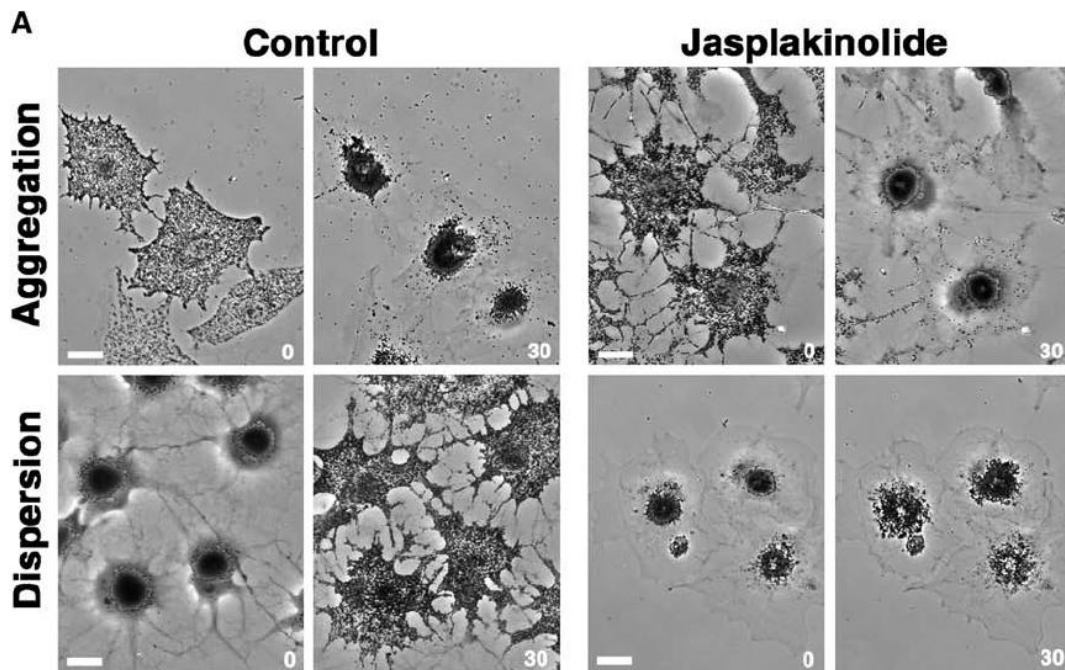


Parte A: Análisis del movimiento de melanosomas

Las imágenes que se muestran a continuación y los videos 1 a 6 que se observarán en clase son resultados obtenidos con melanóforos (células pigmentarias de la piel de algunos animales, como los peces) *in vitro* en diferentes condiciones (agregación: en presencia de melanotonina; dispersión: en presencia de MSH) y a diferentes tiempos de tratamiento, como se indica en la figura (Semenova *et al.* CurrentBiology 2008, 18:1581–1586). La droga jasplakinolide se une a los filamentos de actina y los estabiliza.



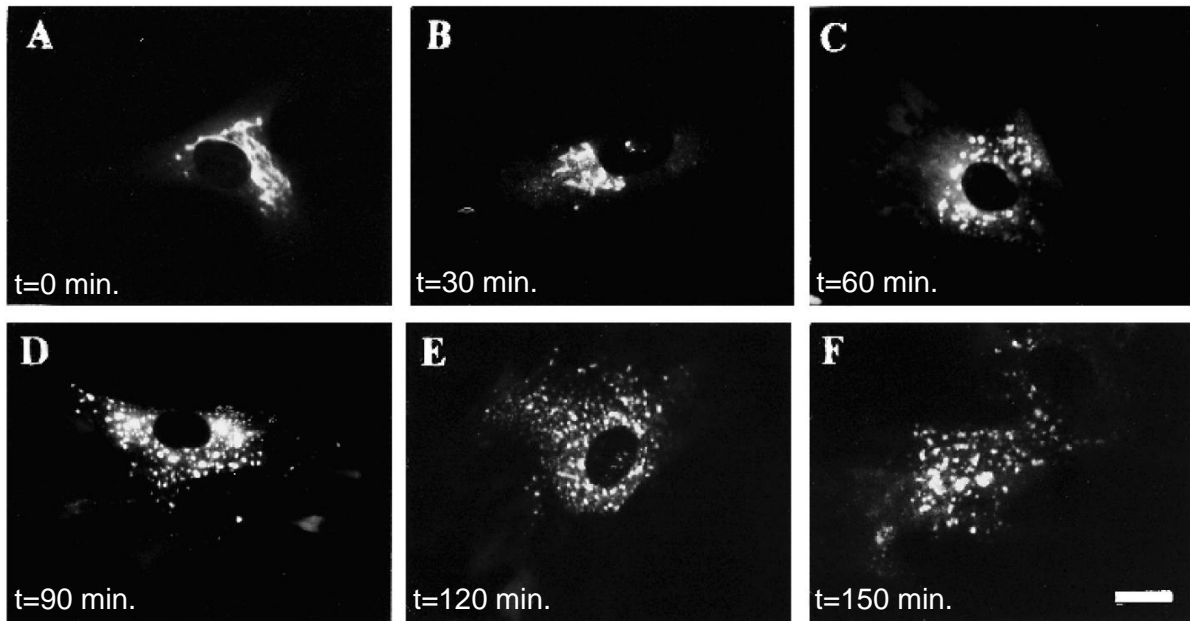
1.- Considere la primera fila de imágenes correspondientes a los experimentos de agregación. ¿Puede concluir a partir de éstos que la agregación es un fenómeno que depende de los filamentos de actina? Justifique brevemente.

2.- ¿Qué otro/s experimento/s realizaría para determinar si la agregación depende de los filamentos de actina?

3.- Considere la segunda fila de imágenes correspondientes a los experimentos de dispersión. ¿Qué hipótesis acerca del mecanismo de dispersión de melanosomas puede elaborar a partir de los resultados observados? ¿Son los filamentos de actina necesarios para la dispersión de los melanosomas?

4.- a. ¿Cómo analizaría la relevancia de los microtúbulos en los procesos de agregación y dispersión de melanosomas?

b. ¿Y de los microtúbulos y microfilamentos en conjunto?



En la figura se muestran los resultados de tratar a un cultivo de células fibroblásticas humanas con la droga despolimerizante de microtúbulos Nocodazol. Las células fueron teñidas con el marcador fluorescente C6-NBD-ceramida, utilizado como marcador estructural del Aparato de Golgi. Los cultivos celulares fueron registrados a lo largo del tiempo a intervalos de 30 minutos. Barra de escala: 10 μ m. Minin, 1997.J. Cell Sci. 110, 2495-2505.

1) Describa cómo se distribuye la marcación fluorescente a t=0 min.

2) ¿Cómo se observa la fluorescencia luego del tratamiento con nocodazol? ¿Qué cambio observa respecto al control?

3) ¿Qué le permiten concluir estos resultados acerca de la regulación del posicionamiento subcelular del Aparato de Golgi?

Parte C: Observación de micrografías electrónicas y preparados histológicos

En esta parte del práctico analizaremos la ultraestructura de distintos componentes celulares. Entendemos por ultraestructura a la estructura detallada o refinada de una muestra biológica. Esta información ultraestructural es aportada por los microscopios electrónicos. Compararemos también la información que aportan sobre las mismas estructuras, la microscopía electrónica y la microscopía fotónica.

Analice las siguientes micrografías de muestras observadas mediante microscopia electrónica utilizando el apoyo de las leyendas correspondientes. A continuación, conteste las preguntas planteadas. Observe el aspecto de los organelos en las preparaciones para microscopía de luz y correlacione lo que ve con el objetivo de mayor aumento de su microscopio con la / las micrografías correspondientes. Realice un esquema, indicando el aumento utilizado, de la misma estructura observada mediante ambas metodologías.

Identifique el tipo de microscopio utilizado para obtener cada imagen.

Señale mediante qué tipo de técnica se procesó el material que se observa en cada caso.

Cuando sea posible, indique el aumento.

Nombre las estructuras esquematizadas.

1.- Retículo endoplásmico

Planchas 117 y 118 - Muestran diferentes configuraciones del retículo endoplásmico rugoso (RER) y Liso (REL, 117d), en diferentes tipos celulares (células glandulares, neurona).

Plancha 119 - Muestra la apariencia ultraestructural del retículo liso (REL) correspondiente a una célula hepática.

Preparado de corte de médula espinal de rata teñida con azul de toluidina. Se observa en la región de las astas ventrales de la médula, la presencia de células grandes, de forma ligeramente redondeada a estrellada, con núcleo eucromático y nucléolo muy evidente. En el citoplasma se distinguen cuerpos intensamente basófilos denominados cuerpos o grumos de Nissl. Los mismos corresponden a zonas del citoplasma ocupadas por cisternas del RER y ribosomas libres.

Con la técnica de Nissl se marcan tanto el nucléolo de la célula como grumos citoplasmáticos ¿por qué?

2.- Aparato de Golgi y Lisosomas

Planchas 121 y 122 - Muestran la ultraestructura del Aparato de Golgi (121 a, b, c).

122: Las regiones cis y trans del Aparato de Golgi pueden marcarse selectivamente, por impregnación prolongada con osmio, la región cis, y por métodos histoquímicos para la enzima tiaminopirofosfatasa, la región trans.

Preparado de ganglio raquídeo impregnado con la técnica argéntica. Se observan células grandes y redondeadas (neuronas ganglionares) coloreadas de amarillo. En el centro de estas células se observa un espacio blanco correspondiente al núcleo que no se colorea. Alrededor del núcleo se observan estructuras fuertemente impregnadas de color negro, fragmentadas, que corresponden al aparato de Golgi, profusamente desarrollado en estas células.

Aparato de Golgi (m. fotónica)	Aparato de Golgi (m. electrónica)

Plancha 123 - Muestra el aspecto ultraestructural heterogéneo de los lisosomas.

3.- Peroxisomas

Plancha Memb 11, 12 y 13. Las imágenes muestran la estructura de los peroxisomas en células animales y vegetales. El esquema en la imagen 13 muestra una de las teorías que explican el proceso de biogénesis de los peroxisomas.

Indique una función celular que tenga lugar en los peroxisomas y relaciónela con la aparición de la inclusión cristalina que se observa en las imágenes Memb 11 y 12.

4.- Citoesqueleto

El citoesqueleto de las células eucariotas está formado por estructuras filamentosas que le dan forma a las células y participan en el movimiento de las mismas, así como también en el movimiento de los organelos celulares. Se distinguen tres tipos de filamentos: microfilamentos (filamentos de actina), microtúbulos y filamentos intermedios.

Planchas 4, 114 y 116 - Microfilamentos (filamentos de actina)

Los filamentos de actina están constituidos por dos protofilamentos que se enrollan entre sí, formando una hélice dextrógira de 5 nm de diámetro.

114 a Muestra los filamentos de actina agrupados en forma de gruesos haces denominados "fibras de estrés" (MET).

114 b y c Los microfilamentos también se demuestran por medio de anticuerpos anti-actina conjugados a fluorocromos. Estas preparaciones se observan con el microscopio de fluorescencia.

4 Los microfilamentos se presentan en una forma ordenada en las microvellosidades.

116 Redmicrotrabecular, compuesta básicamente por fibras de estrés.

Planchas 5, 18, 112 y 113 - Microtúbulos

Los microtúbulos son estructuras filamentosas de 25 nm de diámetro. Están compuestos por polímeros lineales de tubulina organizados formando 13 protofilamentos. Los microtúbulos tienen proteínas asociadas (MAPs). Estos filamentos se presentan en las células como estructuras transitorias: huso mitótico (112 c), asociados al transporte de vesículas (112 d) o como estructuras estables: en el axonema de las cilias (5), los corpúsculos basales y centriolos (18).

Flagelo de espermatozoide (m. fotónica)	Flagelo de espermatozoide (m. electrónica)
---	--

Plancha 115 - Filamentos Intermedios

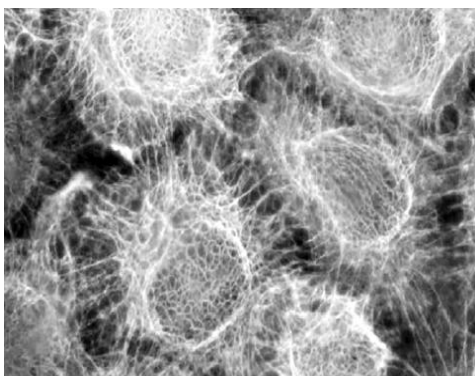
Los filamentos intermedios tienen un diámetro de 10 nm y una composición molecular variable en los distintos tipos celulares.

115 a Filamentos intermedios vistos en el microscopio electrónico de transmisión.

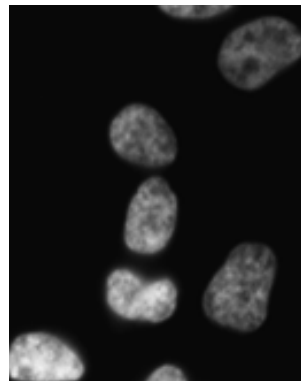
115 b Filamentos intermedios puestos en evidencia por medio de anticuerpos anti-vimentina (Microscopía fotónica de fluorescencia).

Las imágenes que se muestran a continuación fueron tomadas mediante microscopía de fluorescencia a partir de cultivos celulares, en donde se marcaron filamentos intermedios mediante el uso de anticuerpos. Las imágenes corresponden a laminas y a queratinas.

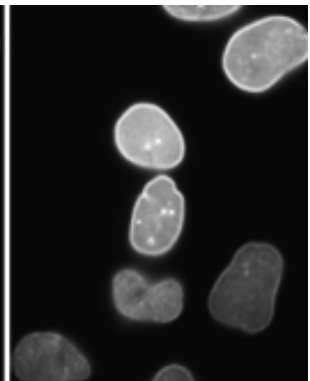
Proteína X:



ADN



Proteína Y:



¿Qué imagen (proteína X o proteína Y) corresponde a queratinas y cuál a laminas? Justifique brevemente.

Proteína X:

Proteína Y:

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

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