



Universidad de la República
Facultad de Ciencias
Uruguay



Curso Práctico de Biología Celular

Actividades prácticas

2016

Cuestionario Guía

- 1.- Escriba la ecuación de Abbe y explique brevemente su significado.
- 2.- Explique brevemente el concepto de apertura numérica.
- 3.- Explique la diferencia entre resolución y aumento.
- 4.- Identifique en el diagrama adjunto:

estativo (pie, brazo)	diafragma del condensador
fuente de luz	tornillo de enfoque del condensador
condensador	sistema de sujeción y movimiento del preparado en la platina
objetivos	revólver porta objetivos
tubo	tornillos de enfoque del tubo (macrométrico, micrométrico)
ocular	



Parte A: Cada estudiante dispondrá de un microscopio de luz o fotónico con el que trabajará durante todo el práctico.

1.- a) Registre los aumentos (X) y las aperturas numéricas (AN) de las lentes objetivas instaladas en su microscopio.

Objetivos:

Aumento (x)	Apertura numérica (AN)

b) Registre el aumento de los oculares instalados en su microscopio.

Aumento de los oculares: _____

2.- En condiciones de observación con luz verde ($\lambda = 550 \text{ nm}$) y usando la ecuación de Abbe, indique el mejor límite de resolución (LR) obtenible con su microscopio. Explícite los cálculos realizados.

3.- Indique el valor del aumento total máximo obtenible con su microscopio. Explícite los cálculos realizados.

4.- Siguiendo estrictamente los pasos descritos en el apéndice 1 de la Guía del Estudiante, enfocar y observar a distintos aumentos al menos un preparado histológico que le proporcionará el docente. **Dibuje lo observado indicando: el tejido observado, la tinción del preparado y el aumento total correspondiente:**

Parte B: Observación de micrografías y ejercicios

Compare las principales diferencias entre las características de las imágenes observadas en las micrografías y las que ud. observa en los microscopios del laboratorio de clase.

1.- Observe las micrografías obtenidas mediante distintas técnicas microscópicas: contraste interferencial de Nomarski, contraste de fases, epifluorescencia convencional y de láser confocal.

Indique **una aplicación** de cada una de las técnicas mediante un ejemplo:

i) Microscopía óptica (m.o) de campo claro:

ii) Microscopía óptica de contraste de fases y m.o de contraste interferencial de Nomarski:

iii) Microscopía óptica de fluorescencia y microscopía óptica de láser confocal:

2) ¿Es posible resolver dos estructuras que se encuentran a una distancia de $0,35 \mu\text{m}$ utilizando una lente objetiva con una apertura numérica de 1 y luz de 600 nm ? Justifique brevemente.

3) El tamaño de las mitocondrias de una célula en cultivo es de 300 nm . ¿Podrá observarla utilizando una lente objetiva de $60 \times$ con una AN de $1,40$ y luz verde? Justifique brevemente.

4) Indique el tipo de microscopía que utilizaría para resolver las siguientes situaciones experimentales:

- Resolver la organización general de un tejido
- Observar el fenómeno de migración de una población de fibroblastos
- Observar una división celular en tiempo real
- Determinar la localización intracelular de una proteína

Parte C: Análisis y discusión de resultados experimentales publicados en artículos científicos.

El material será proporcionado por el docente en la clase práctica.

Cuestionario guía

- 1.- Describa en forma concisa cómo se generan las imágenes en un microscopio electrónico de transmisión.

- 2.- ¿Qué quiere decir el término electrón-lúcido? Explique brevemente y compare con el concepto de electrón-denso.

- 3.- ¿Es posible observar preparados *in vivo* mediante microscopía electrónica? Justifique su respuesta.

- 4.- Con el microscopio electrónico es posible obtener límites de resolución menores que con el microscopio de luz. Explique brevemente por qué.

- 5.- ¿Qué tipo de información brinda el microscopio electrónico de barrido? ¿Y el microscopio electrónico de transmisión?

Parte A: Realización de medidas de longitud celular y diámetro nuclear de células de catáfila de cebolla

Con el fin de familiarizarse con el uso de los controles del microscopio, usted preparará y observará materiales montados en medio líquido, de acuerdo a las instrucciones del docente.

Calibración del micrómetro ocular

1.- Utilizando la información contenida en la guía del estudiante y las instrucciones del docente, calibre su micrómetro ocular

Aumento del objetivo (\times)	Longitud de las divisiones (μm)

2.- Se realiza la calibración de una reglilla ocular para una lente objetiva de $40\times$ y se obtiene un valor de $25\ \mu\text{m}$ para cada unidad de la reglilla. ¿Cuál será el valor aproximado de la unidad de la reglilla ocular para las lentes de $10\times$ y de $100\times$ del mismo microscopio? Explícite los cálculos realizados.

Preparación de catáfila de cebolla coloreada con verde de metilo:

- 1.- Cortar un pequeño trozo ($5\times 5\ \text{mm}$) de catáfila de cebolla con un bisturí.
- 2.- Desprender el epitelio superficial con una pinza y colocarlo sobre un cubreobjetos.
- 3.- Colocar sobre él una gota de solución de verde de metilo.
- 4.- Dejar colorear por uno o dos minutos.
- 5.- Colocar un cubreobjetos y secar el exceso de colorante.

6.- Siguiendo estrictamente los pasos descritos en el apéndice 1 de la guía del estudiante, enfocar y observar a distintos aumentos.

7.- Completar el siguiente cuadro con SUS datos experimentales:

	Largo celular (UA) Aumento:	Largo celular (μm)	Diámetro nuclear (UA) Aumento:	Diámetro nuclear (μm)
Promedio				
Desvío estándar				

Largo celular

Diámetro nuclear

Parte B: Análisis de micrografías electrónicas

Observe que las micrografías utilizadas en clase tienen una barra que indica la escala de las mismas.

1.- Observe las micrografías electrónicas de transmisión, identificando las imágenes de cortes ultrafinos y réplicas de criofractura. En las imágenes de cortes ultrafinos, identifique estructuras electrón-densas y electrón-lúcidas.

2.- Observe las micrografías electrónicas de barrido, comparándolas con las imágenes de microscopía electrónica de transmisión y de microscopía de luz.

3.- Determine las medidas de longitud en micrografías indicando en cada caso el parámetro que mide (ej. diámetro, largo, espesor, etc.).

i) Plancha N° Estructura:.....
 La estructura mide..... μm .

ii) Plancha N° Estructura:.....
 La estructura mide..... μm .

4.- Indique, según corresponda, qué técnica y qué tipo de microscopio electrónico emplearía para resolver los siguientes problemas:

i) Comparar ornamentaciones de granos de polen de diferentes plantas

Técnica

Microscopio

ii) Visualización de filamentos intermedios en el citoplasma celular

Técnica

Microscopio

iii) Distribución de poros sobre la superficie de la envoltura nuclear

Técnica

Microscopio

iv) Visualización de moléculas de ADN aisladas

Técnica

Microscopio

Parte C: **Medición digital y barras de calibración utilizando software de código abierto**

Se le proporcionarán imágenes digitales, en las que deberá realizar mediciones y agregar barras de escala. Recuerde guardar las imágenes procesadas en la carpeta correspondiente a SU grupo.

1.- Abra el programa ImageJ y una imagen de la carpeta “Medir”. Recuerde el aumento del objetivo con el que fue obtenida la imagen.

2.- Utilizando el manual práctico que ud. posee en la guía del estudiante, mida y registre:

i) Imagen que eligió

ii) Largo de la célula Aumento:

iii) Ancho de la célula Aumento:

iv) Diámetro nuclear Aumento:

3.- Agregue a la imagen una barra de calibración con una escala apropiada y guarde el archivo EN LA CARPETA CORRESPONDIENTE A SU GRUPO con la primera letra de su nombre de pila y su apellido (ej. Mariana Perez guardará el archivo como mperez.tiff).

4.- ¿Por qué considera ud. que es imprescindible que al momento de presentar sus resultados sus micrografías posean una barra de calibración?

Parte D: **Análisis y discusión de resultados experimentales publicados en artículos científicos.** El material será proporcionado por el docente en la clase práctica.

Cuestionario guía

1.- Expresar la presión osmótica en términos de la ley de van't Hoff. Justifique brevemente.

2.- ¿Qué es la osmolaridad? (Definición conceptual)

3.- Describa de forma breve en qué consiste la regla de Overton

4.- Indique con una flecha hacia dónde se producirá el flujo neto de agua en los siguientes ejemplos.

Justifique brevemente.

i)

0,1 M glucosa	0,1 M glucosa
------------------	------------------

ii)

1g glucosa MW=180 g/mol	1g sacarosa MW=342 g/mol
----------------------------	-----------------------------

iii)

100 mM NaCl MW=58 g/mol	100 mM glucosa MW=180 g/mol
----------------------------	--------------------------------

5.- El etanol (C_2H_5OH) es un alcohol que difunde rápidamente a través de la membrana plasmática.

a) ¿Por qué?

b) ¿Es osmóticamente activo? Justifique brevemente.

6.- ¿En qué se basa el método de determinación de la viabilidad celular con el colorante azul Tripán?

7. Estudio de la viabilidad celular

En el experimento que se muestra a continuación, cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata fueron tratados con distintas drogas y luego se evaluó su efecto en la viabilidad celular con el método del azul tripán. Los cultivos fueron contrateñidos con fucsina básica (tinción nuclear).

1) Calcule el índice de viabilidad para cada uno de los cultivos ($IV = n^{\circ}$ células no marcadas con azul tripán/número de células totales).

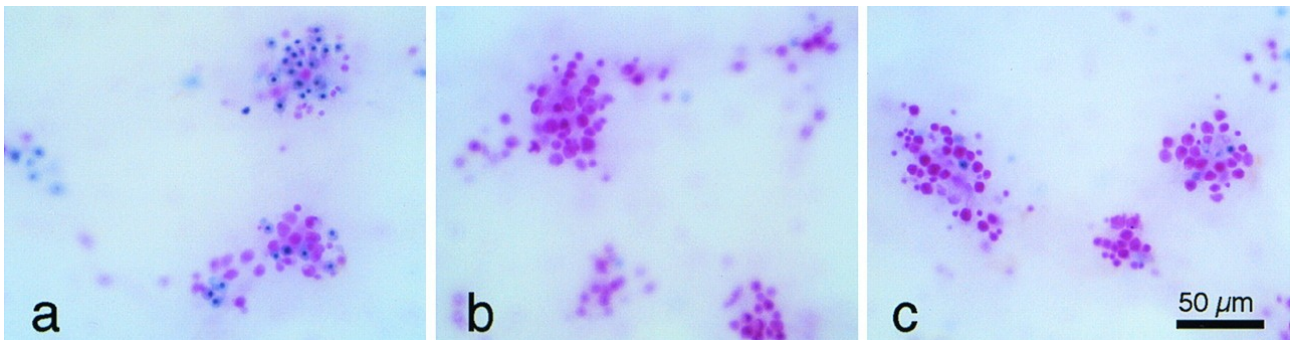
a _____

b _____

c _____

2) De acuerdo a los resultados expresados en 1), indique cuál de los tratamientos realizados resulta más tóxico para las células.

ATENCIÓN: VER IMAGEN EN COLORES (EVA)



(tomado de Murray et al., 1998. PNAS 95, 11975-11980)

- ¿Cuál será el resultado del índice de viabilidad si la tinción con azul tripán se realiza luego de fijar los cultivos? Justifique brevemente.
- ¿Qué mecanismo está alterado en las células azul tripán positivas?

Parte A: **Células y ósmosis**

Morfología normal de eritrocitos y hoja de *Elodea* sp.

- 1.- Corte una hoja de *Elodea* sp. y monte entre porta y cubreobjetos utilizando agua de su medio.
- 2.- Tome una gota de sangre y monte entre porta y cubreobjetos siguiendo las instrucciones del docente.
- 3.- Observe al microscopio.

Comportamiento de las células vegetales frente a soluciones con diferente concentración de solutos

- 1.- Sobre 3 portaobjetos coloque hojas de *Elodea* y adicione soluciones 0,3 M y 1 M de sacarosa, y agua destilada, respectivamente.
- 2.- Luego de 10 minutos coloque el cubreobjetos y observe al microscopio.
- 3.- Desmonte la hoja que había sido expuesta a la solución de sacarosa 1 M cuidando de retirar con papel absorbente el resto de solución 1 M.
- 4.- Enjuagar con agua destilada.
- 5.- Agregue 2 gotas de agua destilada.
- 6.- Luego de 10 minutos, vuelva a colocar un cubreobjetos limpio y observe al microscopio.

Comportamiento de células animales (eritrocitos) frente a soluciones de diferente concentración.

¡ATENCIÓN! Todas las manipulaciones con sangre deben realizarse con guantes y el descarte de material biológico debe realizarse en los contenedores con hipoclorito de sodio.

- 1.- Tome 3 tubos de ensayo y rotule: agua destilada, 0,3 M, 1 M.
- 2.- En cada uno de ellos coloque 100 μ L de la suspensión de sangre.
- 3.- Agregar según corresponda al rótulo del tubo 500 μ L de agua destilada, sacarosa 0,3 M o sacarosa 1 M.
- 4.- Mezclar, esperar como mínimo 5 minutos y observar lo que sucede.
- 5.- Tome una muestra de cada uno y realice un montaje para observar al microscopio.

6.- Determine cuál de las soluciones es isotónica para las células. _____

¿Cuál será la concentración, en molaridad, de NaCl de una solución de suero fisiológico?

Nótese que una vez que se ha identificado la solución isotónica, se puede inferir la osmolaridad del fluido intracelular de los eritrocitos. Como las células mantienen su forma indefinidamente en esta solución, se puede asumir que la osmolaridad es la misma que la del plasma sanguíneo.

Realice esquemas representando lo observado en las preparaciones de sangre ovina y *Elodea* en condiciones fisiológicas y frente a diferentes concentraciones de sacarosa. **Señale las estructuras esquematizadas e indique cómo se denomina el proceso observado según corresponda.**

<i>Elodea sp</i>	Eritrocitos
Condiciones fisiológicas	Condiciones fisiológicas
sacarosa 1 M	sacarosa 1 M
sacarosa 0,3 M	sacarosa 0,3 M
agua destilada	agua destilada

1) Describa brevemente los cambios observados en las células de *Elodea* luego de sustituir la solución hipertónica por agua destilada.

2) ¿Cómo se denomina ese fenómeno?

3) Describa brevemente las diferencias **macroscópicas** observadas en los experimentos realizados "in tubo" con los eritrocitos.

4) ¿Cómo relaciona la observación **macroscópica "in tubo"** de los eritrocitos incubados con agua destilada y con 1,0 M de sacarosa con la observación **microscópica** de las mismas muestras?

5) ¿Hay diferencias entre el comportamiento de las células de *Elodea* y los eritrocitos al incubarlos en agua destilada? ¿A qué puede deberse esta diferencia?

6) ¿Qué estructura subcelular está involucrada en los cambios que ocurren en las células de *Elodea* ante una variación en la concentración de solutos en el medio?

Parte B: Permeabilidad de membrana: efecto del tamaño molecular y la polaridad

Para estudiar los efectos del tamaño molecular y la polaridad del soluto, se colocará una suspensión de eritrocitos en soluciones isotónicas de varios alcoholes.

Comportamiento de los eritrocitos frente a alcoholes de 3 carbonos con distinto grado de polaridad

- 1.- Rotule 2 tubos de ensayo: isopropanol y glicerol
- 2.- En cada uno de ellos coloque 100 µL de la suspensión de sangre
- 3.- Agregue 500 µL de la solución de isopropanol o glicerol, según corresponda

4.- Tape el tubo y mezcle por inversión, observe durante 5 minutos

5.- Describa brevemente lo que observa macroscópicamente a tiempo cero y luego de 25 minutos

6.- Discusión

En el protocolo experimental se expone una suspensión celular a una concentración isotónica de un alcohol en agua. Considerando que la membrana plasmática es permeable al alcohol:

i) ¿qué ocurrirá con el alcohol?

ii) ¿qué ocurrirá con el flujo neto de agua?

iii) Considere la regla de Overton ¿Cómo relaciona el comportamiento de los eritrocitos frente a moléculas permeables con distinto grado de polaridad?

iv) ¿Qué ocurrirá si el isopropanol está disuelto en sacarosa 0,3 M? ¿y el glicerol?

Cuestionario guía

- 1.- ¿Qué niveles de compactación de la cromatina conoce? Mencione un caso extremo de compactación de la misma.

- 2.- Mencione las principales características de la envoltura nuclear y explique por qué NO es apropiado denominarla membrana nuclear.

- 3.- Se sospecha la presencia de una proteína estructural particular en los complejos de poro nuclear. Describa brevemente una estrategia para verificarlo.

- 4.- Enumere los principales pasos del fraccionamiento subcelular, y explique brevemente en qué consisten.

- 5.- Enumere los eventos que tienen lugar en el nucleolo.

Parte A: Reacción de Feulgen – Rossenbeck

I) Reacción de Feulgen sobre macromoléculas en solución: validación del método.

Prepare los tubos Eppendorf 1, 2 y 3 de acuerdo a la tabla adjunta:

TUBO	1	2	3
Agua destilada	-----	-----	100µL
BSA* (1 mg/mL)	-----	100 µL	-----
ADN (1 mg/mL)	100 µL	-----	-----
HCl (1 N)	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar e incubar 10 minutos a 60°C			
Reactivo de schiff	200 µL	200 µL	200 µL

*BSA = albúmina sérica bovina (proteína)

Dejar 15 min en oscuridad (cubrir con aluminio) a temperatura ambiente

a) ¿Qué tubos elegiría como controles positivo y negativo del experimento? Justifique brevemente su respuesta.

b) Indique si la reacción de Feulgen sobre macromoléculas en solución fue positiva o negativa:

Tubo 1 (ADN)

Tubo 2 (BSA)

Tubo 3 (Agua)

c) ¿Qué control negativo falta en el diseño experimental propuesto?

d) Considerando los resultados obtenidos, ¿puede considerarse útil esta reacción para detectar la presencia de núcleos en una fracción subcelular?

II) Utilización de la reacción de Feulgen para la identificación de una fracción subcelular enriquecida en núcleos

1.-Traspase una gota de la fracción nuclear a un portaobjetos para su observación al microscopio. Utilice el volumen restante para la reacción de Feulgen. Agregue 200 µL de HCl 1 N e incúbelo a 60 °C durante 10 min.

2.- Agregue 600 µL de reactivo de Schiff e incube 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad (envolver el tubo con papel de aluminio).

3.- Equilibre el tubo problema con otro tubo de centrifuga.

4.- Centrifugue durante 1 minuto a 2000 rpm.

5.- Observe el pellet obtenido.

6.- Retire la mayor parte del sobrenadante y resuspenda mediante pipeteo suave la fracción remanente.

7.- Observe la fracción nuclear tratada al microscopio poniendo una gota entre porta y cubreobjeto.

a) ¿Cómo se observa el sedimento luego de centrifugar la fracción tratada con la reacción de Feulgen?
¿A qué se debe?

b) Si al concluir la centrifugación usted observa que el sobrenadante del tubo presenta una coloración rosada: ¿qué podría inferir sobre el estado de los núcleos de la preparación?

III) Reacción de Feulgen sobre cortes histológicos (in situ)

1.- Deparafinar los cortes

2.- Cubra el corte con unas gotas de HCl 1 N durante 20 min a 60 °C (verificar que no se evapore el HCl).

3.- Enjuague brevemente con agua destilada.

4.- Incube el preparado con unas gotas de reactivo de Schiff durante 15 min a temperatura ambiente, manteniéndolo en la oscuridad.

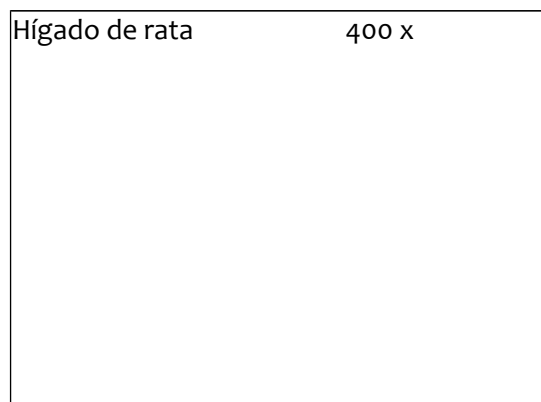
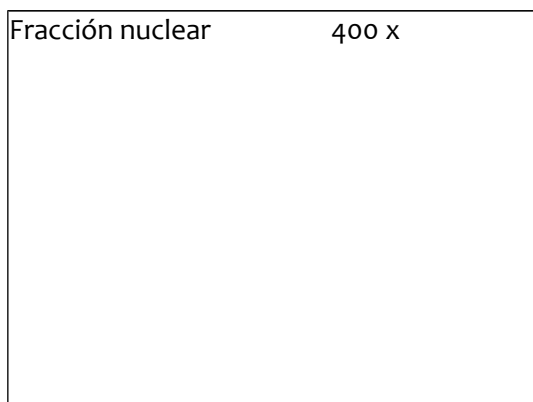
5.- Enjuague con agua destilada.

6.- Tiña el citoplasma con Fast Green 0,08% durante 10 segundos.

7.- Enjuague con agua destilada.

8.- Monte el preparado y observe al microscopio.

9. Realice un esquema de la observación microscópica de la fracción nuclear y del preparado histológico de hígado de rata, sometidos a la reacción de Feulgen.



Parte B: Observación de preparaciones histológicas

1.- Observe a mayor aumento la estructura de los núcleos en los siguientes preparados:

i) *Músculo estriado esquelético (hematoxilina y eosina)*

Observe los núcleos de las fibras musculares, que se ven como grandes células alargadas de citoplasma intensamente eosinófilo.

ii) *Médula espinal, corte transversal (hematoxilina y eosina)*

Busque las motoneuronas en las astas ventrales de la médula, identificables por su gran tamaño y la intensa coloración con hematoxilina del citoplasma. Compare sus núcleos con los de otras células que las rodean.

iii) *Testículo, corte transversal de los túbulos seminíferos (hematoxilina y eosina)*

Identifique las espermátidas maduras y los espermatozoides (muy similares en estructura), como las células de menor tamaño del tejido. Compare sus núcleos con los de otras células que las rodean.

2.- Luego de observar los cortes histológicos coloreados con hematoxilina y eosina, complete los casilleros del siguiente cuadro:

Tipo celular	n° núcleos por célula	forma del núcleo	ubicación del núcleo	estado de la cromatina
<i>Fibra muscular estriada esquelética</i>				
<i>Motoneurona</i>				
<i>Espermátida madura</i>				

Parte C: Observación de micrografías electrónicas

1.- Observe las planchas 1 a 18 y 101 a 107 y discuta con sus compañeros acerca de su contenido.

2.- ¿Cómo se observan, en microscopía electrónica de transmisión, los sectores de cromatina condensada o heterocromatina?

3.- Respecto a plancha 101: ¿cuál de estas células podría tener una mayor actividad de síntesis proteica? ¿En qué basa su respuesta?

4.- De acuerdo a lo observado en la plancha 102: señale dos diferencias entre los núcleos de las células que se observan en las micrografías.

5.- La plancha 105 ilustra la ultraestructura del nucléolo

i) ¿Es el nucleolo una estructura permanente en las células? Justifique su respuesta.

ii) ¿Estas estructuras están más desarrolladas en células con síntesis proteica baja o activa? Justifique brevemente.

iii) ¿Como se denomina la región del cromosoma involucrada en la formación del nucléolo y qué genes contiene?

6.- Considere la plancha 105d. Cuando los nucleolos se disgregan sobre una interfase acuosa, aparecen estas estructuras en forma de “pinos de navidad”, que representan la hebra de ADN y las moléculas de ARNr 45S en diferentes momentos de su transcripción. En cada “pino”, ¿cuáles son las moléculas de ARNr más avanzadas en su síntesis?

7.- ¿Qué técnica microscópica utilizaría para analizar la estructura del poro nuclear?

Parte D: Análisis y discusión de resultados experimentales publicados en artículos científicos.

El material será proporcionado por el docente en la clase práctica

Cuestionario guía

1.- Compare de forma breve las características de las membranas mitocondriales interna y externa.

2.- De las siguientes afirmaciones, señale cuáles son falsas y cuáles verdaderas. Justifique brevemente cada respuesta.

- i. Las mitocondrias se encuentran en todas las células eucariotas.
- ii. A nivel mitocondrial se produce la oxidación de carbohidratos, aminoácidos y ácidos grasos.
- iii. En todas las células eucariotas, la mayor parte del ATP celular es de origen mitocondrial.
- iv. Las mitocondrias presentan intenso dinamismo y plasticidad.
- v. La localización de las mitocondrias en la célula es independiente de la función propia de cada célula.

3.- Explique brevemente qué procesos ocurren en la matriz mitocondrial y qué procesos ocurren en las membranas.

Parte A: Identificación de mitocondrias en una fracción subcelular

Observación de mitocondrias en una fracción subcelular

- a.- Colocar en un tubo eppendorf 20 μ L de la suspensión de mitocondrias concentrada y 20 μ L de solución de verde Jano 0,02%.
- b.- Agitar vigorosamente e incubar 10 min a temperatura ambiente.
- c.- Montar una gota entre porta y cubreobjetos.
- d.- Observar al microscopio.

1.- Realice un diseño experimental que le permita cumplir los objetivos planteados, utilizando para ello los siguientes reactivos:

- Succinato de sodio 0,24 M
- DCPIP 1 mM
- NaN_3 0,05 M*
- Buffer (Tris·HCl-sacarosa-EDTA)
- Agua
- Fracción mitocondrial

2.- Proceda según el siguiente protocolo experimental:

- i) Agitar 2 veces por inversión la suspensión de mitocondrias concentrada.
- ii) Diluir la fracción mitocondrial con 0,4 mL de buffer.
- iii) Numere los tubos y pipetee cada reactivo de acuerdo a lo indicado en el cuadro que Ud. elaboró.

Tubo	Buffer	NaN_3 *	Succin. 0.24 M	DCPIP 1 mM	Agua	Fracción mitocondrial

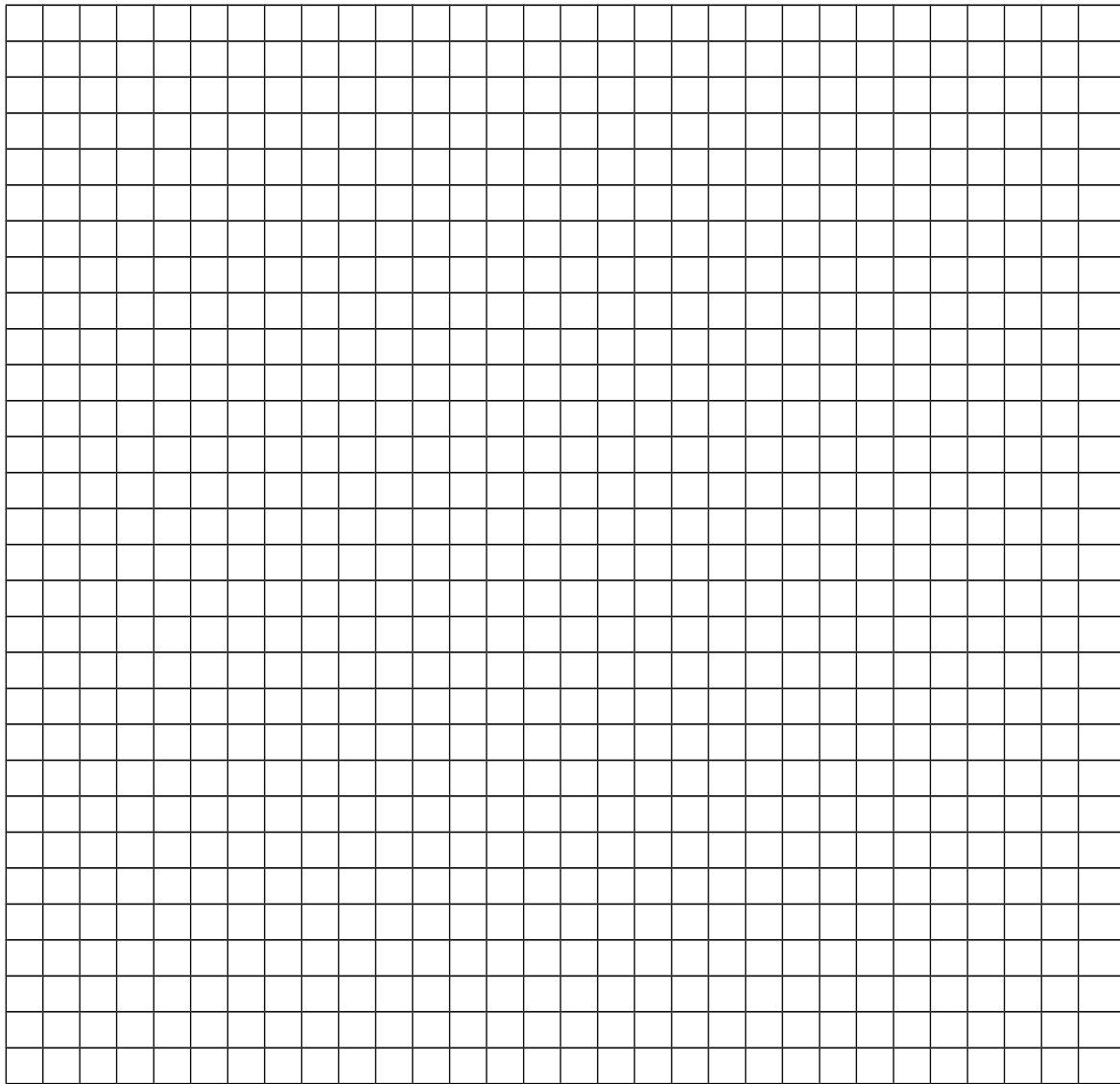
- iv) Ajuste el espectrofotómetro a 600 nm (debe encenderse unos minutos antes de comenzar a medir).
- v) Agite la suspensión de mitocondrias por inversión.
- vi) Ajuste el aparato para llevar la absorbancia a 0, de forma de asegurarse de solo medir la absorbancia del DCPIP.
- vii) Agregue el volumen de la suspensión de mitocondrias que indicará el docente en clase para desencadenar la reacción y agite intensamente.
- viii) El curso de la reacción se seguirá espectrofotométricamente, determinando la absorbancia del DCPIP a diferentes tiempos.
- ix) Mientras se realizan las medidas, los tubos deben ser agitados periódicamente para evitar la sedimentación de la fracción enriquecida en mitocondrias.
- x) ¿Por qué se utiliza agua para ajustar los volúmenes de los diferentes tubos en lugar de buffer?

3.- Registre las medidas de absorbancia a 600 nm en función del tiempo, en la siguiente tabla:

Min Tubo	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
1											
2											
3											

4.- Represente en una gráfica absorbancia vs. tiempo con los valores obtenidos.

absorbancia



TIEMPO (MINUTOS)

5.- ¿Qué indica el cambio de absorbancia del DCPIP observado a lo largo del tiempo? ¿A qué se debe la diferencia en el cambio de absorbancia que hay entre los diferentes tubos?

6.- La actividad enzimática suele expresarse como la pendiente inicial de la gráfica que sigue una reacción enzimática. Usualmente esta gráfica registra la concentración de sustratos o productos en función del tiempo, por lo que la actividad tiene unidades de concentración sobre tiempo. En nuestro caso, la gráfica es de absorbancia (que no tiene unidades) en función de tiempo. En términos de esta gráfica, exprese la actividad de la succinato deshidrogenasa. ¿Qué tubo utilizará para esta determinación? Justifique su respuesta.

7.- ¿Observó algún cambio en las lecturas de absorbancia en el tubo sin succinato de sodio? En caso de responder afirmativamente, ¿a qué puede deberse?

8.- Tomando en consideración únicamente los datos espectrofotométricos, ¿se puede afirmar que hay mitocondrias en la suspensión estudiada?

9.- ¿Puede afirmarse que sólo haya mitocondrias? ¿Cómo confirmaría/descartaría la presencia de otro(s) organelo(s)?

Parte B: Estudio de la ultraestructura de la mitocondria

Para analizar la ultraestructura de la mitocondria, se observarán las planchas de micrografías electrónicas N° 6, 109, 110 y 111.

1.- Mida, en las micrografías, el diámetro mitocondrial y el espesor del espacio intermembrana.

i) Diámetro mayor y menor de la mitocondria: _____

ii) Espesor del espacio intermembrana: _____

2.- A partir de los valores obtenidos en la sección anterior calcule el volumen de una mitocondria aproximando su forma a la de un cilindro.

3.- Observe la micrografía 109C en que se observa el proceso de división mitocondrial. Describa y explique brevemente lo observado.

4.- Teniendo en cuenta lo observado en las plancha 111 A-D (morfología mitocondrial), ¿podría decirse que el esquema que normalmente se utiliza como consenso de la estructura de una mitocondria refleja su morfología real o se trata de una caricatura para facilitar el entendimiento de la compartimentalización funcional (esencialmente bioquímica) de la misma? Justifique brevemente.

Parte C: **Análisis y discusión de resultados experimentales publicados en artículos científicos.**

El material será proporcionado por el docente en la clase práctica

Cuestionario Guía

- 1.- Esquematice el *diagrama Z* de la fotosíntesis, y explique brevemente su significado.

- 2.- Explique de forma sucinta qué son los cromoplastos y los leucoplastos.

- 3.- ¿En qué compartimientos ocurre la fase fotoquímica (luminosa) y la fase bioquímica (oscura) de la fotosíntesis? Justifique brevemente su respuesta.

- 4.- Señale cuál(es) de las siguientes afirmaciones acerca del fotosistema II NO es correcta. Justifique su respuesta.
 - i) Está ubicado en las membranas tilacoidales.
 - ii) Está involucrado en la oxidación de H₂O.
 - iii) Posee una clorofila oxidable: P680.
 - iv) Tiene asociado un complejo de antena para su función de capturar luz.
 - v) Es necesario para la fotofosforilación cíclica.

- 5.- ¿En qué consiste la reacción de Hill?

Parte A: Cromatografía en papel de pigmentos fotosintéticos

- 1.- Cortar en trozos una hoja y macerarla en un mortero con 5 mL de acetona. Filtrar con gasa.
- 2.- Tomar la tira de papel de filtro por el borde y marcar una línea con lápiz a aproximadamente a tres cm de uno de los extremos.
- 3.- A lo largo de la línea marcada, sembrar con un capilar una muestra de la extracción orgánica y dejar secar. Repetir el procedimiento unas 10 veces para concentrar la muestra.
- 4.- Preparar en el momento 8 mL del solvente cromatográfico (éter/acetona, 3:1). Agregarlo con pipeta hasta un nivel intermedio entre el extremo del papel y la línea de siembra.
- 5.- Con una pinza colocar la tira de papel de filtro en la probeta de vidrio. Tapar la probeta con el tapón de gasa y algodón para reducir la evaporación de solventes.
- 6.- Cuidado: cuando el frente de solvente está a unos 0,5 cm del borde del papel, retirar de la probeta con pinza, y antes que el solvente se evapore, marcar con lápiz una línea en el cromatograma que represente el frente de migración.
- 6.- Mientras el solvente se evapora (2-3 min) debe marcarse el punto de mayor migración de cada uno de los pigmentos.
- 7.- Calcular el Rf (Ratio factor) para cada uno de los pigmentos según:

$$R_f = \frac{\text{distancia migrada por el soluto (pigmento)}}{\text{distancia migrada por el solvente}}$$

- 8.- Completar la tabla 1.

Tabla 1. Valores de Rf de pigmentos extraídos con acetona y revelados sobre Whatman 1 con éter de petróleo/acetona como solventes.

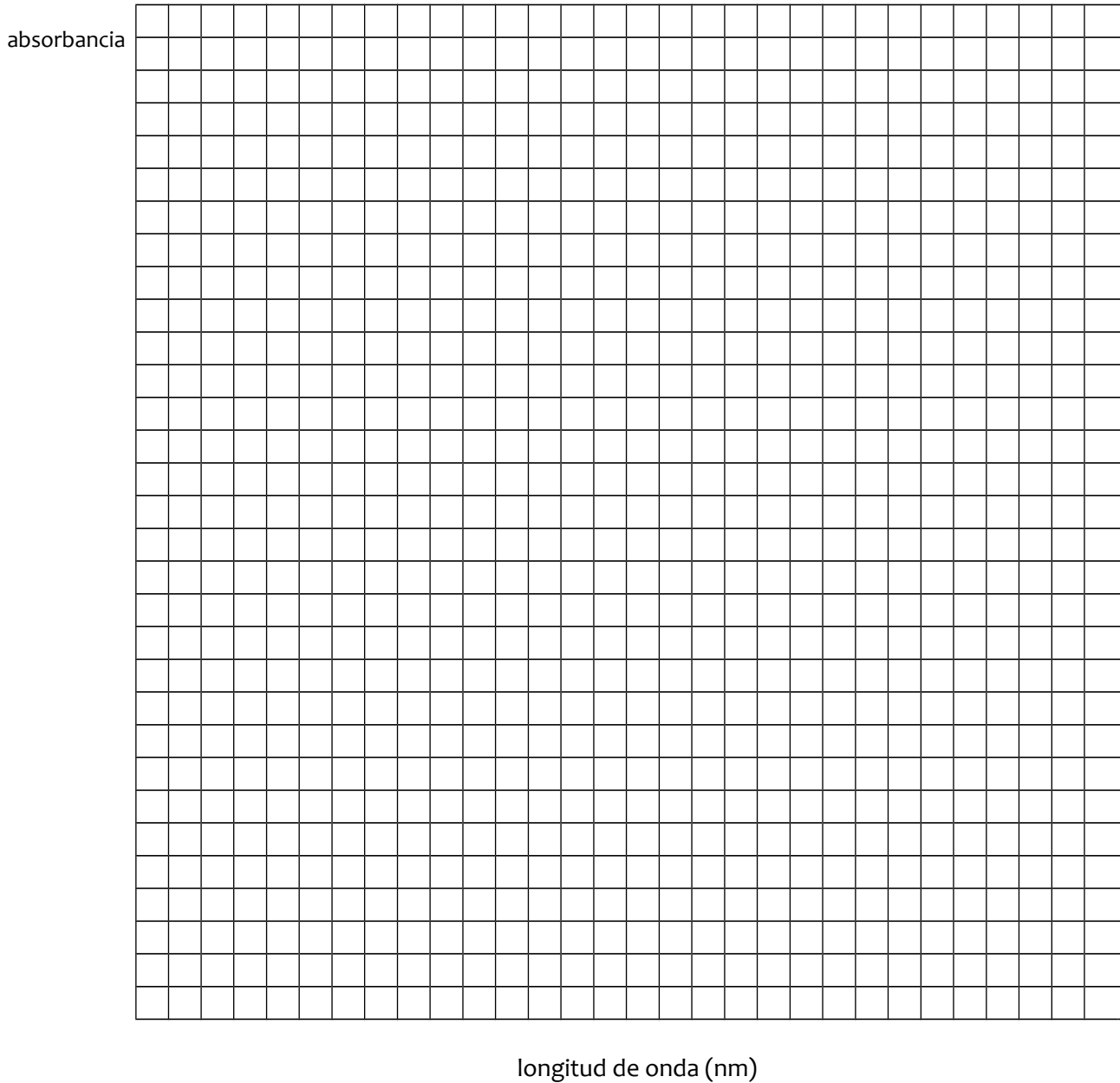
Pigmento	Rf

- 9.- Identificar los pigmentos sabiendo que clorofila a es azul verdoso, clorofila b verde oliva, carotenoides anaranjado-amarillento, y xantofilas amarillo.
- 10.- Eluir los pigmentos de las bandas correspondientes a clorofila a, b, carotenoides y xantofilas recortando las bandas correspondientes y colocándolas en un tubo con 3 mL de acetona 80% durante 5 min.
- 11.- Realizar espectros de absorción ($\lambda = 400 - 700 \text{ nm}$) de los diferentes pigmentos en espectrofotómetro utilizando como blanco acetona 80% (ajustar el blanco para cada longitud de onda medida). Recuerde que si el espectrofotómetro no cuenta con una sonda para lectura de blanco por separado, es decir que se coloca una sola cuba a la vez, debe ajustar el blanco para cada longitud de onda que mida. Utilizar cubas de cuarzo.

Completar la siguiente tabla:

	400 nm	450 nm	500 nm	550 nm	600 nm	650 nm	700 nm
Clorofila a							
Clorofila b							
Carotenoides							
Xantofilas							

12.- Graficar $A = f(\lambda)$



Discusión

i) ¿Cómo se explica el comportamiento de los pigmentos en el cromatograma? Justifique.

- ii) Además del Rf, ¿qué otra característica podría utilizarse para identificar un pigmento desconocido?
- iii) ¿Por qué se utilizan solventes orgánicos en la cromatografía de pigmentos fotosintéticos y no por ejemplo, agua?

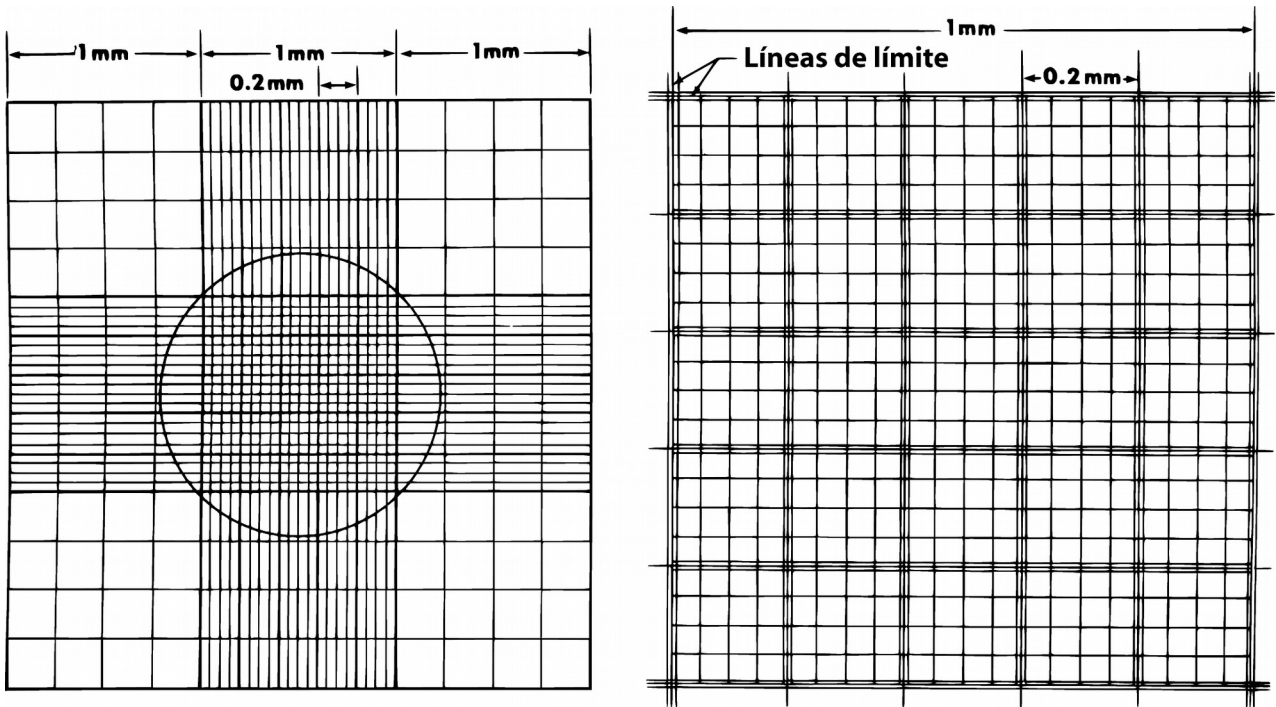
Parte B: Fraccionamiento subcelular y determinación de concentración de pigmentos

Obtención de una fracción subcelular enriquecida en cloroplastos

- 1.- Colocar el mortero en hielo.
- 2.- Cortar las hojas descartando las ramas principales de tejido vascular (para esto es mejor tomar las hojas por el envez).
- 3.- Triturar en mortero con 10 mL de buffer Tris-HCl/NaCl.
- 4.- Filtrar en gasa.
- 5.- Centrifugar a 400 g (50%) a 4 °C por 1 min.
- 6.- Centrifugar el sobrenadante a 1000 g (90%) a 4 °C por 5 min.
- 7.- Resuspender el pellet con 10 mL de buffer.

Determinación de la concentración de cloroplastos en una suspensión

- 1.- Colocar en un tubo de ensayo 4,75 mL de buffer y agregar 0,25 mL de la fracción enriquecida en cloroplastos. Mezclar bien para asegurarse que los cloroplastos están en suspensión.
- 2.- Tomar un hemocitómetro o cámara de Neubauer limpio y seco y colocar el cubreobjetos. Tomar una pequeña porción de la suspensión del tubo con una pipeta Pasteur y cargar el hemocitómetro dejando que la gota de la punta de la pipeta se deslice entre porta y cubre, cuidando que no se sobrecargue y fluya hacia el espacio entre el cubre y los surcos a los lados de la cámara. Si esto ocurriera, limpiar y secar la cámara y finalmente limpiar con un pañuelo de papel con alcohol y volver a comenzar. (El volumen de conteo es de 0,1 μ L).
- 3.- Utilizando el objetivo de 40x, contar el número de cloroplastos en el cuadrado central de la cámara de conteo (el que está separado por un borde triple y que está dividido en 20 grupos de 16 cuadraditos (ver figura)).



Esquema de la grilla del hemocitómetro o cámara de conteo.

4.- Calcular la concentración de cloroplastos en la suspensión diluída. (Se contaron cloroplastos en 10^{-4} mL, así que multiplicando el número por 10^4 se obtiene el número de cloroplastos/mL).

[cloroplastos]_d =

5.- Calcular la concentración de cloroplastos en la suspensión concentrada (fracción).

[cloroplastos]_c =

Determinación de la concentración de pigmentos

1.- Colocar 4,75 mL de acetona 80% en un tubo de ensayo y agregar 0,25 mL de la fracción enriquecida en cloroplastos. Mezclar bien.

2.- Medir la absorbancia a 652 nm utilizando acetona 80% como blanco. Utilizar cubas de cuarzo.

3.- Calcular la concentración de clorofila *a* en la muestra, sabiendo que su absortividad a esta longitud de onda es de $34,5 \text{ (mg/mL)}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.- Calcular la concentración de clorofila *a* en la fracción. _____

5.- Utilizando los datos obtenidos en el apartado anterior, determinar la concentración de clorofila *a* por cloroplasto.

Parte C: Reacción de Hill

1.- Rotular 6 tubos y preparar según el cuadro

Tubo	Buffer pH 7,2 Tris 0,01M NaCl 0,35M	DCPIP* $4 \times 10^{-4}M$	DCMU** $2 \times 10^{-4}M$	Agua
1	3,5 mL	0,5 mL	-	0,5 mL
2	3,5 mL	0,5 mL	-	0,5 mL
3	3,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	-
B (x3)	3,5 mL	-	-	1 mL

2.- Ajustar la longitud de onda del espectrofotómetro a 600 nm

3.-Agregar 0,5 mL de la suspensión de cloroplastos al tubo B, tapar y agitar. Ajustar el espectrofotómetro a 0. Si no fuera posible porque el tubo B queda muy coloreado, agregue 0,3 mL al segundo tubo B. Si aún así no fuera posible, utilizar 0,2 – 0,15 mL en el tercer tubo B.

Envolver el tubo 1 en papel aluminio, agregar la misma cantidad de cloroplastos que al blanco, agitar y medir inmediatamente la absorbancia. Este tubo oficiará de control no iluminado.

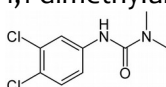
4.- La reacción se desencadena al agregar los cloroplastos y con la exposición a la luz. Agregar la fracción a los tubos 2 y 3, y seguir la reacción midiendo absorbancia a intervalos de 1 min. Completar el cuadro.

min tubo	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1			-	-	-	-	-	-	-	-	
2											
3											

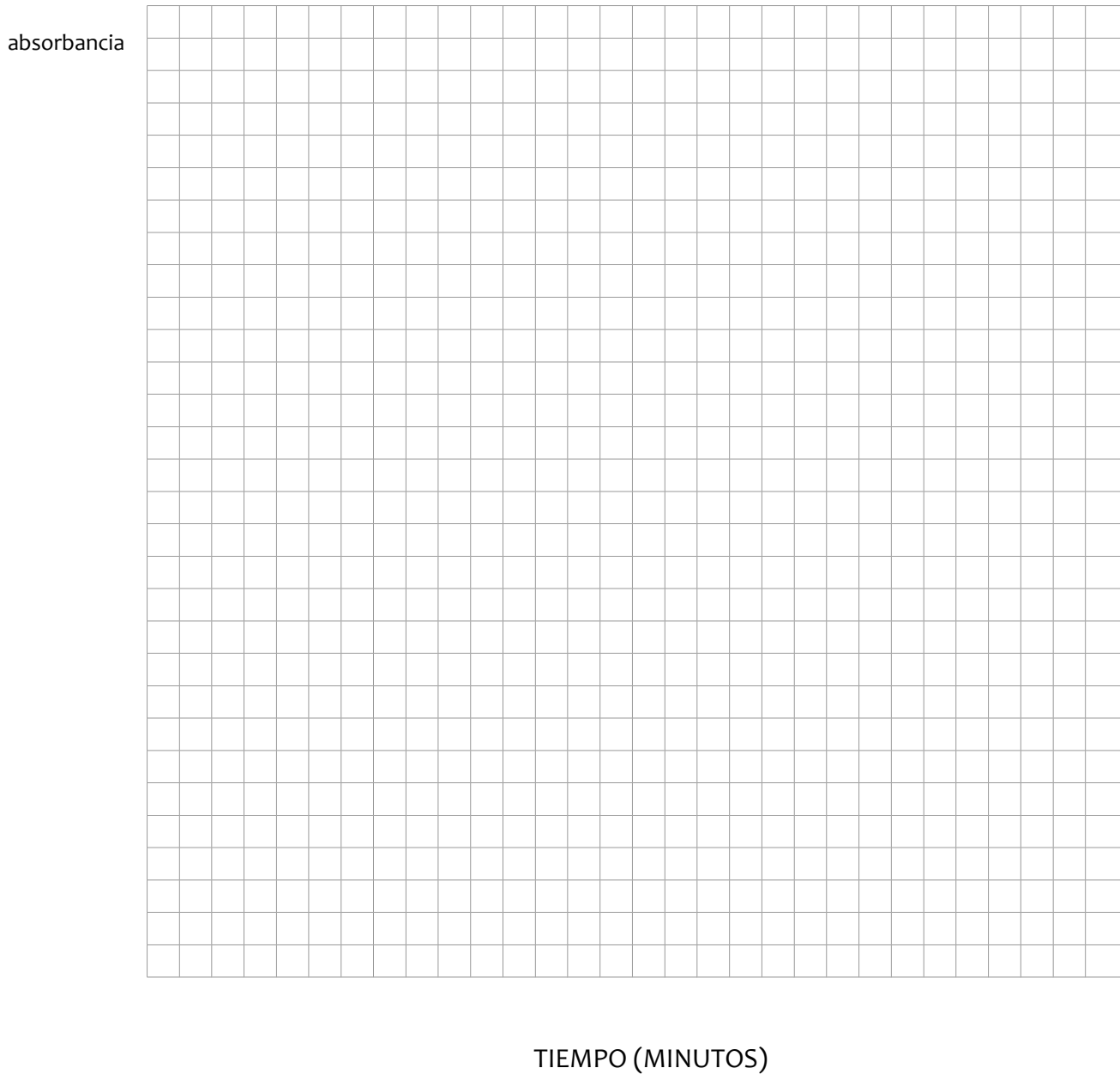
* DCPIP: Aceptor artificial de electrones

** DCMU: Inhibidor, bloquea el transporte de electrones y la fotofosforilacion.

El herbicida DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) inhibe la fotosíntesis al bloquear el sitio de unión de la plastoquinona al fotosistema II.



5.- Represente los valores obtenidos en una gráfica de absorbancia en función del tiempo.



6.- Discusión

- i. ¿Es necesaria la luz para que ocurra la reacción de Hill? Justifique su respuesta.

- ii. ¿Cuáles dos tubos elegiría para fundamentar su respuesta? Justifique brevemente su elección.

ii. ¿Cuál es el efecto del herbicida (DCMU) y cómo lo correlaciona con la curva obtenida experimentalmente?

iii. Si la medición de la absorbancia a tiempo cero se demora unos 30 segundos desde que se colocan los cloroplastos en los tubos 1 y 2 hasta que se realiza la lectura en el espectrofotómetro: ¿esperaría obtener una diferencia notoria entre las absorbancias de estos tubos con respecto al tubo 3? Justifique brevemente.

iv. Observando las micrografías electrónicas:

Mida la longitud de un cloroplasto.....

Mida el espesor de un *granum*.....

Parte D: **Análisis y discusión de resultados experimentales publicados en artículos científicos.**

El material será proporcionado por el docente en la clase práctica.