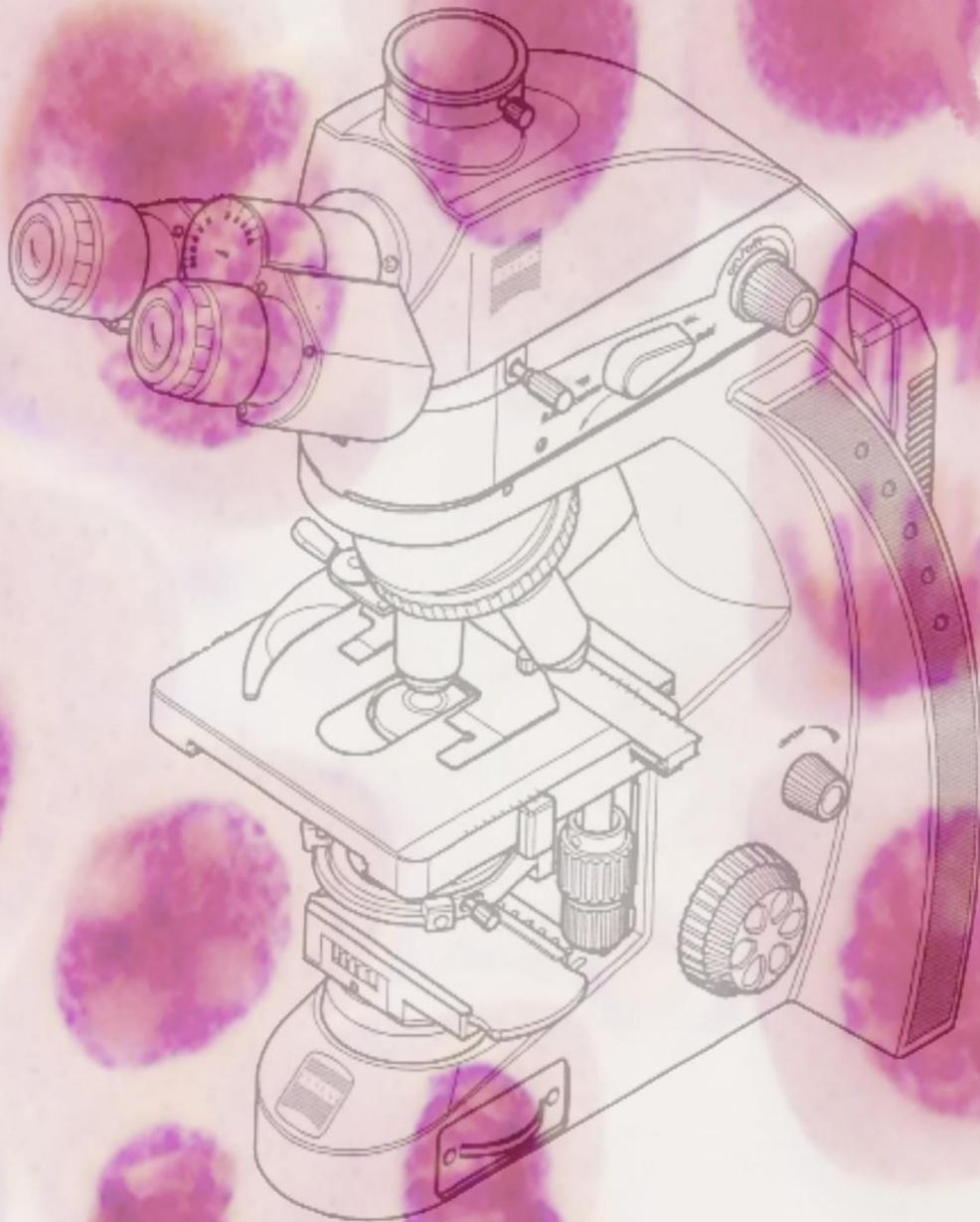


BIOLOGÍA CELULAR

Observaciones y Experimentos



Nancy Jaimes Méndez

Raúl Rodríguez Martínez

Biología Celular: Observaciones y experimentos

1ª edición, 2016

Derechos Reservados © 2016 Universidad de Pamplona

Diagramación y Diseño: Mónica Andrea Jaimes Méndez

ISBN: 978-958-96873-6-9



BIOLOGÍA CELULAR

Observaciones y Experimentos

Nancy Jaimes Méndez

Licenciada en Biología-Química

Maestría en Microbiología

Doctora en Ciencias Médicas Fundamentales

Profesora del Departamento de Biología

Facultad de Ciencias Básicas

Universidad de pamplona

Raúl Rodríguez Martínez

Bacteriólogo y Laboratorista Clínico

Maestría en Microbiología

Doctor en Microbiología y Genética Molecular

Profesor del Departamento de Bacteriología y Laboratorio

Clínico

Facultad de Salud

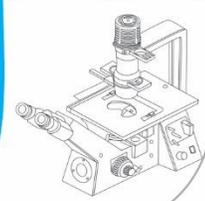
Universidad de pamplona

Tabla de contenido

Capítulo 1	
Microscopía óptica invertida y vertical	5
Capítulo 2	
Estructura de células procariotas con tinciones simples	23
Capítulo 3	
Células de hongos en diferentes sustratos por microscopía óptica	34
Capítulo 4	
Proteínas, lípidos y glúcidos en la membrana plasmática de eritrocitos	49
Capítulo 5	
Vacuolas en protozoos y plantas con tinción de rojo neutro	59
Capítulo 6	
Motilidad celular: Flagelos y Cilios	69
Capítulo 7	
Micrometría celular utilizando el método manual y el programa ImageJ en microscopía óptica	79
Capítulo 8	
Estimación del índice mitótico en el meristemo de las raíces de liliáceas	98
Capítulo 9	
Taller de síntesis de proteínas: Análisis de la secuencia del gen de la alfa actina de musculo cardíaco	110
Agradecimientos	128

Capítulo 1

Microscopía óptica invertida y vertical



➤ Introducción

Los posibles inventores del microscopio compuesto fueron Hans Janssen y Zacharias Janssen en 1590, que consistía en dos lentes soportados en tubos de latón de unos 25 centímetros de largo que se deslizaba dentro de otro, facilitando el enfoque; sin embargo, algunos atribuyen a Galileo Galilei su invención en la primera mitad del siglo XVII, gracias a que él difundió el microscopio y su uso. Los primeros usuarios de los microscopios fueron Marcello Malpighi, de Italia, Antony Van Leeuwenhoek, de Holanda; Robert Hooke y Nehemiah Grew, de Inglaterra. Leeuwenhoek fabricó un microscopio simple en 1632 y Hooke en 1670 utilizó un microscopio compuesto.

Debido a que la mayoría de las células son demasiado pequeñas para ser observadas a simple vista, el estudio de las células ha dependido primordialmente del uso del

microscopio. Es más, el descubrimiento de las células surgió del desarrollo del microscopio: Robert Hooke fue el primero que creó el término de “Células”, haciendo observaciones de corcho con un simple microscopio óptico en 1665. Antony Van Leeuwenhoek en 1670 y años posteriores, utilizando un microscopio que ampliaba los objetos hasta 300 veces su tamaño real, fue capaz de observar diferentes tipos de células. Los estudios microscópicos de tejido vegetal por Matthias Schleiden y los de tejido animal por Theodor Schwann condujeron a la conclusión: “Todos los organismos están compuestos por células”. El microscopio óptico continúa siendo un instrumento básico para la biología celular, que con la implementación de nuevas técnicas permiten la visualización de los detalles aumentados de la estructura celular.

La invención del microscopio invertido se acredita al profesor Lawrence Smith de la Universidad de Louisiana, mejorando el modelo de Chevalier de 1834.

Posteriormente, Nachet, basándose en dibujos de Smith, construye numerosos ejemplares, denominándole microscopio químico. **Figura 1.**

A principios del siglo XX la fabricación de microscopios se concentró en Alemania y en los años sucesivos se desarrolló instrumentos que abrieron muchas posibilidades en el campo de la microscopía, como son la fluorescencia, contraste de fases, interferencia, holografía, luz ultravioleta, rayos X, métodos con electrones y protones, microscopios computarizados para la observación, cuantificación y análisis tridimensional.

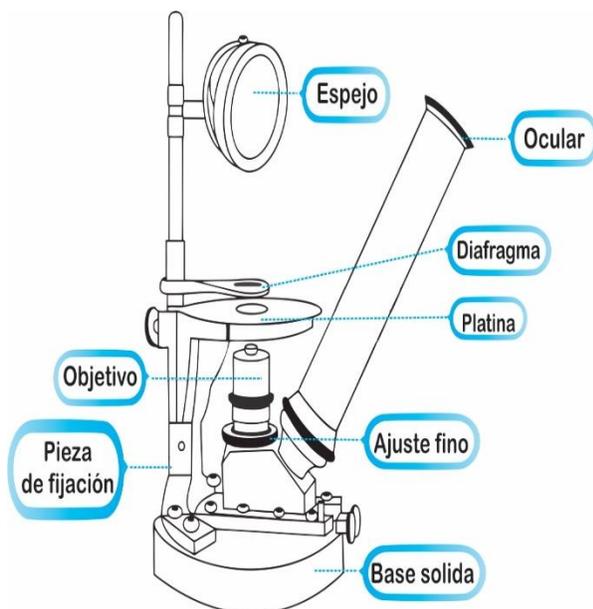


Figura 1: Microscopio invertido químico. Modificado: The Nachet-Smith inverted Chemical Microscope.

➤ Unidades de medida empleadas en microscopía

- **El micrómetro:** (μm), es la unidad de longitud equivalente a una millonésima parte de un metro, abreviado μ (plural latino: micra).

- **El nanómetro:** (nm), es la unidad de longitud que equivale a una mil millonésima parte de un metro. Utilizada además para medir las longitudes de onda de las radiaciones electromagnéticas. Esta unidad se ha hecho importante en el campo de la Nanotecnología, disciplina que estudia materiales cuyas dimensiones son en el orden de escasos nanómetros.

- **El ångström:** (Å), es la unidad de longitud empleada principalmente para expresar longitudes de onda, distancias moleculares y atómicas. Su nombre viene dado por el físico sueco Anders Jonas Ångström. Actualmente su uso en microscopía es restringido, en cierto modo ha sido sustituido por el nanómetro.

➤ Equivalencias

Relaciones entre las diferentes unidades de medida empleadas en microscopía:

1 mm (milímetro) = 1000 μm (micrómetro)

1 μm (micrómetro) = 1000 nm (nanómetro)

1 nm (Nanómetro) = 10 Å (ångström)

1 Å (ångström) = 0.1 nm (nanómetro)

1 Å (ångström) = 0.0001 μm (micrómetro)

➤ Principio de la microscopía óptica invertida y vertical

Existen diversas clases de microscopios, según la conformación, la naturaleza de los sistemas de luz y los elementos para obtener las imágenes.

El microscopio compuesto de uso común también se conoce con el nombre de microscopio óptico vertical, y se basa en que sus propiedades derivan del empleo de lentes ópticas y a que posee la fuente de luz ubicada en la base, por debajo de la platina. El microscopio óptico puede ser monocular, binocular, trinocular (para micrografía).

Por su parte el microscopio invertido es una variante del microscopio óptico convencional (Microscopio vertical), como su nombre lo indica la estructura del microscopio es invertida:

La fuente de luz y el condensador están sobre la platina apuntando hacia abajo de manera que la trayectoria de los rayos de luz se transmiten desde arriba hacia abajo a

través de los objetivos y es alterada por un sistema de espejos de tal manera que llega al ojo desde abajo.

Los objetivos y el revolver están debajo de la platina apuntando hacia arriba. El tubo binocular o trinocular y la muestra se coloca sobre la platina mecánica con igual disposición tanto en el microscopio vertical como en el invertido, así mismo, el principio de funcionamiento y la formación de la imagen son semejante. [Figura 2 a y b.](#)

En el microscopio óptico, una fuente de luz es necesaria para iluminar la muestra, además, se requiere un condensador para concentrar los rayos de luz dispersos, procedentes de la fuente e iluminar la muestra con un pequeño cono de luz con intensidad suficiente para permitir observar las partes muy pequeñas de la muestra luego de la amplificación. Los rayos de luz enfocados sobre la muestra por el condensador también son recolectados por la lente objetivo. El cono de luz derivado de la lente del condensador que atraviesa directamente hacia la lente objetiva, constituye la luz de fondo sobre el campo visual. Los rayos de luz procedentes de la muestra son conducidos al foco por la lente objetivo para formar una imagen real amplificada del objeto observado dentro de la columna del microscopio.

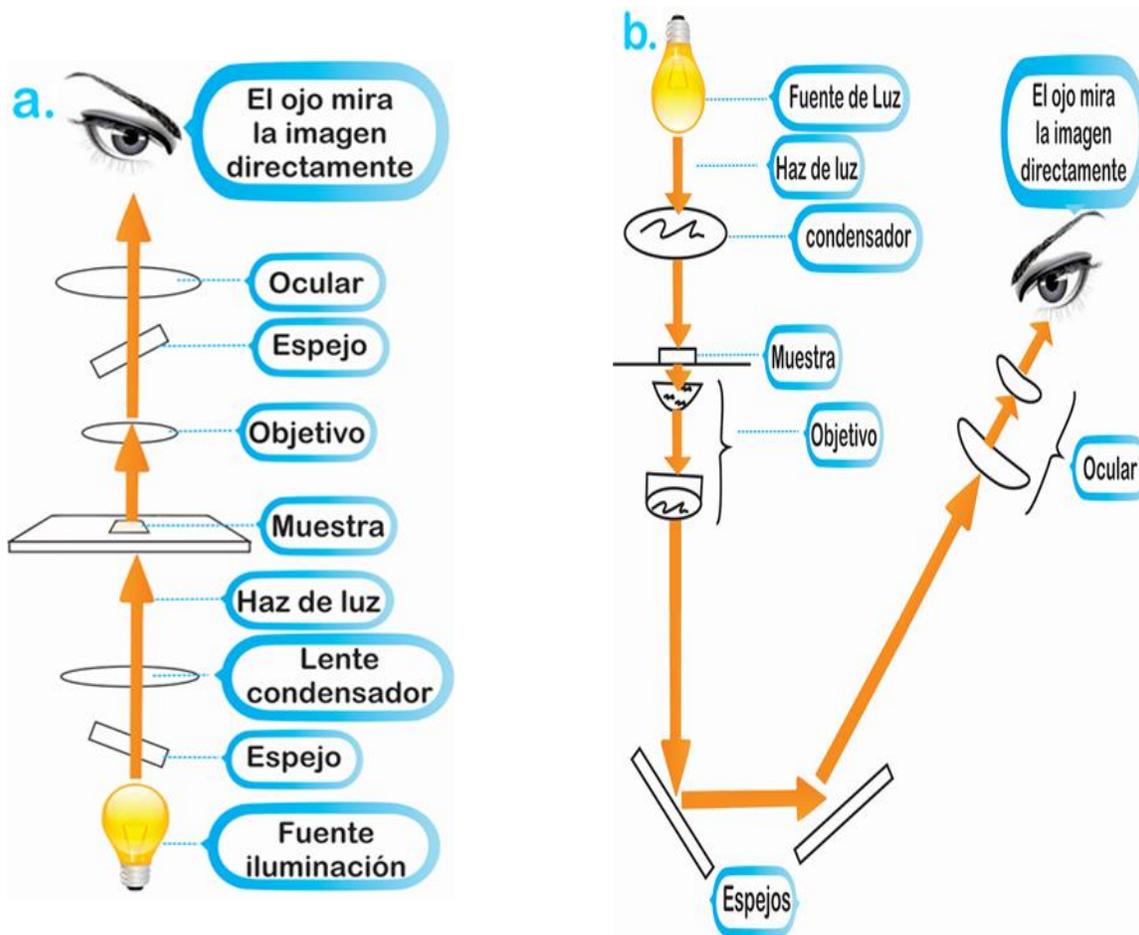


Figura 2. Microscopios ópticos. **a.** Convencional **b.** invertido

La imagen creada por la lente objetivo se emplea entonces por un segundo sistema de lentes, la lente ocular, que utiliza como objeto la imagen formada por la lente objetivo para establecer la imagen virtual amplificada. Un tercer sistema de lentes, localizados enfrente del ojo, usa como objeto la imagen virtual producida por la lente ocular para generar una imagen real sobre la retina. La amplificación total alcanzada por el microscopio es el resultado del aumento producido por la lente objetiva y por la lente

ocular (aumento total). Sin embargo, la propiedad más importante de cualquier microscopio no es el aumento, sino su resolución.

La resolución, se define como la capacidad para distinguir dos objetos o puntos ubicados uno muy cerca del otro en el campo visual como entidades diferentes. Si dos objetos diferentes no están separados por una distancia suficiente, en el mismo campo visual, se verán como uno solo, es decir, no serán resueltos. La resolución de una lente

microscópica es la distancia mínima entre dos objetos que permite distinguirlos como tales; mientras más pequeña sea la distancia, mejor será la resolución.

El límite de resolución del microscopio óptico es aproximadamente de $0.2 \mu\text{m}$, dos objetos separados por menos de esta distancia aparecen como una única imagen, en lugar de distinguirse una de otra, es decir, nunca puede resolver objetos que están separados por menos de $\approx 0.2 \mu\text{m}$.

La resolución está determinada por dos factores, la longitud de onda (λ) de la luz visible, que generalmente es de $0.5 \mu\text{m}$ o 527nm y el poder de captación de luz de las lentes del microscopio, que corresponde a la apertura numérica (AN), por lo general el valor más alto de la apertura numérica es de 1.4. **Figura 3.**

$$\text{Límite de resolución: } \frac{(0.61 \times \lambda)}{AN}$$

$$\text{LR: } \frac{0.61 \times 0.5 \mu\text{m}}{1.4} = 0.22 \mu\text{m}$$

0.61: Constante de proporcionalidad

Figura 3. Límite de resolución del microscopio óptico

➤ Constitución principal del microscopio

Objetivos: Es un sistema de lentes complejos localizados debajo o encima de la platina mecánica. Los objetivos de alto poder (40x, 60x o 100x), utilizados en la microscopía óptica convencional, tienen muy corta distancia de trabajo, generalmente menor de 1mm, por lo tanto, deben acercarse a la muestra para su enfoque. Por el contrario, en el microscopio invertido para las observaciones, se suelen usar recipientes cuyo espesor de fondo difiere considerablemente del espesor de 0.17mm de los cubreobjetos habituales, por tal motivo, los objetivos son adaptados para trabajar a largas distancias, debido a que el grosor de los recipientes impide el contacto estrecho entre el objetivo y la muestra. En la actualidad, existen objetivos denominados de Larga Distancia (LD). Por ejemplo, el objetivo de 40x tiene una distancia de trabajo libre de 2.0mm para espesores de 1mm , de 1.9mm para espesores de 1.2mm y 1.5mm para espesores de 1.8mm .

El objetivo se caracteriza por el tipo de corrección, el material óptico empleado para su construcción, su factor de aumento, su apertura numérica y si está diseñado para

trabajar en campo claro, en contraste de fases, en campo oscuro, polarización o fluorescencia, entre otros.

Los datos grabados en los objetivos proporcionan información relevante que describe las propiedades individuales para su uso correcto, por ejemplo:

Nombre del fabricante: Olympus, Carl zeiss, Leica, entre otros.

Correcciones ópticas: Achro, Achromat (acromáticos), Fluar, Neofluar (semi-apocromáticos), apo (apocromáticos), plan, plano (corrige curvatura de campo).

- **Objetivos acromáticos:** Presentan corrección cromática para la luz azul y roja. La corrección de esfericidad es para el verde. Dan mejores resultados con filtro de luz de color verde y son ideales para micrografía blanco y negro. Se asume que un objetivo es acromático cuando no posee ninguna denominación.

- **Objetivos semi-apocromáticos:** Elaborados a partir de cristales de fluorita. Corrigen para el azul, el rojo y en cierto grado para el verde. La corrección de

esfericidad es para dos colores, el verde y el azul. Dan buenos resultados con luz blanca y están mejor diseñados para la micrografía en colores.

- **Objetivos apocromáticos:** Poseen el más alto nivel de corrección de aberraciones y por ello, son más costosos. Presentan corrección cromática para cuatro colores (azul oscuro, azul, rojo y verde); corrección de esfericidad para dos o tres colores. Son los mejores objetivos para micrografía y video a color. Debido a su alto grado de corrección, estos objetivos poseen mayores aperturas numéricas que los acromáticos y las fluoritas. Esto puede ser un inconveniente puesto que el campo de observación se presenta un poco curvo.

Los tres tipos de objetivos proyectan imágenes con cierta distorsión que se manifiesta como curvaturas y al ser corregidos para este defecto se denominan plan-acromáticos, plan-fluoritas o plan-apocromáticos.

Aumento: El aumento de los objetivos puede ser desde 1x hasta 200x. A cada escalón de aumento está asignado un anillo de color definido. [Figura 4.](#)

Distancia de trabajo (WD): Se denomina así, a la distancia que existe entre la superficie de la laminilla cubreobjetos (preparación) y la lente frontal del objetivo, cuando la imagen está enfocada. Esta distancia será mayor, cuanto menor sea el aumento propio del objetivo y viceversa.

La distancia de trabajo se expresada en milímetros.

Larga distancia (LD): Son objetivos que tienen una distancia de trabajo relativamente larga que permiten el trabajo en recipientes de fondos más gruesos.

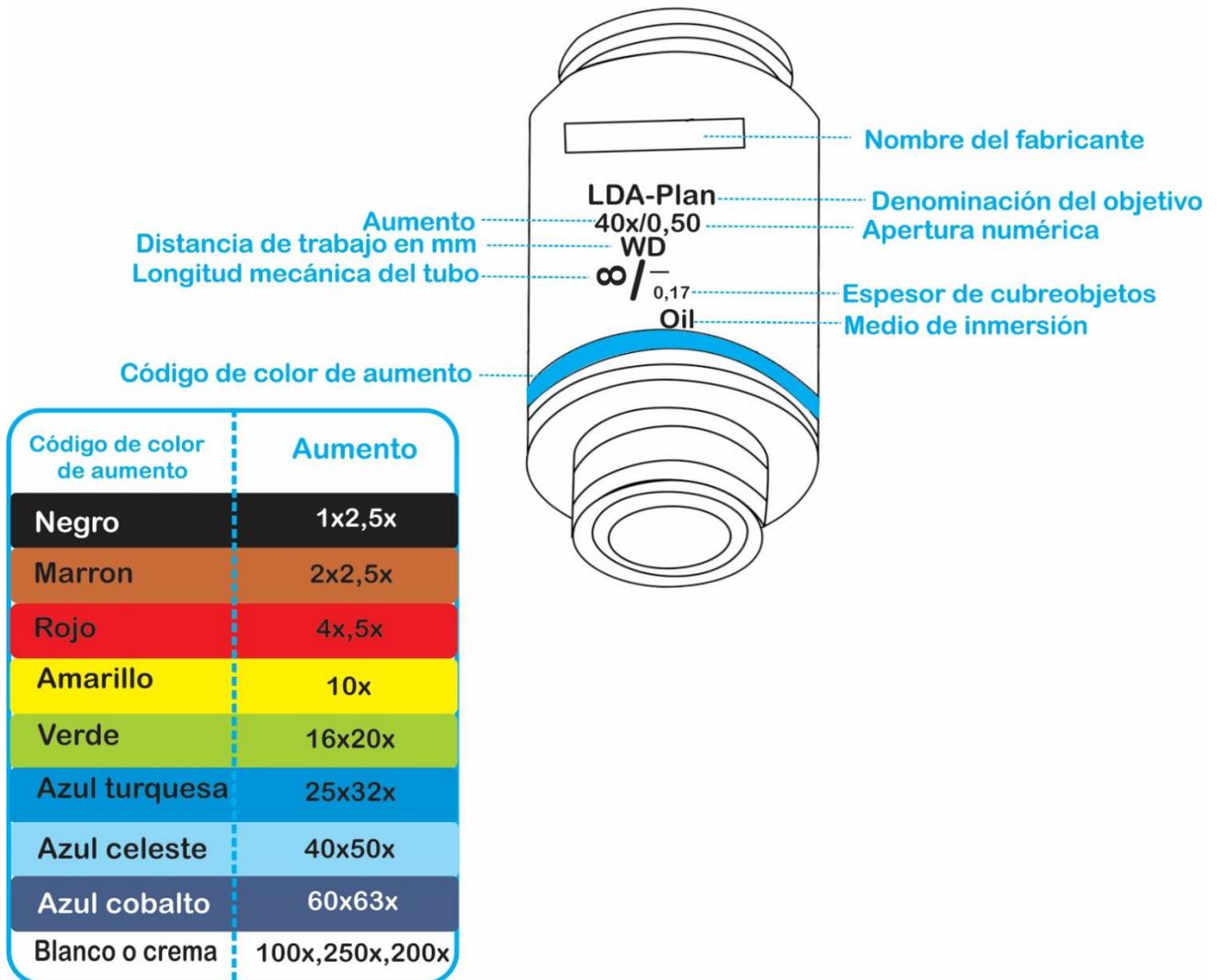


Figura 4. Datos grabados en los Objetivo

Longitud mecánica del tubo: Es la longitud que separa al objetivo del ocular, usualmente en milímetros (160, 170, 220 mm) o con el símbolo infinito (∞) para objetivos con corrección infinita.

Espesor del cubreobjetos: estandarizado a 0.17 mm o una raya (–) que significa que no necesita cubreobjetos. Además, para algunos objetivos es necesario el uso de medios de inmersión y para ello se emplea un código de colores o abreviaciones como se expresa a continuación: color negro u Oil, (aceite), color blanco o W, Water, Wasser (agua), y color naranja o Gly (Glicerol).

Finalmente, la Apertura numérica (A.N) y otras especificaciones cuya nomenclatura depende del fabricante. [Figura 4.](#)

La Apertura Numérica (A.N.): Está normalmente grabada en los objetivos y en las lentes condensadoras; expresa matemáticamente el cono sólido de luz que la lente condensadora arroja sobre la muestra y que capta el objetivo. Cuanto mayor sea la apertura numérica de un objetivo, mayor será la resolución del mismo. Sin embargo, para que se cumpla esta condición es necesario que la A.N. de la lente condensadora sea igual o mayor que la A.N. del objetivo. Por ejemplo, una lente

condensadora con una A.N. 0.55, es insuficiente para aprovechar toda la capacidad de resolución de un objetivo de 100x en aceite de inmersión, cuya A.N. es de 1.25.

➤ **Ocular:** Es el conjunto de lentes de aumento más cercano al ojo con el que el observador visualiza ampliada la imagen real formada por las lentes del objetivo. Además, aplanar y aclarar el campo óptico o plano circular en el que aparece el objeto. La lente superior se denomina lente ocular y es la que produce el aumento de la imagen real del objetivo; la lente inferior se llama colectora, ésta lente aplanar y aclarar el campo.

El ocular produce un aumento adicional a la imagen proporcionada por el objetivo. El valor de este aumento está inscrito en la superficie del ocular y generalmente es de 10x, 12,5x, 15x, 20x o 25x. Posterior al aumento grabado precedido de una diagonal, se encuentra el valor de la cifra de campo que consiste en el diámetro en milímetros de la apertura fija del diafragma, la cual puede variar desde 18mm hasta 26.5 mm. [Figura 5.](#)

Otra de las aplicaciones del ocular consiste en la cuantificación o medición de estructuras del espécimen en estudio.

Campo del microscopio (diámetro del campo visual): Es el círculo visible que se observa en el ocular. También se puede definir como la porción del plano visible observado a través de las lentes. Si el aumento es mayor, el campo disminuye, lo cual quiere decir, que el campo es inversamente proporcional al aumento del objetivo. La forma del campo está determinada por el diafragma fijo del ocular, que generalmente es de forma circular, aunque también puede ser cuadrado.



Figura 5. Datos grabados en el ocular

➤ **Aplicaciones y ventajas de la microscopía invertida respecto al microscopio convencional**

- La microscopía invertida, se emplea para observar células vivas en cultivos celulares o

tejidos, microorganismos y parásitos en condiciones relativamente naturales.

- Se puede colocar un cultivo o muestras grandes en recipientes de diferente grosor que permiten ver todo el contenido en condiciones más naturales (aunque sigue siendo en condiciones *in vitro*), pero son condiciones menos estresantes, porque se puede sostener la vida por un período de tiempo mucho más amplio, ya que el diseño de la tapa de los recipientes evita la evaporación y permiten el intercambio de gas; así mismo, se tiene un mejor control de la temperatura, aunque se pueden evidenciar cambios, ya sean morfológicos o fisiológicos con el paso del tiempo.

- La principal ventaja, del microscopio invertido es poder observar los organismos y tejidos vivos, en comparación con el tratamiento con colorantes “tinción óptica” que es necesario en otros microscopios ópticos, donde las células u organismos pueden morir.

- Facilita monitorear actividades de crecimiento y comportamiento en diferentes tejidos, organismos y muestras en estado natural, disminuyendo las condiciones de estrés, mientras que el microscopio óptico

convencional requiere que la muestra se coloque sobre un portaobjetos de vidrio, normalmente bajo un cubreobjetos; esto generalmente, significa la eliminación de una pequeña muestra de un cultivo y colocarla en un ambiente artificial creado por el portaobjetos y cubreobjetos.

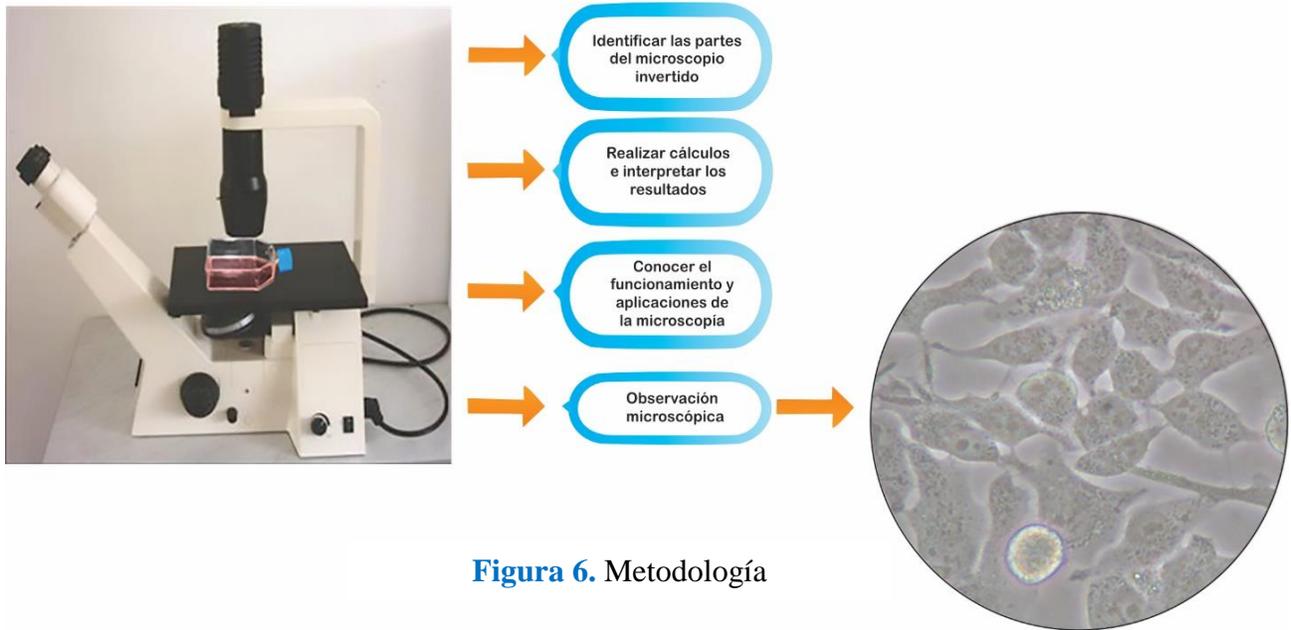
- La temperatura y el contenido de oxígeno de la muestra pueden cambiar rápidamente.

Mientras que en el microscopio óptico, las células o los organismos estarán bajo una presión mayor, en un espacio confinado y antinatural como resultado del cubreobjetos. Por otro lado, la muestra se seca rápidamente por evaporación, a menos que se aplique repetidamente agua, pero ésta adición de agua puede cambiar la salinidad de la muestra. Estos cambios ocasionan estrés severo en las células que pueden afectar su comportamiento y/o matarlas al poco tiempo. En la actualidad, se han propuesto algunas soluciones parciales a estos inconvenientes como son la fabricación de portaobjetos con una pequeña cámara y la técnica de gota colgante para evitar la evaporación, el aumento de la presión y reducir el confinamiento.

- El microscopio invertido, tiene objetivos de alto poder corregidos para una distancia más larga de trabajo, estos objetivos son distinguidos como “LWD” (larga distancia de trabajo) y “ULWD” (Ultra larga distancia de trabajo), que permiten observar a través del fondo de diferentes recipientes, espesores y características ópticas variables, tales como placas de Terasaki, frascos Corning, frascos Roux y cajas de Petri. El material plástico es ópticamente superior que el de vidrio, debido a que es más delgado y uniforme. Adicionalmente, el condensador “ULWD” también permite una distancia larga de trabajo en la cual, los recipientes grandes pueden ser colocados en la platina. Por el contrario, en el microscopio óptico convencional, los objetivos de alto poder (40x y 100x) están optimizados para un espesor específico de un cubreobjetos de vidrio que es bastante delgado (0.17 mm) y suelen tener una distancia de trabajo muy corta, de tal manera, que quedan muy cerca del objeto a enfocar.

➤ **Observaciones y preguntas**

En la [figura 6](#) se esquematiza el procedimiento a seguir para realizar las observaciones.



En la [figura 7](#) coloque los datos gravados en el objetivo del microscopio que está utilizando.

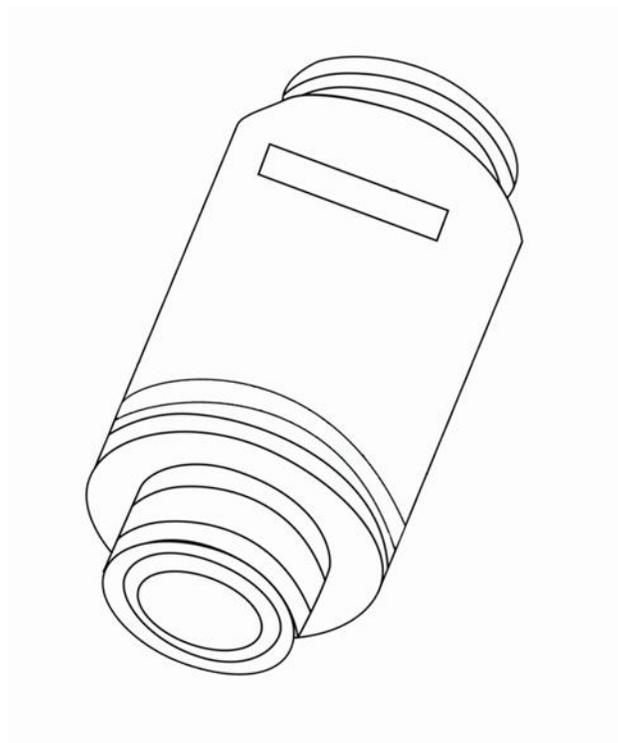


Figura 7. Datos del Objetivo

Identifique e indique en las [figuras 8 y 9](#), las siguientes partes en los microscopios óptico invertido y convencional: 1. Fuente de luz, 2. Condensador, 3. Diafragma, 4. Filtros, 5. Oculares, 6. Tubo binocular, 7. Perilla macrométrica y micrométrica, 8. Revólver porta-objetivos, 9. Objetivos, 10. Platina, 12. Regulador de la intensidad luminosa.

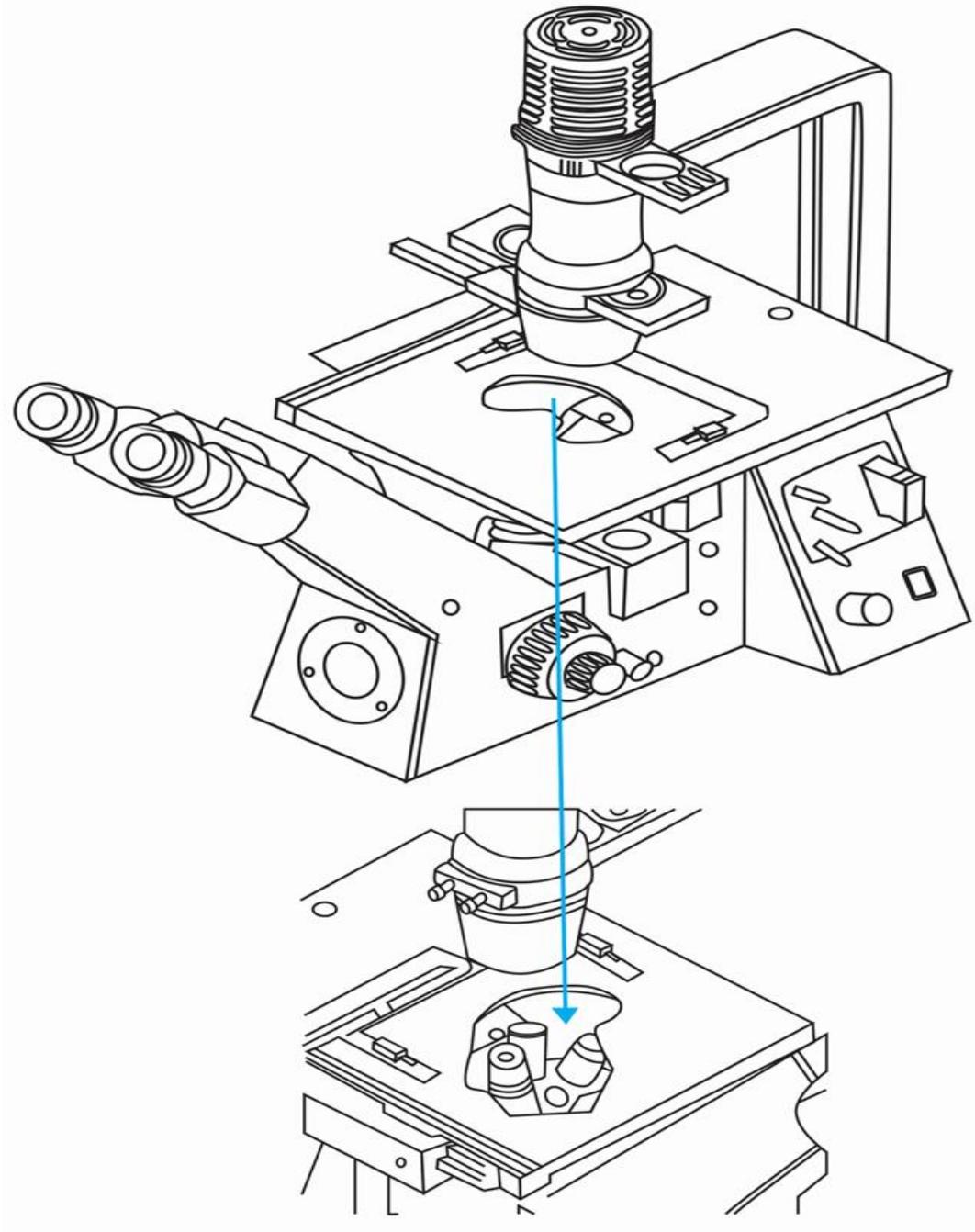


Figura 8: Esquema del microscopio invertido. (Carl Zeiss)

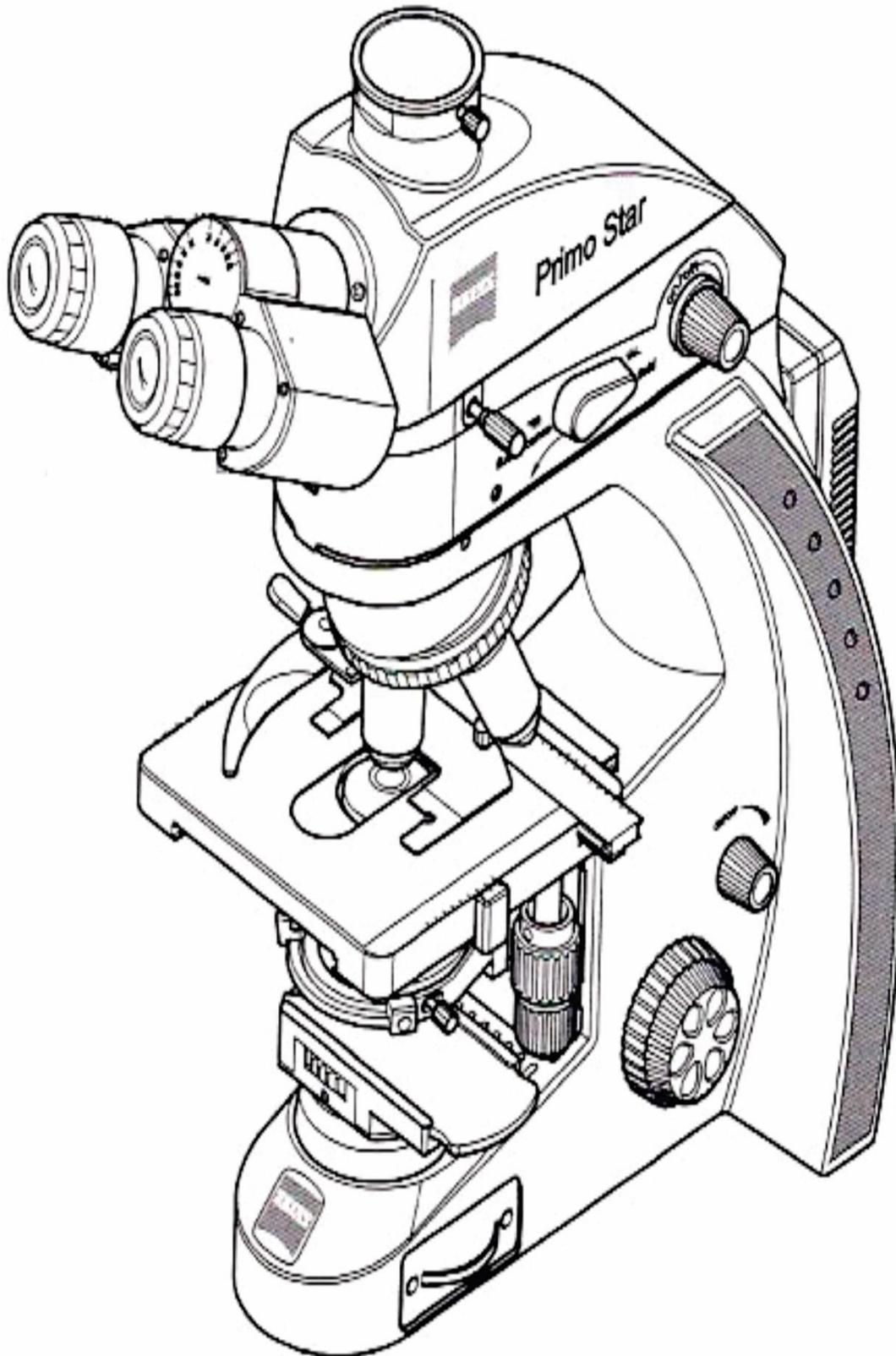
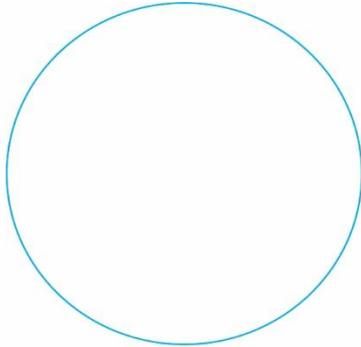


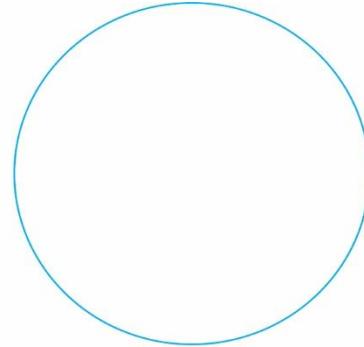
Figura 9: Esquema del microscopio vertical. (Carl Zeiss)

Por medio de la manipulación de las partes del microscopio enfoque el cultivo y el micropreparado celular.



Microscopio óptico vertical

Describe las células



Microscopio óptico invertido

Describe las células

A partir de los datos grabados en los elementos ópticos (ocular y objetivo), se puede calcular el límite de resolución (LR), el poder de resolución (PR), el aumento total (AT) y el diámetro del campo visual (DCV). Tenga en cuenta que la longitud de onda de la luz visible es $0.5\mu\text{m}$ ($\lambda=0.5\mu\text{m}$), A es el aumento y AN es la apertura numérica del objetivo y del condensador. Con la fórmula correspondiente calcule el LR, PR, AT, y

DCV para cada uno de los objetivos del microscopio.

$$LR = \frac{(0.61 \times \lambda)}{AN}$$

$$DCV = \frac{CCO}{A \text{ objetivo}}$$

$$PR = \frac{AN}{(0.61 \times \lambda)}$$

$$AT = A \text{ ocular} \times A \text{ objetivo}$$

AN : Apertura numérica

λ : Longitud de onda

A : aumento

CCO: Cifra del campo visual del ocular

En la [tabla 1](#), registre los cálculos realizados anteriormente.

Tabla 1. Resultados

Ocular		Objetivo		Imagen			
Aumento	Cifra del campo visual	Aumento	Apertura numérica	Aumento total	Límite de resolución	Poder de resolución	Diámetro del campo visual
10x	18 mm	4x	0.1	40x	3.1 μm	0.32 μm	4.5 mm

Concluya al comparar los siguientes datos de la tabla 1:

Apertura numérica/límite de resolución/ poder de resolución

Aumento del objetivo/ Diámetro del campo visual

¿Cuál es el límite de resolución mínimo para el microscopio óptico que utilizó en la práctica?

¿Cuáles son las semejanzas y diferencias entre un microscopio compuesto binocular y un microscopio invertido?

Consulte la definición de límite de resolución, poder de resolución, poder de aumento y campo visual.

Consulte la función del aceite de inmersión (medio de inmersión) en microscopía y los índices de refracción del aceite de inmersión, glicerol, agua, cubreobjetos (vidrio), cultivo de células y aire.

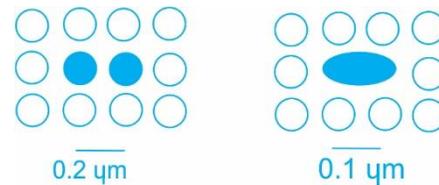
Consulte el límite de resolución para los siguientes sistemas ópticos:

Ojo humano

Microscopía óptica

Microscopía electrónica

Teniendo en cuenta el concepto de límite y poder de resolución, explique el siguiente esquema:



Consulte la función de cada una de las partes del microscopio.

Proponga un esquema metodológico para el estudio de las células por microscopía.

Consulte las variantes actuales del microscopio óptico convencional e invertido.

Realice la lectura del artículo Carl Zeiss, Ernst Abbe, and advances in the light microscope: *Microscopy Today*: 25:4:2017:50-54.

➤ **Bibliografía**

Allen, T. (2015). *Microscopy: A Very Short Introduction*. New York. Oxford University Press.

Carl Zeiss. (2003). *Instrucciones de manejo axiovert 4.0*. Alemania. Microscopios inversos.

Carl Zeiss. (2008). *Instrucciones de manejo Primo Star*. Alemania.

Curtis, H., Barnes, N. S. (2000). *Biología (6ª ed)*. España: Editorial Médica Panamericana.

Freshney, L. R. (2000). *Culture of animal cells: A manual of Basic technique (4ª ed)*. United States of America: Wiley-Liss.

Gómez, R. P. (2003). *Biología celular (2ª ed.)*. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana.

Karp, G. (1996). *Biología celular y molecular (2ª ed)*. México: McGraw-Hill-Interamericana.

Leica. *Glosario de términos ópticos*. Recuperado de http://www.bio-optic.com/introduccion/Glosario_de_terminos_opticos.pdf

Levine, S., Johnstone, L. (2008). *The Ultimate Guide to Your Microscope*. New York. Sterling Publishing Company, Inc.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., ... Darnell, J. (2005). *Biología Celular y Molecular (5ª ed)*. Colombia: Editorial Médica Panamericana.

Montalvo, C. E. (2010). *Microscopía*. Recuperado de http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/Doc/Repaso_I/Apuntes%20bloque%20I/2_microscopia.pdf

Narváez, A. D. *La microscopía: Herramienta para estudiar células y tejidos*. Recuperado de <http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/microscopia.htm>

Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Uría A. M., Fraile, B., Anadón, R., Sáez, F. J. (2003) *Biología Celular (2ª ed)*. España: McGraw-Hill interamericana.

Tecnoedu.com. *Correcciones en ópticas de microscopios y lupas estereoscópicas*. Recuperado de <http://www.tecnoedu.com/Microscopios/Opticas.php>

The Billings microscope collection. Recuperado de <http://campus.usal.es/~histologia/museo/Microscopios/museo28/museo28.htm>

The complete microscope guide. Recuperado de <http://www.microscopemaster.com/history-of-the-microscope.html>

The free dictionary. *Microscope*. Recuperado de <http://encyclopedia2.thefreedictionary.com/Microscope>

Universidad de la República. (2011). *Curso Práctico de Biología Celular*. Recuperado de http://bcelular2.fcien.edu.uy/index_archivos/estudiante_2013.pdf

Universidad Javeriana. *Microscopio Invertido*. Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/minvertido.htm>

Universidad Miguel Hernández de Elche (2005). *Guión de prácticas*. Recuperado de http://retina.umh.es/docencia/confsvivos/practica_1.pdf

Notas

Capítulo 2

Estructuras de células procariotas con tinciones simples



➤ **Introducción**

Las células procariotas son aquellas en las que no existe núcleo (pro: antes de, Karion: núcleo), a estas pertenecen el Dominio Archeobacterias y el Dominio Eubacterias (Bacteria). Adicionalmente, gracias a la técnica de secuenciación del ácido ribonucleico de los ribosomas (ARNr 16S), se ha permitido diferenciar doce grandes linajes del Dominio Eubacteria, dentro de las que se destacan Bacterias Rojas, Bacterias Gram Positivas, Espiroquetas y Cianobacterias, entre otras.

Las células procariotas no tienen un núcleo delimitado por membrana. Generalmente el material genético está organizado en un único cromosoma situado en el citoplasma, dentro de un cuerpo irregular denominado nucleóide. Además, presentan pocas estructuras intracelulares, ya que carecen de mitocondrias, cloroplastos y de los otros orgánulos presentes en las células eucariotas, tales como el aparato de Golgi y el retículo

endoplasmático. Como excepción, algunas bacterias contienen estructuras intracelulares rodeadas por membranas que pueden considerarse orgánulos primitivos, por ejemplo, los tilacoides de las cianobacterias, los compartimentos que contienen amoníaco monooxigenasa en Nitrosomonadaceae y diversas estructuras en Planctomycetes.

En general, el metabolismo de las células procariotas presenta una diversidad extraordinaria, lo que explica que se pueden encontrar bacterias en ambientes muy diversos, e indica el alto grado de organización que se esconde en esa aparente sencillez morfológica. Muchas bacterias presentan vacuolas, gránulos intracelulares para el almacenaje de sustancias, como por ejemplo glucógeno, polifosfatos, azufre o polihidroxialcanoatos. Las cianobacterias, producen vesículas internas de gas que utilizan para regular su flotabilidad y así alcanzar la profundidad con intensidad de

luz y/o unos niveles de nutrientes óptimos. Otras estructuras presentes en ciertas especies son los carboxisomas (que contienen enzimas para la fijación de carbono) y los magnetosomas (para la orientación magnética).

➤ **Morfología bacteriana**

A la forma de una célula se le denomina morfología celular. Las células bacterianas tienen una gran variedad de formas y tamaños, de las cuales se han descrito principalmente cuatro: células esféricas o cocos, células con forma de bastón o bacilos, células en forma de espiral o espirilos y células con forma de coma llamadas vibriones.

Muchas bacterias con las formas descritas anteriormente presentan modelos de agrupamiento que derivan de los diversos planos de división celular. **Figura 1.**

➤ **Cianobacterias**

Es una división del dominio Bacteria y comprende las bacterias capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. Son los únicos procariotas que llevan a cabo ese tipo de fotosíntesis, por ello también se les denomina oxifotobacterias.

a.

Formas esféricas o en Cocos	Ejemplos	Morfología
Diplococos (en pares) 	<i>Neisseria</i>	 División en un solo plano
En cadena	<i>Streptococcus</i>	 División en un solo plano
En tétradas 	<i>Pediococcus</i>	 División en un dos planos
En racimo 	<i>Staphylococcus</i>	 División en tres planos
En cubos	<i>Sarcina</i>	 División en tres planos

b.

Forma en bastones o bacilos	Ejemplos	Morfología
Bacilos en cadena	<i>Bacillus</i>	
Diplobacilos: bacilos en pareja		
En empalizada: dispuestos uno al lado del otro	<i>Corynebacterium</i>	
Cocobacilos: bacilos con extremos ovalados	<i>Haemophilus influenzae</i>	

c.

Otras formas	Ejemplos	Morfología
Vibrio: en forma de coma	<i>Vibrio cholerae</i>	
Espirilos: en forma de hélice rígida	<i>Helicobacter pylori</i>	
Espiroquetas: en forma de hélice flexible	<i>Treponema pallidum</i>	
Filamentosas	<i>Actinomyces</i>	

Figura 1. Morfología Bacteriana. a. formas esféricas. b. formas en bastón. c. otras formas

Se encuentran como células independientes o como colonias pluricelulares filamentosas.

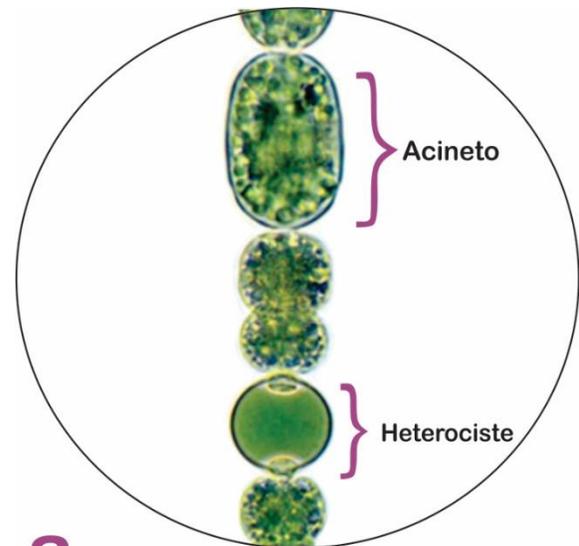
El Manual de Bergey's, divide a las cianobacterias en cinco grupos morfológicos: Unicelulares con división por fisión binaria (*Gloeotheca*), unicelular con división por fisión múltiple colonial (*Dermocarpa*), filamentosas fijadoras de nitrógeno con células diferenciadas llamadas heterocistes (*Anabaena* y *Nostoc*), **Figura 2 a y b** ; filamentosas sin formar heterocistes (*Oscillatoria*) y filamentosas ramificadas (*Fischerella*).

En las cianobacterias filamentosas (que forman tricomas), se puede observar dos tipos principales de células diferenciadas a partir de las vegetativas: heterocistes y acinetos. **Figura 2a.**

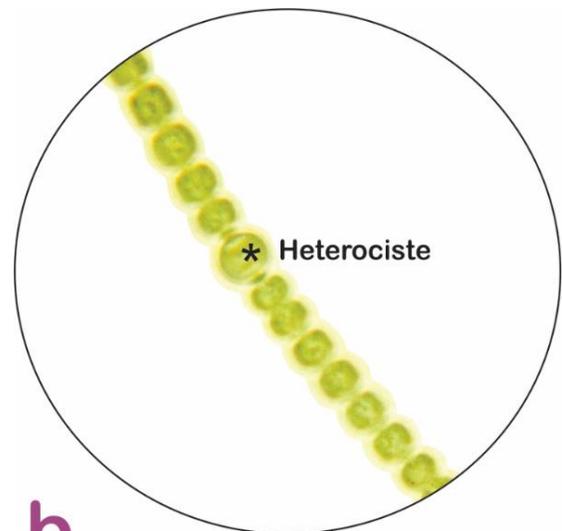
Acineto: una o varias células que ante condiciones adversas generan una capa externa dura que les permite resistir condiciones ambientales desfavorables.

Heterociste: célula observable en algunas cianobacterias filamentosas, especializada en la asimilación del nitrógeno (N_2) atmosférico y en la formación de hormogonios (cada uno de los filamentos en que se dividen los tricomas). Se distinguen por su mayor tamaño, por su contenido traslúcido y por la

presencia de marcas polares refringentes en el punto de unión con las células contiguas.



a.



b.

Figura 2. Cianobacterias filamentosas. a. Cianobacteria con acineto, células vegetativas y heterociste (*Nostoc sp.*) b. Cianobacteria Filamentosa (*Anabaena sp.*). Microscopio óptico 1000x.

➤ **Endospora**

Las endosporas son estructuras esféricas u ovals formadas dentro de ciertas especies bacterianas y representan un estado latente o de reposo en el ciclo de crecimiento de esos microorganismos. **Figura 3.** Las endosporas son altamente resistentes al estrés físico y

químico, tal como calor, presión, sequedad, ácidos, bases fuertes y radiación UV. Las bacterias que forman endosporas se encuentran habitualmente en el suelo, y pertenecen principalmente a los géneros *Streptomyces*, *Clostridium* y *Bacillus*.

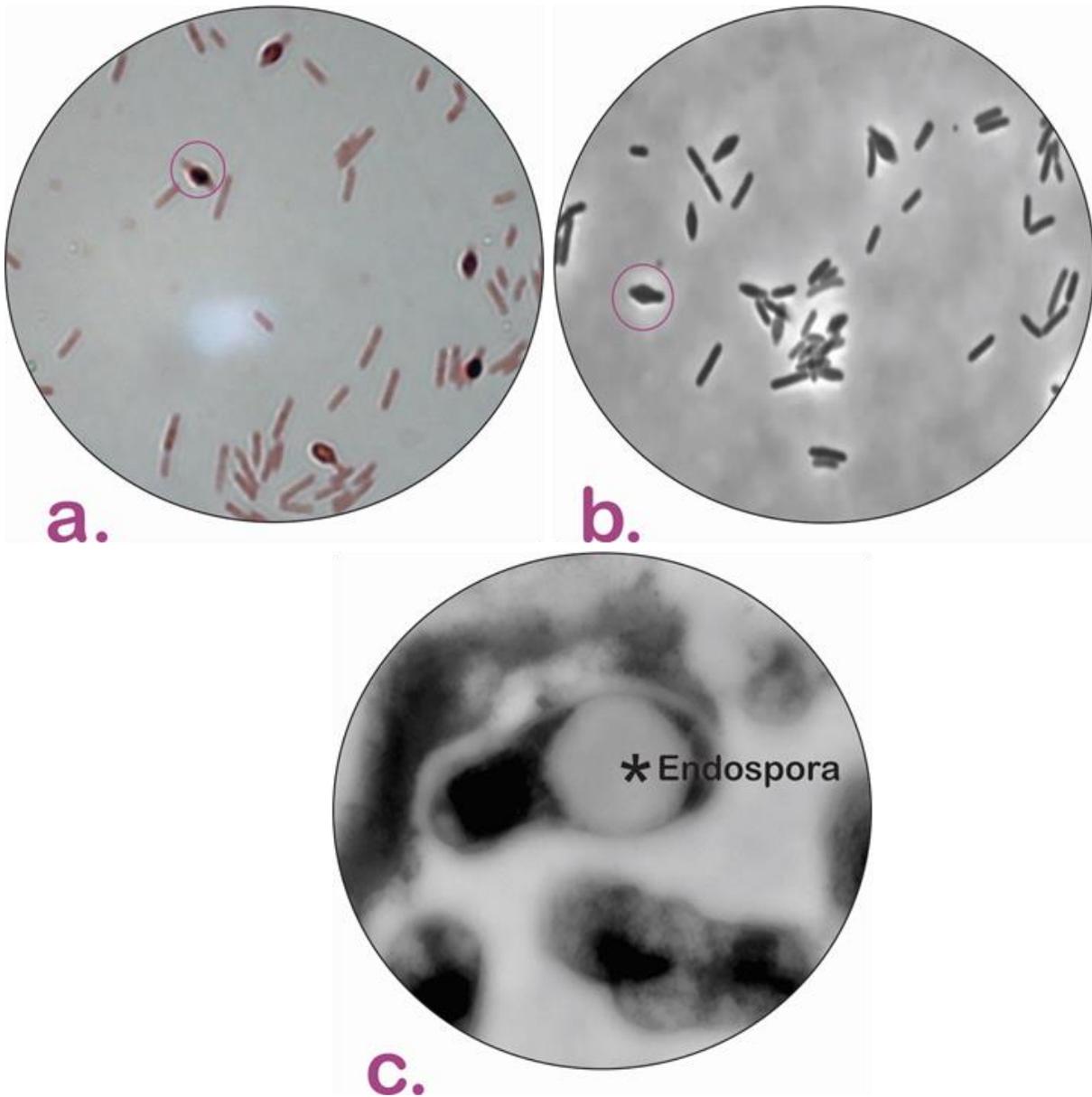


Figura 3. Endosporas de *Paenibacillus sp.* a. Microscopía óptica. b. Microscopía de contraste de fases c. microscopía electrónica de transmisión.

➤ **Observaciones y Preguntas**
Formas de las células procariotas

Preparaciones en fresco

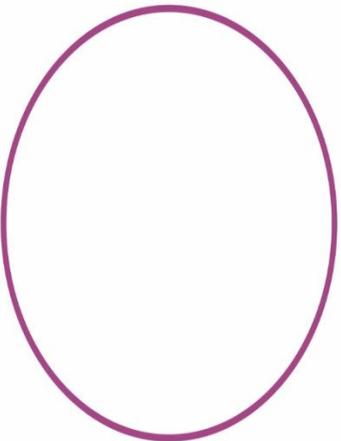
Las preparaciones en fresco se utilizan para observar microorganismos vivos, por ejemplo los que habitan en el agua, los que contiene el yogurt (*Bacillus lacticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus lacti*) y los que causan alguna patología en secreciones corporales, entre otros.

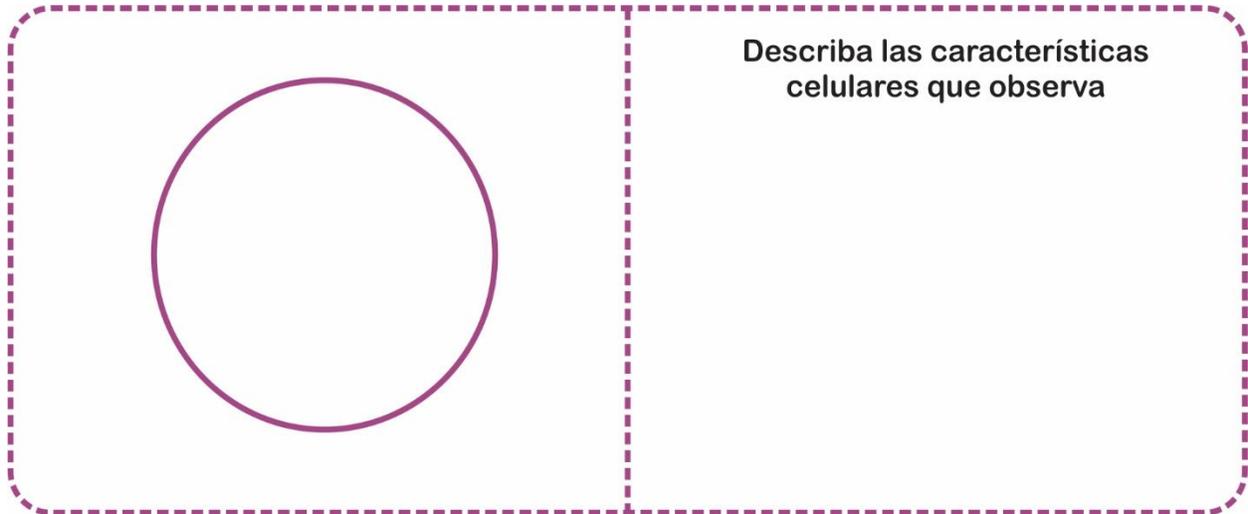
Flamee el asa de siembra y coloque una gota de la muestra (cultivo microbiano, agua residual o yogurt) en el centro del portaobjetos el cual debe estar limpio.

Apoye el cubreobjetos en un ángulo de 45° con relación al portaobjetos y sosténgalo de modo que haga contacto con la muestra líquida, déjelo caer lentamente. De esta manera se evita la formación de burbujas que podrían dificultar la observación. Si queda agua por fuera del cubreobjetos, séquela con papel absorbente.

Observe la lámina al microscopio óptico primero en menor aumento (100x) para dar un enfoque a la muestra, finalmente enfoque en 1000x.

Dibuje lo observado y describa las características celulares.

	<p>Describe las características celulares que observa</p>
---	--



Tinciones simples

Se utiliza un solo colorante por lo que todas las estructuras celulares se tiñen con la misma tonalidad y proporciona contraste lo que permite observar mejor un organismo completo. La tinción se hace con un colorante básico como es cristal violeta, fucsina básica, azul de metileno o nigrosina (tinta china).

Tinción con cristal violeta, fucsina básica o azul de metileno

Esterilice el asa al rojo vivo y déjela enfriar para evitar que los microorganismos sean destruidos.

Haga un extendido por separado de cada cultivo microbiano en la lámina. Si es de un medio sólido, tome en condiciones asépticas, una pequeña cantidad del cultivo bacteriano

y transfíralo a una gota de agua colocada previamente en la mitad del portaobjetos.

Si la muestra procede de un cultivo en medio líquido, basta con colocar y extender una gota de la suspensión bacteriana, que se toma con el asa de siembra, directamente sobre el portaobjetos. Deje secar la muestra a T° ambiente.

Fije la muestra pasando la lámina por la llama del mechero 3 veces.

Realice la tinción adicionando el colorante (azul de metileno o cristal violeta) que cubra todo el frotis y deje actuar por un minuto.

Elimine el exceso del colorante mediante el lavado con agua. En este caso, incline el portaobjetos y aplique el chorro suave de agua en su parte superior, de manera que resbale sobre el frotis, pero sin que vaya

dirigido directamente sobre él, pues lo podría arrastrar.

Deje secar el micropreparado a T° ambiente, limpie el exceso de agua por el reverso del portaobjetos con papel absorbente.

Observe al microscopio con el objetivo de inmersión. **Figura 4.**

Dibuje lo observado y en los recuadros describa las características celulares en cuanto a forma, agrupación, tamaño y estructuras celulares.

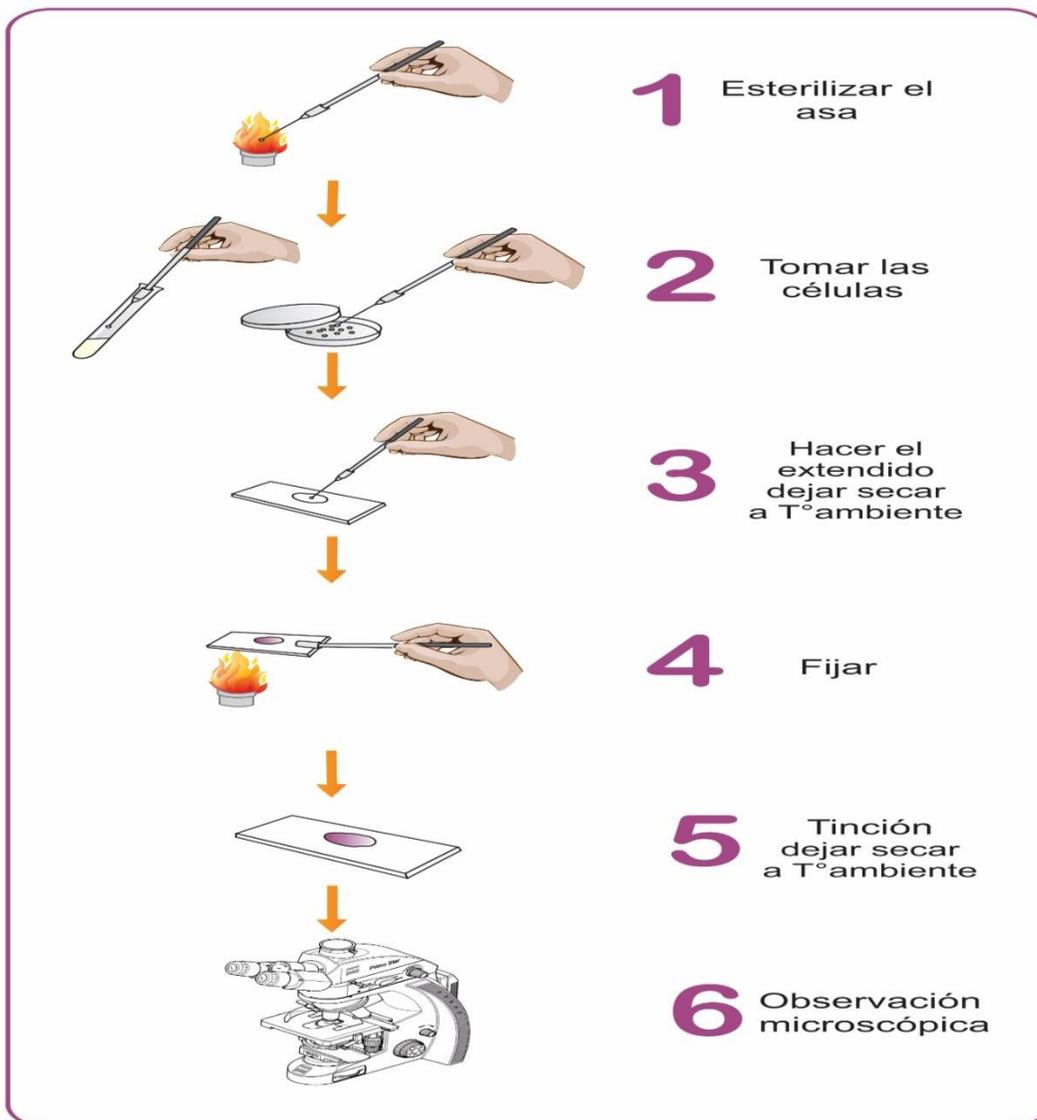
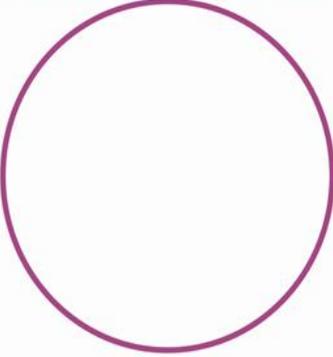
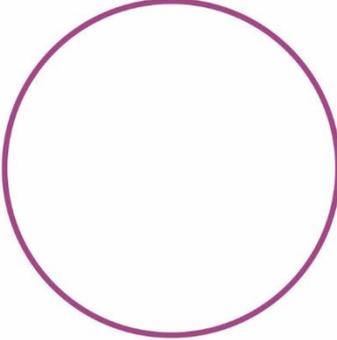
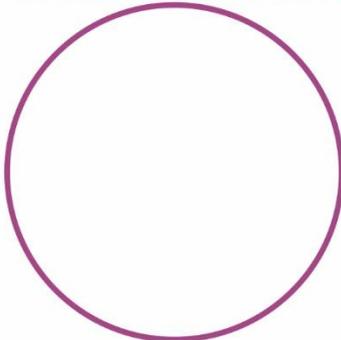


Figura 4. Metodología

	Describe las características celulares que observa
Morfología	
Agrupación	

	Describe las características celulares que observa
Morfología	
Agrupación	

	Describe las características celulares que observa
Morfología	
Agrupación	

**Observación de estructuras procariotas:
Endosporas** (*Clostridium sp.* o *Bacillus sp.*)

Observe el micropreparado al microscopio óptico con el objetivo de menor aumento y luego con el objetivo de inmersión.

Dibuje e indique la estructura procariota que observa.

Describe las estructuras características de las células procariotas.

Dibuje una célula procariota e indique sus estructuras celulares.

¿Cuál es el principal componente químico de la pared celular de las células procariotas?

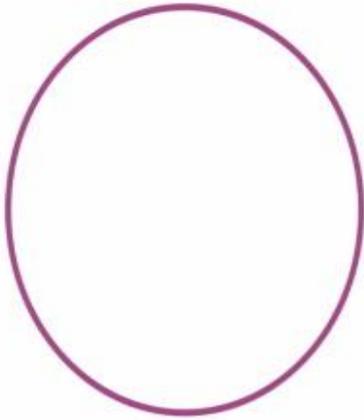
¿Cuáles son las características de la membrana plasmática en células procariotas?

¿Cuál es el fundamento de la tinción diferencial denominada tinción de Gram?

¿Cuál es la diferencia estructural de la pared celular entre las bacterias Gram - y Gram +?

¿Cuáles son las desventajas que tiene la coloración simple?

¿Cuál es la función de la endospora y qué colorantes son usados para la tinción de esta estructura?

	<p>Describe las características celulares que observa</p>
---	--

➤ **Bibliografía**

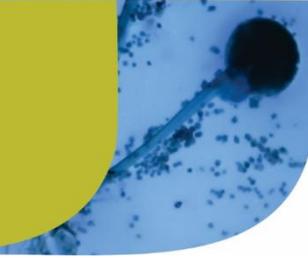
- Berg, J., Tymoczko, J. and Stryer, L. (2011). *Biochemistry (7a ed)*. New York: W. H. Freeman and Company
- Cornelissen, N. (2015). Memorama Microbiología. España. Editorial Lippincott.
- Fuerst, J (2005). *Intracellular compartmentation in planctomycetes*. Annu Rev Microbiol, 59, 299-328.
- García, M. P.; Fernández del Barrio, M. T.; Paredes S. F. (2014). Microbiología clínica aplicada. (3ª Ed). Editorial Díaz de Santos.
- Madigan, M.T., Martinko, J. M., Parker, J. (2015). *Brock Biología de los microorganismos (12ª ed)*. España: Pearson-Prentice-Hall.
- Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Uría A. M., Fraile, B., Anadón, R., Sáez, F. J. (2003) *Biología Celular (2ª ed)*. España: McGraw-Hill interamericana.
- Rodríguez, C. E., Coronado, G. M., Chavarría, H. F., Hidalgo G. J. (2005). *Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio*. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.
- Thanbichler, M., Wang, S., Shapiro, L. (2005). *The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure*. J Cell Biochem. 96(3), 506–521.
- Universidad Complutense de Madrid *Cyanophyta*. Recuperado de http://escalera.bio.ucm.es/usuarios/criptogamas/plantas_criptogamas/materiales/algas/cyanophyta.html
- Universidad de Salamanca. Prácticas de Microbiología. 2º Curso de Biología. Departamento de microbiología y Genética. Recuperado de <http://es.slideshare.net/guestbe57ac709/praticas-de-microbiologia-2-curso-biologia-sp-1796132>.
- Winn, W. C., Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, E. W., Procop, G. W., Schrenckenberger, P. C., Woods G. L. (2008). *Koneman: Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas (6ª ed)*. Bogotá: Editorial medica Panamericana.

Notas

Notas

Capítulo 3

Células de hongos en diferentes sustratos por microscopía óptica



➤ **Introducción**

La micología (del griego *micos*), es el estudio de los hongos. Los hongos son organismos eucariotas con características que los asemejan a las plantas y/o a los animales; es decir, poseen núcleo, mitocondrias, sistemas de endomembranas, tienen una pared formada por quitina y la sustancia de reserva es el glucógeno. Los hongos no sintetizan sus alimentos, ya que no tienen clorofila, son quimioheterotrofos, utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono y de energía. Además, no forman tejidos, sus células son filamentosas (hifas) o globosas (levaduras).

Se estima que el número de hongos presentes en la tierra es de 1.5 millones de especies de las cuales apenas el 5% han sido clasificadas. Este reino tiene aproximadamente 103 órdenes, 484 familias, cerca de 5.000 géneros y unas 80.000 especies descritas. La phyla (a veces llamado divisiones) de los hongos se han clasificado básicamente teniendo en cuenta las características de sus estructuras

reproductivas. Actualmente se proponen siete phyla: Microsporidios, Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Ascomycota, Basidiomycota Neocallimastigomycota y Glomeromycota.

Se puede estudiar los hongos de acuerdo a si son patógenos o benéficos, al lugar que se encuentren, o a la aplicación que se deriva de ellos. De esta manera, se divide su estudio en micología básica, micología médica, micología industrial o micología agrícola, entre otras. La micología básica trata sobre aspectos generales de los hongos, como su estructura, biología, ecología y diversidad. La micología médica versa sobre el estudio de los hongos que producen enfermedades tanto en personas como en animales; hasta el momento se ha descrito que al menos 150 tipos de hongos están relacionados con enfermedades en humanos, algunas enfermedades causadas son la aspergilosis, la candidiasis o la tiña. La micología industrial abarca el estudio de los hongos en procesos industriales, por ejemplo, el uso de las levaduras en la fermentación de bebidas

alcohólicas, de mohos en la obtención de antibióticos y del cultivo de los hongos comestibles. Finalmente, la micología agrícola se encarga de estudiar los hongos que provocan enfermedades en los cultivos, así como los utilizados en el control biológico de plagas (hongos entomopatógenos).

➤ **Morfología de los Hongos**

De acuerdo con su forma, los hongos se clasifican en hongos filamentosos y no filamentosos.

➤ **Hongos filamentosos (Mohos)**

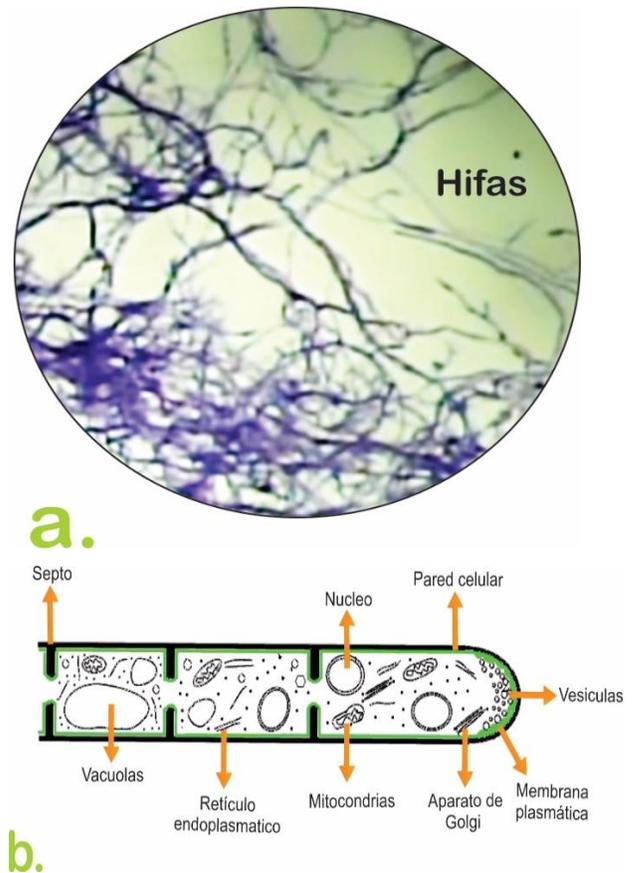
Los mohos se caracterizan por tener núcleo verdadero, carecer de pigmentos fotosintéticos, poseer un micelio con pared celular constituida por glucanos, quitosano y quitina.

Las esporas del moho germinan para producir filamentos largos y ramificados que se conocen como hifas. Las hifas pueden ser: septadas, las que poseen unos tabiques o septos de separación que las dividen en células uninucleadas y las no septadas (cenocíticas) por la ausencia de tabique que separan los núcleos de las células. Las hifas crecen formando una masa ramificada que en su conjunto se llama micelio. **Figura 1a y b.** Los micelios pueden ser a su vez: micelio vegetativo, penetra el sustrato y es el

encargado de la absorción de nutrientes y micelio aéreo, lugar donde se dan las estructuras para la reproducción.

Estructura microscópica y macroscópica de hongos filamentosos

Hifa: son elementos filamentosos cilíndricos característicos de la mayoría de los hongos que conforman su estructura vegetativa. Están constituidos por una fila de células alargadas envueltas por la pared celular que, reunidas, forman el micelio. **Figura 1.**



Esporangio: es una estructura cerrada, a menudo esférica donde se producen esporas asexuadas por división. Ejemplo *Rhizopus sp.* **Figura 2.**

Esporangióforo: una hifa especializada que sostiene el Esporangio.

Conidia: espora producida asexualmente formada por constricción, gemación o división del septo de la hifa.

Conidióforo: Ramificación del micelio en la que se desarrolla las conidias. Ejemplo *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* **Figura 3.**

Fiálide: Estructura con forma de botella, ubicada en el extremo de un conidióforo, sobre la cual se producen esporas. Ejemplo *Penicillium sp.*

La estructura de las esporas de los hongos filamentosas es muy variable y constituye una de las bases de la clasificación. El color de muchos mohos que viven en la materia orgánica en descomposición se debe a sus esporas asexuales. Éstas presentan varias

tonalidades de color como blanco, amarillo, azul, verde, rojo, pardo o negro. **Figura 4.**

La importancia que tienen los hongos es muy amplia. De los hongos medicinales se ha obtenido la penicilina (*Penicillium sp.*), algunos se han empleado en la alimentación como por ejemplo los champiñones (*Agaricus bisporus*), otros son utilizados con un fin estético y ornamental (*Amanita muscaria*). Los hongos psicocibios son empleados en la industria farmacéutica al producir sustancias alucinógenas; en la agricultura son usados como agentes de control biológico de plagas, mientras que otros hongos están presentes en la pudrición de la madera. Se han empleado hongos para producir industrialmente enzimas como las amilasas y proteasas, ácidos como por ejemplo el cítrico, glucónico o el ácido gálico. Sin embargo, algunas especies afectan a humanos y animales al producir micotoxinas o compuestos bioactivos como los alcaloides, así mismo, existen hongos que atacan las plantas y estos pueden poner en riesgo la seguridad alimentaria y el rendimiento de los cultivo.

Tipos de esporas asexuales

Endógenas
(Ascos)

Esporangiosporas: Espora que se encuentra dentro de un esporangio o saco, en el extremo de una hifa aérea llamada esporangióforo. **Figura 2.**

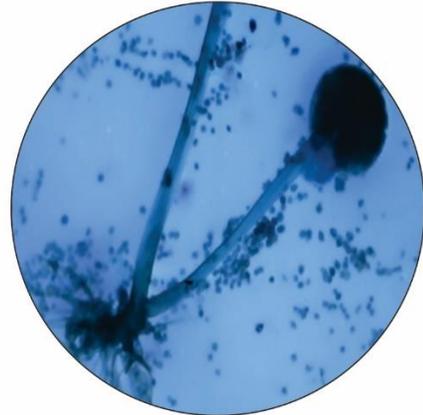
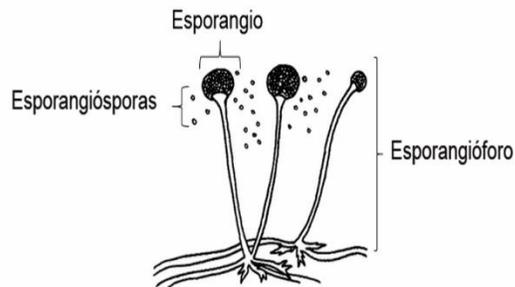


Figura 2. Hongo *Rhizopus* sp.

Zoosporas: Esporangiosporas móviles (flagelos) formadas en estructuras llamadas zoosporangios.

Exógenas

Conidiosporas o conidias: Espora unicelular o multicelular que no está encerrada en un saco.

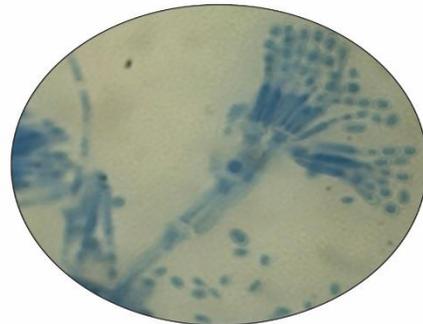
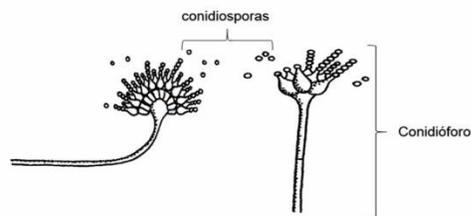


Figura 3. Hongo *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp.

Se forman en la punta o costados de hifas llamadas conidióforos. **Figura 3**
Existen diversos tipos: artrosporas, clamidiosporas, blastosporas

Artrosporas: Conidias formadas por septación y fragmentación de una hifa existente. Los elementos de la hifa se convierten en Conidios. Cada segmento se libera sucesivamente.

Clamidiosporas: Conidias formadas cuando la célula de una hifa intercalar o apical crece, se redondea y forma una pared delgada. Usualmente se desarrolla bajo condiciones de estrés.

Blastosporas: Conidias formadas por gemación a partir de una célula vegetativa (hifa). La espora puede permanecer unida y formar más blastosporas (cadena de esporas).



Figura 4. Estructura macroscópica de *Penicillium sp.*

➤ **Hongos no filamentosos (Levaduras)**

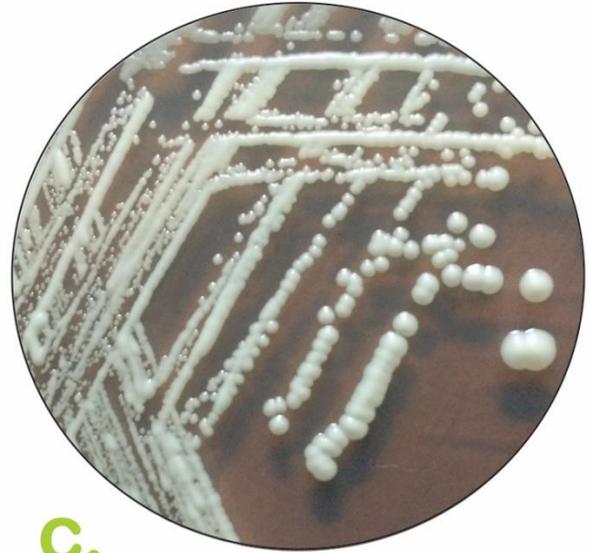
Son hongos unicelulares, las células (blastospora) pueden ser de forma oval, esférica, elipsoide o alargada y en el medio de cultivo forman colonias cremosas. (Figura 5a y b). Las blastosporas se multiplican mediante fisión binaria o por gemación o división asimétrica. Algunas forman Pseudohifas que es una nueva célula que no se separa y que adquiere forma filamentosa. De acuerdo con la especie, nutrición, edad y otros factores, las dimensiones de una blastospora pueden oscilar entre 1 a 9 μm de ancho y de 2 a más de 20 μm de longitud. Vale la pena destacar que algunos hongos fitopatógenos forman colonias levaduriformes en cultivos axénicos y varios patógenos de animales se presentan como levaduras en los materiales clínicos.

Las levaduras pertenecen a dos clases de hongos: ascomicetos o basidiomicetos, aunque muchas de ellas se presentan comúnmente en la forma imperfecta. Un ejemplo de los ascomicetos es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual tiene la facultad de crecer en forma anaerobia realizando fermentación alcohólica. Por parte de los basidiomicetos un ejemplo es la especie *Rhodotorula mucilaginosa* que se caracteriza por la coloración rojo-salmón de sus colonias, lo cual es resultado de la acumulación de pigmentos carotenoides de interés industrial, tales como torularodina, toruleno y β -caroteno. (Figura 5c).

Las levaduras son consideradas generalmente como benéficas cuando se asocian a la industria de alimentos, debido al papel que juegan en la obtención de productos y bebidas fermentables, entre los que se conocen la fabricación de pan y productos de pastelería; producción de alcohol, vino, sidra y cerveza, entre otras bebidas.

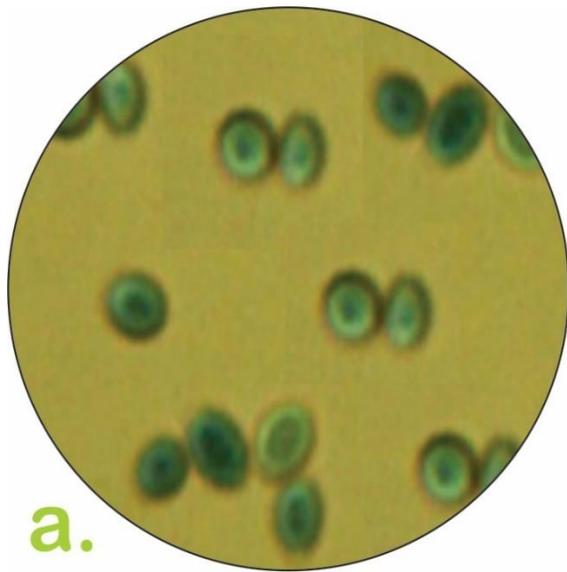
Existen algunas especies de levaduras que pueden causar enfermedades en las plantas, en los animales y en el hombre. La levadura *Nematospora coryli*, puede infectar y producir manifestaciones patológicas en ciertas frutas y verduras. Las principales

infecciones humanas pueden presentarse en la piel (dermatofitosis), en el aparato respiratorio o a nivel intestinal. Un ejemplo es *Candida albicans* que produce con frecuencia infecciones de la piel, uñas y mucosas, y en algunas ocasiones, da origen a infecciones generalizadas de bronquios y pulmones. La levadura *Cryptococcus neoformans* causa una infección sistémica grave que afecta al cerebro y meninges.

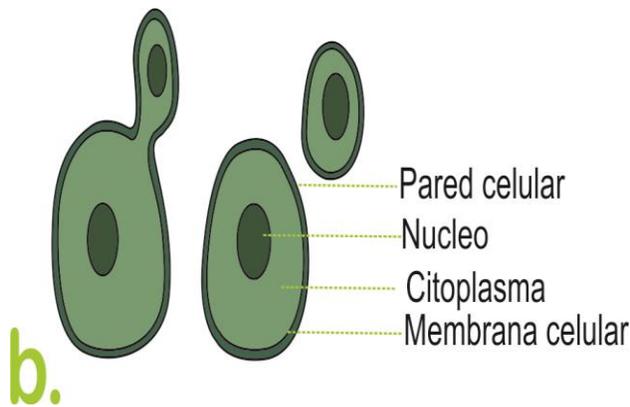


C.

Figura 5. *Saccharomyces cerevisiae*. a. Blastosporas por microscopía óptica. 1000x b. Diagrama de blastosporas en gemación. c. Estructura macroscópica



a.



b.

➤ Observación y preguntas

Observación Macroscópica de Hongos filamentosos y levaduras

La identificación de los hongos se basa en el examen macroscópico de la colonia presente en el medio de cultivo, así como en sus características microscópicas. Respecto a las características macroscópicas se debe tener en cuenta la forma de la colonia, el color de la superficie, la textura y la producción de pigmentos. En los medios de cultivo las levaduras forman colonias húmedas, cremosas opacas o pastosas y los hongos filamentosos producen colonias algodonosas, lanosas o pulverulentas.

A cada grupo se entregará cultivos que contienen los siguientes hongos: *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa*.

Observe con detalle cada una de las cepas crecidas y describa las características de la colonia teniendo en cuenta la siguiente **tabla 1**.

Tabla 1. Características macroscópicas de la colonia

Características macroscópicas	Hongos filamentosos	Hongos levaduriformes
Apariencia	Aterciopelada Algodonada Pulverulenta	Creмоса Opaca Pastosa
Color	Colonia reverso, pigmento del medio	
Tamaño	Diámetro de la colonia	

Observación microscópica

Coloque una gota de azul de lactofenol en un portaobjetos limpio.

Tome una pequeña cantidad de micelio o colonia cremosa de cada uno de los cultivos con el asa o cinta pegante, procurando

arrancarlo desde la base y colóquelo con cuidado sobre la gota de colorante. Con ayuda de agujas o de un asa recta distribuya el material en la gota de manera que no quede amontonado.

Coloque sobre la preparación la lámina cubre objeto, empezando por un lado para evitar que se formen burbujas entre los dos vidrios.

Observe al microscopio con los objetivos de 10x, 40x y 100x, si es necesario.

Realice esquemas e identifique las células de los hongos observadas.

Repita los dos pasos iniciales para realizar el micropreparado de la colonia de levaduras.

Para cada uno de los cultivos asignados, haga el reporte en la tabla 2 de las diversas colonias en cuanto a color, tamaño y apariencia, tal como se indica en la tabla 1.

Tabla 2. Resultados

Nombre científico del Hongo:

Características macroscópicas	Hongos filamentosos	Hongos levaduriformes
Color		
Tamaño		
Apariencia		

Nombre científico del Hongo:

Características macroscópicas	Hongos filamentosos	Hongos levaduriformes
Color		
Tamaño		
Apariencia		

Nombre científico del Hongo:

Características macroscópicas	Hongos filamentosos	Hongos levaduriformes
Color		
Tamaño		
Apariencia		

Nombre científico del Hongo:

Características macroscópicas	Hongos filamentosos	Hongos levaduriformes
Color		
Tamaño		
Apariencia		

Nombre científico del Hongo:

Características macroscópicas	Hongos filamentosos	Hongos levaduriformes
Color		
Tamaño		
Apariencia		

Nombre científico del Hongo:

Características macroscópicas	Hongos filamentosos	Hongos levaduriformes
Color		
Tamaño		
Apariencia		

Observación de hongos en diferentes sustratos: Hojas, tallos, frutas, entre otros

Una semana antes de la práctica, seleccione fragmentos de tallos, hojas, frutas maduras o pan y colóquelos en una cámara húmeda.

Para construir la cámara húmeda, coloque en una bolsa plástica o recipiente plástico un algodón embebido en agua. Posteriormente, deposite residuos de hojas, tallos, frutas o pan y se mantenga el recipiente cerrado a temperatura ambiente. **Figura 6.**

Lleve al laboratorio la cámara húmeda el día de la práctica.

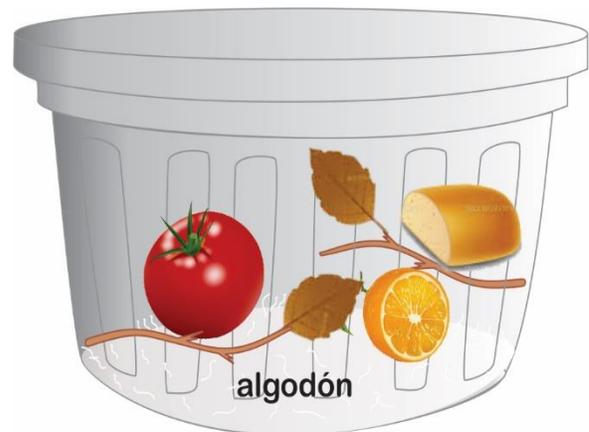


Figura 6. Cámara húmeda

Con el asa recta o con cinta pegante, tome muestras de los hongos que crecieron en los residuos que están en la cámara húmeda y

prepare las placas utilizando el colorante azul de lactofenol.

Observe al microscopio óptico con los objetivos de 10x y 40x.

Realice esquemas e identifique las estructuras de los hongos observadas.

Compare las células observadas con las estructuras de los hongos que se encuentra en los atlas de micología descritas en la bibliografía.

Observación de hongos en muestras de suelo.

Ponga aproximadamente 150 gramos de tierra en un recipiente plástico o de vidrio.

Sumerja dos portaobjetos limpios en una solución de gelatina sin sabor, deje que se solidifique hasta que cubran con una película delgada uno de los lados del portaobjetos.

Luego, introduzca el portaobjetos en la tierra del recipiente, dejándole afuera una pequeña porción.

Cubra el recipiente con un plástico transparente, perfórelo para permitir la entrada del aire e incube a temperatura ambiente durante una semana. **Figura 7.**



Figura 7. Montaje en tierra

Lleve el montaje el día de la práctica. Remueva el portaobjetos teniendo cuidado de no dañar la película que será teñida (uno de los lados del portaobjetos).

Fije la película al calor; limpie suavemente y elimine las partículas grandes de tierra del lado del portaobjetos que será teñida.

Después que los portaobjetos estén limpios, sumérjalos en ácido acético durante uno a tres minutos.

Realice la tinción con violeta de genciana durante 5 a 10 minutos.

Lave con agua para eliminar el exceso de colorante y deje secar al aire.

Observe al microscopio con los objetivos de 40x y 100x.

Dibuje e identifique las células de los hongos observadas.

Compare y describa las células observadas con las estructuras de los hongos que se encuentra en los atlas de micología en la bibliografía.

En la siguiente tabla realice el dibujo y describa las estructuras y las características de las células de los hongos que observa en los micropreparados de los cultivos y los encontrados en hojas, pan, frutas y tierra.

	<p>Describe las características celulares que observa</p>
	<p>Describe las características celulares que observa</p>
	<p>Describe las características celulares que observa</p>

	<p>Describe las características celulares que observa</p>
	<p>Describe las características celulares que observa</p>

Consulte la estructura de los siguientes hongos: *Penicillium*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*.

Defina el término esporas

Consulte enfermedades en humanos y animales que son causadas por hongos.

¿Qué productos biotecnológicos se pueden obtener por la acción de los hongos?

¿Cuáles son los componentes químicos de la pared celular en los hongos?

Realice el diseño de un micropreparado de una muestra de yogurt y describa las células de hongos que participan en el proceso de fermentación.

¿Cuáles son los mecanismos de división celular fúngica?

¿Qué eventos moleculares regulan la división celular por gemación?

Realice una tabla con la clasificación general de los hongos

➤ **Bibliografía**

Alexopoulos, J. C., Mims W. C., Blackwell M. (1996) *Introductory Mycology*. (4^a ed). New York: John Wiley & Sons, Inc.

Anaissie E. J., McGinnis M. R., Pfaller M. A. (2009). *Clinical Mycology*. (2^a Ed). China. Elsevier Health Sciences.

Arenas G. R. (2011). *Micología Médica Ilustrada* (4^a Ed). México. McGraw Hill.

Hibbett D. S., Binder M., Bischoff J.F, Blackwell M, Cannon P.F, Eriksson OE. (2007). A higher level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111 (5), 509–547.

Moore D., Robson G. D., Trinci A. P. (2011). *21st Century Guidebook to Fungi*. New York. Cambridge University Press.

Kirk M. P., Cannon F. P., Minter W. D., Stalpers J. A. (2011). *Dictionary of the Fungi*. CABI Publishing.

San-Blas G., Calderone R. A. (2008). *Pathogenic Fungi: Insights in Molecular Biology*. Washington. Caister Academic Press.

Saldarriaga O. Y., Pineda G. F. (2001). *Manual de micología aplicada*. Medellín. Editorial Universidad de Antioquia.

Zheng Y.T., Toyofuku M., Nomura N., Shigeto S. (2013). Correlation of Carotenoid Accumulation with Aggregation and Biofilm Development in *Rhodococcus sp.* SD-74. *Anal. Chem*, 85(15), 7295-7301.

Atlas de micología. Recuperado de: <http://www.telmeds.org/atlas/micologia/>

Mycology online. Photo Galleries. The University of Adelaide. Recuperado de: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/>

Atlas de micología. Recuperado de: <http://atlasmicologia.blogspot.com/>

Álvarez Y. M. Hongos. Recuperado de: http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/acy m/Hongos_completo.pdf

McCoy P. Radical mycology. Recuperado de: : <http://radicalmycology.wordpress.com/>

The www virtual library: Mycology: Recuperado de: <http://mycology.cornell.edu/>

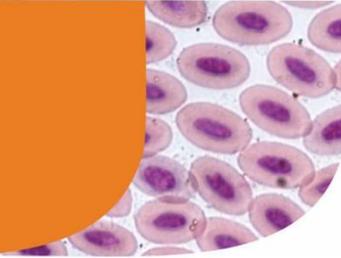
Bonifaz, A. (2016). *Micología médica básica*. (5^a Ed). México. McGraw-Hill.

Arenas, R. (2014). *Micología médica ilustrada*. (5^a Ed). México. McGraw-Hill.

Notas

Capítulo 4

Proteínas, lípidos y glúcidos en la membrana plasmática de eritrocitos



➤ **Introducción**

Para llevar a cabo las reacciones químicas necesarias en el mantenimiento de la vida, la célula necesita mantener un medio interno apropiado. Esto es posible porque las células se encuentran separadas del mundo exterior por una membrana limitante, conocida como membrana plasmática. Todas las células, tanto procariotas como eucariotas están rodeadas por la membrana plasmática, que es una barrera física que separa el medio celular interno del externo. En las células eucariotas, y en algunas procariotas, también hay membranas intracelulares que delimitan a los orgánulos, separando la luz del orgánulo del citosol.

Cada tipo de membrana está especializada en una o varias funciones determinadas dependiendo del compartimento celular donde se encuentre. Entre las diversas funciones que realiza la membrana está la creación de gradientes iónicos, los cuales hacen sensible a la célula frente a estímulos

externos que permiten la transmisión de información (señalización celular), la producción de ATP por el paso de electrones a través de la cadena transportadora de electrones en la membrana mitocondrial interna y en general mecanismos del transporte selectivo de moléculas.

La presencia de membranas internas en las células eucariotas proporciona compartimientos intracelulares (por ejemplo, la membrana nuclear que encierra el ADN) que limitan ambientes únicos en los que se llevan a cabo las actividades bioquímicas de la célula, necesarias para su supervivencia. En las membranas se disponen múltiples receptores que permiten a la célula "sentir" la información que viaja en forma de moléculas por el medio extracelular (comunicación intercelular), por ejemplo, en las neuronas y células musculares. Además, poseen enzimas asociadas que realizan numerosas actividades metabólicas, como la síntesis de celulosa, fosforilaciones, producción de energía y síntesis de lípidos,

entre otras. También la adhesión celular a la matriz extracelular a otras células en los tejidos animales se debe a las moléculas presentes en la membrana plasmática.

Parte de las funciones de la membrana se deben a sus propiedades físicoquímicas, ya que es una estructura fluida que hace que sus moléculas tengan movilidad lateral, como si se tratase de una lámina de líquido viscoso; es semipermeable, por lo que puede actuar como una barrera selectiva frente a determinadas moléculas (mecanismos de transporte); posee la capacidad de ser rota y fusionada de nuevo sin perder su organización, es una estructura flexible y maleable que está en permanente renovación, es decir, eliminación y adición de moléculas que permiten su adaptación a las necesidades fisiológicas de la célula.

El espesor de las membranas varía entre los 6 y los 10 nm, lo cual indica que no son exactamente iguales. Las membranas celulares están formadas por lípidos, proteínas y, en menor medida, por glúcidos. La organización de las membranas celulares, así como sus propiedades fisiológicas y estructurales dependen de la proporción y del tipo de moléculas que las componen. Los lípidos son moléculas anfipáticas, con una

parte hidrofílica y otra hidrofóbica, que se disponen formando una bicapa lipídica donde las partes hidrofóbicas (ácidos grasos) se encuentran en el centro de la membrana y las hidrofílicas (glicerol, grupo fosfato y otros radicales) en contacto con el agua. Entre los lípidos se insertan las proteínas denominadas integrales o transmembrana, que poseen secuencias de aminoácidos hidrofóbicos entre las cadenas de los ácidos grasos de los lípidos, y secuencias de aminoácidos hidrofílicos que están con la solución acuosa intra y extracelular. También hay proteínas asociadas a una u otra superficie de la bicapa lipídica. Los glúcidos no están en todas las membranas, por ejemplo en algunas membranas intracelulares, pero son abundantes y se localizan en la superficie extracelular de la membrana plasmática que limita la célula con el medio externo.

Por supuesto, los lípidos, proteínas y glúcidos son grupos heterogéneos de moléculas, así mismo, como se describió anteriormente, las membranas están en una constante renovación que permite a la célula cambiar su composición y proporción de sus componentes. Por ejemplo, la membrana de los eritrocitos de rata contiene un 50 % de lípidos, un 40 % de proteínas y un 10 % de

glúcidos. Una proporción similar a ésta es la más común entre las membranas plasmáticas de todas las células animales, con algunas excepciones, por ejemplo, la mielina formada por las membranas plasmáticas de las células de Schwann, que rodean a los axones situados fuera del sistema nervioso central, contienen un 80 % de lípidos y un 20 % de proteínas. Las membranas intracelulares suelen contener una mayor proporción de proteínas que la membrana plasmática. La mayor diferencia la encontramos en las mitocondrias donde el porcentaje de proteínas de su membrana interna llega hasta el 80 %.

Los glúcidos (Oligosacáridos) presentes en las membranas no se encuentran libres, como ocurre con los glucosaminoglucanos en la matriz extracelular, sino que están unidos covalentemente a los lípidos (principalmente esfingolípidos) formando los glucolípidos y a las proteínas haciendo parte de las glucoproteínas de membrana, mediante enlaces glucosídicos tipo O (con el aminoácido serina) o tipo N (con el aminoácido asparagina). Tanto glucolípidos como glucoproteínas son más abundantes en la membrana plasmática, preferentemente localizados en la monocapa externa, estabilizando la posición de éstas biomoléculas dentro de la membrana. Los

glúcidos de las membranas se ensamblan principalmente en el aparato de golgi, aunque también en el retículo endoplasmático. Al conjunto de glúcidos localizados en la membrana plasmática se les denomina glucocálix y el grado de desarrollo depende del tipo celular.

Los glúcidos tienen papeles importantes en el funcionamiento celular, fundamentalmente actúan como lugares de reconocimiento y unión. Por ejemplo, los grupos sanguíneos vienen determinados por glúcidos de la membrana (antígenos presentes en la membrana celular de los eritrocitos), cuya función está relacionada con la capacidad de respuesta inmunitaria y estabilidad inmunológica a la superficie celular. Cuando se produce una infección, las células endoteliales próximas exponen una serie de proteínas llamadas selectinas que reconocen y unen sacáridos de los linfocitos circulantes en el torrente sanguíneo y permiten su adhesión y el cruce del propio endotelio para dirigirse hacia la zona infectada. El reconocimiento celular mediado por los glúcidos es también muy importante durante el desarrollo embrionario. Son también unos de los principales lugares de reconocimiento por parte de los patógenos para unirse e infectar a las células.

Los virus como el de la gripe, bacterias patógenas como *E. coli* y protozoos patógenos deben adherirse a la superficie celular para infectar, de otra manera serán eliminados por los mecanismos de defensa del organismo. Estos patógenos poseen unas proteínas de membrana denominadas lectinas que tienen afinidad por determinados azúcares o cadenas de azúcares y por tanto sólo reconocerán a las células que los posean. La selectividad en la infección de determinados tipos celulares depende de la composición de azúcares de su glucocálix. Existen diferencias entre los glúcidos de la membranas de vertebrados, invertebrados y protozoos.

Las cadenas de carbohidratos de las glucoproteínas y de los glucolípidos en la membrana plasmática se extienden hacia el espacio extracelular (asimetría) y están disponibles para interactuar con componentes de la matriz extracelular al igual que las lectinas, los factores de crecimiento y los anticuerpos. Una consecuencia importante de tales interacciones se ilustra con los antígenos de los grupos sanguíneos A, B y 0. Estos tres componentes oligosacáridos estructuralmente relacionados con ciertas glucoproteínas y glucolípidos se expresan en la superficie de los eritrocitos humanos y en

otros tipos celulares. Los antígenos de los grupos sanguíneos AB0 son cadenas de oligosacáridos unidos en forma covalente a glucolípidos o glucoproteínas en la membrana plasmática. Los azúcares terminales de los oligosacáridos distinguen a los tres antígenos. La presencia o ausencia de las glucosiltransferasas que añaden galactosa o N-acetilgalactosamina al antígeno del 0 determina el tipo de sangre.

Figura 1.

La determinación de los diferentes grupos sanguíneos se basa en la aglutinación, que se produce en los eritrocitos, cuando se ponen en contacto con anticuerpos plasmáticos aglutinantes (aglutininas) específicos contra los antígenos de su superficie (aglutinógeno), este proceso se denomina hemoclasificación. Las diferentes especies de animales presentan los siguientes grupos sanguíneos. **Tabla 1.**

Tabla 1. Grupos sanguíneos

Especies	Grupo sanguíneo (Antígeno de la superficie de los eritrocitos)
Humanos	A, B, AB, 0
Chimpancés	A, mínimo 0
Gorilas	B, mínimo 0
Caninos	Sistema DEA (Dog erythrocyte antigen): DEA-1.1 (A1), DEA-1.2 (A2), DEA-3 (B), DEA-4 (C), DEA-5 (D), DEA-6(F), DEA-7 (Tr), DEA-8 (He).
Felinos	A, B, AB

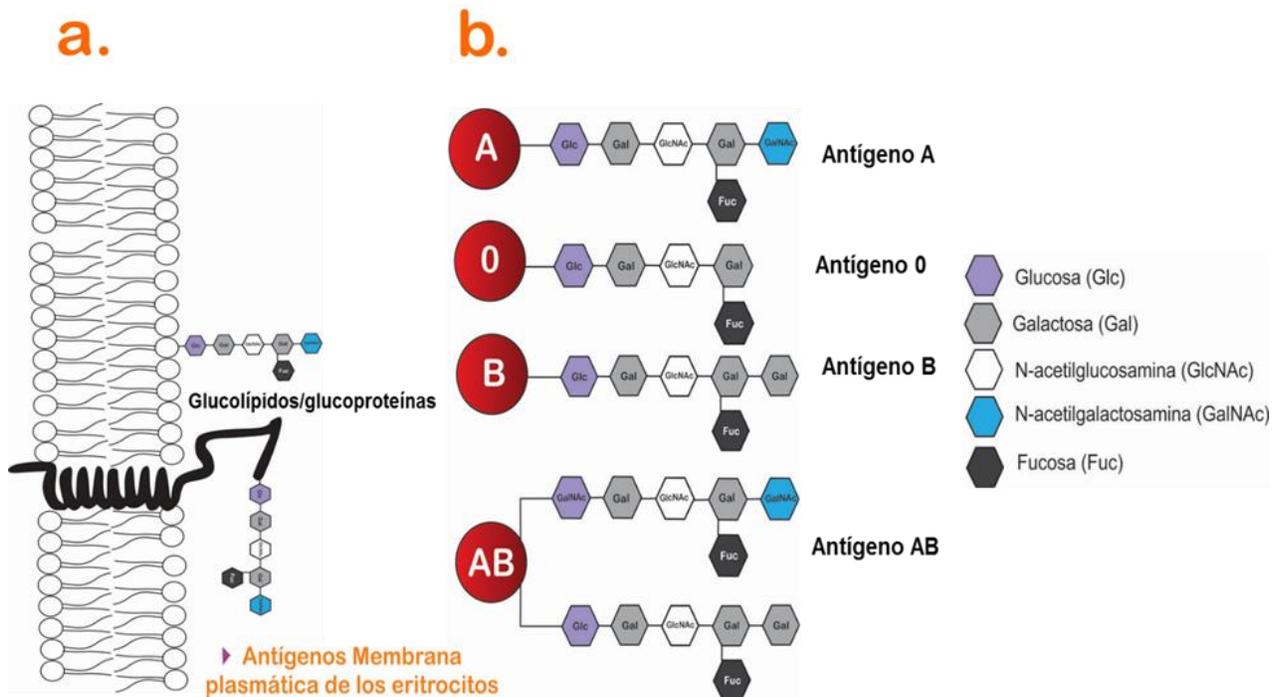


Figura 1. Antígenos (glucolípidos /glicoproteínas) en la membrana plasmática de los eritrocitos. a. Membrana plasmática de los eritrocitos b. Antígenos A, 0, B y AB.

➤ **Factor Rh**

En el año 1940, se detecta la existencia de un nuevo antígeno en la membrana de los glóbulos rojos de la mayoría de la población. Este antígeno es llamado Rh o antígeno D, ya que las primeras investigaciones se llevaron a cabo experimentando con un simio del tipo *Macaccus Rhesus*. El Rh, es una proteína que si está presente en la superficie del eritrocito, será Rh positivo y si está ausente, será Rh negativo. Los antígenos Rh, son proteínas de 417 aminoácidos que juntos cruzan la membrana celular del eritrocito 12 veces. Figura 2.

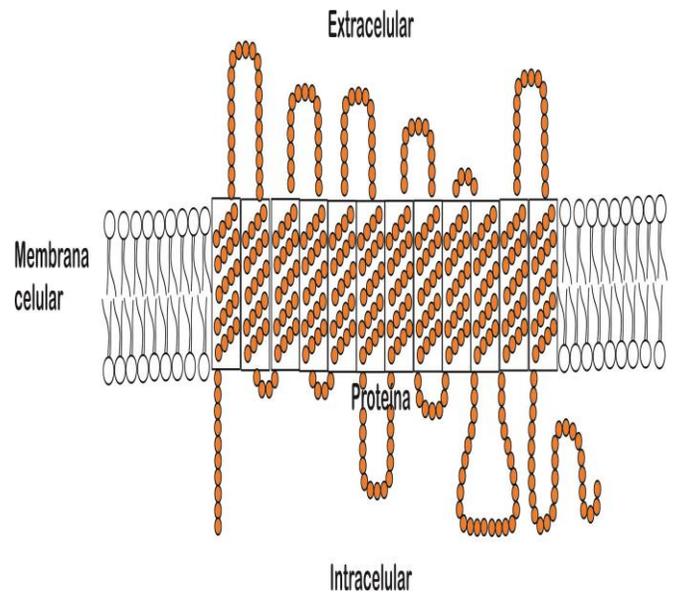


Figura 2. Proteína del Rh en la membrana de los eritrocitos

➤ **Observación y preguntas**

Antígenos en los eritrocitos (glóbulos rojos o hematíes)

En un portaobjetos previamente marcado A, B, Rh y preferiblemente a 37°C, temperatura óptima para la aglutinación, coloque tres gotas de sangre obtenidas por punción. A cada una de ellas adicione una gota del respectivo anticuerpo (antisuero): Anti-A, Anti-B, Anti-D. Las muestras se homogenizan con un palillo y observe en cuál de ellos se ha producido la aglutinación por la unión de glóbulos rojos que hace que estos se precipiten dando un aspecto grumoso. **Figura 3.**

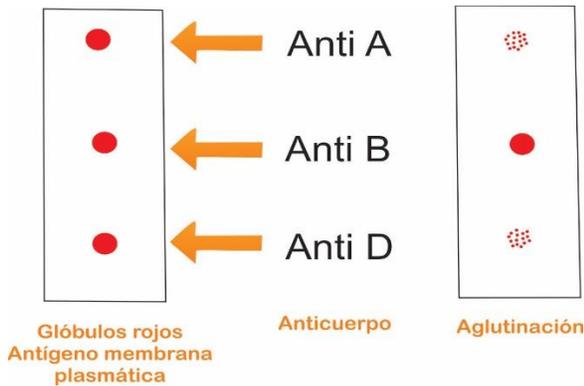


Figura 3. Reacción de aglutinación de glóbulos rojos

La presencia de aglutinación indicará que los eritrocitos poseen ese determinado antígeno en su membrana plasmática. Por ejemplo, en la **tabla 2** y **figura 3**, se reportan los resultados en caso de aglutinación con el

Anti-A y anti- D en eritrocitos que contienen el antígeno del grupo sanguíneo A.

Tabla 2. Aglutinación con el anti-A y anti-D.

(Anticuerpos) Antisero	Reacción de aglutinación	Antígeno (Membrana plasmática)	Glúcidos	Grupo sanguíneo y RH
Anti-A	Si	Glucoproteína/ Glucolípido	Glc-Gal- GlcNAc-Gal- Fuc-GalNAc	A+
Anti-D :Rh	Si	Proteína	—————	

Identificación de antígenos por la reacción de aglutinación

Realice el procedimiento descrito anteriormente y registre los resultados en la tabla 3:

Tabla 3: Resultados

Placa 1

(Anticuerpos) Antisero	Reacción de aglutinación	Antígeno (Membrana plasmática)	Glúcidos	Grupo sanguíneo y RH

Placa 2

(Anticuerpos) Antisero	Reacción de aglutinación	Antígeno (Membrana plasmática)	Glúcidos	Grupo sanguíneo y RH

Placa 3

(Anticuerpos) Antisuero	Reacción de aglutinación	Antígeno (Membrana plasmática)	Glúcidos	Grupo sanguíneo y RH

Placa 5

(Anticuerpos) Antisuero	Reacción de aglutinación	Antígeno (Membrana plasmática)	Glúcidos	Grupo sanguíneo y RH

Placa 4

(Anticuerpos) Antisuero	Reacción de aglutinación	Antígeno (Membrana plasmática)	Glúcidos	Grupo sanguíneo y RH

Placa 6

(Anticuerpos) Antisuero	Reacción de aglutinación	Antígeno (Membrana plasmática)	Glúcidos	Grupo sanguíneo y RH

Análisis de resultados

Mediante un esquema describa las balsas lipídicas o “rafts”

¿Cuál es la importancia de conocer los grupos sanguíneos de las diferentes especies animales?

Defina antígeno y anticuerpo.

Consulte los antígenos en los eritrocitos que representan los grupos sanguíneos en Bovinos, Ovejas, Cerdos y Caballos.

¿Cuáles son los componentes químicos que representan los antígenos de los grupos sanguíneos en la membrana plasmática de los eritrocitos?

¿En qué estructura celular se encuentran los antígenos de los grupos sanguíneos?

Consulte ejemplos de oligosacáridos utilizados para el reconocimiento celular.

¿Qué diferencia existe entre los antígenos de los grupos sanguíneos A, B, 0, en relación al antígeno del grupo sanguíneo Bombay?

➤ **Bibliografía**

Bregman A. (1983). Laboratory investigations in cell and molecular biology. (3ª Ed). United States of America. Jhon Wiley & Sons.

Cooper G., Hausman R. (2008). La célula. (6ª Ed). España. Marbán libros, S.L.

Etimología del factor Rh. Recuperado de: <http://etimologias.dechile.net/?factor-RH>

Grupos sanguíneos. Hopstital Veterinari Montjuic Recuperado de: http://www.hvmontjuic.com/categoria/es/grupos_sanguineos/50/

Incompatibilidad Rh: Recuperado de: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/rhincompatibility.htm>

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., ... Darnell, J. (2005). *Biología Celular y Molecular* (5ª ed). Colombia: Editorial Médica Panamericana.

Megías M., Molist P., Pombal M. (2014) Atlas de histología vegetal y animal. La célula. 3. Membrana celular. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología.

Universidad de Vigo. Recuperado de: <http://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/atlas-celula-03-membrana-celular.pdf>

Membrana Plasmática: Recuperado de: <http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/celulavirtual/membranaplasmatica/proteinas.htm>

Murray, R., Bender, D., Botham, K., Kennelly, P., Weil A. (2015). Harper Bioquímica Ilustrada. (30ª Ed). McGraw-Hill.

Protocolo inmunológico en el trasplante de órganos. Recuperado de: <http://trasplantealdia.pulsointeractivo.com/modulos.php?name=libro&op=viewCapNewVersion&idpublication=1&idedition=1&idcapitulo=13&idversion=&wordsearch=>

Rodak, B., Carr, J. (2015). Atlas de Hematología Clínica. (4ª Ed). Bogotá. Editorial medica panamericana.

Rodgers, G., Young, N. (2014). Manual de hematología Clínica. (3ª Ed). Editorial Lippincott.

Sangre y líquidos: Recuperado de: <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/nguias/other/sangreall.txt>.

Notas

Capítulo 5

Vacuolas en protozoos y plantas con tinción de rojo neutro



Introducción

Las vacuolas son estructuras celulares constituidas por una membrana (tonoplasto) y un contenido interno (jugo vacuolar), están presentes en el citoplasma de las células eucariotas y son parte del sistema de endomembranas.

Vacuolas vegetales.

Las vacuolas son orgánulos multifuncionales esenciales para la viabilidad de las células vegetales, en las que cumplen funciones metabólicas importantes como son: Almacenan proteínas, aminoácidos e iones; mantienen la homeostasis citoplasmática; secuestran toxinas, pigmentos y metabolitos; proporcionan un óptimo compartimento ácido para enzimas hidrolíticas y generan turgencia para la expansión de las células. La vacuola vegetal ocupa el 90-95% del volumen de las células de plantas, además, maximiza tanto la relación de superficie-volumen del citoplasma y el área de

superficie del citoplasma en contacto con el medio ambiente.

La célula vegetal adulta encierra una voluminosa vacuola separada del medio que la rodea por una membrana llamada tonoplasto. Ésta membrana se comporta como una membrana semipermeable con respecto a numerosas sustancias disueltas como cloruro sódico y sacarosa, entre otras. El tonoplasto interviene especialmente en el mantenimiento de la turgencia celular y el crecimiento. En su interior se encuentra una sustancia fluida de composición variable (agua, azúcares, proteínas, grasas, entre otros), denominado jugo vacuolar. **Figura 1.**

La luz de las vacuolas vegetales es mucho más ácido (pH 3 a 6) que el citosol (pH 7,5). La acidez de las vacuolas es mantenida por una bomba de protones impulsada por ATP de clase V y por una bomba de protones de hidrólisis de pirofosfato que es exclusiva de los vegetales. Estas dos bombas, ubicadas en la membrana vacuolar, transportan iones H^+

hacia la luz vacuolar en contra de un gradiente de concentración. La membrana vacuolar también contiene canales iónicos de cloro y nitrato (Cl^- y NO_3^-), que transportan estos aniones desde el citosol a través de proteínas canal hacia el interior de la vacuola.

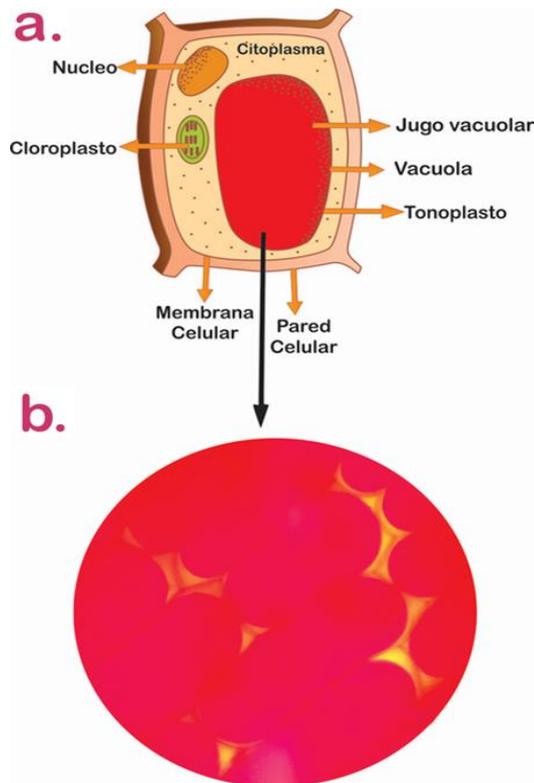


Figura 1. Vacuola vegetal a. esquema de la vacuola vegetal b. micrografía de vacuolas en células de la epidermis de cebolla. 1000x.

La entrada de estos aniones en contra de sus gradientes de concentración es impulsada por el potencial positivo interno generado por las bombas de H^+ . El funcionamiento combinado de estas bombas de protones y canales de aniones producen un potencial

eléctrico positivo interno de alrededor de 20mV a través de la membrana vacuolar.

Por otro lado, el gradiente electroquímico de protones a través de la membrana vacuolar de los vegetales es utilizado para impulsar la incorporación de iones y moléculas pequeñas por diversos antiportadores de protones, de esta manera, por el gradiente de H^+ se acumulan Na^+ , Ca^{2+} y sacarosa dentro de la vacuola. Por ejemplo un antiportador protones/sacarosa en la membrana vacuolar funciona para acumular sacarosa en las vacuolas vegetales. El movimiento de sacarosa hacia dentro es impulsado por el movimiento de H^+ hacia afuera, lo que es favorecido por su gradiente de concentración (luz vacuolar > citosol) y por el potencial citosólico negativo a través de la membrana vacuolar. **Figura 2.**

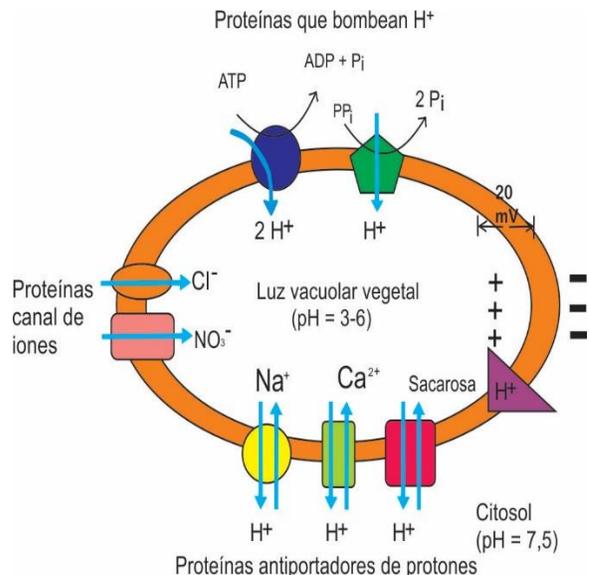


Figura 2. Concentración de iones (pH) y sacarosa por la vacuola vegetal.

A diferencia de las células animales, las células vegetales, de algas, hongos y de bacterias están rodeadas por una pared celular rígida. Debido a la pared celular, el flujo osmótico de ingreso de agua que tiene lugar cuando estas células están situadas en una solución hipotónica, conduce a un incremento de la presión intracelular, pero no del volumen de la célula. En las células de las plantas, la concentración de soluto (azúcares y sales) suele ser más alto en la vacuola que en el citoplasma, que a su vez tiene una concentración de soluto más alta que la del espacio extracelular. La presión osmótica y presión de turgencia, generadas por la entrada de agua en el citoplasma y luego en la vacuola, empujan al citosol y a la membrana plasmática contra la resistente pared celular. De esta manera, la elongación de la célula durante el crecimiento inducido por hormonas, tiene lugar por una pérdida localizada de una región de la pared celular, seguida por un flujo de agua hacia adentro de la vacuola, lo que incrementa su tamaño.

Vacuolas en eucariotas unicelulares

La mayoría de los organismos unicelulares son microscópicos; debido a su tamaño las células requieren de una superficie celular lo suficientemente grande en relación con el

volumen, para garantizar el intercambio de material necesario para su existencia. Muchos eucariotas unicelulares relativamente grandes reducen este problema porque contienen vacuolas de varios tipos rodeadas por membranas que aumentan la superficie celular efectiva.

Para los organismos que viven en agua dulce, su citoplasma es hipertónico con relación a su medio, por lo que se produce entrada de agua. Algunos eucariotas unicelulares dulceacuícolas, como el género *Paramecium*, resuelven la hipertonicidad con vacuolas contráctiles, que excretan el exceso de agua que el organismo absorbe constantemente por ósmosis.

La principal función de la vacuola contráctil es la osmoregulación. A pesar de que la mayoría de los protozoarios no tienen una pared celular, muchos contienen una vacuola contráctil que les permite evitar la lisis osmótica. La vacuola contráctil toma agua del citoplasma y a diferencia de la vacuola de las plantas, descarga periódicamente su contenido a través de la fusión con la membrana plasmática. De esta manera, aunque el agua entra continuamente en la célula protozoaria por el flujo osmótico, la vacuola contráctil evita que se acumule

demasiada agua en la célula y la dilate hasta el punto de explosión.

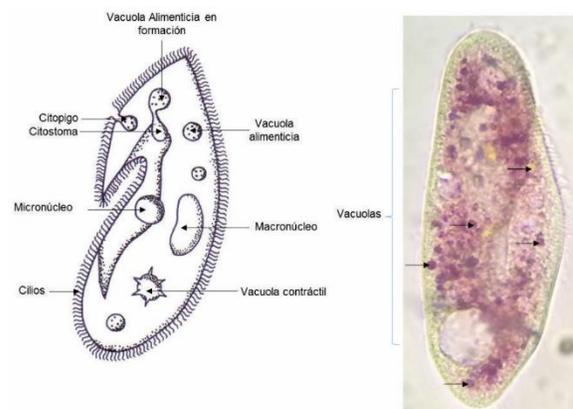
La vacuola alimenticia, es otra de las vacuolas importantes presentes en el género *Paramecium* y en otros eucariotas unicelulares. Estos organismos engloban alimento sólido por endocitosis formando una vacuola en la que digieren el alimento, luego, unas vesículas más pequeñas que contienen el alimento digerido se desprenden de la vacuola alimenticia e ingresan en el citoplasma. Estas diminutas vesículas presentan una gran superficie de intercambio, a través de la cual los productos de la digestión pueden ser absorbidos por el resto de la célula. **Figura 3.**

El género *Paramecium* ingiere alimento a través de una estructura oral o citostoma. Se ha estudiado que la acidificación de las vacuolas alimenticias colaboran con la digestión y esto se ha comprobado cuando el protozoo es alimentado con células de levaduras teñidas, por ejemplo con Rojo Congo (indicador de pH). En este caso, alrededor de la levadura se forma una vacuola alimenticia que se tiñe de color verde, lo que indica que la vacuola se volvió ácida, esto se debe a que el Rojo Congo vira a verde a pH ácido. A medida que los

productos de la digestión se mueven hacia el citosol, el pH aumenta en la vacuola, el colorante vuelve a verse rojo (rojo a pH alcalino a neutro). El fundamento de la tinción de las vacuolas con Rojo Neutro es similar al Rojo Congo. **Figura 3 a y b.**

Tinción de las vacuolas con Rojo Neutro

El Rojo Neutro (RN), 3-amino-7-dimetilamino-2-methylphenazine, se usa como una tinción vital porque penetra en las células viables, atraviesa fácilmente las membranas celulares (membrana plasmática y tonoplasto) por difusión pasiva en su forma no protonada y se acumula en los lisosomas de animales, en vacuolas de plantas y en células de hongos.



a.

b.

Figura 3. Vacuolas en protozoos. a. dibujo de un protozoario con sus partes b. Micrografía de vacuolas (Flechas negras) en Protozoario con rojo neutro (rojo a pH por debajo de 6.8 y amarillo a pH de 8.0). 1000x.

La acumulación del RN ocurre por entrapamiento de la forma protonada del colorante dentro del ambiente ácido, es decir, el RN es un colorante catiónico débil que penetra fácilmente y se acumula intracelularmente (el pH lisosomal o vacuolar es menor que el pH citoplasmático), en sitios aniónicos de la matriz lisosomal. Así mismo, el RN se une a cargas ácidas fijas, tales como polisacáridos ácidos dentro de la matriz del lisosoma o vacuola (interacción iónica entre el RN protonado con cargas negativas) y es conocido por teñir diversos compuestos debido a su afinidad para estructuras lipófilas y sustancias fenólicas. El RN es un indicador de pH (rojo a pH por debajo de 6.8 y amarillo a pH 8.0) y tiñe vacuolas alimenticias recién formadas de un rojo brillante, pero a medida que el proceso de digestión avanza, estas vacuolas cambian a un color amarillento que indica un pH alcalino cuando la digestión se lleva a cabo.

➤ **Observaciones y preguntas**

Tinción vacuola vegetal con RN.

(Se tiñe de color Rojo por debajo de pH 6.8 y de color amarillo a pH de 8.0).

Coloque una cebolla en agua aproximadamente 5 días antes de realizar el siguiente experimento.

En una caja de petri coloque aproximadamente 2 mililitros de la solución RN al 1% en tampón fosfato (pH 7.4). Tome un fragmento de la epidermis interior del bulbo de la cebolla y sumérgalo inmediatamente en la solución anterior, deje actuar durante 20 minutos.

Haga el montaje de la epidermis en el portaobjetos y colóquelo el cubreobjetos. Realice observaciones en el microscopio óptico. **Figura 4.**

¿A qué se debe la gran extensión de la coloración de la célula tras la tinción con rojo neutro?

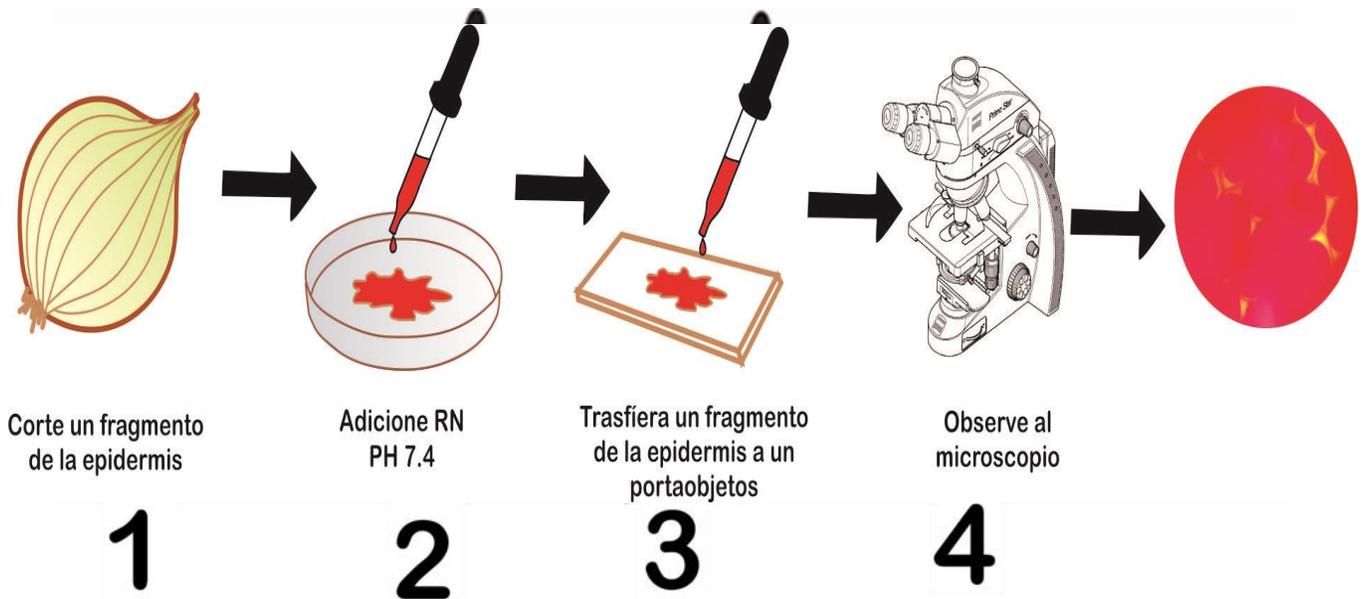


Figura 4. Metodología de la tinción de la vacuola vegetal con RN.

¿De qué color observa la vacuola? ¿A cuál propiedad química de la vacuola se debe el color?

¿Observa la célula en fenómeno de turgencia o plasmólisis?

¿El medio externo es hipotónico o hipertónico en relación al jugo vacuolar para que la célula absorba agua y la acumule en la vacuola?

Sustituya la solución rojo neutro tampón fosfato por una solución de NaCl al 6%, depositando unas gotas de dicha solución en el borde del cubreobjetos con ayuda de una pipeta en la preparación anterior, y con ayuda de un papel filtro en el lado opuesto retire por capilaridad la solución RN.

La solución salina reemplaza el colorante y esto se puede apreciar porque se aclara el líquido de la preparación.

Observe la preparación al microscopio óptico.

Describa las características que observa en las vacuolas:

¿Qué función cumplen el tampón fosfato y el cloruro de sodio sobre el jugo vacuolar?

¿Observa la célula en fenómeno de turgencia o plasmólisis?

¿En este caso el medio externo es hipotónico o hipertónico con relación al jugo vacuolar? ¿Por qué?

Tinción vacuola de protozoos con rojo neutro

Con una micropipeta transfiera una gota de muestra del cultivo de protozoos sobre el portaobjetos. Adicione una gota de rojo neutro 0.01% en tampón fosfato 0.08M (pH 7.2) y mezcle las dos gotas suavemente girando el portaobjetos y deje por 5 minutos.

Adicione una gota de acetato de cobre al 3% o sulfato de cobre al 1%. Aplique vaselina a los cuatro extremos del cubreobjetos y coloque el cubreobjetos sobre la gota de la muestra que está en el portaobjetos. Presione suave el cubreobjetos.

Observe el citoplasma teñido de rosa pálido. Las vacuolas se tiñen diferencialmente según el pH de su contenido: las vacuolas ácidas (rojo) y las básicas (amarillo).

Realice un dibujo de la observación microscópica

¿Qué funciones tiene la vacuola pulsátil y las digestivas en los protozoos?

¿Qué le sucede al protozoario si no regula contenido de agua?

Formación de vacuolas alimenticias con Polvo de carmín

Coloque una gota del cultivo de protozoos en un portaobjetos, con una mini espátula transfiera un poco de polvo de carmín sobre la gota del cultivo de protozoos. Ponga el cubreobjetos.

Observe y dibuje la formación de vacuolas alimenticias.

Realice un dibujo del protozoo e indique las partes que observó.

¿Qué función cumplen y en qué organismos se encuentran las vacuolas gaseosas, contráctiles, alimenticias y de reserva?

¿Cuáles son las funciones de la vacuola en la célula animal, en la vegetal y en organismos unicelulares?

¿Defina qué es una solución hipotónica, isotónica e hipertónica?

➤ **Bibliografía**

Bregman A. (1983). Laboratory investigations in cell and molecular biology. (3ª Ed). United States of America. Jhon Wiley & Sons.

Curtis, H., Barnes, N.S., Schnek, A., Massarini, A. (2015). Invitación a la Biología en contexto social. (7ª Ed). España. Editorial panamericana.

Deepesh N. (Ed). (2000). Plant Cell Vacuoles: An Introduction. Australia. CSIRO Publishing.

Dubrovsky, J. G., Guttenberger, M., Saralegui, A., Napsucialy-Mendivil, S., Voigt, B., Baluska, F., Menzel, D. (2006) Neutral Red as a Probe for Confocal Laser Scanning Microscopy Studies of Plant Roots. *Annals of Botany*, 97, 1127–1138.

Hildrew, G. A., Townsed R. C (Ed.). (1996). *Freshwater Biology*. 35 (2), 376-482.

Howey R. L. Vital Staining for Protozoa and Related Temporary Mounting Techniques. Recuperado de <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artfeb00/rhvital.html>

Kirby H. (1950) *Materials and Methods in the Study of Protozoa*. United States of America. University of California press.

Lisosomas, peroxisomas y vacuolas. Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/poroxisomas.html>

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P, Darnell, J. (2015). *Biología Celular y Molecular* (7ª ed). Colombia: Editorial Médica Panamericana.

Nelson, D., Cox, M. (2014). *Lehninger: Principios de Bioquímica* (6ª Ed.). Barcelona. Editorial Omega.

Ngo, A. D., Garland A. P., Mandoli F. D. (2005). Development and organization of the central vacuole of *Acetabularia acetabulum*. *New Phytologist*, 165 (3), 731-746.

Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Uría A. M., Fraile, B., Anadón, R., Sáez, F. J. (2003) *Biología Celular* (2ª ed). España: McGraw-Hill interamericana.

Sadava, D., Heller, G., Orians, G., Purves, D., Hillis, D. (2009). *Vida la ciencia de la biología*. (8ª Ed). Argentina. Editorial médica panamericana.

Schwab, B., Hülskamp, M. (2010) Neutral Red Staining for Plant Vacuoles. *Cold Spring Harb Protoc*, 2010, 6, 1.

Notas

Capítulo 6

Motilidad celular: Flagelos y cilios



➤ **Introducción**

Los flagelos y cilios son prolongaciones flexibles de la membrana plasmática constituidas por microtúbulos (citoesqueleto), que permiten el movimiento de varios tipos de células. En los eucariotas, se encuentran muy difundidos en los invertebrados, vertebrados, en las células sexuales de los helechos y otras plantas.

Los flagelos los utilizan para la locomoción los protozoos del género *Leishmania*, así como los espermatozoides. En el caso de los cilios, se puede citar el caso del género *Paramecium* en donde son responsables tanto de la movilidad celular como del barrido de organismos hacia la cavidad oral para su alimentación (ver capítulo 5). En los humanos, los cilios se encuentran en las células epiteliales que tapizan las superficies internas de las trompas de Falopio y ayudan a movilizar los óvulos al útero; también existen cilios en las células del aparato respiratorio que contribuyen a la expulsión

del material extraño que ingresa a los pulmones.

Otra forma más lenta de motilidad celular es el movimiento ameboide, que ocurre por un flujo citoplasmático en extensiones de la superficie celular formando pseudópodos. Este movimiento se observa en amebas y también en células sanguíneas como los leucocitos que participan en procesos de defensa contra la infección causada por invasores extraños (bacterias o virus) y en el daño de los tejidos por trauma o inflamación. Además, el movimiento ameboide también es característico en procesos de migración celular de las células embrionarias durante el proceso de morfogénesis y en patologías como la metástasis.

➤ **Estructura de Flagelos y cilios en células eucariotas**

La estructura fundamental tanto de los flagelos como de los cilios eucariotas es el axonema, que está constituido por

microtúbulos y sus proteínas asociadas. El axonema está rodeado por una extensión de la membrana plasmática, así que cada flagelo o cilio es realmente una región sobresaliente del citoplasma.

La ultraestructura básica es común para flagelos y cilios, y se compone de microtúbulos los cuales son estructuras no ramificadas, cilindros vacíos con un diámetro de aproximadamente 24 nm, formados por la proteína Tubulina. Por microscopía electrónica de un corte transversal, la ultraestructura característica del axonema es “9₂+2” microtúbulos, es decir, los microtúbulos siempre se observan en arreglos de 9 dobletes externos o pares de microtúbulos, y 2 microtúbulos sencillos centrales.

El par central de microtúbulos simples, están conectados por puentes y rodeados por una estructura fibrosa denominada vaina interna. Los dos microtúbulos fusionados de cada doblete exterior son distintos: uno denominado el túbulo A, es un microtúbulo completo constituido por 13 protofilamentos; el otro, el túbulo B está incompleto, constituido solamente por 10 a 11 protofilamentos unidos al túbulo A.

Los dobletes exteriores de microtúbulos se conectan al par central mediante espinas radiales y entre sí mediante puentes formados por una proteína denominada nexina. Además, cada túbulo A se une a dos brazos de dineína de brazo interno y brazo externo de actividad motora (ATPasa que convierten la fuente de energía liberada por la hidrólisis del ATP en fuerza mecánica), esta dineína axonémica dirige el batido de los flagelos y cilios.

En la base o extremos “menos” de los microtúbulos de los cilios y flagelos están unidos a un cuerpo basal que tiene una ultraestructura similar a la del centriolo, con nueve tripletes de microtúbulos, sin microtúbulos centrales, es decir, una ultraestructura de microtúbulos “9₃+0”. Los cuerpos basales tienen un papel definido en la organización de los microtúbulos del axonema. A saber, cada uno de los dobletes de microtúbulos externos del axonema está formado por la extensión de dos de los microtúbulos presentes en los tripletes del cuerpo basal. Por lo tanto, los cuerpos basales sirven para iniciar el crecimiento de los microtúbulos del axonema, así como para anclar los cilios y los flagelos a la superficie de la célula. [Figura 1 a, b y c.](#)

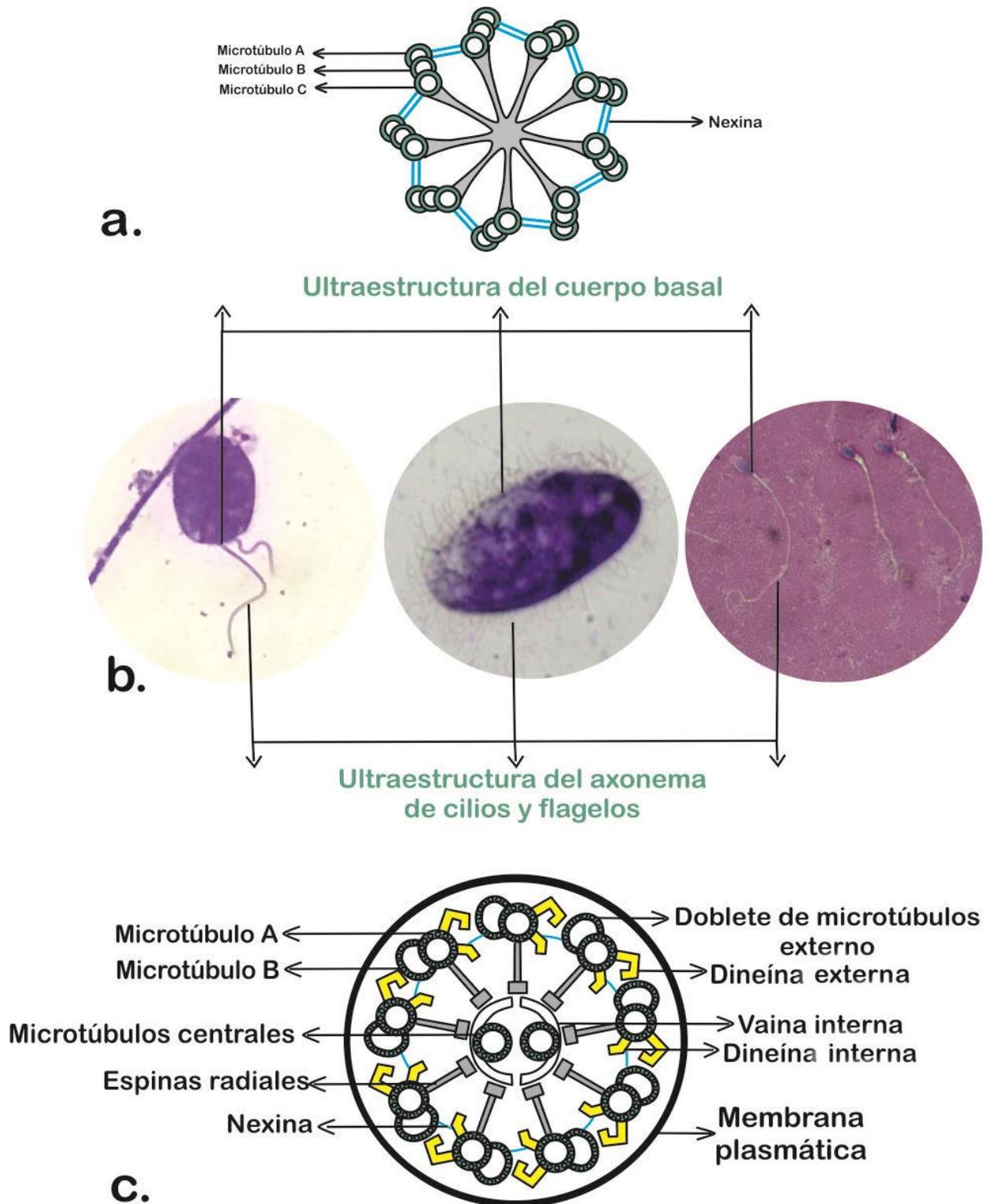


Figura 1. Ultraestructura de Cilios y Flagelos. a. Ultraestructura del cuerpo basal. b. Células de protozoos flageladas, ciliados, y espermatozoides. 1000x. c. Ultraestructura del axonema de cilios y flagelos.

Una diferencia general entre flagelos y cilios, está en su longitud y el número, los primeros son más largos (arriba de $150\mu\text{m}$) y las células generalmente tienen solamente uno o dos flagelos, mientras que los segundos son más cortos (longitud entre $5\text{-}12\ \mu\text{m}$) y menor diámetro, además, se presentan en mayor número en una célula. Otra diferencia es la naturaleza de su movimiento, en los flagelos el movimiento generalmente es ondulante, con movimiento de ondas desde la base del flagelo hasta la punta. Por su parte, el cilio exhibe un movimiento de golpe como un remo, alternando el movimiento hacia atrás y hacia adelante. **Figura 2 a y b.**

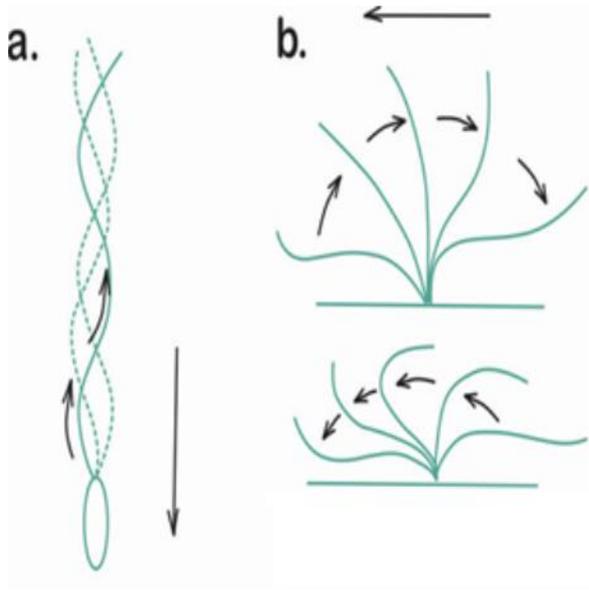


Figura 2. Movimiento (flecha negra) de flagelos (a) y cilios (b) en organismos eucariotas.

El movimiento rítmico de los flagelos y cilios se caracteriza por una serie de curvaturas que se originan en la base de la estructura y se propagan hacia la punta. La curvatura es resultado del deslizamiento entre sí de dobletes de microtúbulos adyacentes. Las bases de los brazos de dineína axonémica se unen a los túbulos A, y las cabezas motoras de la dineína interactúan con los túbulos B de los dobletes adyacentes. El movimiento de las cabezas de dineína hacia el extremo “menos” (hacia la base del cilio) provoca entonces que el túbulo A de un doblete se deslice hacia la base del túbulo B adyacente. Debido a que ambos dobletes de microtúbulos en el axonema están conectados por puentes de nexina, este movimiento de deslizamiento les obliga a doblarse. **Figura 3 a y b.**

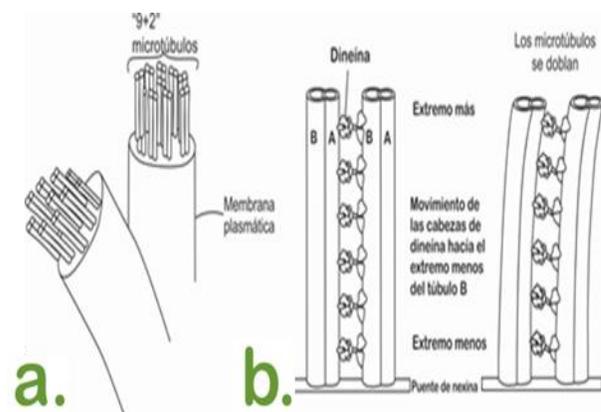


Figura 3. a. Organización de microtúbulos en flagelos y cilios b. Movimiento de los microtúbulos en los flagelos y cilios.

Algunas células bacterianas poseen flagelos. El flagelo en procariotas está constituido por largos apéndices filamentosos helicoidales y con capacidad de rotación, lo cual le permite propulsar a la bacteria en medio líquido. Está formado por un tubo helicoidal hueco y compuesto exclusivamente de un polímero repetido de la proteína flagelina, que crece por el agregado de nuevas subunidades de flagelina en el extremo distal. En los procariotas estos filamentos proteicos se proyectan desde la superficie celular, en vez de prolongaciones de la membrana plasmática sostenidas por microtúbulos que es la estructura básica de los flagelos en células eucariotas. Otra diferencia está relacionada con el movimiento; los flagelos procarióticos giran, los eucarióticos se mueven onduladamente. **Figura 4 a y b.**

La longitud del flagelo varía entre 5 a 10 μm , pero el diámetro es constante y uniforme para cada especie. El patrón de flagelación, es decir, el número y localización de los flagelos procariotas varía entre especies, y reviste interés en la determinación taxonómica. Los flagelos se presentan en las células procariotas en cuatro disposiciones diferentes:

Monotricos: un solo flagelo polar en bacterias bacilares, por ejemplo en *Vibrio cholerae*.

Anfitricos: Un flagelo en cada extremo de la célula, por ejemplo *Alcaligenes faecalis*.

Lofotricos: Dos o más flagelos en uno o en ambos extremos de la célula, por ejemplo en *Spirillum volutans*.

Peritricos: flagelos distribuidos en toda la superficie celular, por ejemplo en *Escherichia coli*.

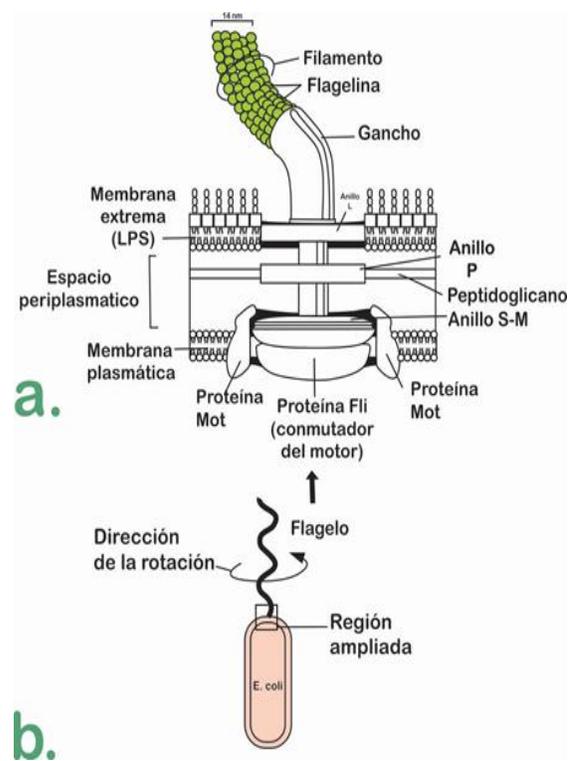


Figura 4: a. Estructura del flagelo procariota. b. Movimiento del flagelo procariótico.

El flagelo procariota tiene tres partes fundamentales: El filamento, el gancho y el motor. El filamento es la región más externa formado por la proteína flagelina. El filamento se une al gancho ligeramente más grueso, constituido por una proteína distinta.

La tercera porción del flagelo es el motor denominado cuerpo basal, que le sirve de anclaje a la pared celular y a la membrana citoplasmática.

El motor se compone de un pequeño eje central insertado en una serie de anillos. En las bacterias Gram negativas contiene dos pares de anillos. Los externos se anclan en las distintas porciones de la pared celular y el par de anillos internos lo hace en la membrana citoplasmática. En las bacterias Gram positivas sólo está presente el par más interno. Alrededor del anillo interno y anclado en la membrana citoplasmática hay un par de proteínas denominadas *Mot* que hacen parte del motor flagelar y son los que provocan la rotación del filamento; además, existen las proteínas *Fli* que actúan como un conmutador del motor invirtiendo la rotación del flagelo en respuesta a señales intracelulares. **Figura 4.**

El movimiento por rotación como una hélice ya sea en contra o en sentido de las agujas del reloj, se origina a partir del motor flagelar, y la energía que se necesita para la rotación del flagelo proviene de la fuerza motriz generada por el gradiente de protones de H⁺/Na⁺.

Debido a la extrema delgadez del flagelo que mide aproximadamente 20nm de diámetro (por debajo del límite resolutivo del microscopio óptico), no se pueden detectar los flagelos individuales. En este caso es necesario el uso de tinciones para aumentar su diámetro y ser observados por microscopía óptica; también se pueden observar por microscopía óptica de alta intensidad en campo oscuro o microscopio de contraste de fases y son claramente visibles en microscopía electrónica.

- **Observaciones y preguntas**
- **Observación de flagelos en células animales**

Micropreparado en fresco

Tome una gota de semen, colóquela en un portaobjetos y cúbrala con un cubreobjetos. Observe el movimiento de las células en el microscopio óptico.

Describa el movimiento del flagelo de las células observadas.

¿Qué estructura celular está relacionada con el movimiento de estas células?

Haga un esquema y describa la estructura del espermatozoide.

Micropreparado con tinción de Wright

Con una pipeta Pasteur tome semen y coloque varias gotas separadas en un portaobjetos. Déjelas secar a temperatura ambiente, cuando estén secas las gotas de la muestra aplique la tinción de Wright como se indica a continuación:

Cubra cada una de las gotas con el colorante de Wright y deje 1 minuto. Pasado este tiempo vierta sobre el preparado unas gotas de agua destilada. Mueva o sopla la preparación para que se efectúe la mezcla durante 3 minutos. La aparición de un brillo metálico indica que la tinción es correcta. Lave la preparación hasta que se elimine el exceso de colorante. Espere hasta que la preparación se seque a temperatura ambiente y observe al microscopio óptico.

Relacione la estructura flagelar observada con la ultraestructura molecular del flagelo

➤ Observación de cilios y flagelos en protozoarios Micropreparado en fresco

Con una pipeta Pasteur tome una muestra de agua residual o cultivo de protozoarios, coloque una gota sobre el portaobjetos, cúbrala con el cubreobjetos, observe al microscopio óptico.

¿Qué estructuras celulares están relacionadas con el movimiento de estas células?

¿Cuál es la proteína motora que provee la energía (ATP) para el movimiento de los flagelos o cilios?

¿Cuál es el componente del citoesqueleto que conforma la estructura del flagelo o cilio?

Micropreparado con tinción

Con una pipeta Pasteur tome la muestra del cultivo de protozoarios, coloque varias gotas, espere que las gotas de la muestra se sequen a temperatura ambiente. Cubra la muestra con Wright o con Giemsa o con lugol durante un tiempo de 15 a 30 minutos. Deje secar. Observe al microscopio óptico.

¿Cuál es la proteína que se polimeriza para organizar estas estructuras?

Dibuje e indique las estructuras celulares observadas.

Consulte y describa la ultraestructura (microscopía electrónica) de un corte transversal del axonema del flagelo del espermatozoide con dineína defectuosa.

¿Cuáles son las consecuencias en los animales cuando por mutaciones presentan los brazos de dineína defectuosos?

Diseñe un experimento donde se evidencia la

pérdida de la función flagelar (deflagelación y retorno de la motilidad).

Realice un cuadro comparativo de las diferencias y similitudes entre los flagelos eucariotas y flagelos procariotas.

Describa patologías relacionadas con defectos en la estructura y funcionalidad de los cilios o flagelos en animales, por ejemplo, la discinesia ciliar primaria.

➤ **Bibliografía**

Bregman A. (1983). Laboratory investigations in cell and molecular biology. (3ª Ed). United States of America. Jhon Wiley & Sons.

Brennen, C., Winet, H. (1977). Fluid Mechanics of Propulsion by Cilia and Flagella. Annual Review of Fluid Mechanics. 9, 339-398.

Cilios respiratorios. Recuperada de http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/19533.htm

Cooper G., Hausman R. (2008). La célula. (6ª Ed). España. Marbán libros, S.L.

Curtis, H., Barnes, N. S. (2000). *Biología* (6ª ed). España: Editorial Médica Panamericana.

Curtis, H., Barnes, N.S., Schnek, A., Massarini, A. (2015). Invitación a la Biología en contexto social. (7ª Ed). España. Editorial panamericana.

Hildrew, G. A., Townsed R. C (Ed.). (1996). Freshwater Biology. 35 (2), 376-482.

Madigan, M.T., Martinko, J. M., Parker, J. (2015). *Brock Biología de los microorganismos* (14ª ed). España: Pearson-Prentice-Hall.

Movimiento celular. Recuperado de <http://www.biologia.arizona.edu/cEll/tutor/cyto/page2.html>

Nelson, D., Cox, M. (2014).

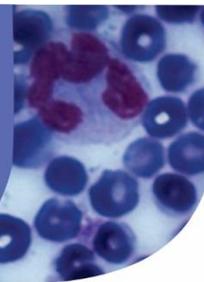
Lehninger: Principios de Bioquímica (6ª Ed.). Barcelona. Editorial Omega.

Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Uría A. M., Fraile, B., Anadón, R., Sáez, F. J. (2003) *Biología Celular* (2ª ed). España: McGraw-Hill interamericana.

Notas

Capítulo 7

Micrometría celular utilizando el método manual y el programa ImageJ en microscopía óptica



➤ **Introducción**

Casi todas las células son microscópicas; por lo tanto, las unidades más comúnmente empleadas son el micrómetro (μm) y el nanómetro (nm). El tamaño de las células procariotas varía entre 1 y $5\mu\text{m}$ de longitud, un ejemplo es la bacteria *Escherichia coli* que mide $1\mu\text{m}$ ancho x $3\mu\text{m}$ de largo; sin embargo, hay excepciones como en el caso del bacilo *Epulopiscium fishelsoni*, el cual puede alcanzar $50\mu\text{m}$ de diámetro y llegar a medir entre 200 a $700\mu\text{m}$ de longitud. Por su parte, el tamaño de las células eucariotas oscila entre 10 y $30\mu\text{m}$ con formas muy variadas, determinadas por múltiples factores, siendo el más importante la función que realiza la célula.

Por lo tanto, la mayoría de los procariotas son comparativamente mucho más pequeñas que las eucariotas, y su minúsculo tamaño determina varias propiedades biológicas. Por ejemplo, el ritmo con el que los nutrientes y

las sustancias de desecho pasan respectivamente al interior y al exterior de las células, generalmente es inversamente proporcional al tamaño celular. Este flujo puede afectar profundamente los ritmos metabólicos y de crecimiento. Este hecho se debe a que las velocidades de transporte son parcialmente dependientes de la superficie de membrana disponible y en relación al tamaño celular, así, las células pequeñas tienen mayor superficie relativa disponible que las células grandes.

De modo que, la principal restricción al tamaño de la célula es la que se impone por la relación entre el volumen y la superficie. Las sustancias como el oxígeno, el dióxido de carbono, los iones, los nutrientes y los productos de desecho que entran y salen de una célula viva deben atravesar su superficie, delimitada por una membrana. Estas sustancias son los materiales simples y los productos del metabolismo celular que representan el total de las actividades

químicas en las que se encuentra comprometida una célula. Cuanto más activo es el metabolismo celular, más rápidamente deben intercambiarse los materiales con el ambiente para que la célula siga funcionando.

Superficie y volumen celular

A través de la superficie celular (membrana plasmática) se realizan los intercambios con el medio y le permite a la célula el suministro de los nutrientes necesarios y la eliminación de sus desechos. Además, tienen un volumen celular lo suficientemente pequeño, lo que hace que las moléculas que participan del metabolismo se desplacen de una parte a otra de la célula en menor tiempo.

Lo descrito anteriormente se puede explicar tal como se representa en la [figura 1](#), el cubo A de 4 micrómetros de lado tiene una superficie de $96\mu\text{m}^2$, y un volumen de $64\mu\text{m}^3$. El cubo B de 2 micrómetros de lado tiene una superficie de $24\mu\text{m}^2$ y un volumen de $8\mu\text{m}^3$. El cubo C de 1 micrómetro de lado tiene una superficie de $6\mu\text{m}^2$, un volumen de $1\mu\text{m}^3$. La relación superficie a volumen incrementa de 1.5 para el cubo A, a 3 para el cubo B y de 6 para el cubo C. Si la superficie de los cubos tuviera que ser utilizada para

realizar intercambios, como ocurre con las células, el cubo C sería más eficiente que el cubo A y B, ya que dispone de una superficie mayor para su volumen.

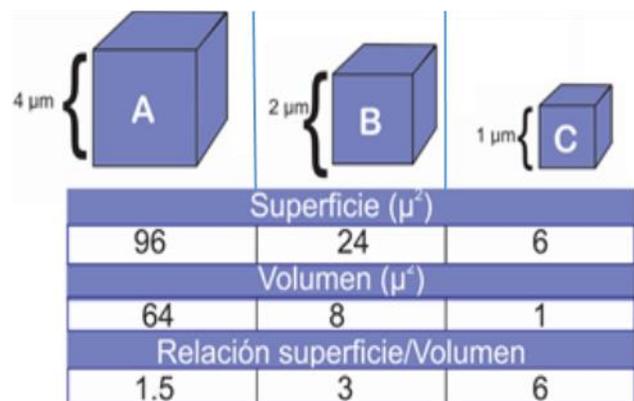


Figura 1: Relación superficie / volumen

De modo similar, las células más pequeñas tienen una mayor relación de superficie a volumen que las células más grandes. Esto significa, no sólo más superficie de membrana a través de la cual los materiales pueden entrar en la célula o salir de ella, sino también menos materia viva para atender y distancias más cortas a recorrer en el interior de la célula.

Por su parte, en las células grandes la relación superficie/volumen es menor que en células más pequeñas, es decir, las células de mayor tamaño disponen de una superficie de intercambio con el medio ambiente proporcionalmente menor. [Figura 2.](#)

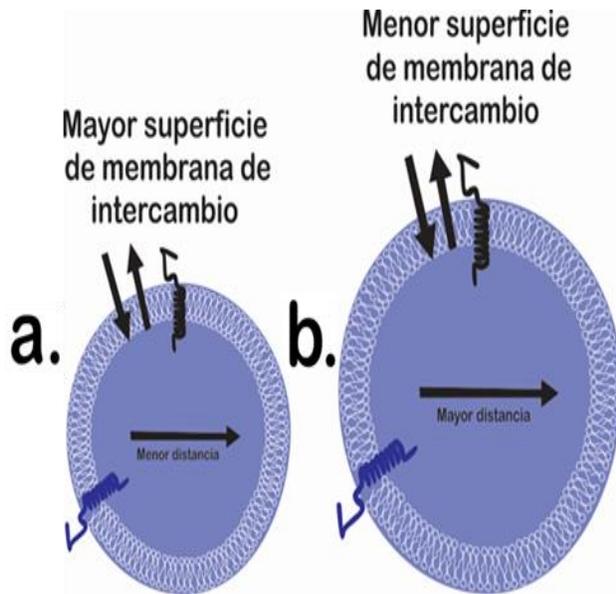


Figura 2. Representación del tamaño celular y el intercambio. a. mayor intercambio celular a través de la membrana plasmática b. Menor intercambio celular a través de la membrana plasmática.

Micrometría

Es la técnica que permite medir objetos microscópicos; puede ser óptica o electrónica. La medida de especímenes bajo el microscopio óptico es relativamente sencillo, sí se dispone de algunos accesorios, como el micrómetro ocular y el micrómetro de platina (método manual). En la actualidad existen métodos computarizados utilizando software como Axiovision (Carl Zeiss), LAS (Leica), Stream (Olympus), Image-Pro Plus (Media Cybernetics) y ImageJ (NIH), entre otros.

El método manual utiliza dos escalas o micrómetros: una ocular y la otra de platina. El micrómetro ocular es un disco de vidrio que se coloca debajo de la lente ocular, posee grabada una escala con 10 divisiones que deben ser calibradas, es decir, se le debe adjudicar un valor en micras a cada una de sus divisiones y para cada uno de los objetivos del microscopio que se va a emplear para la observación. Para la calibración se utiliza el micrómetro de platina, el cual es una escala grabada en un portaobjetos con 100 divisiones, cada una corresponde a $10\mu\text{m}$, con un total de 1mm . (Ver la figura 9 en apartado de observaciones y preguntas del presente capítulo).

El método computarizado emplea software como el ImageJ. El ImageJ es un programa para procesamiento y análisis de imágenes, de dominio público y en plataforma JAVA, inspirado en NIH Image para Macintosh. Se ejecuta, ya sea como un “applet” en línea o como una aplicación descargable en cualquier ordenador con Java 1.5 o una máquina virtual posterior. Distribuciones descargables están disponibles para Windows, Mac OS X y Linux. Puede mostrar, editar, analizar, procesar, guardar e imprimir imágenes en 8 bit’s, 16-bit’s y 32-

bit's. Además, leer numerosos formatos de imagen, incluyendo TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS y RAW.

Formatos para archivos de imágenes

Existen diferentes formatos para guardar imágenes, entre los que se pueden mencionar como métodos de compresión públicos TIFF, GIF, JPG, PNG. El JPG (Join Photograph Expert Group), es el método de compresión más adecuado para fotografías e imágenes de tonos continuos similares que contiene muchos colores y permite obtener una compresión muy alta, manteniendo a su vez una calidad en la imagen muy elevada. JPG analiza las imágenes y elimina la información que no es apreciable visualmente. Programas avanzados de tratamiento de imágenes como Paint Shop Pro o Photoshop permiten ver la calidad de la imagen y el tamaño del archivo como una función de nivel de compresión, de esa forma, se puede elegir convenientemente la calidad y el tamaño del archivo deseado.

Tejido sanguíneo

El tejido sanguíneo se caracteriza porque está constituido por células libres que son los **eritrocitos, los leucocitos y plaquetas,**

además por su matriz extracelular líquida conocida como plasma sanguíneo. Las células sanguíneas más abundantes son los eritrocitos de 4.5 a 5 x 10⁶ por mm³ de sangre, constituyen 99% de la población celular. Los leucocitos son sólo de 5.000 a 9.000 por mm³ de sangre.

Clasificación de las células de la sangre

Eritrocitos (Glóbulos rojos): En condiciones normales, los eritrocitos del ser humano miden aproximadamente de 7 a 8 µm de diámetro, con un grosor de 2,5 µm y aparecen como discos bicóncavos. Aunque las células precursoras de los eritrocitos dentro de la médula ósea poseen núcleo, durante el desarrollo y maduración las células expulsan el núcleo y sus organelas antes de entrar a la circulación, por consiguiente los eritrocitos maduros de mamíferos carecen de núcleo y organelas, pero viven alrededor de 120 días en la sangre debido a que tienen enzimas necesarias para realizar la glucólisis. Sin embargo, en vertebrados no mamíferos como peces, anfibios, reptiles y aves, los glóbulos rojos son nucleados. Con tinción de Wright los eritrocitos se tiñen de color rosa a rojo y el núcleo morado. **Figura 3a.**

Leucocitos (Glóbulos blancos): Los leucocitos son células del sistema inmunológico que viajan a través de la sangre para llegar a los sitios donde son requeridos y llevan a cabo su función fuera de la circulación. Se clasifican en granulocitos y agranulocitos de acuerdo con la presencia o ausencia de gránulos específicos en su citoplasma, aunque cabe aclarar que todos presentan gránulos inespecíficos, que corresponden a lisosomas. [Figura 3 b, c, d, e y f](#)

Granulocitos: Los granulocitos son los **neutrófilos**, **eosinófilos** y **basófilos**, los nombres que reciben los leucocitos granulocitos dependen del color que adquieren sus gránulos específicos con la tinción:

Neutrófilos: Son los leucocitos más abundantes, constituyen entre 50 y 70% de los leucocitos totales. Son también conocidos con el nombre de polimorfonucleares debido a la forma del núcleo, el cual tiene de 3 a 5 lóbulos con cromatina muy condensada. Miden aproximadamente 12 μm y debido a que su principal función es la fagocitosis, son llamados también micrófagos, en comparación con los macrófagos que son de

mayor tamaño. Sus gránulos se pierden en el citoplasma y son pequeños, por tanto son neutros, con tinción de Wright tienen gránulos finos de color pardo. [Figura 3b.](#)

Eosinófilos: Forman de 2 a 4 % del total de leucocitos en sangre, miden de 12 a 15 μm de diámetro, tienen un núcleo bilobulado con un citoplasma lleno de gránulos eosinófilos. Con la tinción de Wright los gránulos se tiñen de color anaranjado a rojo brillante, debido a que tienen afinidad por la eosina que les da dicho color. [Figura 3c.](#)

Basófilos: Son muy escasos en la sangre y se encuentran desde 0 hasta el 1%. Miden aproximadamente 12 μm , su núcleo en forma de S difícilmente se puede observar porque su citoplasma está lleno de gránulos grandes y metacrómicos. Sus gránulos grandes se tiñen de color azul a morado por los colorantes básicos como la tinción de Wright. [Figura 3d.](#)

Agranulocitos: Dichas células no tienen gránulos específicos, dentro de estos están los **linfocitos** y **monocitos**, que con la tinción de Wright tienen un citoplasma azul pálido y gránulos inespecíficos de tamaño mediano.

Linfocitos: Son los agranulocitos más abundantes, constituyen de 20 a 30% de los leucocitos totales. Miden aproximadamente 7 μm , tienen un núcleo muy grande y redondo con heterocromatina y un escaso reborde de citoplasma. **Figura 3e.**

Monocitos: Están presentes en un 3 a 8% de los leucocitos totales. Son las células precursoras de los macrófagos que forman el sistema fagocítico mononuclear, cuya principal función es la fagocitosis. Miden de 12 a 18 μm , son las células más grandes de la sangre. Tienen un núcleo en forma de riñón, grande y excéntrico, así como citoplasma ligeramente basófilo con abundantes lisosomas que le ayudarán en su función fagocítica. **Figura 3f.**

Plaquetas (trombocitos): Se encuentran en la sangre en cantidades de 150.000 a 450.000 por milímetro cúbico (mm^3) de sangre. Son fragmentos del citoplasma de una célula precursora más grande de médula ósea, el megacariocito. Tienen forma de disco con un diámetro de 2 a 3 μm , pero al activarse cambian su forma haciendo prolongaciones que le dan un aspecto de estrella que facilita la adhesión y agregación. Las plaquetas aparecen como grupos de estructuras pequeñas teñidas de azul pálido,

a veces se identifican en su interior pequeñas masas granulares moradas. **Figura 3g.**

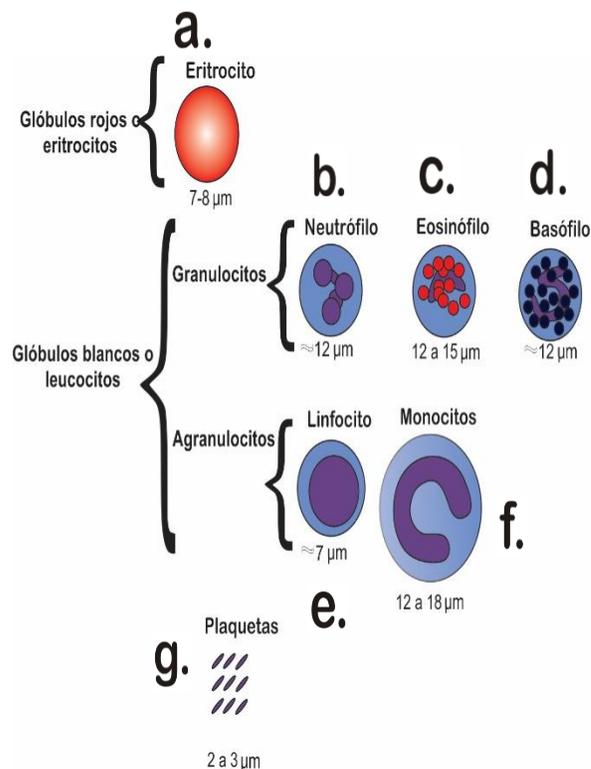


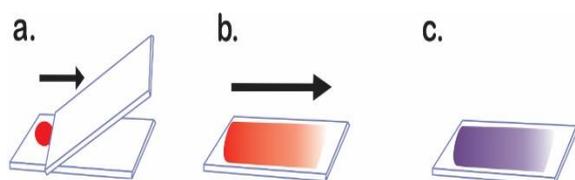
Figura 3. Características morfológicas de las células sanguíneas. a. Eritrocitos b. Neutrófilo c. Eosinófilo d. Basófilo e. Linfocito f. Monocitos g. Plaquetas.

➤ Observaciones y preguntas

Preparación de micropreparados de tejido sanguíneo

Limpie la yema del dedo índice con un algodón con alcohol, haga una punción para conseguir una gota de sangre o tome una gota de sangre del tubo con anticoagulante.

Coloque la gota de sangre, en un extremo y en el centro de un portaobjetos bien limpio. Seguidamente, con el empleo del borde de otro portaobjetos y en una posición de ángulo de 45° sobre la gota y dejando que ésta se extienda sobre el borde, realice el frotis sanguíneo. El portaobjetos con el que se hace la extensión debe deslizarse bien y sólo debe pasarse una vez, de forma continua e ininterrumpida. [Figura 4](#).



[Figura 4](#). Preparación del frotis sanguíneo

Es conveniente realizar dos o tres placas, con el fin de seleccionar para la tinción la mejor. Finalmente, los frotis deben secarse al aire lo más rápidamente posible. La desecación se facilita con movimiento en forma de abanico, nunca soplando o por calor. La rápida desecación evita la deformación de las células.

Tinción

Adicione sobre el micropreparado sanguíneo unas gotas de metanol y espere que el alcohol se evapore, con lo que se consigue el fijado.

Deposite cubriendo todo el micropreparado sanguíneo, con unas gotas de reactivo Giemsa o de Wright, deje actuar el colorante unos cinco minutos. Posteriormente, añada agua en partes iguales hasta obtener un brillo metálico, durante 6 minutos adicionales.

Finalmente lave la preparación, hasta que arrastre todo el colorante teniendo cuidado de no dejar caer el chorro directamente sobre el el micropreparado sanguíneo.

En el micropreparado se pueden estudiar las características morfológicas de las células sanguíneas. Observe los micropreparados a 400x y 1000x, ubique un campo microscópico donde las células estén bien separadas.

Los parámetros que se usan para la identificación son: Tamaño y forma del núcleo, tinción nuclear, reacción tintorial del citoplasma, presencia o ausencia de gránulos específicos y reacción tintorial de los gránulos.

Identifique, dibuje y describa las células sanguíneas que observa en los micropreparados, teniendo en cuenta los parámetros de identificación mencionados anteriormente. [Tabla 1](#).

Micrometría celular por el método manual y el programa ImagenJ en microscopía óptica

¿Qué estructuras celulares observa en los glóbulos rojos y glóbulos blancos?

¿En qué consiste el proceso de diapedesis?

¿Cuál es el contenido de los gránulos de

cada uno de los leucocitos granulocitos?

¿Cuál es la función de los lisosomas?

¿Cuál es el fundamento de la tinción de Wright?

Tabla 1. Resultados de la observación microscópica de las células sanguíneas

Tipo de célula	Forma y tamaño de la célula	Características del			Función de la célula
		Núcleo	Citoplasma	Gránulos	
Eritrocito					
Neutrófilos					
Eosinófilos					
Basófilos					
Linfocitos					
Monocitos					
Plaquetas					

En las siguientes micrografías de las figuras 5 a la 8 identifica las células del tejido sanguíneo.

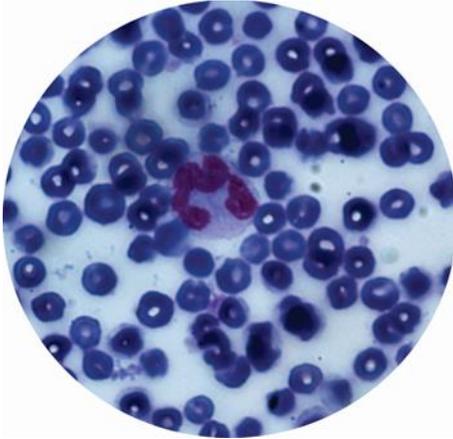


Figura 5. Muestra de sangre equina. 1000x

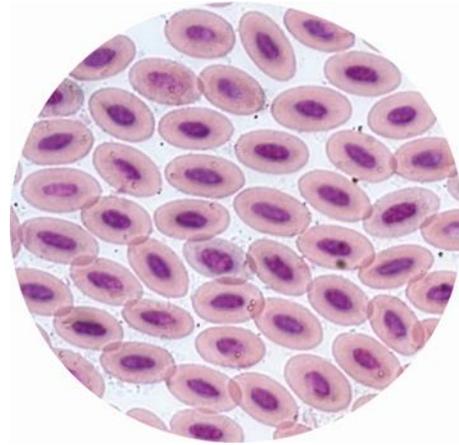


Figura 8. Glóbulos rojos de ave. 1000x.

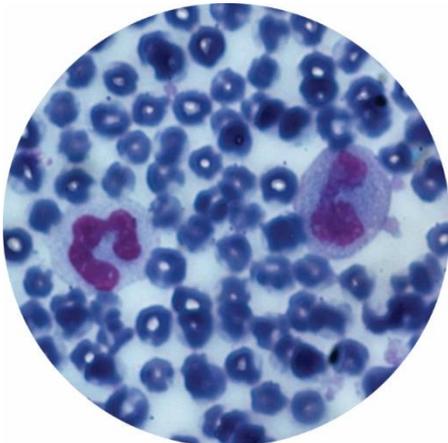


Figura 6. Muestra de sangre equina. 1000x

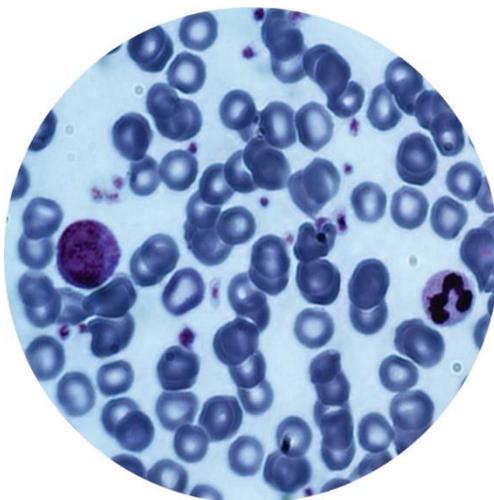


Figura 7. Muestra de sangre canina. 1000x

➤ **Determinación del tamaño de células mediante el método manual**

Calibración del micrómetro

El objetivo de la calibración es determinar el ancho en micrones de cada división de la escala ocular, cuando se calibra en comparación con la escala micrométrica de platina.

Cuando se observa a través del ocular, la escala micrométrica aparece como una serie de divisiones limitadas por líneas, como se muestra en la figura 9a. Coloque el micrómetro de platina bajo el objetivo del microscopio a calibrar. Enfoque la escala micrométrica de platina que aparece como una serie de líneas separadas por espacios de 0,1 y 0,01 mm, como se muestra en la figura 9b.

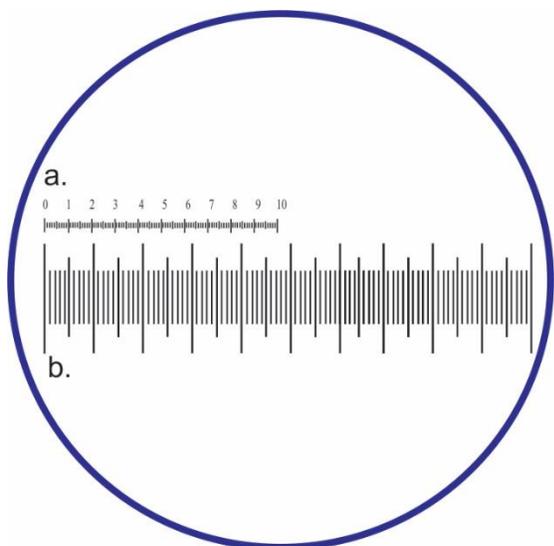


Figura 9. a. escala micrométrica ocular. b. escala micrométrica de platina.

Regule el micrómetro de la platina de tal manera que la línea del 0 del ocular micrométrico coincida exactamente con la línea del 0,0 de la escala micrométrica de la platina.

observe a lo largo de ambas escalas para encontrar el primer par de líneas en las cuales coincidan exactamente.

Por ejemplo, con un aumento de 40x, las líneas coincidentes se encuentran en la línea 4 de la escala ocular y en la marca 0,05 mm de la escala micrométrica de platina. Las 4 unidades de la escala ocular equivalen a 0,05 mm de la escala micrométrica de la platina; por lo tanto, cada división ocular equivale a $0,05 \text{ mm}/4$ o sea, $0,0125 \text{ mm}$. Debido a que cada milímetro son $1.000 \mu\text{m}$, cada división

del micrómetro ocular, para la calibración ilustrada, es igual a $0,0125 \times 1.000 = 12,5 \mu\text{m}$. De esta forma, si un objeto observado con el microscopio ocupa 2 divisiones de la escala ocular, su medida será $12,5 \times 2 = 25 \mu\text{m}$.

Realice la calibración para el aumento de 40x y coloque el dato en la tabla 2.

Tabla 2. Resultado de la Calibración

Aumento X	Equivalencia um
40	
100	5
200	2.5
400	1.25
1000	0.5

Cálculo del tamaño celular

Teniendo en cuenta los datos de la calibración del ocular micrométrico consignados en la tabla anterior, realice la medición del tamaño de una célula procariota (bacteria) y una célula eucariota (Células sanguíneas). Se recomienda tener en cuenta la forma celular para registrar los datos necesarios para el cálculo de la relación superficie/volumen

Procariota

Eucariota

Concluya al comparar los tamaños

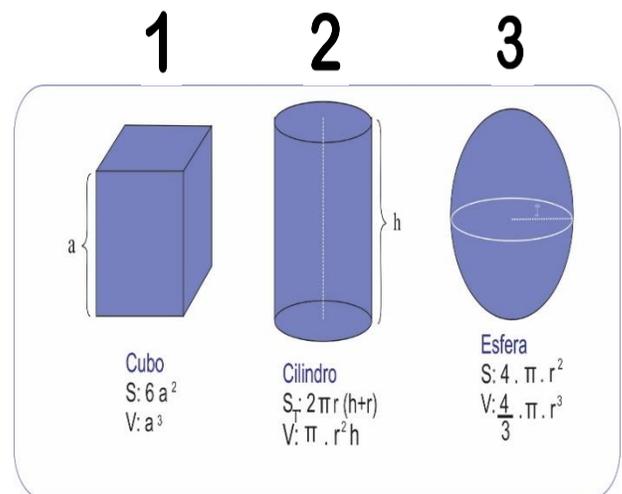
Cálculos de la relación superficie/volumen

Para desarrollar este punto tenga en cuenta la forma de la célula, los datos obtenidos en el punto anterior y la fórmula en la tabla 3, para calcular la relación superficie/volumen.

Por ejemplo, un cubo es un cuerpo formado por seis caras cuadradas y en cada vértice convergen 3 aristas mutuamente perpendiculares. El volumen de un cubo es igual al valor de su lado elevado al cubo, y la superficie es seis veces el lado al cuadrado, como se indica en la fórmula de la [tabla 3](#). Si el lado del cubo mide $3\mu\text{m}$ entonces su volumen es $27\mu\text{m}^3$ y la superficie es $54\mu\text{m}^2$.

Tabla 3. Fórmula de superficie y volumen.

1. Cubo 2. Cilindro 3. Esfera



a = arista (lado), S= superficie, V= volumen, $\pi = 3.1416$, h =altura, SL = superficie lateral, ST = superficie total r = radio.

Realice los siguientes ejercicios

¿Cuál es la relación superficie /volumen para la célula A de forma cúbica que su lado mide 2 μm y para la célula B de forma cúbica que su lado mide 3 μm.

¿Cuál es la relación superficie /volumen para una célula A de forma esférica que su radio es de 2μm y para una célula B de forma

esférica con 3μm de diámetro. $V= 4/3 \pi \cdot r^3$,
superficie $S= 4 \pi \cdot r^2$.

¿Qué puede concluir de los datos anteriores?

¿Cuáles son las razones para que las células sean tan pequeñas?

¿Por qué es importante conocer el tamaño de una célula?

Tabla 4. Resultados de medida de la superficie y volumen

Procariotas	Eucariotas
Superficie	Superficie
Volumen	Volumen

¿Cuál es la superficie y el volumen para las células que midió? [Tabla 4.](#)

¿Cuál es la relación superficie/ volumen para cada célula. [Tabla 4.](#)

¿Qué puede concluir del tamaño de la célula en relación a la superficie / volumen?
[Tabla 4.](#)

¿Qué relación hay entre el tamaño de la célula y la eficiencia de la misma para intercambiar sustancias? [Tabla 4.](#)

➤ **Medición celular con el programa ImageJ**

La medición del tamaño y/o ultraestructuras celulares se puede hacer en micrografías tomadas en microscopios con sistema de fotografía. Para hacer las medidas se recomienda tomar las micrografías de las células y de la escala micrométrica de platina con la misma magnificación y resolución, además guardarlas en archivos

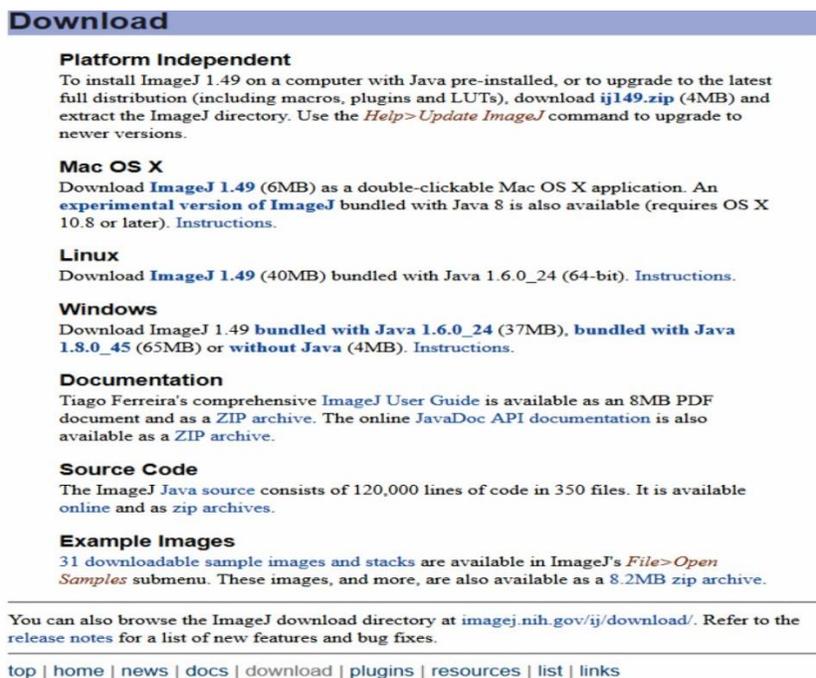
JPG.

Instalación y configuración

Descargue el programa ImageJ desde: <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>

A continuación se dan los pasos a seguir para desarrollar la actividad:

Se abre la siguiente ventana, seleccione el sistema operativo y la versión que corresponda a su equipo (32 o 64 bit)



Download

Platform Independent
To install ImageJ 1.49 on a computer with Java pre-installed, or to upgrade to the latest full distribution (including macros, plugins and LUTs), download [ij149.zip](#) (4MB) and extract the ImageJ directory. Use the *Help>Update ImageJ* command to upgrade to newer versions.

Mac OS X
Download [ImageJ 1.49](#) (6MB) as a double-clickable Mac OS X application. An [experimental version of ImageJ](#) bundled with Java 8 is also available (requires OS X 10.8 or later). [Instructions](#).

Linux
Download [ImageJ 1.49](#) (40MB) bundled with Java 1.6.0_24 (64-bit). [Instructions](#).

Windows
Download ImageJ 1.49 [bundled with Java 1.6.0_24](#) (37MB), [bundled with Java 1.8.0_45](#) (65MB) or [without Java](#) (4MB). [Instructions](#).

Documentation
Tiago Ferreira's comprehensive [ImageJ User Guide](#) is available as an 8MB PDF document and as a ZIP archive. The online [JavaDoc API](#) documentation is also available as a ZIP archive.

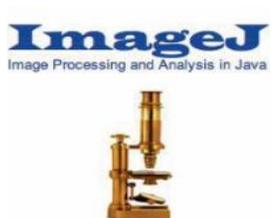
Source Code
The ImageJ Java source consists of 120,000 lines of code in 350 files. It is available [online](#) and as zip archives.

Example Images
31 downloadable sample images and stacks are available in ImageJ's *File>Open Samples* submenu. These images, and more, are also available as a 8.2MB zip archive.

You can also browse the ImageJ download directory at imagej.nih.gov/ij/download/. Refer to the [release notes](#) for a list of new features and bug fixes.

[top](#) | [home](#) | [news](#) | [docs](#) | [download](#) | [plugins](#) | [resources](#) | [list](#) | [links](#)

Al finalizar la instalación, aparecerá un acceso directo de ImageJ



De doble click en el icono, inmediatamente se abre la interfase principal del programa.



Abra la imagen del micrómetro de platina: File>Open. **Figura 10.**

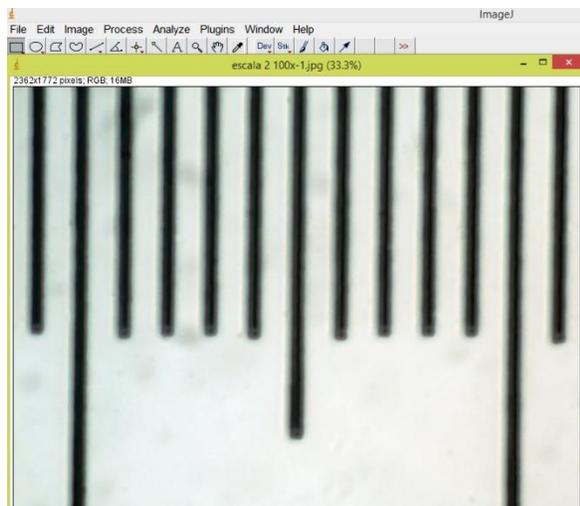


Figura 10. Micrografía de la escala micrométrica

Para medir, utilice la herramienta de líneas rectas. Trace una línea de selección del largo de la división conocida del micrómetro de platina. **Figura 11.**

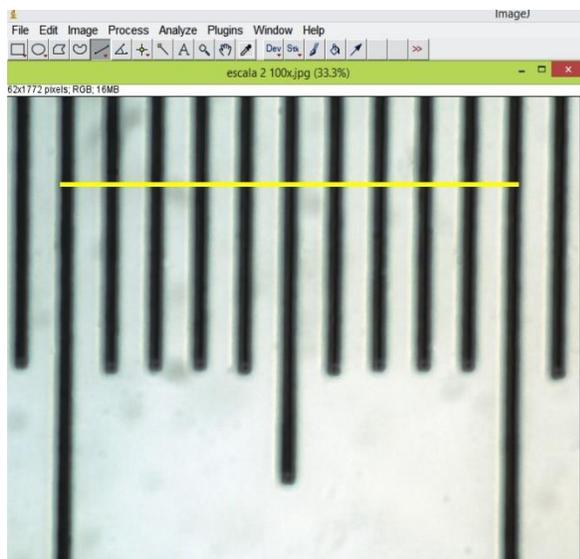


Figura 11. Distancia conocida en el micrómetro de platina.

El programa da una medida en píxeles de la línea que se acaba de trazar, en la interfase

del programa aparece el ángulo para la línea con 0° o 90° respecto a la horizontal. Se recomienda trabajar con mouse para facilitar el trazado y la precisión.

Establezca la escala: Analyze >Set Scale
ImageJ reconoce la medida que se hecho previamente en el campo “Distancia en píxeles”. Se ingresa la distancia conocida en micras del paso anterior: Known Distance.

Se ingresa la unidad de medida “Unit of Length”, en este caso es la micra: um.

Finalmente, seleccione la casilla “Global”, para que esta calibración sea aplicable a todas las imágenes que se van a medir. Se aceptan estos cambios con click en OK.

Figura 12.

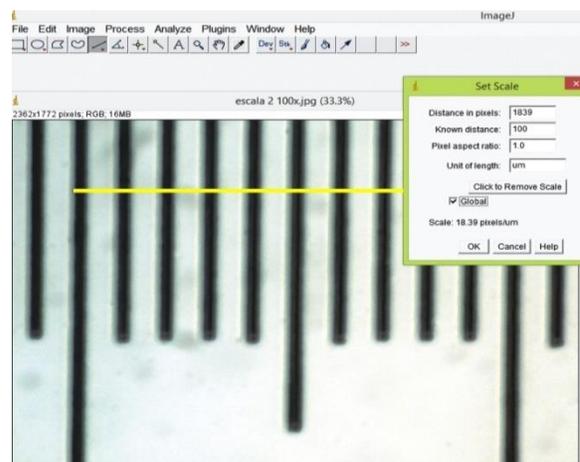


Figura 12. Ingreso de datos

Se abre la imagen que se desea medir. En este ejemplo se abrió la micrografía de células sanguíneas. **Figura 13.**

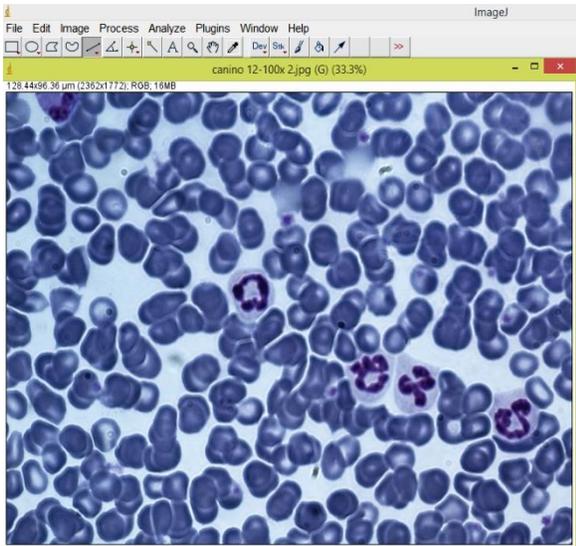


Figura 13. Micrografía de células sanguíneas. 1000x.

Nuevamente, utilizando la herramienta de líneas rectas, se traza una línea de selección de la célula que se va a medir. Figura 14.

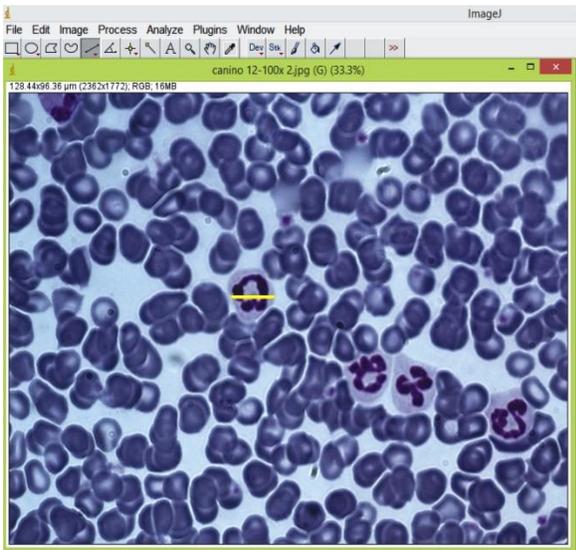


Figura 14. Micrografía con una célula sanguínea seleccionada para medir. 1000x.

Selecione en la herramienta: Analyze> Set Measurements, lo que se desea medir. Figura 15.

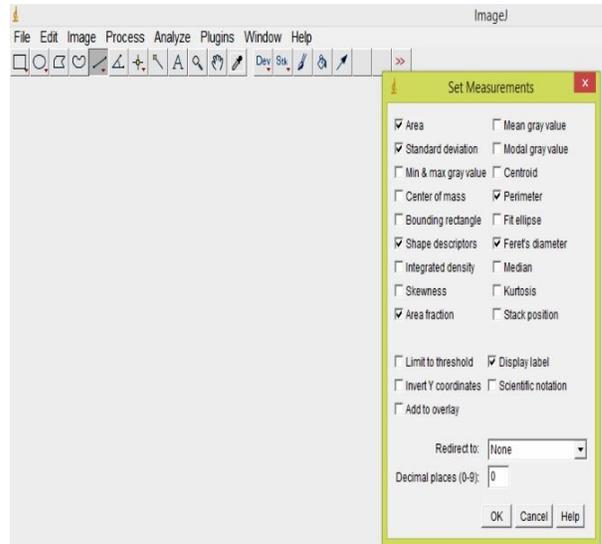


Figura 15. Parámetros a medir.

Se solicita al programa ImageJ que mida lo que se ha seleccionado: Analyze> Measure, en este caso la longitud (length) se registra en la última columna de la tabla de resultados. Tabla 5.

Tabla 5. Resultados

Results							
Label	Angle	Feret	FeretX	FeretY	FeretAngle	MinFeret	Length
1 canino 12-100x 2.jpg	0	9	51	43	0	0	9

Para agregar la barra de escala a la imagen: De click en Analyze>Tools>Scales Bar. Figura 16.

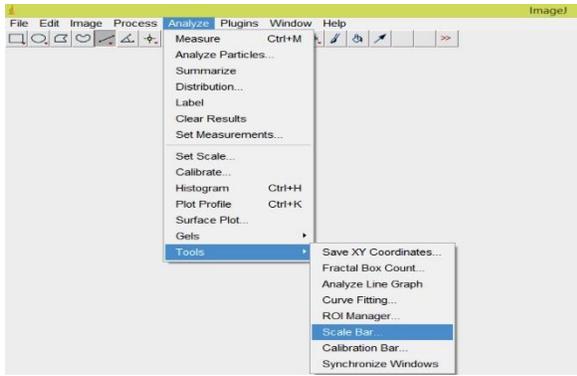


Figura 16. Barra de escala

Seleccione el ancho, tamaño, color, ubicación y tipo de texto de la barra. Figura 17.

Mida 5 células de una micrografía de células sanguíneas, tomada a la misma magnificación y resolución de la micrografía

del micrómetro de platina que se ha empleado para la calibración. Compare los datos del diámetro obtenido con el dato teórico, según el tipo de célula. Haga una descripción de las características estructurales de las diferentes células medidas.

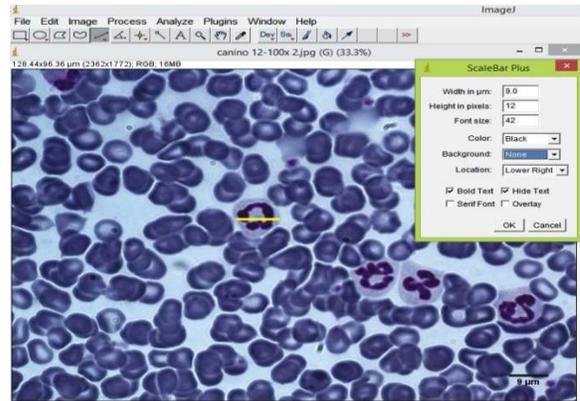


Figura 17. Característica de la barra de escala

➤ **Bibliografía**

Capítulo 3. La célula. Recuperado de http://genomasur.com/BCH/BCH_libro/index_bloque_3.htm

Curtis, H., Barnes, N. S. (2000). *Biología* (6ª ed). España: Editorial Médica Panamericana.

Ferreira T., Rasband W. (2012). *ImageJ. User Guide IJ 1.46r*. Recuperado de <http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide>

Fortoul T., Castell A. (2010). *Histología y Biología celular*. McGraw Hill.

Guía del estudiante. Curso práctico de *Biología Celular* (2011). Universidad de la República. Facultad de Ciencias. Uruguay.

Karp, G. (1996). *Biología celular y molecular* (2ª ed). México: McGraw-Hill-Interamericana.

Madigan, M.T., Martinko, J. M., Parker, J. (2009). *Brock Biología de los microorganismos* (12ª ed). España: Pearson-Prentice-Hall.

Sandoval, E. (2005). *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*. Instituto de Biología. México. Universidad Nacional Autónoma de México.

Sepúlveda S. J. (2011). *Histología. Biología celular y tisular. Instructivo de laboratorio*. (5ª Ed). México. McGraw Hill.

Tapia R. M. (2013). *ImageJ para microscopía*. Unidad de Microscopía. Instituto de Investigaciones Biomédicas. México. Universidad Nacional Autónoma de México.

Winn, W. C., Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, E. W., Procop, G. W., Schrenckenberger, P. C., Woods G. L. (2008). *Koneman: Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas* (6ª ed). Bogotá: Editorial medica Panamericana.

Notas

Capítulo 8

Estimación del índice mitótico en el meristemo de raíces de liliáceas



➤ Introducción

Ciclo celular

El Ciclo celular es la secuencia ordenada de eventos macromoleculares en los cuales una célula eucariota duplica sus cromosomas y se divide en dos células hijas, cada una de las cuales contiene cromosomas idénticos a los de la célula madre.

El ciclo celular se divide en dos etapas fundamentales: [Mitosis e Interfase](#).

La mitosis o división del núcleo es la etapa que corresponde a la separación y distribución de los cromosomas hijos en cada una de las células hijas y termina, generalmente, en la citocinesis. La citocinesis se define como la división del citoplasma tras la mitosis para generar dos células hijas, cada una con un núcleo y orgánulos citoplasmáticos.

Así mismo, la mitosis se divide en cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase; durante estas fases los cromosomas se condensan, la envoltura nuclear de la mayoría de las células se desintegra, el citoesqueleto se reorganiza para formar el huso mitótico y los cromosomas migran a polos opuestos.

La división celular, es un proceso que se experimenta durante el crecimiento y el desarrollo, en la curación de heridas, regeneración de tejidos y en la función del sistema inmunológico.

En la etapa de interfase, los cromosomas se descondensan y se distribuyen por el núcleo, por lo que el núcleo presenta un aspecto uniforme. Sin embargo, a nivel molecular, en la interfase es cuando ocurren el crecimiento celular y la replicación del ADN

de manera sucesiva, lo que deja a la célula preparada para la división.

Por lo tanto, la interfase, es el periodo más largo del ciclo celular, entre dos mitosis, que incluye las fases G₁, S y G₂. En la G₁ (Gap= intervalo), las células sintetizan RNA y proteínas, para prepararse para la síntesis de ADN y replicación de los cromosomas paternos durante la fase S (síntesis); después de avanzar a través de la fase G₂, las

células empiezan el proceso de M (mitosis) donde tiene lugar la división celular, que genera dos células hijas. En ciertas condiciones, las células abandonan el ciclo celular durante G₁ y permanecen en el estado G₀, un estado de reposo, en el que las células continúan activas metabólicamente pero no proliferan a no ser que sean requeridas para ello mediante las señales extracelulares apropiadas. [Figura 1.](#)

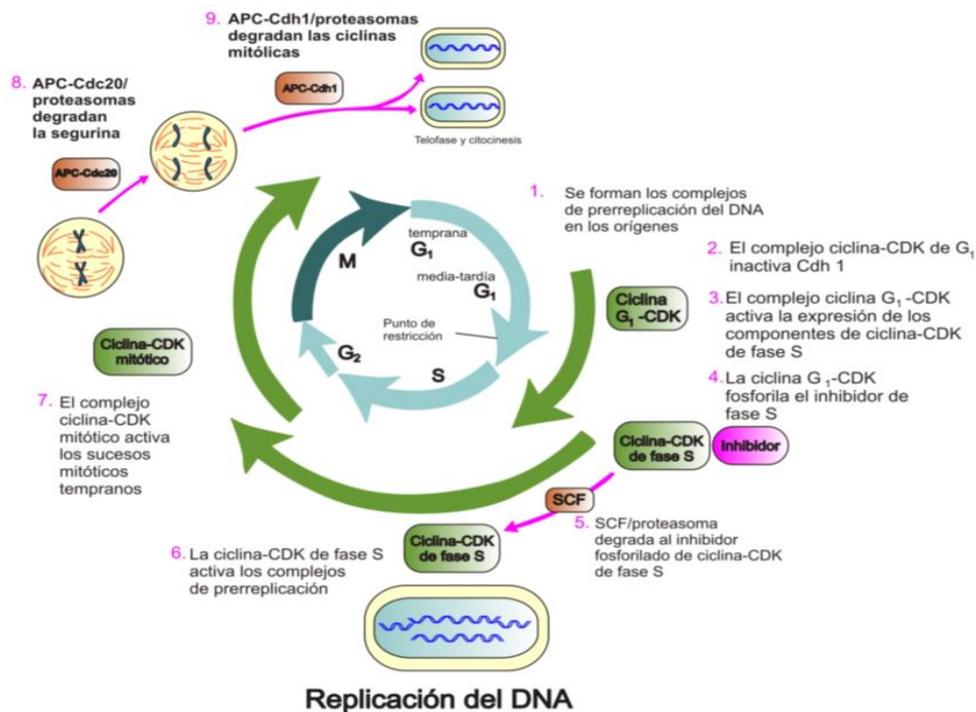


Figura 1. Ciclo celular y modelo general de la regulación del ciclo celular

La duración de estas fases del ciclo celular varía considerablemente según los distintos

tipos de células. Para una célula de proliferación rápida humana típica, con una

duración total del ciclo de 24 horas, la fase G₁ dura unas 11 horas, la fase S unas 8 horas, G₂ cerca de 4 horas, la M y la citocinesis duran una hora, aproximadamente, por lo tanto el 95% del ciclo celular transcurre en interfase.

Meristemo radicular

La mitosis, se puede observar en meristemas primarios del ápice de las raíces de liliáceas, como la cebolla, el ajo y el jacinto, entre otras; se encuentra ubicado en una posición subterminal de la raíz, es generalmente blanco, denso y redondeado.

La división celular en plantas con flores se lleva a cabo en los meristemas, en el cual las células no están especializadas para ninguna función particular y se dividen repetidamente por mitosis, en este caso, la proliferación celular hace que crezca la raíz.

Es así que algunas de las células hijas permanecen meristemáticas (en división continua), mientras que otras dejan de dividirse y se diferencian en tipos de células apropiadas dependiendo de su posición, por ejemplo, el meristemo radicular contiene un grupo de células inactivas mitóticamente que forman el llamado centro quiescente. Además, el meristemo está protegido por la

cofia o caliptra, la cual está formada por una masa de células parenquimáticas secretoras de glicosaminoglucano de acción lubricante cuya función es ayudar a la raíz en su penetración a través del suelo y proteger el meristemo apical. Las células más externas de la cofia se mueren y se desprenden siendo reemplazadas a partir del meristemo radicular. Algunas de las células de la cofia, llamadas estatocistos, contienen inclusiones citoplasmáticas sólidas situadas en la parte inferior de la célula, que son principalmente granos de almidón y que están implicados en el crecimiento de la raíz con dirección geotrópica. [Figura 2.](#)

El meristemo apical está compuesto por células relativamente pequeñas de 10 a 20 micrómetros de diámetro, con citoplasma denso y núcleos grandes con cromatina condensada y una pared celular primaria delgada que les permite dividirse continuamente por mitosis. Estas divisiones siguen una asincronía uniforme, es decir, son constantes los porcentajes de células que se encuentran en cada fase de la división mitótica. Durante la citocinesis se forma el tabique separador de las células hijas que es perpendicular al eje longitudinal de la raíz, permitiendo de esta manera el crecimiento

en longitud de la misma. A partir de este meristemo se produce el crecimiento primario de la raíz y da lugar a los tejidos primarios.

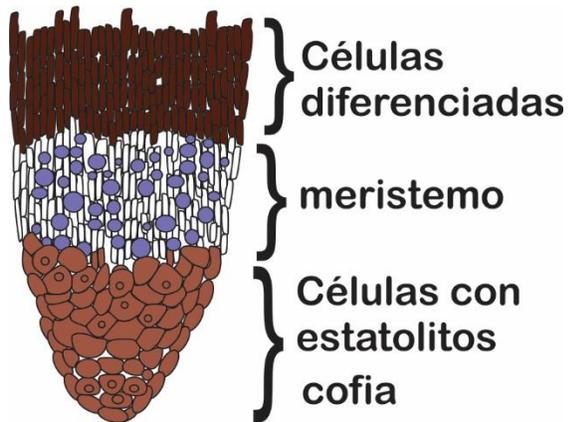


Figura 2. Corte transversal del ápice de raíz de cebolla

En las plantas superiores los meristemos proliferan siguiendo una cinética en equilibrio dinámico, lo que puede evaluarse a través de una serie de indicadores tales como: la velocidad de crecimiento, la población de células en división celular, la duración del ciclo celular, el índice mitótico y la frecuencia de células en los diferentes estados morfológicos, entre otros.

Índice Mitótico (IM)

El sistema de índice, introducido por Minot en 1908, se define como la relación entre el

número de mitosis en cualquier momento sobre el número total de células presentes.

El índice mitótico se utiliza para análisis cuantitativos de la proliferación, por ejemplo, en el epitelio escamoso estratificado, expresa el número de mitosis con relación a una unidad de referencia. La población total de células epiteliales es generalmente usada como la referencia y el número de células en división se expresan en relación a 100 o 1000 de las células epiteliales presentes.

En patología, se define como la proliferación celular directamente en cortes histológicos, donde el índice mitótico corresponde al número de células en mitosis por unidad de 1000 células. También se define como el número de mitosis por un determinado número de campos ópticos (generalmente 10) a 400x. Un elevado índice mitótico se ha relacionado con neoplasias malignas agresivas, es decir, se cuentan las figuras de mitosis en 10 campos microscópicos de alto poder (que puede ser distinto para cada tipo de tumor) y, que junto con la necrosis y la diferenciación, el índice mitótico bajo, medio o alto define el grado histológico. por ejemplo, una escasa diferenciación, una intensa necrosis y un IM alto equivalen a un tumor de grado alto, es decir de marca

agresiva. Sin embargo, el IM no siempre es sinónimo de malignidad, ya que tumores benignos como los histiocitomas tienen un IM alto, y muchos tumores malignos pueden tener un IM bajo.

Finalmente, el diccionario del Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos, define el índice mitótico en una población de células, como el coeficiente entre el número de células que experimentan mitosis (multiplicación de células) y el número de estas que no experimentan mitosis.

El índice mitótico se puede utilizar para estimar una medida indirecta de las tasas de proliferación de un tipo celular animal o vegetal particular. Además, ha sido considerado como un importante criterio del crecimiento y multiplicación de los tejidos.

Se mide comúnmente en muestras fijas y con tinción, y por lo tanto representa la etapa del material en el momento de la observación.

Para estimar el porcentaje del IM, se calcula entre el número de células en división mitótica con respecto al número total de células meristemáticas (células en mitosis + células en interfase) observadas en el campo

microscópico, multiplicado por cien, con la fórmula 1:

$$\%IM = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células en división}}{\text{N}^\circ \text{ total de células observadas}} \times 100$$

Fórmula 1

Por otro lado, se puede determinar el porcentaje del Índice de Fases (IF), mediante el número de células observadas en una fase mitótica definida entre el número total de células en mitosis (profase+ metafase+ anafase+ telofase), multiplicado por cien, con la fórmula 2:

$$\%IF = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células en determinada fase}}{\text{N}^\circ \text{ total de células en mitosis}} \times 100$$

Fórmula 2

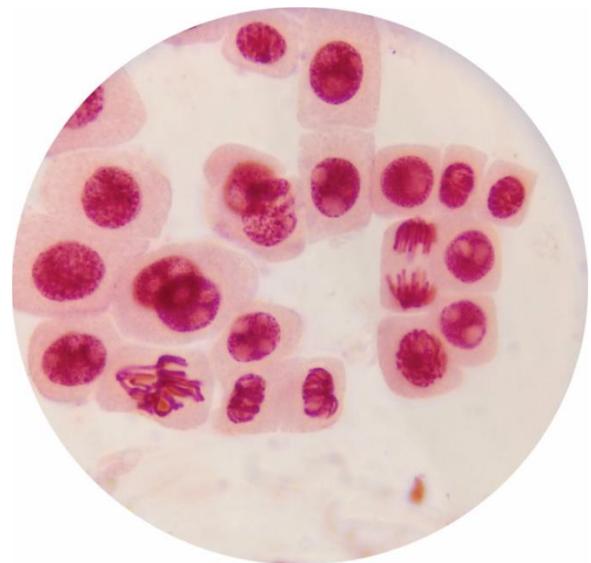


Figura 3. Células meristemo de cebolla en división celular (Mitosis). 1000x.

➤ **Observación y preguntas**

Indique las etapas del ciclo celular y las fases de la mitosis que observa en la micrografía de la [figura 3](#).

Describa las micrografías de las [figuras 4 a la 8](#) de cada una de las etapas de la mitosis en una célula vegetal. [Tabla 1](#).

Crecimiento de la raíz: En un frasco con agua coloque una cabeza de ajo o de cebolla que tenga contacto con la superficie del agua, establezca este montaje 4 días antes de su uso.

Se recomienda limpiar las zonas radiculares de las cebollas para eliminar las capas secas, coloque el montaje en una zona aireada, entre 20 y 22 °C, y cambie el agua al menos 2 veces al día.

Fijación: Terminado el tiempo de crecimiento de las raíces, corte 1 a 2 cm de la punta de la raíz y colóquelas por 20 minutos en la solución de etanol-acético (3 partes de etanol absoluto: 1 parte de ácido acético glacial), preparada justo antes del uso. Las puntas de las raíces se pueden

mantener en este líquido fijador a -18°C desde varios días a meses.

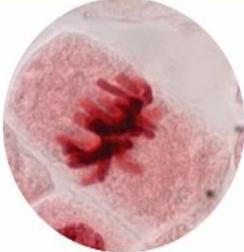
Preparación de las células del meristemo:

Coloque las raíces en un tubo eppendorf que contiene aproximadamente 1 ml de una disolución de HCl 1N durante 10 minutos a 60°C. El tratamiento con el HCl hidroliza los enlaces entre las celulosas de la pared de las células del meristemo y permite una mejor penetración del colorante y fácil aplastamiento a la hora de hacer la preparación. Lave las raíces en agua fría por 4-5 minutos y secar con papel absorbente, con el fin de eliminar el HCl. Corte con una tijera alrededor de 2mm de la punta de la raíz en crecimiento (meristemo), descarte el resto de la raíz

Tinción aceto-orceína y preparación de los micropreparados

Con una pinza transfiera los fragmentos de meristemo de la raíz a un tubo eppendorf, agregue aceto-orceína de tal manera que cubra toda la muestra, deje actuar por 5 minutos. Para acelerar la absorción del colorante, caliente el preparado a 50°C. [Figura 9](#)

Tabla 1. Fases de la mitosis

Etapas de la mitosis	Descripción
 <p>Figura 4.1000x</p>	
 <p>Figura 5.1000x</p>	
 <p>Figura 6.1000x</p>	
 <p>Figura 7.1000x</p>	
 <p>Figura 8.1000x</p>	

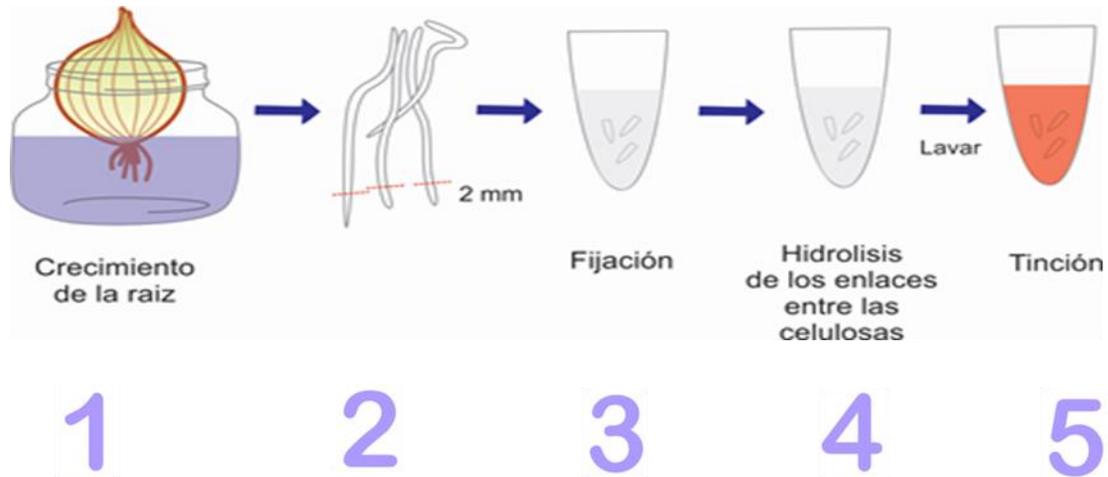


Figura 9. Procedimiento para la obtención del meristemo radicular

Transfiera con una pinza los fragmentos de meristemo de aproximadamente 2mm a un portaobjetos limpio, coloque el cubreobjetos. Evite el exceso del colorante o de trozos de tejido debido a que se perderán por acumulación en el borde del cubreobjetos.

Rompa el meristemo por squash, que puede ser de la siguiente manera:

Coloque en una superficie plana el portaobjetos que contiene el meristemo, doble un par de capas de papel y colóquela sobre el cubreobjetos, rompa el tejido con una fuerte presión vertical con el dedo o dando varios golpes con el extremo romo de una aguja de disección o de un lápiz. Si se forman burbujas de aire, adicione más colorante después del squash.

El meristemo también se puede romper con el uso de una aguja de disección, por maceración de la punta de la raíz sobre el portaobjetos formando un extendido en un área equivalente al tamaño de una moneda. Otra posibilidad, es colocar un nuevo portaobjetos en ángulo recto con el portaobjetos que contiene el meristemo para formar una cruz, y aplastar la punta entre los dos portaobjetos. Este método proporciona dos muestras para la tinción.

Observe la preparación del meristemo de la raíz bajo el microscopio a 400x. Tome micrografías de las células en las diferentes fases de la mitosis.

Examine varias placas y calcule el índice mitótico para cada una.

Estimación del Índice mitótico

Calcule el índice mitótico mediante la fórmula 1, contando 100 células seguidas, diferenciando las que están en división de las que están en interfase:

Registre los datos en la [tabla 2](#).

Tabla 2. Resultados del IM

Células del meristemo	Datos individuales	Dato de otro compañero del grupo
Número de células división		
Número de células interfase		
Número total de células		
IM		

Células del meristemo	Datos individuales	Dato de otro compañero del grupo
Número de células división		
Número de células interfase		
Número total de células		
IM		

Células del meristemo	Datos individuales	Dato de otro compañero del grupo
Número de células división		
Número de células interfase		
Número total de células		
IM		

Compare los resultados en una gráfica de barras, coloque en eje de Y el porcentaje de índice mitótico. ¿Qué concluye de los datos obtenidos?

Compare el índice mitótico obtenido con datos teóricos y con el de otras especies vegetales.

Estimación del índice de las fases mitóticas (IFM)

Sobre la misma preparación realice el recuento en 100 células en mitosis anotando la fase en que se encuentran con aumento de 400x. Calcule el índice de fase con la fórmula 2.

Registre los datos en la [tabla 3](#). Compare sus resultados con los de otro compañero del grupo.

Tabla 3. Resultados del IFM

Fase	Índice de la fase mitótica individual	Índice de la fase mitótica de otro compañero
Profase		
Metafase		
Anafase		
Telofase		
Número de células		
Mitosis		

Fase	Índice de la fase mitótica individual	Índice de la fase mitótica de otro compañero
Profase		
Metafase		
Anafase		
Telofase		
Número de células		
Mitosis		

Fase	Índice de la fase mitótica individual	Índice de la fase mitótica de otro compañero
Profase		
Metafase		
Anafase		
Telofase		
Número de células		
Mitosis		

En una gráfica de barra coloque en el eje Y los porcentajes del índice mitótico de cada fase.

Compare los resultados que obtuvo junto con los datos de otro compañero del grupo, así como con los datos teóricos que indican lo siguiente, en condiciones normales por cada anafase deben encontrarse 2 metafases, por cada metafase deben encontrarse 2 telofases y por cada telofase 2 profases. Por ejemplo, los índices de fases reportados para *Allium cepas* se observan en la figura 10.

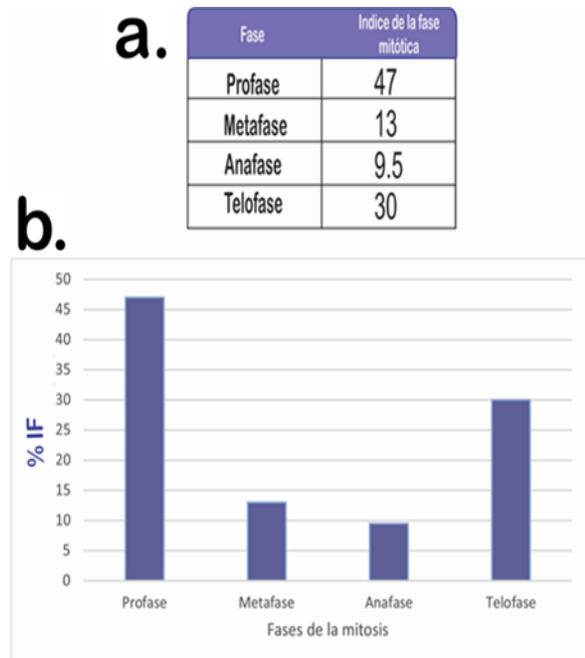


Figura 10. Índice de las fases mitóticas en *Allium cepa*. a. Tabla de resultados b. representación gráfica de los resultados del IF.

Compare el índice mitótico en diferentes especies vegetales o con la aplicación de diferentes concentraciones de extractos vegetales, entre otros.

¿Encuentra variación en el índice mitótico del meristemo de la raíz?

Consulte otras tinciones utilizadas para observar las fases de la mitosis en raíces de plantas.

¿Para qué se utiliza y en qué consiste “Allium test”?

Realice un esquema de la estructura y partes de un cromosoma.

Explique la regulación del ciclo celular en eucariotas. Figura 1.

Consulte en procedimiento a seguir para el análisis del ciclo celular por citometría de flujo.

Diseñe un experimento, modifique por ejemplo, las condiciones de crecimiento del meristemo, las temperaturas y tiempos de crecimiento.

➤ **Bibliografía**

Atlas de histología vegetal y animal. Tejidos vegetales. Meristemas. Recuperado de http://mmegias.webs.uvigo.es/1-vegetal/v-imagenes-grandes/meristemo_primario.php

Bjorklund, C. How to Calculate the Percentage of Mitotic Index .Recuperado de http://www.ehow.com/how_8743914_calculate-percentage-mitotic-index.html

Cooper G., Hausman R. (2014). La célula. (6ª Ed). España. Marbán libros, S.L.

Fases de la mitosis. Universidad de Cádiz. Laboratorio de genética. Recuperado de <http://asociaciones.uca.es/genetica-vid/practicas/fases-de-la-mitosis.pdf>

Ferrer, P. H., Alcorcés G.J., Méndez, N. J. (2007). Determinación del ciclo mitótico de dos cultivares de *Gossypium hirsutum* L. y dos ecotipos de *Gossypium barbadense* L. *Acta Biol. Par., Curitiba*, 36 (3-4), 121-149.

Índice mitótico. Diccionario de cáncer. Instituto Nacional de Cáncer. Recuperado de <http://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=386225>

Investigating mitosis in allium root tip squash. Recuperado de <http://www.nuffieldfoundation.org/practical-biology/investigating-mitosis-allium-root-tip-squash>

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P, Darnell, J. (2005). *Biología Celular y Molecular* (5ª ed). Colombia: Editorial Médica Panamericana.

Manual de patología general. Capítulo 2. Patología celular. Alteraciones del núcleo. Recuperado de

http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/patol_029.html

Peña., C. M., Gonzales-Figueroa., H. (2002). Alteraciones de los índices de fases y mitótico en meristemas de *Allium cepa*, inducidas por extractos de *Lepidium meyenii* Walp "maca". *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Ricardo Palma*, 3 (1), 21-22.

Poblete, S. M. (2001). Marcadores de utilidad en cáncer mamario. *Cuadernos de cirugía*, 15 (1), 74-79.

Práctica 2. Ciclo celular en células vegetales. Recuperado de http://www.unioviado.es/A.Roca/citogenetica/2CICLO_CELULAR.pdf

Raven, P. H., Evert, R. F., Eichhorn, S. E. (1992). *Biología de las plantas*. España. Editorial Reverté, S.A.

Romansik, E. M., Reilly, C. M., Kass, P. H., Moore P. F., London, C. A. (2007). Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol*, 44,3335-341.

Staining a root tip and calculating its mitotic index. Recuperado de <http://www.nationalstemcentre.org.uk/elibrariy/resource/10244/staining-a-root-tip-and-calculating-its-mitotic-index>

The mitotic index. (1973) *Journal of Periodontal Research*, 8(13), 24–28. Published by John Wiley & Sons Ltd.

Walker, P. M. (1954). The mitotic index and interphase processes. *Journal of Experimental Biology*, 31, 8-15.

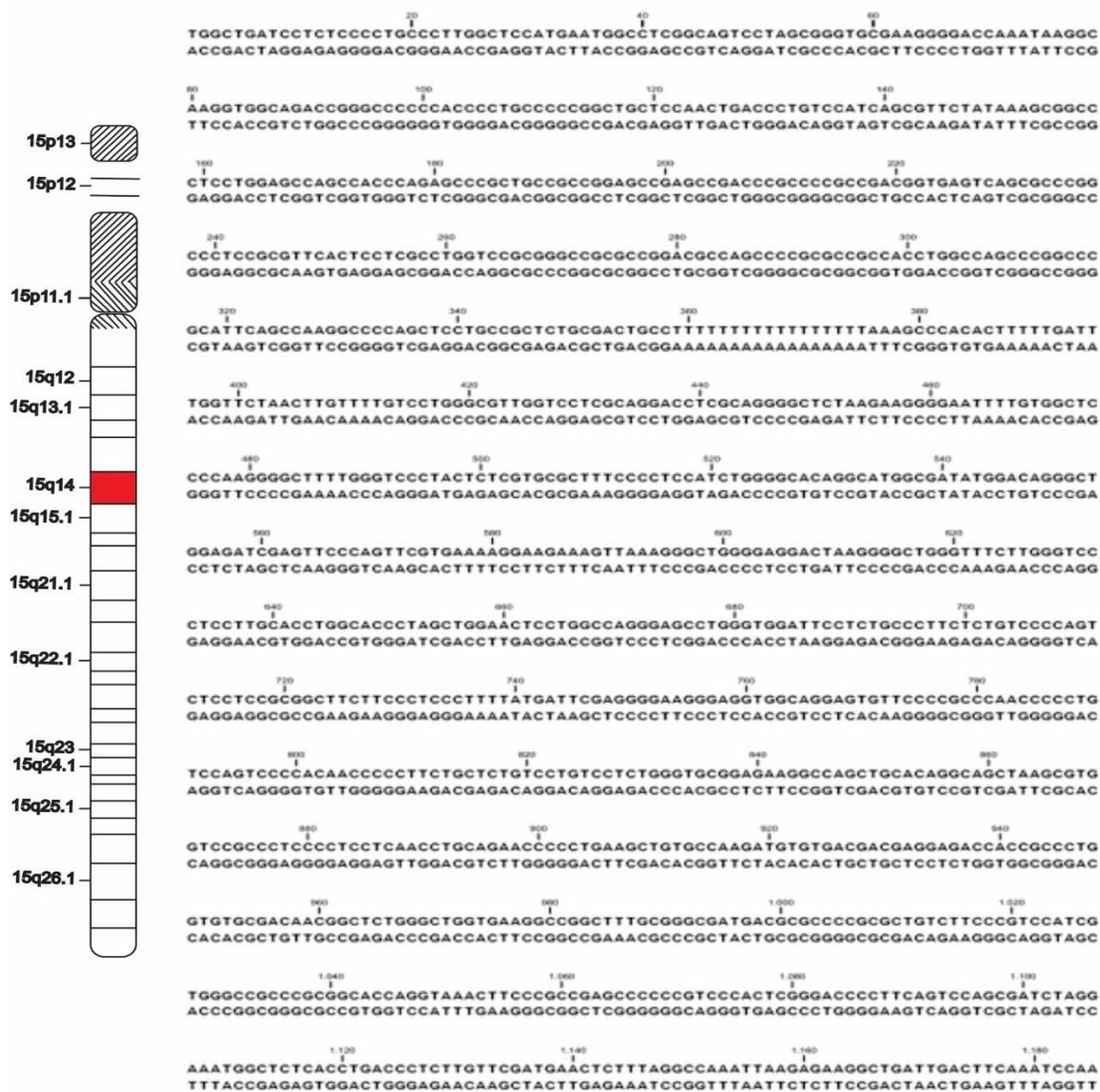
Notas

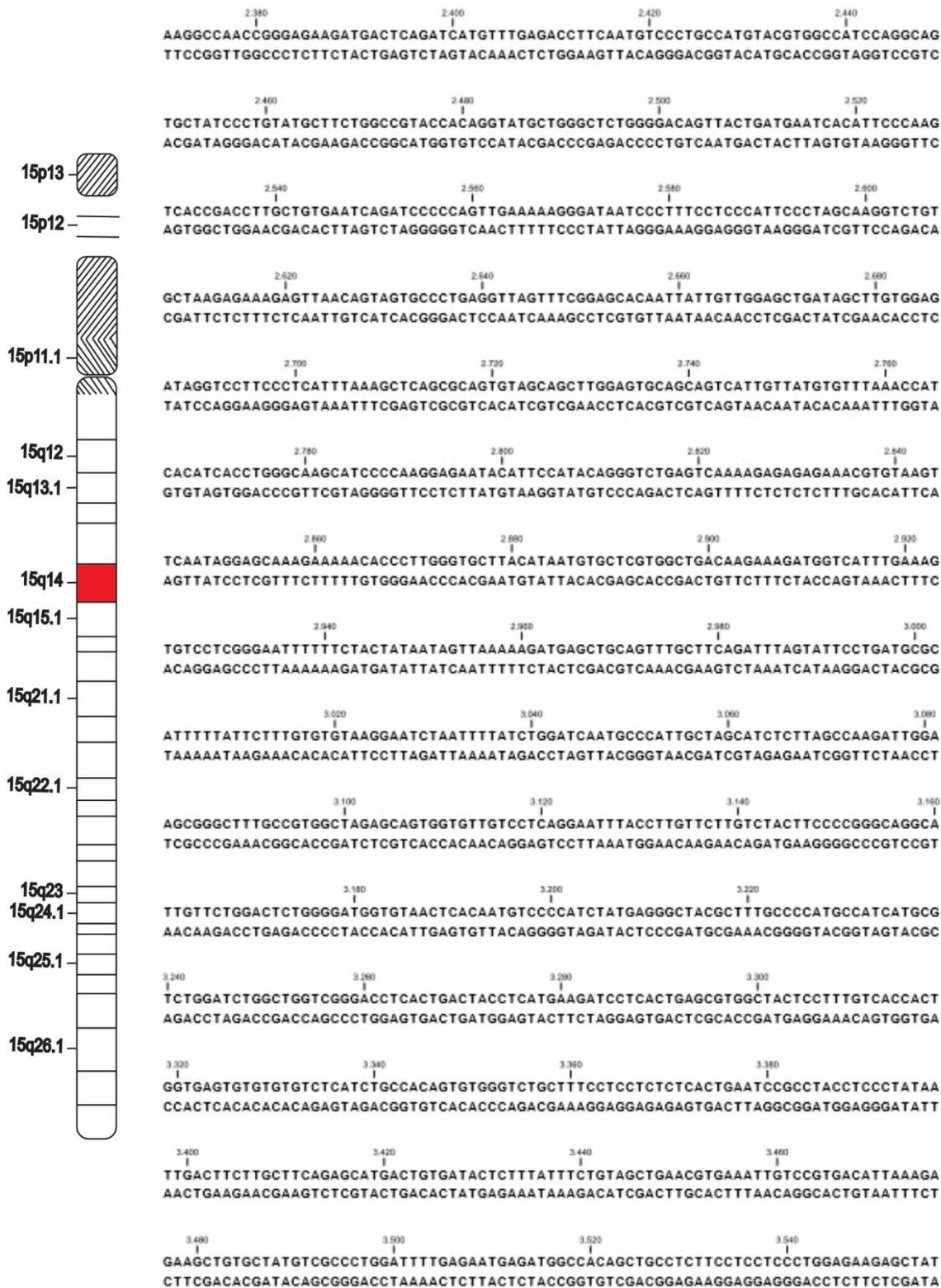
Capítulo 9

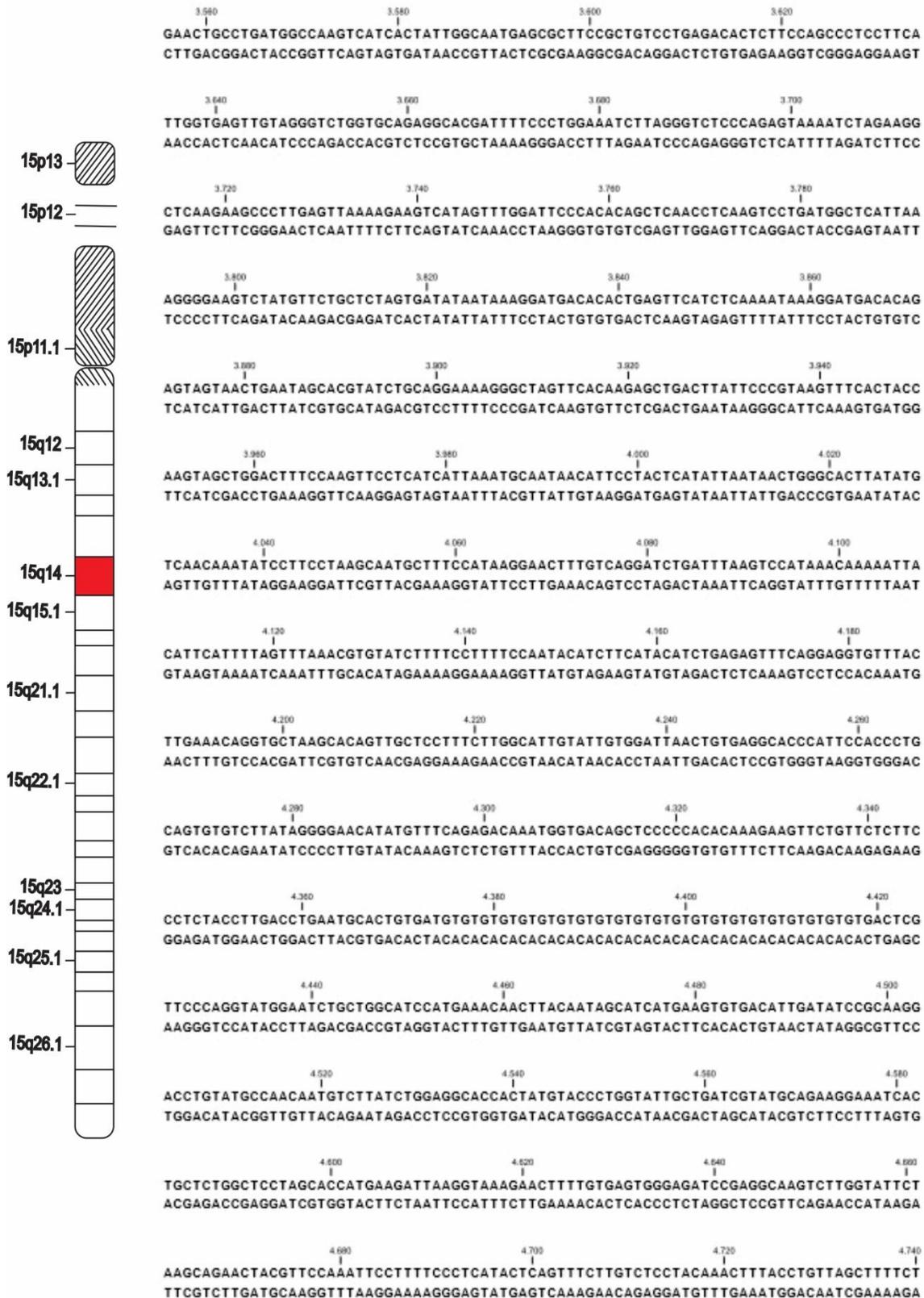
Taller de síntesis de proteínas: Análisis de la secuencia del gen de la alfa actina de músculo cardíaco

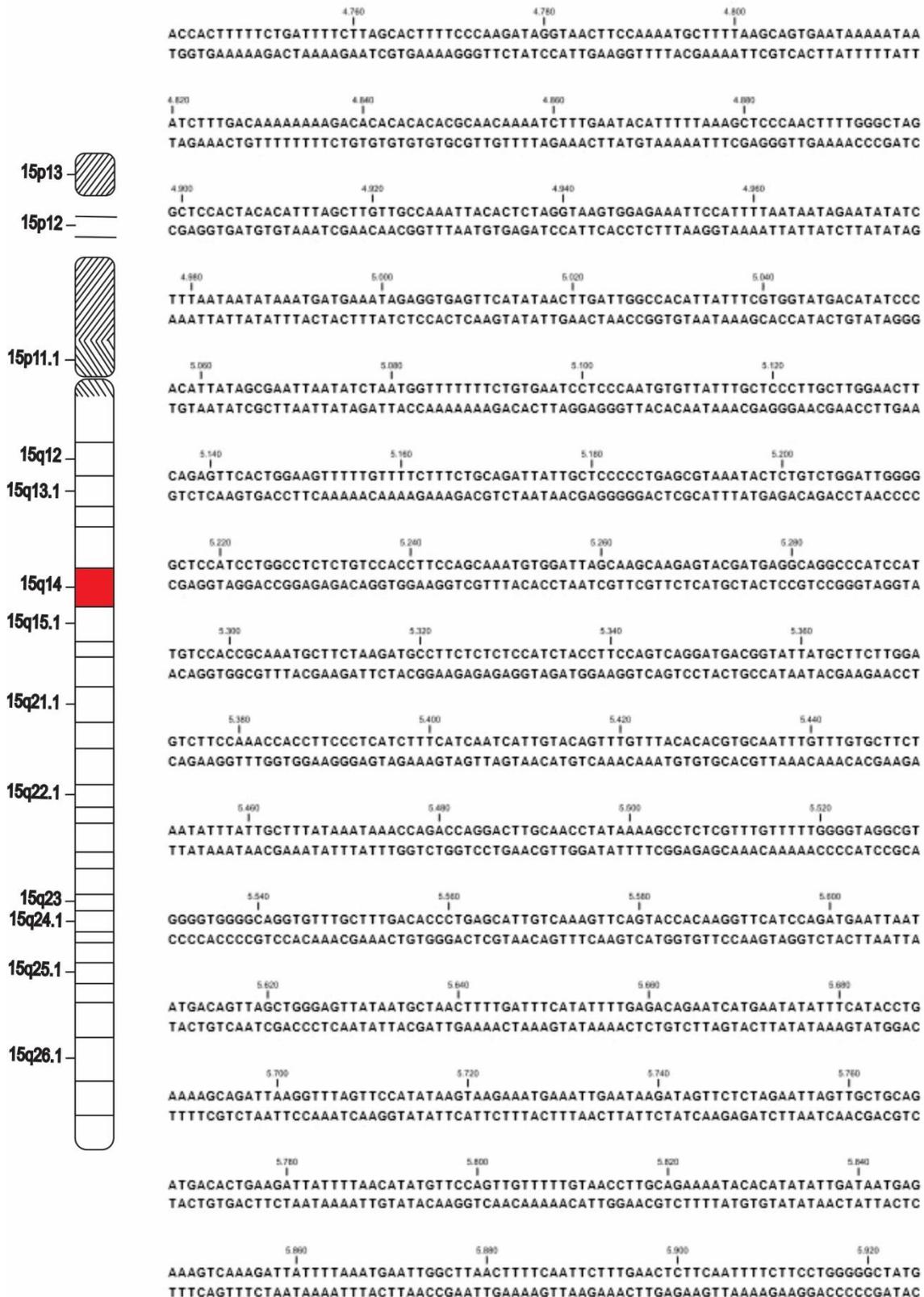
ACCCCTGTCCATCA
CCGAGCCGACCC
GGGCCCGCCCGG
TCCTGCCGCTCT
GTTTTGTCTCTGG
AAGGGGCTTTTGC
CAGGGCTGGAGAT
CTGGGTTTCTTGG
GATTCTCTGCCCT
GAGGGGAAGGGAGGTC

En <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> se encuentra la información del gen de la alfa actina de músculo cardíaco, este gen se localiza en el cromosoma 15q14 del *Homo sapiens* (*ACT1*), con una longitud total de 7631 pares de bases de la hebra codificante del gen. **Figura 1.**









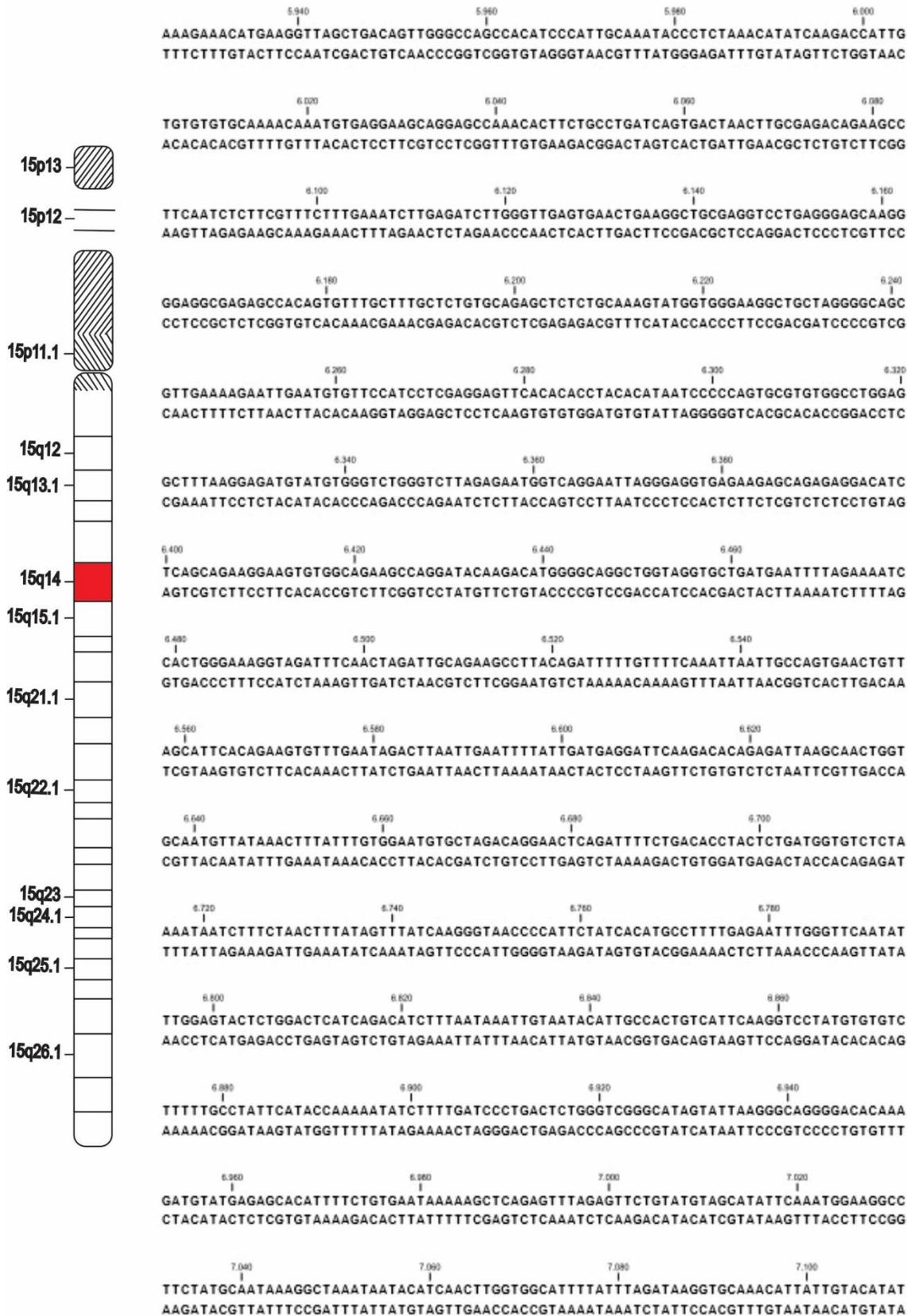




Figura 1. Hebra molde y hebra codificante del gen de la α - actina del músculo cardíaco (fragmento en rojo)

A continuación se presenta la secuencia de nucleótidos del gen de la alfa actina del músculo cardíaco. **Figura 2**

5'

TGGCTGATCCTCTCCCTGCCCTTGGCTCCATGAATGGCCTCGGCAGTCCTAGCGGGTGCAGAGGGGACC
 AAATAAGGCAAGGTGGCAGACCGGGCCCCCAACCCCTGCCCCCGGCTGCTCCAACCTGACCCTGTCCATCA
 CGTTCCTATAAAGCGGCCCTCCTGGAGCCAGCCACCCAGAGCCCGCTGCCGCCGGAGCCGAGCCGACCCG
 CCCC GCCGACGGTGTAGTCAGCGCCCGGCCCTCCGCGTTCACTCCTCGCCTGGTCCGCGGGCCGCGCCGGA
 CGCCAGCCCCGCGCCGCCACCTGGCCAGCCCGGCCGATTCAGCCAAGGCCCCAGCTCCTGCCGCTCTG
 CGACTGCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAGCCACACTTTTTGATTTGGTTCTAACTTGTTTTTGTCTGGG
 CGTTGGTCTCCTCGCAGGACCTCGCAGGGGCTCTAAGAAGGGGAATTTTGTGGCTCCCCAAGGGGCTTTTGG
 GTCCCTACTCTCGTGCCTTTCCCTCCATCTGGGGCACAGGCATGGCGATATGGACAGGGCTGGAGATC
 GAGTTCCAGTTTCGTGAAAAGGAAGAAAGTTAAAGGGCTGGGGAGGACTAAGGGGCTGGGTTTCTTGGGT
 CCTCCTTGACCTGGCACCTAGCTGGAACCTTGCCAGGGAGCCTGGGTGGATTCTCTGCCCTTCT
 CTGTCCCCAGTCTCCTCCGCGGCTTCTTCCCTCCCTTTTATGATTCGAGGGGAAGGGAGGTGGCAGGAGT
 GTTCCCCGCCAACCCCTGTCCAGTCCCCACAACCCCTTCTGCTCTGTCTCTGTCTCTGGGTGCGGAG
 AAGCCAGCTGCACAGGCAGCTAAGCGTGGTCCGCCCTCCCTCCTCAACCTGCAGAACCCCTGAAGCT
 GTGCCAAGATGTGTGACGACGAGGAGACCACCGCCCTGGTGTGCGACAACGGCTCTGGGCTGGTGAAGGC
 CGGCTTTGCGGGCGATGACGCGCCCGCGCTGTCTCCCGTCCATCGTGGGCCGCCGCGGCACCAGGTA
 AACTTCCCGCCGAGCCCCCGTCCCACTCGGGACCCCTTCAGTCCAGCGATCTAGGAAATGGCTCTCACC
 TGACCCTCTTGTTCGATGAACCTTTAGGCCAAATTAAGAGAAGGCTGATTGACTTCAAATCCAAGCCAA
 GGCAAGCAATACTCCACAAAACCCCAACATACTAGGGAATGTACACCTGAGTGGCACGCCTCTAAAAGGG
 TCCCACTCCCTGGTGTGAAAGCCACCTGCTTCTCTCCACTAATGGCCTTTTGGACTTTTAGTCTTTAGTG
 TCTTCTCTGCCTTATACACTTCATTTTCTTCCCTGTCTCTCTTTTTCAGTCTGTTTAAAACCTCTAACA
 ATATCACCTCTCCAACCAACCAGGACCAATCCACATTCCTCTCTCATGTTTACAGCCAGTTTACAGGG
 TTCCCCAAAGGTGTAATCAATCTATCTCCTTCTCTGGCTGTTGCATTTTATAAGCCAGGCGTGCAGAGG
 CAGCAAGTCCATGGTATAGTGACATACCCTCGTTTGTAAAAGACATGCCATGCTCTGGGTTT
 TCACATGCCTGGCCAGACAGGCTGCCAAGCAGGAGAGCTTAGTCTCAGAGCTGGTGAATGACTCCAGAA

CAGCTCTGGACAGGCTGAATTTCACTGTTGGAGTGAGGATGGCATATCAGCCCATCATTATGTGTTCACT
 TGAATGTCAAAATCTTTTTCTTAGGAGAAAATACAATGTGTCAATTAATTCAGTCATTCCAAAATGCAGTCA
 TCTATATTTCCAGTTGCATGGGTGATGAGCTTAATAACTTAATGAAGGCATATGATATTTTTAAGGTGAG
 GTGAGGCTCTGCTTCTCAGTGGAAATAGCTTCATTCTCTCTGAGTTATATTTCTCAACAATAGAAATTATA
 CATCTTTGGGGAGTGGGAGAAAGGTAGAAGATTGATTTTTAAATAAATTTCTAAATTTGGGTAAAATC
 GTATTGCTTGTATTCTGGTATTTAAATATGTTCCCTTGACTTGGGCAGTTAGATATAAATGGACAAAGAC
 ACTGATTATATTTCTGACATGGTGAGAGCATGATTTTTCTCATTTTTTTCTTCTCATAGGGAGTTATGGTGG
 GTATGGGTGAGAAGGACTCCTACGTAGGTGATGAAGCCCAGAGCAAGAGAGGCATCCTGACCCCTGAAGTA
 TCCCATCGAGCATGGTATCATCACCAACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCACCACACCTTCTACAAT
 GAGCTCCGTGTGGCTCCCAGAGGACACCCACCTGCTCACAGAGGCCCGCTGAACCCCAAGGCCAACCC
 GGGAGAAGATGACTCAGATCATGTTTTGAGACCTTCAATGTCCCTGCCATGTACGTGGCCATCCAGGCAGT
 GCTATCCCTGTATGCTTCTGGCCGTACCACAGGTATGCTGGGCTCTGGGGACAGTTACTGATGAATCACA
 TTCCCAAGTCAACCGACCTTGCTGTGAATCAGATCCCCAGTTGAAAAAGGGATAATCCCTTTCTCCCAT
 TCCCTAGCAAGGTCTGTGCTAAGAGAAAGAGTTAACAGTAGTGCCCTGAGGTTAGTTTCCGGAGCACAAAT
 ATTGTTGGAGCTGATAGCTTGTGGAGATAGGTCCCTCCCTCATTTAAAGCTCAGCGCAGTGTAGCAGCTT
 GGAGTGCAGCAGTCATTGTTATGTGTTTTAAACCATCACATCACCTGGGCAAGCATCCCCAAGGAGAATAC
 ATTCCATACAGGGTCTGAGTCAAAGAGAGAGAAAACGTGTAAGTTCAATAGGAGCAAAGAAAAACACCCCT
 TGGGTGCTTACATAATGTCTCGTGGCTGACAAGAAAGATGGTCATTTGAAAGTGTCTCTCGGGAATTTTT
 TCTACTATAATAGTTAAAAAGATGAGCTGCAGTTTGTCTCAGATTTAGTATTCCTGATGCGCATTTTTAT
 TCTTTGTGTGTAAGGAATCTAATTTTTATCTGGATCAATGCCATTGCTAGCATCTCTTAGCCAAGATTGG
 AAGCGGGCTTTGCCGTGGCTAGAGCAGTGGTGTGTCTCAGGAATTTACCTTGTCTTGTCTACTTCCC
 CGGGCAGGCATGTTCTGGACTCTGGGGATGGTGTAACTCACAATGTCCCATCTATGAGGGTACGCTT
 TCCCCATGCCATCATCGCTCTGGATCTGGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 TGAGCGTGGCTACTCCTTTGTACCACCTGGTGTGAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 TCCCTCTCTCTCACTGAATCCGCCTACCTCCCTATAATTGACTTCTTGTCTCAGAGCATGACTGTGATAC
 TCTTTATTTCTGTAGCTGAACGTGAAATGTCCGTGACATTAAGAGAAAGCTGTGCTATGTCGCCCTGGA
 TTTTGAGAATGAGATGGCCACAGCTGCCTCTTCTCCTCCCTGGAGAAGAGCTATGAACTGCCTGATGGC
 CAAGTCATCACTATTGGCAATGAGCGCTTCCGTGTCTGAGACACTCTTCCAGCCCTCCTTCATTGGTG
 AGTTGTAGGGTCTGGTGCAGAGGCACGATTTTCCCTGGAAATCTTAGGGTCTCCCAGAGTAAAATCTAGA
 AGGTCACAAGAGCCCTTGAGTTAAAAGAAGTCATAGTTTGGATTCCCACACAGCTCAACCTCAAGTCCCTG
 ATGGCTCATTAAAGGGGAAGTCTATGTTCTGCTCTAGTGATATAATAAAGGATGACACACTGAGTTTCATC
 TCAAAAATAAAGATGACACAGAGTAGTAACGTAGTACACGTATCTGCAGGAAAAGGGCTAGTTTCAACAG
 AGCTGACTTATTTCCGTAAAGTTTCACTACCAAGTAGCTGGACTTTCCAAGTTCTCATCATTAAATGCAA
 TAACTTCTACTCATATTAATAACTGGGCCTTATATGTCAACAAATATCCTTCTAAGCAATGCTTTC
 CATAAGGAACCTTGTGTCAGGATCTGATTTAAGTCCATAAACAAAAATTACATTCATTTTAGTTTAAACGTG
 TATCTTTTCTTTTCCAATACATCTTCATACATCTGAGAGTTTTCAGGAGTGTTTACTTGAACAGGTGC
 TAAGCACAGTTGCTCCTTTCTTGGCATTGTATGTGGATTAAGTGTGAGGCACCCATTCCACCTGCAGT
 GTGTCTTATAGGGGAACATATGTTTTCAGAGACAAAATGGTGACAGCTCCCCACACAAAAGAAAGTTCTGTT
 TCTTCCCTTACCTTGACCTGAATGCACTGTGATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 GTGTGTGTGACTCGTTCCAGGTATGGAATCTGTCTGGCATCCATGAAACAACCTTACAATAGCATCATGAA
 GTGTGACTTATGATATCCGCAAGGACCTGTATGCCAACAATGTCTTATCTGGAGGCACCACTATGTACCCCT
 GGTATTGCTGATCGTATGCGAAGGAAATCACTGCTCTGGCTCCTAGCACCATGAAGATTAAGGTAAAGA
 ACTTTTGTGAGTGGGAGATCCGAGGCAAGTCTTGGTATTCTAAGCAGAACTACGTTCCAAATTCCTTTTC
 CCTCATACTCAGTTTCTGTCTCCTACAACTTTACCTGTTAGCTTTTCTACCCTTTTTCTGATTTTCT
 TAGCACTTTTCCCAAGATAGGTAACCTTCCAAAATGCTTTTAAAGCAGTGAATAAAAATAAATCTTTGACAA
 AAAAAAGACACACACACAGCAACAAAATCTTTGAATACATTTTTAAAGCTCCCAACTTTTGGGCTAGGC
 TCCACTACACATTTAGCTTGTGGCAAATTACACTCTAGGTAAGTGGAGAAAATCCATTTTAAATAATAGA
 ATATATCTTTAATAATATAAATGATGAAATAGAGGTGAGTTCATATAACTTGATTGGCCACATTAATTTCCG
 TGGTATGACATATCCCACATTAAGCGAATTAATATCTAATGGTTTTTTTTCTGTGAATCCTCCCAATGTG
 TTATTTGCTCCCTTGCTTGGAACTTCAGAGTTCAGTGGAAAGTTTTTGTTTTCTTTCTGCAGATTAATGCT
 CCCCCTGAGCGTAAATACTCTGTCTGGATTGGGGGCTCCATCCTGGCCTCTCTGTCCACCTTCCAGCAAA
 TGTGGATTAGCAAGCAAGAGTACGATGAGGCAGGCCATCCATTGTCCACCGCAAATGCTTCTAAGATGC
 CTTCTCTCTCCATCTACCTTCCAGTCAGGATGACGGTATTATGCTTCTTGGAGTCTTCCAACCACCTTC
 CCTCATCTTTTCATCAATCATTGTACAGTTTGTTTACACACGTGCAATTTGTTTGTGCTTCTAATATTTAT
 TGCTTTATAAATAAACCAGACCAGGACTTGCACCTATAAAAAGCCTCTCGTTTGTTTTTGGGGTAGGCGT
 GGGGTGGGGCAGGTGTTTGTCTTGGACCCCTGAGCATTGTCAAAGTTCAGTACCACAAGGTTCATCCAGA
 TGAATTAATATGACAGTTAGCTGGGAGTTATAATGCTAACTTTTGATTTTCATATTTGAGACAGAATCAT
 GAATATATTTACATACCTGAAAAGCAGATTAAGTTTGTAGTTCCATATAAGTAAGAAATGAAATGAATAAG
 ATAGTTCTCTAGAAATTAGTTGCTGCAGATGACACTGAAAGATTATTTAACATATGTTCCAGTTGTTTTG
 TAACTTGCAGAAAATACACATATATTGATACATGAGAAAGTCAAAGATTATTTTAAATGAATTGGCTTAA
 CTTTTCAATTTCTTGAACCTTCAATTTTTCTTCTGGGGCTATGAAAGAAACATGAAGGTTAGCTGACA

```

GTTGGGCCAGCCACATCCCATTGCAAATACCCCTCTAAACATATCAAGACCATTGTGTGTGTGCAAAACAA
ATGTGAGGAAGCAGGAGCCAAACACTTCTGCCTGATCAGTGACTAACTTGCAGAGACAGAAGCCTTCAATC
TCTTCGTTTCTTTGAAATCTTGAGATCTTGGGTTGAGTGAAC TGAAGGCTGCGAGGTCCTGAGGGAGCAA
GGGGAGGCGAGAGCCACAGTGTGCTTTGCTCTGTGCAGAGCTCTCTGCAAAGTATGGTGGGAAGGCTG
CTAGGGGCAGCGTTGAAAAGAATTGAATGTGTTCCATCCCTCGAGGAGTTTACACACCTTACACATAATCCC
CCAGTGCCTGTGGCC TGGAGGCTTTAAGGAGATGTATGTGGGCTTGGGCTTAGAGAATGGTCAGGAATT
AGGGAGGTGAGAAGAGCAGAGAGGACATCTCAGCAGAAGGAAGTGTGGCAGAAGCCAGGATACAAGACAT
GGGGCAGGCTGGTAGGTGCTGATGAATTTTAGAAAATCCACTGGGAAAGGTAGATTTCAACTAGATTGCA
GAAGCCTTACAGATTTTTGTTTTCAAATTAATTGCCAGTGAAC TGTAGCATTACAGAAGTGTGTTGAAT
AGACTTAATTGAATTTTATTGATGAGGATTAAGACACAGAGATTAAGCAACTGGTGAATGTTATAAAC
TTTTTTGTGGAATGTGCTAGACAGGAAC T CAGATTTTTCTGACACCTACTCTGATGGTGTCTCTAAAATA
ATCTTTCTAACTTTATAGTTTATCAAGGTAACCCCATCTATCACATGCCTTTTGAGAATTTGGGTTCA
ATATTTGGAGTACTCTGGACTCATCAGACATCTTTAATAAAATTGTAATACATTGCCACTGTCAATCAAGG
TCCTATGTGTCTTTTTTGCC TATTCATACCAAAAATATCTTTTGATCCCTGACTCTGGGTCGGGCATAG
TATTAAGGGCAGGGGACACAAAGATGTATGAGAGCACATTTTCTGTGAATAAAAAGCTCAGAGTTTAGAG
TTCTGTATGTAGCATATTCAAATGGAAGGCC TCTATGCAATAAAGGCTAAATAATACATCAACTGGTG
GCATTTTATTTAGATAAGGTGCAAACATTTATGTACATATGCCCCCGCCCCACCACCCCATTTGTATCC
TATAGCACAGTTGAACTGGTTTAAAAGCCATGCATGGGAGGTATGATTTCACTAGTTTTTGTGTCTCTT
TCTTTTCTCTGTACAATTGAGTGCATAAAATATTATGAATTGTATCCTCTGAACACAGTATTAATGCTTT
AACTGTAGATGATTGGCTGGGGTATCACCTCTGGTCTTTCCATCTGTGATTAGAAATGGAGAGGACATT
TTTTTTCTATGTAAGTAGAAGCTTTAAGAATCAGCTTCTGATATTTATATCAGAAGAGGTAAGCACC
CAGATTTCTGTTGAATTTCTGAGGTCTTCTCATCTTTGCTTGATTATAGGGTATAAAGTATTAGAACAATT
GAATCTTAAAAATTTGTGCTTAAGGAAGGTACTAAGACAAAAATGTTTGCTTAAGGTAATCTTCATATGTA
TACAATAACTGAGACATGGATAGTGCC TACGTCTTTGGTTAAAGTGCAATAAACAAAGAACTATATAAAT
T 3'

```

Figura 2. Hebra codificante del gen de la alfa actina del músculo cardíaco. (En FASTA http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_000015.10?report=fasta&from=34788096&to=34795726&strand=true)

A partir de la información del mRNA (1..221, 897..1047, 2158..2482, 3158..3319, 3446..3637, 4432..4613, 5172..7631), se obtienen los exones (Rojo) e intrones (Negro), **Figura 3**. El inicio de los intrones cumple con la regla de tener un sitio común determinado por los nucleótidos GU, en tanto que el fin del intrón está determinado por los nucleótidos AG. También se resalta en amarillo el codón de inicio AUG y el codón de término UAA. **Homo sapiens chromosome 15, GRCh38 Primary Assembly: NCBI Reference Sequence: NC_000015.10.**

¿Cuántos intrones tiene este gen? ¿Cuáles son los nucleótidos de inicio y finalización para cada intrón?

¿Cuántos exones tiene este gen?

¿Cuál es la enzima que participa en la transcripción de la información del ADN a mRNA?

Describe el proceso de splicing o procedimiento de corte y empalme del pre-mARN

5'

1 **uggcugaucc ucucuccugc ccuuggcucc augaauggcc ucggcagucc uagcggggugc**
 61 **gaagggggacc aaauaaggca agguggcaga ccgggcccc caccucugcc cccggcugcu**
 121 **ccaacugacc cuguccauca gcguucuaia aagcggcccu ccuggagcca gccaccacaga**
 181 **gcccgcugcc gccggagccg agccgaccgg ccccgccgac** ggugagucag gcgccggccc
 241 uccgcguuca cuccucgccu gguccgcggg ccgcccggga cggcagcccc gcgcccggcc
 301 cuggccagcc cggcccgc au ucagccaagg ccccagcucc ugccgcucug cgacugccuu
 361 uuuuuuuuu uuuuuaaagc ccacacuuuu ugauuugguu cuaacuuguu uuuguccggg
 421 cguugguccu cgcaggaccu cgcaggggcu cuaagaaggg gaauuuugug gcucuccaag
 481 gggcuuuugg gucccuacuc ucgugcgcu ucccucuccu cuggggcaca ggcauggcga
 541 uauggacagc gcuggagauc gaguucccag uucgugaaaa ggaagaaagu uaaagggcug
 601 gggagacua aggggcuggg uuucuuuggu ccucuccuugc accuggcacc cuagcuggaa
 661 cuccuggcca gggagccugg guggauuccu cugcccuucu cuguccccag ucuccuccgc
 721 ggcuucuucc cuccuuuuu ugauucgagg ggaagggagg uggcaggagu guucccccgc
 781 caacccccug uccagucccc acaacccccu ucugcucugu ccuguccucu gggugcggag
 841 aaggccagcu gcacaggcag cuaagcgugg uccgcccucc ccuccucaac cugcag**aacc**
 901 **cccugaagcu gugccaagau** **gugugacgac** **gaggagacca** **ccgccuggu** **gugcgacaac**
 961 **ggcucugggc** **uggugaagc** **cggcuuugcg** **ggcgaugacg** **cgccccgcgc** **ugucuucccg**
 1021 **uccaucugug** **gccgcccgcg** **gcaccag**gua aacuucccgc cgagcccccc gucccacucg
 1081 ggaccccuuc aguccagcga ucuaggaaau ggcucucacc ugaccucuu guucgaugaa
 1141 cucuuuagc caauuaaga gaaggcugau ugacuucaaa uccaagccaa ggcaagcaau
 1201 acuccacaaa accccaacau acugaggaau guacaccuga guggcacgcc ucuaaaaggg
 1261 ucccacuccc uggugugaaa gccaccugcu ucucuccacu aauggccuuu uggacuuuuu
 1321 gucuuuagug ucuucucugc cuuauacacu ucauuuucu ccuuguccuc ucuuuucagu
 1381 ccuguuuaa acuucuaaca auaucaccuc uccaaccaa ccaggaccaa auccacauuc
 1441 cucucucaug uucacagcca guuuacaggg uccccaaag guguaauca ucuaucuccu
 1501 uccuggcugu ugcauuuuu gaagccagc gugacagagg cagcaagugc cauggugaua
 1561 gugacauacc accucguuug uaaaaagaca ugccaugcuc ucuggguuug ucacaugccu
 1621 ggccagacag gcugccaagc aggagagcgu aguccucaga gcuggugaau gacuccagaa
 1681 cagcucugga caggcugaau uucacuguug gagugaggau ggcauacag ccaucauuu
 1741 uguguucacu ugaauguca aaucuuuuu uuaggagaaa uacaugugu cauuuuuca
 1801 gucauucca aaugcaguca ucuaauucc aguugacaug ggugaugagc uuauaacuu
 1861 aaugaaggca uaugauuuu uuaaggugag gugaggcucu gcuuucucag uggaaugcu
 1921 ucauucucuc cugaguuaa uucucaaca uagaauuaa caucuuggg ggagugggga
 1981 gaagguagaa gauugauuu uaaauaauc uucuaaaug gguaaaauc guauugcuug
 2041 uuauucugg uauuuuuu uguuccuuga cuugggcagu uagauuaaa uggacaagac
 2101 acugauuaa uuccugacau ggugagagca ugauuuucuc auuuuuucu cucauag**gga**
 2161 **guuauuggug** **guauggguca** **gaaggacucc** **uacguaggug** **augaagccca** **gagcaagaga**
 2221 **ggcauccuga** **cccugaagua** **ucccaucgag** **cauggauca** **ucaccaacug** **ggacgacaug**
 2281 **gagaagacu** **ggcaccacac** **cuucuaaca** **gagcuccgug** **uggcuccga** **ggagcacc**
 2341 **accucgcuca** **cagaggcccc** **gcugaacccc** **aaggccaacc** **gggagaagau** **gacucagauc**
 2401 **auguuugaga** **ccuucuaugu** **cccugccaug** **uacguggcca** **uccaggcagu** **gcuaucuccg**
 2461 **uaugcuucug** **gccguaccac** **agguaugcug** **ggcucugggg** **acaguuacug** **augaaucaca**
 2521 uucccaaguc accgaccuug cugugaauc gaucucccag uugaaaaagg gauaaucuu
 2581 uuccucccau ucccuagcaa ggucugugcu aagagaaaga guuaacagua gugccugag
 2641 guuaguuuug gagcacaau auuguuggag cugauagcu guggagauag guccuuccu

2701 cauuuaaagc ucagcgcagu guagcagcuu ggagugcagc agucauuguu auguguuuuaa
 2761 accaucacau caccugggca agcaucccca aggagaauac auuccauaca gggucugagu
 2821 caaaagagag agaaacgugu aaguucaaua ggagcaaaga aaaacaccu ugggugcuua
 2881 cauaaugugc ucguggcuga caagaaagau ggucuuuga aaguguccuc gggauuuuu
 2941 ucuacuauaa uaguuaaaaa gaugagcugc aguugcuuc agauuuagua uuccugaugc
 3001 gcauuuuuau ucuuugugug uaaggaaucu aauuuuaucu ggaucaaugc ccauugcuag
 3061 caucucuuaug ccaagauugg aagcgggcuu ugccguggcu agagcagugg uguuguccuc
 3121 aggaauuuac cuuguucuug ucuacuucc cgggcaggca **uuguucugga cucuggggau**
 3181 **gguguaacuc acaaugucc caucuaugag ggcuaagcuu ugccccaugc caucaugcgu**
 3241 **cuggaucugg cuggucggga ccucacugac uaccucauga agauccucac ugagcggggc**
 3301 **uacuccuuug ucaccacug** ugagugugug ugucucauc gccacagugu gggucugcuu
 3361 uccuccucuc ucacugaau cgccuaccuc ccuaauauug acuucuugcu ucagagcaug
 3421 acugugauac ucuuuuuu uguagcugaa **cgugaaauug uccgugacau uaaagagaag**
 3481 **cugugcuauug ucgcccugga uuuugagaau gagaugcca cagcugccuc uuccuccucc**
 3541 **cuggagaaga gcuaugaacu gccugauggc caagucauca cuauuggcaa ugagcgcuu**
 3601 **cgucuguccug agacacucuu ccagccucc uucauug**gug aguuguaggg ucuggugcag
 3661 aggcacgauu ucccuggaa aucuuagggu cucccagagu aaaucuaa aggcucaaga
 3721 agcccuugag uuaaaagaag ucauaguuu gauuccaca cagcucaacc ucaaguccug
 3781 auggcucauu aaagggaag ucuanguucu gcucuaguga uauaauaaag gaugacacac
 3841 ugaguucauc ucaaaaauaa ggaugacaca gaguaguaac ugaauagcac guaucugcag
 3901 gaaaagggcu aguucacaag agcugacuua ucccguuag uuucacuacc aaguagcugg
 3961 acuuuccaag uuccucauca uuaaaugcaa uaacauuccu acucauaua auaacugggc
 4021 acuuauaugu caacaaauau ccuuccuaag caaugcuuc cauaaggaac uuugucagga
 4081 ucugauuuua guccaauaac aaaaauuaca uucauuuag uuaaaacgug uaucuuuucc
 4141 uuuccaaua caucucaua caucugagag uuucaggagg uguuuacuug aaacaggugc
 4201 uaagcacagu ugcuccuuu uuggcauugu auugggauu aacugugagg caccuauucc
 4261 acccugcagu gugucuuaa ggggaacaua uguuucagag acaauggug acagcucucc
 4321 cacacaaaga aguucuguu ucuuccucuc accuugaccu gaaugcacug ugaugugugu
 4381 gugugugugu gugugugugu guguguguga cucguucca **gguauuggau**
 4441 **cugcuggcau ccaugaaaca acuuacaaua gcaucauga gugugacau gauauccga**
 4501 **aggaccugua ugccaacau gucuuucug gaggaccac uauguaccu gguauugcug**
 4561 **aucguaugca gaaggaauc acugcucug cuccuagcac caugaagau aag**guaaaga
 4621 acuuuuguga gugggagau cgaggcaagu cuugguauu uaagcagaac uacguucca
 4681 auuccuuu ccauacuc aguuuucuug cuccuacaaa cuuaccug uagcuuuu
 4741 accacuuuu cugauuuu uagcacuuu ccaagauag guaacuucca aaugcuuu
 4801 aagcagugaa uaaaaauaa ucuuugaca aaaaagaca cacacacag caacaaauc
 4861 uuugaauaca uuuuuuagc uccaacuuu ugggcuaggc uccacuacac auuagcuug
 4921 uugccaaau acacucuagg uaaguggaga aauccauuu uauaauaga auauaucuu
 4981 auauauaaa augaugaa auagggugagu ucauuaacu ugauggcca cauuuuucg
 5041 ugguaugaca uauccacau uauagcga uauuauuaa ugguuuuuu cuugaauc
 5101 ucccaaugug uauuuugc ccuugcuug aacuucagag uucacugga guuuuuguu
 5161 ucuuucugca **gauuauugcu cccccugagc guaaauacuc ugucuggau gggggcucca**
 5221 **uccuggccuc ucuguccacc uuccagcaa uguggauuag caagcaagag uacgaugagg**
 5281 **caggcccauc cauuguccac cgcaaugcu ucuaa**gugc **cuucucucuc caucuaccuu**
 5341 **ccagucagga ugacgguuu augcuucuug gagucuucca aaccaccuuc ccuacuucu**
 5401 **caucaucau uguacaguuu guuuacacac gugcauuuug uuugucuuu uauuuuuu**

```

5461 ugcuuuauaa auaaaccaga ccaggacuug caaccuauaa aagccucucg uuuguuuuug
5521 gggugaggcgu gggguggggc agguguuugc uuugacaccc ugagcauugu caaaguucag
5581 uaccacaagg uucauccaga ugaauuaaia ugacaguuag cugggaguua uaaugcuaac
5641 uuugauuuuc auauuuugag acagaaucan gaauauuuu cauaccugaa aagcagauua
5701 agguuuaguu ccouauaagu aagaaaugaa auugaauaag auaguucucu agaauuaguu
5761 gcugcagaug acacugaaga uuauuuuuaac auauguucca guuguuuuug uaaccuugca
5821 gaaaauacac auauauugau aaugagaaag ucaaagauua uuuuaaauga auuggcuuaa
5881 cuuuucaauu cuuugaacuc uucauuuuuc uuccuggggg cuaugaaaga aacaugaagg
5941 uuagcugaca guugggcccag ccacauccea uugcaauuac ccucuaaaca uaucaagacc
6001 auugugugug ugcaaaacaa augugaggaa gcaggagcca aacacuucug ccugaucagu
6061 gacuaacuug cgagacagaa gccuucanuc ucuucguuuc uuugaaaucu ugagaucuug
6121 gguugaguga acugaaggcu gcgagguccu gagggagcaa ggggaggcga gagccacagu
6181 guuugcuuug cucugugcag agcucucugc aaaguauggu ggggaaggcug cuaggggagc
6241 cguugaaaag aauugaaugu guuccauccu cgaggaguuc acacaccuac acauaauccc
6301 ccagugcgug uggccuggag gcuuaaagga gauguaugug ggucuggguc uuagagaaug
6361 gucaggaauu agggagguga gaagagcaga gaggacaucu cagcagaagg aaguguggca
6421 gaagccagga uacaagacau ggggcaggcu gguaggugcu gaugaauuuu agaaaaucca
6481 cugggaaagg uagauuucaa cuagauugca gaagccuuc agauuuuugu uuucaaaaua
6541 auugccagug aacuguuagc auucacagaa guguuugaau agacuuaauu gaauuuuauu
6601 gaugaggauu caagacacag agauuaagca acuggugcaa uguuauaaac uuauuuugug
6661 gaaugugcua gacaggaacu cagauuuucu gacaccuacu cugauggugu cucuaaaaaua
6721 aucuuucuaa cuuuauaguu uaucaagggg aaccccuuuc uaucacaugc cuuuugagaa
6781 uuuggguuca auauuuggag uacucuggac ucaucagaca ucuuaaauaa auuguaauac
6841 auugccacug ucauuaagc uccuauugug gucuuuuugc cuauucauac caaaaauauc
6901 uuugauccc ugacucuggg ucgggcuuag uauuaagggc aggggacaca aagauguaug
6961 agagcacauu uucugugaau aaaaagcua gaguuuagag uucuguaugu agcauuuca
7021 aauggaaggc cuucuaugca auaaaggcua auauauacau caacuuggug gcuuuuuauu
7081 uagauaaggu gcaaacauua uuguacauau gccccccgccc cccaccaccc cauuguaucc
7141 uauagcacag uugaacuggu uuaaaagcca ugcaugggga gguaugauuu cacuaguuuu
7201 ugugucucu ucuuuuccuc uguacaauug agugcauaaa uauuaugaau uguauccucu
7261 gaacacagua uuauugcuuu aacuguaugau gauuggcugg gguaucaccu cugguucuuu
7321 ccaucuguga uuagaaaugg agaggacauu uuauuuucua uguaaaagua gaagcuuuua
7381 gaucagcuu cugauuuua uaucagaaga gguaaagcacc cagauucuuug uugaauucug
7441 aggucuucuc aucuuugcuu gauuauaggg uauaaaguau uagaacaauu gaaucuuaaa
7501 aaugugcuu aaggaaggua cuaagacaaa aauguuugcu uaagguaauc uucauugua
7561 uacaauaacu gagacaugga uagugccuac gucuuuuguu aaagugcaau aaacaaagaa
7621 cuauauaaau u 3'

```

Figura 3. Secuencia de nucleótidos del pre-mARN gen alfa actina de músculo cardíaco (Genbank:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000015.10?report=genbank&from=34788096&to=34795726&strand=true)

A partir del mRNA de la alfa actina del músculo cardíaco se obtiene el péptido codificante (CDS: 919..1047, 2158..2482, 3158..3319, 3446..3637, 4432..4613, 5172..5315). **Figura 4**

5´

augugugacgacgaggagaccaccgcccgugugcgacaacggcucugggcuggugaaggc
 cggcuuugcgggcgaugacgcgccccgcgucucuucccguccaucgugggcccgcggc
 accagggaguuauugguggguaugggucagaaggacuccuacguaggugaugaagcccagagc
 aagagaggcauccugaccugagaaguaucccaucgagcaugguaucauccaacugggacga
 cauggagaagaucuggcaccacaccuucuaaauagagcuccguguggcucccgaggagcacc
 ccaccucgucacagaggccccgcugaacccaaggccaaccgggagaagaugacucagauc
 auguuugagaccuuaaugucccugccauguacguggccauccaggcagugcuaucccugua
 ugcucuggccguaccacaggcauuguucuggacucuggggauuggguaacucacaauugcc
 ccaucaaugagggcuacgcuuugcccgaugccaucgucuggaucuggcuggcugggac
 cucacugacuaccucaugaagauccucacugagcguggcuacuccuuugucaccacugcuga
 acgugaaaauuguccgugacauuaaagagaagcugugcuaugucgcccuggauuuugagaau
 agauggccacagcugccucucuccucccugggagaagagcuaugaacugccugauggccaa
 gucaucacuauuggcaaugagcgcuuccgcuguccugagacacucucuccagcccucucua
 ugguauggaauucugcuggcauccaugaaacaacuuacaauagcaucaugaagugugaauug
 auauccgcaaggaccuguaugccaacaauugucuuauucuggaggcaccacuauguaccuggu
 auugcugaucguaugcagaaggaaauacugcucuggcuccuagcaccaugaagauuaagau
 uauugcucccccugagcguaaauacucugucuggauugggggcucauccuggccucucugu
 ccaccuuccagcaauuguggauuagcaagcaagaguacgaugaggcaggcccauccauugc
 caccgcaauucuucaaa 3´

Figura 4. Secuencia de nucleótidos del mRNA del gen de la alfa actina de músculo cardíaco. En color amarillo los codones de inicio y de terminación.

➤ **Obtención de la secuencia de aminoácidos de la proteína alfa actina de músculo cardíaco**

Utilizando la tabla del código genético apropiada, se obtiene la secuencia de aminoácidos de la proteína madura de la alfa actina. **Figura 5.**

N

MCDDEETTALVCDNGSGLVKAGFAGDDAPRAVFPSIVGRPRHQGVMMVGMGQKDSY
 VGDEAQSKRGILTLYPIEHGIITNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPTLLTEAPLN
 PKANREKMTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRITGIVLDSGDGVTHNVPIYEG
 YALPHAIMRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFVTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFENE
 MATAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPETLFQPSFIGMESAGIHETTYNSIMKCD
 IDIRKDLYANNVLSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIPPERKYSVWIGGSI
 LASLSTFOOMWISKOEYDEAGPSIVHRKCF **C**

Figura 5. Secuencia de aminoácidos de la proteína alfa actina de músculo cardíaco. N: terminación amino y C: terminación carboxilo de los aminoácidos.

¿Con cuál código genético se realiza la traducción de este gen? **Figura 6.**

Código estándar (1)

UUU F Phe	UCU S Ser	UAU Y Tyr	UGU C Cys
UUC F Phe	UCC S Ser	UAC Y Tyr	UGC C Cys
UUA L Leu	UCA S Ser	UAA * Ter	UGA * Ter
UUG L Leu i	UCG S Ser	UAG * Ter	UGG W Trp
CUU L Leu	CCU P Pro	CAU H His	CGU R Arg
CUC L Leu	CCC P Pro	CAC H His	CGC R Arg
CUA L Leu	CCA P Pro	CAA Q Gln	CGA R Arg
CUG L Leu i	CCG P Pro	CAG Q Gln	CGG R Arg
AUU I Ile	ACU T Thr	AAU N Asn	AGU S Ser
AUC I Ile	ACC T Thr	AAC N Asn	AGC S Ser
AUA I Ile	ACA T Thr	AAA K Lys	AGA R Arg
AUG M Met i	ACG T Thr	AAG K Lys	AGG R Arg
GUU V Val	GCU A Ala	GAU D Asp	GGU G Gly
GUC V Val	GCC A Ala	GAC D Asp	GGC G Gly
GUA V Val	GCA A Ala	GAA E Glu	GGA G Gly
GUG V Val	GCG A Ala	GAG E Glu	GGG G Gly

Código mitocondrial de vertebrados (2)

UUU F Phe	UCU S Ser	UAU Y Tyr	UGU C Cys
UUC F Phe	UCC S Ser	UAC Y Tyr	UGC C Cys
UUA L Leu	UCA S Ser	UAA * Ter	UGA W Trp
UUG L Leu	UCG S Ser	UAG * Ter	UGG W Trp
CUU L Leu	CCU P Pro	CAU H His	CGU R Arg
CUC L Leu	CCC P Pro	CAC H His	CGC R Arg
CUA L Leu	CCA P Pro	CAA Q Gln	CGA R Arg
CUG L Leu	CCG P Pro	CAG Q Gln	CGG R Arg
AUU I Ile i	ACU T Thr	AAU N Asn	AGU S Ser
AUC I Ile i	ACC T Thr	AAC N Asn	AGC S Ser
AUA M Met i	ACA T Thr	AAA K Lys	AGA * Ter
AUG M Met i	ACG T Thr	AAG K Lys	AGG * Ter
GUU V Val	GCU A Ala	GAU D Asp	GGU G Gly
GUC V Val	GCC A Ala	GAC D Asp	GGC G Gly
GUA V Val	GCA A Ala	GAA E Glu	GGA G Gly
GUG V Val i	GCG A Ala	GAG E Glu	GGG G Gly

Código mitocondrial de levaduras (3)

UUU F Phe	UCU S Ser	UAU Y Tyr	UGU C Cys
UUC F Phe	UCC S Ser	UAC Y Tyr	UGC C Cys
UUA L Leu	UCA S Ser	UAA * Ter	UGA W Trp
UUG L Leu	UCG S Ser	UAG * Ter	UGG W Trp
CUU T Thr	CCU P Pro	CAU H His	CGU R Arg
CUC T Thr	CCC P Pro	CAC H His	CGC R Arg
CUA T Thr	CCA P Pro	CAA Q Gln	CGA R Arg
CUG T Thr	CCG P Pro	CAG Q Gln	CGG R Arg
AUU I Ile	ACU T Thr	AAU N Asn	AGU S Ser
AUC I Ile	ACC T Thr	AAC N Asn	AGC S Ser
AUA M Met i	ACA T Thr	AAA K Lys	AGA R Arg
AUG M MeU i	ACG T Thr	AAG K Lys	AGG R Arg
GUU V Val	GCU A Ala	GAU D Asp	GGU G Gly
GUC V Val	GCC A Ala	GAC D Asp	GGC G Gly
GUA V Val	GCA A Ala	GAA E Glu	GGA G Gly
GUG V Val	GCG A Ala	GAG E Glu	GGG G Gly

Código mitocondrial de invertebrados (5)

UUU F Phe	UCU S Ser	UAU Y Tyr	UGU C Cys
UUC F Phe	UCC S Ser	UAC Y Tyr	UGC C Cys
UUA L Leu	UCA S Ser	UAA * Ter	UGA W Trp
UUG L Leu i	UCG S Ser	UAG * Ter	UGG W Trp
CUU L Leu	CCU P Pro	CAU H His	CGU R Arg
CUC L Leu	CCC P Pro	CAC H His	CGC R Arg
CUA L Leu	CCA P Pro	CAA Q Gln	CGA R Arg
CUG L Leu	CCG P Pro	CAG Q Gln	CGG R Arg
AUU I Ile i	ACU T Thr	AAU N Asn	AGU S Ser
AUC I Ile i	ACC T Thr	AAC N Asn	AGC S Ser
AUA M Met i	ACA T Thr	AAA K Lys	AGA S Ser
AUG M MeU i	ACG T Thr	AAG K Lys	AGG S Ser
GUU V Val	GCU A Ala	GAU D Asp	GGU G Gly
GUC V Val	GCC A Ala	GAC D Asp	GGC G Gly
GUA V Val	GCA A Ala	GAA E Glu	GGA G Gly
GUG V Val i	GCG A Ala	GAG E Glu	GGG G Gly

Código de hongos, protozoos y mitocondrial de coelenterados y micoplasma/espiroplasma (4)

UUU F Phe	UCU S Ser	UAU Y Tyr	UGU C Cys
UUC F Phe	UCC S Ser	UAC Y Tyr	UGC C Cys
UUA L Leu i	UCA S Ser	UAA * Ter	UGA W Urp
UUG L Leu i	UCG S Ser	UAG * Ter	UGG W Trp
CUU L Leu	CCU P Pro	CAU H His	CGU R Arg
CUC L Leu	CCC P Pro	CAC H His	CGC R Arg
CUA L Leu	CCA P Pro	CAA Q Gln	CGA R Arg
CUG L Leu i	CCG P Pro	CAG Q Gln	CGG R Arg
AUU I Ile i	ACU T Thr	AAU N Asn	AGU S Ser
AUC I Ile i	ACC T Thr	AAC N Asn	AGC S Ser
AUA I Ile i	ACA T Thr	AAA K Lys	AGA R Arg
AUG M Met i	ACG T Thr	AAG K Lys	AGG R Arg
GUU V Val	GCU A Ala	GAU D Asp	GGU G Gly
GUC V Val	GCC A Ala	GAC D Asp	GGC G Gly
GUA V Val	GCA A Ala	GAA E Glu	GGA G Gly
GUG V Val i	GCG A Ala	GAG E Glu	GGG G Gly

Código bacterias arqueas y plastidio de plantas (11)

UUU F Phe	UCU S Ser	UAU Y Tyr	UGU C Cys
UUC F Phe	UCC S Ser	UAC Y Tyr	UGC C Cys
UUA L Leu	UCA S Ser	UAA * Ter	UGA * Ter
UUG L Leu i	UCG S Ser	UAG * Ter	UGG W Trp
CUU L Leu	CCU P Pro	CAU H His	CGU R Arg
CUC L Leu	CCC P Pro	CAC H His	CGC R Arg
CUA L Leu	CCA P Pro	CAA Q Gln	CGA R Arg
CUG L Leu i	CCG P Pro	CAG Q Gln	CGG R Arg
AUU I Ile i	ACU T Thr	AAU N Asn	AGU S Ser
AUC I Ile i	ACC T Thr	AAC N Asn	AGC S Ser
AUA I Ile i	ACA T Thr	AAA K Lys	AGA R Arg
AUG M Met i	ACG T Thr	AAG K Lys	AGG R Arg
GUU V Val	GCU A Ala	GAU D Asp	GGU G Gly
GUC V Val	GCC A Ala	GAC D Asp	GGC G Gly
GUA V Val	GCA A Ala	GAA E Glu	GGA G Gly
GUG V Val i	GCG A Ala	GAG E Glu	GGG G Gly

Figura 6. Código genético para la traducción nuclear, mitocondrial de vertebrados e invertebrados, bacterias y plastidios.

¿Cuáles son las diferencias entre un código genético utilizado para la traducción de un gen en un organismo eucariota en comparación al utilizado por la mitocondria, cloroplasto, y una bacteria?

En www.uniprot.org se encuentra la información de las funciones, localización subcelular, patologías, modificaciones postraduccionales entre otra, de la proteína alfa actina de músculo cardíaco. Por ejemplo, en las modificaciones postraduccionales se encuentra la eliminación del Péptido Señal de la alfa actina del músculo cardíaco (ACTC1). **Tabla 1 y figura 7.**

Tabla 1. Modificaciones postraduccionales

Características	Posición	Longitud	Descripción	Representación Gráfica
Pro péptido	1-2	2	Eliminado en la forma madura (Péptido señal)	
Cadena	3-377	375	Actina, 1 alfa de músculo cardíaco (Proteína)	

MCDDEETAL VCDNGSGLVK AGFAGDDAPR AVFPSIVGRP RHQGMVGMG 50
 QKDSYVGDEA QSKRGILTLK YPIEHGIITN WDDMEKIWHH TFYNELRVAP 100
 EEHPTLLTEA PLNPKANREK MTQIMFETFN VPAMYVAIQ A VLSLYASGRT 150
 TGIVLDSGDG VTHNVPIYEG YALPHAIMRL DLAGRDLDY LMKILTERGY 200
 SFVTTAEREI VRDIKEKLCY VALDFENEMA TAASSSSLEK SYELPDGQVI 250
 TIGNERFRCP ETLFQPSFIG MESAGIHETT YNSIMKCDID IRKDLYANNV 300
 LSGGTTMYPG IADRMQKEIT ALAPSTMKIK IIAPPERKYS VWIGGSILAS 350
 LSTFOOMWIS KOEYDEAGPS IVHRKCF 377

Figura 7. Péptido señal (amarillo) en la secuencia de aminoácidos de la alfa actina de músculo cardíaco

¿Cuáles son las funciones de la proteína actina alfa de músculo cardíaco?

¿Cuál es la función del péptido señal?

Además de la eliminación del péptido señal, ¿qué otras modificaciones postraduccionales se describen en la actina alfa de músculo cardíaco?

Analice la información de la síntesis de la proteína β -globina de *Homo sapiens* y la catalasa de *E. coli*. ¿Cuáles son las diferencias en la síntesis de estas proteínas?

➤ **Bibliografía**

ACTC1 actin, alpha, cardiac muscle 1
[*Homo sapiens* (human)] Recuperado de
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Actin, alpha cardiac muscle 1. Recuperado
de <http://www.uniprot.org/uniprot/P68032>

Cooper G., Hausman R. (2014). La célula.
(6ª Ed). España. Marbán libros, S.L.

Jiménez G. L., Valdez S. L. (2010). Biología
celular del genoma. México. Las prensas de
ciencias.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P.,
Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., ...
Darnell, J. (2005). *Biología Celular y
Molecular* (5ª ed). Colombia: Editorial
Médica Panamericana.

Notas

Agradecimientos

A las más de diez generaciones de estudiantes de la asignatura de Biología Celular, a los profesores y asistentes de laboratorio de la Universidad de Pamplona, por sus valiosos aportes en la preparación del material, toma de micrografías y corrección del texto.

El texto de Biología celular. Observaciones y experimentos, es un apoyo didáctico que sirve de guía y cuaderno de trabajo en el que los estudiantes de las carreras de ciencias básicas, agronómicas y de la salud hacen la descripción de los resultados, dibujos de las observaciones, refuerzan conceptos y realizan consultas bibliográficas con el fin de profundizar y proponer metodologías en las diferentes temáticas de biología celular. Está diseñado con el fin de acompañar al estudiante en el proceso de identificación de los tipos celulares procariotas/eucariotas y estructuras celulares utilizando la microscopía y aplicando técnicas de tinción. Cuenta con excelentes micrografías y esquemas que permite una mejor comprensión de la estructura celular real, y de esta manera entender mejor la relación entre la teoría y la práctica.