



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Protocolo de Prácticas de Biología (NHD)

Autores:

Josué Martínez de la Puente ^{1,2}, Francisco José Palma Martín ³, Mario Garrido Escudero¹, Noel Amaurys Tejera García ³

1. Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada
2. Ciber de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP)
3. Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Farmacia. Universidad de Granada

Curso 2022-23

OBSERVACIÓN DE LA MITOSIS EN ÁPICES DE RAÍCES DE CEBOLLA

Introducción:

La mayoría de las células atraviesa una secuencia regular y repetitiva de crecimiento y división que constituye el ciclo celular. Las células se reproducen mediante un proceso conocido como división celular, en el cual su material genético (ADN) se reparte entre dos células hijas. En las plantas y en los animales multicelulares, la división celular es el procedimiento por el cual el organismo crece, partiendo de una única célula y los tejidos son reparados y reemplazados. Una célula individual crece hasta alcanzar un cierto tamaño crítico y un cierto estado metabólico y entonces se divide. Cuando la célula se divide, cada célula hija tiene que recibir una copia completa, y sólo una, de cada uno de los cromosomas. El proceso por el que se lleva a cabo este reparto se llama colectivamente **mitosis**. La mitosis habitualmente es seguida de un proceso de **citocinesis** que divide a las células en dos células nuevas en el cual el citoplasma materno es partido por la mitad.

Antes de que una célula pueda comenzar la mitosis y dividirse efectivamente, debe duplicar su ADN, sintetizar histonas y otras proteínas asociadas con el ADN de los cromosomas, producir una reserva adecuada de orgánulos para las dos células hijas y ensamblar las estructuras necesarias para que se lleven a cabo la mitosis y la citocinesis. Estos procesos preparatorios ocurren durante la interfase, en la cual, a su vez, se distinguen tres etapas: las fases G1, S y G2.

El proceso de la mitosis se divide convencionalmente en cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase. Durante toda la interfase, poco puede distinguirse dentro del núcleo. Sin embargo, al comienzo de la profase (habitualmente la etapa más larga de la mitosis), la cromatina ya se ha condensado lo suficiente como para que los cromosomas individuales sean visibles por el microscopio óptico. Cada cromosoma está compuesto por dos cromátidas dispuestas muy juntas y conectadas por sus centrómeros. Durante la profase, los pares de centriolos se separan y comienza la formación del huso. Los dos centriolos migran hacia los polos opuestos de la célula. Durante la metafase temprana, los pares de cromátidas se van ubicando en el plano ecuatorial, conducidos por las fibras cinetocóricas, como si fuesen atraídos primero por un polo y después por el otro. Finalmente los pares de cromátidas se disponen exactamente en el plano ecuatorial de la célula. Esto señala el final de la metafase. Al comienzo de la anafase, la etapa más rápida de la mitosis, los centrómeros se separan simultáneamente en todos los pares de cromátidas. Luego se separan las dos cromátidas de cada par, siendo cada una atraída hacia los polos opuestos. Al iniciarse la telofase, los cromosomas ya alcanzan los polos opuestos y el huso comienza a dispersarse en dímeros de tubulina. Durante la telofase tardía, se vuelven a formar las correspondientes envolturas nucleares alrededor de los dos conjuntos de cromosomas que, una vez más se vuelven difusos por descondensación de la cromatina. En cada núcleo reaparecen los nucléolos.

En la mitosis de una célula vegetal se puede observar el huso pero no hay centriolos ni ásteres visibles. El plano de la división celular se establece en la fase G2 tardía del ciclo celular, cuando los

microtúbulos se organizan en una estructura circular, conocida como banda preprofásica, justo por dentro de la pared celular. Aunque esta banda desaparece al empezar la profase, determina la ubicación futura del ecuador y de la placa celular. Los microtúbulos se ensamblan luego en el huso, en una zona clara que se origina alrededor del núcleo en la profase. En la citocinesis, que comienza durante la telofase, la placa celular se extiende gradualmente hacia afuera hasta que alcanza la región exacta de la pared celular ocupada previamente por la banda preprofásica. Las vesículas, producidas por el aparato de Golgi, que originan la pared celular son guiadas a su posición correcta por las fibras del huso que quedan entre los núcleos hijos.

Material y métodos

- | | |
|--|--------------------------------------|
| - Microscopio | - Papel de filtro |
| - Portaobjetos | - 1 vaso de precipitado |
| - Cubreobjetos | - Orceína acética al 2% |
| - 1 pinzas | - Orceína acética al 1% |
| - 1 tijeras | - HCl 0.1N |
| - 1 pincel | - Alcohol de 70% |
| - 1 escalpelo | - Ápices de raíz de cebolla o de ajo |
| - 1 aguja enmangada | |
| - 1 Vidrio de reloj o porcelana excavada | |

Para el desarrollo de la práctica, se tendrán en cuenta los siguientes pasos:

- En un vidrio de reloj se colocan 9 gotas de orceína acética al 2% y una gota de HCl 0.1N, mezclándolo bien.
- Colocar dos ápices de raíz, procedentes de alcohol de 70%, en el vidrio de reloj y mantenerlo en estufa a 60°C durante 10 minutos.
- Poner en el portaobjetos limpio una gota de orceína al 1% y sobre ella los ápices procedentes del vidrio de reloj, desechando el resto de la raíz.
- Colocar sobre los ápices un cubreobjetos, protegerlo con un trozo de papel de filtro y se presiona suavemente con la uña hasta que el material se disgregue. Limpiar el exceso de colorante con un papel de filtro.
- Observar al microscopio.

La observación de las muestras al microscopio se realizará siguiendo los siguientes pasos:

- Coloque la preparación sobre la platina sujetándola con las pinzas.
- Compruebe previamente que la platina está baja, que el objetivo de menor aumento (el más corto) está dirigido hacia la platina y que el material a observar quede bien centrado.
- Asegúrese que el objetivo de 10 aumentos (10x) esté bien colocado. Para ello, gire el revólver y vuélvalo a poner hasta que se sienta un golpecito seco.

- d. Con el diafragma abierto, regule la luz sobre la preparación para obtener una imagen clara pero que no dañe la vista.
- e. Enfoque la preparación moviendo el tornillo macrométrico para acercar el objetivo hasta la preparación y después, mirando por el ocular, alejar lentamente el objetivo hasta el momento de ver la preparación.
- f. Ajustar la abertura del diafragma hasta obtener un poder resolutivo óptimo (percepción de los detalles de la preparación)
- g. Moviendo el tornillo micrométrico se logrará una imagen más nítida.
- h. Pase al objetivo de 40 aumentos (40x). Suba ligeramente el condensador. La imagen debe estar casi enfocada: afine el foco con el micrométrico. Si la imagen no está ni medianamente enfocada, es preferible volver a un enfoque con el objetivo de 10x. El objetivo de 40x trabaja muy cerca de la preparación y por ello es susceptible de accidente si se usa el macrométrico y ser clavado en la preparación, rompiéndose el cubreobjetos y pudiendo dañarse el objetivo.
- i. Finalizada la observación de la preparación, y antes de retirarla de la platina, se colocará el objetivo de menor aumento girando el revólver en sentido hacia él. Nunca retire la preparación con un objetivo largo en posición de observación.
- j. Retire la preparación y limpie cuidadosamente los objetivos.

OBSERVACIÓN DE CÉLULAS ANIMALES Y VEGETALES

Introducción:

Las células son pequeñas y complejas, para entender su funcionamiento un requisito previo esencial es comprender la organización estructural de las células. En los últimos años la microscopía óptica ha ido ganando importancia día a día ya que tiene una ventaja importante y es que la luz es relativamente poco destructiva y se pueden observar las células vivas y se pueden identificar sus componentes con colorantes y marcadores fluorescentes. Su principal limitación es que las estructuras más pequeñas que se pueden observar son las mitocondrias, ya que el poder de resolución de un buen microscopio óptico es de 0,2 μm .

A pesar de la gran diversidad de células existentes presentan muchas similitudes. Cada célula es una unidad autónoma rodeada por una membrana que controla el paso de sustancias hacia y desde el interior, con un diseño común tanto para eucariotas como procariotas y que hace posible que la célula difiera bioquímica y estructuralmente del medio circundante. El núcleo es un cuerpo grande, frecuentemente esférico y, por lo común, la estructura más voluminosa dentro de las células eucariotas donde se encuentran los cromosomas. En las células eucariotas además existen numerosas membranas que definen y mantienen las diferencias entre los orgánulos y el citosol. En el citoplasma se encuentra el retículo endoplasmático que constituye la mayor parte del sistema de endomembranas, el aparato de Golgi, los lisosomas, peroxisomas y mitocondrias.

Las plantas son eucariotas y sus células tienen la característica organización que consta de núcleo y citoplasma. El citoplasma está rodeado por el plasmalema y contiene además de los orgánulos rodeados de membrana presentes en animales, los plastos (cloroplastos en los tejidos verdes, encargados de llevar a cabo la función fotosintética), y una gran vacuola central, que puede llegar a ocupar 30 - 90% del volumen celular, separada del resto por el tonoplasto. El citoesqueleto formado por microtúbulos y microfilamentos participa en las corrientes citoplasmáticas, transporte de vesículas secretoras y deposición de microfibrillas de celulosa. Uno de los rasgos más característicos y distintivos de las células vegetales es la pared celular. Está compuesta mayoritariamente por polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y pectinas) con pequeñas cantidades de glicoproteínas y fenoles, formando una estructura muy compleja.

Material y métodos:

- Microscopio
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Paralelas para tinción
- Pinzas y tijeras
- 1 pincel y 1 escalpelo
- 1 Vidrio de reloj o porcelana excavada
- Papel de filtro
- Cristalizador
- Hojas de *Elodea*
- 1 aguja enmangada
- 1 vaso de precipitado
- Sacarosa 1M
- Mejillón

Observación de células de hoja de Elodea

Poner una gota de agua y montar entre porta y cubre el ápice de una hoja de *Elodea*. Usando el objetivo de mayor aumento (40x), observar un grupo de células próximas al borde del ápice.

Plasmolisis de las células de *Elodea* y observación de las corrientes citoplasmáticas

Una vez montada la preparación de *Elodea* y enfocada poner unas gotas de sacarosa 1M en uno de los bordes del cubreobjetos y retirar el agua con ayuda de un papel de filtro colocado en el lado opuesto del cubreobjetos y observar lo que ocurre.

Observación de células de branquias de mejillón

Abrir un mejillón que esté vivo, introduciendo el borde de una navaja o cuchillo entre las dos valvas. La fuerza de incisión debe ser algo intensa, para forzar la separación de las dos valvas y procurar cortar el par de músculos que mantienen cerrada la concha. Hay que colocar el borde cortante entre ambas valvas y hacer presión suave pero continua hasta lograr suavemente la apertura de la concha.

Procurar que el líquido interno que contiene el mejillón no se pierda, dejándole gotear sobre un vidrio de reloj. Poner unas gotas del líquido interno del mejillón sobre un portaobjetos utilizando un cuentagotas o un pincel.

Cortar con una navaja u hoja de afeitar un pequeño trozo de las branquias depositándolo con unas pinzas sobre el portaobjetos y cubrir con el cubreobjetos.

Usando el objetivo de mayor aumento (40x), observar un grupo de células próximas al borde del tejido. Observar el movimiento de los cilios de las branquias.

Resultados y cuestiones relativas a la práctica:

- a) Efectuar un dibujo esquemático de una célula de *Elodea* turgente y otra plasmolizada, rotulando sus diferentes partes.
- b) Describir lo que sucede a las células vegetales sumergidas en una solución concentrada de sacarosa (plasmolisis).
- c) Efectuar un dibujo esquemático de una célula de branquias del mejillón.
- d) Enumerar las diferencias entre las células animales y vegetales.

NOTA IMPORTANTE:

Durante la realización de esta práctica, igualmente mostraremos **CÉLULAS DE LA MUCOSA BUCAL HUMANA**. Por las imposibilidades asociadas a la situación que estamos viviendo, estas muestras serán procedentes de preparaciones ya realizadas, con el objetivo de que podáis completar adecuadamente vuestra formación, a pesar de las limitaciones. A modo de contextualización se presenta la información relativa, para que podáis contextualizarlo:

Introducción:

La mucosa bucal es un epitelio plano poliestratificado no queratinizado asociado a numerosas glándulas secretoras de moco. Este epitelio está en continua descamación, no debido al roce (aunque si aumenta el roce, aumenta la descamación), sino a la naturaleza del epitelio. Las mujeres y los hombres sin ninguna anomalía cromosómica tienen 22 autosomas y dos cromosomas sexuales que son XX en las mujeres y XY en los hombres (esta circunstancia varía en otros grupos de vertebrados, por ejemplo, las aves). Sólo en teoría, es posible especular que esta disparidad daría lugar a un problema de “dosis génica” entre mujeres y hombres para los genes ligados al sexo. Las mujeres tienen dos cromosomas X y los varones sólo uno.

Los experimentos de Keith Moore y Barr en humanos demostraron la existencia en los mamíferos de un mecanismo genético que compensa la disparidad de dosis del cromosoma X. Los autores observaron un cuerpo que se teñía de oscuro en células de la mucosa bucal de mujeres, pero no en células similares de hombre, que se conoce como corpúsculo de Barr. Esta estructura altamente condensada, es una masa heterocromática, plana y convexa, con un tamaño de 0.7x1.2 µm que se encuentra pegada a la envoltura nuclear de células interfásicas se tiñe positivamente con la reacción de Feulgen para el ADN. De los dos cromosomas X sólo uno será activo y el que presenta el corpúsculo de Barr es el que está inactivado.

Para observar las muestras, debéis observar al microscopio las muestras presentadas teniendo en consideración los pasos mostrados en prácticas anteriores. El objetivo final es que podáis dibujar lo observado al microscopio, reflejando que estructuras celulares / orgánulo citoplasmático con especial atención al corpúsculo de Barr.

DETERMINACIÓN DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS ABO Y Rh

Introducción:

Esta parte de la práctica, como ocurre con la anterior, requiere de tener que tomar muestras de sangre e intercambio de reactivos que no es lo más conveniente en la situación en que nos encontramos, por ello, se presentarán los resultados y se explica la metodología (ver presentaciones en Prado), pero no se realizará *in situ* en el laboratorio. Durante esta práctica igualmente se presentarán las características hereditarias y los rasgos monogenicos principales (ver pdf adjunto en Prado).

Un grupo sanguíneo es una clasificación de la sangre de acuerdo con las características presentes o no en la superficie de los hematíes y en el suero de la sangre. Las dos clasificaciones más importantes para describir grupos sanguíneos en humanos son los antígenos (el sistema ABO) y el factor RH.

Sistema ABO: El sistema ABO fue descubierto por Karl Landsteiner en 1901, convirtiéndolo en el primer grupo sanguíneo conocido; su nombre proviene de los tres tipos de grupos que se identifican: los de antígeno A, de antígeno B, y sin antígeno o cero (Ø) y que no hay que confundir con la letra "Ó". Las transfusiones de sangre entre grupos incompatibles pueden provocar una reacción inmunológica que puede desembocar en hemólisis, anemia, fallo renal, shock, o muerte.

El sistema ABO fue el primer caso de alelomorfismo múltiple que se descubrió en el hombre. Se puede considerar como un carácter hereditario controlado por tres alelos de un solo gen, dos de ellos (A y B) dominantes sobre un tercero y codominantes entre sí (en realidad la situación es más complicada, aunque esta hipótesis es válida para explicar los resultados que obtendremos). Aunque se han utilizado diversas notaciones, utilizaremos los símbolos IA, IB e IO para los tres alelos. La letra I se refiere a isoaglutinógeno, otro término para antígeno. Si asumimos que los alelos IA e IB son responsables de la producción de los antígenos A y B, respectivamente y que IO es un alelo que no produce ningún antígeno A o B detectable, se puede hacer una lista de los posibles genotipos posibles y de sus posibles fenotipos.

Si se mezclan sangres de distintos tipos, de modo que las aglutininas se pongan en contacto con sus respectivos aglutinógenos, se produce la aglutinación de los hematíes. Debido a ello no se pueden realizar todas las transfusiones teóricamente posibles. Si el volumen de sangre no es excesivo, puede realizarse con seguridad cualquier tipo de transfusión, siempre que el suero receptor no contenga anticuerpos para los antígenos de los hematíes del dador.

El grupo AB es el denominado "receptor universal" ya que puede recibir hematíes de todos los grupos, mientras que el grupo 0 es el "dador universal" ya que sus hematíes no son aglutinados por la sangre de ningún grupo. Los anticuerpos anti-A y anti-B de la sangre del grupo 0 no absorbidos por otros tejidos o quedan muy diluidos si la transfusión es pequeña.

Sistema Rh: el Dr. Landsteiner descubrió otro grupo de antígenos que se denominaron Rhesus (factores Rh), porque fueron descubiertos durante unos experimentos con monos *Rhesus*. Las personas con factores Rhesus en su sangre se clasifican como Rh positivas; mientras que aquellas sin los factores se clasifican Rh negativas. Es un antígeno que está presente en la mayoría de la población europea (85%).

Las primeras investigaciones genéticas hicieron pensar que en las poblaciones humanas había sólo dos alelos controlando la presencia o ausencia del antígeno. Se creía que el alelo Rh+ determinaba la presencia del antígeno y se comportaba como dominante. El alelo Rh- parecía dar lugar a la ausencia de antígeno. Con el desarrollo de antisueros más purificados para comprobar la presencia de antígeno, quedó claro que el control genético Rh era mucho más complicado de lo que originalmente se creía. Según diversos genéticos parecen estar implicados entre 3 y 8 alelos Rh.

El Rh se determina por la presencia del antígeno D que es el más potente mediante la reacción de aglutinación. Si un individuo Rh- se le hace una transfusión con sangre Rh+, a los 12 días producirá aglutininas anti-Rh. Una transfusión posterior con sangre Rh+ dará lugar a una gran destrucción de hematíes. Es el mismo efecto que produce en una mujer Rh- la gestación de un hijo Rh+, que origina en la madre la producción de aglutininas anti-Rh que la sensibilizan para futuros embarazos. En embarazos posteriores, de hijos Rh+ puede presentarse una serie incompatibilidad materno-filial, puesto que puede producirse una grave destrucción de los hematíes del feto (eritroblastosis fetal o enfermedad hemolítica del recién nacido). En la actualidad, se trata clínicamente este problema inyectando a la madre Rh- que ha tenido un hijo Rh+ gammaglobulina anti-D, que actúa sobre los hematíes fetales que podrían provocar inmunización en la madre y los hace desaparecer antes de que esto ocurra.

La metodología para el desarrollo de esta práctica es sencilla, de modo que se realiza una punción en el dedo anular con una lanceta esterilizada desechable recogiendo varias gotas en una tarjeta diseñada para ello. Posteriormente, mediante las reacciones observadas se podrá identificar los grupos sanguíneos según:

A: Si hay aglutinación en el suero anti-A pero no en el suero anti-B.

B: Si hay aglutinación en el suero anti-B pero no en el suero anti-A.

0: Si no hay aglutinación en ningún caso.

AB: Si hay aglutinación en el suero anti-A y en el suero anti-B. Sistema Rh

Tras añadir una gota de suero anti-D a las muestras de sangre, los resultados serán:

Rh positivo: Si hay aglutinación.

2. Rh negativo: Si no hay aglutinación.

En algunos casos existe una aglutinación dudosa. Es posible que los hematíes contengan otra variante del antígeno D, por lo que para una determinación correcta del factor Rh hay que hacer pruebas más complicadas.

OBSERVACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE FRUTAS

Introducción:

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se generan constantemente bajo condiciones normales *in vivo*, como consecuencia del metabolismo aeróbico. Sin embargo, en ciertos estados fisiológicos se producen en exceso como en condiciones patológicas, lo que provoca un estrés oxidativo. Para proteger a las moléculas biológicas de los posibles daños del estrés oxidativo, especialmente al ADN, los lípidos y las proteínas, todos los organismos que consumen oxígeno están dotados de un sistema antioxidante bien integrado, que incluye componentes enzimáticos y no enzimáticos. Los componentes no enzimáticos consisten en macromoléculas, como la albúmina, ceruloplasmina y ferritina, así como una serie de pequeñas moléculas, como las vitaminas C y E, el β -caroteno, o el glutatión reducido. Las frutas son fuentes ricas en diversas vitaminas, minerales y fibras requeridas por el cuerpo humano para una salud óptima. En los últimos años, se ha prestado más atención a los antioxidantes contenidos en las frutas porque los estudios epidemiológicos revelaron que la ingesta elevada de frutas se asoció con una menor mortalidad y morbilidad de las enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer y uno de los posibles mecanismos se atribuyó a la actividad antioxidante presente en la fruta. Además de los antioxidantes clásicos, entre los que se incluye la vitamina C, E y β -caroteno, los compuestos fenólicos se identificaron como importantes antioxidantes contenidos en las frutas. Sin embargo, las frutas son diversas en cuanto a la composición y a la actividad antioxidante, y aquellas con alta actividad, generalmente contienen más antioxidantes.

Los ensayos que miden el efecto antioxidante combinado de las distintas defensas no enzimáticas en fluidos biológicos pueden ser útiles para proporcionar un índice de capacidad para resistir el daño oxidativo. Un método para medir la capacidad antioxidante total es el método descrito que mide la capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP). En este método, a bajo pH, se produce la reducción de un complejo férrico-tripiridiltriaina a su forma ferrosa, que es coloreada, gracias a la presencia de antioxidantes, permitiendo de este modo cuantificar la capacidad antioxidante de un tejido.

Material y métodos:

- Zumos de naranja, pomelo, zumo comercial
- Acetona al 80% conservada a -20 oC
- Reactivo de FRAP (10:1:1), que contiene: 10 mL tampón acetato sódico 0.3M pH 3.6; 1mL FeCl₃ 6H₂O 20 mM; 1mL TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazine) 10 mM disuelto en HCl 40 mM
- FeSO₄ · 7H₂O (10 µg/mL)
- Erlenmeyer
- Tubos centrifuga
- Centrífuga de mesa
- Tubos de ensayo
- Pipetas
- Espectrofotómetro

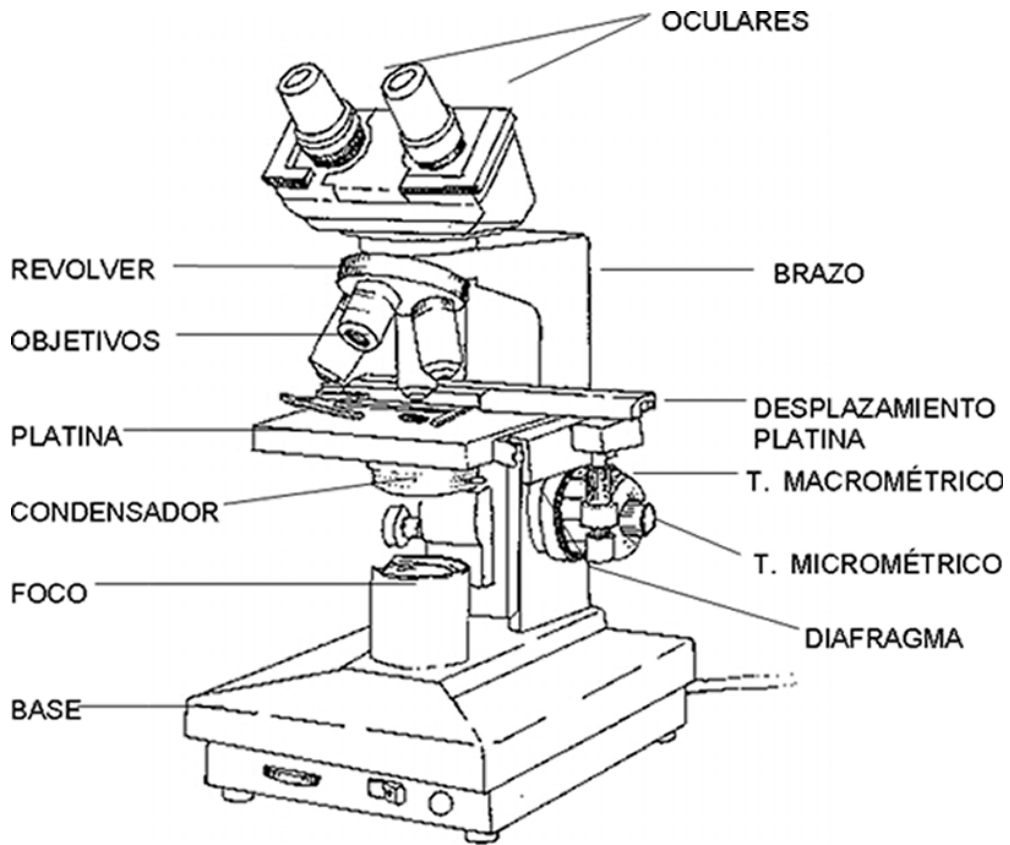
- 1) Se toman 0.2 mL de zumo de fruta y diluirlo con 9.8 ml de Acetona al 80% que estará conservada a -20°C, en un tubo de ensayo.
- 2) Agitar dicha mezcla e incubarla durante 15 min a 4 oC
- 3) Volver a agitar la mezcla y pasar 5 mL a un tubo de centrifuga
- 4) Centrifugar 15 min a 5000 rpm
- 5) Tomar el sobrenadante, que se pasará a un tubo de ensayo limpio
- 6) Tomar 0.2 mL de sobrenadante y pasarlo a tubo de ensayo limpio
- 7) Agregar 1.8 mL de acetona al 80%
- 8) Agregar 1 mL de reactivo de FRAP, consiguiendo un volumen final de 3 mL
- 9) Agitar dicha mezcla e incubar 30 min en oscuridad a 37 oC
- 10) Transcurrido dicho tiempo, cuantificar el valor de absorbancia a 593 nm.

Curva Patrón

Nº TUBO	FeSO ₄ · 7H ₂ O (mL)	Acetona 80% (mL)	Reactivo FRAP (mL)	FeSO ₄ · 7H ₂ O (µg)
1	2.0	0	1	20
2	1.5	0.5	1	15
3	1.0	1.0	1	10
4	0.5	1.5	1	5
5	0.3	1.7	1	3

Con los tubos de la curva patrón se procede como con los de las muestras: se agitan las mezclas, se incuban 30 min en oscuridad a 37 °C y se cuantifica el valor de absorbancia a 593 nm.

El objetivo último es interpolar los valores de absorbancia de los distintos zumos de frutas en la curva patrón para poder calcular para cada zumo de fruta la capacidad antioxidante y expresarla como microgramos de FeSO₄ · 7H₂O/ mL de zumo.



PARTES DE UN MICROSCOPIO ÓPTICO

