

Parte A: Identificación de mitocondrias en una fracción subcelular

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

Tubo	Buffer	NaN_3 *	Succin. 0.24 M	DCPIP 0,1 mM	Agua	Fracción mitocondrial

* NaN_3 (azida de sodio): *inhibidor del complejo citocromo oxidasa.*

2.- Proceda según el siguiente protocolo experimental:

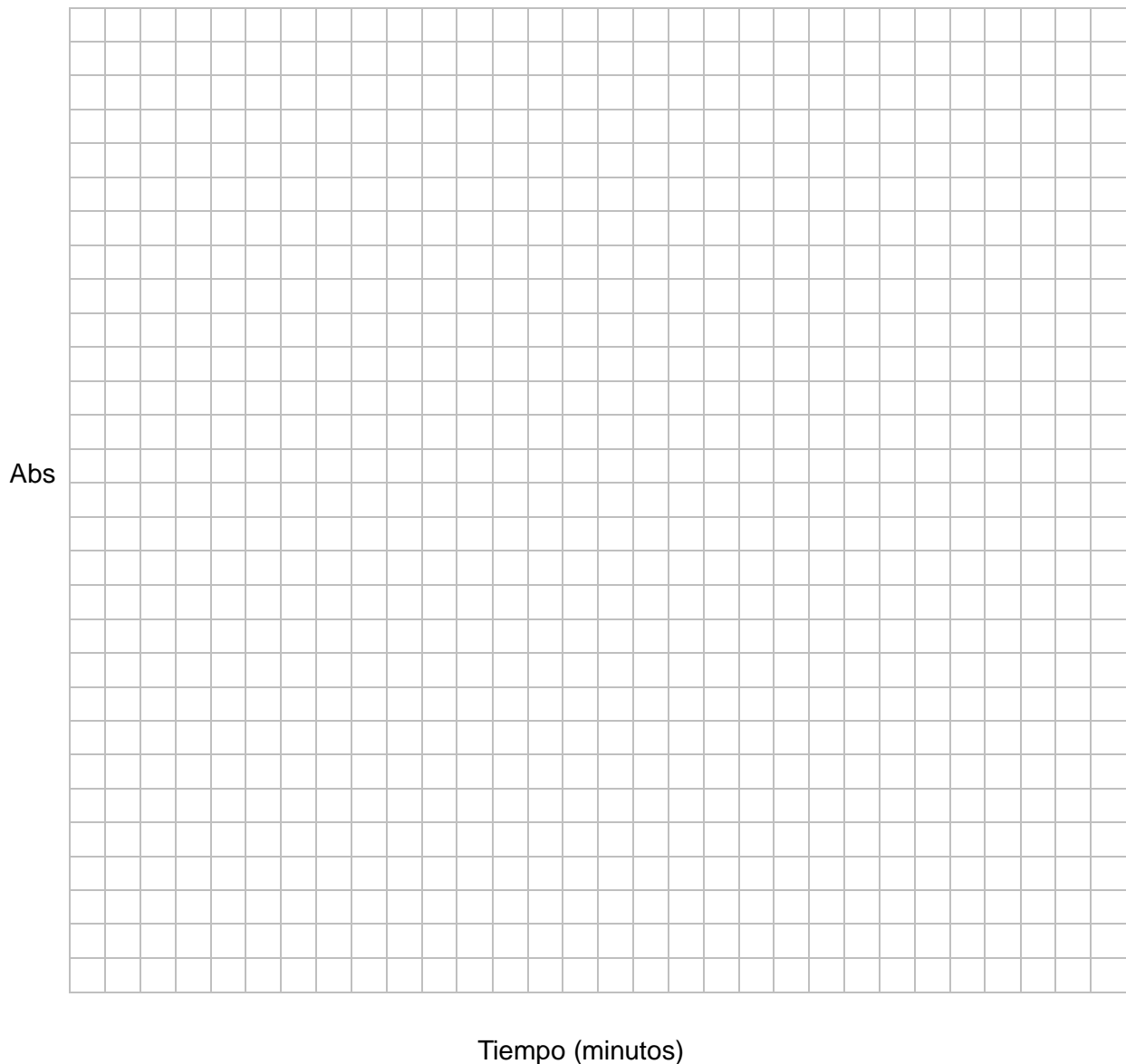
- i) Agitar 2 veces por inversión la suspensión de mitocondrias concentrada.
- ii) Diluir la fracción mitocondrial con mL de buffer.
- iii) Numere los tubos y pipetee cada reactivo de acuerdo a lo indicado en el cuadro que Ud. elaboró en el paso número 2.
- iv) Ajuste el espectrofotómetro a 600 nm (debe encenderse unos minutos antes de comenzar a medir).
- v) Agite la suspensión de mitocondrias por inversión tapando con parafilm.
- 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 las mitocondrias.

x) ¿Por qué debe igualar el volumen final de los diferentes tubos en el diseño experimental?

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

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

4.- Represente en una gráfica de absorbancia (Abs) vs. tiempo con los valores obtenidos.



5.- a-¿Qué indica el cambio de absorbancia del DCPIP observado a lo largo del tiempo?

b-¿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: **expresé 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.- Considere la imagen C en la plancha 109 en que se observa el proceso de división mitocondrial. Describa brevemente lo observado en cada micrografía.

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

El material será proporcionado por el docente en la clase práctica
