 2014, 167 pp.
- Tribe, Michael A. y otros. *Metabolism and Mitochondria*. Cambridge University Press, Londres-Nueva York, 1986.
- Valadez M., Ernestina y Gunter Kahl. *Huellas de ADN en genoma de plantas: teoría y protocolos de laboratorio*. Mundi-Prensa/Universidad Autónoma de Chapingo, México, 2000, 147 pp.
- Vázquez, J. M. "El ciclo celular", Luis Felipe Jiménez y Horacio Merchant (edits). *Biología celular y molecular*. Pearson Educación, México, 2003, 853 pp.
- Voet, Donald y Judith Voet. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Nueva York, 2010, 1428 pp.
- Whittaker, Peter y Susan M. Danks. *Mitocondria, estructura y función*. CECSA México, 1982, 176 pp.

ÍNDICE

Presentación	7
Reglamento del laboratorio de biología celular	9
Práctica 1. Fuentes de información	11
Objetivo	11
Introducción	11
Material y equipo	12
Métodos	12
Investigación extramuros	13
Práctica 2. El estudio de la célula: microscopio óptico	15
Objetivo	15
Introducción	15
Equipo	17
Colorantes	17
Materiales	17
Métodos	17
Preparaciones de muestras para observar al microscopio	22
Investigación extramuros	23

Práctica 3. Diversidad celular: forma, tamaño y número.	25
Objetivo	25
Introducción	25
Equipo	26
Reactivos	26
Materiales	26
Método.	27
Resultados.	29
Medición del diámetro y longitud de las células observadas al microscopio	29
Cálculos para obtener el coeficiente micrométrico	30
Conteo con la cámara de Neubauer	31
Conteo de eritrocitos	35
Conteo de leucocitos	36
Conteo de espermatozoides	36
Resultados.	37
Investigación extramuros	37
Práctica 4. Transporte a través de la membrana celular.	39
Objetivo	39
Introducción	39
Equipo y materiales	40
Material biológico	40
Reactivos	40
Método.	41
Continuación de la práctica 4. Metodología para cuantificar el transporte de tirosina a través de la membrana (curva estándar de tirosina).	45
Resultados.	47
Investigación extramuros	48
Cuestionario	48

Práctica 5. Separación e identificación de organelos celulares (técnica citoquímica)	49
Objetivos	49
Introducción	49
Material biológico	50
Equipo y materiales	50
Reactivos	51
Método	51
Resultados	53
Investigación extramuros	53
Práctica 6. Fraccionamiento celular por centrifugación en un gradiente de densidad (gradiente de sacarosa)	55
Objetivo	55
Introducción	55
Material biológico	56
Equipo y materiales	56
Reactivos	56
Gradiente de sacarosa	57
Resultados	58
Cuestionario	58
Práctica 7. Caracterización bioquímica de organelos	59
Objetivos	59
Introducción	59
Material biológico	61
Equipo y materiales	61
Reactivos	61
Metodología	62
Resultados	64
Cuestionario	65

Práctica 8. Lisosomas: determinación de la actividad de fosfatasa ácida	.67
Objetivo	.67
Introducción	.67
Equipo	.68
Materiales	.68
Reactivos	.68
Método	.69
Resultados	.70
Práctica 9. Peroxisomas: identificación de la urato oxidasa	.71
Objetivo	.71
Introducción	.71
Material biológico	.72
Equipo y materiales	.72
Reactivos	.72
Método	.73
Cuantificación de ácido úrico	.74
Resultados	.74
Investigación extramuros	.74
Cuestionario	.75
Práctica 10. Retículo endoplásmico liso: identificación de citocromo P450	.77
Objetivo	.77
Introducción	.77
Materiales y equipo	.78
Reactivos	.78
Método	.78
Resultados	.79

Práctica 11. Mitocondria: identificación de citocromo C y deshidrogenasa succínica	81
Objetivo	81
Introducción	81
Materiales y equipo	82
Reactivos	82
Método	82
Resultados	84
Cuestionario	84
Práctica 12. Separación de cloroplastos: contenido de clorofila	85
Objetivo	85
Introducción	85
Equipo	86
Material biológico	86
Materiales y reactivos	87
Método	87
Resultados	88
Investigación extramuros	88
Práctica 13. Citoesqueleto: movimiento ciliar	91
Objetivo	91
Introducción	91
Material biológico	92
Materiales y equipo	92
Reactivos	92
Método I.	92
Resultados	94
Investigación extramuros	94
Práctica 14. Núcleo	95
Objetivo	95
Introducción	95
Material biológico	96

Material y equipo:	96
Reactivos	96
Método para cromatina sexual-cuerpo de Barr	97
Método para identificar células en interfase y mitosis en meristemos	97
Resultados	98
Investigación extramuros	99
Práctica 15. Ciclo celular y etapas de la división celular	101
Objetivo	101
Introducción	101
Materiales	102
Equipo	102
Método	102
Resultados	103
Investigación extramuros	103
Práctica 16. Cultivo celular en suspensión	105
Objetivos	105
Introducción	105
Equipo	106
Materiales	106
Reactivos	107
Métodos	107
Investigación extramuros	109
Práctica 17. Biología molecular de la célula: electroforesis	111
Objetivos	111
Introducción	111
Material y equipo	112
Reactivos	112
Método	113

Práctica 18 Extracción de DNA genómico y de plásmido	119
Objetivo	119
Introducción	119
Material y reactivos	120
Métodos.....	121
Práctica 19. Electroforesis de DNA	125
Objetivo	125
Introducción	125
Material y equipo.....	126
Reactivos	126
Método.....	126
Bibliografía	129

Siendo rectora de la Universidad Veracruzana
la doctora Sara Ladrón de Guevara,
Manual de la experiencia educativa Biología Celular
de Rocío Coutiño, Socorro Fernández
y Beatriz Palmeros
se terminó de imprimir en marzo de 2015,
en Proagraf, S. A. de C. V., Av. 20 de Noviembre núm. 649,
col. Badillo, CP 91190, Xalapa, Veracruz, México, tel: 01 228 890 62 04.
La edición fue impresa en papel cultural de 90 g.
En su composición se usaron tipos Palatino
de 11/12, 12/14, y 16/18 puntos.
Formación: Ma. Guadalupe Marcelo Quiñones.
Cuidado de la edición: Leticia Cortés Flores.