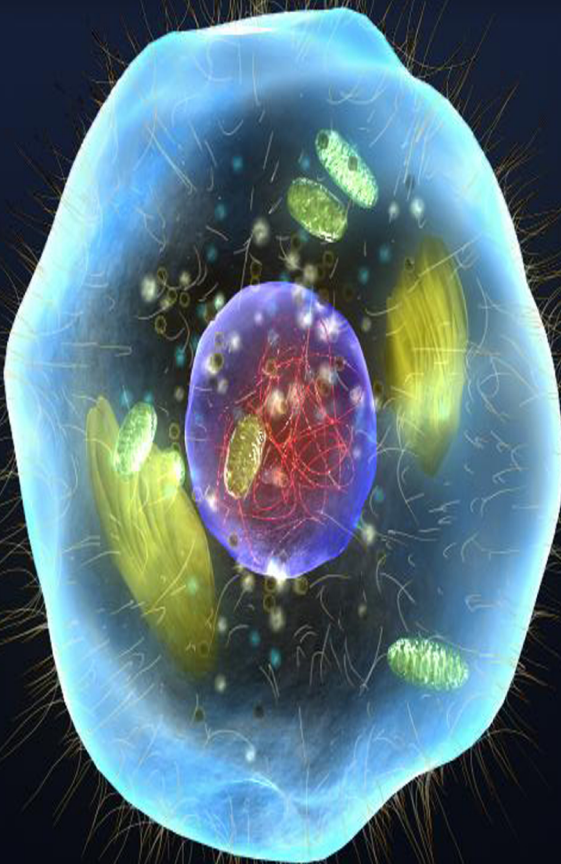




Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Manual de prácticas de laboratorio **Biología celular**



Dr. Yvonne **Ducolomb**

Dr. Reyna **Fierro**

Dr. Cristina **González**

Dr. Rocío **Ortiz**

Dr. Ernesto **Rodríguez**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Dr. Enrique Fernández Fassnacht
Rector General

Mtra. Iris Santacruz Fabila
Secretaria General

UNIDAD IZTAPALAPA

Dr. Javier Velázquez Moctezuma
Rector de Unidad

Dr. Óscar Comas Rodríguez
Secretario de Unidad

Dr. Rubén Román Ramos
Director de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Dra. Milagros Huerta Coria
Coordinadora de Extensión Universitaria

Lic. Adrián Felipe Valencia Llamas
Jefe de la Sección de Producción Editorial

Primera Impresión 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina,
Del. Iztapalapa, C.P 09340, México D.F. Tel.: 5804 4600

Impreso y hecho en México/*Printed in Mexico*

Índice

Presentación	5
Información general	7
Programa teórico	9
Bibliografía	13
Lecturas adicionales	14
Evaluación	17
Reglas del laboratorio	18
Prácticas de laboratorio	19
Práctica 1. Microscopía I: iluminación de Köhler y diversidad celular	21
Práctica 2. Microscopía II: microscopio de contraste de fases y diversidad celular	27
Práctica 3. Microscopía III: medición de diferentes tipos celulares	35
Práctica 4. Permeabilidad membranal	41
Práctica 5. Actividad enzimática de peroxisomas en células vegetales y animales	47
Práctica 6. Actividad respiratoria en mitocondria: efecto de un inhibidor y de un desacoplante	53
Práctica 7. Mitosis	57
Apéndice: Preparación de las soluciones empleadas en las prácticas	63

Presentación

El presente manual consta de dos partes, el programa de la parte teórica y las prácticas de laboratorio, ambas en este curso interactúan reforzándose mutuamente.

En la parte del programa teórico se plantea el temario general, los subtemas que deben incluirse, así como el tiempo y el nivel al que deberán exponerse los tópicos que lo integran. También, se plantean las lecturas básicas, consideradas necesarias para complementar el curso, además de una lista de lecturas adicionales opcionales, si se requiere profundizar en algún tema específico.

En la segunda parte del manual se exponen detalladamente cada una de las prácticas a realizar, éstas aunque son sencillas, son representativas y están de acuerdo con el tiempo y recursos de la UAM-1. Cada una de estas prácticas ha sido rediseñada y revisada en lo que respecta a forma y contenido. La inclusión de cada una de ellas se basa en la experiencia, ya que los profesores que elaboramos el presente manual hemos impartido este curso al menos en los últimos quince años.

Información general

Esta Unidad de Enseñanza Aprendizaje (UEA) forma parte del plan de estudios de las siguientes licenciaturas:

Biología Experimental

Biología

Hidrobiología

Producción Animal

El programa tiene como finalidad que el alumno comprenda el origen y la evolución de los diferentes sistemas celulares a través del conocimiento de sus estructuras, de manera que pueda explicar las funciones de la célula y relacionarlas a varios niveles de complejidad.

Esta UEA se encuentra ubicada en el tercer trimestre. Es conveniente que el alumno que la curse tenga bases de Química General, Química Orgánica y Bioquímica. Asimismo, sirve de base para el estudio de otras UEA, como Histología, Genética, Fisiología, entre otras, de las distintas licenciaturas mencionadas.

El tiempo estimado y la bibliografía propuestos para cada tema tienen como finalidad ser una guía para la uniformidad en los distintos grupos en cuanto a la profundidad que se asigne a cada tópico.

Programa teórico

IZTAPALAPA CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



Objetivo(s)

El alumno comprenderá el origen y evolución de los sistemas celulares. Tendrá un panorama completo y general de la estructura y función de los diferentes organelos que componen a la célula y la relación entre éstos, de manera que pueda explicar las funciones celulares a varios niveles de complejidad.

Contenido

Tema I.- Antecedentes y generalidades. 2 hrs.

1. Datos históricos.- Importancia de la microscopía en el estudio de la célula.
2. Teoría celular.- Analizar y discutir los postulados de esta teoría.

Tema II.- Estructura, origen y evolución celular. 4 hrs.

1. Origen de los sistemas celulares.
 - a) Teoría de la Generación Espontánea.
 - b) Panspermia.
 - c) Evolucionistas.
 - d) Oparin-Haldane.
 - e) Miller-Urey.
2. Evolución de las células primitivas.
 - a) Pruebas del origen de los procariontes (vías metabólicas, registro fósil y mineral).
 - b) Aparición de la fotosíntesis.
 - c) Evolución de las células en el Precámbrico.
 - d) Origen de las células eucariontes (teorías autógena y simbiótica).
3. Diversidad celular.
 - a) Descripción de los tres dominios: Archaea, Bacteria y Eucarya (Woese, 1977).
 - b) Características estructurales de cada uno de los grupos, haciendo énfasis en las diferencias entre hongos, plantas y animales.

Tema III.- Membrana plasmática. 8 hrs.

1. Composición química.
 - a) Lípidos.- Mencionar brevemente: ácidos grasos, triglicéridos, fosfolípidos y colesterol.
 - b) Fosfolípidos y su carácter anfipático, micelas, liposomas, bicapas. Modelo de membrana de Gorter y Grendel (1925).
 - c) Proteínas.- Concepto y estructura. Modelo de membrana de Davson y Danielli (1935), y de Robertson (1950).
 - d) Asimetría y fluidez de la membrana (Modelo de Singer y Nicolson, 1972). Proteínas integrales y periféricas, tipos de movimiento de los lípidos en la membrana.
 - e) Carbohidratos de la membrana como receptores y antígenos de superficie. Definición de lectinas y su papel en el estudio de los carbohidratos: tipos sanguíneos A, B, O, identificación de células malignas, proliferación de linfocitos y distribución de los carbohidratos en las membranas celulares.
2. Movimiento de moléculas a través de la membrana.
 - a) Difusión simple.- Moléculas lipofílicas. Osmosis (acuaporinas, soluciones hipotónicas, hipertónicas e isotónicas. Canales iónicos (ionóforos y proteínas de canal).
 - b) Difusión facilitada.- Características (transporte de glucosa).
 - c) Transporte activo.- Características (bomba de sodio-potasio).
3. Transporte masivo.
 - a) Endocitosis (fagocitosis).
 - b) Endocitosis mediada por receptor.
 - c) Exocitosis.
4. Uniones intercelulares.- Estructura y función.
 - a) Adherentes (integrinas, cateninas, cadherinas y selectinas), desmosomas y hemidesmosomas.
 - b) Herméticas o impermeables.
 - c) Comunicación y plasmodesmosomas.

Tema IV.- Pared celular. 3 hrs.

1. Composición química y física de la pared celular de plantas y hongos.
2. Formación de la pared celular.
3. Comunicación entre células con pared primaria y secundaria.
4. Importancia del proceso de lignificación (alimentación de animales domésticos).

Tema V.- Citoesqueleto y movimiento. 4 Hrs.

1. Descripción y función del citoesqueleto.
2. Componentes.
 - a) Microtúbulos.- Estructura y componentes (tubulina, MAP, tau).
 - Centriolo y huso mitótico (astral y anastral).
 - Transporte intracelular.- Desplazamiento de gránulos de pigmento (peces, anfibios y reptiles).
 - Cuerpos basales, cilios y flagelos. Ultraestructura de cilios y flagelos (9+2).
 - b) Microfilamentos.- Revisar su estructura (actina G, actina F, profilina). Participación en la citocinesis, contracción muscular y movimiento amiboideo.
 - c) Filamentos intermedios.- Tipos de filamentos (queratina, neurofilamentos, desmina).

Tema VI.- Sistemas membranales internos. 6 hrs.

1. Retículo endoplásmico.
 - a) Liso.- Revisar estructura y función (síntesis de lípidos, síntesis de hormonas esteroides, degradación de glucógeno, almacenamiento de calcio, eliminación de tóxicos).
 - b) Rugoso.- Revisar estructura y función (síntesis de proteínas membranales, lisosomales y de secreción). Explicar la Hipótesis de la Señal.
2. Aparato de Golgi.
 - a) Estructura.
 - b) Identificar las diferentes reacciones enzimáticas que se llevan a cabo (fosforilación, glicosilación y procesamiento proteolítico).
 - c) Reconocer las modificaciones de las proteínas de secreción y lisosomales.
 - d) Analizar los pasos finales de la exocitosis y su relación con el reciclaje de membrana.
3. Lisosomas y vacuolas.
 - a) Clasificación funcional de los lisosomas y partículas relacionadas (lisosomas primarios, vesículas autofágicas, fagolisosomas, endosomas y cuerpos residuales).
 - b) Capacidad digestiva de los lisosomas. Función de los lisosomas en el desarrollo normal de los organismos (recambio de matrices extracelulares, reabsorción y formación de tejido óseo, proceso de fertilización, metamorfosis en los anuros).
 - c) Procesos patológicos causados por falta de enzimas específicas en los lisosomas (asbestosis y enfermedades de almacenamiento).
 - d) Vacuolas de plantas y hongos. Funciones en el mantenimiento del pH, turgencia de la célula y mecanismo de defensa. Almacenamiento de metabolitos primarios y secundarios.

Tema VII.- Organelos generadores de energía. 5 hrs.

1. Mitocondria.
 - a) Estructura.- Componentes mitocondriales (membranas, espacio intermembranal y matriz).
 - b) Función.- Revisar los puntos principales del Ciclo de Krebs y de la cadena respiratoria.
 - c) Analizar el proceso quimiosmótico que convierte la energía de oxidación en ATP (Hipótesis quimiosmótica de Peter Mitchell, 1972).
2. Cloroplasto.
 - a) Estructura.- Componentes del cloroplasto (membranas, tilacoides y estroma).
 - b) Pigmentos fotosintéticos (clorofilas, carotenoides, bilinas y xantofilas).- Revisar las reacciones dependientes de la luz en las que se genera NADPH y ATP (Fotosistema I y II) y su utilización en las reacciones independientes de la luz en plantas C3, C4 y CAM.
 - c) Cromoplastos y leucoplastos.- Estructura y función.
3. Microcuerpos (peroxisomas y glioxisomas). Revisar los diferentes procesos oxidativos en los que intervienen (peroxidación, beta-oxidación, fotorrespiración y ciclo el glioxilato). Analizar su interrelación con mitocondria y cloroplasto.

Tema VIII.- Núcleo. 6 hrs.

1. Envoltura nuclear.- Analizar la estructura y composición de la envoltura nuclear, del complejo de poro y su relación con el transporte de materiales.
2. Nucleolo.- Estructura y composición. Región granular, región fibrilar, ADN asociado y su participación en la biogénesis de subunidades ribosomales.
3. Cromatina.- Describir la composición de la cromatina (nucleosoma). Heterocromatina y eucromatina.
4. Ciclo celular celular.
 - a) Definir ciclo celular diferenciando células cíclicas y no cíclicas.
 - b) Interfase.- Describir cada etapa (G0, G1, S, G2).
 - c) División celular.
 - Mitosis. Analizar sus etapas. Citocinesis. Importancia de la mitosis en la proliferación y mantenimiento de los organismos.
 - Meiosis. Revisar brevemente las fases haploides, diploides y poliploides de los ciclos de vida sexual que se presentan en protistas, hongos, plantas y animales. Mencionar la fertilización como el inicio de la fase diploide y la producción de gametos en la fase haploide por medio de la meiosis.
 - Analizar las dos divisiones que suceden en la meiosis, los eventos que ocurren en las etapas de la profase de la primera división, haciendo énfasis en la recombinación genética. Enfatizar su importancia como generadora de la variabilidad y su relación con la evolución de las especies.

Tema IX.- Envejecimiento y Muerte Celular. 2 hrs.

1. Apoptosis.- Definición, causas y mecanismos. Relación con ciclo celular y cáncer.
2. Necrosis.- Definición, causas y mecanismos.
3. Diferencias entre apoptosis y necrosis.

Modalidades del proceso de enseñanza aprendizaje

Presentación del profesor de los temas del curso y participación del alumno con cuestionarios, lectura de artículos y seminarios.

Bibliografía

-  Academia de biología celular vínculo <http://docencia.izt.uam.mx/acbc/>
-  Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. 2004. *Biología Molecular de la Célula*. Omega. España.
-  Avers, Ch. 1991. *Biología Celular*. Grupo Editorial Iberoamericano. México.
-  Becker, W. M., Kleinsmith, L. J., Hardin, J. 2006. *El Mundo de la Célula*. Pearson-Addison Wesley, México.
-  Jiménez, L. F., Merchant, H. 2003. *Biología Celular y Molecular*. Prentice Hall. México.
-  Karp, G. 2009. *Biología Celular y Molecular: conceptos y experimentos*. McGraw Hill. México.
-  Larcher, W. 2001. *Physiological plant ecology*. Springer. Alemania.
-  Lazcano-Araujo, A. 1983. *El origen de la vida*. Trillas. México.
-  Leclerc, J. 2003. *Plant ecophysiology*. Science Publisher. EUA.
-  Lodish, H., Beerk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. 2002. *Biología Celular y Molecular*. Médica Panamericana. México.
-  Vasil, I. K. 1994. *Plant cell and tissue culture*. Trevor A Thorpe. EUA.

Lecturas adicionales

Tema I.- Antecedentes y generalidades

- Libros de Biología Celular, Molecular, Bioquímica o Fisiología
- Teoría celular de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Tema II.- Estructura, origen y evolución celular

- Lazcano-Araujo, A. *El origen de la vida*. Trillas. México.1983. Capítulo 4 y 5.
- Bacterial (Prokaryotic) Phylogeny Webpage. 2006. Evolutionary Relationship between Bacteria and Archaea (Archaeobacteria). March 2006.
- Schopf, W. J. La evolución de las células primitivas. *Investigación y Ciencia* (26): 58-75, Nov. 1978.
- Margulis, L. Symbiosis and evolution. *Sci.Am.* 225(2): 48-57, 1971.
- Ford-Doolittle, W. Nuevo árbol de la vida. 2000. *Investigación y Ciencia*. Abril,. 26-32.

Tema III.- Membrana plasmática

- Bretscher, M.S. Las moléculas de la membrana celular. *Investigación y Ciencia* (III): 66-75, Dic. 1985.
- Maldonado-Baez, L., Wendland B. 2006. Endocytic adaptors: recruiters, coordinators and regulators. *Trends Cell Biol.* Oct; 16(10): 505-513. Epub 2006 Aug 28.
- Alberts, B., et al. *Op. Cit.* Capítulo 10a. Estructura y lípidos.
- Alberts, B., et al. *Op. Cit.* Capítulo 10b. Proteínas y azúcares.
- Alberts, B., et al. *Op. Cit.* Capítulo 10. Uniones intercelulares.

Tema IV.- Pared celular

- Pérez-Almeida, I., Carpita, NC. 2006. *Las galactosidasas y la dinámica de la pared celular*. INCI, vol.31, no.7, p.476-483. ISSN 0378-1844.
- Jamet, E., Canut, H., Boudart, G., Pont-Lezica, R.F. 2006. Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends in Plant Science*. Volume 11: 33-39.

Tema V.- Citoesqueleto y movimiento

- Dustin, P. 1980. Microtúbulos. *Investigación y Ciencia*. Oct. (49): 36-48.
- Watanabe, T., Noritake J., Kaibuchi, K. 2005. Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol.* Feb; 15(2): 76-83.
- Helfand, B., Chou, Y., Shumaker, K., Goldman, R. 2005. Intermediate filament proteins participate in signal transduction. *Trends in Cell Biology*. Vol.15, 568-570 .
- Pardo, M. 2005. Citoquinesis en células eucariotas. *Investigación y Ciencia*. Julio, 40-49.

- Meza, I., Frixione E. 1996. Máquinas vivientes, ¿Cómo se mueven las células? Fondo de Cultura Económica. México. Capítulo VI. Aparatos de presión: Motilidad coordinada.
- Meza, I., Frixione, E. 1996. Máquinas vivientes, ¿Cómo se mueven las células? Fondo de Cultura Económica. México. Capítulo VII. Sistemas mixtos: Movimiento generado por microtúbulos y microfilamentos.
- Tovar-Franco, J. A. Citoesqueleto. Biología Celular, Curso Básico, Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Bogotá, Colombia.

Tema VI.- Sistemas membranales internos

- Samaj, J., Read, N. D. Volkmann, D., Menzel, D. Baluska, F. 2005. The endocytic network in plants. Trends Cell Biol 15(8): 425-433.
- Barr, F. A. 2002. The Golgi apparatus: going round in circles? Trends Cell Biol 12(3): 101-104.
- Arias, J. L. 2000. ¿Cómo saben las proteínas de la célula donde deben ubicarse una vez sintetizadas? Tecno Vet, Año 6 N°1, marzo.
- Alberts, B., et al. *Op. Cit.* Capítulo 12. Compartimentos intracelulares.

Tema VII.- Organelos generadores de energía

1. Mitocondria

- Konigsberg Fainstein, M. Respiramos por los pulmones o por las mitocondrias. Ciencia y Desarrollo. 144. 66-72. 1999.

2. Cloroplasto

- Hofmann, N.R., Theg, S. M. 2005. Chloroplast outer membrane protein targeting and insertion. Trends in Plant Science, Volume 10, Issue 9, September, 450-457

3. Microcuerpos

- Alberts, B., et al. *Op. Cit.* Capítulo 12. Compartimentos intracelulares.
- Jiménez-Sánchez, G., Silva-Zolezzi, I. 2003. Bases bioquímicas y fisiopatológicas de las enfermedades peroxisomales. Mensaje Bioquímico, Vol XXVII. 1-23.

Tema VIII.- Núcleo

1. Envoltura nuclear

- Prunuske, A. J. *et al.* The nuclear envelope: form and reformation. Current Opinion in Cell Biology 2006, 18:108-116

2. Nucleolo

- Alberts, B., et al. *Op. Cit.* Capítulo 8.

3. Cromatina

- Recillas-Targa, F. Escamilla-Del Arenal, M. 2004. Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. *Mensaje Bioquímico*, Vol XXVIII. 173- 201.
- Downey, M., Durocher, D. 2006. Chromatin and DNA repair: the benefits of relaxation. *Nat Cell Biol* 8(1): 9-10.

4. Ciclo celular

- López-Casillas F. 2002. El ciclo celular bien vale un galardón. *Ciencia*. 74-77. enero-marzo.
- Pawlowski, W. P., Cande, W. Z. 2005. Coordinating the events of the meiotic prophase. *Trends Cell Biol* 15(12): 674-681.
- Cimini, D. Degrossi, F. 2005. Aneuploidy: a matter of bad connections. *Trends Cell Biol* 15(8): 442-451.

Tema IX.- Envejecimiento y muerte celular

- Arnoult, D. 2007. Mitochondrial fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 17, 6-12.
- Flores-Pérez, F.I. 2002. ¿Es la muerte importante para la vida? *Veterinaria México*. 33:161-171.
- Ramírez-Chamond, R., Carracedo-Añón, J. Moreno-Aguilar, C., Guerra-Pasadas, F. 1999. Apoptosis y enfermedad. *Alergol Inmunol Clin*.
- Gómez González, E.O., Zentella, A. 1998. Apoptosis y muerte celular programada. *BEB* 17 (3): 105-114.

Evaluación

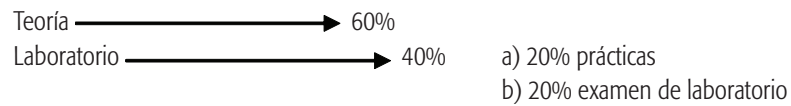
Se realizarán exámenes parciales durante el trimestre.

Los alumnos que aprueben todos los exámenes parciales no tendrán que presentar el examen final y la calificación de la parte teórica será el promedio aritmético de los parciales, en caso contrario, el alumno deberá reponer el día del examen final, los exámenes parciales que no hubiera presentado o aprobado.

En las prácticas se calificará el trabajo de laboratorio y el reporte escrito. Al finalizar el trimestre se hará un examen individual teórico-práctico.

Se podrá pedir un seminario de investigación para ser desarrollado durante el trimestre.

El porcentaje de cada una de las partes que integran el curso se indica a continuación:



El alumno que no apruebe alguna de las dos evaluaciones (teórica o laboratorio) no podrá acreditar el curso.

Reglas del Laboratorio

1. Es indispensable el uso de la bata.
2. No se debe fumar ni ingerir alimentos durante las sesiones.
3. Los equipos de trabajo estarán formados por 4 o 5 alumnos como máximo.
4. El profesor escogerá al azar a un alumno para que exponga la práctica correspondiente a esa sesión y posteriormente será discutida por todo el grupo.
5. El tiempo límite de tolerancia para entrar al laboratorio será de 10 minutos.
6. El reporte deberá incluir:
 - Introducción
 - Objetivo
 - Material y Método
 - Resultados
 - Discusión (análisis de resultados)
 - Conclusiones
 - Bibliografía
7. Para acreditar el Laboratorio se requerirá el 80% de reportes y asistencias, así como obtener una calificación mínima de 6 (promedio de reportes y examen final).

Prácticas

Práctica 1

Microscopía I: Iluminación de Köhler y diversidad celular

Introducción

El tamaño de las células escapa al poder de resolución del ojo que se define como la distancia mínima entre dos puntos para que puedan verse como objetos separados. El descubrimiento de las células fue posible a partir de la invención del microscopio compuesto. El conocimiento de la célula y el papel que juega en la formación de los tejidos animales y vegetales ha avanzado de manera paralela al perfeccionamiento de las técnicas de microscopía. Una célula animal típica mide entre 10 y 20 μm de diámetro, unas cinco veces menos que el diámetro de la partícula más pequeña observable por el ojo humano.

Se han desarrollado diferentes sistemas de iluminación para el microscopio, que permiten observar células o tejidos vivos, o fijados y teñidos.

El microscopio de campo claro es útil para la observación de material teñido, la tinción incrementa el contraste entre la muestra y el medio que lo rodea. La imagen formada resalta sobre un fondo blanco brillante. En este sistema, el trayecto que sigue la luz va desde la lámpara hasta el ojo del observador pasando por un sistema de lentes que la alinea y la concentra.

August Köhler (1866-1948), físico alemán, desarrolló un sistema que permite el alineamiento del sistema óptico con el sistema de iluminación sobre un mismo eje. Esto se realiza tomando como referencia el diafragma de campo, que es un dispositivo que se encuentra sobre a la fuente de luz, que regula la apertura para el paso de ésta. El diafragma de campo permite centrar el condensador móvil. La iluminación de Köhler crea un campo visual que ilumina uniformemente el espécimen. Esta técnica evita la aberración cromática, mejorando la resolución de las imágenes. Se pueden cambiar los objetivos (10X, 40X y 100X), sin tener que volver a alinear el sistema.

Para el uso correcto del microscopio es indispensable que al inicio de cualquier observación se realice la iluminación de Köhler alineando el condensador con respecto a la fuente de luz, su finalidad es obtener la iluminación óptima de la muestra.

Objetivo

Identificar las partes del microscopio de campo claro, aprender a realizar la iluminación de Köhler y observar diferentes tipos celulares.

Material

Proporcionado por el laboratorista a cada equipo:

Microscopio de campo claro con condensador móvil y diafragma de campo (Figura 1),

1 lanceta

papel seda

aceite de inmersión

1 vidrio de reloj

3 pipetas Pasteur

pinzas de disección

piseta con etanol

algodón

2 ml de azul de metileno al 0.2%

2 ml de safranina al 1.0%

2 ml de NaCl al 0.9%.

Proporcionado por el alumno:

Portaobjetos
cubreobjetos
hisopillos
cebolla
elodea
navaja.

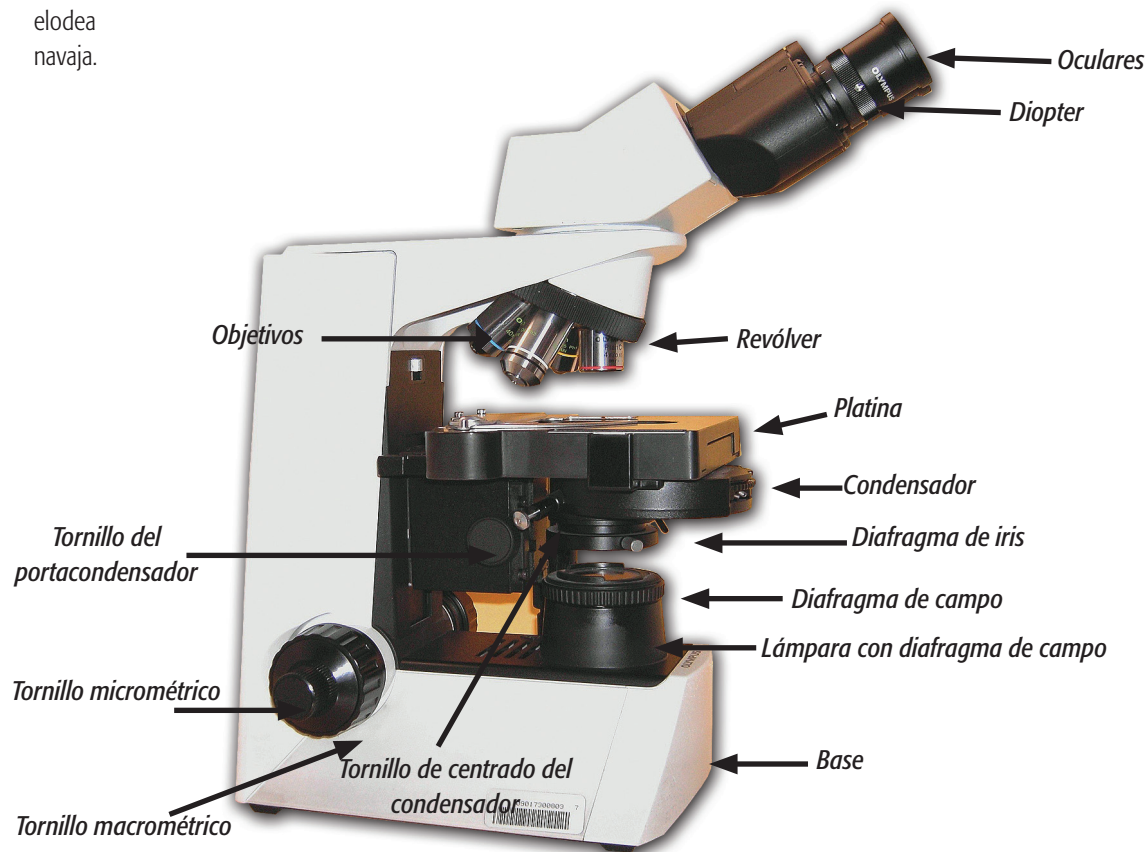


Figura 1. Microscopio de campo claro.

Método

Para que los microscopios proporcionen imágenes de buena calidad las lentes deben estar limpias, por lo que debe evitar tocarlas, ya que las huellas digitales alteran la calidad de la imagen observada. Solo si es imprescindible debe limpiar las lentes, para llevarlo a cabo utilice únicamente papel especial para la limpieza de las lentes (papel seda), no emplee pañuelos desechables ni cotonetes. En el ambiente hay pequeñas partículas de polvo y si no se utiliza el material adecuado, las lentes se deterioran dañando la calidad de la imagen.

Use aceite de inmersión solo cuando va a utilizar el objetivo de 100X. Evite que los demás objetivos entren en contacto con el aceite. Al finalizar la sesión de laboratorio siempre limpie el aceite de la lente.

I.- Iluminación de Köhler

1. Identifique con la ayuda de la Figura 1, las partes del microscopio y verifique su funcionamiento.
2. Abra el diafragma de iris y el diafragma de campo.
3. Suba el condensador hasta el tope, utilizando el tornillo del portacondensador (Figura 2).

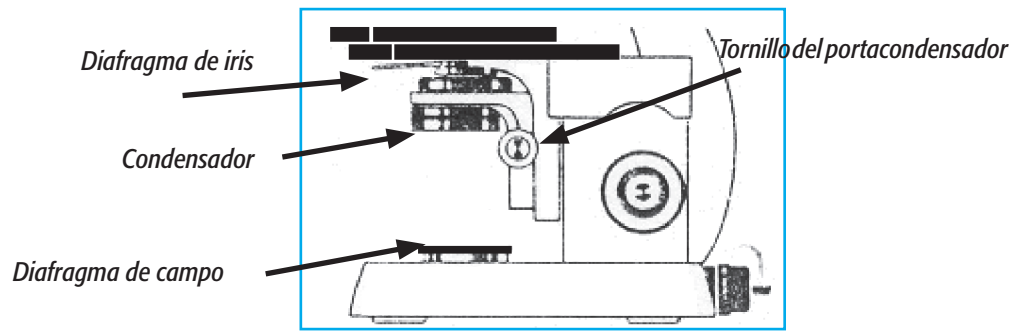


Figura 2. Vista lateral del condensador.

4. Seleccione el objetivo de 10X.
5. Ajuste la distancia interpupilar. Enfoque una preparación con el tornillo macrométrico. Para realizar el enfoque fino use el tornillo micrométrico.

Afine el enfoque para el ojo izquierdo con el *diópter*.

6. Cierre el diafragma de campo completamente, se debe ver una luz difusa como aparece en la Figura 3.

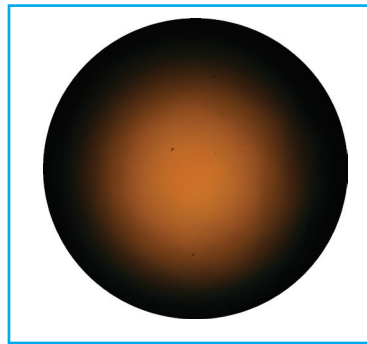


Figura 3. Vista del campo del microscopio con el diafragma de campo completamente cerrado.

7. Utilizando el tornillo del portacondensador, descienda el condensador hasta ver nítido el diafragma de campo que aparecerá como un polígono (Figura 4).

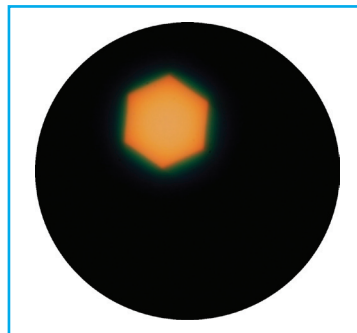


Figura 4. Enfoque del diafragma de campo mediante el tornillo del portacondensador.

8. Centre este polígono con los tornillos posteriores (Figura 5).

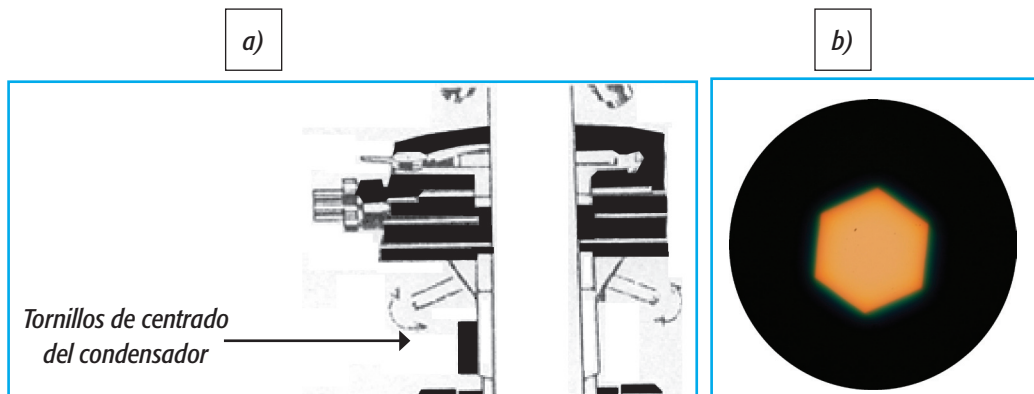


Figura 5. a) vista posterior del microscopio en donde se muestran los tornillos de centrado del condensador, b) campo del microscopio en donde se observa el polígono centrado.

9. Abra el diafragma de campo totalmente (Figura 6).

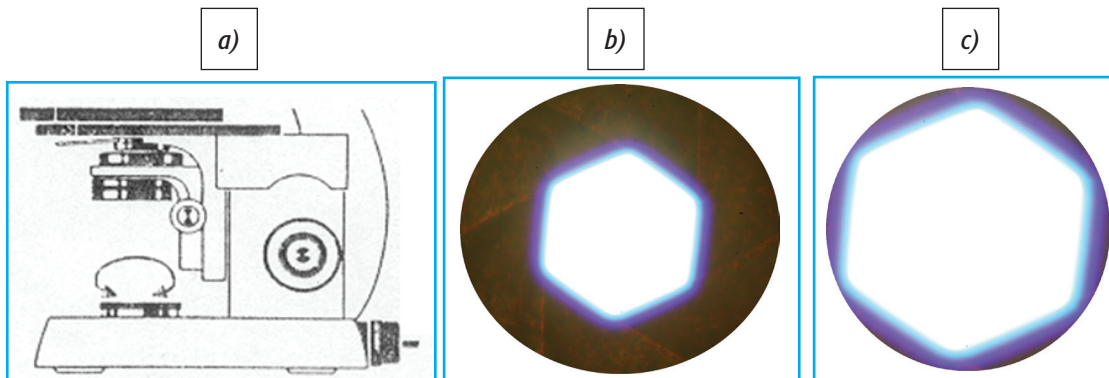


Figura 6. a) vista lateral del microscopio en donde se muestra la apertura del diafragma de campo, b y c) se abre el polígono hasta ocupar todo el campo.

10. Contraste la imagen con el diafragma de iris del condensador.

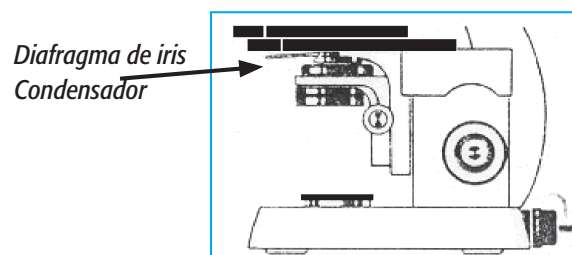


Figura 7. Vista lateral del microscopio en la que señala con una flecha la posición del diafragma del iris.

11. Para observar sus muestras con el objetivo de 40X y 100X solamente afine el enfoque con el tornillo micrométrico.

NOTAS:

- a) Cada vez que observe con el objetivo de 100X, deberá colocar sobre el cubreobjetos de la preparación, una pequeña gota de aceite de inmersión, la lente del objetivo deberá quedar inmersa en el aceite para tener un mejor resultado. Al retirarlo, absorba el aceite de la lente usando papel seda.
NO OLVIDE LIMPIAR BIEN las lentes de 40X y 100X.
- b) Evite que su muestra se seque agregando una gota de la solución correspondiente por los bordes del cubreobjetos.

II.- Preparaciones en fresco

1. Con un hisopillo raspe la superficie interna de la mejilla y frótelo sobre un portaobjetos perfectamente limpio, agregue una gota de azul de metileno al 0.2%, coloque el cubreobjetos y observe al microscopio con el objetivo de 10X, 40X y 100X.
2. Limpie con un algodón con alcohol la yema de alguno de sus dedos y píquelo con una lanceta estéril, coloque una gota de sangre en un vidrio de reloj que contenga 2 ml de solución de NaCl al 0.9%. Coloque una gota de esta suspensión en un portaobjetos, coloque un cubreobjetos y observe al microscopio con los objetivos de 10X, 40X y 100X.
3. Desprenda un fragmento de epidermis de cebolla, deposítelo en el portaobjetos cuidando que quede completamente extendido, agregue una gota de azul de metileno al 0.2%, coloque el cubreobjetos y observe con el objetivo de 10X y de 40X.
4. En un portaobjetos deposite una hoja de elodea, ponga una gota de safranina, coloque un cubreobjetos y observe con los objetivos de 10X y 40X.

Resultados

Esquematice las células de las muestras observadas con los objetivos de 10X, 40X y 100X, anotando el nombre de la célula, los componentes celulares identificados, así como el aumento total empleado (para lo cual se multiplica el aumento del objetivo por el aumento del ocular).




Con base en sus resultados y tomando como guía los siguientes enunciados, redacte la discusión de la práctica:

1. Indique la importancia del microscopio de campo claro en la investigación científica.
2. ¿Qué importancia tiene realizar la iluminación de Köhler?
3. ¿Qué cuidados hay que tener al utilizar el aceite de inmersión?
4. Indique los componentes celulares que haya observado en esta práctica en cada muestra.
5. Diga las diferencias y semejanzas que hay entre las células animales y vegetales.
6. ¿Se logró el objetivo de la Práctica? ¿Por qué?

Conclusiones

Con base en sus resultados y discusión, indique cuáles serían las conclusiones de esta práctica.

Bibliografía

-  Barrera-Escorcia H., Cárdenas-Reygadas, R. 1997. *El Microscopio Óptico*. Plaza y Valdés Editores. México, D.F.
-  Karp, G. 2009. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. McGraw-Hill/Interamericana. México.
-  Keller, E, Goldman, D. R. 2006. Light Microscopy. En: *Basic Methods in Microscopy . Protocols and Concepts from Cells: A Laboratory Manual*. Spector D, Goldman RD eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.

Práctica 2

Microscopía II: Microscopio de contraste de fases y diversidad celular

Introducción

El microscopio de Contraste de fases está dotado de un sistema óptico especial que transforma las diferencias de fase de los rayos luminosos en diferencias de intensidad. De ese modo, las diferencias de fase que el ojo humano no puede percibir, se hacen visibles, pues se convierten en diferencias de intensidad luminosa, fácilmente perceptibles.

La velocidad de la luz al atravesar un cuerpo está en función del grosor de la muestra, por lo que la luz no la atraviesa a igual velocidad, esto origina diferencias de fase en la luz emergente que se transforman en diferencias de amplitud, dando diferencias de intensidad luminosa que la retina sí puede percibir.

El microscopio de contraste de fases se utiliza principalmente en el estudio de células vivas sin alterar o sin teñir, así como también es de gran utilidad para observar células cultivadas, cuyo crecimiento y división mitótica pueden seguirse fácilmente.

Existen células de una enorme variedad de formas y tamaños que representan su adaptación evolutiva a distintos ambientes o a diferentes funciones especializadas dentro de un organismo multicelular. El tamaño de las células varía desde unas décimas de micrómetro, tal y como ocurre con algunas bacterias, hasta dimensiones de centímetros, como las yemas de huevo de algunas aves.

Objetivo

Conocer el sistema de contraste de fases y su utilidad. Aprender a manejarlo y examinar distintos tipos celulares.

Material

Proporcionado por el laboratorista a cada equipo:

Microscopio de contraste de fases (Figura 1)

Papel seda

3 pipetas Pasteur

1 vidrio de reloj

1 lanceta

2 ml de agua destilada

Piseta con etanol

Lente auxiliar (Figura 1)

Aceite de inmersión

Algodón

2 ml de solución isotónica de NaCl al 0.9%.

Proporcionado por el alumno:

Un frasco chico con agua estancada

1 cebolla

1 sobre de levadura seca activa

1 navaja

Hisopillos

Portaobjetos y

Cubreobjetos.

Por sección:

Parrilla de calentamiento y

un vaso de precipitado de 500 ml.



Figura 1. Microscopio de contraste de fases y lente auxiliar.

Método

Para que los microscopios proporcionen imágenes de buena calidad las lentes deben estar limpias, por lo que debe evitar tocarlas, ya que las huellas digitales alteran la calidad de la imagen observada. Se deberán limpiar las lentes solo si es imprescindible, para llevar a cabo esta tarea, únicamente papel especial para la limpieza de las lentes (papel seda), no emplee pañuelos desechables ni cotonetes/Q-Tips. En el ambiente hay pequeñas partículas de polvo y si no se utiliza el material adecuado, las lentes se deterioran dañando la calidad de la imagen.

Use aceite de inmersión solo cuando va a utilizar el objetivo de 100X. Evite que los demás objetivos entren en contacto con el aceite. Al finalizar la sesión de laboratorio siempre limpie el aceite de la lente.

I.- Realice la iluminación de Köhler (como se indica en la Práctica 1).

II.- Ajuste para el contraste de fases:

1. Coloque en el condensador el número que corresponda al aumento del objetivo usado: en 40 para el objetivo 40X y en 100 para el objetivo 100X (Figura 2).
2. Cambie un ocular por la lente auxiliar (Figura 3). Enfoque los dos círculos (anillo de fases y diafragma anular) (Figura 4) separando las partes que componen la lente auxiliar.
3. Centre los dos círculos, utilizando los tornillos situados en la parte lateral del condensador.
4. Retire la lente auxiliar, coloque nuevamente el ocular y afine el enfoque.
5. Cada vez que cambie el objetivo (10X, 40X y 100X) debe cambiar el condensador al número correspondiente y repetir el procedimiento antes mencionado.

NOTAS:

- a) Cada vez que haga una observación con el objetivo de 100X, deberá colocar sobre el cubreobjetos de la preparación una pequeña gota de aceite de inmersión; esto quiere decir que la lente del objetivo deberá quedar inmersa en el aceite para tener un mejor resultado. Al retirarlo, absorba el aceite de la lente usando papel seda. **NO OLVIDE LIMPIAR BIEN las lentes de 40X y 100X.**
- b) Evite que su muestra se seque agregando en caso necesario, una gota de la solución correspondiente por los bordes del cubreobjetos.

III.- Preparaciones en fresco

1. Desprenda un fragmento de epidermis de cebolla, deposítelo en el portaobjetos cuidando que quede completamente extendido, agregue una gota de agua, coloque el cubreobjetos y enfoque la muestra con el objetivo de 10X. Una vez efectuado esto realice el contraste de fases y haga sus observaciones en 10X y 40X.
2. Pique la yema de cualquiera de sus dedos con una lanceta estéril, coloque una gota de sangre en un vidrio de reloj que contenga 2 ml de solución de NaCl al 0.9%. Coloque una gota de la suspensión celular en un portaobjetos y, posteriormente, coloque un cubreobjetos, observe al microscopio a 10X, 40X y 100X en contraste de fases. Si su preparación empieza a secarse, coloque una gota de NaCl al 0.9% por los bordes del cubreobjetos.

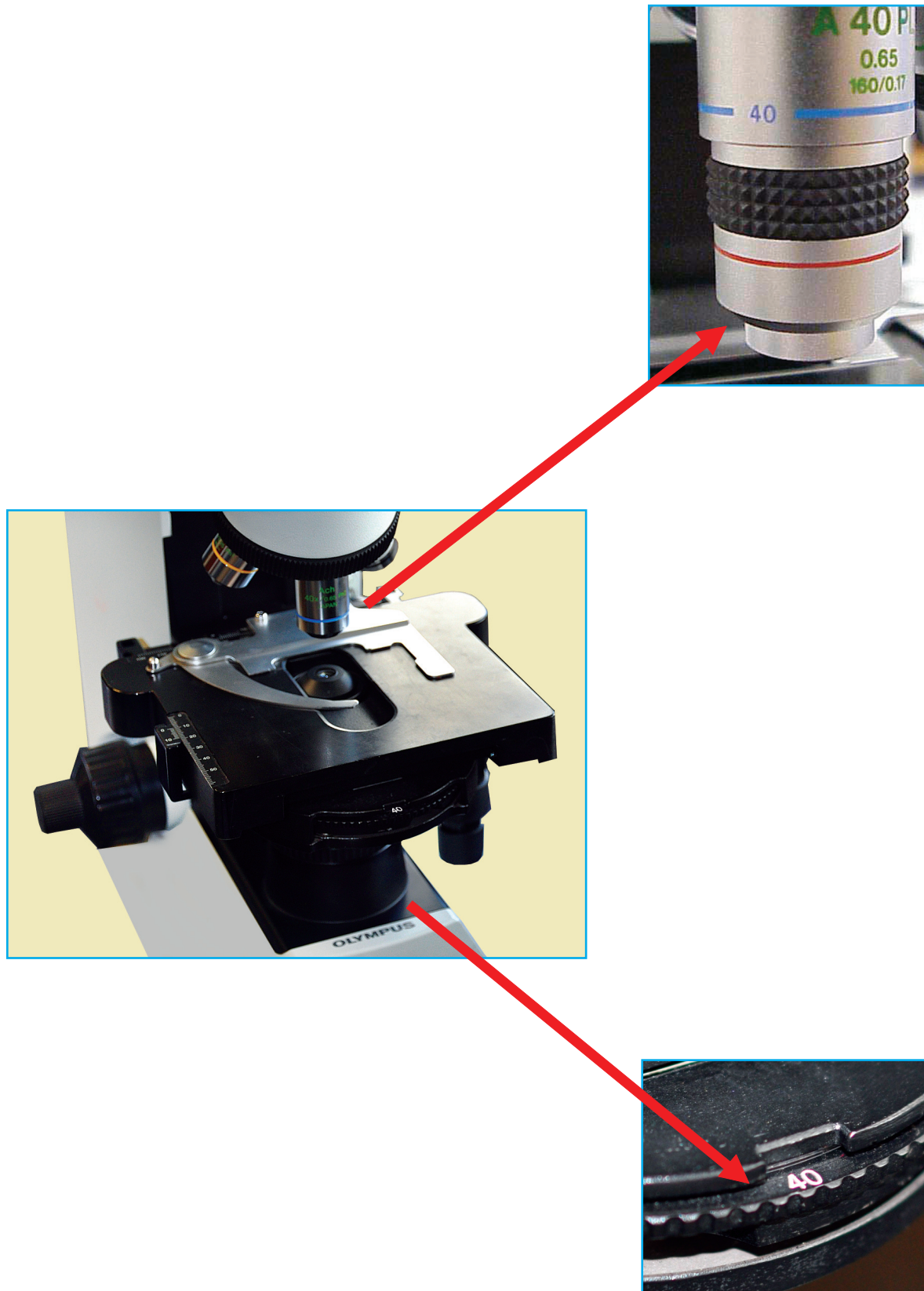


Figura 2. Número en condensador de acuerdo con aumento del objetivo utilizado.

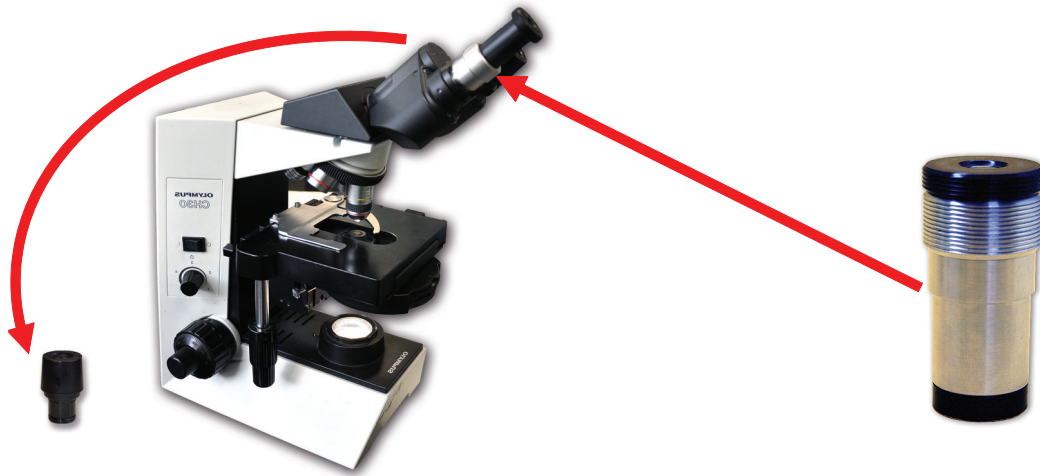


Figura 3. Cambiar ocular normal por la lente auxiliar.

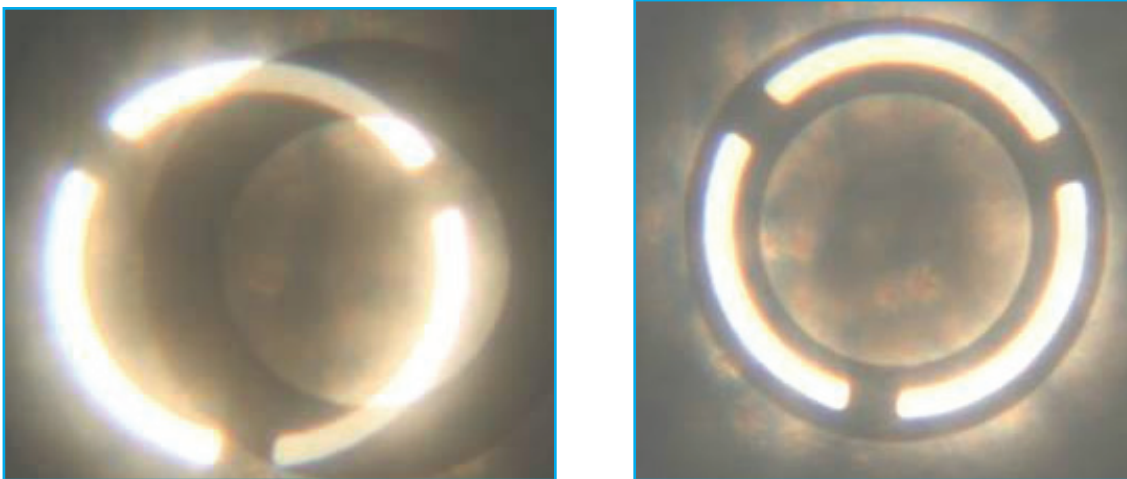


Figura 4. Centrado del anillo de fases y diafragma anular.

3. Con un hisopillo raspe la superficie interna de la mejilla y frótelo sobre un portaobjetos perfectamente limpio, agregue una gota de solución de NaCl al 0.9%, coloque el cubreobjetos, enfoque la muestra con el objetivo de 10X y realice el contraste de fases y haga sus observaciones con los objetivos de 10X, 40X y 100X.
4. En un tubo de ensayo coloque unos granos de levadura seca activa, agregue agua tibia y agite hasta tener una solución muy diluida; deposite una gota sobre el portaobjetos, ponga el cubreobjetos y observe al microscopio con los objetivos de 10X, 40X y 100X.
5. En un portaobjetos coloque una gota de agua estancada, ponga el cubreobjetos, enfoque la muestra con el objetivo de 10X tratando de identificar los microorganismos. Después realice el contraste de fases y haga sus observaciones a 10X y 40X.

Resultados

Haga esquemas de todas sus observaciones.




Con base en sus resultados y tomando como guía los siguientes enunciados, redacte la discusión de la práctica:

1. Indique la importancia del microscopio de contraste de fases en la investigación científica.
2. De acuerdo con sus observaciones, diga qué diferencias o ventajas encontró al usar el microscopio de contraste de fases, con respecto al de campo claro que utilizó en la práctica anterior.
3. Explique en qué tipo de estudios es recomendable utilizar el microscopio de contraste de fases y por qué?
4. Indique cuáles son los adelantos más recientes en el campo de la microscopía y explique su aplicación en la investigación científica.

Conclusiones

Con base en sus resultados y discusión, indique cuáles serían las conclusiones de esta práctica.

Bibliografía

-  Barrera-Escorcia, H., Cárdenas-Reygadas, R. 1997. *El Microscopio Óptico*. Plaza y Valdés Editores. México D.F.
-  Karp, G. 2009. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. McGraw-Hill/Interamericana. México.
-  Keller, E., Goldman, D. R. 2006. Light Microscopy. En: *Basic Methods in Microscopy. Protocols and Concepts from Cells: A Laboratory Manual*. Spector D, Goldman RD eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.

Práctica 3

Microscopía III: Medición de diferentes tipos celulares

Introducción

Para medir células y otras muestras al microscopio, es necesario utilizar una regla, al igual que para medir objetos mayores. Con este fin, se utiliza una pequeña regla dividida en 100 unidades (Figura 1) que se encuentra en un ocular micrométrico. Las divisiones tienen una longitud indeterminada por lo que es necesario medirlas con una regla de unidades conocidas.



Figura 1. Reglilla del ocular micrométrico (vista al microscopio).

Para esto se usa una escala que mide un milímetro de longitud y que está grabada en el centro de un portaobjetos (Figura 2), esta reglilla micrométrica está dividida en 100 partes iguales (Figura 3a), cada una de las cuales mide 10 micrómetros (μm) (Figura 3b). Cuando se cambian las lentes objetivos, el tamaño de lo observado se aprecia diferente por lo que es necesario medir la escala del ocular para cada objetivo del microscopio.

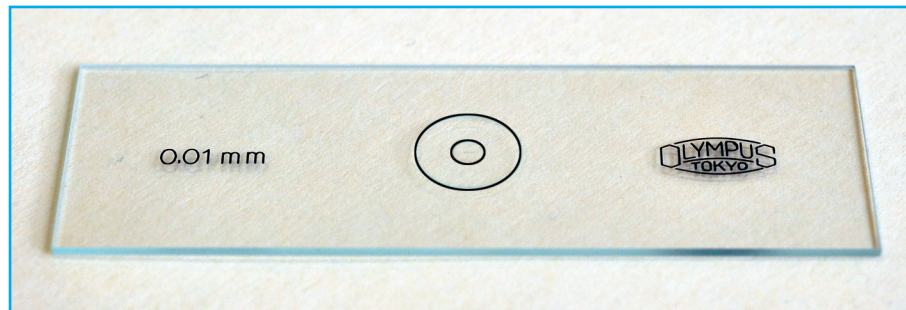


Figura 2. Portaobjetos que contiene la reglilla micrométrica.

Midiendo la escala arbitraria del ocular micrométrico (Figura 1) con la de la reglilla micrométrica (de longitud conocida) (Figura 3a), se determina cuánto mide cada una de las divisiones del ocular micrométrico.

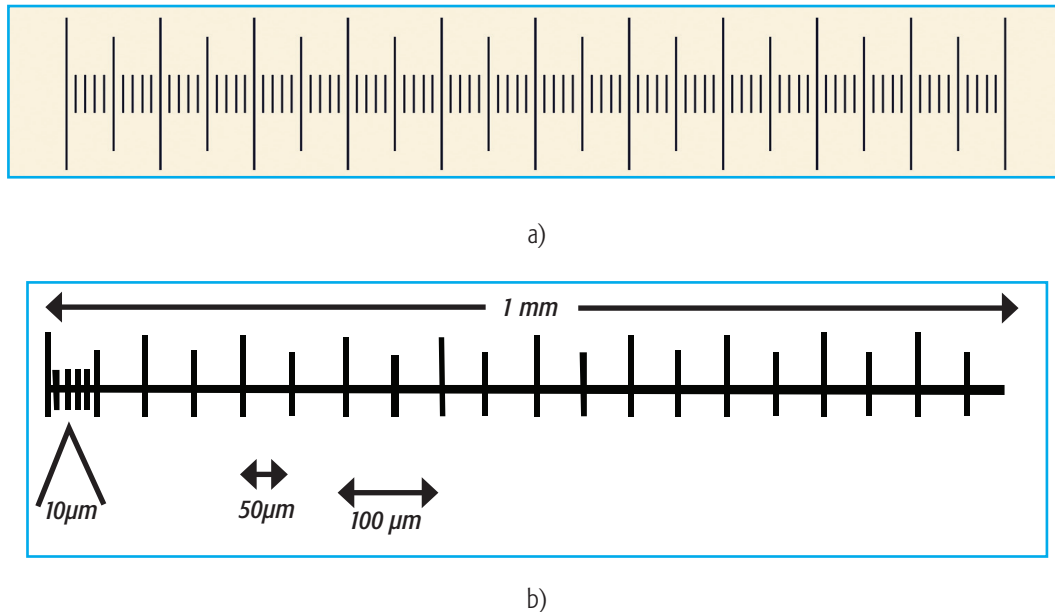


Figura 3. Reglilla micrométrica: a) vista al microscopio; b) unidades de medida.

Objetivo

Aprender a medir muestras observadas al microscopio.

Material

Proporcionado por el laboratorista:

Microscopio de campo claro, ocular micrométrico

Reglilla micrométrica

1 vidrio de reloj

Papel seda

Lanceta, algodón

Pipeta Pasteur

2 ml de solución isotónica de NaCl al 0.9%

2 ml de azul de metileno al 0.2%

Una preparación fija

Piseta con etanol.

Proporcionado por el alumno:

Portaobjetos

Cubreobjetos

Hisopillos

Una navaja

Elodea

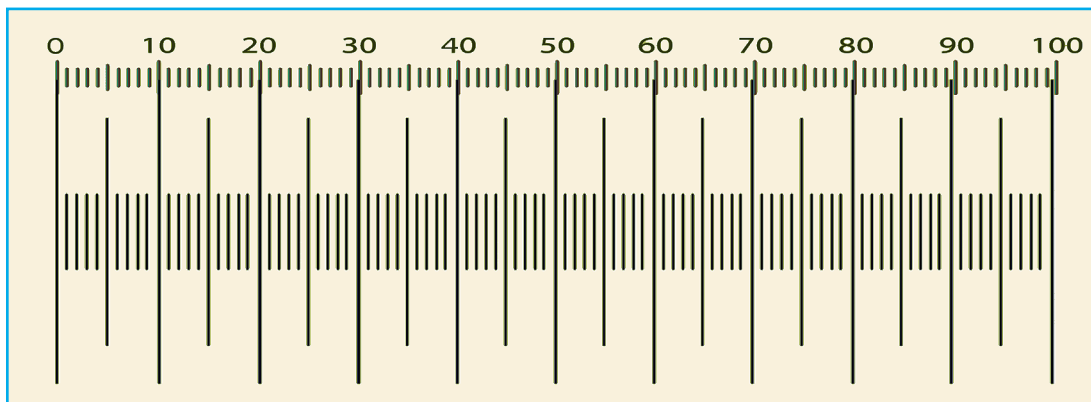
Una cebolla.

Método

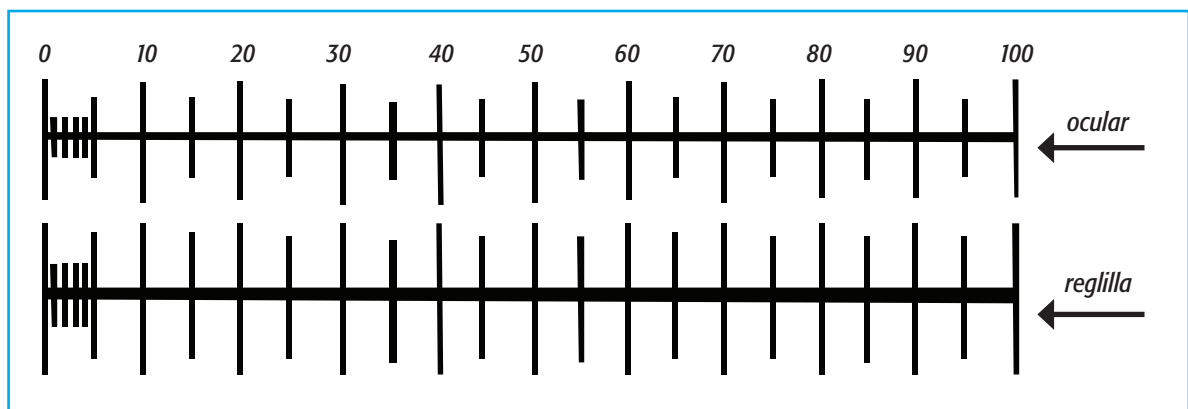
I.- Realice la iluminación de Köhler (como se indica en la Práctica 1).

II.- Realice la calibración de la reglilla del ocular:

1. Limpie cuidadosamente con papel seda el ocular micrométrico y la reglilla micrométrica.
2. Retire la preparación fija que se usó para realizar la iluminación Köhler y coloque en su lugar la reglilla micrométrica (Figura 1).
3. Enfoque con el objetivo de 10X y centre la escala grabada, la cual se observará como se muestra en la Figura 3a. La escala consta de 100 divisiones de 10 μm cada una (Figura 3b).
4. Retire uno de los oculares del microscopio (colóquelo en la mesa, teniendo cuidado que no se ruede) y en su lugar coloque el ocular micrométrico, cuya escala se observará como se muestra en la Figura 1. La escala consta de 100 divisiones arbitrarias.
5. Haga coincidir exactamente la primera de las divisiones del ocular micrométrico con la primera de las marcas de la reglilla micrométrica como se aprecia en la Figura 4a.



a)



b)

Figura 4. Ambas escalas micrométricas: a) vistas al microscopio; b) esquematizadas.

6. Observe detenidamente las dos escalas y determine cuál división del ocular micrométrico coincide con una división de la reglilla micrométrica. Si hay varias divisiones que coinciden, se escogerá la más alejada del cero.
7. Calcule mediante una regla de tres simple cuánto mide cada una de las divisiones del ocular micrométrico de la siguiente manera:

núm. divisiones ocular micrométrico _____ μm reglilla micrométrica

una división ocular micrométrico _____ x μm

Ejemplo: Si 80 divisiones del ocular micrométrico coinciden con la marca 900 μm de la reglilla micrométrica, entonces a cuántos micrómetros corresponderá una sola división del ocular. Esto es:

$$\begin{array}{l} 80 \text{ divisiones} \text{ --- } 900 \mu\text{m} \\ 1 \text{ división} \text{ --- } x \mu\text{m} \\ 900 \times 1 = 900 / 80 = 11 \mu\text{m} \end{array}$$

Por lo tanto, una división mide 11 μm al observar con el objetivo de 10X.

8. Enfoque la reglilla micrométrica usando el objetivo de 40X y repita desde el paso 5 hasta el 7.

Ejemplo: Si 95 divisiones del ocular micrométrico coinciden con la marca 500 μm de la reglilla micrométrica, entonces una división a cuántos μm equivale:

$$\begin{array}{l} 95 \text{ divisiones} \text{ --- } 500 \mu\text{m} \\ 1 \text{ división} \text{ --- } x \mu\text{m} \\ 500 \times 1 = 500 / 95 = 5 \mu\text{m} \end{array}$$

Por lo tanto, una división equivale a 5 μm al observar con el objetivo de 40X.

9. Una vez calibrado el microscopio, retire y guarde cuidadosamente la reglilla micrométrica.
10. Con el ocular micrométrico realice mediciones de diferentes tipos celulares con los objetivos de 10X y 40X. Mida el largo, ancho, diámetro, etc.

III.- Preparaciones en fresco

Realice y observe las siguientes preparaciones:

1. Con un hisopillo raspe la superficie interna de la mejilla y frótelo sobre un portaobjetos perfectamente limpio, agregue una gota de azul de metileno al 0.2% y coloque el cubreobjetos. Observe al microscopio con el objetivo de 10X y el de 40X. Mida el diámetro de una célula y de su núcleo.
2. Desprenda un fragmento de epidermis de cebolla, deposítelo en el portaobjetos cuidando que quede completamente extendido, agregue una gota de azul de metileno al 0.2%, coloque el cubreobjetos. Observe con el objetivo de 10X y 40X. Mida el largo y ancho de una célula.
3. Coloque una hoja de *Elodea* en un portaobjetos, agregue una gota de agua y coloque el cubreobjetos. Observe con el objetivo de 10X y 40X. Mida el largo y ancho de una célula y el diámetro de un cloroplasto.
4. Pique la yema de cualquiera de sus dedos con una lanceta estéril, coloque una gota de sangre en un vidrio de reloj que contenga 2 ml de solución de NaCl al 0.9%. Coloque una gota de la suspensión celular en un portaobjetos y posteriormente coloque un cubreobjetos, observe al microscopio a 10X, 40X y 100X en contraste de fases. Si su preparación empieza a secarse, coloque una gota de NaCl al 0.9% por los bordes del cubreobjetos.

Resultados

1. Esquematice todas sus observaciones indicando las mediciones realizadas en cada caso.
2. Incluya en el reporte todos los cálculos efectuados.




Con base en sus resultados y tomando como guía los siguientes enunciados, redacte la discusión de la práctica:

1. ¿Cuál es la importancia de la calibración en el microscopio?
2. Al observar una misma célula a 10X y a 40X. ¿Hay variaciones en cuanto a sus medidas? Si las hay, ¿a qué pueden deberse?
3. ¿Puede calibrarse el microscopio para observar muestras con el objetivo de 100X o cualquier otro objetivo diferente a los de 10X y 40X? ¿De qué forma se haría?
4. Investigue las medidas de los cloroplastos y de los eritrocitos reportadas en la bibliografía. Compárelas con las obtenidas en esta práctica. Si hay diferencias entre las mediciones, o si no las hay, comente a qué puede deberse.

Conclusiones

Con base en sus resultados y discusión, indique cuáles serían las conclusiones de esta práctica.

Bibliografía

-  Barrera-Escorcia, H., Cárdenas-Reygadas, R. 1997. *El Microscopio Óptico*. Plaza y Valdés Editores. México D.F.
-  Karp, G. 2009. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. McGraw-Hill/Interamericana. México.
-  Keller, E., Goldman, D. R. 2006. Light Microscopy. En: *Basic Methods in Microscopy . Protocols and Concepts from Cells: A Laboratory Manual*. Spector D, Goldman RD eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.

Práctica 4

Permeabilidad membranal

Introducción

La célula, para llevar al cabo sus funciones vitales, requiere de un intercambio constante de materia y energía con su entorno. Para esto, las moléculas, requieren atravesar la membrana que la recubre.

La membrana plasmática, por el tipo de moléculas que la componen, es de naturaleza no polar. Las moléculas no polares tendrán libre paso a través de ella, dependiendo de su grado de solubilidad en lípidos y de su tamaño; a mayor liposolubilidad, la penetración es más rápida. Una molécula debe satisfacer dos condiciones para difundir al interior de una célula a través de la membrana plasmática: Debe estar presente en concentración más elevada fuera de la célula, y la membrana debe ser permeable a ella. Una membrana puede ser permeable a un soluto determinado porque pasa directamente a través de la bicapa de lípidos, o porque es capaz de atravesar un poro situado en el espesor de la membrana que impide el contacto del soluto con las moléculas lipídicas de la bicapa.

Otro factor que determina la velocidad de penetración de un compuesto a través de una membrana, es su tamaño. Las moléculas de menor tamaño tienden a penetrar en la bicapa de lípidos de una membrana con mayor rapidez en comparación con la molécula más grande. Las moléculas de agua se desplazan con mucha mayor rapidez a través de una membrana celular que los iones y pequeños solutos polares comúnmente presentes en las células. Debido a esta diferencia de penetrabilidad del agua en comparación con solutos se dice que las membranas son semipermeables.

El agua se mueve rápidamente a través de una membrana semipermeable desde una región de baja concentración hasta otra de alta concentración de soluto. Este proceso se denomina ósmosis y puede demostrarse fácilmente colocando la célula en una solución con una concentración de soluto diferente de la presente en el interior de ella.

Cuando se colocan las células en una solución con una concentración salina similar a la de su medio (isotónica), la concentración de agua permanece constante dentro y fuera de la célula, por lo que su volumen y forma no se alteran. Los eritrocitos humanos pueden conservarse por largos periodos en una solución de cloruro de sodio al 0.9% sin presentar alteración ni hemólisis.

Cuando las células son colocadas en soluciones de menor concentración de soluto que la propia (hipotónicas), el agua tiende a pasar hacia donde está la mayor concentración, dando lugar a que las células se hinchen. Por otra parte, cuando se colocan en soluciones de mayor concentración de soluto que la de ellas (hipertónicas), el agua tiende a salir ocasionando la contracción celular.

En las células vegetales, la presencia de una pared celular rígida, les ayuda a evitar un incremento excesivo de volumen ante soluciones hipotónicas, sin embargo, en soluciones hipertónicas, sí se puede apreciar la contracción del citoplasma por la pérdida de agua.

Objetivo

Observar el comportamiento de las células vegetales y animales frente a soluciones con diferente concentración de soluto. En la segunda parte de la práctica se observará el fenómeno de la permeabilidad en una membrana artificial.

Hipótesis

Con base en la introducción y los objetivos, plantee la o las hipótesis de trabajo.

Material

Proporcionado por el laboratorista a cada equipo:

1 vaso de precipitado de 500 ml
1 microscopio de campo claro
1 vidrio de reloj
Papel seda
Lanceta
3 pipetas Pasteur
5 ml de las soluciones de NaCl 0.15 M (0.9%)
0.075 M, y 0.3 M
2 ml de fenolftaleína
2 ml de lugol
15 ml de solución de almidón con hidróxido de amonio
Piseta con etanol
Una preparación fija
Papel celofán dulce.

Proporcionado por el alumno:

Etiquetas adheribles
Hilo
Portaobjetos
Cubreobjetos
Elodea, algodón
Regla graduada en cm.

Por sección:

1 vaso de precipitado de 2 litros
Parrilla de calentamiento
Varilla de vidrio
Tijeras.

NOTAS:

- a) Tenga cuidado de utilizar la pipeta correspondiente para cada solución y de no confundirlas, de hacerlo, se alterará la concentración de las soluciones.
- b) Etiquete debidamente los portaobjetos para evitar confusiones en sus observaciones y resultados.
- c) Evite la desecación de sus preparaciones.

Método

I.- Estudio microscópico

1. Haga la iluminación de Köhler utilizando una preparación fija.
2. Con una lanceta estéril pique la yema de cualquiera de sus dedos y deposite una gota de sangre en un vidrio de reloj perfectamente limpio y etiquetado que contenga 2 ml de la solución de NaCl 0.15 M (0.9%), deje reposar un minuto. Con ayuda de una pipeta Pasteur coloque una gota de esta suspensión celular en un portaobjetos, después coloque el cubreobjetos y observe. Enfoque con el objetivo de 10X y pase al objetivo de 40X para hacer sus observaciones.
3. Repetir el mismo procedimiento con la solución de NaCl 0.075 M, y con la de 0.3 M.
4. En un vidrio de reloj que contenga 2 ml de la solución de cloruro de sodio 0.15 M, deposite una hoja de elodea, déjela reposar de 2 a 3 min. Coloque la hoja en un portaobjetos, cúbrala con el cubreobjetos y observe al microscopio a 10X y 40X. Ponga atención en el movimiento de los cloroplastos.
5. Repita el paso anterior con las otras dos concentraciones.

II.- Estudio macroscópico con una membrana artificial

1. Por sección: En un vaso de precipitado coloque 2 litros agua de la llave, ponga en él un cuadro de papel celofán de 20 x 20 cm por equipo y hiérvalo por 15 minutos (Figura 1). Sáquelo y déjelo enfriar.

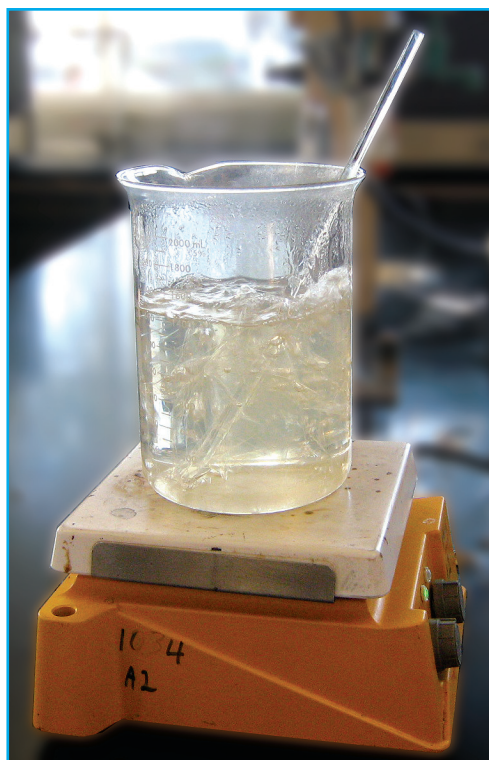


Figura 1. Vaso de precipitados conteniendo los cuadros de papel celofán.

2. Una todas las orillas del papel celofán y coloque en su interior 15 ml de la solución de almidón con hidróxido de amonio y amárralo con hilo de tal manera que la bolsa que se forma quede perfectamente cerrada (Figura 2).

3. Enjuague la bolsa con agua de la llave.
4. Agite la bolsa dentro de un vaso de precipitado de 500 ml que contenga agua de la llave y 5 gotas de fenolftaleína durante 5 minutos. Observe si cambia el color del agua.
5. Abra la bolsa y agregue 4 gotas de la solución de lugol, observe si aparece color.

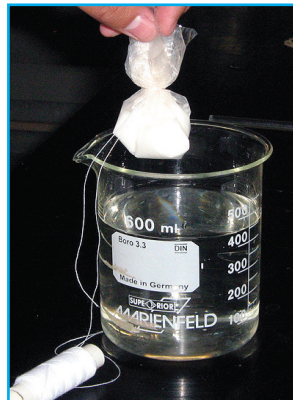


Figura 2. Bolsa de celofán que contiene la solución de almidón con hidróxido de amonio.

6. Agregue 4 gotas de lugol al agua del vaso de precipitado y compare con la coloración observada en el punto anterior.

Resultados

1. Esquematice el comportamiento de las células vegetales y animales frente a las concentraciones de NaCl.
2. De acuerdo en las observaciones, llene la siguiente tabla:

Muestra	Molaridad	Tipo de solución	Observaciones
Eritrocitos	0.075 M/L		
	0.15 M/L	Isotónica	
	0.3 M/L		
Elodea	0.075 M/L		
	0.15 M/L		
	0.3 M/L		





Con base en sus resultados y tomando como guía los siguientes enunciados, redacte la discusión de la práctica:

1. Diga qué propósito tiene colocar las células en una solución isotónica.
2. ¿Qué diferencias observó entre las células animales y vegetales en presencia de la solución hipotónica? Explique la causa.
3. ¿Qué efecto observó en las células al colocarlas en una solución hipertónica?
4. De las sustancias utilizadas (almidón, hidróxido de amonio y fenolftaleína), diga cuál(es) atravesaron la membrana de celofán y cómo se demostró esto. Diga cuáles no atravesaron y a qué se debe.
5. Si los resultados obtenidos en su práctica no fueron los esperados, explique a qué pudo deberse.

Conclusiones

Con base en sus resultados y discusión, indique cuáles serían las conclusiones de esta práctica.

Bibliografía

-  Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. 2004. *Biología Molecular de la Célula*. Omega. España.
-  Becker, W. M., Kleinsmith, L. J., Hardin, J. 2006. *El Mundo de la Célula*. Pearson-Addison Wesley, México.
-  Karp, G. 2009. *Biología Celular y Molecular: conceptos y experimentos*. McGraw Hill. México.
-  Lodish, H., Beerk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. 2002. *Biología Celular y Molecular*. Médica Panamericana. México.

Práctica 5

Actividad enzimática de los peroxisomas en células vegetales y animales

Introducción

Los peroxisomas están presentes en todas las células animales y en muchas células vegetales, su forma es esférica u ovoide, tienen una membrana simple altamente permeable y una matriz granulosa. Su diámetro es de 0.2 a 1.0 μm . Los peroxisomas se consideran organelos especializados en llevar al cabo reacciones oxidativas ya que contienen varias enzimas oxidativas.

En los peroxisomas se realizan dos tipos de reacciones enzimáticas, en el primer paso están involucradas las flavinoxidases que catalizan reacciones de oxidación de algún sustrato usando oxígeno molecular y formando como producto peróxido de hidrógeno (H_2O_2) el cual puede ser utilizado a su vez para oxidar diversos sustratos como ácido fórmico, formaldehído y alcohol.



En caso de baja concentración de estos sustratos se acumula el peróxido de hidrógeno, que es un metabolito altamente citotóxico y cuya eliminación corresponde a una segunda reacción en la cual interviene la catalasa.



En los peroxisomas tanto de células animales como vegetales se llevan al cabo las dos reacciones anteriores. En los vegetales, existen dos tipos de peroxisomas uno de ellos se encuentra en las hojas e interviene en la fotorrespiración, el otro tipo se encuentra en las semillas en germinación y participa en el ciclo del glioxilato durante la gluconeogénesis por lo que se denomina glioxisoma, en este proceso los ácidos grasos son convertidos en precursores de la glucosa.

Objetivo

Medir y comparar la actividad enzimática de los peroxisomas de células animales (corazón e hígado) y células vegetales (apio y rábano).

Hipótesis

Con base en la introducción y los objetivos, plantee la o las hipótesis de trabajo.

Material

Proporcionado por el laboratorista a cada equipo:

Gradilla

4 tubos de ensayo (revisar que el tapón del manómetro sea de la medida adecuada para los tubos de ensayo)

2 pipetas de 5 ml

Agua destilada

Termómetro

Manómetro

20 ml de solución de azul de metileno al 2%

balanza granataria

Papel para sellar (parafilm).

Proporcionado por el alumno:

Agua oxigenada

Navaja

Papel milimétrico

Cinta adhesiva

Regla graduada en milímetros

Apio, rábano

Corazón e hígado de pollo

Las muestras biológicas deben estar frescas.

NOTAS:

- a) Coloque la muestra en el tubo correspondiente en el momento de iniciar su medición.
- b) Mida el diámetro del tubo del manómetro que utilizó y anótelo.

Método

1. Coloque en cuatro tubos de ensayo 2 ml de agua oxigenada y 8 ml de agua destilada. Registre la temperatura en uno de ellos y anótelos.
2. Monte un dispositivo como el de la Figura 1.

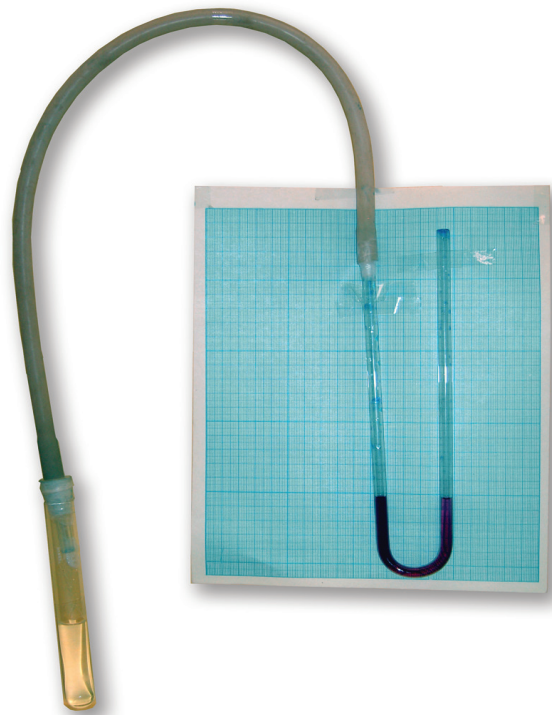


Figura 1. Manómetro.

3. Al primer tubo agregue un trozo de tallo de apio de 1 g y realice las lecturas. Procure que el trozo sea compacto, no lo fragmente. Tape el tubo, selle con parafilm cuidadosamente todas las uniones para evitar fugas y mida la producción de oxígeno por elevación de la solución coloreada en el brazo del manómetro que no está conectado a la manguera. Marque el punto inicial en el papel milimétrico inmediatamente después de taponar el tubo. Efectúe 10 mediciones a intervalos de 10 seg.
4. Siga el mismo procedimiento descrito en el punto tres, colocando antes de hacer las lecturas en el segundo tubo un trozo de 1 g de rábano, y en el tercero y cuarto 1 g de hígado y corazón respectivamente. Debido a que la velocidad de reacción en los tejidos animales es mayor, se sugiere hacer las mediciones con intervalos de 10 seg para los tejidos vegetales y de 5 seg para los tejidos animales.

Resultados

1. Calcule el total de moles de oxígeno producidos para cada muestra con la siguiente fórmula:

$$PV = nRT$$

Despejando para obtener número de moles:

$$n = PV / RT$$

donde:

$$V = \text{Volumen} \quad V = \pi r^2 h$$

r = Radio (del tubo del manómetro)

h = Altura máxima alcanzada por la solución coloreada (ver última medición en la tabla del punto 2)

P = Presión atmosférica $P = 0.769 \text{ atm}$ en el D.F.

R = Constante universal de los gases $R = 82 \text{ atm cm}^3 / \text{mol } ^\circ\text{K}$

T = Temperatura absoluta ($^\circ\text{K}$) $T = ^\circ\text{C} + 273$

n = Moles

2. Llene la siguiente tabla con los datos obtenidos de las mediciones realizadas:

x = Tiempo en segundos $y = \text{Altura en mm}$

Apio		Rábano		Hígado		Corazón	
x	y	x	y	x	y	x	y
10		10		5		5	
20		20		10		10	
30		30		15		15	
40		40		20		20	
50		50		25		25	
60		60		30		30	
70		70		35		35	
80		80		40		40	
90		90		45		45	
100		100		50		50	

3. Grafique tiempo contra distancia (los datos de la tabla del punto 2) en un solo papel milimétrico (con un color diferente para cada muestra).
4. Al graficar los datos obtenidos de manera experimental observará que estos siguen una distribución semejante a una línea recta, sin embargo, dado que seguramente no se ajustan en su totalidad a ella, se utiliza el método de mínimos cuadrados, el que permite con los datos obtenidos calcular una ecuación con la que se calculan los valores teóricos, que se ajustarán en forma perfecta a una recta. Además, la ecuación permitirá calcular puntos intermedios (interpolación) o externos (extrapolación) a los medidos experimentalmente. Para aplicar el método de mínimos cuadrados es necesario

que de inicio llene la siguiente tabla con los datos obtenidos experimentalmente para cada muestra, y que calcule los valores que se le solicitan:

x = Tiempo en segundos y = Altura en mm

Apio

N	x	y	xy	x ²
1	10			
2	20			
3	30			
4	40			
5	50			
6	60			
7	70			
8	80			
9	90			
10	100			
N = 10	Σx = 550	Σy	Σxy	Σx ²

5.- Utilizando los datos de la tabla anterior substituya en las siguientes ecuaciones los valores calculados:

$$m = \frac{N \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{N \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

m = Pendiente

N = Número de datos

$$b = \frac{\sum y}{N} - m \frac{\sum x}{N}$$

b = Ordenada al origen

El valor de la pendiente (m) es una estimación de la velocidad con la que ocurre cierto fenómeno, en esta práctica indicará la velocidad con la que se produce oxígeno al reaccionar la catalasa de los peroxisomas con el peróxido de hidrógeno.

Finalmente para obtener la ecuación de la recta substituya los valores de m y b obtenidos en la siguiente ecuación:

$$y = mx + b$$

6. Utilizando la ecuación de la recta obtenida en el punto anterior para cada una de las muestras, obtenga los valores teóricos de "y" substituyendo cada uno de los valores de "x" que utilizó durante el desarrollo de la práctica y grafique estos valores teóricos en el mismo papel con los valores experimentales (gráfica del punto 3) para compararlos. Analice sus resultados comparando las pendientes obtenidas en las diferentes muestras.





Con base en sus resultados y tomando como guía los siguientes enunciados, redacte la discusión de la práctica:

1. Explique a qué se debe la diferencia en cuanto al desprendimiento de oxígeno en los tejidos estudiados: Para definir en qué muestras se desprendió mayor cantidad de oxígeno, utilice el número de moles producidos en cada una de ellas.
2. ¿Podría el valor de la pendiente indicar en qué muestras se desprende más oxígeno?
3. Explique la utilidad del método de mínimos cuadrados en estudios biológicos.
4. En la gráfica, ¿Qué diferencias observó entre los valores teóricos y los experimentales? ¿A qué se deben estas diferencias?

Conclusiones

Con base en sus resultados y discusión, indique cuáles serían las conclusiones de esta práctica.

Bibliografía

-  Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. 2004. *Biología Molecular de la Célula*. Omega. España.
-  Becker, W. M., Kleinsmith, L. J., Hardin, J. 2006. *El Mundo de la Célula*. Pearson-Addison Wesley, México.
-  Karp, G. 2009. *Biología Celular y Molecular: conceptos y experimentos*. McGraw Hill. México.
-  Lodish, H., Beerk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. 2002. *Biología Celular y Molecular*. Médica Panamericana. México.

Práctica 6

Actividad respiratoria en mitocondria: efecto de un inhibidor y de un desacoplante

Introducción

Las células requieren energía para llevar al cabo sus funciones vitales. El proceso fundamental mediante el cual la obtienen es la respiración, que se realiza en la mitocondria. En dicho organelo se presenta un sistema complejo de enzimas que catalizan la oxidación de moléculas orgánicas, durante este proceso se sintetizan moléculas altamente energéticas (ATP, GTP).

En condiciones aerobias el proceso respiratorio consta de tres etapas: La primera, que se realiza en el citoplasma, consiste en la degradación de polisacáridos, lípidos y proteínas hasta piruvato, ácidos grasos y aminoácidos, respectivamente. En la matriz mitocondrial se realiza la segunda etapa que comprende el ciclo de Krebs durante el cual se oxida la molécula de acetil CoA a CO_2 y se transfieren electrones a los transportadores NAD^+ y FAD , que se integran a la tercera etapa conocida como cadena respiratoria o transporte de electrones, la cual se efectúa en la membrana interna de la mitocondria y acoplada a ella se encuentra la fosforilación del ADP para formar ATP (fosforilación oxidativa).

Experimentalmente la fosforilación oxidativa puede ser desacoplada por ciertas sustancias como el 2,4-Dinitrofenol (2,4-DNP), de tal modo que el transporte de electrones continúe, pero no así la fosforilación del ADP, en estas condiciones se activa el proceso respiratorio. Así mismo, se ha encontrado que otras sustancias como el cianuro inhiben el transporte de electrones y con esto la fosforilación del ADP, provocando que se detenga el proceso respiratorio.

Objetivo

Observar la variación de la cantidad de CO_2 producido por levaduras por la adición de un inhibidor de la cadena respiratoria y un desacoplante de la fosforilación oxidativa.

Hipótesis

Con base en la introducción y los objetivos, plantee la o las hipótesis de trabajo.

Material

proporcionado por el laboratorista a cada equipo:

Manómetro
3 tubos de ensayo
Vórtex
Gradilla
Una pipeta de 5 ml
3 pipetas Pasteur
Espátula
2 ml de cianuro de potasio 0.5 M
2 ml de 2,4-DNP 0.3 M
20 ml de solución de azul de metileno
Sacarosa en polvo
Papel para sellar (parafilm).

Proporcionado por el alumno:

3 hojas de papel milimétrico
Un paquete de levadura seca activa
Tela adhesiva
Regla graduada en milímetros.

Por sección:

Parrilla de calentamiento
Vaso de precipitado de 500 ml
Balanza granataria
Termómetro.

Método

1. Numere los tubos del 1 al 3 y agréguelos en el momento de usarse 1 g de sacarosa, 0.5 g de levadura y 5 ml de agua a 45°C. Mezcle perfectamente el contenido de los tubos con una pipeta Pasteur, la misma puede utilizarse para los tres tubos.
2. El tubo 1, por ser el control, sólo contendrá lo indicado en el punto anterior. Al tubo 2 agréguele 20 gotas de cianuro de potasio y al tubo 3, adiciónale 8 gotas de 2,4-DNP. Use una pipeta Pasteur diferente para cada solución, use cada una de las pipetas para mezclar.

Maneje estas dos soluciones con sumo cuidado, ya que son altamente tóxicas. Lávese las manos inmediatamente después de haberlas utilizado.

3. Monte el manómetro de la misma manera que en la práctica anterior.
4. Conecte el tubo 1 al manómetro, el cual debe contener la solución coloreada (recuerde sellar las uniones con parafilm).
5. Efectúe 10 mediciones a intervalos iguales de acuerdo a la velocidad de la reacción (se sugiere tomarlas cada 10 seg). Utilice el mismo intervalo de tiempo para los otros dos tubos.

NOTA: Mida el diámetro del manómetro que utilizó y anótelo.

Resultados

1. Calcule el total de moles de CO₂ producidos para cada muestra con la siguiente fórmula:

$$PV = nRT$$

Despejando para obtener número de moles:

$$n = PV / RT$$

donde:

$$V = \text{Volumen} \quad V = \pi r^2 h$$

r = Radio (del tubo del manómetro)

h = Altura máxima alcanzada por la solución coloreada (ver última medición en la tabla del punto 1)

P = Presión atmosférica $P = 0.769 \text{ atm}$ en el D.F.

R = Constante universal de los gases $R = 82 \text{ atm cm}^3 / \text{mol } ^\circ\text{K}$

T = Temperatura absoluta ($^\circ\text{K}$) $T = ^\circ\text{C} + 273$

n = Moles

2. En la práctica anterior se utilizó el procedimiento manual para calcular la ecuación de la recta de los datos de cada muestra analizada, en esta práctica se debe calcular la ecuación de la recta

$$y = mx + b$$

utilizando el programa Excel, para lo que se requiere siga los siguientes pasos:

- a) Abra una hoja nueva de Excel.

- b) En la columna A coloque los valores de x (Tiempo en segundos) y en las siguientes columnas los valores que obtuvo de las lecturas de cada muestra, póngale los nombres correspondientes a cada columna (Tiempo, Control, Cianuro, 2-4 DNP).
- c) Marque todas las lecturas incluyendo los encabezados.
- d) En la Barra de Herramientas, de clic en el asistente para gráficos.
- e) Haga una gráfica de líneas, anote el título de la gráfica y el nombre de las variables graficadas en cada eje.
- f) Para obtener la línea de tendencia, coloque el cursor sobre una de las líneas graficadas, cianuro por ejemplo, y haga clic con el botón derecho, señale línea de tendencia, aquí dé clic en opciones y escoja Presentar Ecuación en el Gráfico y para finalizar elija Aceptar.
- g) La ecuación obtenida para cada muestra, presenta los siguientes valores:

$$y = mx + b$$

Donde la m corresponde al valor de la pendiente y b el valor de la ordenada al origen. Imprima la gráfica con las ecuaciones de cada recta e interprete los resultados, considerando los valores de la pendiente.

Analice si es que hay alguna relación entre el valor de la pendiente y el número de moles CO₂ producidos en cada muestra.




Con base en sus resultados y tomando como guía los siguientes enunciados redacte la discusión de la práctica:

1. Explique los resultados obtenidos en cuanto a producción de CO₂ en cada una de las tres muestras. Considere el número de moles de CO₂ calculados para cada una de ellas y el valor de la pendiente de las ecuaciones de la recta que calculó para cada muestra.
2. Explique por qué el bloqueo de la cadena respiratoria, inducido por el cianuro de potasio, o el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa inducido por el 2-4-DNP, los podemos evidenciar por la formación de un producto del ciclo de Krebs.
3. Explique qué respuesta obtendría si en vez de cuantificar producción de CO₂ cuantificara consumo de O₂ al usar el inhibidor o el desacoplante?

Conclusiones

Con base en sus resultados y discusión, indique cuáles serían las conclusiones de esta práctica.

Bibliografía

-  Becker, W. M., Kleinsmith, L. J., Hardin, J. 2006. *El Mundo de la Célula*. Pearson-Addison Wesley, México.
-  Karp, G. 2009. *Biología Celular y Molecular: conceptos y experimentos*. McGraw Hill. México.
-  Lodish, H., Beerk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. 2002. *Biología Celular y Molecular*. Médica Panamericana. México.

Práctica 7

Mitosis

Introducción

La capacidad de reproducción es fundamental para la existencia, propagación y continuación de las células. Este proceso forma parte de su ciclo de vida y es denominado ciclo celular, el cual es un conjunto muy ordenado de eventos y comprende esencialmente dos periodos: la interfase y la división.

En general, la mayor parte del tiempo del ciclo corresponde a la interfase y esta se ha dividido en diferentes etapas que son: fase G1 S y G2. Además, en diversos tipos celulares se ha descrito una fase "quiescente" o durmiente en la cual las células no proliferan, se le considera "fuera del ciclo" y se le conoce como G0 (G cero). La otra etapa del ciclo corresponde a la división, la cual se realiza por mitosis en todas las células somáticas y por meiosis en las células germinales.

La mitosis es un proceso continuo, pero ciertos acontecimientos durante ella permiten identificar cuatro etapas que se describen de manera breve a continuación y se representan en la Figura 1.

La Profase se caracteriza por la condensación gradual de la cromatina para formar los cromosomas, los cuales se aprecian al microscopio como estructuras en forma de filamentos.

En la Metafase los cromosomas ya condensados se agrupan en un plano equidistante de los polos del huso.

Durante la Anafase las cromátidas de los cromosomas emigran hacia los polos.

En la Telofase las cromátidas se agrupan en los polos donde comienzan nuevamente a descondensarse.

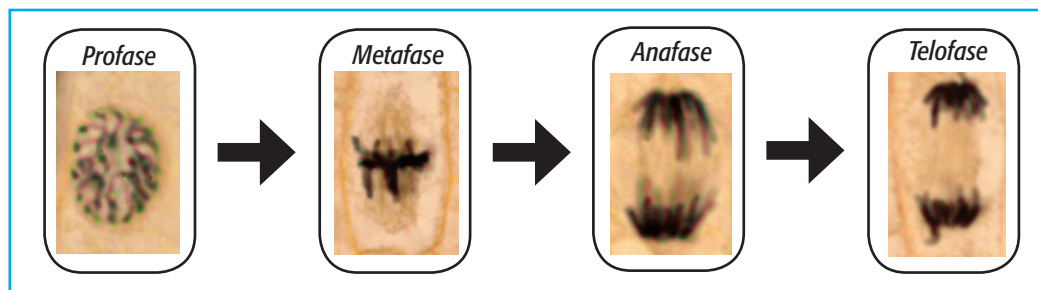


Figura 1. Células en las diferentes fases de en mitosis.

Durante la mitosis es necesaria la presencia del huso mitótico que asegura la segregación y emigración adecuada de los cromosomas, ciertas sustancias como la colchicina, son capaces de inhibir la formación del huso mitótico, dando como consecuencia que la división se detenga en la etapa de metafase.

Existen diversas metodologías para el estudio de la mitosis, entre las que se encuentran la microscopía de fluorescencia y la microscopía electrónica

Objetivo

Identificar las diferentes fases de la mitosis en células meristemáticas de raíz de cebolla y observar el efecto de un agente mitostático.

Hipótesis

Con base en la introducción y los objetivos, plantee la o las hipótesis de trabajo.

Material

Proporcionado por el laboratorista a cada equipo:

- 4 vidrios de reloj
- 1 mechero
- 1 microscopio de campo claro
- 1 pinza de disección
- 1 aguja de disección
- 2 pipetas graduadas de 5 ml
- 3 ml de colchicina al 0.1%
- 40 ml de acetorceína.

Proporcionado por el alumno:

- 2 cebollas con raicillas nuevas y frescas
- Navaja
- Cubreobjetos y portaobjetos
- Etiquetas adheribles
- Lápiz con goma.

Método

1. Una semana antes de realizar esta práctica, coloque una cebolla en un frasco como se aprecia en la figura 2.

Cambie el agua del frasco cada 24 hrs. Al transportar la cebolla cuide de no maltratar las raicillas.



Figura 2. Procedimiento para obtener raíces de la cebolla.

2. Saque la cebolla del agua y corte la punta de las raicillas que aparecen más oscuras (2 mm de largo aproximadamente), divida las raicillas en dos lotes de trabajo.

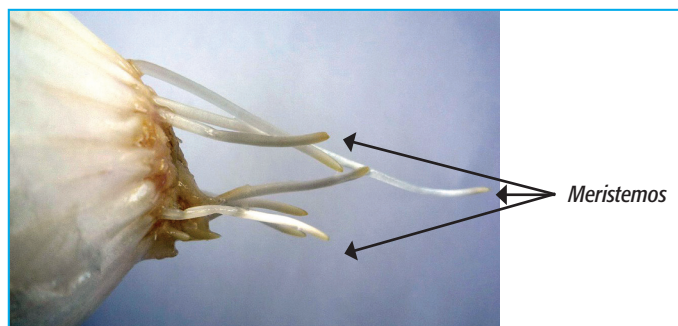


Figura 3. Raicillas/Meristemos.

- a) Coloque el primer lote en un vidrio de reloj que contenga 3 ml de colchicina al 0.1%, manténgalas sumergidas durante 1 hora.
- b) Coloque el segundo lote en un vidrio de reloj que contenga 3 ml de agua destilada durante el mismo tiempo y en las mismas condiciones, este servirá como testigo.

3. En un vidrio de reloj limpio deposite las raicillas tratadas con colchicina y en otro las del lote testigo, etiquetándolos para no confundirse.
4. Cubra las raicillas de ambos vidrios con acetorceína, agregue 4 ml de colorante con la pipeta graduada.
5. Caliente con el mechero a flama suave (se ve de color azul) hasta que empiecen a salir los primeros vapores. Evite quemar las raicillas.
6. Si observa que el volumen de acetorceína disminuye quedando las raicillas casi secas, añada unas gotas de colorante para evitar que se quemen. Deje enfriar.
7. Repita dos veces más los pasos 5 y 6. Adicione 4 ml de colorante en cada calentamiento.
8. Tome una raicilla, deposítela en un portaobjetos limpio y etiquetado.
9. Agregue una gota de acetorceína.
10. Coloque el cubreobjetos.
11. Presione con la goma de un lápiz girando el cubreobjetos.
12. Limpie el exceso de colorante.
13. Enfoque con el objetivo de 40X y determine el índice mitótico en ambos lotes.

Resultados

1. Para calcular el índice mitótico observe al microscopio y revise 100 células de cada lote, anotando de estas cuántas están en mitosis.
2. Substituya sus datos en la siguiente fórmula:

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

3. Compare el índice mitótico obtenido en el lote con colchicina y en el lote sin colchicina. Comente sus resultados.
4. Realice un esquema de un núcleo en interfase y de las cuatro diferentes etapas de las mitosis observadas durante la práctica.

Con base en sus resultados y tomando como guía los siguientes enunciados, redacte la discusión de la práctica:

1. ¿Qué diferencias observó en el índice mitótico y en el número de metafases, entre las raicillas del lote testigo y las tratadas con colchicina? Explicar a que se deben estas diferencias.
2. Indique cuál es la acción de un agente mitógeno y de uno mitostático. Dé ejemplos de ambos.
3. Defina cuál es la importancia de la meiosis y de la mitosis y en qué tipo de células se realizan.
4. Mencione los eventos que se llevan a cabo en cada fase del ciclo celular (interfase y división).

En la Figura 4 se muestra una fotografía en la que se advierten diferentes etapas de la mitosis.

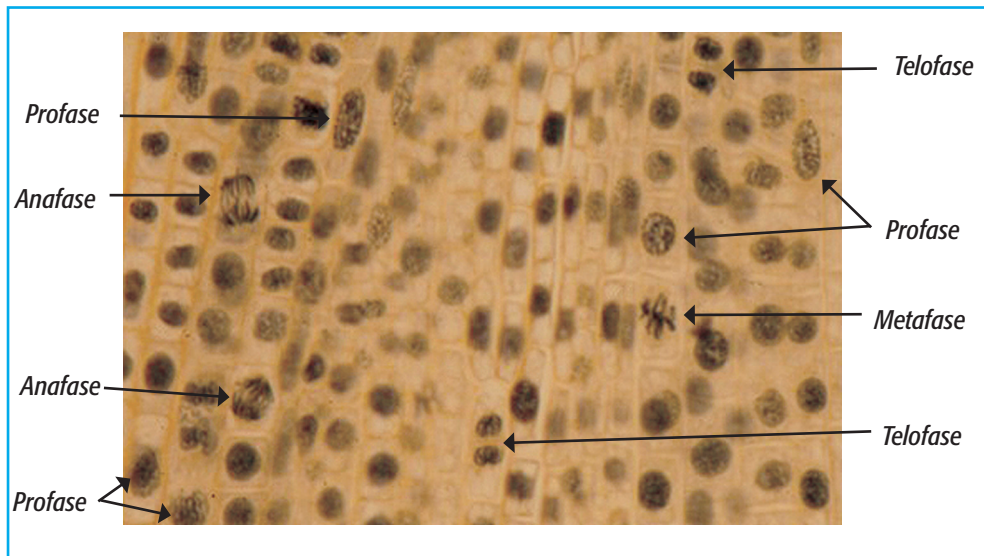


Figura 4. Fotografía de células en las diferentes fases de la mitosis.




NOTA:

Se agradece al Maestro Eduardo Casas de la UAM-I, su ayuda en la obtención de las fotografías de las mitosis.

Conclusiones

Con base en sus resultados y discusión, indique cuáles serían las conclusiones de esta práctica.

Bibliografía

-  Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. 2004. *Biología Molecular de la Célula*. Omega. España. Se sugiere revisar los siguientes vínculos:
Figura 9-14 Multiple-fluorescent-probe microscopy. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26880/figure/A1740/?report=objectonly>
Figura 18-8 The course of mitosis in a typical animal cell. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26931/figure/A3346/?report=objectonly>
-  Karp, G. 2009. *Biología Celular y Molecular: conceptos y experimentos*. McGraw Hill. México.
-  Segura-Valdez, M. L., Cruz-Gómez, S.J., López-Cruz, R., Zavala, G.I., Jiménez-García, L.F. 2008. Visualización de la mitosis con el microscopio de fuerza atómica. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 11: 87-90. Disponible en Internet: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=43211934003>

Apéndice

Soluciones empleadas en las Prácticas de laboratorio

Acetorceína

Calentar a ebullición 55 ml de ácido acético, agregar 2 g de orceína y dejar hervir de 7 a 10 min, dejar enfriar totalmente y agregar 55 ml de agua destilada. Filtrar y mezclar 90 ml de esta solución con 10 ml de HCl 1N.

Almidón con amoniaco

Pesar 100 g de almidón y agregarlos a 450 ml de agua destilada. Adicionar 50 ml de amoniaco.

Azul de metileno 0.2%

Disolver 0.2 g de azul de metileno en 100 ml de agua destilada y agregar 0.5 g de NaCl.

Bicarbonato de sodio 1%

Pesar 1 g de bicarbonato de sodio y en un matraz aforar el volumen a 100 ml con agua destilada.

Cianuro de potasio 0.5 M

Disolver 3.3 g de cianuro de potasio en 100 ml de agua destilada. Solo se deben preparar pequeñas cantidades, ya que la solución se descompone con facilidad. Precaución: la solución es extremadamente venenosa.

Cloruro de sodio 0.075 M

Disolver 2.2 g de NaCl en 500 ml de agua destilada.

Cloruro de sodio 0.15 M (0.9%)

Disolver 4.4 g de NaCl en 500 ml de agua destilada.

Cloruro de sodio 0.3 M

Disolver 8.8 g de NaCl en 500 ml de agua destilada.

Colchicina 0.1%

Pesar 0.1 g de colchicina y aforar a 100 ml con agua destilada.

2,4-dinitrofenol 0.3 M

Pesar 6.4 g de 2,4-DNP y aforar a 100 ml con agua destilada. Manéjese con cuidado pues es altamente tóxico.

Fenolftaleína 1%

Pesar 1 g de fenolftaleína y disolver en 50 ml de alcohol etílico, aforar a 100 ml con agua destilada.

Formol 5%

Agregar 5 ml de formol a 95 ml de agua destilada.

Lugol (Solución de Yodo)

Disolver 1 g de yodo y 2 g de yoduro de potasio en 25 ml de agua destilada, cuando se haya disuelto completamente agregar 75 ml de agua destilada para obtener 100 ml.

Safranina 1%

Disolver 1 g de safranina en 100 ml de agua destilada.

Manual de prácticas de laboratorio. Biología celular

Se terminó de imprimir en julio de 2012,
con un tiraje de 200 ejemplares, más sobrantes para reposición.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Av. San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina
C.P.09340
Del. Iztapalapa México D.F.
Tel (01) 58044600