



Departamento de Ecología, Genética y Evolución

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires
Ciudad Universitaria de Núñez, 4º Piso
C1428EHA Buenos Aires, ARGENTINA

CITOGENÉTICA

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS

Departamento de Ecología, Genética y Evolución
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

Profesora: Dra. Marta D. Mudry

Jefe de Trabajos Prácticos: Dra. María José Bressa

Año: 2014

“Los cromosomas son un tema de estudio integrativo: estructural, funcional, molecular y evolutivo, y constituyen la disciplina Citogenética o Biología Cromosómica”.

A.J. Solari, 2001

Programa

1- Generalidades e Historia. La Genética en sus orígenes. Antecedentes y cronología. La Genética como ciencia. Citogenética clásica y molecular. Desarrollo de la Citogenética Rioplatense. La Citogenética en la Argentina.

2- Cromatina y cromosomas. Estructura y composición del nucleosoma. Interacción ADN-Histonas. El papel de las proteínas no histónicas. ARN y estructura cromatínica. Eucromatina y Heterocromatina. Organización del genoma. Cromosoma Eucariótico: sus características estructurales. Constricción primaria (centrómero) y secundarias (ej. organizador nucleolar), tipos de satélites. Telómero. Regiones cromosómicas y puntos calientes del genoma. Distintos tipos cromosómicos.

3. Ciclo celular. Regulación. Puntos de control, ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas. Mitosis. Características de las fases. Huso acromático. Dinámica de los microtúbulos y proteínas motoras durante la mitosis. Pasajeros cromosómicos. Meiosis. Características de las fases. Apareamiento, sinapsis y recombinación. Complejo sinaptonémico. Meiosis aquiasmática y quiasmática.

4- Cariotipo. Morfología cromosómica. Nomenclatura y categorías cromosómicas según posición del centrómero. Complemento cromosómico. Longitud del complemento, índices centromérico y de relación de brazos. Cariotipo, Cariograma e Idiograma. Tinciones diferenciales. Nomenclatura y patrones de Bandas. Bandas G, Q, R, T, C, NOR y Bandas de restricción. Citogenética molecular (GISH, FISH). Identificación cromosómica. Sintenias. Microdissección cromosómica. Homeologías cromosómicas y conservación genómica. Ejemplos: Animales y Vegetales.

5. Alteraciones Estructurales. Origen, estabilidad estructural de los cromosomas. Mecanismos de inducción de los reordenamientos estructurales. Cambios cromatídicos y cromosómicos. Deleciones, duplicaciones, inversiones, translocaciones, reordenamientos Robertsonianos (fusión y fisión céntricas). Comportamiento mitótico y meiótico.

6. Alteraciones Numéricas. Aneuploidía. Tipos de aneuploides. Condiciones que causan aneuploidía. Monosómicos: origen, comportamiento de los univalentes en meiosis. Trisómicos y tetrasómicos: tipos, origen, configuraciones meióticas, comportamiento meiótico y fertilidad, herencia. Líneas de sustitución y adición, su aplicación en el mejoramiento vegetal. Poliploidía. Criterios clasificación, métodos de estudio (C, Q, enzimas de restricción, FISH, GISH y CGH).

7. Cromosomas y función genética. Cromosomas politénicos. Endocitosis y endopoliploidía. Politenia. Cromosomas "lampbrush" o plumulados, holocinéticos, sexuales en plantas y en animales. Sistemas simples y sistemas múltiples. Evolución de los sistemas de cromosomas sexuales. Cromosomas B. Origen: distintas hipótesis. Mecanismos de acumulación y efectos.

8. Evolución del tamaño del genoma. Mecanismos de cambio. Enigma del valor "C". Variación en contenido de heterocromatina. Contenido de ADN y nivel de ploidía.

9. Evolución del cariotipo. Variación en contenido y posición de heterocromatina, consecuencias evolutivas. Relación entre cambios génicos y cromosómicos en la especiación. Modelos de especiación cromosómica. Polimorfismos y politipismos. Algunos ejemplos en diferentes organismos. Significado evolutivo de los cromosomas B.

10. Citogenética y Mejora. Diagnóstico citogenético. Aplicaciones del FISH. Localización de

secuencias de ADN mediante PRINs y C- PRINs y FISH multicolor. Aplicaciones del GISH. Variantes de la técnica y sus aplicaciones. Microdissección cromosómica: su utilización e hibridación *in situ* de los productos de microdissección. Complemento cromosómico de animales domésticos y de producción. Alteraciones cromosómicas más frecuentes en animales de producción, mejora y mantenimiento.

11. Citogenética Clínica Humana. El rol de la citogenética en medicina. Síndromes y condiciones asociados a variaciones numéricas y estructurales en los cromosomas autosómicos y sexuales. Incidencia de las variaciones cromosómicas en poblaciones humanas. Síndromes de Inestabilidad Cromosómica. Cromosomas y Cáncer. Relevancia de la cuantificación de la enfermedad residual (Q-PCR) post-tratamiento.

12. Citogenética en el Monitoreo genotóxico. Alcances y Metodologías. Xenobióticos químicos, físicos y biológicos. Bioindicadores de efecto. Clastogénesis. Aneugénesis. Teratogénesis. Ensayos de corto plazo (STT) en la evaluación genotóxica. Batería de monitoreo mínima empleando herramientas citogenéticas. Monitoreo de exposición accidental, laboral o por estilos de vida. Citogenética y modelos animales. Influencia de xenobióticos ambientales.

Bibliografía General

- American Type Culture Collection Catalogue of strains II. III Edition 1981.
- An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. 1995. -ISCN Karger Medical and Scientific Publishers, Basel.
- An introduction to animal cytogenetics. 1993. Macgregor. H.C., Chapman & Hall 238pp
- Andraszek, K & Smalec, E. 2011. Structure and functions of lampbrush chromosomes. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, 92(4): 337-344.
- Animal Cell Biotechnology Vol 1. Ed. R.E. Spier y J.B. Griffiths Academic Press 1985.
- Animal Cytology and Evolution. 1973. White, M.J.D. Cambridge University Press. Londres.
- Atlas of Mammalian Chromosomes. 2004. O'Brien, Messenger & Nash. Willey Liss., 714pp.
- B chromosomes in the eukaryote genome. 2004. "J.P. Camacho ed. in *Cytogenetic and Genome research* Vol 106 (2-4): 147-412
- Bengston, B. 1980. Rates of karyotype evolution in placental mammals. *Hereditas* 92: 37-47
- Bennett M. D. 1984. The genome, the natural karyotype and biosystematics. In: *Plant biosystematics* (Grant, W.F.,ed.). Academic Press, New York, pp 41-66.
- Bickham. JW; Baker, RJ. 1979. Canalization model of chromosomal evolution. *Models and Methodologies en Evolutionary Theory. Bull Carnegie Mus Nat. Hist* 13: 70-84
- Cell culture and somatic variation. Morgan Harris. Ed. Holt, Rinehart and Winston 1964.
- Chromosomal Evolution in Higher Plants. 1971. Ledyard Stebbins, G. Addison-Wesley Publishing Co. 216pp
- Chromosome Banding. 1990. A.T. Sumner. Unwin Hyman Ed. 434pp
- Chromosome Biology. 1998. Appels R., R. Morris, B.S. Gill & C.E. May. Kluweer Academic Publishers. 401 pp
- Chromosome Painting. 2001. Sharma & Sharma eds. Kluwer Academic Publishers. 180 pp
- Chromosomes. Organization and function. 2003. A.T. Sumner. Blackwell Publishing. 287 pp.
- Chromosomes. The complex code. 1996. Clark, M.S. & W.J. Wall, Chapman & Hall 343pp
- Citogenética. 1996. Lacadena, J.R., Editorial Complutense. 931pp
- Conceitos e Aplicacoes na Citogenética. 2004. Marcelo Guerra. FISH. Ed. SBG. Brasil. 176pp
- Concepts of Genetics. 2006. William S Klug, Michael R Cummings, Charlotte Spencer, 8va. Ed. Pearson Prentice Hall.
- Coyne, JA. 1984. Correlation between heterozygosity and rate of chromosome evolution in animals. *Amer. Nat* 123: 725-729
- Culture of Animal Cells. A manual of basic technique. Ian R Freshney. 2000. 4th Ed. Willey-Liss. NY. 577 pp.
- Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques. 2000. R Ian Freshney. 577pp.
- Cytogenetics in Plant Breeding. 1992. Sybenga, J. Springer Verlag.
- Cytogenetics: an introduction. 1972. Garber, E.D. Mc Graw-Hill Book Company. 259pp.
- Cytology. 1965. Darlington, C.D. Churchill, Londres. 760 pp.
- Discussions in Cytogenetics. 1962. Burnham, C.R.. Burgess Publishing Company, Minnesota.
- Evans, HJ, 1962. Chromosome aberrations induced by ionizing radiation. *Int. Rev. Cytol.* 13: 221
- Evolutionary Dynamics of Mammalian Karyotypes. 2012. Editors Roscoe Stanyon, Florence & Alexander Graphodatsky, Novosibirsk. *Cytogenetic and Genome Research*, Vol. 137, No. 2-4.
- Fisiología de la Sangre. Murro H 1989. Editorial CTM. Buenos Aires
- Fredga, K. 1977 Chromosomal changes in vertebrate evolution *Proc Linnean. Soc Lond ser B* 199: 377-397
- Genética Humana. Fundamentos y aplicaciones en medicina. 3º edición. 2004 Solari, A.J., Editorial Médica Panamericana 556 pp.
- Genética Toxicológica. 2006. Mudry, M.D.; Carballo, M.A. Ed. De Los 4 Vientos, Buenos Aires, Argentina. 669pp.
- Genetics in medicine -Nussbaum RL 2004 Thompson & Thompson, 6th. rev. ed., Nussbaum RL, M.C. Innes, H. Willard, Saunders, Philadelphia.
- Glossary of Genetics. Classical and Molecular. 1991. Rieger, R., A. Michaelis & M.M. Green. Springer-Verlag 553pp.

- Heterochromatin. Molecular and structural aspects. 1987. RS. Verma (ed.) Cambridge Univ. Press. 301pp
- Human Chromosomes. Principles and Techniques Ram S. Verma & Arvind Babu. (1995).. 2nd Ed. Mc Graw-Hill, Inc. NY. 419pp.
- Hybrid Zones and the evolutionary process. 1993. R.G. Harrison . Oxford Univ. Press. 364pp
- Internacional System for Cytogenetic nomenclature of Domestic Animals –ISCNDA. 1989, Cytogenetics and Cell Genetics, 53: 65-79, 1990.
- Introducción a la Genética Veterinaria.-Nicholas, F. W. 1996 Editorial Acribia S.A.
- ISCN for Human Cytogenetics Nomenclature. 2005. Cytogenetics and Genome Research. 131pp
- King, M. 1987 Chromosomal rearrangements, speciation and the theoretical approach. Heredity 59: 1-6
- Laboratorio. Métodos de Análisis Clínicos y su Interpretación. Querci A.A., 1975. Editorial El Ateneo, Buenos Aires.
- Lande, R. 1979. Effective deme sizes during long-term evolution estimated from rates of chromosomal rearrangements. Evoution 33: 234-251
- Meiosis. 1987. Moens, P.B. Academic Press 391pp
- Meiosis. 1990 John, B.. Cambridge Univ. Press. 396 pp
- Meiotic Configurations 1975. Sybenga, J. Springer Verlag. 251pp.
- Métodos de cultivo de los tejidos y las células. R.C.Parker. Ed. Atika S.A. Madrid 1967.
- Methods in Enzimology. Vol LVIII Cell culture. Ed. W.B. Jakoby and I.H. Pastaii Academic Press N.Y. 1979.
- Methods of genome analysis in plants. 1996. Jahuar, P.P (ed). CRC Press. 386pp.
- Plant Cytogenetics. 2005.. M.J. Puertas & Tomas Naranjo eds in Cytogenetic and Genome Research. Vol. 109 (1–3): 408pp
- Practical in situ hybridization. Trude Schwarczacher & Pat Heslop-Harrison (2000) BIOS Scientific Publishers 250 pages
- Readings in Mammalian Cell Culture. Ed. Robert Pollack. Cold Spring Harbor Laboratory 1973.
- Reproducción e Inseminación artificial en animales 2002 - Capítulo 20: Genética de la incapacidad reproductiva Rosnina Y, Jainudeen MR, Hafez ESE En: Hafez ESE, Hafez B, 7ma. Edición, Mc Graw Hill Interamericana, México.
- Smeets, D.F.C.M. 2004. Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. Clinical Biochemistry 37: 439– 446.
- Sex chromosomes and sex determination in vertebrates. 1994. Solari, A.J. CRC Press. 308pp.
- Stebbins, G.L. 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants. Addison Wesley Publ. Reading. Massachusetts. 216 pags.
- Técnicas en citogenética. José Egozcue Ed. Espaxs Barcelona 1971.
- Techniques in Animal Genetics 2000 P. Popescu, H.Hayes & Dutrillaux. Springer, 229pp.
- Textbook of Cytogenetics 1972. Brown,W.V. The C.V. Mosby Company, Saint Louis. 346 pp.
- The Chromosome. 1993. Herslop-Harrison, J.S. & R.B. Flavell,. Bios Scient. Publ. Limited. 281pp
- The evolution of the genome 2005.T R. Gregory.Elsevier Academic Press, 730 pp
- White, MJD. 1973. Animal cytology and evolution Cambridge University Press
- Wilson, AC; Busch, GL; Base, SM; King, MC 1975. Social structuring of mammalian population and rate of vchromosomal evolution Proc Nat Acad Sci USA 72: 5061-5065
- Wright, S. 1941. On the probability of fixation of reciprocal translocations Am. Nat. 75: 513-522

REQUISITOS PARA CURSAR LA MATERIA

Para cursar la materia: Trabajos Prácticos de Genética I aprobados.

Para rendir el final o promocionar: Final de Genética I aprobado.

Régimen de la materia:

La materia constará de clases teóricas no obligatorias y clases prácticas obligatorias.

Se tomarán 2 parciales teórico-prácticos. Se permitirá rendir un parcial recuperatorio por cada examen luego del 2º parcial teórico-práctico.

Requisitos para aprobar la materia:

Para promocionar:

- Tener un 80% de asistencia a los Trabajos Prácticos.
- Aprobar todos los parciales con un mínimo de 6 puntos sin recuperar ninguno de ellos.
- Promediar 7 puntos entre los dos parciales.
- Presentar y exponer oralmente trabajos (seminarios) sobre temáticas de interés para la materia, que serán propuestos por los docentes oportunamente.

Para aprobar los Trabajos Prácticos:

- Tener un 80% de asistencia a los Trabajos Prácticos.
- Aprobar los dos parciales con un mínimo de 6 puntos (se pueden recuperar los dos parciales).

La nota final de promoción estará constituida en un 40% por la nota del primer parcial, en un 50% por la nota del segundo parcial y en un 10% por la nota de los seminarios.

Horarios y pautas de cursada:

- Clases Teóricas: martes y jueves de 12 a 14 horas
- Clases de Trabajos Prácticos: martes y jueves de 14 a 18 horas
- Alumnos: carpeta con informes por cada Trabajo Práctico
- Seminarios: presentación oral por grupo e Informe grupal de todos los seminarios

NDICE

| | PÁGINA |
|--|---------------|
| <p>Trabajo práctico nº 1 y 2</p> <ul style="list-style-type: none"> - Microscopía I: manejo del equipamiento y observación de preparaciones cromosómicas - Microscopía II: visitas al microscopio con Epifluorescencia, Confocal y Láser | |
| <p>Trabajo práctico nº 3</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ciclo Celular: confección de preparaciones cromosómicas de ápices radiculares de <i>Allium cepa</i> y reconocimiento de las fases del ciclo celular | |
| <p>Trabajo práctico nº 4</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mitosis y Cariotipo: cálculo de índices mitótico, de fase y de asimetría y confección del cariotipo de <i>Allium cepa</i> | |
| <p>Trabajo práctico nº 5</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mitosis y Cariotipo: confección de preparaciones cromosómicas a partir de <i>pellets</i> de linfocitos sangre periférica humana y del cariotipo y cálculo de índices mitótico y de fase | |
| <p>Trabajo práctico nº 6</p> <ul style="list-style-type: none"> - Meiosis en vegetales con cromosomas monocéntricos: estudio de las fases de la meiosis, bivalentes, quiasmas, segregación | |
| <p>Trabajo práctico nº 7</p> <ul style="list-style-type: none"> - Meiosis en insectos con cromosomas monocéntricos: estudio de las fases de la meiosis, bivalentes, quiasmas, segregación | |
| <p>Trabajo práctico nº 8</p> <ul style="list-style-type: none"> - Meiosis en insectos con cromosomas holocinéticos: confección de preparaciones cromosómicas a partir de gónadas y estudio de las fases de la meiosis, bivalentes, quiasmas, segregación meiosis | |
| <p>Trabajo práctico nº 9</p> <ul style="list-style-type: none"> - Confección de preparaciones cromosómicas y análisis de cromosomas politénicos de larvas de insectos (Diptera) | |
| <p>Trabajo práctico nº 10 y 11</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cultivo I: extracción de sangre y entrada de cultivo - Cultivo II: sacrificio de cultivo y confección de preparaciones cromosómicas para técnicas de bandas cromosómicas | |
| <p>Trabajo práctico nº 12 y 13</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bandas Cromosómicas (G, C) | |
| <p>Trabajo práctico nº 14 y 15</p> <ul style="list-style-type: none"> - Alteraciones Numéricas y Estructurales. Detección y caracterización de las anomalías cromosómicas | |

| | |
|---|--|
| Trabajo práctico nº 16, 17 y 18 - Evolución del cariotipo en vegetales y animales | |
| Seminarios Híbridos y poliploides - Citogenética Humana – Mejoramiento Animal – Cáncer - Genética de la Conservación | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

PARTE A: MICROSCOPIA OPTICA

Objetivos

Comprender los fundamentos básicos de la microscopía y sus aplicaciones en los estudios citogenéticos.

Aprender a reconocer y utilizar las distintas partes de un microscopio óptico, enfocar y revisar correctamente un preparado citológico.

Incorporar la noción básica y elemental que el primer objetivo de todo aquél que se dedique a la Citogenética.

Principios ópticos del microscopio compuesto

El microscopio óptico compuesto, más allá de la lupa simple, permite una mayor amplificación de objetos cercanos. Su invención, que pudo haber ocurrido hacia 1590, se acredita generalmente al fabricante de anteojos holandés Zacharías Janssen de Middleburg. Galileo tiene el segundo lugar, habiendo anunciado su invención en 1610. Una versión simplificada, que es más cercana a los primeros sistemas, se puede ver en la Figura 1.

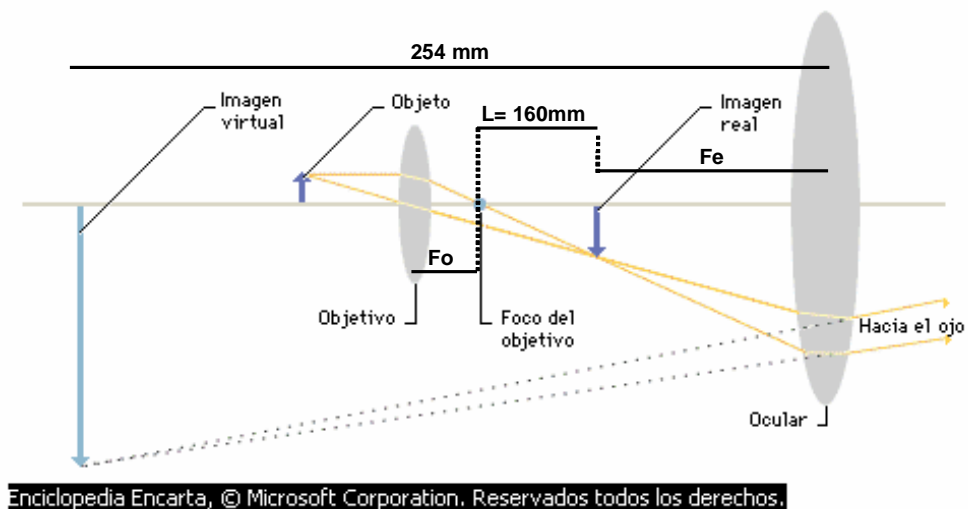


Figura 1. Esquema de observación de un espermatozoide al microscopio óptico compuesto

El sistema de lentes próximo al objeto, que aquí es una lente simple, recibe el nombre de **objetivo**. Forma una imagen real del objeto, invertida y generalmente aumentada. Los rayos que divergen de cada punto de la imagen emergerán de la lente del ojo (la cual en este caso es el ocular mismo) paralelos uno a otro. El ocular aumenta esta imagen intermedia aún más. El poder de aumento del sistema completo es el producto del aumento lineal del objetivo (M_{To}) y el aumento angular del ocular (M_{Ae}):

$$PA = M_{To} M_{Ae}$$

Los fabricantes generalmente diseñan sus microscopios de tal modo que la distancia del segundo foco del objetivo al primer foco del ocular se estandariza en 160 mm. Esta distancia se conoce como longitud del tubo (L). Por lo tanto, con la imagen final al infinito y el punto cercano estándar tomado como 254 mm, el poder de aumento de un microscopio compuesto se define como:

$$PA = (- 160 / F_O) (254/F_E)$$

Donde,

F_O = foco del objetivo

F_E = foco del ocular

Y dado que P.A. < 0, la imagen está invertida.

Las propiedades del aumento producido y de la fidelidad de las imágenes transmitidas por un microscopio, dependen del sistema de lentes que el mismo posea. La característica del objetivo de mayor aumento (100x) es la de aumentar al máximo el tamaño de la imagen, a la vez que el campo de visión y la iluminación son mínimas. Simultáneamente la distancia entre el preparado y el objetivo, o sea la distancia de trabajo, también es mínima (Figura 2).

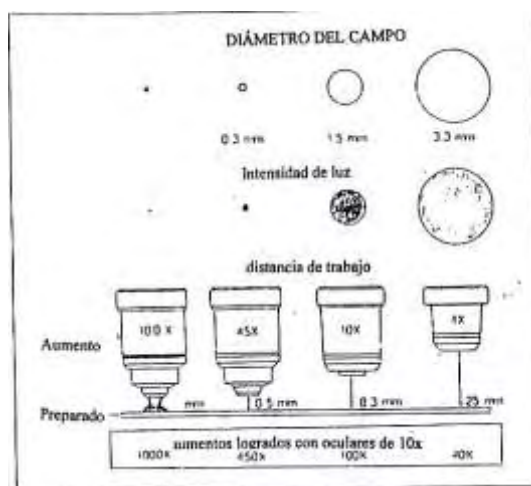


Figura 2. Propiedades de los aumentos y distancias hacia los preparados en un microscopio óptico

Una propiedad muy importante del microscopio es su poder de resolución. Es decir, la capacidad de diferenciar y separar dos puntos ubicados lo más cercanamente posible sin perder su individualidad. El poder de resolución o poder resolvente depende de la apertura numérica (que es una propiedad de cada lente) y de la longitud de onda de la luz utilizada. A mayor apertura numérica el poder resolvente de resolución es más grande, o sea que la distancia entre dos puntos que resuelve es más pequeña y de éstas, la distancia más pequeña que resuelve se denomina **límite de resolución**. El límite de resolución del microscopio óptico es de 0,2 μ m mientras que la del ojo humano es de 0,1 mm (100 μ m). La profundidad y el diámetro del campo, como así también la distancia focal son inversamente proporcionales a la apertura numérica. Por ejemplo, el objetivo de 10x tiene una pequeña apertura numérica y por ello se lo utiliza como objetivo panorámico.

Para conseguir el poder de máxima resolución hay que utilizar el objetivo de inmersión (100x) en el cual se aumenta el valor de la apertura numérica. Esto se logra aumentando el índice de refracción

del medio interpuesto entre el objeto y la lente frontal del objetivo ($2 \times n \times \text{seno de } \alpha$, donde n es el índice de refracción del medio y α es el ángulo de apertura del objetivo). Para ello, se utilizan medios como el aceite de inmersión, que poseen un índice de refracción superior al aire y similar al del vidrio del portaobjetos y al de las lentes, permitiendo que los rayos lumínicos no se desvíen y se obtenga mayor información del objeto en la imagen resultante (Figura 3).

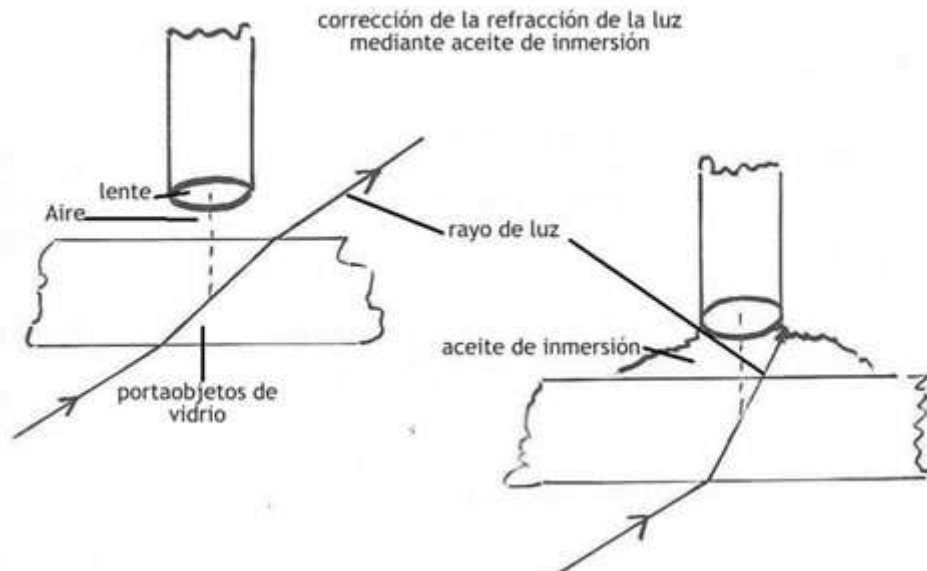


Figura 3. Desvío de los rayos en la interfase aire – vidrio y aceite – vidrio en un microscopio óptico.

Imagen tomada de http://www.unad.edu.co/cursos_biologia/Microscopio.htm

Elementos del microscopio óptico

Sistema óptico

- **OCULAR:** Lente convergente situada en el extremo superior del tubo a la cual se aplica la luz. Aumenta las imágenes reales producidas por los objetivos, a diferencia de la función de la lupa, donde la imagen aumentada es virtual. El aumento individual de cada ocular es generalmente de 10x o 15x, aunque este valor hay que multiplicarlo por un coeficiente de aumento del objetivo.
- **OBJETIVOS:** Primera lente convergente que refleja el foco de iluminación proveniente de la preparación. Es de distancia focal corta y forma imagen real, aumentada e invertida. El aumento de los objetivos oscila entre 4x (panorámica), 10x 20x, 40x, 63x y 100x (inmersión).
- **CONDENSADOR:** Lente convergente que concentra sobre el preparado la iluminación proveniente de la fuente luminosa.
- **DIAFRAGMA:** Disco obturador de diámetro variable que determina el área de iluminación incidente en la muestra. Regula la cantidad de luz que entra en el condensador. Los microscopios modernos poseen un diafragma de campo luminoso, que se interpone entre la luz y el resto del sistema óptico. Su función es permitir un tipo de iluminación, denominada iluminación de Koehler, que aumenta el contraste y la nitidez, ya que maximiza la utilización de los rayos de luz. Hace que todos los rayos pasen por el objeto, sin que haya ninguna dispersión. Regulando el diafragma se optimiza el contraste.
- **FOCO:** Dirige los rayos luminosos hacia el condensador.

Sistema mecánico

- **SOPORTE O ESTATIVO:** Mantiene la parte óptica. Tiene dos partes: el pie o base y el brazo. Contribuye a amortiguar las vibraciones
- **PLATINA:** Superficie plana donde se deposita el preparado con el material a observar. Tiene incorporado un carro portaobjetos con una pinza portaobjetos fija. Este carro puede desplazarse en las dos dimensiones de la platina accionada por sus comandos. El carro dispone de un sistema de coordenadas que permite localizar zonas concretas de la muestra. En la Figura 4 se observa la escala micrométrica del carro de la platina.



Figura 4. Escala micrométrica del carro de la platina. Imagen tomada de <http://ortegaprecisiones.blogspot.com.ar/2013/02/microscopio-optico.html>

- **CABEZAL:** Soporte de los oculares, generalmente permite giro a la derecha y a la izquierda.
- **TAMBOR O REVÓLVER:** Disco rotatorio que sostiene los objetivos y permite intercambiarlos fácilmente.
- **MECANISMOS MACROMÉTRICOS Y MICROMÉTRICOS:** Comandos ubicados en el estativo que desplazan la platina verticalmente y ajustan las preparaciones al sistema óptico para enfocarlas.
- **FUENTE DE LUZ:** Puede ser una lámpara o un espejo.

Aumento

La forma de calcular el aumento en el cual se está trabajando consiste en multiplicar el aumento correspondiente al ocular por el aumento correspondiente al objetivo que se está utilizando para visualizar el preparado.

Ejemplo:

Ocular: 10x } Aumento: 400 x
Objetivo: 40x }

Ubicación del portaobjetos en la platina

Se toma como referencia la etiqueta del portaobjetos, pudiendo quedar ésta hacia la izquierda o hacia la derecha. En Argentina, se usa por convención hacia la derecha.

INSTRUCCIONES PARA LA UTILIZACIÓN DEL MICROSCOPIO ÓPTICO

Conectar el cable del microscopio a la red eléctrica y encender el interruptor del microscopio cuidando que el control de intensidad de la iluminación se encuentre en mínimo para no quemar la fuente de iluminación por sobrecarga.

- 1.- Colocar el objetivo de menor aumento
- 2.- Colocar la preparación en la platina y fijarla con la pinza de la platina a tal fin.
- 3.- Desplazar el preparado con los tornillos de movimiento de la platina para que el preparado quede en el lugar desde donde se desea observar y luego bajo un control visual lateral, tratar de acercarse a una distancia de aproximadamente 8 mm la preparación al objetivo de 10x.
- 4.- Mirar por el ocular y buscar el enfoque correcto utilizando los controles macrométrico y micrométrico. Recorrer el preparado hasta observar la célula o el objeto deseado.
- 5.- Cambiar a un objetivo de mayor aumento sin cambiar la posición de la platina. Ajustar el enfoque utilizando el control micrométrico.
- 6.- Colocar una gota de aceite de inmersión Para observar con el objetivo de mayor aumento (100x) sobre la preparación y enfocar poco a poco con el micrométrico.
- 7.- Ajustar la distancia entre ambos oculares a la distancia interpupilar de cada observador. En los microscopios binoculares, el cansancio de la vista es mínimo si se utilizan simultáneamente ambos oculares.
- 8.- Retirar la preparación al finalizar la sesión de observación, y limpiar el objetivo, el ocular, la preparación y la platina con un papel de celulosa humedecida con una mezcla de etanol-éter.
- 9.- Bajar al máximo la intensidad de la luz.
- 10.- Apagar el interruptor del microscopio, desenchufar el cable de la red eléctrica y cubrirlo con su funda o guardarlo en su correspondiente caja.

PARTE B: MICROSCOPIA Y APLICACIONES

Objetivos

Comprender los fundamentos básicos de la microscopía y sus aplicaciones en los estudios citogenéticos.

Lograr que el alumno se familiarice con la terminología y conceptos básicos del manejo fotográfico.

Estos conocimientos teóricos serán integrados en la parte práctica donde se buscará la obtención de fotomicrografías de diversos preparados de células mitóticas.

Conjuntamente con estos procedimientos se capacitará al alumno en el manejo del fotomicroscopio.

Microscopio de contraste de fases

Hace posible visualizar fácilmente pequeñas células incluso sin teñirlas. Las células tienen un índice de refracción distinto del medio que las rodea, y esta diferencia puede utilizarse para crear una imagen de mayor contraste que el que puede obtenerse con el microscopio óptico normal.

El microscopio de contraste de fases hace posible observar más fácilmente células en estado vivo, ayudándonos así a evitar la creación de condiciones artificiales tales como las introducidas por la tinción (aparición de artefactos que interfieren con la correcta visión y alteración de las estructuras

naturales de las células). En muchos laboratorios de bacteriología el microscopio de contraste de fases ha reemplazado prácticamente al microscopio óptico como instrumento de investigación. Este tipo de observación se basa en el hecho de que las diferentes estructuras celulares introducen pequeñas variaciones de fase en las radiaciones, retrasándolas ligeramente, siendo estos retrasos diferentes según el tipo de estructura. Con este microscopio, el bajo contraste existente se refuerza por medio de un sistema óptico especial que transforma las diferencias de fase, que no son captadas por el ojo humano, en diferencias de amplitud (intensidad luminosa), que sí son detectables (Figura 1).

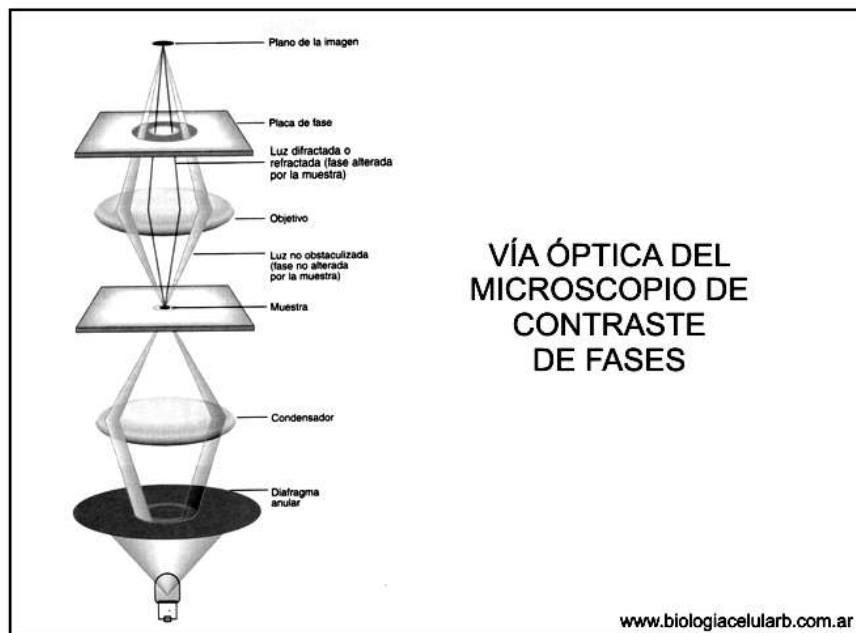


Figura 1. Microscopio de contraste de fases. Imagen tomada de <http://laboratoriodehistologianelly.blogspot.com.ar/>

Microscopio de campo oscuro

Se llama también ultramicroscopio y es un microscopio óptico cuyo sistema condensador ha sido modificado para dirigir la luz a la preparación desde los lados, de tal modo que sólo la luz difractada por la preparación, pasa al ocular y se hace visible. A causa de esta disposición, la muestra en el preparado aparece iluminada sobre un fondo oscuro.

La microscopía de campo oscuro hace posible la observación en estado vivo de elementos que de otra manera estarían por debajo de los límites de resolución del microscopio óptico, aunque resulten visibles pocos detalles estructurales. La microscopía de campo oscuro ha sido ampliamente usada en el estudio de pequeñas células móviles tales como *Treponema pallidum*, la espiroqueta causante de la sífilis, que no es visible con microscopía óptica.

Microscopio equipado con equipo de epifluorescencia

Algunos colorantes denominados fluorocromos tienen la propiedad de ser excitados (pasar a un nivel superior de energía) cuando absorben luz ultravioleta (luz de longitud de onda corta). A medida que las moléculas excitadas regresan a su estado normal liberan el exceso de energía en forma de luz visible de mayor longitud de onda que la radiación excitante. Esta propiedad se denomina

fluorescencia. Se han desarrollado métodos microscópicos modernos que aprovechan la mayor detección que posibilita este sistema.

Este tipo de microscopios lleva una fuente luminosa que emite radiaciones ultravioleta (Figura 2), en el límite del espectro visible, que atraviesan el material de la preparación de la misma forma en que lo hace un microscopio óptico. Las lentes suelen ser de cuarzo ya que el vidrio absorbe la radiación ultravioleta. A continuación del objetivo lleva unos filtros que retienen la radiación ultravioleta, que es peligrosa para el ojo humano, dejando pasar solamente la radiación visible, que no es peligrosa.

Hoy día se utiliza frecuentemente un microscopio de fluorescencia en el cual la luz es emitida desde arriba del preparado (epifluorescencia). Un filtro deja pasar luz de la longitud de onda deseada para excitar al fluorocromo y un filtro barrera en el objetivo, protege al ojo del observador de la radiación fluorescente. Los objetos fluorescentes aparecen brillantemente iluminados, según el color del colorante usado, contra un fondo oscuro.

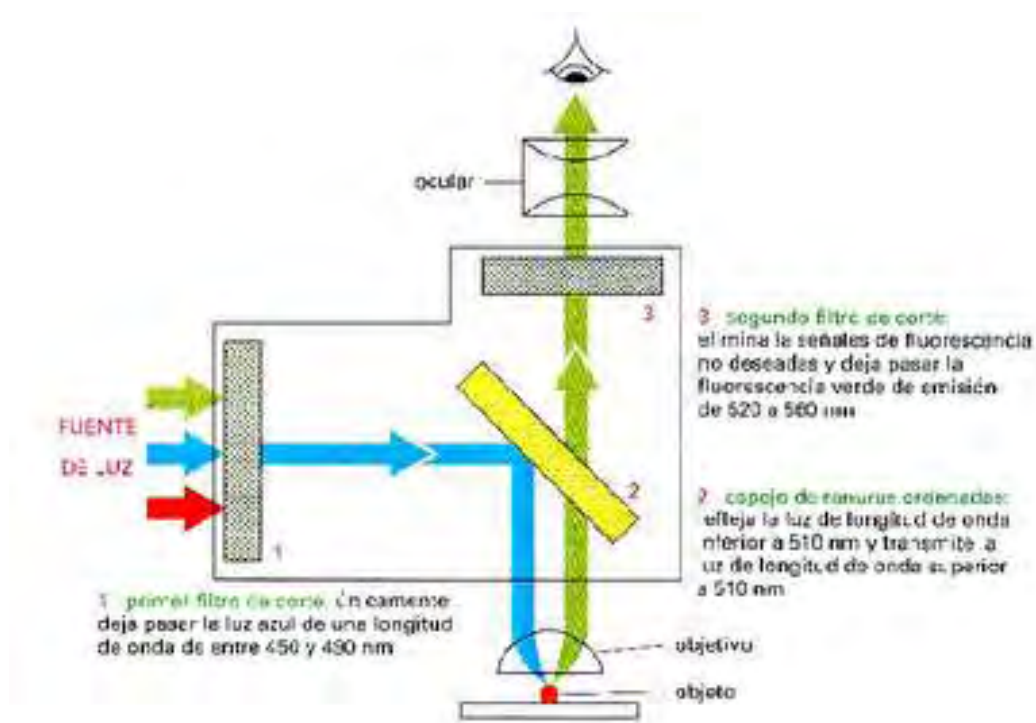


Figura 2. Microscopio de fluorescencia. Imagen tomada de <http://laboratoriodehistologia-nelly.blogspot.com.ar/>

Microscopio invertido

En el laboratorio de virología se utiliza con notable frecuencia el microscopio invertido, que no es más que una variante del microscopio convencional que, tal y como indica su nombre, tiene invertida la posición normal de los objetivos que están en el revólver, por debajo de la platina, mientras que la luz de la fuente de iluminación, a través del condensador y del diafragma, llega desde arriba de la platina (Figura 3). Así se facilita cierto tipo de trabajos, como el control del estado de las monocapas celulares cuando se trabaja con botellas o tubos de cultivo de células, cultivos en suspensión.



Figura 3. Microscopio invertido. Imagen tomada de <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/minvertido.htm>

Microscopio confocal

El microscopio confocal es un microscopio óptico que incorpora dos diafragmas: un diafragma de iluminación, generalmente de tamaño invariable y localizado tras la fuente luminosa, y un diafragma de detección, de tamaño variable situado delante del fotodetector. La utilidad de este diafragma de detección es eliminar la luz proveniente de planos superiores e inferiores al plano focal, aumentando con ello la claridad y resolución de la imagen. Esta capacidad de obtener SECCIONES ÓPTICAS es la característica principal y exclusiva del microscopio confocal (Figura 4).

La obtención de secciones ópticas más o menos gruesas está determinada por una combinación entre el diámetro del diafragma de detección, la apertura numérica del objetivo y la longitud de onda de la luz utilizada.

El haz de láser es dirigido a un punto concreto del plano focal. La luz reflejada por la muestra o la fluorescencia emitida es dirigida y captada por un fotodetector, una vez que atraviesa el diafragma. La imagen focal se obtiene tras rastrear la muestra (*scanning*) con el láser. Las imágenes obtenidas son siempre imágenes digitales: Los fotodetectores (PMTs) transforman la señal lumínica en una señal eléctrica que mediante el sistema informático acoplado, se traduce en un píxel. Cada píxel/voxel, proporciona información referente a la localización tridimensional del punto excitado, así como de la intensidad lumínica de dicho punto. La obtención de secciones ópticas más o menos gruesas está determinada por una combinación entre el diámetro del diafragma de detección, la apertura numérica del objetivo y la longitud de onda de la luz utilizada.

El haz de láser es dirigido a un punto concreto del plano focal. La luz reflejada por la muestra o la fluorescencia emitida es dirigida y captada por un fotodetector, una vez que atraviesa el diafragma. La imagen focal se obtiene tras rastrear la muestra (*scanning*) con el láser. Las imágenes obtenidas son siempre imágenes digitales: Los fotodetectores (PMTs) transforman la señal lumínica en una señal eléctrica que mediante el sistema informático acoplado, se traduce en un píxel. Cada píxel, proporciona información referente a la localización tridimensional del punto excitado, así como de la intensidad lumínica de dicho punto.

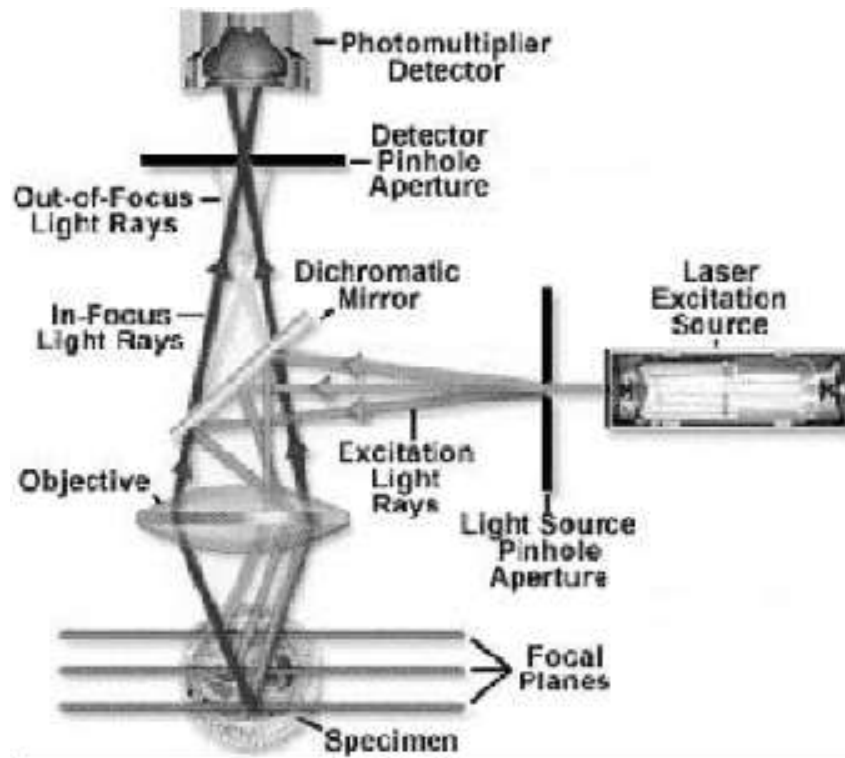


Figura 4. Esquema de Microscopio confocal. Imagen tomada de <http://histologiaenlaboratorio.blogspot.com.ar/2010/11/microscopia.html>

Las principales aplicaciones de la microscopía confocal son, entre otras:

- expresión y localización de moléculas en dos o tres dimensiones, permitiendo reconstrucciones tridimensionales, tanto en cultivos celulares, como tejidos histológicos y "whole mounts";
- estudios de co-localización de proteínas u otro tipo de moléculas;
- transporte intracelular, endocitosis;
- medidas de concentraciones de iones intracelulares;
- desarrollo y expresión génica;
- hibridación *in situ* con sondas fluorescentes.

Microscopios electrónicos

Hace unos 50 años los biólogos comenzaron a plantearse la necesidad de sustituir las imágenes obtenidas mediante luz visible por la suministrada por los electrones. De este modo, utilizando el poder de penetración de estos últimos y el contraste suministrado por metales pesados, el límite de resolución podía ser 100.000 veces más pequeño que el del ojo humano (Figura 5).

En un microscopio electrónico (ME) que tiene un voltaje de aceleración de los electrones de 100.000 voltios, la longitud de onda de un electrón es de 0,004nm, de manera que en teoría, la resolución de un microscopio de este tipo sería de aproximadamente 0,002nm. Sin embargo debido a que las aberraciones de las lentes electrónicas son más difíciles de corregir que las de las de vidrio, la resolución de los microscopios electrónicos actuales es, en el mejor de los casos de 0,1nm (1Å). Es más, los problemas relacionados con la preparación de las muestras, el contraste y la radiación, limitan claramente la resolución obtenida a partir de muestras biológicas a unos 2nm (20Å) y sin

embargo esta resolución práctica es unas 100 a 300 veces más grande que la obtenida mediante un microscopio óptico (0,2 μ m).



Figura 5. Dimensiones de las células y de sus componentes dibujados sobre una escala logarítmica, indicando el valor del poder de resolución del ojo humano y de los microscopios ópticos y electrónicos. Imagen tomada de <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/moptica.html>

Microscopio electrónico de transmisión

El microscopio electrónico de transmisión (MET) (Figuras 6, 7b) es, en sus principios generales, similar a un microscopio óptico. La fuente de iluminación es un filamento o cátodo situado en la parte superior de una columna cilíndrica de unos 2 metros de altura. Del cátodo emergen los electrones. Debido a que los electrones pueden ser dispersados por las moléculas de aire, se debe trabajar en vacío. A continuación, los electrones son acelerados y migran hacia un ánodo que pueden atravesar mediante un pequeño orificio del mismo. De ese modo forman un haz que es dirigido a la parte inferior de la columna. Unas bobinas electromagnéticas situadas a intervalos a lo largo de la columna enfocan el haz de electrones, de la misma manera que las lentes enfocan el haz lumínico en el microscopio óptico. La muestra es colocada dentro del tubo y en el camino del haz de electrones. Algunos de los electrones que pasan a través de la muestra son dispersados en función de la densidad local del material. El resto de los electrones son enfocados formando una imagen, de manera idéntica en que se forma la imagen en un microscopio óptico, y son visualizados mediante una placa fotográfica o una pantalla fluorescente. Debido a que los electrones dispersados no llegan a ser visualizados, las regiones densas aparecen más oscuras con respecto a las áreas menos densas.

Para obtener una buena imagen, la muestra debe estar correctamente preparada. Debido a que las muestras son atravesadas por un haz de electrones de alta intensidad, no es posible la observación de muestras de material vivo o húmedo. Normalmente los tejidos son protegidos mediante la fijación. Como los electrones tienen un poder de penetración limitado, generalmente los tejidos fijados son cortados mediante un ultramicrotomo en secciones extremadamente delgadas (de 50 a 100nm de grosor, esto es aproximadamente 1/200 del grosor de una célula) antes de poder ser observadas. Para lograr la deshidratación de la muestra se la infiltra con una resina monomérica que al polimerizar forma un sólido bloque de plástico. El bloque es luego cortado mediante un ultramicrotomo con una

cuchilla de vidrio o de diamante. Las secciones ultrafinas, libres de agua y de otros solventes volátiles son recogidas sobre unas pequeñas rejillas metálicas circulares. Luego las muestras son teñidas mediante sales de metales pesados y pueden finalmente observarse al MET. Este modo de preparación de las muestras permite observarlas en dos dimensiones. Efectivamente, las secciones ultrafinas son cortes bidimensionales de un tejido y no revelan la disposición tridimensional de los componentes celulares. La tercera dimensión puede ser reconstruida a partir del estudio de centenares de cortes seriados, algo que implica un proceso largo y meticuloso.

También es posible utilizar el MET para la observación de la disposición de las estructuras internas de las células. En ese caso, las muestras no se deben incluir ni cortar, sino que se deben congelar a -196°C . Una vez congeladas se procede a la fragmentación que consiste en colocar una fracción de la muestra en una rejilla. Luego se procede a su teñido. Normalmente las células tienden a separar las dos capas lipídicas de las diferentes membranas celulares. A este procedimiento se lo conoce como criofractura (Figura 8).



Figura 6. Microscopio electrónico de transmisión. Imagen tomada de <http://histologiaenlaboratorio.blogspot.com.ar/2010/11/microscopia-electrica.html>

Microscopio electrónico de barrido

Para la obtención de imágenes tridimensionales existen diferentes sistemas. El sistema más comúnmente utilizado consiste en examinar las muestras en un microscopio electrónico de barrido (MEB) (Figuras 7c, 9). Mientras que en el MET las imágenes se forman a partir de los electrones que han atravesado la muestra, en el MEB se utilizan los electrones dispersados o emergentes de la superficie de la muestra. La muestra a examinar en el MEB, es fijada, desecada y recubierta por una fina capa de un material pesado. Seguidamente la muestra es barrida por un haz focalizado de electrones. Por consiguiente, esta técnica se utiliza para el estudio de superficies celulares o tejidos,

no para organelas.

Como hemos visto, existen varios métodos que nos permiten explorar una estructura y comprenderla en su totalidad. La fotomicrografía es la fase final de un protocolo experimental, previamente diseñado en función de una finalidad determinada. Es decir la fotomicrografía es una muestra parcial del objeto estudiado.

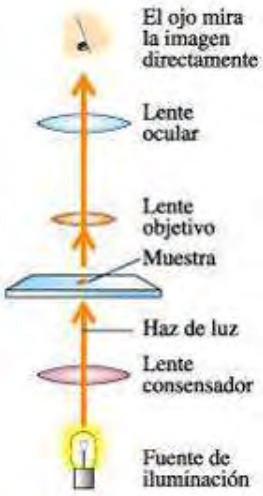

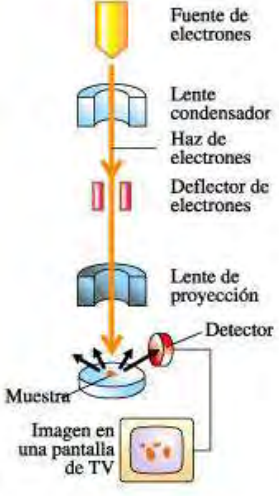

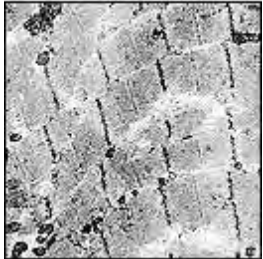
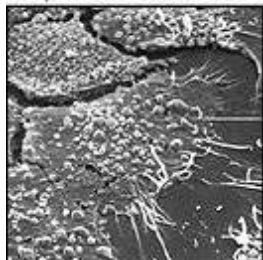
| MO (a) | MET (b) | MEB (c) |
|---|---|--|
| <p>El microscopio óptico tiene un límite resolución de cerca de 200 nm (0,2 μm). Este límite se debe a la longitud de onda de la luz (0,4-0,7μm). Las células observadas bajo el microscopio óptico pueden estar vivas o fijadas y teñidas.</p> | <p>El microscopio electrónico de transmisión tiene un límite de resolución de cerca de 2nm. Esto es debido a limitaciones de la lente usada para enfocar los electrones hacia la muestra. Un MET mira réplicas de células muertas, después de haber sido fijadas y teñidas con iones de metales pesados. Los electrones son dispersados cuando pasan a través de una fina sección del espécimen, y luego detectados y proyectados hacia una imagen sobre una pantalla fluorescente.</p> | <p>El microscopio electrónico de barrido también tiene un límite de 2nm. Al igual que el MET, el MEB permite mirar células muertas, después de haber sido fijadas y teñidas con iones de metales pesados. Con esta técnica los electrones son reflejados sobre la superficie del espécimen.</p> |
|  <p>El ojo mira la imagen directamente.</p> <p>Lente ocular</p> <p>Lente objetivo</p> <p>Muestra</p> <p>Haz de luz</p> <p>Lente condensador</p> <p>Fuente de iluminación</p> |  <p>Fuente de electrones</p> <p>Lente condensador</p> <p>Haz de electrones</p> <p>Muestra</p> <p>Lente objetivo</p> <p>Lente proyectora</p> <p>Imagen sobre una pantalla fluorescente</p> |  <p>Fuente de electrones</p> <p>Lente condensador</p> <p>Haz de electrones</p> <p>Deflector de electrones</p> <p>Lente de proyección</p> <p>Detector</p> <p>Muestra</p> <p>Imagen en una pantalla de TV</p> |
| <p>Microfotografía de hueso</p>  | <p>MET en tejido muscular</p>  | <p>MEB de células hepáticas estresadas</p>  |

Figura 7. Características principales del (a) Microscopio óptico, (b) Microscopio electrónico de transmisión y (c) Microscopio electrónico de barrido. Imágenes tomadas de <http://www.cobach-elr.com/academias/quimicas/biologia/biologia/curtis/libro/c4e.htm>

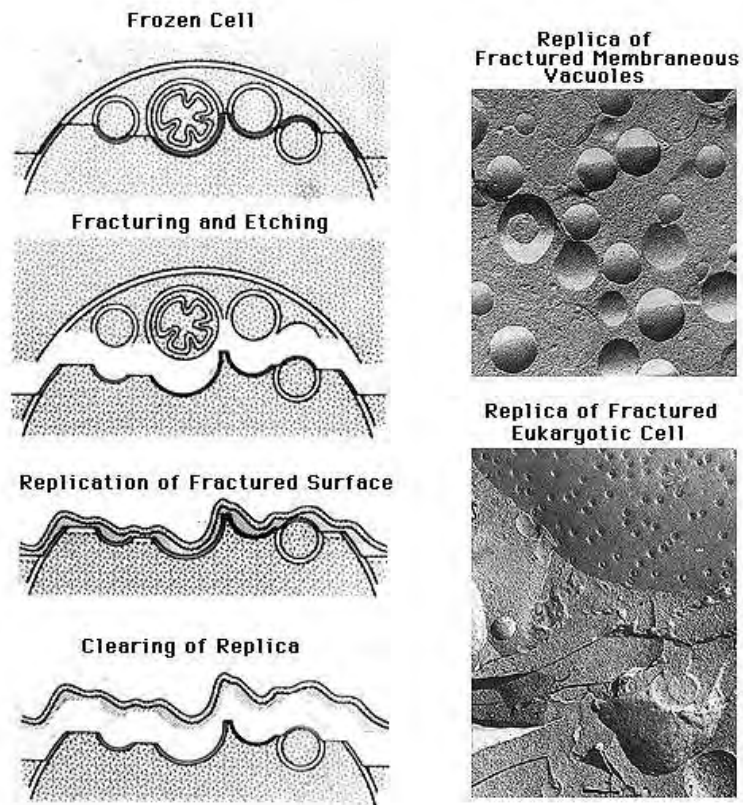


Figura 8: Técnica de criofractura (freeze fracture)



Figura 9. Microscopio electrónico de barrido. Imagen tomada de <http://histologiaenlaboratorio.blogspot.com.ar/2010/11/microscopia-electrica.html>

Microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM)

La dosimetría biológica emplea diversos equipos para analizar imágenes y para cuantificar modificaciones en variables que superan las descripciones meramente cualitativas. A fines de la década de los 80 se desarrolló el Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental (ESEM) con grandes ventajas para el análisis de materiales biológicos de distintos niveles de complejidad, desde el celular hasta el organísmico. Este equipo permite variar el ambiente de observación dentro de un amplio rango de temperatura, presión y composición de gases, sin la restricción del alto vacío en la cámara de la muestra de los microscopios de barrido convencionales (SEM). Las muestras pueden ser observadas en su estado natural sin requerimientos de preparación previa, lo que permite la observación directa de posibles alteraciones en organismos bioindicadores de contaminación ambiental.

El ESEM se ha utilizado en estudios de contaminación, remediación, localización de metales en tejidos biológicos, biopelículas y biocorrosión, caracterización de microorganismos, análisis de biopartículas y biomateriales. Por ser un aparato que posibilita la visualización del material aplicando técnicas no destructivas, se utiliza para caracterizar el efecto de variables ambientales sobre procesos y se ha incorporado como herramienta taxonómica de uso habitual cuando se accede al mismo. Las muestras pueden ser extraídas directamente del organismo en estudio o del ambiente, estar conservadas en fijador, en agua o en diferentes solventes, y aún los materiales no conductivos pueden observarse directamente sin secado por punto crítico ni metalizado. Las mejores condiciones de observación se consiguen variando la presión y la temperatura en la cámara de observación, de manera tal que resulte en condiciones de humedad relativa alta (70% a 100%).

Cada muestra se debe estudiar en particular, a fin de determinar las condiciones de observación adecuadas para obtener las mejores imágenes, eliminando posibles artefactos debidos a la técnica.

El ESEM ha permitido estudiar los más diversos materiales biológicos en distintos niveles de complejidad, desde el celular (animal/vegetal, somático/germinal) hasta el organísmico (hongos e insectos), incluyendo comunidades de organismos (biopelículas). La resolución permite observar hasta con 20000 aumentos y hacer una medición muy precisa de los objetos observados (en el orden de centésimas de μm); las imágenes obtenidas se registran en forma digital (Figura 10, tomado de Palermo *et al.*, 2006). El ESEM se ha utilizado en estudios de contaminación, remediación, localización de metales en tejidos biológicos, biopelículas y biocorrosión, caracterización de microorganismos, análisis de biopartículas y biomateriales. Por ser un aparato que posibilita la visualización del material aplicando técnicas no destructivas, se utiliza para caracterizar el efecto de variables ambientales sobre procesos y se ha incorporado como herramienta taxonómica de uso habitual cuando se accede al mismo.

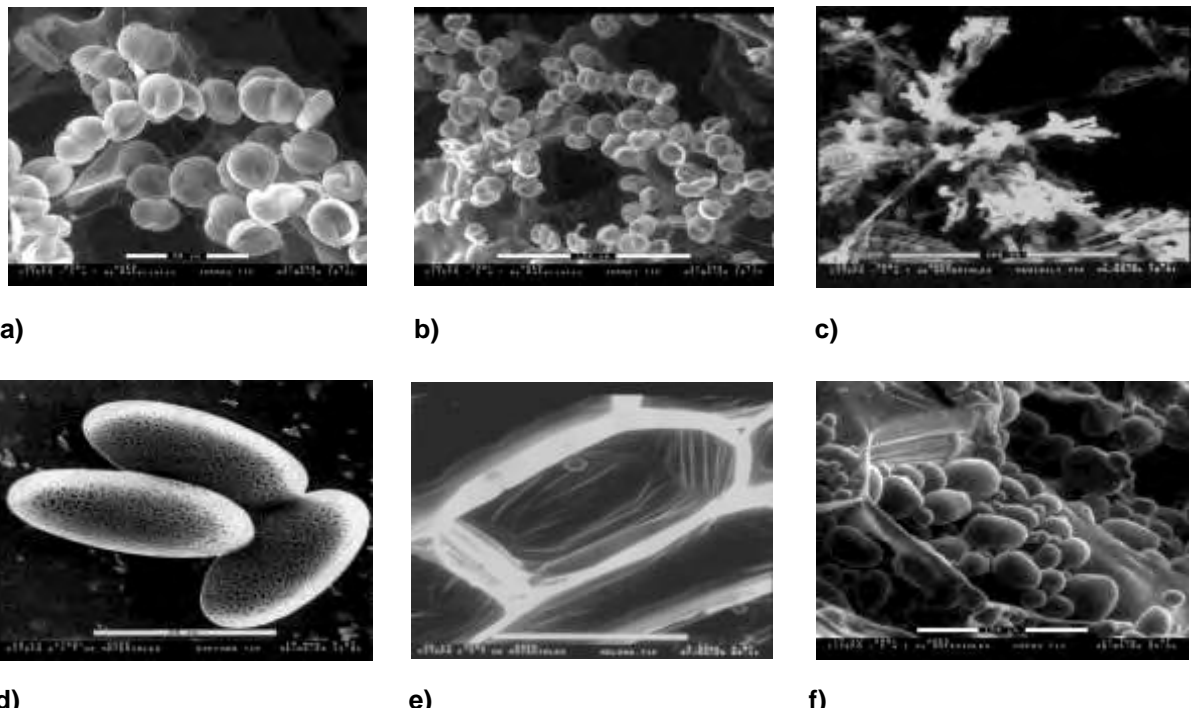


Figura 10: Distintos tipos de organismos o células: a-b) comunidad de organismos crecidos en una torre de enfriamiento; c) micelio y esporas de *Penicillium* sp; d) esporas de *Ascobolus* sp; e) detalle de pared celular en células de melón (*Cucubis melo*); f) gránulos de almidón en células de papa (*Solanum tuberosum*)

PARTE C: CONCEPTOS DE FOTOGRAFÍA

Cámara fotográfica analógica

Una cámara fotográfica es un dispositivo encargado de recoger un haz de luz proveniente de un objeto y proyectarlo sobre una película impregnada de una sustancia fotosensible, de forma que sobre cada punto de la película incida la luz proveniente de un cono visual tan estrecho como sea posible. Es decir, la cámara debe formar una imagen real sobre la película de todos los objetos de su campo de visión (Figura 1).

Las partes que componen una cámara fotográfica son (Figura 2):

- **Objetivo.** Es el encargado de formar una imagen del objeto sobre la película. Consta de una lente o conjunto de lentes fijas o móviles que determinan una distancia focal f con un plano focal muy próximo al de la película.
- **Película.** Es un material fotosensible que sufre una alteración química cuando es iluminado. Este cambio es el que guarda la información visual del objeto en cada fotografía. Existen distintos tipos de películas y varios formatos que determinan las características requeridas del conjunto de rayos necesario (Detallado en secciones posteriores)
- **Obturador.** Es un dispositivo encargado de permitir el paso de la luz a la película durante un corto período de tiempo, que puede ser fijo o variable (suele ser del orden de las centésimas de segundo).
- **Diafragma.** Es una apertura variable que limita el haz de rayos que partiendo de un punto del objeto llega a la película.

- **Sistema de enfoque:** gradúa la posición del objetivo, para que la imagen se forme totalmente donde está la placa sensible.
- **Sistema de deslizamiento de la película:** sistema que permite desplazar una nueva película antes de cada toma
- **Visor:** sistema óptico que permite encuadrar el campo visual que a de ser fotografiado.
- **Caja:** estuche hermético a la luz y de color contiene todos los elementos anteriores y constituye el cuerpo de la cámara.

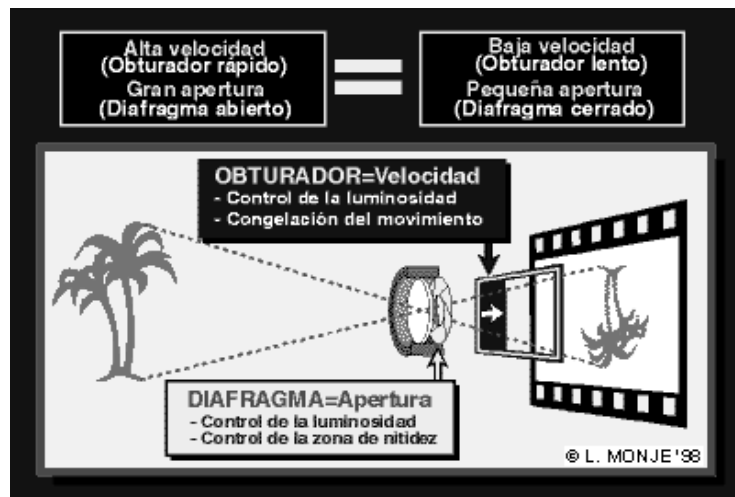


Figura 1. Esquema del principio fotográfico. Imagen tomada de http://www.difo.uah.es/curso/objetivo_e_imagenes.html

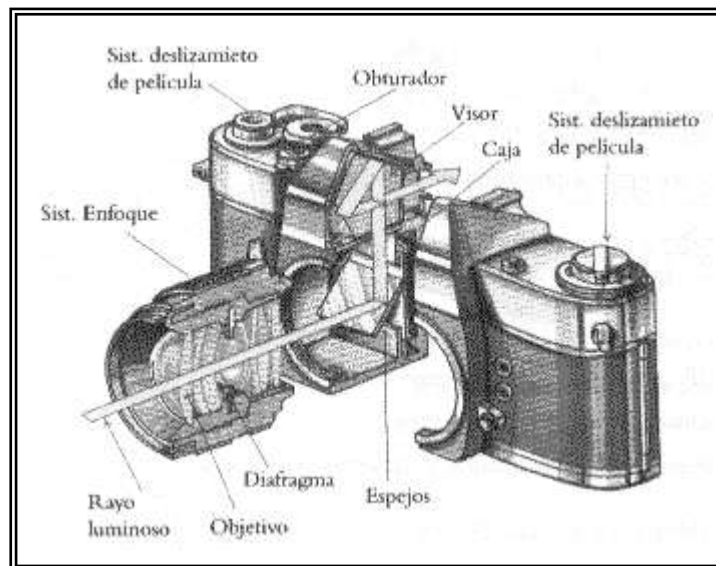


Figura 2. Detalle de cámara fotográfica analógica. Tomado de Teoría de Los Sistemas - El Ojo Humano por Bruno Nicolás Gutierrez Perea.

La película

De una manera muy simple, una película es una emulsión sensible a la luz que va revestida sobre una base de plástico. La emulsión fotográfica consiste de dos partes: el medio de dispersión y la fase sensible a la luz. El medio de dispersión, en casi todos los materiales modernos, es una gelatina. El

medio de dispersión tiene que satisfacer varios requisitos rigurosos. Tiene que ser un coloide protector que mantenga la fase sensible altamente dispersada. Tiene que ser transparente a la luz. Tiene que ser estable por varios años para asegurar a la fotografía un grado razonable de permanencia. Tiene que ser permeable a las soluciones reveladoras y fijadoras pero no debe estropearse en grado apreciable durante su contacto con ellas. Tiene que poder adquirirse en grandes cantidades como material relativamente uniforme. La gelatina cumple satisfactoriamente todos estos requisitos.

La fase sensible a la luz consiste en minúsculas partículas, o granos de haluro de plata. El haluro de plata forma un 30% - 40 % del peso total de la emulsión en la mayoría de los materiales comerciales. El primer paso para hacer la emulsión es disolver barras de plata en ácido nítrico. Como resultado, se obtiene nitrato de plata. Luego, como el agua en la solución se evapora, se forman cristales de nitrato de plata, los cuales son subsecuentemente lavados y purificados. Mientras tanto, se prepara una gelatina para que sea el vehículo de la emulsión sensible a la luz. Se calienta hasta que se haga líquida y el nitrato de plata y bromuro de potasio se añaden a aquélla. A partir de esta etapa, se debe proceder en casi oscuridad completa para que la plata y el bromuro se combinen y formen cristales de bromuro de plata sensibles a la luz. El potasio y nitrato se unen como nitrato potásico, el cual se elimina de la gelatina por medio del lavado. Así, los granos o cristales de bromuro de plata se dejan solos en el contenido de la gelatina. El tamaño de los granos varía mucho entre las diferentes emulsiones. Los granos más pequeños tienen 10- 15 mm de diámetro; el tamaño medio del grano es de 20- 40 mm. En el extremo opuesto, los granos de las emulsiones de gran velocidad del tipo de rayos X alcanzan un diámetro de varias micras. Los granos más grandes de una emulsión absorben más luz que los más pequeños durante una exposición uniforme y son, en promedio, más sensibles; esto es: pueden revelarse con una exposición menor. Fotográficamente hablando esta es la emulsión (Figura 3).

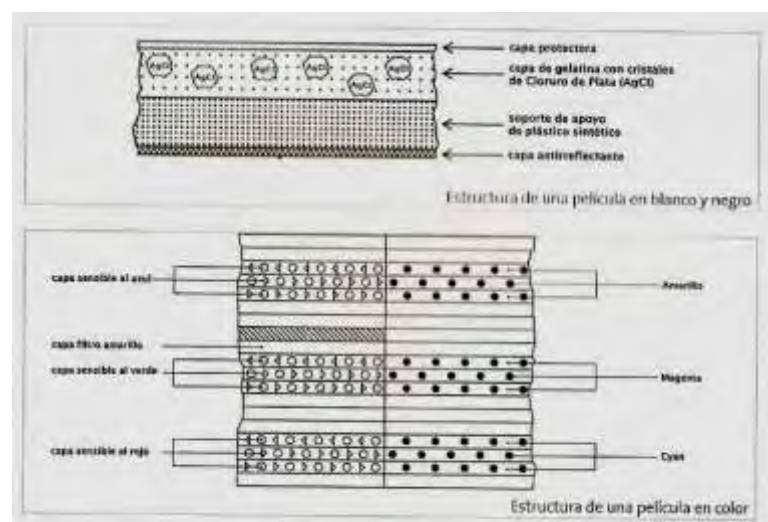


Figura 3. Composición de una película. Imagen tomada de <http://hazmeunafoto.wordpress.com/2011/04/30/la-pelicula-fotografica-i-estructura/>

Cuando se abre el obturador de la cámara y la luz incide sobre estos cristales, tiene lugar una reacción química que retiene sobre la película la imagen de lo que ha visto la cámara. Sin embargo,

la imagen todavía no puede verse en la película. De hecho, si se pudiera examinar la emulsión antes y después de ser expuesta a la luz, no se apreciaría ninguna diferencia, aunque la imagen está allí, está "latente" y no puede verse todavía. Para que se pueda convertir en una imagen visible tiene que ser procesada.

Otras características básicas que se pueden definir en una película, además de la granularidad explicada anteriormente, son la sensibilidad y el contraste.

La sensibilidad en una película significa la rapidez con que responde a la acción de la luz al incidir sobre ella. Una alta sensibilidad permite hacer buenas fotografías con poca luz. Los fabricantes han hecho todo lo posible para producir películas en las que la alta sensibilidad y la granularidad estén combinadas. Además, lo que es una realidad palpable es que un grano mayor es más sensible que uno pequeño.

En cuanto al contraste, es una característica que posee la película para distinguir entre tonos íntimamente relacionados en la escala de brillo. La calidad del contraste es predeterminada por su fabricante; sin embargo, éste puede mejorarse variando a su vez el revelado y el positivado subsiguiente.

¿Cómo actúa la película?

La luz penetra en la cámara e incide sobre la emulsión de la película, produciendo un cambio importante: los cristales de haluro de plata que han recibido luz se descomponen, obteniéndose así el negativo de la imagen.

Un negativo es una imagen invertida en la cual las zonas claras o brillantes del sujeto fotografiado aparecen reproducidas en plata negra, es decir, oscuras, mientras que las sombras del sujeto están representadas por gelatina transparente, es decir, por zonas claras. Las zonas más negras aparecen donde es más densa la concentración de granos de plata negra, que es justamente donde incidió la mayor cantidad de luz sobre la emulsión. Las partes más claras del negativo, donde hay poca o ninguna plata negra, representan las partes de la escena que eran más oscuras y que no reflejaron luz sobre la emulsión. Todas las demás áreas aparecen en distintos tonos de gris (Figura 4). Para tener una imagen visible, la película debe ser revelada, fijada y lavada convenientemente, que son los pasos subsiguientes en el proceso fotográfico.



POSITIVO



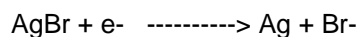
NEGATIVO

Figura 4. Imagen positiva y su negativo. Notar que las zonas donde incide la mayor cantidad de luz en el positivo, aparecen más oscuras en el negativo y viceversa.

Revelado

El agente revelador debe ser un agente reductor que puede distinguir entre los granos expuestos y los no expuestos de la emulsión.

El agente revelador en la solución de revelado reduce los granos de bromuro de plata expuestos, a placa metálica. La reacción que se produce es:



Esta acción oxida simultáneamente el agente revelador (Figura 5). El sulfito sódico utilizado como conservador evita que la solución se oscurezca y manche la emulsión. El sulfito también protege al agente revelador de oxidarse por acción del oxígeno del aire. Se utiliza un álcali para producir el régimen de revelado deseado de forma que no cambie durante su uso. En muchos reveladores, particularmente los más activos, se añade una pequeña cantidad de bromuro potásico como retardador para reducir la formación de velo.

Baño de paro

Después de haber sido revelada, la película contiene una imagen visible de plata. Esta imagen no está aún en condiciones de ser llevada a la luz ni de ser usada para obtener copias, ya que los granos de haluro de plata que no fueron afectados por la exposición (que no han sido reducidos por el revelador) permanecen aún en la emulsión. Además, estos granos siguen siendo sensibles a la luz y la gelatina contiene una gran cantidad de revelador.

Fijado

Su acción característica es la de eliminar de la emulsión el haluro de plata no expuesto, sin dañar la gelatina ni atacar la imagen de plata. De los posibles disolventes de los haluros de plata, sólo se usan los tiosulfatos (los demás presentan algún inconveniente). Los cianuros y los tiocianatos alcalinos, por ejemplo, aunque de acción más rápida que los tiosulfatos, ablandan la gelatina y llegan a disolver la imagen de plata. Los cianuros presentan además el inconveniente de ser altamente tóxicos (algunos refieren que son “venenosos”).

El baño fijador elimina el haluro de plata residual transformándolo en tiosulfatos complejos de plata y sodio. Estos complejos no son muy estables y deben ser eliminados por lavado de la emulsión. Si permanecieran en la emulsión, se desdoblarían con el tiempo, formando un tinte pardo-amarillo de sulfuro de plata

Lavado

La finalidad del lavado es la de eliminar las sales solubles que permanecen en la emulsión después del fijado. Las sales más importantes que deben ser eliminadas son el tiosulfato sódico y las sales complejas de plata.

Para un lavado eficaz de películas y papeles es mejor un sistema de agua corriente que aporte flujo continuo de agua limpia a la superficie de la gelatina. Este método exige un gran consumo de agua. Otro método igualmente efectivo se obtiene con varios cambios de agua. Para un lavado rápido y eficaz de películas son suficientes seis cambios de dos minutos de duración cada uno con agitación.

Sin agitación pueden aplicarse seis cambios de cinco minutos.

El lavado de las películas y papeles es principalmente una medida preventiva. Los productos químicos del baño de fijado que quedan en la película o papel, con el tiempo causan decoloración a través de la sulfuración de la imagen. El sulfuro de plata resultante, cuando se expone a una alta humedad relativa y altas temperaturas durante mucho tiempo, puede oxidarse lentamente a sulfato de plata, un componente blanco y la imagen comienza a desaparecer.

Secado

Después de lavada, es conveniente que la película reciba un enjuague final de un minuto o dos en un baño que contenga unas gotas de agente humectante. Esto hace que el agua sea escurrida con más uniformidad, reduciendo la formación de marcas durante el secado.

Positivado

El paso final de todo el proceso fotográfico consiste en la obtención de una copia positiva a partir de una película negativa. En dicha copia hay que intentar restablecer la escala tonal de la escena. La copia o positivo se obtiene de forma similar pero utilizando el negativo como original y utilizando un proyector o ampliadora en lugar de la cámara; sobre este aparato puede ejercerse el mismo control sobre el tiempo e intensidad de la luz. Una ampliadora consta, en esencia, de una fuente de luz (halógena o incandescente) provista de un sistema que distribuya la iluminación de forma uniforme, bajo el que sujeta la película por medio de una placa perforada conocida como portanegativos. La imagen iluminada del negativo, es recogida por un objetivo provisto de un *raíl* de enfoque. Todo el conjunto se encuentra sujeto a una columna, por la que puede moverse verticalmente, para ampliar el área de proyección (Figura 17). Al igual que en la cámara, en la ampliadora, el objetivo va provisto de un diafragma con la misma escala graduada.

Otros dispositivos que intervienen en el proceso de positivado son:

- **Reloj:** Su función es equivalente a la del obturador de la cámara.
- **Marginador:** para sujetar el papel durante la exposición de forma que quede plano, se utiliza un tablero bajo la ampliadora provisto de un marco y dos regletas móviles, que sirven para ajustar el encuadre, inmovilizar el papel y definir también el grosor del margen blanco que rodeará la foto.
- **Luz de seguridad:** El clásico papel fotográfico en B/N, es prácticamente insensible a las longitudes de onda desde el amarillo al rojo; gracias a ello no es necesario trabajar a oscuras, siempre que utilicemos una luz con la emisión adecuada.
- **Cubetas para las distintas soluciones a utilizar y sus correspondientes pinzas.**

La nueva emulsión fotosensible tiene como soporte papel en vez de acetato, para aumentar la reflectancia y contraste de la copia, si bien las sustancias fotosensibles vienen a ser las mismas al igual que el proceso y las sustancias reveladoras. La estructura básica del papel fotográfico es la misma que la de la película con la salvedad del soporte, que en vez de ser transparente, es intensamente blanco para mejorar la reflexión de la luz.

Si en vez de papel utilizásemos como soporte de la emulsión otra vez el acetato, obtendríamos una diapositiva, esta palabra, contracción de la frase "directo-a-positivo" se toma por su equivalencia a

otros procesos en que la imagen positiva se obtiene sin mediar un negativo.

La ventaja del método negativo-positivo, radica en que:

- a. Pueden hacerse muchas copias a partir de un negativo.
- b. Éstas pueden hacerse en gran variedad de tamaños y sobre distintos soportes.
- c. Permite además ejercer un nuevo control de la imagen durante el proceso de positivado.

Una vez realizada la exposición se anota al dorso del papel el tiempo y diafragma empleado y se introduce rápidamente con la imagen hacia abajo en la cubeta del revelador, a los pocos segundos se le da la vuelta para observar la aparición de la imagen. Durante el revelado conviene mover la copia con las pinzas o balancear la bandeja para renovar la capa de reactivos en contacto con el papel y conseguir así un revelado homogéneo.

El proceso se detiene sacando la copia y pasándola a la bandeja del baño de paro que tiene la misma composición y funciones que cuando revelábamos el negativo (detener al instante el revelado y neutralizar la acción del revelador y su pH).

Al pasar la copia a esta bandeja con las pinzas del revelador, no conviene tocar este baño para no contaminar luego el revelador. El resto de los pasos se hacen con sus propias pinzas.

Del baño de paro se pasa al de fijado donde se mantiene unos minutos y de ahí al lavado final en agua corriente. El tiempo de estancia en cada baño depende del tipo de papel.

Fotografía digital

La **fotografía digital** consiste en la grabación de imágenes mediante una cámara (Figura 5), de forma análoga a la fotografía clásica. Sin embargo, así como en esta última las imágenes quedan grabadas sobre una película y se revelan posteriormente mediante un proceso químico, en la fotografía digital las imágenes son capturadas por un sensor electrónico que dispone de múltiples unidades fotosensibles y desde allí se archivan en otro elemento electrónico que constituye la memoria.



Figura 5. Cámaras digitales

Ventajas

Una gran ventaja de este sistema respecto a la fotografía clásica es que permite disponer de las imágenes grabadas al instante, sin necesidad de llevar la película al laboratorio y esperar un cierto tiempo hasta que éste entregue las fotos reveladas. En la cámara digital pueden verse, en una pantalla, las fotos que se acaban de tomar. La cámara se puede conectar a una computadora u otro dispositivo capaz de mostrar las fotos en una pantalla. Al tener formato informático, las fotos pueden enviarse directamente por e-mail, publicarse en la web y procesar con programas de tratamiento

fotográfico en una computadora, para ampliarlas o reducir las, realizar un encuadre (una parte de la foto), rectificar los colores y el brillo, y realizar otras posibles modificaciones, según el programa que se utilice. El costo por fotografía impresa, en comparación con el del sistema analógico, es menor. Esto considerando que se pueden realizar "n" tomas y elegir e imprimir sólo las mejores fotografías.

Desventajas

- La calidad de una fotografía analógica es superior, aunque muchas veces sólo es notoria cuando se amplían las fotos (Nikon aseguró que el film de 35 mm tiene en comparación poco menos de 6 mega píxeles de resolución, aunque expertos fotográficos aseguran que una buena cámara analógica, con un buen objetivo, un buen negativo y un buen revelado, equivaldría a unos 40 mega píxeles).
- La foto digital presenta un mayor número de aberraciones cromáticas y "ruido".
- La manipulación de las fotografías digitales es fácil de hacer y muy difícil de detectar, prestándose al fraude y a usos poco éticos.

Tipos de cámaras

Al igual que en la fotografía clásica, existen muy diversos tipos de cámaras digitales, ya sean de tamaño de bolsillo, medianas o para uso avanzado o profesional, con ópticas más o menos completas, y con sistemas más o menos sofisticados. Una característica peculiar de las cámaras digitales es, sin embargo, la resolución que describe cuánto detalle puede observarse en una imagen. El término es comúnmente utilizado en relación a imágenes de fotografía digital y también se utiliza para describir cuán nítida (como antónimo de granular) es una imagen de fotografía convencional (o fotografía química). Tener mayor resolución se traduce en obtener una imagen con más detalle o calidad visual.

Para las imágenes digitales almacenadas como mapa de bits, la convención es describir la resolución de la imagen con dos números enteros, donde el primero es la cantidad de columnas de píxeles (cuántos píxeles tiene la imagen a lo ancho) y el segundo es la cantidad de filas de píxeles (cuántos píxeles tiene la imagen a lo alto). La convención que le sigue en popularidad es describir el número total de píxeles en la imagen (usualmente expresado como la cantidad de mega píxeles), que puede ser calculado multiplicando la cantidad de columnas de píxeles por la cantidad de filas de píxeles.

Otras convenciones incluyen describir la resolución en una unidad de superficie (por ejemplo píxeles por pulgada). También en la fotografía clásica, se habla de resolución, aunque en este caso depende del tipo de película que se usa, ya que es el tamaño de los granos fotosensibles y la dimensión física de la película es lo que determina la resolución independientemente de la cámara. También se habla de la "resolución interpolada", en la que debe ser tenida en cuenta solamente la del sensor, ya que la interpolación consiste en un proceso que amplía la imagen sin ganancia de calidad (incluso puede perderla ligeramente), puesto que se parte siempre de la resolución del sensor y ésta se interpola con procedimientos matemáticos en los que es imposible obtener los detalles que no captó el sensor.

Cámaras digitales estándar

Esta categoría incluye la mayoría de las cámaras digitales ó cámaras de consumidor. Se caracterizan por tener una gran facilidad de uso y operación y enfoque sencillo; este diseño limita las capacidades

de capturar imágenes en movimiento. Tienen una profundidad de campo amplia para la cuestión del enfoque. Esto permite que varios objetos estén enfocados al mismo tiempo lo que facilita el uso aunque es también una de las razones por las cuales los fotógrafos profesionales encuentran las imágenes tomadas por estas cámaras, planas o artificiales. Estas cámaras son ideales para tomar paisajes y de uso casual. Usualmente guardan los archivos de imagen en formato JPG.

Por **profundidad de campo** se entiende tradicionalmente en fotografía, a la zona en la cual la imagen captada por el objetivo es nítida, de manera que, en la fotografía que se realice las personas y objetos que se encuentren dentro de esa zona aparecerán también nítidos o enfocados. Una definición más completa y exacta de **profundidad de campo** sería el rango de distancias reproducidas en una fotografía donde la imagen es aceptablemente nítida comparada con el plano más nítido de la misma. Esta definición extendida es importante porque aclara algunas de las confusiones relacionadas con este concepto:

- Primero: La Profundidad de campo sólo existe en el contexto de una reproducción. No es una propiedad intrínseca de una lente y depende de valores de apreciación subjetivos.
- Segundo: La frase **aceptablemente nítida** se refiere a la zona que rodea el plano de la imagen que está en foco. Todos los puntos en una fotografía están fuera de foco en cierta medida (aunque no sea obvio), sólo un plano está perfectamente enfocado. Los límites de la profundidad de campo son precisamente donde la falta de nitidez se vuelve inaceptable para el observador.

La profundidad de campo no es una zona en la que la fotografía está enfocada perfectamente sino la zona de la fotografía donde el foco es lo suficientemente cercano al plano nítido como para ser aceptable. La profundidad de campo tampoco dictamina que tan borroso estarán los planos alejados del plano nítido, una confusión común.

La profundidad de campo aumenta cuanto más cerrado se encuentra el objetivo, es decir, cuanto mayor sea el número del diafragma elegido. Por ejemplo, con un diafragma de 5,6 la profundidad de campo no será muy amplia, mientras que con un diafragma de 11 o de 16 será considerable.

Por otra parte, cuanto más cerca se encuentre el motivo que se desea fotografiar, menor será la profundidad de campo, independientemente del diafragma seleccionado. Si se utilizan teleobjetivos también se reduce la profundidad de campo. Pero con objetivos angulares, la profundidad de campo aumenta. El hecho de que un diafragma o un iris muy abierto reducen la profundidad de campo, explica que las personas miopes vean peor de noche. Cuando el rango enfocado se reduce, el defecto visual se hace más evidente debido a que hace falta más precisión en el enfoque.

Cámaras de "Prosumidor".

Las cámaras de "Prosumidor" o de Zoom extendido forman un grupo general de cámaras de mayor calidad y prestaciones que físicamente se asemejan a las cámaras SLR (*Single lens Reflex*) "profesionales" y comparten algunas de sus funciones empero siguen estando encaminadas a consumidores. De este modo, el nombre "Prosumidor" viene formado de Profesional y Consumidor. Estas cámaras generalmente tienen zoom óptico largo que asegura una capacidad de multiuso. Las cámaras de prosumidor algunas veces son comercializadas y confundidas con cámaras SLR digitales (dSLR) ya que los cuerpos de cámara se parecen entre sí. Las principales características que las distinguen son que no tienen una lente intercambiable (aunque pueden añadirse diferentes lentes en algunos modelos, pueden tomar video, grabar audio y la composición de la escena se lleva a cabo en

la pantalla de cristal líquido o en el visor electrónico. El rendimiento de estas cámaras tiende a ser más lento que el de una verdadera SLR digital si bien las cámaras prosumidor pueden lograr una muy buena calidad de imagen siendo más ligeras y compactas que las SLR digitales. Muchas de estas cámaras pueden archivar en formatos JPEG o RAW.

Cámaras SLR digitales

También conocidas por el acrónimo en inglés "DSLR" (*Digital single reflex camera*) son concebidas para fotógrafos profesionales y están muy bien adaptadas para fotografía en acción ó usos especializados. Están basadas en las cámaras SLR de rolo y mantienen sus principales funciones: Composición de imagen llevada a cabo a través del visor óptico usando una imagen reflejada en espejo y lentes intercambiables. La posibilidad de cambiar lentes permite los mismos beneficios que una cámara de rolo permitiendo el uso del lente a discreción y no por compromiso. Pueden usar los mismos lentes que las cámaras de rolo, pero el sensor más pequeño que el rolo de 135 (generalmente 1,5 o 1,6 veces menor) implica que al utilizar un lente con el mismo campo de vista se vea éste a su vez reducido.

Las DSLR tienen sensores de imagen más grandes que las compactas o las de prosumidor así logran mayor sensibilidad a la luz tenue y logran menor ruido, en las imágenes capturadas. Usualmente son de encendido instantáneo y la operación del enfoque automático es más veloz. La mayoría de ellas pueden archivar en formato JPEG y RAW e incluso ambos al mismo tiempo.

Otra característica es que la mayoría de las DSLR llevan a cabo la composición de imagen por medio del visor (ya que no produce retardo como sucede con la pantalla de cristal líquido) y la pantalla lcd solamente se utiliza para revisar imágenes ya capturadas.

Características

La resolución en fotografía digital se mide multiplicando el alto por el ancho de las fotografías que permite obtener la cámara y generalmente comienza con un millón de píxeles, para las cámaras más económicas, y va en aumento hasta más de diez millones de píxeles, para las cámaras profesionales. El término "pixel" (del inglés *picture element*), es la unidad más pequeña que capta un valor gris o de color de la fotografía. Una cámara de cuatro millones de píxeles generará imágenes más grandes que una de dos millones lo que permite obtener una copia impresa de hasta 50 x 75 cm, pero no necesariamente de mayor calidad ya que en este aspecto tiene una mayor importancia la calidad de la óptica utilizada. Dado que a más mega píxeles las cámaras son más caras es habitual que también posean mejores ópticas. Otra característica de la fotografía digital es el *zoom* digital. Mediante este *zoom* se puede ampliar una foto si bien el efecto no es el de un *zoom* óptico. El *zoom* óptico acerca y amplía lo que se quiere fotografiar sin mermar la resolución de la cámara, ya que el acercamiento se consigue con el objetivo. El *zoom* digital, por el contrario, amplía la imagen que ya ha recibido, de forma que disminuye la resolución, al igual que ocurriría encargando una ampliación al laboratorio o utilizando un programa de edición de gráficos. Actualmente las cámaras digitales también permiten tomar videos, generalmente en resoluciones de 320x240 ó 640x480 píxel y de entre 12 y 60 fotogramas por segundo, a veces con sonido (normalmente mono) en el caso de los modelos más completos. Estos videos son sólo un complemento a la función principal de la cámara que es sacar fotos, por eso no suelen ser de una gran calidad, para ello se requiere una videocámara.

Trabajo Práctico N° 1

Actividades

1. Contar el número cromosómico y dibujar cromosomas en metafase de especies vegetales.
2. Contar el número cromosómico y dibujar cromosomas en metafase de especies de mamíferos.

Para los puntos 1 y 2 detallar:

Nº de preparación

Nº cromosómico (en caso de tratarse de una metafase)

Coordenadas del campo

Aumento utilizado

Posición de la etiqueta (por si no se sigue convención derecha)

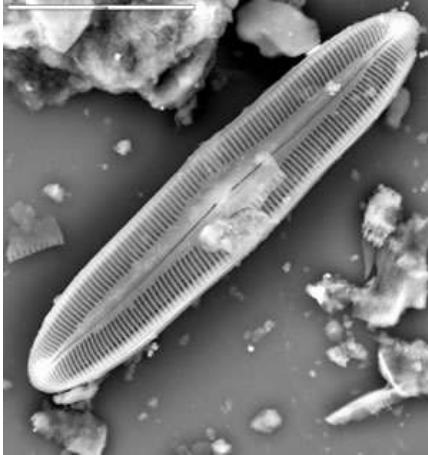
3. Cada alumno deberá confeccionar un portaobjeto marcador para cada preparado observado, en el cual indicará la posición de al menos dos células para ser fotografiadas.

4. A partir de los conocimientos adquiridos durante el desarrollo del Trabajo Práctico, ubique cada uno de los elementos ópticos y mecánicos de un microscopio óptico en la Figura y detalle la utilidad de cada uno de ellos.

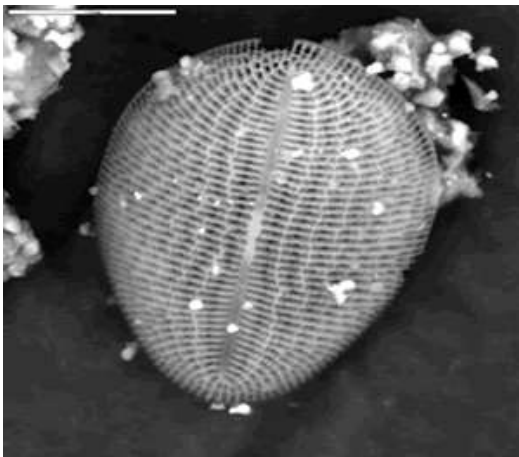


5. A partir de una serie de fotografías, indique qué tipo de microscopio se ha utilizado para obtener la imagen.

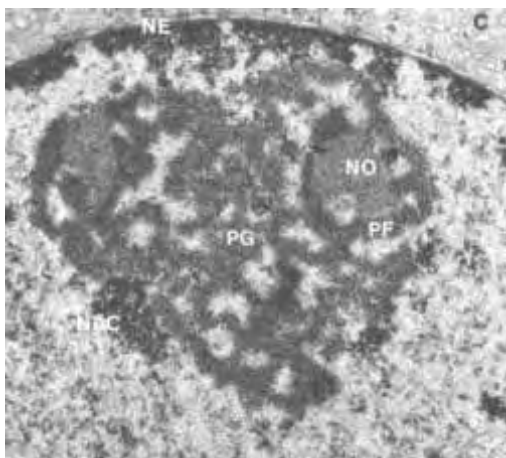
1. *Pinnularia mayor*



2. *Cocconeis pediculus*



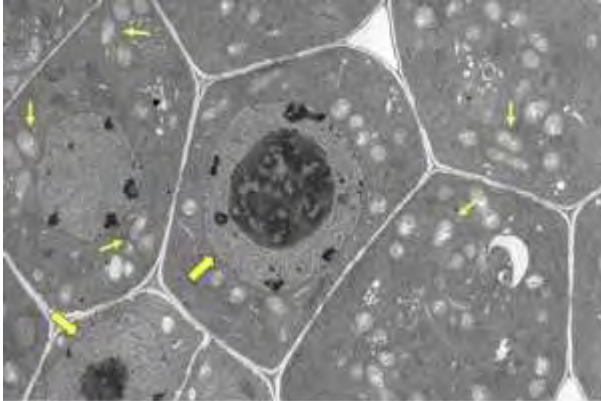
3. Nucleolo



4. Células del ápice radicular

Flechas amarillas anchas: núcleo

Flechas amarillas angostas: mitocondrias

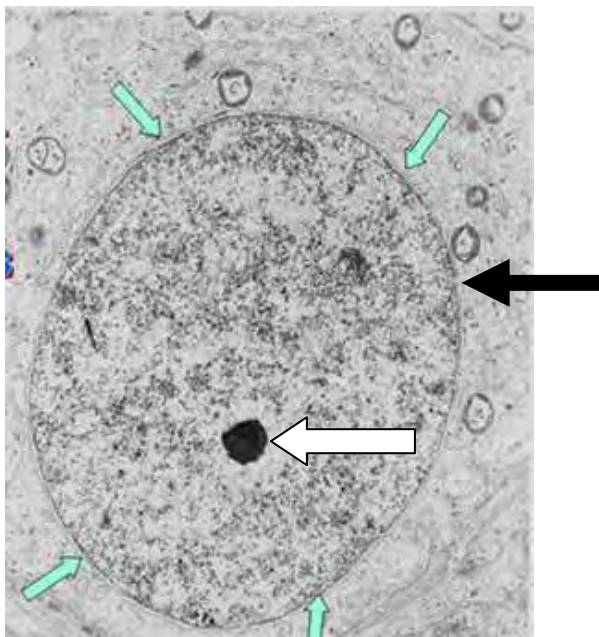


5. Espermátida temprana de insecto

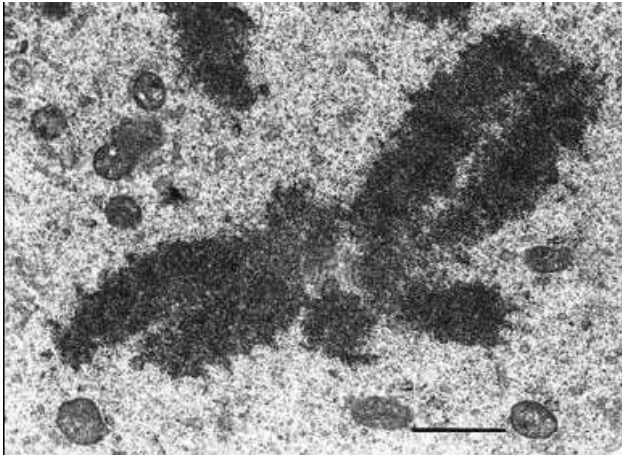
Flechas: membrana nuclear

¿A qué se corresponde el pequeño y denso punto negro? (Señalado con flecha blanca)

¿Qué es lo que se señala en el núcleo con una flecha negra?

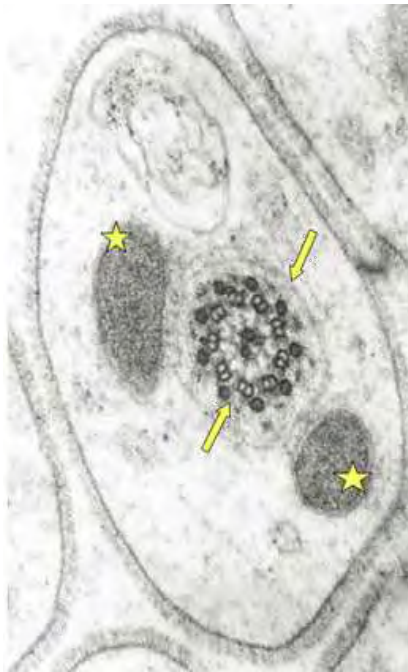


6. Cromosoma metafásico de célula ovárica de hamster Chino. Barra= 1µm



7. Flagelo

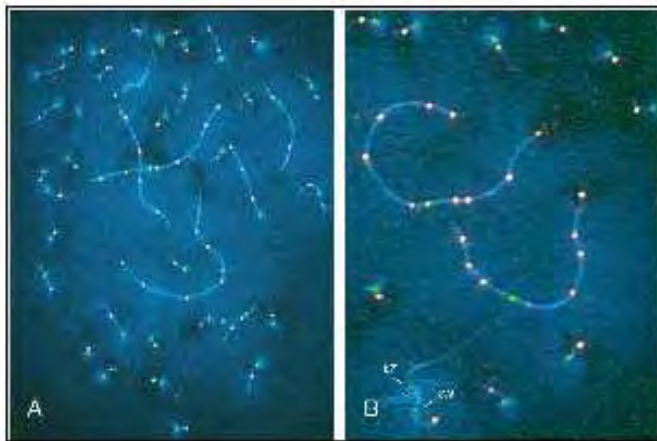
Estrellas: mitocondrias modificadas. Flechas: microtúbulos (9+9+2)



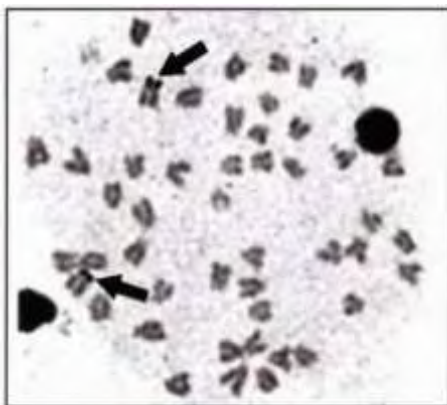
8. Quiasmas



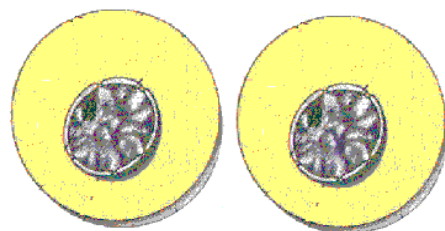
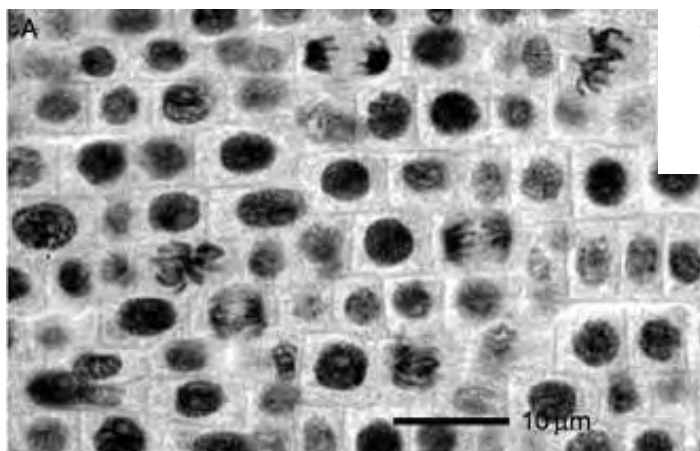
9. Complejo sinaptonémico



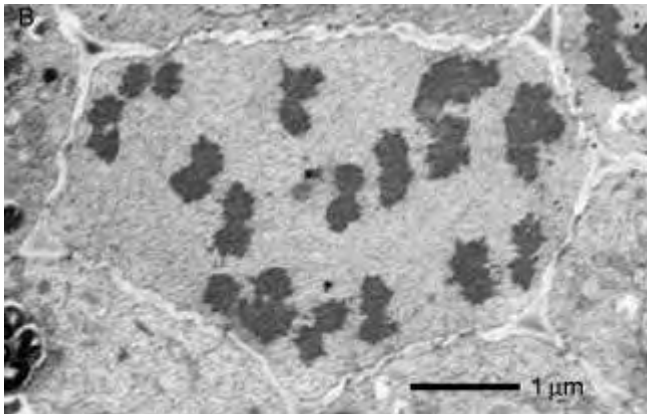
10. Nucleolo (flechas negras)



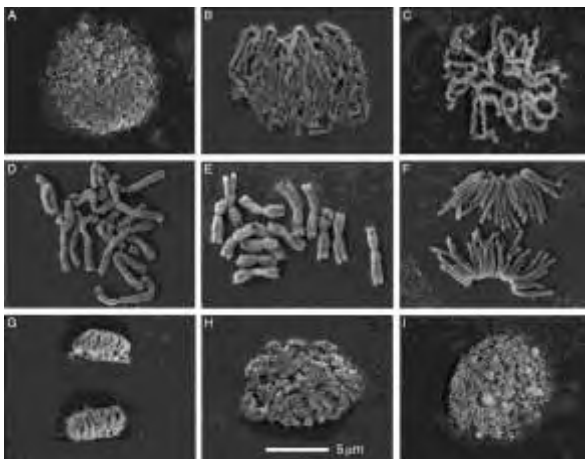
11. Células de ápice radicular de cebolla



12. Célula mitótica de ápice radicular de cebolla



13. Células de arroz en distintas etapas del ciclo celular

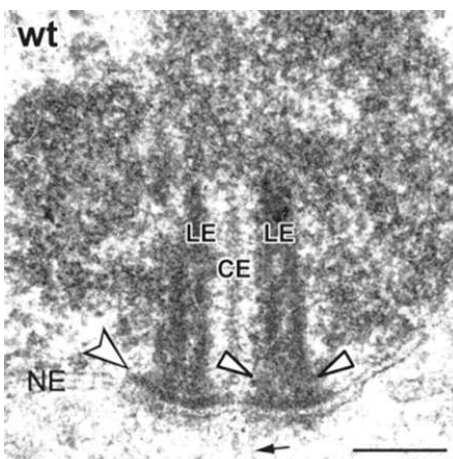


14. Complejo sinaptonémico de la región telomérica en espermatocitos de ratones

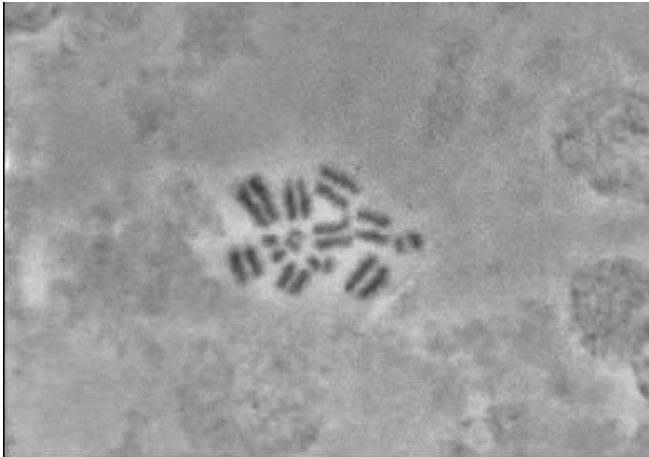
LE: elementos laterales

CE: elemnto central

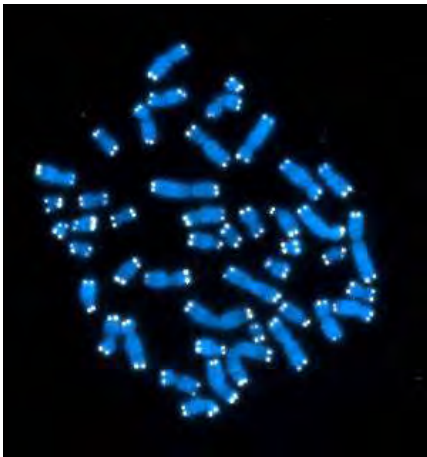
NE: envoltura nuclear



15. Cromosomas de células mitóticas de un insecto (*Myzus persicae*)



16. Regiones teloméricas



Glosario

Aberración

Defecto óptico inherente al diseño de una lente que le impide concentrar todos los rayos de luz en un foco exacto.

Aberración cromática

Se detecta en un sistema de lentes cuando los rayos de los colores que componen de la luz blanca no son llevados a un foco simultáneamente, produciendo así franjas cromáticas no deseadas en la imagen.

Aberración esférica

Se produce cuando los rayos de luz de un mismo color, que pasan por la periferia de la lente, no alcanzan el mismo punto que los rayos que pasan próximos al centro. La imagen queda más o menos borrosa y no puede enfocarse utilizando los mandos macrométricos y micrométricos.

Acromática

Literalmente, sin aberraciones de color. Las lentes y los prismas del interior del microscopio están corregidos de manera que transmitan una imagen fiel de la muestra, sin franjas cromáticas.

Lente acromática (sin color)

Lente compuesta por dos o más elementos, habitualmente confeccionada con cristal crown y cristal flint. La aberración cromática de esta lente se ha corregido de modo que tiene la misma distancia focal para dos colores (o longitudes de onda) diferentes (rojo y azul). La imagen resultante no presenta colores extraños. Esta lente también está corregida de aberración esférica para un color.

Ángulo de incidencia

Ángulo que se forma entre el rayo incidente y la normal a la superficie en el punto de intersección. (Es el ángulo en el diagrama que sigue).

Ángulo de reflexión

Medida angular entre un rayo de luz reflejado y la normal a la superficie de reflexión. Para cualquier superficie el ángulo de incidencia equivale al ángulo de reflexión. (Es el ángulo en el diagrama que sigue).

Ángulo de refracción

Medida angular entre un rayo refractado (rayo que se inclina al atravesar la superficie de separación de dos medios transparentes) y la normal a esa superficie. (Es el ángulo en el diagrama).

Alineación

Coincidencia de los componentes ópticos y mecánicos en un mismo eje.

Angstrom

Unidad de longitud de ondas luminosas utilizada en espectroscopia. Véase unidades de medida y también longitud de onda.

Apertura anular (anillo)

Abertura u orificio fija o variable por el cual debe pasar la luz (véase anillo de fases).

Lente aplanática

Conjunto de lentes corregido simultáneamente para las aberraciones de coma y la aberración esférica.

Diafragma de apertura

Diafragma de disco giratorio o diafragma iris, situado en la lente condensadora del microscopio. Se

utiliza para el control adecuado del ángulo sólido de iluminación que atraviesa la muestra y entra en el objetivo. La resolución, el contraste y la definición de la muestra dependen en gran medida del ajuste correcto de diafragma de apertura. Es importante señalar que el control de la intensidad de la iluminación no está en función del diafragma de apertura; para este fin se utilizan los filtros de absorción.

Lentes apocromáticas

Lentes acromáticas de alta calidad. Las lentes acromáticas solamente corrigen los colores rojo y azul, mientras que las lentes apocromáticas corrigen los tres colores (rojo, azul y verde) y reducen en gran medida el aspecto borroso provocado por los colores que no corrige la acromática. Además, esta lente está mejor corregida de la aberración esférica y tiene por lo general mayor apertura numérica que la acromática.

Astigmatismo

Aberración de la lente por la que las líneas verticales y horizontales se enfocan en dos puntos distintos en el eje óptico. La imagen se define con claridad en algún lugar entre los dos puntos mencionados.

Iluminación del campo claro

Es el tipo de iluminación que se aplica normalmente en los microscopios ordinarios. La imagen de la muestra aparece oscura contra un fondo más claro.

Calibrar

Determinar los intervalos de escala correctos para cualquier aparato de medición.

Centrado

Precisión con la que coinciden el eje óptico y el eje mecánico de la lente.

Aberración cromática

Defecto óptico de una lente que provoca que los distintos colores o longitudes de onda de luz se enfoquen a diferentes distancias de la lente. Se presenta como franjas cromáticas o halos en los extremos, con la consiguiente degradación de la calidad de la imagen.

Círculo de mínima confusión

Punto de enfoque óptimo para una imagen. Es la sección transversal mínima de un haz de luz enfocado.

Colimación

Alineación de dos sistemas de lentes de manera que, cuando quedan correctamente ajustados, los ejes ópticos de los dos sistemas apuntan en la misma dirección. La precisión de la alineación y la ausencia de doble imagen incrementan el rendimiento y la comodidad para el usuario. Por ejemplo, un sistema de lentes binoculares.

Coma

Aberración que se produce cuando no convergen los rayos que parten de puntos que están fuera del eje óptico. La imagen de un punto no aparece como un círculo diminuto, sino como un gráfico en forma de pera, carente de buena definición.

Microscopio compuesto

Instrumento óptico de precisión utilizado para aumentar y resolver los detalles más precisos en una muestra transparente. Se diferencia del microscopio simple (lente de aumento ordinaria) por sus dos sistemas de lentes separados: un objetivo, situado cerca de la muestra que la aumenta un cierto

número de veces y un ocular *que vuelve a ampliar la imagen formada por el objetivo. El aumento* resultante que observa el ojo equivale al producto del aumento primario de ambos sistemas de lentes.

Lente condensadora

Lente o sistema de lentes que captan los rayos de luz de iluminación y los llevan a converger en un foco. Está situado directamente debajo de la platina del microscopio. Constituye, junto con el diafragma de apertura, uno de los elementos más importantes y necesarios de un buen microscopio. Por ello, los microscopios llevan incorporadas lentes condensadoras y diafragmas que permiten aumentar la resolución, mejorar el contraste, reducir el brillo y garantizar resultados óptimos con todas las combinaciones de objetivo y ocular. A continuación se describen varios tipos de lentes condensadoras que se utilizan en el microscopio:

Abbe: Se trata del modelo más simple de lente condensadora, se sitúa bajo la platina, tiene buena capacidad de captación de luz pero no está corregida ni de la aberración esférica ni de la cromática.

Lente condensadora acromática: está corregida tanto para la aberración esférica como para la cromática. Es un modelo prácticamente perfecto para trabajar en campo claro puesto que sus cualidades ópticas se asemejan a las del objetivo.

Lente condensadora de campo oscuro: no envía luz directa al microscopio, pero ilumina el objeto de modo que aparece luminoso contra un fondo con muy poca luz o sin ella. Existen varios tipos de lentes condensadoras de campo oscuro.

Lente condensadora de contraste de fase: transmite la luz a través de los aros anulares que trabajan conjuntamente con unas láminas de alteración de fases situadas en el objetivo. Véase contraste de fases.

Lente condensadora de foco variable: cambia la apertura numérica de la iluminación con una lente condensadora única, por medio de elementos móviles (La apertura numérica de una lente condensadora Abbe o acromática se modifica con el cambio manual de uno o más elementos de la propia lente condensadora).

Contraste

Grado de diferencia en el tono, el brillo o el color de un punto a otro o del claro de luz a la sombra en un objeto o una imagen.

Lentes corregidas

Lente o sistema de lentes que corrige las aberraciones: rectifica la desviación de los rayos de luz del objeto al ojo para producir una imagen más clara y nítida.

Corrección

Eliminación o reducción de las diversas aberraciones que aparecen en la imagen causadas por una lente o sistema de lentes. La reducción o el equilibrado de la distorsión, de la curvatura del campo y de la aberración cromática por medio del diseño óptico producen una imagen clara y nítida.

Ajuste macrométrico

Se utiliza para un enfoque rápido de la muestra.

Cubreobjetos

Placas cuadradas, rectangulares o circulares de cristal fino y ópticamente plano que se utilizan para cubrir las muestras colocadas en el portaobjetos del microscopio. El grosor de los cubreobjetos afecta a los rayos de luz; así, la mayoría de fabricantes de microscopios diseñan objetivos que se

pueden utilizar con cubreobjetos de un grosor de 0,17 mm. Se recomienda especialmente la utilización de cubreobjetos de 0,17 mm \pm 02 mm para todas aquellas muestras que se observen con dificultad con un objetivo de 40x o mayor aumento.

Ángulo de incidencia límite

Es el ángulo máximo de incidencia que puede formar un rayo de luz al pasar de un medio denso a un medio menos denso. Este ángulo se mide entre un rayo y una perpendicular levantada en la intersección del rayo con la superficie de medio. El ángulo de incidencia límite de una superficie aire-cristal es de 42° para un índice de 1,5. Este fenómeno se utiliza en los prismas de reflexión total, en los que la luz incide en la pared del prisma con un ángulo de 45° y se refleja en lugar de atravesar la superficie limítrofe. (El ángulo de incidencia límite es el ángulo Δ del diagrama). El ángulo de incidencia límite es el principio básico que se aplica en los refractómetros.

Curvatura del campo

Aberración que provoca que la superficie del foco óptico no sea plana sino curvada. (Los límites del campo parecen quedar fuera del foco cuando se enfoca claramente la parte central).

Curvatura de la lente

Medida del radio en la superficie de una lente. Se mide como el inverso del radio de curvatura (por ejemplo: una lente con un radio de superficie de 100 mm tiene una curvatura de 0,01)

Definición

Fidelidad con la que el sistema óptico aumenta y reproduce los detalles de la muestra. Brillo, claridad y nitidez de la imagen de microscopio.

Profundidad de campo

Distancia en el eje óptico a la que se puede ubicar el objeto y que permite visualizarlo con claridad satisfactoria.

Profundidad de foco

Grosor de la muestra que permite tenerla enfocada por completo. Cuanto mayores sean el aumento y la apertura numérica y menor la distancia focal, tanto más fino será este grosor. Las lentes de distancia focal más larga con menor aumento resultan habitualmente más satisfactorias para el estudio de la disposición general de la muestra gracias a la mayor profundidad de foco: el campo visual es más amplio y la imagen más clara.

Diferencia angular entre la trayectoria original de un rayo de luz y su trayectoria después de pasar por uno o más límites ópticos. (En el diagrama, Δ es el ángulo de desviación).

Difracción

División e inflexión de pequeña escala que sufren las ondas de luz una vez superados los límites de un obstáculo o al pasar por una pequeña abertura. Este efecto es el que determina que los contornos de una sombra se vean borrosos y que aparezcan halos de pequeñas manchas brillantes de luz alrededor de las imágenes.

Dispersión

Separación de la luz "compleja" (luz compuesta por una mezcla de colores) según los colores que la componen. (El diagrama es exagerado. En realidad la banda de color es muy estrecha).

Distorsión

Aberración de una lente que provoca que la imagen aparezca deformada a causa de un incremento o descenso gradual del aumento desde el centro hasta el contorno de una imagen, en consecuencia,

las imágenes de líneas rectas aparecen curvadas.

Objetivo seco

Objetivos del microscopio diseñados para su utilización en seco, es decir, sin aceite de inmersión.

Rejilla de difracción

Es un tipo de rejilla que habitualmente tiene pocas líneas por pulgada. Cuando se usa trabajando con ángulos grandes y cruzada con otro miembro dispersor (como en el Espectrógrafo de Rejilla de Difracción) proporciona mayor dispersión, mayor resolución y una más amplia gama espectral, pero con un instrumento de dimensiones moderadas. Para obtener los mismos resultados con un espectrógrafo de rejilla convencional se requeriría un instrumento de dimensiones no realizables.

Microscopio Electrónico (transmisión)

Instrumento óptico que utiliza electrones con la finalidad de iluminar la muestra para su visualización. Se suele utilizar para ver objetos que son demasiado pequeños como para ser vistos en un microscopio óptico. En el microscopio electrónico de transmisión, una lámina muy fina de muestra (500 Å o menos) queda permanentemente iluminada por un haz colimado de electrones que se dispersan al pasar por la muestra. Un campo magnético especialmente diseñado concentra esta dispersión y proporciona una imagen de la muestra en una pantalla fluorescente. (Véase Microscopio Electrónico de Barrido)

Aumento vacío

Gran aumento que incrementa las dimensiones pero no los detalles debido a la limitación de la capacidad de resolución.

Pupila de entrada

Imagen de la abertura límite en el "espacio objeto", es decir, está formada por lentes a la izquierda de la apertura límite

Distancia focal equivalente

Es la distancia focal del sistema considerado como un todo, en una lente compuesta, dotada de varias lentes simples, con un eje óptico común.

Pupila de salida

Imagen de la abertura límite en el "espacio imagen", es decir, está formada por lentes a la derecha de la apertura límite.

Ocular

En un microscopio compuesto, dicese del 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.

Ocular Ampliplan -diseñado exclusivamente para microproyección y fotomicrografía con la finalidad de producir campo plano.

Ocular compensador - corregido para su uso exclusivo con objetivos apocromáticos, elimina las franjas cromáticas que se presentan cuando se utilizan oculares ordinarios con tales objetivos.

Ocular de Huyghens - este ocular simple ejerce una cierta corrección de la aberración cromática de aumento en el objetivo acromático.

Ocular hiperplano - proporciona una imagen más plana que el ocular de Huyghens y una compensación de color intermedia entre la del ocular de Huyghens y la del ocular compensador.

Ocular de Ramsden - similar al de Huyghens aunque con el plano focal en la superficie del objetivo o inmediatamente fuera. Se utiliza habitualmente en los instrumentos de medición.

Ocular ultraplano - diseñado para la microproyección y la microfotografía con la finalidad de compensar en la mayor medida posible la curvatura del campo y la aberración cromática de aumento.

Ocular de campo amplio - tiene un campo visual ancho y una distancia focal alta. Se usa con pocos aumentos para examinar amplias secciones de la muestra simultáneamente.

Distancia focal en el ojo

Punto del eje, por encima del ocular, en que interseccionan los principales rayos luminosos. Para una visión óptima el ojo debería encontrarse en este punto. A continuación, se presenta un gráfico de un ocular con una distancia focal en el ojo de 16 mm. Si no se conoce, esta distancia se puede averiguar realzando la luz sobre una tela o cristal esmerilado colocados por encima del ocular.

F/Número

Relación entre la distancia focal de una lente y su apertura efectiva. Medición de la "luminosidad" de una lente o de su capacidad para concentrar luz.

Diafragma de campo

Diafragma que limita el campo visual. Se debe ajustar para cada objetivo de modo que las hojas que componen el diafragma queden inmediatamente fuera del campo visual.

Campo visual

Área visualizada por el microscopio cuando la muestra está enfocada, se suele expresar en mm de diámetro. Se puede determinar enfocando con precisión una escala milimétrica transparente y graduada colocada en la platina del microscopio. El campo visual varía inversamente en relación con los aumentos resultantes - a más aumentos menor campo visual.

Filtro

Material transparente caracterizado por absorber de forma selectiva la luz según sus longitudes de onda.

Planitud de campo

Aspecto plano de una imagen; una superficie plana en el objeto se visualiza como plana. Véase curvatura del campo.

Objetivo de fluorita (semi apocromático)

Objetivo que combina cristal y fluorita y que, gracias a su baja dispersión, produce una calidad de imagen cercana a la de los objetivos apocromáticos. Tiene mayor capacidad de resolución que los acromáticos y a la vez un precio moderado comparado con el de los apocromáticos.

Distancia de la pupila de salida al ojo

Distancia de la lente ocular del microscopio o de otro instrumento al ojo.

Distancia entre la lente y la imagen de un objeto situado en el infinito. El punto donde se forma la imagen se denomina punto focal.

Plano focal

Plano perpendicular al eje óptico en el punto focal. Este plano contiene la imagen de un objeto situado en el infinito si la lente no tiene curvatura del campo.

Punto focal (foco principal)

Punto en que convergen los rayos de luz procedentes de un objeto situado en el infinito después de pasar por una lente, de alcanzar un foco y formar una imagen. Si los rayos de luz arrancan de este punto, son paralelos entre sí después de pasar por la lente. Para el gráfico, véase foco principal.

Foco

Punto en que los rayos de luz que cruzan una lente se interseccionan para formar una imagen. (Véase enfoque macrométrico y micrométrico).

Enfoque micrométrico

Enfoque preciso de la muestra. Mecánicamente, conjunto menor de botones de enfoque que controlan, con rodamiento de bolas, el movimiento preciso y ajustado del revólver portaobjetivos. El embrague deslizante mecánico situado en el extremo de todos los recorridos de ajuste fino impide que se atasque y que se dañe el mecanismo de enfoque.

Deslumbramiento

Luz desfavorable difundida por una muestra, que perjudica los detalles de la imagen. La luz difusa o diseminada en el interior del sistema de un microscopio tiene habitualmente su origen en una utilización incorrecta de los diafragmas y las lentes condensadoras.

Infrarrojo

Parte del espectro en que las longitudes de onda son excesivamente largas para ser percibidas por el ojo humano. Sin embargo, estos colores se pueden grabar gracias a los últimos avances de las técnicas de fotografía. Véase el gráfico del espectro.

Interferencia

Interacción de dos ondas luminosas que afecta la intensidad total de luz. La interferencia constructiva aumenta la intensidad, mientras que la interferencia destructiva la disminuye, en ocasiones hasta la oscuridad total si las ondas de luz que interaccionan cumplen ciertas condiciones. Las franjas de interferencia son bandas alternativamente claras y oscuras provocadas por las ondas de luz que salen de dos orificios adyacentes y que se interfieren mutuamente.

Filtro de interferencia

Formado por dos películas de plata altamente reflectantes pero parcialmente transmisoras separadas por una película de material no absorbente. Esta combinación se deposita en una placa de vidrio por medio de métodos de alto vacío y se protege cubriéndola con una lámina. La separación de las películas de plata rige la longitud de onda de la banda de transmisión y, por consiguiente, el color de la luz que el filtro transmitirá. El principio de la interferencia óptica se utiliza para obtener una transmisión selectiva o coloreada.

Diafragma iris

Conjunto de finas láminas de metal que, a través de una palanca, se pueden controlar para producir aberturas de distintas dimensiones. Se suele asociar a lentes condensadoras del microscopio y a los iluminadores de tipo medio y avanzado.

Aberración cromática de aumento

Aberración por la que la luz de un color genera una imagen con mayor aumento que la luz de otro color lo que ocasiona que la imagen de un objeto fuera del eje se difumine en un pequeño espectro. Pieza de cristal transparente cóncava o convexa utilizada para cambiar la dirección de los rayos de luz, lo que tiene como resultado el aumento o la reducción de las dimensiones aparentes de los objetos.

Sistema de lentes

Dos o más lentes montadas para trabajar conjuntamente y desempeñar así una función. Por ejemplo, una lente condensadora, un sistema de lentes de proyección, un microscopio, etc.

Luz

Radiación electromagnética con una longitud de onda entre 400 nm y 700 nm perceptible por el ojo humano, que es especialmente sensible a la radiación de 555 nm, luz amarilla - verde. Cuando la radiación, con las longitudes de onda mencionadas más arriba, alcanza la retina estimula los impulsos nerviosos que producen la visión. La luz blanca se compone de una mezcla de varias longitudes de onda o colores. Cuando las muestras son demasiado transparentes como para ser observadas correctamente se pueden teñir. De esta manera, se puede visualizar la imagen en color de la muestra enfocada, puesto que el tinte absorbe ciertas longitudes de onda de luz y transmite las demás al ojo.

Aumento

Relación entre las dimensiones lineales aparentes de un objeto visto a través del microscopio (imagen virtual) y las dimensiones del objeto tal como aparecen sin el microscopio a una distancia de 250 mm. Esta relación se suele expresar en términos de aumentos, 4x o "veces"; por ejemplo, 100 aumentos, 100x o 100 veces. El microscopio compuesto tiene dos sistemas de lentes separados. El que se encuentra más próximo al objeto (el objetivo) aumenta la muestra en una proporción inicial determinada. El otro sistema de lentes, el ocular, aumenta de nuevo la imagen (imagen real) de modo que la imagen resultante percibida por el ojo (imagen virtual) tiene un aumento aproximadamente equivalente al producto del aumento de los dos sistemas. El aumento primario de los objetivos y el de los oculares está grabado en ambos sistemas. Para determinar el aumento exacto de los sistemas combinados deberá proyectarse la imagen de un micrómetro de platina en una pantalla o cristal esmerilado situado a 250 mm por encima del punto de visualización y medirse el aumento directamente con una escala de precisión. El objetivo de los microscopios más precisos no es simplemente aumentar (véase "Aumento Vacío") ya que la imagen aumentada o ampliada no resulta útil si no se pueden apreciar más detalles (resolución).

Capacidad de aumento (expresada en "veces" o "X" o "aumentos")

Medida de la capacidad de una lente o combinación de éstas para que un objeto aparezca más grande. Se refiere al número de veces que la imagen visualizada a través del instrumento es más grande que la apariencia del objeto a ojo desnudo.

Menisco

Lente con forma de media luna: cóncava en una superficie, convexa en la otra. Puede ser convergente o divergente (Véase el esquema de las lentes).

Micrómetro de disco

Disco reglado transparente situado en el ocular de un microscopio que permite mediciones de precisión en el objeto estudiado.

Microscopio

Instrumento óptico de alta precisión que utiliza la luz para estudiar los detalles más pequeños de los objetos. Puede tener gran capacidad de aumento y se utiliza para visualizar detalles minúsculos.

Microscopio de campo claro: es el tipo de microscopio más utilizado en el trabajo de laboratorio. Para trabajar con él se suelen utilizar portaobjetos coloreados.

Microscopio de campo oscuro: visualiza la muestra luminosa sobre un fondo con muy poca luz o sin luz. Se utiliza en objetos que muestran muy poco contraste en un microscopio de campo claro.

Microscopio metalúrgico: diseñado para el reconocimiento visual, con aumento, de objetos opacos,

muestras de metal pulido y materiales similares.

Microscopio de contraste de fase: se utiliza para visualizar muestras vivas u otras muestras con bajo contraste que normalmente no serían visibles en el microscopio de campo claro. Este microscopio aplica los principios de la difracción, la refracción y la difusión. La interferencia también es un factor para mostrar las diferencias más leves en el alcance óptico.

Microscopio de polarización: utiliza luz polarizada para mostrar los cambios en la estructura interna y en la composición de un material que no serían visibles con luz ordinaria. Véase luz polarizada.

Microscopio estereoscópico o lupa: se utiliza para obtener una imagen en tres dimensiones de una muestra grande. Tiene una capacidad de aumento limitada (hasta aproximadamente 200x).

Luz monocromática

Luz de un color (longitud de onda).

Monocromador

Tipo de espectrómetro que emite luz con una única longitud de onda.

Apertura numérica (A.N.)

Indicación, normalmente grabada en los objetivos y en las lentes condensadoras, que 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, tanto 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.

Objetivo

Sistema de lentes situado directamente encima del objeto o muestra. Es el subconjunto más preciso del microscopio puesto que su función es aumentar la muestra con toda fidelidad y resolver sus detalles. Las aberraciones de esta lente deberían estar corregidas al máximo, ya que cualquier defecto óptico presente se acentúa cuando la imagen es aumentada por el ocular. Todos los objetivos que se suministran con los microscopios Leica son objetivos parfocales, parcentrados y corregidos a infinito para un óptimo rendimiento óptico y mecánico. Un código de colores facilita su identificación.

Distancia del objeto

Distancia entre el centro óptico de la lente hasta el punto en que se encuentra el objeto que hay que visualizar. Para el esquema véase foco.

Eje óptico de una lente

Línea que une los centros de curvatura de las dos caras esféricas de las lentes.

Centro óptico

Punto de la lente que no provoca desviación angular de los rayos de luz que lo cruzan.

Elemento óptico

Lente unitaria, prisma, espejo u otra parte óptica de un sistema óptico. Suele estar compuesto por una pieza única de material.

Vidrio de alta calidad diseñado especialmente para su uso en instrumentos científicos. Las lentes de los microscopios y los prismas de calidad se fabrican con un tipo de cristal con un índice de refracción y unos valores de dispersión específicos.

Filtros ópticos

Cualquier filtro de vidrio, o gelatina laminada, coloreado o neutro, utilizado para modificar la fuente de luz. La luz de una bombilla con filamento de tungsteno es amarilla y se suele hacer más blanca mediante la inserción de un filtro azul que absorbe el exceso de rojo. El uso selectivo de filtros complementarios puede contribuir en gran medida a reforzar los detalles coloreados de la muestra.

Anillo de fase

Aro transparente sobre un fondo opaco que se coloca en la lente condensadora del microscopio para limitar la iluminación a un haz cónico hueco, es el tipo de iluminación que se utiliza en la técnica de contraste de fase.

Contraste de fase

Método especial de iluminación para la observación de objetos finos transparentes cuyos detalles estructurales varían muy ligeramente en cuanto a grosor y a índice de refracción y que, por tanto, no son visibles en el microscopio de campo claro. Este método supone la interferencia de una porción de la luz con el resto, de manera que se produzca una imagen visible.

Fotomicrografía

Grabación fotográfica de imágenes visualizadas en el microscopio.

Planacromático

Indica que el objetivo, además de estar corregido cromáticamente, ha sido diseñado para tener un campo visual plano en todo el área visible.

Plano

Con características planas; una superficie de lente del tipo plano no tiene curva alguna. Una lente planoconvexa tiene una superficie plana y la otra curvada hacia el interior. Para el esquema, véase lente.

Luz Polarizada

Aquella luz que vibra en un sólo plano. La luz que se emite normalmente es una mezcla de ondas luminosas que vibran en todas las direcciones. Esta luz se puede polarizar por reflexión, doble refracción, absorción selectiva o difusión. La polarización permite distinguir los cambios en la estructura y en la composición del material que no son discernibles con luz ordinaria. El cambio de aspecto que sufre la muestra al ser visualizada con luz polarizada sirve como identificación.

Foco principal (punto focal)

Punto donde se enfoca un haz de rayos luminosos paralelos al eje óptico de una lente o un espejo esférico.

Prisma

Cuerpo transparente (fabricado con vidrio óptico, fluorita o cuarzo, etc.)

Distancia de proyección

Distancia desde la lente de proyección a la pantalla donde la imagen está enfocada.

Imagen real (imagen aérea)

Imagen formada en el espacio por un sistema de lentes. Su presencia sólo se puede visualizar mediante la inserción de una pantalla receptora, una superficie plana de vidrio esmerilado o una pantalla de proyección.

Reflexión

Retorno de la luz desde una superficie óptica al medio del que provenía.

Refracción

Desviación y cambio de velocidad que sufre un rayo luminoso al pasar de un medio transparente a otro de diferente densidad.

Índice de refracción

Relación entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción cuando un rayo luminoso pasa del aire a un medio transparente.

Apertura relativa

Relación del diámetro de un espejo o lente esférica con su distancia focal. Si la superficie de una lente contiene una fracción relativamente importante de la superficie esférica total de la que forma parte dicha lente, se considera que la superficie de la lente será de amplia apertura. Si incluye una porción relativamente pequeña, la apertura es pequeña.

Capacidad de separación (resolución)

Capacidad de un microscopio para mostrar detalles muy finos. Se enuncia como la distancia mínima de separación entre dos líneas o puntos que permite distinguirlos como tales, en lugar de como un único objeto borroso. La capacidad de separación es una función de la longitud de onda utilizada y del mayor cono de luz que puede penetrar en el objetivo (apertura numérica). La apertura numérica está marcada en los objetivos y se puede usar para calcular el límite de resolución mediante la aplicación de una fórmula.

Resolución cromática

Capacidad de un instrumento espectrográfico de distinguir longitudes de onda ligeramente diferentes.

Microscopio electrónico de barrido

El Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) permite obtener imágenes tridimensionales de la topografía de la superficie de una muestra barriendo sobre ella un fino haz electrónico sincronizado con el haz que forma la imagen en la pantalla o monitor. La obtención de imágenes tridimensionales de los objetos resulta posible porque el SEM no registra los electrones que pasan a través de la muestra sino los electrones secundarios liberados desde la muestra por el haz de electrones que choca contra ella. La profundidad de campo del MEE es de 500 veces la de un microscopio óptico.

Espectro

Distribución ordenada de energía radiante derivada de la vibración atómica o molecular y ordenada por longitudes de onda expresadas en nanómetros (nm) o Angstrom (Å). Las partes más utilizadas de todo el espectro son la ultravioleta (1850 a 4000 Å), la visible (4000 a 7000 Å) y la infrarroja (8000 a 35000 Å).

Aberración esférica

Defecto óptico por el que la lente no llega a formar una imagen nítida debido a las características de las superficies curvas que la forman y en las que se produce la refracción de los rayos. Los rayos luminosos que cruzan una lente cerca de sus extremos convergen en un punto más cercano a la lente que los rayos que cruzan por el centro. La aberración esférica puede reducirse con una adecuada elección de los radios de curvatura de las superficies de las lentes o cerrando la lente (insertando un diafragma en el haz de manera que se exponga solamente su parte central). la imagen tridimensional. El estereomicroscopio utiliza la visión binocular.

Ultravioleta

Corresponde a una parte del espectro en la que las longitudes de onda son demasiado cortas para

ser percibidas por el ojo humano. La luz ultravioleta se usa en microfotografía con óptica especial (habitualmente cuarzo). La utilización de estas longitudes de onda corta para fotografía permite obtener una resolución dos o tres veces mayor que lo normal. Véase el diagrama del espectro.

Obturador (apertura de lente)

Diafragma en el alcance de un haz de luz insertado de manera que se exponga únicamente la parte central de una lente.

Unidades de medida

1 metro (m) = 1000 mm

1 milímetro (mm) = 0,001 m

1 micra (μ) = 0,001 mm

1 nanómetro (nm) = 0,01 μ = 0,000001 mm

1 Angstrom (A) = 0,1 nm = 0,0000001 mm

Visión estereoscópica

Aplicación concreta de la visión binocular que permite al observador visualizar un objeto para obtener la impresión de un objeto tridimensional. Si se fotografían dos perspectivas distintas de un objeto desde dos puntos distintos de cámara, se puede reconstruir Tamaño y posición aparente de la muestra. Esta imagen no es una imagen real, es la que se visualiza con el microscopio, se visualiza como si estuviera a la distancia de lectura. Se ha establecido que esta distancia es de unos 250 mm.

Longitud de onda

La luz viaja en ondas que varían en cuanto a su longitud. La medición se realiza entre los extremos superiores de dos ondas consecutivas en micras (μ) o Angstroms (A). La medición se expresa a veces con el símbolo griego m que equivale al símbolo de la micra μ . Los nanómetros equivalen 10^{-9} m. Véase unidades de medida.

Distancia útil

Distancia entre el frontal del objetivo y la parte superior del vidrio cubreobjetos cuando el microscopio enfoca una preparación muy delgada.. A mayor aumento inicial del objetivo menor distancia útil. Puesto que todos los objetivos están diseñados para su uso con un vidrio cubreobjetos de 0,17 mm de grosor, habrá que adoptar la costumbre de trabajar con el grosor adecuado para cubrir todas las preparaciones. Hay que reconocer que si el grosor es demasiado fino, no se podrán enfocar todos los detalles de una preparación con el objetivo de baño de aceite debido a la corta distancia útil de dichos objetivos.

Objetivos

Analizar las etapas del ciclo celular y sus relaciones.

Comprender los principales acontecimientos que caracterizan las fases del Ciclo Celular de células eucarióticas.

Visualizar la Mitosis como mecanismo de crecimiento y reproducción asexual.

Analizar las principales características de la mitosis (M) y las diferentes etapas de la fase M del ciclo proliferativo.

Determinar el tiempo que las células pasan en cada fase del ciclo celular.

Identificar las fases de la mitosis.

Conceptos básicos

El ciclo celular comprende todas las etapas que experimentan las células durante su proceso vital, es decir, proliferación, (eventualmente reposo proliferativo), diferenciación, envejecimiento y muerte celular. Todas estas etapas están finamente reguladas. Durante el ciclo proliferativo (en ocasiones se usa como sinónimo de ciclo celular) la célula replica su ADN y se divide, con lapsos de tiempo entre estas dos etapas, de tal manera que este proceso se puede dividir en 4 fases: Fase S (síntesis de ADN), G₁ (lapso entre la división celular y la fase S), G₂ (lapso entre la fase S y la división siguiente) y M (mitosis y citocinesis) (Figuras 1a, b).

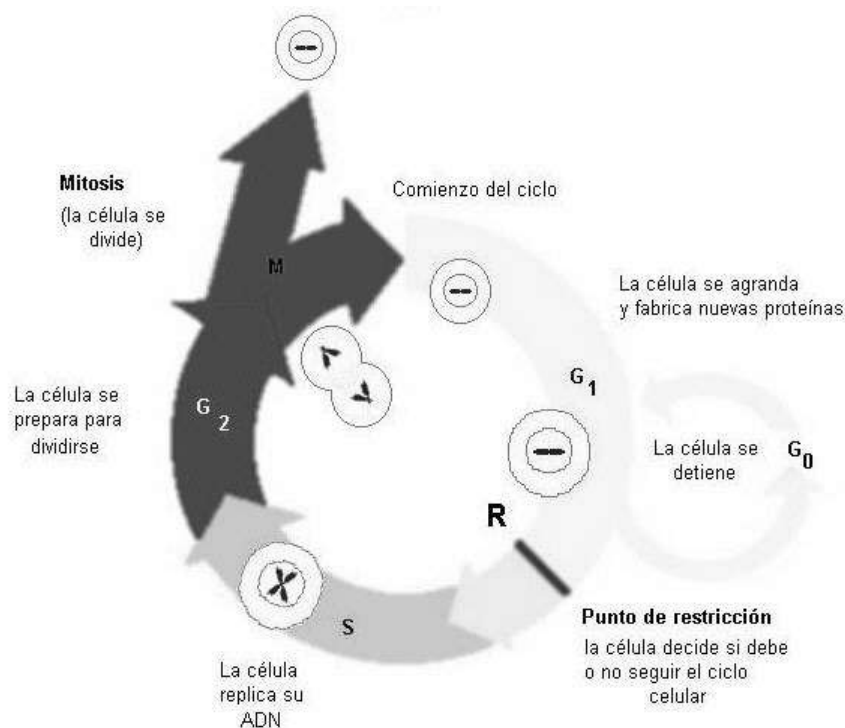


Figura 1a. Esquema del ciclo proliferativo. Imagen tomada de <http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/ciclo.htm>

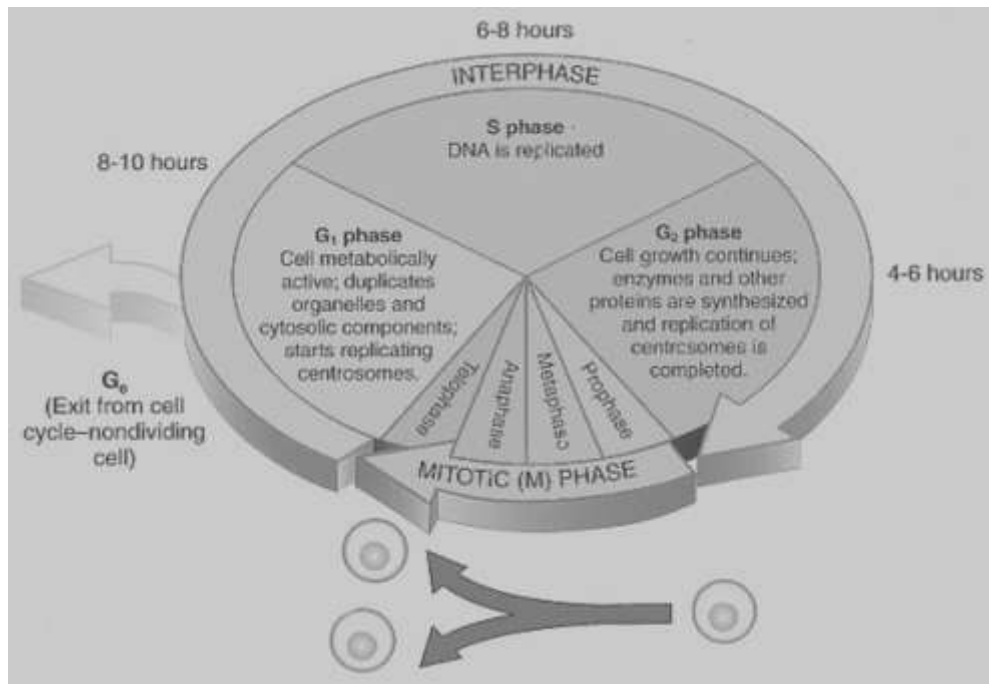


Figura 1b. Esquemas detallado de cada una de las fases del ciclo proliferativo. Imagen tomada de <http://retomemoslaciencia.jimdo.com/ciencias-naturales-biolog%C3%ADa/sexta/divisi%C3%B3n-celular/>

En ocasiones y dependiendo del tipo celular y las condiciones del entorno, una célula puede salir del ciclo proliferativo, sin necesariamente seguir el camino de la diferenciación. Este período se denomina G₀ y se dice que la célula está en reposo proliferativo. La salida del ciclo proliferativo ocurre normalmente en G₁. En el control del ciclo proliferativo participan un conjunto de proteínas quinasas que son reguladas a su vez por otras proteínas denominadas ciclinas. Luego que el ADN se replica, se activan mecanismos de revisión del material genético que detectan y reparan posibles fallas en el ADN, para proceder a la división celular. Otros puntos de control importantes (*check points*) están en G₁ y la mitosis. La entrada en mitosis está regulada por un complejo proteico denominado MPF (factor promotor de la mitosis). Este complejo consiste en una proteína denominada ciclina B y una enzima quinasa denominada cdk2 y está regulado por fosforilaciones y desfosforilaciones, de manera tal que se activa dando inicio la mitosis y se inactiva (por degradación de la ciclina) al término de ésta. Un complejo similar regula la entrada en fase S y el proceso en su conjunto está controlado por señales extracelulares denominadas, en general, factores de crecimiento.

La duración de la división celular o mitosis varía en los distintos organismos, como así también la duración del ciclo celular, que incluso varía en los distintos tipos celulares dentro de un mismo organismo, podemos tomar como modelo de ciclo celular el siguiente:

La mitosis cuenta de cuatro fases y da como resultado dos células hijas idénticas a la célula madre (Figura 2).

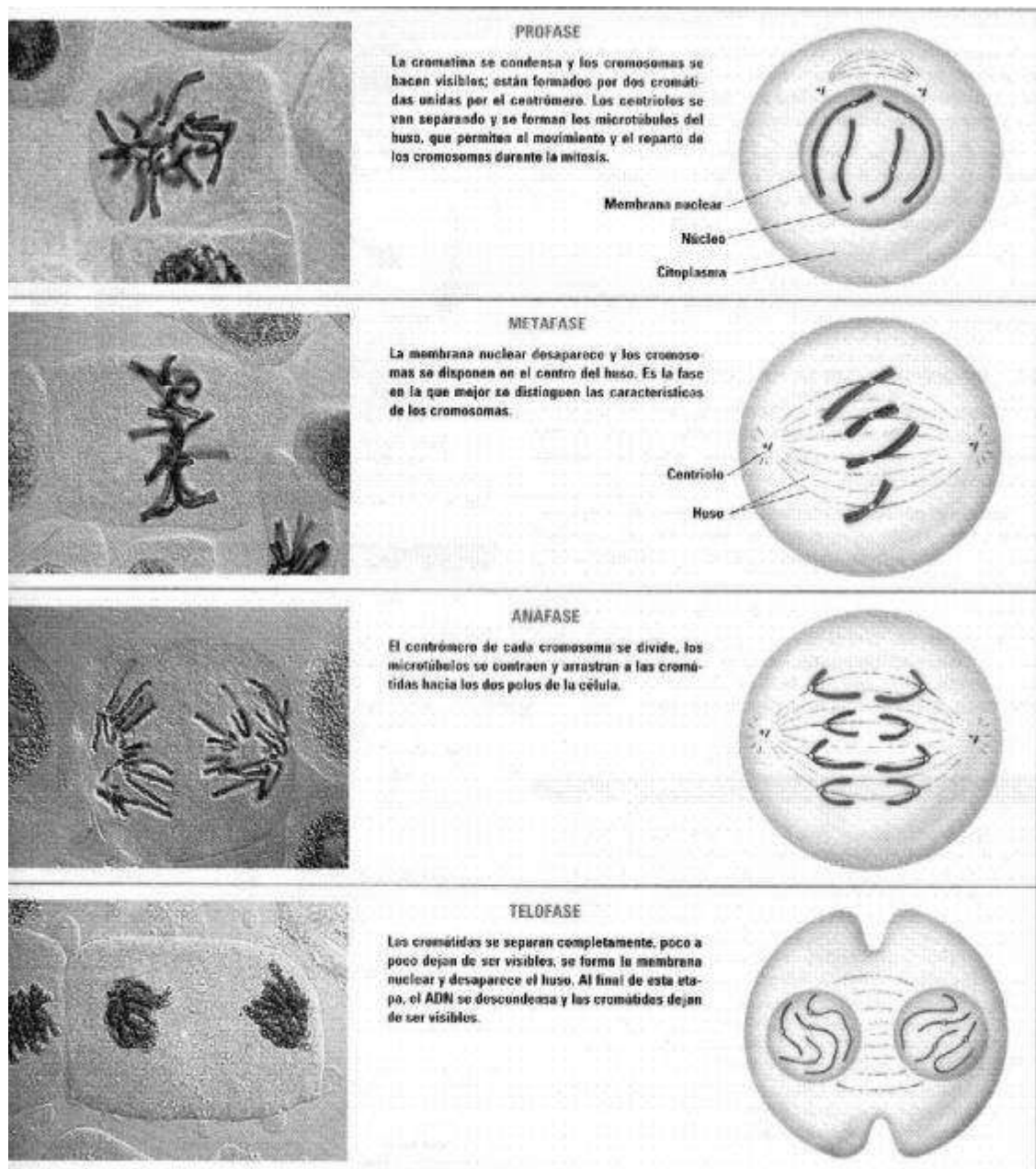


Figura 2. Esquema de las fases de la mitosis. Imagen tomada de <http://fundacionannavazquez.wordpress.com/2007/12/13/la-mitosis/>

La meiosis varía según se trate de la ovogénesis que en muchos dura años, o de la espermatogénesis que dura entre 70 a 74 días, y origina células hijas con la mitad de la carga modal que la célula madre (Figura 3).

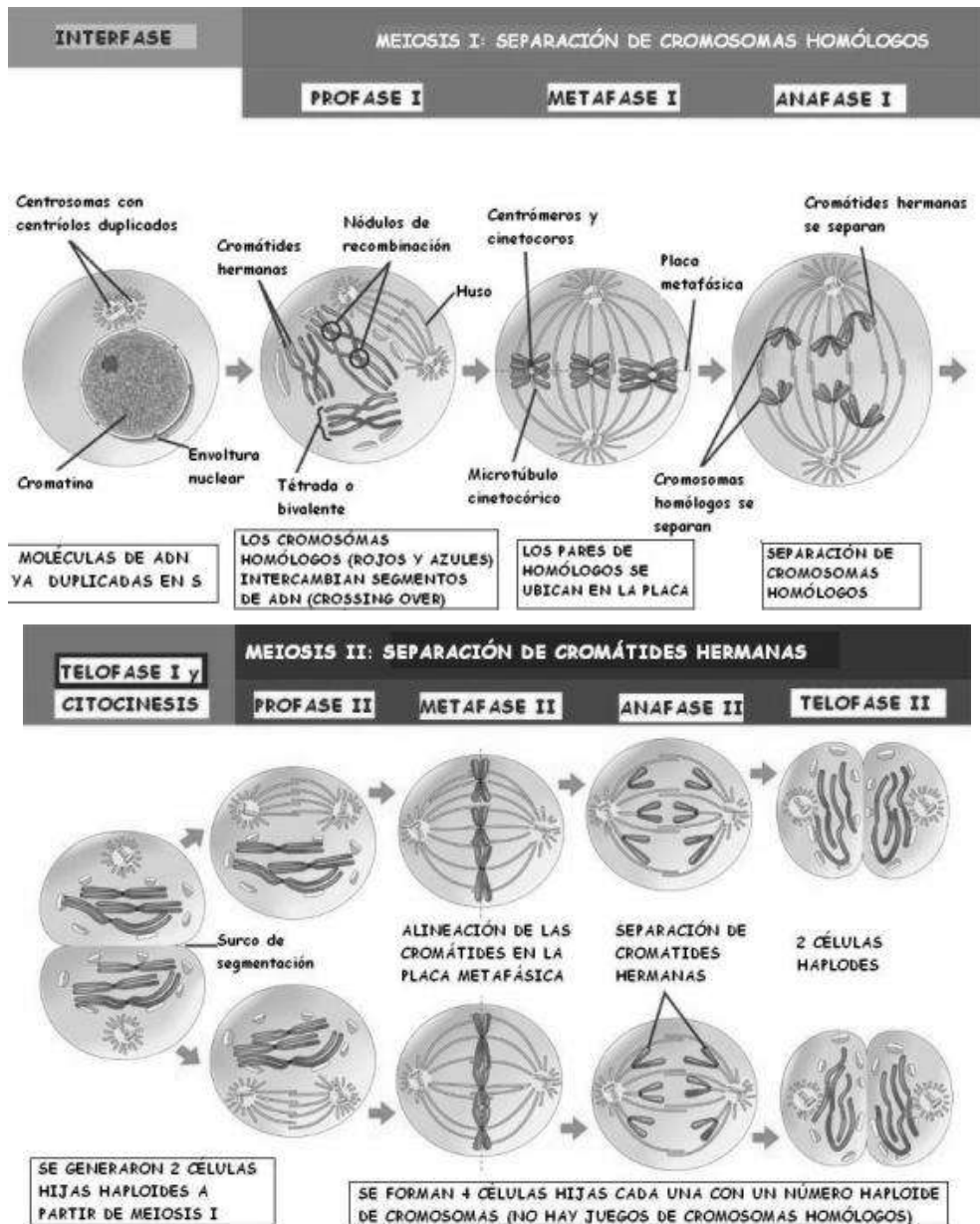


Figura 3. Dibujo esquemático de las fases de la meiosis. Imagen tomada de <http://my.opera.com/tutoriabiologiaUBAXXI/blog/t>

Trabajo Práctico N° 3

Materiales

| | |
|-----------------------------|------------------------------------|
| Microscopio | Pinzas de madera |
| Meristema apical de cebolla | Vasos de precipitación de 10 ml. |
| Alcohol etílico | Papel de filtro |
| Ácido acético glacial | Mechero, trípode, rejilla metálica |
| Colorante carmín acético | Pinzas y tijeras |
| Portaobjetos y cubreobjetos | |

Actividades

1. Realización de preparaciones cromosómicas a partir de células meristemáticas de ápices radiculares de *Allium cepa*.

Protocolo para la confección de preparaciones cromosómicas por la técnica de aplastado

Los ápices de las raíces se obtienen sumergiendo los bulbos de cebolla en agua, de modo que ésta cubra la zona de donde emergerán las nuevas raicillas. Al cabo de tres días las raíces comienzan a crecer, cuando alcanzan una longitud aproximada de 1 cm pueden ser cortadas.

- Corte el ápice de las raicillas y colóquelas en un vaso de precipitación con fijador de Carnoy (3 partes de alcohol, 1 parte de ácido acético), cuidando que estén totalmente sumergidas.
- Colocar las raíces en una cápsula de Petri con agua destilada por 5 minutos para eliminar el fijador (tres cambios de agua destilada, 5 minutos cada uno).
- Eliminar el agua destilada y añadir HCl 5N durante 15 minutos.
- Lavar las raíces para eliminar el HCl 5N, utilizando 3 cambios de agua destilada de 5 minutos cada uno.
- Añadir una gota de ácido acético 45% en un portaobjeto, luego colocar la raíz, cortar con una hojilla y conservar los 2 mm terminales del lado del meristema y eliminar el resto de la raíz

Importante: no dejar que el material se seque en el portaobjetos

- Colocar una gota de colorante sobre el material disgregado, esperar 1 a 3 minutos, cuidando en todo momento que el material no se seque y monitoreando bajo la lupa el avance del proceso de tinción.
- Cubrir la preparación con un cubreobjetos teniendo cuidado que no entre aire y espere un minuto.
- Colocar la preparación entre hojas de papel de filtro y presionar con la yema del dedo pulgar firmemente contra la superficie plana y uniforme de una mesa.
- Observe al microscopio con objetivo de 40X e identifique las fases del ciclo celular en su preparado comparándolas con las de la figura 4.

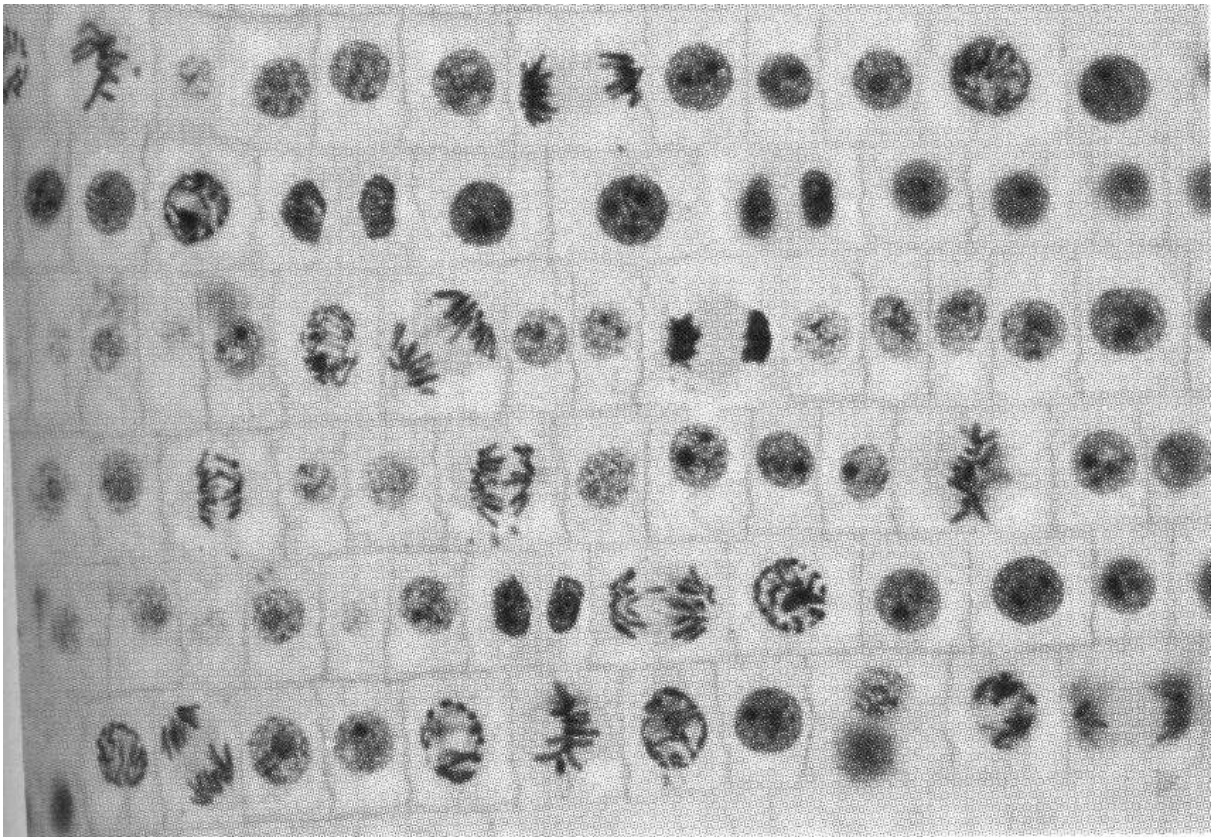
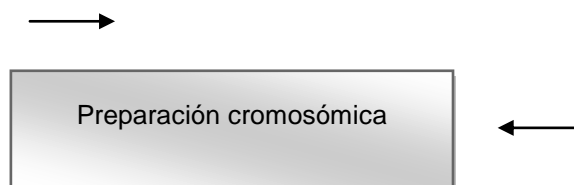


Figura 4: Microfotografía de células vegetales en que se distinguen distintas etapas de la mitosis.

2. Determinación del tiempo que las células pasan en las distintas etapas del ciclo celular: interfase y división celular.

a. Coloque el preparado obtenido en la actividad 1 en el microscopio óptico y con objetivo de 40X recorra el preparado y cuente el número de células que se encuentran en interfase y en cada una de las fases de la mitosis. El número total de células contadas debe ser el máximo posible (no menos de 30) para que la muestra sea representativa.

Nota: Cuando recorra el preparado para contar las células evite realizarlo en campos ya recorridos. Una forma de hacerlo es comenzar en el extremo superior izquierdo y desplazarse hacia la derecha, cuando llegue al otro extremo del preparado bajar y hacer el recorrido en sentido inverso.



b. Determine el tiempo que las células pasan en interfase y en cada fase de la mitosis usando la siguiente fórmula:

$$T_f = \frac{N_{fase} \times 720 \text{ min}}{N_{total}}$$

Donde: T_f es el tiempo requerido para la fase, N_{fase} es N° total de células en la fase, N_{total} es el N° total de células contadas y 720 minutos es el tiempo de duración del ciclo celular en células de cebolla.

c. Calcule los porcentajes en cada fase teniendo en cuenta que el número total de células contadas por Ud. representa 100 %.

d. Ubique los datos en el cuadro siguiente:

| Interfase y Mitosis | Número de células | Porcentaje de células en cada fase |
|---------------------------|-------------------|------------------------------------|
| Interfase | | % |
| Profase | | % |
| Metafase | | % |
| Anafase | | % |
| Telofase | | % |
| N° células totales | | 100 % |

d. Realice un gráfico que exprese la variación del contenido de ADN nuclear y las etapas del ciclo proliferativo.

3. Responda el siguiente cuestionario guía:

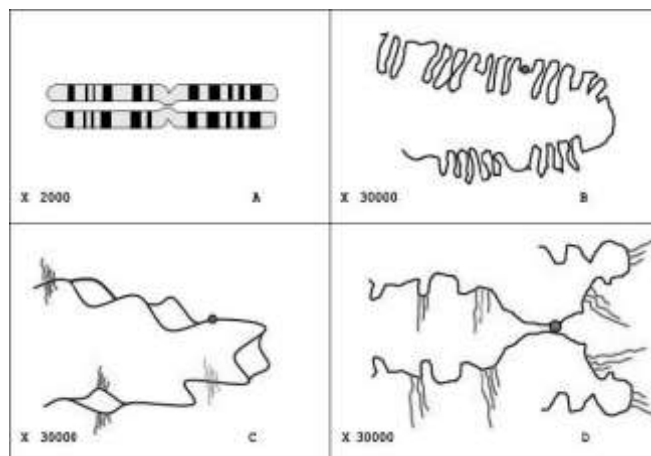
a. En la siguiente figura se representan algunos aspectos del cromosoma durante el ciclo celular, ¿cuál corresponde al periodo S de la interfase?

1) La a

2) la b

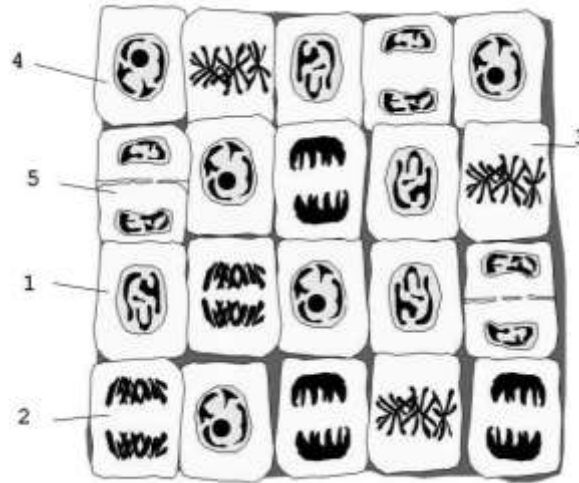
3) la c

4) la d



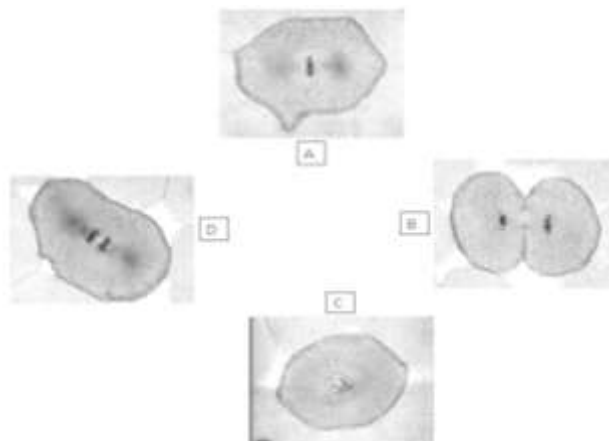
b. En la siguiente figura se representa un esquema de un fragmento del meristema apical de la raíz de cebolla visto al microscopio óptico ¿cuál de las células está en la interfase de la mitosis?

- 1) la 1
- 2) la 2
- 3) la 3
- 4) la 4



c. En la siguiente figura se representan varias fotografías de una célula animal en varias fases del ciclo celular ¿cuál de las células está en anafase de la mitosis?

- 1) A
- 2) B
- 3) C
- 4) D



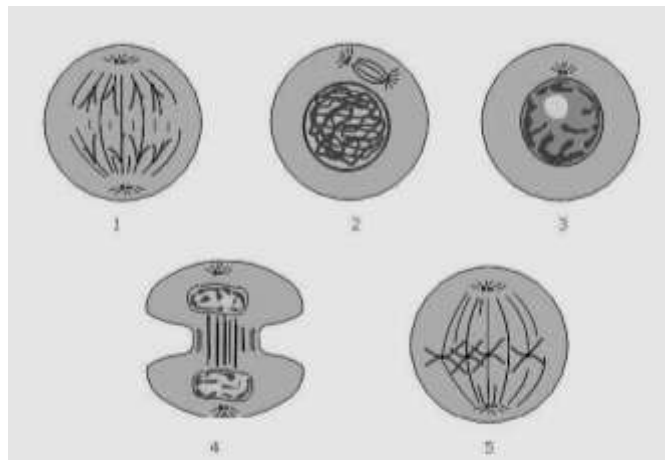
d. En relación con el ciclo celular, el orden correcto de las células de la siguiente imagen es:

1) 4, 3, 1, 5 y 2;

2) 3, 4, 2, 5 y 1;

3) 3, 2, 5, 4 y 1;

4) 3, 2, 5, 1 y 4.



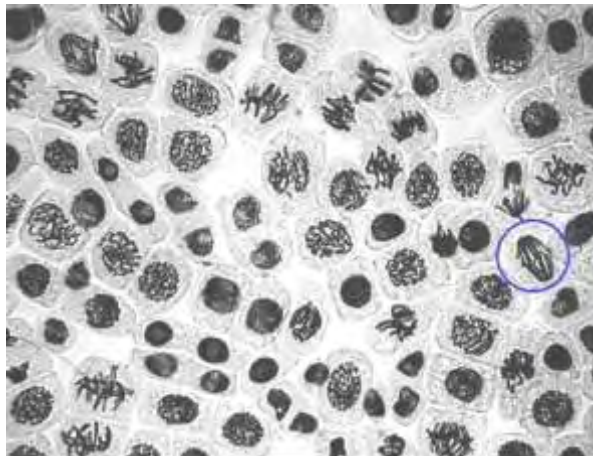
e. ¿En cuál de las fases de la mitosis está la célula encerrada en un círculo azul en la siguiente figura?

1) profase;

2) metafase;

3) anafase;

4) telofase.



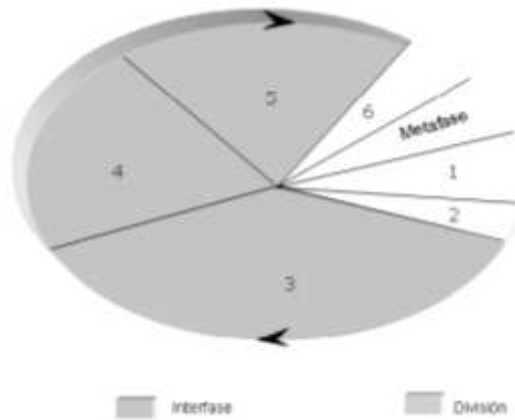
f. Basándote en lo que se observa en la siguiente figura, indica a qué fase del ciclo celular corresponde la numerada con el número 4.

1) a la fase G₂ de la interfase;

2) a la anafase de la mitosis;

3) al periodo S de la interfase;

4) a la telofase.



g. Basándote en lo que se observa en la figura anterior, indica cuántos cromosomas y con cuántas cromátidas tendrá una célula $2n=6$ durante la fase o período que lleva el número 3.

- 1) 6 cromosomas con una cromátida cada uno;
- 2) 6 cromosomas con dos cromátidas;
- 3) 12 cromosomas con una cromátida cada uno;
- 4) 12 cromosomas con dos cromátida cada uno.

Bibliografía

- Becker, W. N., Kleinsmith, L. J. y Hardin, J. El mundo de la célula Edición: 6º. 2007.
- Alberts, B., Johnson A., Lewis, J., Raff, M., Keiths, R. y Walter P. 4ta. Edición. 2002. Molecular Biology of the Cell. Garland Science, Taylor and Francis Group, New York. USA.
- Cooper, G. M. The Cell, A Molecular Approach. 2nd edition. Boston University. 2000.
- Karp, G. Biología Celular y Molecular. 6ta Edición, pp. 850, 2011.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, SL., Matsudaira, P., Baltimore, D. y Darnell, J. Biología Celular y Molecular. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. Argentina. 4ta Edición. 2002.
- Hall, B. K., University, D., Hallgrímsson, B. Strickberger's Evolution. 4th Edition. University of Calgary, pp.762, 2008.
- Mahabal Ram. Fundamentals of Cytogenetics and Genetics. PHI Learning Pvt. Ltd., pp. 653, 2010.

PARTE A: MITOSIS

Objetivos

Observación e identificación de los estadíos mitóticos en diferentes materiales.

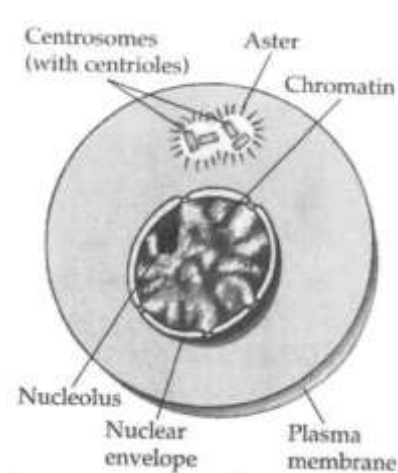
Observación e identificación de las fases de la mitosis en vegetales.

Determinación de Índice Mitótico e Índice de Fases.

Comparación de los mismos entre diversas especies.

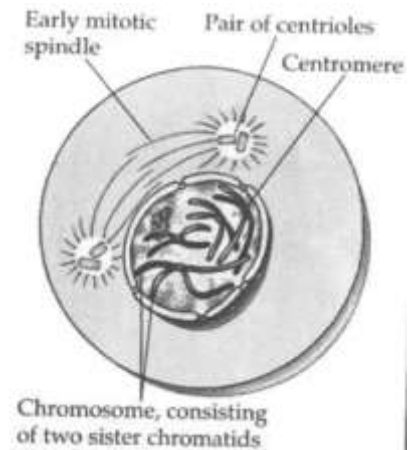
Conceptos básicos

La división celular es un fenómeno complejo por el cual el material celular se distribuye en partes iguales entre las dos células hijas. Los componentes fundamentales de las células, particularmente los cromosomas, se duplican antes que la célula se divida por medio de la mitosis. Las etapas de la mitosis son las fases de un ciclo que comienza al finalizar el período interfásico y que finaliza al comenzar una nueva interfase. Las principales fases de la mitosis son:

| | |
|---|--|
| <p>Interfase</p> <p>La célula está ocupada en la actividad metabólica preparándose para la mitosis (las próximas cuatro fases que conducen a la división nuclear). Los cromosomas no se distinguen claramente en el núcleo, aunque una mancha oscura llamada nucleolo, puede ser visible. La célula puede contener un par de centríolos responsables de la organización de los microtubulos.</p> |  <p>Centrosomes (with centrioles) Aster Chromatin Nucleolus Nuclear envelope Plasma membrane</p> |
|---|--|

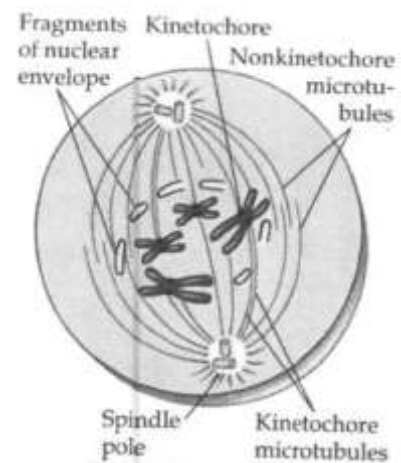
Profase

Los cromosomas se visualizan como largos filamentos dobles, que se van acortando y engrosando, cada uno formado por un par de cromátidas unidas sólo a nivel del centrómero. Los cromosomas pasan de la forma laxa de trabajo a la forma compacta de transporte. La envoltura nuclear se fracciona en una serie de cisternas que ya no se distinguen del RE, por lo que se vuelve invisible al microscopio óptico. Los nucleolos desaparecen y se dispersan en el citoplasma en forma de ribosomas. Los centriolos comienzan a moverse a polos opuestos de la célula y las fibras se extienden desde los centrómeros. Algunas fibras cruzan la célula para formar el huso mitótico.



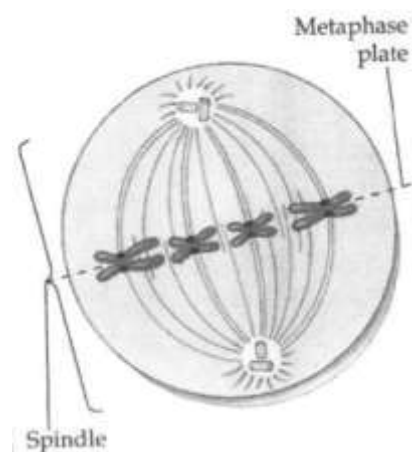
Prometáfase

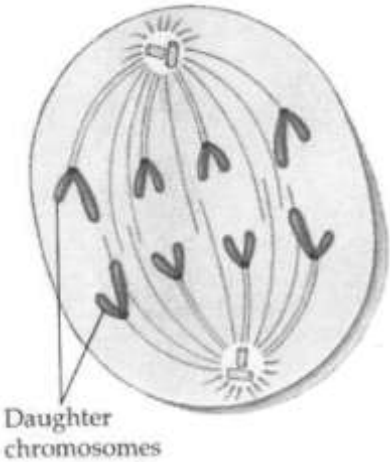
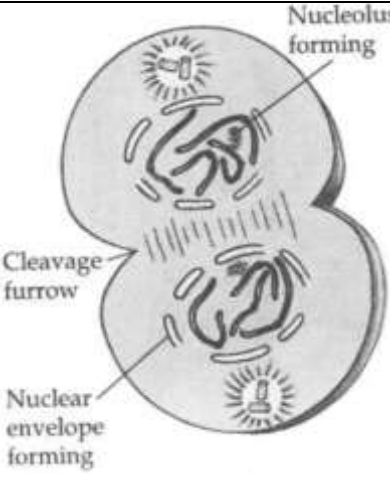
La membrana nuclear se disuelve, marcando el comienzo de la prometáfase. Las proteínas se adhieren a los centrómeros creando los cinetocoros. Los microtubulos se adhieren a los cinetocoros y los cromosomas comienzan a moverse.



Metafase

Aparece el huso mitótico o acromático, formado por haces de microtúbulos; los cromosomas se unen a algunos microtúbulos a través de la porción proteica del centrómero (cinetocoro). También hay microtúbulos polares, más largos, que se solapan en la región ecuatorial de la célula. Los cromosomas muestran el máximo acortamiento y condensación, y son desplazados por los microtúbulos hasta que todos los centrómeros quedan en el plano ecuatorial. Al final de la metafase se produce la autoduplicación del ADN del centrómero, y en consecuencia su división.



| | |
|---|---|
| <p>Anafase</p> <p>Se separan los centrómeros hijos, y las cromátidas, que ahora se convierten en cromosomas hijos. Cada juego de cromosomas hijos migra hacia un polo de la célula. El huso mitótico es la estructura que lleva a cabo la distribución de los cromosomas hijos en los dos núcleos hijos. El movimiento se realiza gracias a la actividad de los microtúbulos que se van acortando en el extremo unido al cinetocoro. Los microtúbulos polares se deslizan en sentido contrario, distanciando los dos grupos de cromosomas hijos.</p> |  |
| <p>Telofase</p> <p>Comienza cuando los cromosomas hijos llegan a los polos de la célula. Los cromosomas hijos se alargan, pierden condensación, ya no son visibles bajo el microscopio óptico, las fibras del huso se dispersan, la envoltura nuclear se forma nuevamente a partir del RE rugoso y se forma el nucléolo a partir de la región organizadora del nucléolo de los cromosomas SAT.</p> |  |
| <p>Citocinesis: es la división del citoplasma de la célula "madre" para generar las dos células "hijas". En células animales, la citocinesis ocurre cuando un anillo fibroso compuesto de una proteína llamada actina, se contrae alrededor del centro de la célula estrangulando el citoplasma para dividir la célula original en dos células hijas, cada una con su núcleo.</p> <p>En células vegetales, la existencia de la pared celular impide que la célula se estrangule por lo que se sintetiza un tabique llamado fragmoplasto entre las dos células hijas.</p> | |

Modificado de <http://www.etitudela.com/>

PARTE B: CARIOTIPO

Objetivos

Confección de cariotipos de distintas especies vegetales.

Calcular los índices de Asimetría de los diferentes cariotipos.

Aprendizaje del uso de *software* para la confección de cariotipos.

Conceptos básicos

Confección de cariotipos de distintas especies vegetales y animales (mamíferos)

La nomenclatura usada para la descripción de la morfología de los cromosomas es la propuesta por Levan et al. (1964). De acuerdo con ello, los cromosomas se asignan a cuatro categorías morfológicas diferentes según el índice centromérico:

$$(IC) = \text{longitud brazo corto} \times 100 / \text{longitud cromosómica total.}$$

| Categoría | IC |
|----------------------|-----------|
| metacéntrico (m) | 50,0-37,5 |
| submetacéntrico (sm) | 37,5-25,0 |
| subtelocéntrico (st) | 25,0-12,5 |
| telocéntrico (t) | 12,5-0 |

Cuando los valores se hallan muy en el límite se indican ambas categorías, separadas por un guión (ejemplo: m-sm).

Cálculo de la simetría - asimetría del cariotipo

El índice de asimetría intracromosómica (**A₁**) estima la asimetría del cariotipo en función de la relación entre la longitud de los brazos cromosómicos y se calcula según la ecuación:

$$A_1 = 1 - \frac{\sum b_j / B_j}{n}$$

Donde b_j y B_j son las longitudes promedio de los brazos corto y largo respectivamente para cada par de cromosomas homólogos, y n es el número de pares o grupos de cromosomas homólogos. A_1 varía entre 0 y 1; su valor disminuye cuando los cromosomas tienden a ser metacéntricos. Además es independiente del número y tamaño cromosómicos.

El índice de asimetría intercromosómica (**A₂**) es un estimador de la asimetría del cariotipo debida a la relación entre el tamaño de los diferentes cromosomas, y se calcula según la ecuación:

$$A_2 = S / x$$

Es decir, el cociente entre la desviación estándar y la media de la longitud cromosómica de cada muestra. A₂ adopta valores más grandes cuanto mayor es la variación en la longitud cromosómica entre los pares o grupos de homólogos, y también es independiente del número y tamaño cromosómicos. Por medio del uso de estos dos índices y su representación gráfica simultánea en dos coordenadas se puede realizar una comparación de variaciones numéricas de los diferentes cariotipos.

Trabajos Prácticos Nº 4 y 5

Materiales

Ápices de raíz de cebolla (*Allium cepa*), lechuga (*Lactuca sativa*).

Pellets de linfocitos sangre periférica humana

Actividades

1. Observación e identificación de las fases de la mitosis en preparaciones cromosómicas de células meristemáticas de cebolla (*Allium cepa*) y de linfocitos sangre periférica humana.

2. Se identificarán y dibujarán los distintos estadios de la mitosis, describiendo las características citológicas observables al microscopio óptico que les permite reconocer cada estadio.

Además, en cada uno de sus dibujos de los diferentes estadios de la mitosis indique:

- número de cromátidas en cada cromosoma y número de cromosomas
- ubicación de los centrómeros
- aumento del MO en que realizó la observación y coordenadas del MO para ubicar cada célula.

3. Cálculo del Índice mitótico y el Índice de fase.

$$I_m (\text{Índice mitótico}) = \frac{\text{Nro de células en división} \times 100}{\text{Nro total de células observadas}}$$

$$I_f (\text{Índice de fase}) = \frac{\text{Nro de células en determinada fase} \times 100}{\text{Nro total de células en mitosis}}$$

4. Comparación de los índices mitóticos e de fases entre las dos especies.

5. A partir de fotomicrografías de células en mitosis de células vegetales deben confeccionar los cariotipos correspondientes.

6. Calcular los índices de Asimetría A₁ y A₂

7. Utilización del Programa Micro Measure for Windows disponible en <http://www.biology.colostate.edu/MicroMeasure>.

Bibliografía

- Alberts, B., Johnson A., Lewis, J., Raff, M., Keiths, R. y Walter P. 4ta. Edición. 2002. Molecular Biology of the Cell. Garland Science, Taylor and Francis Group, New York. USA.
- Cooper, G. M. The Cell, A Molecular Approach. 2nd edition. Boston University. 2000.
- Karp, G. Biología Celular y Molecular. 6ta Edición, pp. 850, 2011.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, SL., Matsudaira, P., Baltimore, D. y Darnell, J. Biología Celular y Molecular. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. Argentina. 4ta Edición. 2002.
- Hall, B. K., University, D., Hallgrímsson, B. Strickberger's Evolution. 4th Edition. University of Calgary, pp.762, 2008.
- Becker, W. N., Kleinsmith, L. J. y Hardin, J. El mundo de la célula Edición: 6º. 2007.
- Macgregor, H. C. An introduction to animal cytogenetic. 1 edn, (Chapman & Hall, 1993).
- Sumner, A. T. Chromosomes: organization and function. 1ra. edn, (Blackwell Science Ltd, 2003).
- Sybenga, J. General Cytogenetics (North-Holland Publishing company, 1972).
- Mahabal Ram. Fundamentals of Cytogenetics and Genetics. PHI Learning Pvt. Ltd., pp. 653, 2010.
- Solari, A. J. Genética Humana. Fundamentos y aplicaciones en medicina. (Editorial Médica Panamericana, 2004).
- Poggio, Lidia; Naranjo, Carlos A. II.- Citogenética. En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal Capítulo 5, pp, 69-79.
- Levan, A, Fredga, K and Sandberg, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52: 201-220, 1964.
- Grabilele, M et al. 2009. Caracterización morfológica y cromosómica de *Commelina benghalensis* L. (Commelinaceae) de Argentina. Gayana Bot. 66, n.1, pp. 18-27.

MEIOSIS EN VEGETALES E INSECTOS CON CROMOSOMAS MONOCÉNTRICOS

Objetivos

Realización de preparaciones a partir de gónadas masculinas de langostas de campo y de anteras jóvenes de diversos vegetales.

Observación e interpretación mediante microscopía óptica de los diferentes estadios de la meiosis.

Conceptos básicos

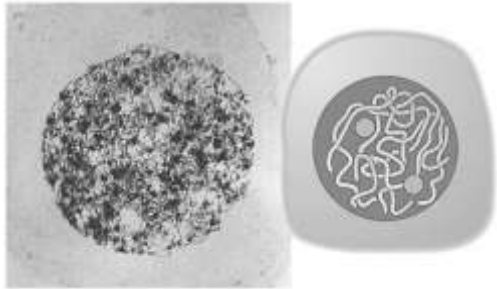
La meiosis tiene lugar en las células germinales de los organismos de reproducción sexual. Es un proceso universal muy similar en todas las especies y consistente en una única duplicación de los cromosomas, seguida de dos divisiones celulares de las cuales resultan células haploides.

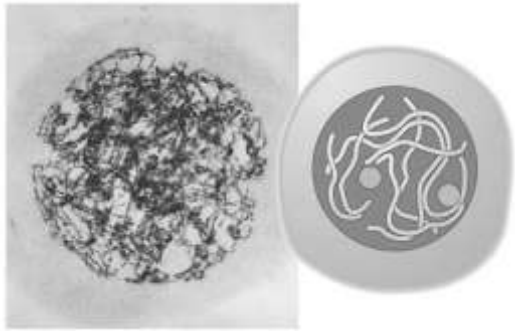
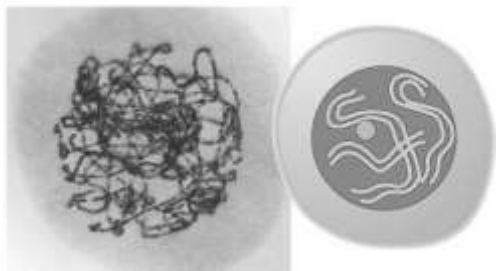


En la primera división meiótica existe una **profase** larga (profase I) durante la cual se aparean los cromosomas homólogos para intercambiar el material hereditario. Debido a su importancia y para facilitar su estudio, a la profase I se la divide en los siguientes estadios: **leptotene, cigotene, paquitene, diplotene y diacinesis**. La sinapsis o apareamiento cromosómico se inicia en zigotene y se completa en paquitene, en donde tiene lugar el entrecruzamiento o “crossing-over”. En diplotene los cromosomas homólogos comienzan a separarse y las regiones en donde ocurrió el entrecruzamiento son visibles debido a la existencia de los quiasmas. El número de quiasmas puede ser variable entre y dentro de los distintos bivalentes pero al menos existe uno por bivalente (Figura 1). Durante la **diacinesis** y la **metafase I** la contracción de los cromosomas es más acentuada, de modo que son éstas las fases más idóneas para el estudio de los cromosomas meióticos.


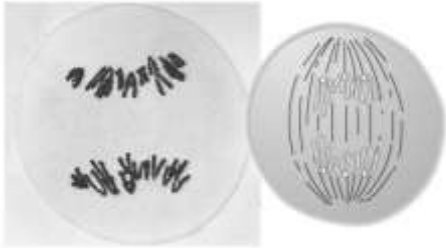
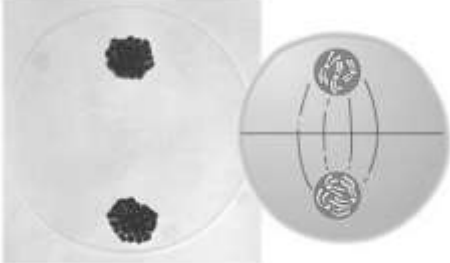
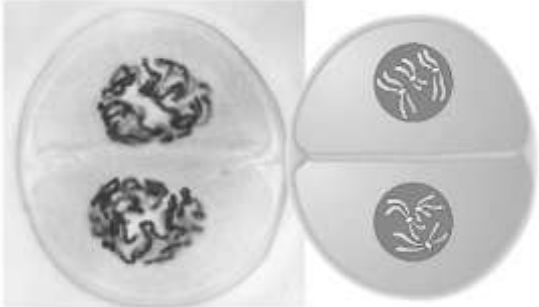
Durante **anafase I** se separan los cromosomas homólogos.

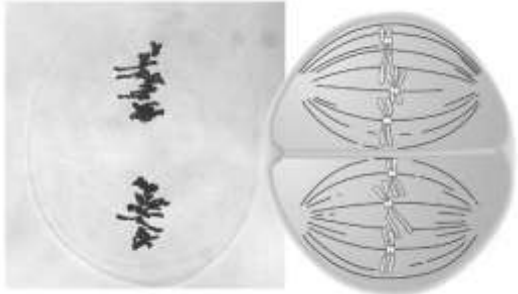
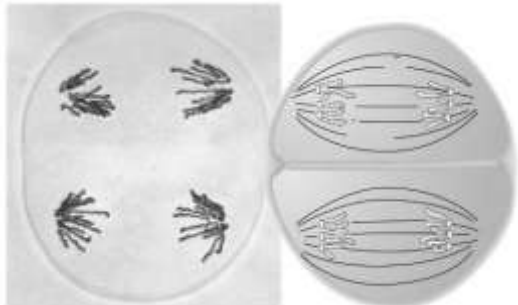
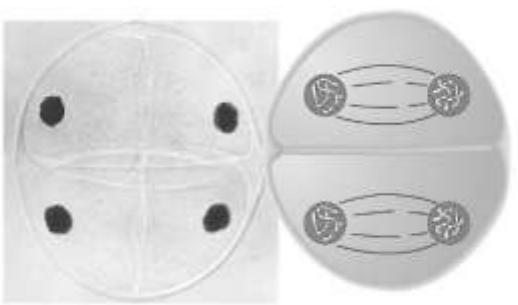
La **segunda división** meiótica es muy similar a una mitosis y es en ella cuando se separan las cromátidas hermanas, quedando los núcleos formados con el número haploide de cromosomas.

A manera de resumen, se presenta el siguiente cuadro integrador (Griffith, 2002):

| Meiosis I | |
|--|--|
| Profase I | |
| <p>Leptotene</p> <p>En esta fase, los cromosomas se hacen visibles, como hebras largas y finas. Otro aspecto de la fase leptoteno es el desarrollo de pequeñas áreas de engrosamiento a lo largo del cromosoma, llamadas cromómeros, que le dan la apariencia de un collar de perlas.</p> |  |

| | |
|--|--|
| <p>Cigotene</p> <p>Es un período de apareamiento activo en el que se hace evidente que la dotación cromosómica del meiocito corresponde a dos conjuntos completos de cromosomas. Así pues, cada cromosoma tiene su pareja, cada pareja se denomina par homólogo y los dos miembros de la misma se llaman cromosomas homólogos.</p> |  |
| <p>Paquitene</p> <p>Esta fase se caracteriza por la apariencia de los cromosomas como hebras gruesas indicativas de una sinapsis completa. Así pues, el número de unidades en el núcleo es igual al número n. A menudo, los nucleolos son muy importantes en esta fase. Los engrosamientos cromosómicos en forma de perlas están alineados de forma precisa en las parejas homólogas, formando en cada una de ellas un patrón distintivo.</p> |  |
| <p>Diplotene</p> <p>Ocurre la duplicación longitudinal de cada cromosoma homólogo, al ocurrir este apareamiento las cromátidas homólogas parecen repelerse y separarse ligeramente y pueden apreciarse unas estructuras llamadas quiasmas entre las cromátidas. Además la aparición de estos quiasmas nos hace visible el entrecruzamiento ocurrido en esta fase.</p> |  |
| <p>Diacinesis</p> <p>Esta etapa no se diferencia sensiblemente del diplotene, salvo por una mayor contracción cromosómica. Los cromosomas de la interfase, en forma de largos filamentos, se han convertido en unidades compactas mucho más manejables para los desplazamientos de la división meiótica.</p> |  |
| <p>Fin de la Profase I</p> | |

| | |
|---|--|
| <p>Metafase</p> <p>Al llegar a esta etapa la membrana nuclear y los nucleolos han desaparecido y cada pareja de cromosomas homólogos ocupa un lugar en el plano ecuatorial. En esta fase los centrómeros no se dividen; esta ausencia de división presenta una diferencia importante con la meiosis. Los dos centrómeros de una pareja de cromosomas homólogos se unen a las fibras del huso de polos opuestos.</p> |  |
| <p>Anafase I</p> <p>Como en la mitosis, la anafase comienza con los cromosomas moviéndose hacia los polos. Cada miembro de una pareja homóloga se dirige a un polo opuesto</p> |  |
| <p>Telofase I</p> <p>Esta telofase y la interfase que le sigue, llamada intercinesis, son aspectos variables de la meiosis I. En muchos organismos, estas etapas ni siquiera se producen; no se forma de nuevo la membrana nuclear y las células pasan directamente a la meiosis II. En otros organismos la telofase I y la intercinesis duran poco; los cromosomas se alargan y se hacen difusos, y se forma una nueva membrana nuclear. En todo caso, nunca se produce nueva síntesis de ADN y no cambia el estado genético de los cromosomas.</p> |  |
| Meiosis II | |
| <p>Profase II</p> <p>Esta fase se caracteriza por la presencia de cromosomas compactos en número haploide. Los centríolos se desplazan hacia los polos opuestos de las células.</p> |  |

| | |
|--|---|
| <p>Metafase II</p> <p>En esta fase, los cromosomas se disponen en el plano ecuatorial. Las cromátidas aparecen, con frecuencia, parcialmente separadas una de otra en lugar de permanecer perfectamente adosadas, como en la mitosis.</p> |  |
| <p>Anafase II</p> <p>Los centrómeros se separan y las cromátidas son arrastradas por las fibras del huso acromático hacia los polos opuestos.</p> |  |
| <p>Telofase II</p> <p>En los polos, se forman de nuevo los núcleos alrededor de los cromosomas.</p> |  |

Trabajos Prácticos Nº 6 y 7

Materiales

El material de partida para la realización de la práctica lo constituyen anteras de *Phytolacca dioica* y gónadas de ejemplares de *Dichroplus elongatus* (Orthoptera).

El material químico e instrumental necesarios constan de:

Solución fisiológica

Alcohol etílico 70%

Pinza de disección

Alfileres entomológicos

Portaobjetos y cubreobjetos

Microscopio estereoscópico

Solución de hematoxilina acética 2 %

Solución de ácido acético 45%

Agujas enmangadas

Portaobjetos excavados

Cera, esmalte o sellador de cubreobjetos

Microscopio óptico

PARTE A:

1. Observación de preparaciones cromosómicas temporarias a partir de anteras de *Phytolacca dioica*.
2. Identifique y dibuje las distintas fases de la meiosis.
3. Dibuje un único bivalente e identifique las cromátidas hermanas, los cromosomas homólogos y los puntos de quiasmas.
4. Indique en diacinesis y/o metafase I los bivalentes (II) e indique si es abierto o cerrado y el número de quiasmas que se observan.

PARTE B:

1. Disección de gónadas de ejemplares de *Dichroplus elongatus* (Orthoptera).

La disección se realiza bajo microscopio binocular estereoscópico colocando al ejemplar sobre una cápsula de Petri con parafina en solución fisiológica fría para insectos. En la parte inferior del abdomen del ejemplar adulto se realiza un corte transversal con una tijera de disección, luego se hace un corte perpendicular al primero hasta encontrar los testículos. Los testículos localizados se disectan para su posterior utilización en la obtención de preparaciones cromosómicas por aplastado.

2. Realización de preparaciones temporarias a partir de las gónadas disecadas.

Las preparaciones citogenéticas se realizan por aplastado en hematoxilina acética o propiónica férrica según el siguiente protocolo:

- a. Para ejemplares vivos, fijar las gónadas en etanol absoluto:cloroformo:ácido acético glacial (6:3:1) durante 15-30 minutos.
 - b. Colocar en un portaobjetos una pequeña porción de tejido gonadal en una gota de hematoxilina acética o propiónica férrica. Disgregar el material con la punta de una espátula.
 - c. Colocar un cubreobjetos. Si no hay suficiente colorante, agregar por los bordes del cubreobjetos.
 - d. A veces conviene flamear para que se aclare el citoplasma. El calentamiento no debe sobrepasar los 50°C. La temperatura puede controlarse con la piel. Es importante que el líquido debajo del cubreobjetos no hierva. Para lograr el efecto buscado basta con unos breves pasajes por la llama.
 - e. Aplastar las células ejerciendo presión sobre el cubreobjetos. Para este fin, colocar la preparación cromosómica sobre un trozo de papel absorbente, sostenerlo con dos dedos de una mano y presionar una mitad del cubreobjetos con el dedo gordo de la otra. La fuerza aplicada debe ser lo más vertical posible para evitar el deslizamiento del cubreobjetos, ya que se arruinaría el preparado. También hay que cuidar que la superficie sobre la cual se hace el aplastado no tenga irregularidades y sea horizontal. Repetir la operación en la otra mitad del cubreobjetos. La función de los dos dedos que sostienen es evitar que el cubreobjetos se mueva.
 - f. Examinar al microscopio óptico con el objetivo de menor aumento. Si hay células en buen estado y suficientemente aplastadas, sellar el preparado con cera o con esmalte de uñas. Si le falta aplastado, instilar un par de gotas de colorante por los bordes del cubreobjetos y aplastar nuevamente.
3. Identifique y dibuje las distintas fases de la meiosis.
 4. Indique en diacinesis y/o metafase I los bivalentes (II) e indique si es abierto o cerrado y el número de quiasmas que se observan. Dibuje un bivalente e identifique las cromátidas hermanas, los cromosomas homólogos y los puntos de quiasmas.
 5. Dibuje la disposición de todos los cromosomas del complemento en las placas en metafase I y

metafase II. Identifique los cromosomas sexuales.

PARTE C:

Responda el siguiente cuestionario guía:

- a. ¿Qué es un bivalente? ¿En qué fase o fases se observa?.
- b. ¿Qué diferencia existe entre anafase I y anafase II?
- c. La cebada tiene $2n = 14$ cromosomas, ¿cuántos cromosomas tiene una célula de cebada en una metafase de una mitosis, en una metafase I y II de una meiosis?.
- d. Si tiene una preparación cromosómica en la que observa células anafásicas en las que se separan cromátidas ¿cómo sabrá si se trata de anafase de una mitosis o de anafase II de una meiosis?
- e. ¿Cuál de lo siguiente es único a la mitosis y no una parte de la meiosis?
 1. Cromosomas homólogos se aparean formando bivalentes
 2. Cromosomas homólogos intercambian segmentos
 3. Las cromátides se separan durante anafase
 4. Cromosomas homólogos se comportan independientemente

Bibliografía

- Alberts, B., Johnson A., Lewis, J., Raff, M., Keiths, R. y Walter P. 4ta. Edición. 2002. Molecular Biology of the Cell. Garland Science, Taylor and Francis Group, New York. USA.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, SL., Matsudaira, P., Baltimore, D. y Darnell, J. 4ta Edición. 2002. Biología Celular y Molecular. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. Argentina.
- Macgregor, H. C. An introduction to animal cytogenetic. 1 edn, (Chapman & Hall, 1993).
- Passarge, E. Color Atlas of Genetics. Second edition, Thieme, Stuttgart, New York, 2001.
- Popescu, P., Hayes, H. & Dutrillaux, B. Techniques in Animal Cytogenetics (Principles and practice), XXVI+229 (Springer-Verlag, Berlin, 2000)
- Sumner, A. T. Chromosomes: organization and function. 1ra. edn, (Blackwell Science Ltd, 2003).
- Sybenga, J. 1975. Meiotic Configurations. Springer Verlag, pp. 251.
- Cooper, G. M. The Cell, A Molecular Approach. 2nd edition. Boston University. 2000.
- Karp, G. Biología Celular y Molecular. 6ta Edición, pp. 850, 2011.
- Hall, B. K., University, D., Hallgrímsson, B. Strickberger's Evolution. 4th Edition. University of Calgary, pp.762, 2008.
- Becker, W. N., Kleinsmith, L. J. y Hardin, J. El mundo de la célula Edición: 6º. 2007.
- Mahabal Ram. Fundamentals of Cytogenetics and Genetics. PHI Learning Pvt. Ltd., pp. 653, 2010.
- Swan, A. Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity. InTech Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia, 2012.

MEIOSIS EN INSECTOS CON CROMOSOMAS HOLOCINÉTICOS

Objetivos

Realización de preparaciones a partir de gónadas masculinas de insectos pertenecientes al orden Hemiptera, conocidos vulgarmente como chinches.

Observación e interpretación mediante microscopía óptica de las características citogenéticas y del comportamiento meiótico de este tipo de cromosomas.

Conceptos básicos

La gran mayoría de los organismos posee cromosomas con constricción primaria y centrómero localizado (cromosomas monocéntricos), pero en distintas taxa de los reinos protista, vegetal y animal se ha descrito la presencia de cromosomas que carecen de una constricción primaria y, por ende, de un centrómero localizado. Este tipo de cromosomas ha recibido diferentes denominaciones: cromosomas con cinetocoro difuso o actividad cinética difusa, cromosomas holocéntricos y cromosomas holocinéticos. En la literatura también se encuentran otros términos como cromosomas policéntricos, dicéntricos, con centrómero semilocalizado y policinéticos, para referirse a casos particulares de cromosomas sin un centrómero localizado, presentes en nematodos, escorpiones, musgo *Pleurozium schreberi* y una pocas especies de Lepidoptera respectivamente.

En los animales invertebrados es donde se encuentran más representados los cromosomas holocinéticos; además, están presentes en todos los Nematoda (gusanos cilíndricos) y en las pocas especies de Onychophora analizadas de la familia Peripatidae. Dentro de los artrópodos son característicos de los insectos Odonata (aguaciles), Dermaptera (tijeretas), Zoraptera, Heteroptera (chinches), homópteros Sternorrhyncha (pulgones o áfidos, cochinillas, mosca blanca) y Auchenorrhyncha (cigarras, cotorritas), Phthiraptera (Mallophaga y Anoplura) (piojos), Psocoptera (piojos de los libros), Lepidoptera (mariposas y polillas) y Trichoptera ("polillas"). Otros grupos de artrópodos ampliamente estudiados se caracterizan por incluir especies con cromosomas holocinéticos y otras con cromosomas monocéntricos. Por ejemplo, en Arachnida los cromosomas holocinéticos se encuentran sólo en los escorpiones de la familia Buthidae, en la superfamilia Dysderoidea de arañas haploginas, en todos los ácaros Astigmata y en algunas especies de Prostigmata, y dentro de los Chilopoda (ciempiés) se los ha descrito en unas pocas especies de Scutigerae y Henicopidae.

En las plantas los cromosomas holocinéticos son característicos de las familias de monocotiledóneas Juncaceae y Cyperaceae (juncos). En otros grupos algunas especies poseen cromosomas holocinéticos, mientras que otras tienen cromosomas monocéntricos; por ejemplo, los cromosomas holocinéticos se encuentran en la monocotiledónea *Chionographis* (Melanthiaceae) y, entre las dicotiledóneas, en *Myristica* (Myristicaceae) y en las eudicotiledóneas del género *Drosera* (plantas carnívoras) (Droseraceae) y *Cuscuta* subgénero *Cuscuta* (plantas parásitas) (Convolvulaceae). También se ha descrito este tipo cromosómico en algunos géneros de Clorophyta (*Zygnema*,

Spirogyra, *Cosmarium* y *Pleurotaenium*) y en el musgo *Pleurozium schreberi* (Briophyta).

Entre los protistas los cromosomas holocinéticos se han descrito en el radiolario *Aulacantha scolymantha* (Protozoa) y en los géneros *Spongospora*, *Sorosphaera* y *Plasmidiophora* (Plasmidiophorales).

Los principales criterios para el reconocimiento del carácter holocinético de los cromosomas son los siguientes:

- 1) ausencia de una constricción primaria en metafase mitótica;
- 2) migración de las cromátidas hermanas en forma paralela al plano ecuatorial en anafase mitótica;
- 3) persistencia de los fragmentos cromosómicos resultantes luego de irradiación;
- 4) presencia de placas cinetocóricas que se extienden sobre una gran superficie de cada cromátida en mitosis.

Si bien los dos primeros criterios son aparentemente fáciles de observar, cuando los cromosomas son de pequeño tamaño o isodiamétricos, como sucede en la mayoría de los organismos que tienen cromosomas holocinéticos, no siempre es posible asegurar su morfología (presencia o ausencia de centrómero) y/o su comportamiento (forma de migración en anafase).

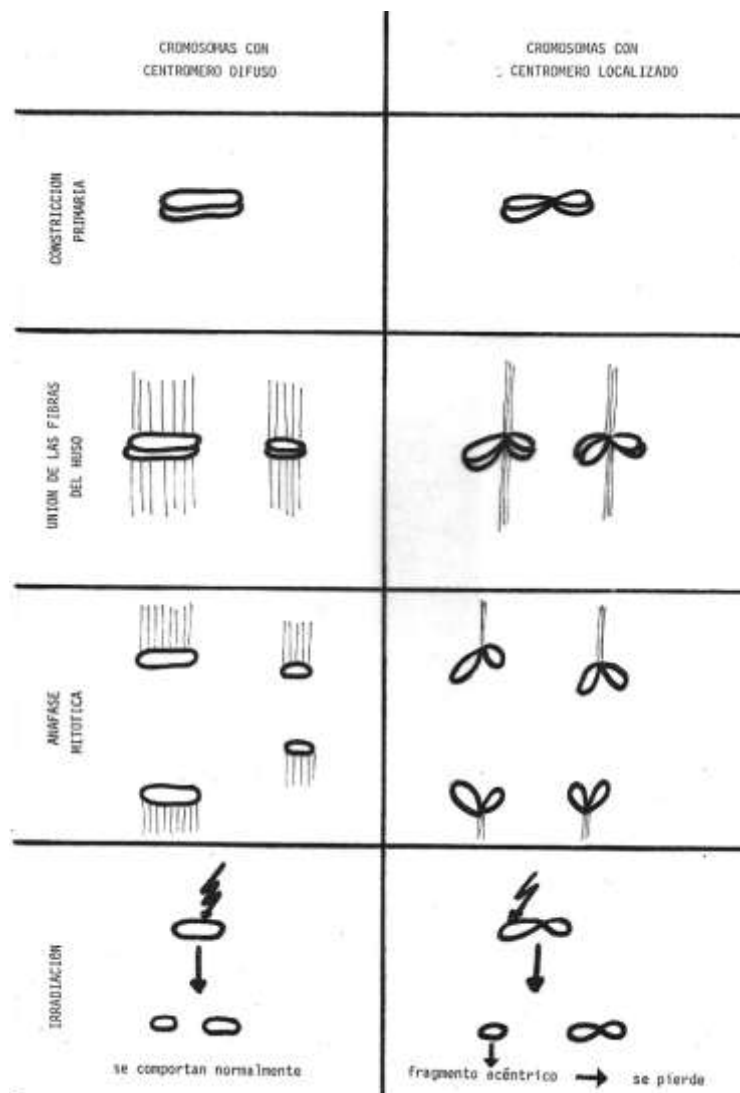


Figura 1

Con respecto a los experimentos de irradiación, éstos se han realizado en una pocas especies de algas verdes, traqueofitas, nematodos, insectos y arácnidos empleando rayos X y rayos γ . Los resultados de la irradiación mostraron que los fragmentos cromosómicos tienen la capacidad de unirse a las fibras del huso y migrar normalmente durante la mitosis y/o meiosis; sin embargo, se ha visto que la segregación de fragmentos muy pequeños puede ser ineficiente. En general, no se observó la formación de micronúcleos como consecuencia de la presencia de fragmentos. La potencialidad de los fragmentos cromosómicos de perdurar en las divisiones celulares ha servido de fundamento para asegurar que las fragmentaciones serían un mecanismo relativamente frecuente de evolución del cariotipo en los sistemas holocinéticos.

Los estudios de microscopía electrónica realizados mostraron diferencias entre los cromosomas en mitosis y en meiosis con respecto tanto a la presencia de placa cinetocórica así como a sus características. El análisis de cromosomas mitóticos reveló la presencia de un cinetocoro generalmente de estructura tripartita y que cubría gran parte de la superficie polar de la cromátida. En algunos casos el cinetocoro podía ser de tamaño similar al de un cromosoma monocéntrico, debido al pequeño tamaño de los cromosomas.

En la meiosis I, en algunas especies los microtúbulos se insertan directamente en la cromatina, sin la presencia de una placa cinetocórica discreta (especies de heterópteros y homópteros, nematodos), en otras se observó una placa cinetocórica extensa (escorpiones y hembras de lepidópteros), y en otros casos en metafases I se observó una placa cinetocórica discreta ubicada en una depresión en cada una de las cuatro cromátidas del bivalente (juncáceas, tricópteros y lepidópteros). Un nuevo tipo de organización cinética se describió en la meiosis de lepidópteros con complementos cromosómicos derivados (debido a la reducción del número cromosómico por fusiones), en este caso no se observaron placas cinetocóricas, y cada cromátida exhibía numerosos sitios discretos de unión de los microtúbulos. Esta organización cinética fue considerada como policinética. A pesar de que Trichoptera y Lepidoptera son grupos hermanos, en el primero tanto las especies con números atávicos como con números reducidos mantendrían la organización cinética ancestral (presencia de placas cinetocóricas), mientras que en Lepidoptera las especies con número cromosómico reducido habrían desarrollado una organización policinética.

Durante la embriogénesis temprana de algunas especies de nematodos se produce el proceso de eliminación cromatínica, que consiste en la fragmentación cromosómica y la eliminación de heterocromatina en todas las células pre-somáticas. Luego de la disminución cromatínica en la línea somática se originaban numerosos cromosomas pequeños que también son holocinéticos, ya que los microtúbulos del huso se unen al cinetocoro continuo presente en casi toda su longitud. De aquí su denominación de policéntricos, ya que cuando comenzó el estudio en nematodes se pensaba que los cromosomas de la línea germinal se originaban por las fusiones de los cromosomas somáticos y que cada uno aportaba un cinetocoro.

En los nematodos *Caenorhabditis elegans* y *Parascaris equorum*, el empleo de técnicas de inmunolocalización con anticuerpos específicos ha permitido profundizar el conocimiento de la estructura cinetocórica. Estos estudios sugieren que muchas de las proteínas relacionadas con la estructura y función del cinetocoro están altamente conservadas entre cromosomas monocéntricos y holocinéticos.

Si bien el comportamiento mitótico de los cromosomas holocinéticos es único en cuanto a la orientación y forma de migración de las cromátidas, existen variaciones en el comportamiento meiótico describiéndose dos tipos de orientaciones. Los bivalentes se pueden orientar axialmente con respecto al huso, es decir con el eje mayor paralelo al eje polar; como en heteropteros y algunos homopteros; o los bivalentes se pueden orientar ecuatorialmente con respecto al huso, es decir con el eje mayor perpendicular al eje del mismo, como en odonatos, ciperáceas y juncáceas (Figura 2). Desde el punto de vista genético, las gametas producidas en ambos tipos de meiosis son indistinguibles.

El tipo de meiosis puede ser diferente en los autosomas y en los cromosomas sexuales. En los Heteroptera, en general, los cromosomas sexuales son asinápticos y aquiasmáticos y se dividen ecuacionalmente en la meiosis I, mientras que en la segunda división meiótica se asocian y segregan reduccionalmente.

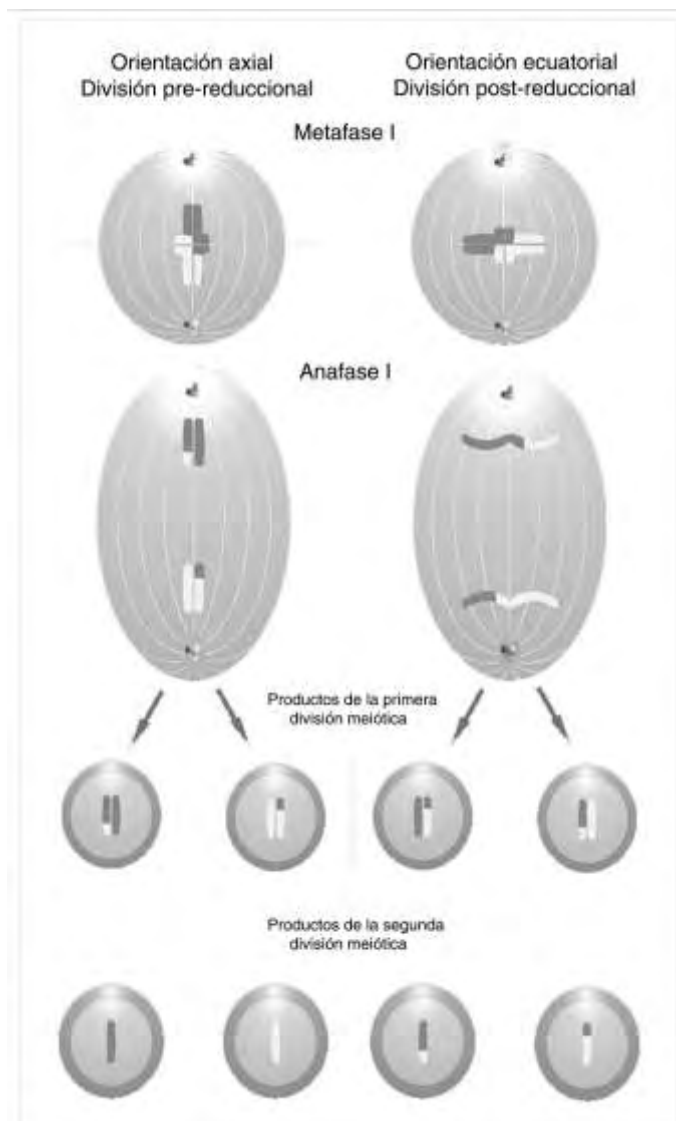


Figura 2. Representación esquemática de los modos de orientación de un bivalente y de la migración cromosómica en la meiosis. Imagen tomada de Mola & Papeschi (2006).

Los principales reordenamientos cromosómicos implicados en la evolución del cariotipo de los sistemas holocinéticos son las fusiones y las fragmentaciones, y en las ciperáceas y juncáceas también la poliploidía. Los términos agmatoploidía y simpliploidía se han acuñado para referirse respectivamente a las fragmentaciones y a las fusiones en las plantas. Las translocaciones recíprocas sólo han sido observadas en individuos mutantes espontáneos en diferentes grupos, pero los politipismos y polimorfismos para translocaciones recíprocas son una característica muy frecuente de los escorpiones.

En los organismos con cromosomas holocinéticos, la cuantificación del ADN ha constituido un dato sumamente relevante en toda discusión sobre la evolución del cariotipo. Así, por ejemplo, en *Luzula* la determinación del valor C en varias especies con números somáticos muy diferentes ha permitido diferenciar el origen poliploide o agmatoploide/simpliploide de varias de ellas, que presentaban el mismo o diferente número diploide. Otras investigaciones permitieron conocer el contenido de ADN de algunas especies heterópteros de las familias Pentatomidae, Reduviidae, Pyrrhocoridae, Lygaeidae y Belostomatidae y establecer relaciones con la evolución del cariotipo.

En general, en los distintos grupos se observa que las fusiones son más frecuentes que las fragmentaciones. Esto podría explicarse porque si bien los cromosomas resultantes de una fragmentación tienen la capacidad de perdurar en las sucesivas divisiones celulares, existe una limitación dada por la necesidad de formar nuevos telómeros, esenciales para la estructura cromosómica.

Entre los grupos de insectos más extensamente estudiados desde el punto de vista citogenético están los heterópteros y los odonatos. Estos grupos pueden tomarse como modelo para ejemplificar algunas de las características meióticas de los cromosomas holocinéticos.

Una particularidad de la meiosis masculina de los heterópteros es la arquitectura de la placa metafásica. Los bivalentes autosómicos, el pseudobivalente m y los cromosomas sexuales muestran una disposición particular en ambas metafases meióticas. En general, los autosomas se disponen formando un anillo, y los cromosomas sexuales (que se comportan como univalentes en la meiosis I) se ubican en el centro del mismo, el pseudobivalente m (cuando presente) también se ubica en el centro. Sin embargo, pueden existir desviaciones de este arreglo dependiendo del sistema cromosómico de determinación del sexo y la presencia o ausencia de cromosomas m. En la segunda división meiótica las cromátidas de los cromosomas sexuales se asocian formando un pseudobivalente o un pseudomultivalente (lo que garantiza su correcta segregación en la segunda división meiótica) y se disponen nuevamente en el centro del anillo de autosomas. La división de los autosomas y de los cromosomas m es pre-reduccional mientras que la de los cromosomas sexuales es ecuacional (post-reduccional). En la meiosis masculina de odonatos, en cambio, tanto los autosomas como los cromosomas sexuales se dividen ecuacionalmente (post-reduccionalmente); en metafase I no muestran una disposición particular en el plano ecuatorial, en anafase I migran casi paralelos al mismo y en metafase II el cromosoma sexual normalmente se encuentra fuera de la placa metafásica, más próximo a uno de los polos.

El mecanismo cromosómico de determinación del sexo más frecuente en Heteroptera es XY/XX (macho/hembra) (aproximadamente 75% de las especies) encontrándose también los sistemas

derivados X0/XX, diferentes sistemas múltiples X_n0 , X_nY y XY_n , y menos frecuentemente neo-sistemas. En este grupo los sistemas múltiples se habrían originado por fragmentación de los cromosomas sexuales de los sistemas atávicos mientras que los neo-sistemas habrían derivado por fusiones entre los cromosomas sexuales y autosomas. En odonatos el mecanismo más frecuente es XX/X0 (95% de las especies) siendo el macho el sexo heterogamético. Los únicos sistemas derivados se habrían originado por fusiones del X atávico con un autosoma. El sistema neo-XY y se encuentra heterogéneamente distribuido entre las distintas familias del orden. El único mecanismo múltiple X_1X_2Y / $X_1X_1X_2X_2$ hallado hasta el presente se habría originado por fusiones a partir de un sistema neo-XY.

De acuerdo a la concepción de centrómero propuesta por Lima de Faria en 1949 los cromosomas holocinéticos serían una forma diferenciada de un único proceso. Este autor considera que la actividad cinética se desarrolló originalmente en uno de los cromómeros del cromosoma y que luego se extendió a varios cromómeros. Según la distribución de los cromómeros surgirían los diferentes tipos de cromosomas. Si el grupo de cromómeros estaba restringido a un determinado lugar, se originaba un cromosoma con centrómero localizado; si varios grupos de cromómeros estaban separados a lo largo de la cromátida, los cromosomas eran policéntricos; y cuando la mayoría de los cromómeros del cromosoma tenían actividad cinética, los cromosomas eran holocinéticos.

Con posterioridad, varios autores plantearon la hipótesis de que los cromosomas holocinéticos representaban un carácter primitivo argumentando que a) el centrómero localizado representa una especialización; b) los cromosomas holocinéticos se encuentran en general en taxa primitivos de plantas y animales; c) las fragmentaciones aumentan el número cromosómico, lo que brinda una mayor variabilidad y una mejor capacidad de adaptación; y d) las fusiones y translocaciones no tendrían las limitaciones que pueden presentar en los cromosomas monocéntricos (por ejemplo, cromosomas dicéntricos). Sybenga en 1981 consideró que existiría una especialización gradual del estado holocinético hacia el estado monocéntrico. Primero habría ocurrido una localización de la actividad centromérica en la meiosis, como se observa en los heterópteros y algunos homópteros en los que la actividad cinética en la meiosis está restringida a las regiones teloméricas y posteriormente la localización también se extendieron a la mitosis.

Swanson en 1957, sin embargo, consideró que el carácter holocinético sería derivado, dado que los cromosomas holocinéticos se encuentran en grupos filogenéticamente muy separados y, además, a que los hemípteros así como las luzulas habrían derivado de formas más primitivas que tienen cromosomas monocéntricos. Greilhuber, más recientemente apoyó esta hipótesis y consideró por el argumento del outgroup que los cromosomas holocinéticos deberían ser considerados derivados entre las angiospermas, y habrían aparecido separadamente al menos cuatro veces como un paralelismo (en Juncaceae- Cyperaceae, en *Chionographis*, en *Cuscuta* subgénero *Cuscuta*, y en *Myristica fragrans*). La dispersión de la actividad cinética, según este autor, se habría realizado mediante un elemento transponible que llevaría una secuencia centromérica.

La caracterización de las proteínas del cinetocoro con inmunofluorescencia indica que los cinetocoros de los cromosomas monocéntricos estarían compuestos por subunidades estructurales repetidas localizadas en una única región, mientras que los cinetocoros de los cromosomas holocinéticos, involucran la coalescencia de subunidades centroméricas que se encuentran más dispersas a lo largo

de la cromátida. Los resultados obtenidos mediante esta técnica llevan a plantear una hipótesis de que la organización cinetocórica que guarda cierto paralelismo con la hipótesis planteada originalmente por Lima de Faria.

Trabajo Práctico N° 8

Materiales

El material de partida para la realización de la práctica lo constituyen gónadas masculinas de ejemplares de chinches (Hemiptera).

El material químico e instrumental necesarios constan de:

| | |
|-----------------------------|--|
| Solución fisiológica | Solución de hematoxilina acética 2 % |
| Alcohol etílico 70% | Solución de ácido acético 45% |
| Pinza de disección | Agujas enmangadas |
| Alfileres entomológicos | Portaobjetos excavados |
| Portaobjetos y cubreobjetos | Cera, esmalte o sellador de cubreobjetos |
| Microscopio estereoscópico | Microscopio óptico |

Procedimiento

1. Disección de gónadas de ejemplares de chinches (Hemiptera).

La disección de las gónadas se realiza bajo microscopio binocular estereoscópico colocando al ejemplar sobre una cápsula de Petri con parafina en etanol 70%, si los ejemplares están fijados enteros; o en solución fisiológica fría para insectos si están vivos. Los ejemplares se sujetan con un alfiler entomológico por la región dorsal (escutelo) (Figura 3), se separan los hemiólitros y el segundo par de alas con otros dos alfileres y se practica un par de cortes a la altura de los primeros segmentos abdominales, quedando expuestas las gónadas.

Los testículos/ovariolas localizados a ambos lados del cuerpo se disectan para su posterior utilización en la obtención de preparaciones cromosómicas por dispersión y por aplastado.

El aparato genital masculino está formado por dos testículos con folículos tubulares. Cada folículo se continúa con un túbulo espermático que presenta una región dilatada que constituye la vesícula seminal. Los túbulos espermáticos se reúnen en un par de conductos espermáticos o deferentes que finalmente se asocian en un único ducto eyaculador. Cada folículo lleva en su interior varios grupos de células (cistos) y las células de cada grupo se hallan en la misma fase de desarrollo. Los estadios más jóvenes se localizan en la zona apical del folículo, de manera tal que en un testículo que está produciendo activamente espermatozoides los grupos de espermatogonias se encuentran en el ápice del folículo, seguidas de grupos de espermatocitos primarios, espermatocitos secundarios, espermátidas y espermatozoides maduros en una secuencia regular (Figura 4).

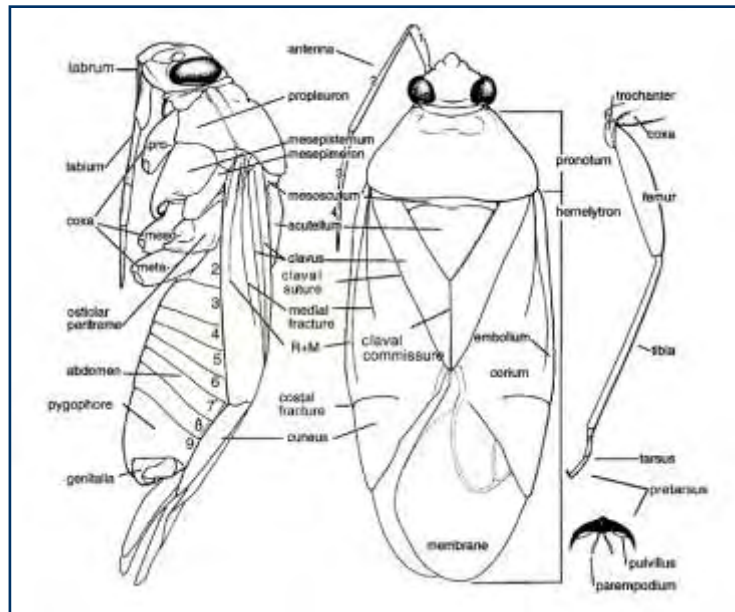


Figura 3. Esquema de un Heteroptera. Imagen tomada de Schuh & Slater, 1995.

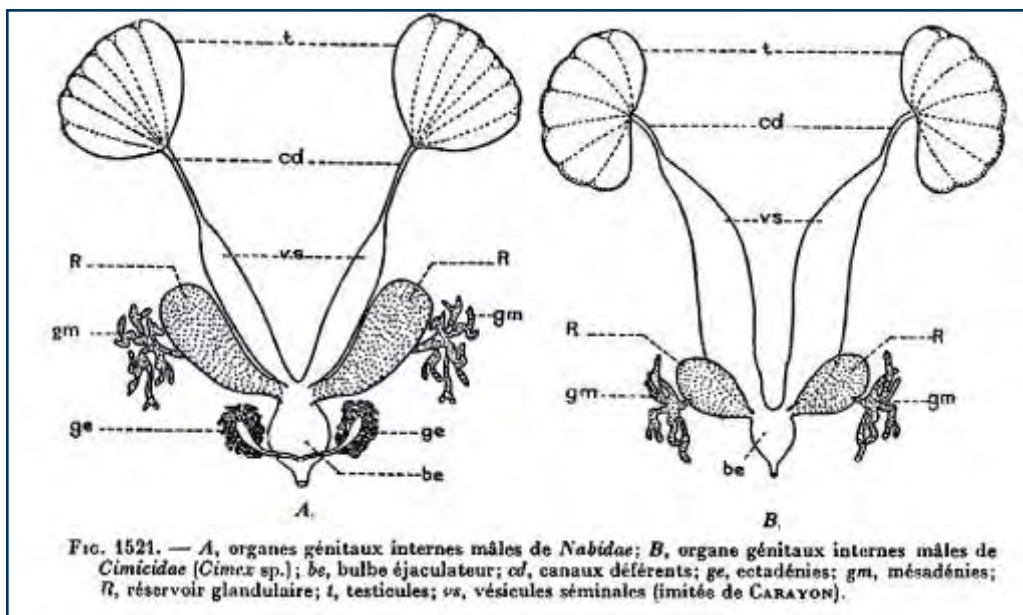


Figura 4. Aparato genital masculino de Heteroptera. Imagen tomada de Grassé 1975.

El aparato genital femenino está formado por un par de ovarios constituidos a su vez por ovariolas. Cada ovariola está formada por un filamento terminal, un germario donde se forman las oogonias y los folículos o cámaras de huevos donde maduran los ovocitos. Las ovariolas desembocan en túbulos ováricos que se unen para formar un oviducto a cada lado del cuerpo, los cuales se reúnen finalmente en una única cámara. Además, están presentes el receptáculo seminal y el par de glándulas accesorias (Figura 5).

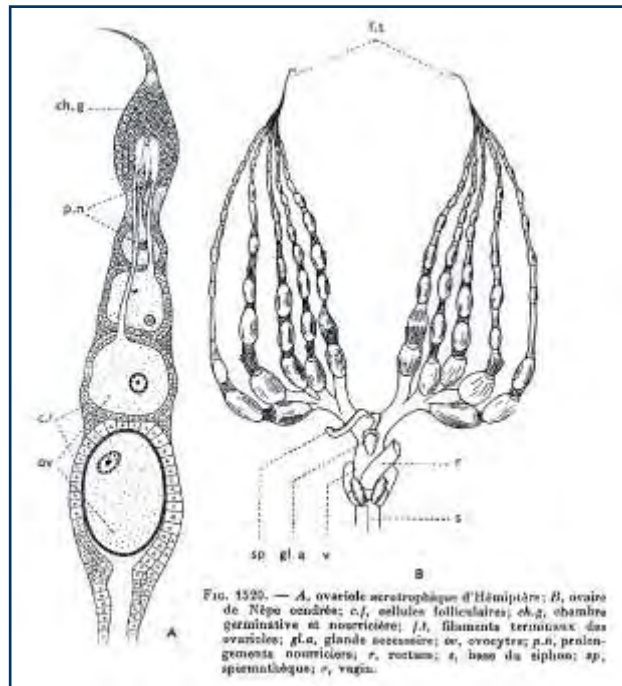


Figura 5. Aparato genital femenino de Heteroptera. Imagen tomada de Grassé 1975

2. Realización de preparaciones temporarias a partir de las gónadas disecadas.

Las preparaciones citogenéticas se realizan por aplastado en hematoxilina acética o propiónica férrica según el siguiente protocolo:

- a. Para ejemplares vivos, fijar las gónadas en etanol absoluto:cloroformo:ácido acético glacial (6:3:1) durante 15-30 minutos.
- b. Colocar en un portaobjetos una pequeña porción de tejido gonadal en una gota de hematoxilina acética o propiónica férrica. Disgregar el material con la punta de una espátula.
- c. Colocar un cubreobjetos. Si no hay suficiente colorante, agregar por los bordes del cubreobjetos.
- d. A veces conviene flamear para que se aclare el citoplasma. El calentamiento no debe sobrepasar los 50°C. La temperatura puede controlarse con la piel. Es importante que el líquido debajo del cubreobjetos no hierva. Para lograr el efecto buscado basta con unos breves pasajes por la llama.
- e. Aplastar las células ejerciendo presión sobre el cubreobjetos. Para este fin, colocar la preparación cromosómica sobre un trozo de papel absorbente, sostenerlo con dos dedos de una mano y presionar una mitad del cubreobjetos con el dedo gordo de la otra. La fuerza aplicada debe ser lo más vertical posible para evitar el deslizamiento del cubreobjetos, ya que se arruinaría el preparado. También hay que cuidar que la superficie sobre la cual se hace el aplastado no tenga irregularidades y sea horizontal. Repetir la operación en la otra mitad del cubreobjetos. La función de los dos dedos que sostienen es evitar que el cubreobjetos se mueva.
- f. Examinar al microscopio óptico con el objetivo de menor aumento. Si hay células en buen estado y suficientemente aplastadas, sellar el preparado con cera o con esmalte de uñas. Si le falta aplastado, instilar un par de gotas de colorante por los bordes del cubreobjetos y aplastar nuevamente.

Actividades

1. Identifique y dibuje las distintas fases de la meiosis.
2. Dibuje bivalentes e identifique las cromátidas hermanas, los cromosomas homólogos y los puntos de quiasmas.
3. Dibuje la disposición de todos los cromosomas del complemento en las placas en metafase I y metafase II. Identifique los cromosomas sexuales.

Bibliografía

- Mola, L. M. & Papeschi, A.G. 2006. Holokinetic chromosomes at a glance. *Journal of Basic & Applied Genetics* (Buenos Aires) 17 (1): 17-33.
- Popescu, P., Hayes, H. & Dutrillaux, B. *Techniques in Animal Cytogenetics (Principles and practice)*. (Springer-Verlag, Berlin; 2000).
- White, M.J.D. *Animal cytology and evolution*, Edn. 3rd. (Cambridge University Press, London; 1973).
- Papeschi, A.G. & Bressa, M.J. Classical and molecular cytogenetics in Heteroptera, in *Research Advances in Entomology*, Vol. 1. (ed. R.M. Mohan) 1-9Kerala; 2007).
- Papeschi, A.G. & Bressa, M.J. Evolutionary cytogenetics in Heteroptera. *J. Biol. Res.* 5, 3-21 (2006).

CROMOSOMAS POLITÉNICOS DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES DE *DROSOPHILA***Objetivos**

Obtención de cromosomas politénicos a partir de larvas de *Drosophila melanogaster*.

Observación e interpretación del patrón de bandas que presenta este tipo de cromosomas.

Conceptos básicos

En 1881 Balbiani descubrió que en los núcleos de las glándulas salivales de *Drosophila melanogaster*, durante el período larvario, no se observaba la apariencia típica descrita durante la metafase sino que aparecían unas estructuras enormemente largas y que al colorerlas aparecían compuestas por bandas e interbandas.

Los trabajos sucesivos de varios autores sirvieron para determinar, en primer lugar, que dichas estructuras eran cromosomas especiales y en segundo lugar, que su origen había tenido lugar por endorreduplicación (cromomérica supernumeraria) durante la interfase mitótica.

Endorreduplicación se llama al fenómeno en el que después de un período de síntesis, el núcleo no entra en mitosis, sino que vuelve a experimentar otro período S, los cromosomas duplican otra vez sus cromátidas (duplocromosomas), pudiendo llegar hasta ocho si vuelve a repetirse la anomalía y sucesivamente. Los cromosomas así constituidos pueden separar luego las cromátidas por parejas, con lo cual el número de cromosomas se duplica, cuadruplica, etc. (endopoliploidía).

Aunque las bandas en cromosomas humanos representen segmentos lineales muy largos de ADN, las bandas en los cromosomas de *Drosophila* representan segmentos más cortos, de sólo 50.000 a 100.000 pares de bases. Afortunadamente, las características estructurales de los cromosomas de estos insectos justifican el hecho de que tales segmentos cortos puedan ser observados al microscopio óptico. Parece ser que la única molécula de ADN duplex de los cromosomas salivales en insectos está copiada repetidamente (unas 1.000 veces) en formaciones paralelas idénticas de ADN. Esta politenia da lugar a gruesos haces de moléculas de ADN paralelas, que presentan el mismo patrón de bandas a través del ancho del haz (Figura 1). Aunque casi todo el cromosoma participa en la politenización, ciertas secuencias como el ADN de secuencia sencilla cercano al centrómero, no participan en este aumento.

El aspecto normal de un núcleo de dichas glándulas en *Drosophila* es el siguiente: todos los cromosomas se reúnen en un punto común, llamado cromocentro, alrededor del que irradian cinco largos brazos. El cromocentro está formado por la atracción mutua y asociación cerrada de las zonas centroméricas heterocromáticas (Figura 1),

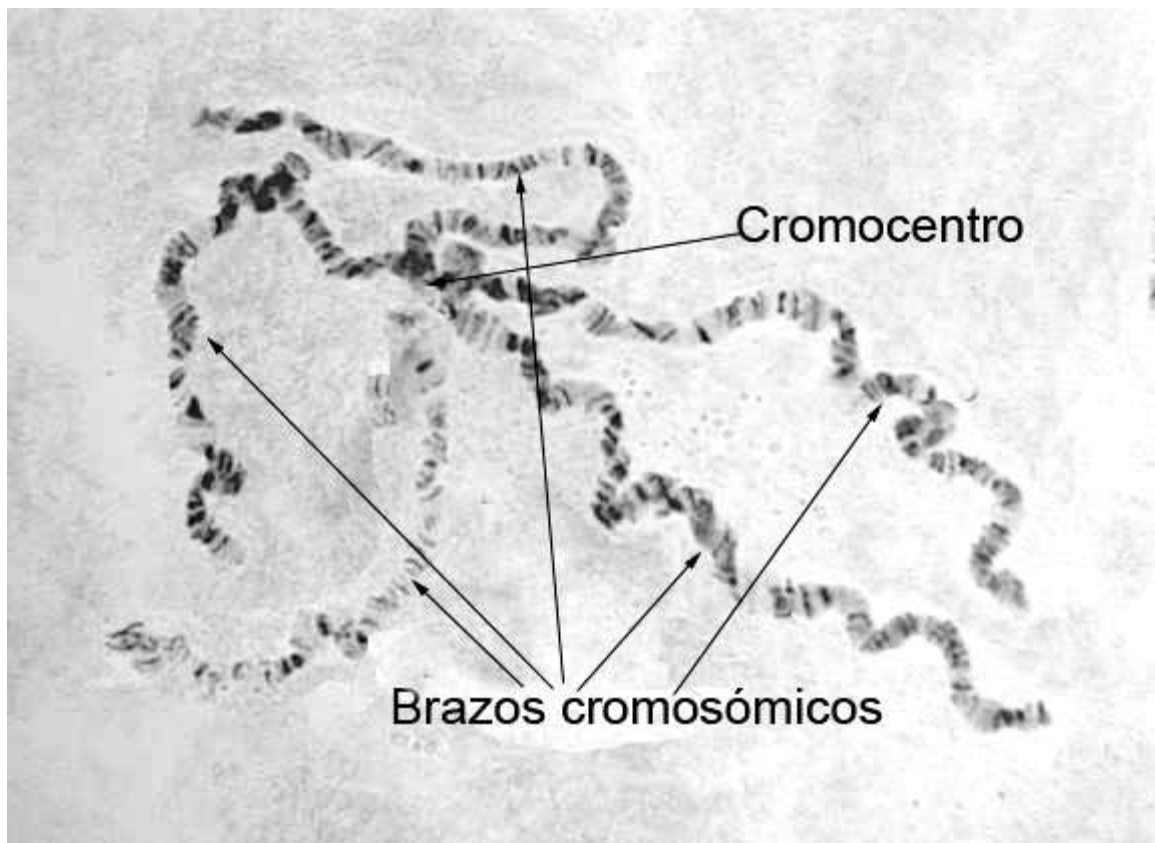


Figura 1. Esquema de los cromosomas politénicos de *D. melanogaster*. Imagen tomada de <http://www.ucm.es/info/genetica>

Los cinco brazos que irradian del cromocentro resultan de la unión íntima de los brazos de cromosomas homólogos ya que presentan apareamiento somático parecido al que se da en la profase meiótica, y se denominan así:

- X, de la unión de los brazos largos de los cromosomas X de la hembra (en condición simple en el macho).
- 2L y 2R, de la unión del brazo izquierdo y derecho del par II
- 3L y 3R, de la unión del brazo izquierdo y derecho del par III.
- el par IV y el cromosoma Y del macho apenas sobresalen del cromocentro.

(La denominación izquierdo o derecho referida a los brazos cromosómicos no se refiere a su posición espacial sino a la simple distinción entre ellos).

Un cierto porcentaje de bandas, dependiendo del desarrollo de la larva, muestran un aspecto muy hinchado de *puffs*-o hinchamientos (Fig. 2). Los trabajos de varios autores pusieron en claro que dichas zonas serían puntos de síntesis activa de ARNm. Estudios de clonación molecular, así como de obtención de mapas de ARNm han sugerido que cada banda contiene un número limitado de unidades de transcripción, quizás sólo una unidad en algunos casos.

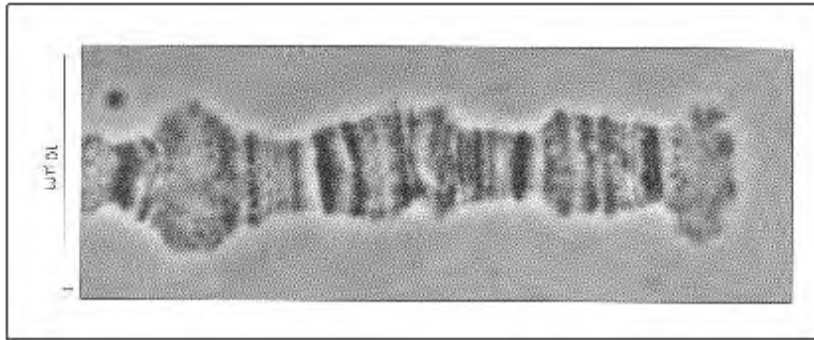


Figura 2. Detalle de un cromosoma de *D. melanogaster* mostrando dos pufs. Imagen tomada de <http://bioinformatica.uab.es/biocomputacio/treballs05-06/jigea06/drosophila.htm>

Los cromosomas politénicos han proporcionado información sobre diversos aspectos importantes de la Genética tales como el conocimiento de la base física de la herencia, la transmisión de los genes y la forma de actuar de los mismos. Más concretamente han servido para la construcción de los mapas citogenéticos de *Drosophila*, el estudio de los cambios estructurales y su importancia como mecanismos evolutivos, estudios de diferenciación y genética del desarrollo, regulación génica, y por último el estudio de la transcripción del mensaje genético mediante la síntesis del ARNm.

Trabajo Práctico N° 9

Materiales

El material de partida para la realización de la práctica lo constituyen larvas de *Drosophila melanogaster* u otra especie de *Drosophila*.

El material químico e instrumental necesarios constan de:

| | |
|---|--|
| Solución salina fisiológica | Portaobjetos y cubreobjetos |
| Solución de hematoxilina acética 2 % | Cera, esmalte o sellador de cubreobjetos |
| Pinza de disección | Microscopio estereoscópico |
| Aguja enmangada o alfileres entomológicos | Microscopio óptico |

Procedimiento

1. Colocar la larva sobre una gota de solución salina en un portaobjetos limpio. Las glándulas salivales, como se aprecia en la Figura. 3, se encuentran unidas a la trompa que poseen las larvas en el extremo anterior, identificable por poseer unas plaquitas de color negro, las mandíbulas.

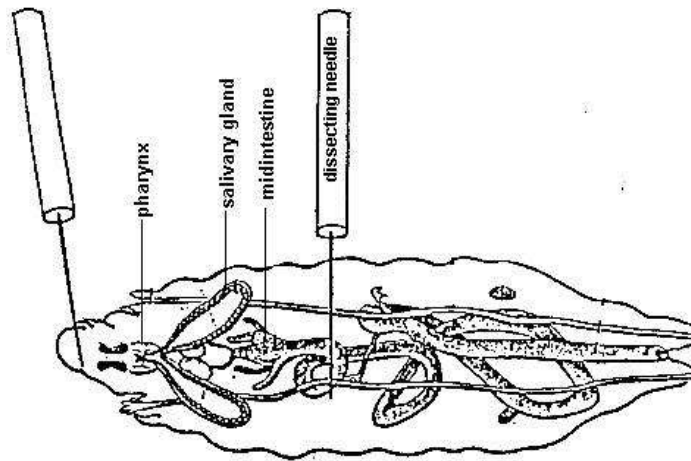


Figura 3. Esquema de una larva de *D. melanogaster*. Imagen tomada de <http://train-srv.manipalu.com/wpress/?p=92545>)

Para extraerlas, usar una pinza para sujetar la parte posterior de la larva y una aguja enmangada o alfileres entomológicos para decapitarlas (Figura 4). En el movimiento de decapitación que habrá de ser lento, saldrán las glándulas apareadas, fáciles de identificar por su aspecto de bolsitas transparentes a ambos lados del esófago.

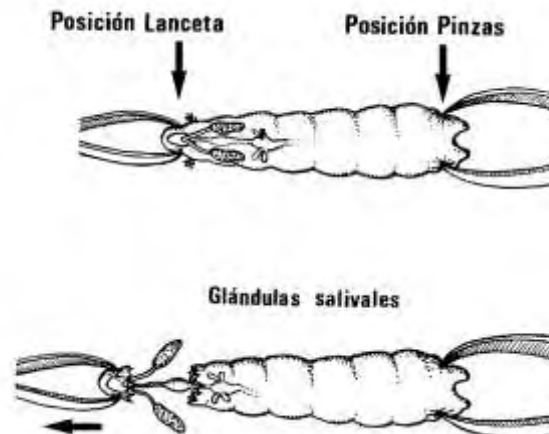


Figura 4. Esquema de decapitación de una larva de *D. melanogaster*.

2. Una vez extraídas las glándulas, limpiar el portaobjeto eliminando los restos de larva y quitar los cuerpos grasos que se encuentran pegados a las glándulas.
3. Añadir rápidamente una gota de colorante (los más comúnmente utilizados son orceína acética y orceína lacto-acética).
4. Dejar que se tiñan durante 10 min calentando suavemente y sin que llegue a hervir, a la llama de un mechero. Si durante este tiempo se evapora el colorante, añadir una o dos gotas más.
5. Colocar un cubreobjeto con suavidad sobre las glándulas. A continuación realizar un aplastamiento vertical sobre el cubreobjeto con la yema del dedo pulgar, colocando un papel de filtro doblado sobre

el cubre y evitando el movimiento lateral del mismo. El papel absorberá el exceso de colorante y la presión hará que se distiendan los cromosomas.

Para prevenir que se seque la preparación durante la observación microscópica, cerrarla aplicando cera fundida sobre los cuatro bordes del cubre.

6. Quitar el exceso de colorante con papel absorbente y sellar con esmalte para uñas.

Actividades

1. Observar los cromosomas de *D. melanogaster* y a partir de las observaciones microscópicas realizar dibujos interpretativos de:

- el cromocentro y los brazos irradiando a su alrededor,
- el grosor de cada brazo,
- el número de brazos,
- la estructura de bandas e interbandas,
- la presencia de *puffs* en algunas zonas de los brazos cromosómicos,
- cada uno de los brazos cromosómicos utilizando ilustraciones de los mismos que se les proveerán.

2. Responda el siguiente cuestionario

- a) ¿En qué tipos de organismos se pueden observar los cromosomas politénicos?
- b) ¿Cuál es su función?
- c) Explique brevemente la forma en la que se generan los cromosomas politénicos.
- d) ¿Qué es un *puff* y un anillo de Balbiani, existe alguna diferencia?
- e) En Genética ¿qué utilidad tiene los cromosomas politénicos?

Bibliografía

- White, M. J. D. Animal cytology and evolution. 3rd. edn, (Cambridge University Press, 1973).
- Popescu, P., Hayes, H. & Dutrillaux, B. *Techniques in Animal Cytogenetics (Principles and practice)*. (Springer-Verlag, 2000).
- Lacadena, J. R. Citogenética. 1ra. edn, (Editorial Complutense, 1996).
- Sumner, A. T. Chromosomes: organization and function. 1ra. edn, (Blackwell Science Ltd, 2003).
- Kulg W. et al. Conceptos de genética. Ed prentice hall 5ª ed. Madrid 1999. pp. 43-45.
- Muñoz de Hoyos, P. La importancia de los cromosomas politénicos en la determinación taxonómica de los simúlidos. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 16 (66): 511-520, 1990. ISSN 0370-3908.

CULTIVO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Objetivos

Obtención de cromosomas a partir del cultivo de linfocitos de sangre periférica de mamíferos.

Conceptos básicos

Cultivo de linfocitos de sangre periférica: generalidades y protocolo

La obtención de linfocitos de sangre periférica es una de las herramientas más útiles con las que cuentan la Genética y es ampliamente utilizada también por la Citogenética, debido a la fácil disponibilidad del material celular, al bajo costo de procesamiento y la gran cantidad de información que puede brindar al investigador el cultivo de linfocitos.

A partir de estos cultivos es posible realizar una amplia cantidad de ensayos. Por ejemplo, se puede obtener el cariotipo de una especie cuando se combina con la técnica de bandas apropiada, y permite efectuar además estudios evolutivos por comparación de cariotipos entre especies relacionadas.

A través de las metafases de los cultivos referidos se puede confirmar el cariotipo de una especie y estudiar sus variaciones poblacionales *in vivo* sin sacrificio del individuo en análisis. El cariotipo es un parámetro de suma importancia desde distintos puntos de vista, especialmente en estudios poblacionales (de especies en las cuales sus linfocitos se puedan cultivar) y muy especialmente, cuando se trata de especies incluidas en el CITES (protegidas, en vía de extinción). Además la combinación de esta técnica con las de bandas cromosómicas apropiadas permite realizar estudios de variaciones cariotípicas intraspecíficas, interespecífica y/o intergenéricas, posibilitando inferencias evolutivas. También, se pueden utilizar las metafases obtenidas para aplicar ensayos de genotoxicidad, utilizando para esto, biomarcadores como ICH (Intercambio de Cromátides Hermanas), CPC (Cinética de Proliferación Celular), IM (Índice Mitótico), AC (Aberraciones Cromosómicas) entre otros de los posibles marcadores de efecto genotóxico.

Cultivos de células

Los cultivos celulares pueden dividirse en dos grandes grupos dependiendo del sustrato que se emplee en el crecimiento celular:

Cultivos en suspensión: las células se cultivan por agitación constante en medio líquido. Los cultivos se preparan por dilución de las suspensiones celulares.

Cultivos en monocapa: Las células se adhieren a una superficie sólida (vidrio o plástico) o semisólida (agar, coágulo sanguíneo) formando una superficie celular es decir, formando un tejido observable al microscopio óptico o de contraste de fases. Los cultivos se mantienen liberando las células del sustrato por medios mecánicos o enzimáticos y continuando su ciclo vital en nuevos subcultivos celulares.

En la bibliografía se pueden encontrar distintas denominaciones y clasificaciones para los cultivos celulares. Hayflick y Moorliand (1961) denominaban a los cultivos: primarios, cepas y líneas celulares, aceptando que los primarios son diploides iguales morfológicamente a las células que les dieron origen y generalmente formados por más de un tipo celular; cepa celular es aquel cultivo que por

pasajes sucesivos selecciona un único tipo morfológico, mantiene la diploidía inicial, pero presenta alteraciones a nivel génico que no pueden observarse en el cariotipo pero sí fisiológicamente; línea celular es heteroploide (en general aneuploide) y presenta una morfología particular que no puede asemejarse a ningún tipo de células *in vivo*.

Actualmente se acepta que el cultivo recién establecido se denomina primario y luego de sucesivos pasajes secundario, terciario, etc. Luego el cultivo desarrolla en una línea que puede o no establecerse indefinidamente. Por lo tanto se denominan líneas continuas y líneas continuas establecidas respectivamente.

En cultivos primarios de células de animales y humanas se han descrito tres fases:

- 1) Un intervalo de crecimiento progresivo, generalmente vigoroso, a través de un cierto número de pasajes seriados.
- 2) Un período latente en el cual la mayoría de las células se pierden.
- 3) La aparición ocasional de variantes celulares, dando origen, a líneas permanentes.

Este patrón no es uniforme ni predecible para todos los tipos celulares. La incapacidad aparente de las poblaciones celulares primarias para proliferar indefinidamente plantea un problema fundamental: ¿se debe esta restricción a un artefacto del método o es la expresión de un cambio celular intrínseco? Los factores limitantes del crecimiento celular están relacionados con el deterioro progresivo de sistemas de control principalmente aquellos concernientes a la duplicación cromosómica, división mitótica, entre otros. Por lo tanto, se espera una pérdida de la población celular a menos que aparezca información genética que produzca variantes que, posteriormente, reestablezcan selectivamente las condiciones de equilibrio para crecer como líneas celulares continuas.

Los cultivos primarios conservan el número diploide característico del organismo/tejido que le dio origen. Con los sucesivos pasajes, se van acumulando alteraciones (mutaciones génicas) dando un amplio espectro de variaciones celulares tanto genéticas como morfológicas. Cualquier cambio que involucre al complemento cromosómico completo (poliploidía) o a cromosomas individuales (aneuploidía) hace que ese pasaje se denomine heteroploide.

Comparando el cariotipo del cultivo primario con el de la línea celular continua se puede observar que esta última presenta, en general, un alto grado de aneuploidía y además presenta números cromosómicos modales distintos del cultivo primario. Por lo tanto, debe considerarse que las líneas continuas son sistemas celulares nuevos. Sus patrones cromosómicos generalmente aneuploides y su apariencia pleomórfica las apartan de las características de los tipos celulares normales *in vivo*. Por esta razón, algunos investigadores se han inclinado a homologar a las líneas celulares con tumores y a igualar sus orígenes con un proceso de conversión neoplásica o transformación celular dado que se pudo observar transformación **in vitro**.

Requerimiento del crecimiento celular

Existen diferentes variables que se combinan para determinar si una célula se va a multiplicar o no *in vitro*, algunas que dependen directamente del medio de crecimiento y otras que no.

Medio de cultivo: debe poseer todos los nutrientes esenciales balanceados cuantitativamente. Se incluye toda la materia prima necesaria para la síntesis de macromoléculas celulares, sustrato para el metabolismo (energía), vitaminas y trazas de minerales cuya función primaria es catabólica, y una cantidad de iones inorgánicos con función metabólica.

Parámetros fisiológicos: temperatura, PH, osmolaridad, potencial redox, que deben mantenerse dentro de límites aceptables.

Sistema de cultivo: debe mantenerse libre de efectos tóxicos o inhibitorios incluyendo el efecto producido por exceso de componentes esenciales. Puede o no presentar un soporte de distinta naturaleza.

Densidad celular y modo de subcultivo: según el tipo celular y el tamaño del tubo o frasco de cultivo será el número de células a sembrar; siempre en relación estrecha con el volumen de nutrientes que permita su crecimiento normal, se respeta el ciclo celular particular. El modo de subcultivo estará determinado por la duración del ciclo celular que en los cultivos en monocapa cubran la superficie del frasco o en los cultivos en suspensión agoten el medio de cultivo con el consiguiente cambio de coloración y pH.

Suero: se agrega a los medios basales definidos para estimular la multiplicación e interactúa con cada una de las otras variables del sistema. Sirve como una fuente de factores macromoleculares del crecimiento.

Las células se multiplican solamente si TODOS estos aspectos han sido considerados

Suero y su relación con otros requerimientos para el crecimiento

La razón por la cual el suero es un suplemento tan efectivo para promover la multiplicación celular es que contiene una gran cantidad de diferentes actividades promotoras del crecimiento. El suero completo contiene la mayoría de los nutrientes de bajo peso molecular (PM) necesarios para la multiplicación celular. El suero dializado mantiene varios nutrientes de bajo PM en forma combinada y posee además, otras actividades promotoras del crecimiento. Grandes cantidades de proteínas séricas permiten la multiplicación celular en presencia de concentraciones de nutrientes esenciales que son inadecuadas para el crecimiento. El suero dializado reduce también los efectos inhibitorios tanto de contaminantes como de nutrientes esenciales que están presentes en exceso. El suero puede asociar sustancias tóxicas del medio de cultivo, neutralizar la tripsina y otras proteasas, proveer de proteínas “carrier” para solubilizar sustancias insolubles en agua como lípidos y tiene la capacidad de proveer hormonas o factores de crecimiento de las mismas.

Medios de cultivo

Una vez conocidos los requerimientos básicos para cada tipo celular se prepara el medio de cultivo correspondiente, haciendo los controles pertinentes de esterilidad (caldo de cultivo, tioglicolato, caldo Sabouraud).

Originalmente los medios utilizados en cultivo de tejidos eran totalmente naturales, o sea, todos sus componentes eran sustancias biológicas complejas de las cuales no se conocía su composición cuali ni cuantitativa. Actualmente se utilizan medios semi-sintéticos o sintéticos donde se conocen sus composiciones cuali y cuantitativas pero contienen agregado de suero o plasma.

Los medios naturales más comunes son: HLS (hidrolizado de lactoalbúmina, -extracto de levadura, suero), EARLE (sales de Earle, -hidrolizado de lactoalbúmina y extracto de levadura), Suero diluido.

Los medios sintéticos o semi-sintéticos: 199, Eagle, MEM, F10, F12.

Además, hay que considerar que los cultivos celulares no tienen el mismo requerimiento durante toda su etapa de crecimiento. Cuando se repican las células se emplea un medio rico que permita el

desarrollo metabólico activo de las células.

Estos medios se denominan medios de crecimiento y contienen una gran proporción de suero. Una vez que el cultivo ha llegado a la fase estacionaria de su crecimiento, el medio empleado es medio de mantenimiento, tiene una proporción reducida de suero y no estimula la multiplicación celular pero si mantiene el metabolismo basal de las mismas.

Contaminaciones de los cultivos celulares

Los cultivos celulares pueden estar contaminados por hongos; bacterias, micoplasmas, virus, parásitos o células provenientes de otros tejidos. Erróneamente, se piensa que los tejidos obtenidos con técnicas asépticas de animales aparentemente sanos son estériles, sin embargo, es frecuente encontrar en ellos bacterias, micoplasmas, virus u otros microorganismos. La aceptación de este hecho ha conducido a un estudio intensivo de los contaminantes habituales mediante el desarrollo de métodos de detección, prevención y control.

Los hongos y las bacterias están distribuidos universalmente en la naturaleza y son relativamente resistentes a factores del medio ambiente tales como temperatura, radiaciones, desecación, etc. Pueden introducirse en los cultivos de diversas formas:

- asociados a las partículas de polvo arrastradas por corrientes de aire.
- por aerosoles producidos por el operador durante la manipulación de las células.
- por medios o equipos no estériles.

Los virus y micoplasmas están vinculados en la naturaleza principalmente con las células y fluidos corporales y son más sensibles que los hongos y las bacterias a factores ambientales. Las fuentes más importantes de contaminación con micoplasma son los aerosoles y los sueros usados en los medios de cultivo. Las vías de entrada de los virus son otros cultivos infectados, sueros o aerosoles.

Los virus contaminantes según que relación establezcan con las células se los divide en pasajeros, indígenas o crípticos.

La contaminación por protozoarios no es muy frecuente; sin embargo, la especie *Amebae* cuya forma enquistada está presente en el polvo, puede contaminar los cultivos cuando hay corrientes de aire.

Tres factores son los que determinan la efectividad de un test de esterilidad en un dado cultivo celular:

- Sensibilidad y espectro de los medios utilizados.
- Condiciones y tiempo de incubación.
- Tamaño de muestreo.

El medio utilizado para los tests debe ser sensible y poseer un espectro amplio para detectar bacterias anaeróbicas, hongos y micoplasmas en las pruebas rutinarias. El uso de medios hipertónicos permite detectar bacterias. Los caldos semisólidos son útiles para el desarrollo de microorganismos con diferentes requerimientos de oxígeno y nutrición. Los cultivos para bacterias y micoplasmas deben ser incubados anaeróbica y aeróbicamente para evitar la pérdida de detección de algunos microorganismos. Los cultivos de micoplasmas crecen mejor incubados en presencia de 5% de CO₂. Como los hongos y micoplasma son, en algunos casos, de crecimiento lento, los cultivos deben incubarse por períodos más prolongados. El tamaño de la muestra es importante debido a que los microorganismos contaminantes están presentes en baja concentración. En general la muestra debe representar 10 % del volumen total y debe estar diluída 10 % en el caldo de cultivo. Se

recomienda hacer los tests de esterilidad al comienzo, en la la mitad y al finalizar el cultivo celular.

Contaminación de los cultivos por otras células

Una contaminación muy frecuente y en general no considerada por los investigadores que trabajan en cultivos celulares, es la contaminación cruzada entre cultivos celulares tanto intra como interespecífica.

En los últimos años se han documentado varias instancias de contaminación cruzada entre cultivos celulares y esto ha sido posible debido a la existencia de fuentes que proveen líneas certificadas y a las cuales se puede recurrir cuando se sospecha la existencia de una contaminación. Aproximadamente entre 20 % y 30 % de los cultivos presentan contaminación inter o intraespecífica y se cree que este valor es más alto debido a la gran cantidad de cultivos contaminados sobre los cuales no hay sospecha.

El problema de la contaminación cruzada es sustancial y persistente y aflige a cualquier laboratorio que utilice cultivos celulares. Es necesario el control de los cultivos para su identificación. En general este control utiliza expresiones fenotípicas celulares que sean genéticamente estables. Los controles más empleados para detectar una contaminación interespecie son análisis citogenético, hemoaglutinación, citotoxicidad, aglutinación mixta y anticuerpos fluorescentes. Para contaminaciones intraespecie los métodos son: perfiles de isoenzimas, fusión e hibridación y estudios citogenéticos.

Prevención de la contaminación

Lo más conveniente es eliminar el pipeteo por boca, usar técnica rígidas de esterilización, técnicas asépticas, probar los sueros antes de usarlos e inactivarlos a 56° C durante 30 min o filtrarlos mediante un poro de 220 nm, probar la tripsina y filtrarla por poro de 100 nm, trabajar en condiciones de filtrado de aire en los recintos, trabajar en cámaras con flujo laminar, decontaminar el área de trabajo diariamente y entre pasos de la manipulación de líneas celulares distintas.

El uso de antibióticos se restringe a las células que se utilizan para realizar las distintas experiencias de laboratorio, y se recomienda no emplearlos en el stock de células. Los requerimientos básicos de un antibiótico a usar en un medio de cultivo son:

- el antibiótico debe eliminar el contaminante. Es preferible usar bactericidas y no bacteriostáticos

Trabajos Prácticos Nº 10 y 11

Procedimiento para la realización del cultivo de linfocitos de sangre periférica de mamíferos

1. Obtención de la muestra

El paso inicial para la realización del cultivo, es la obtención de una muestra estéril de sangre entera (10 ml), utilizando para ello una jeringa con un anticoagulante (Heparina, por ejemplo), lo que evitará la coagulación de la sangre. Es de esperar, que cuanto más fresco sea el material, mayor será la viabilidad celular y por lo tanto mejor resultará el cultivo; no obstante, puede conservarse en la heladera por algún tiempo (hay experiencias de hasta 5 días o una semana) y siempre, antes de su utilización, será obligatorio un control de la viabilidad celular.

2. Siembra de la muestra

- Para el presente Trabajo Práctico, se preparan 10 ml de medio MEM en un frasco de vidrio debidamente tapado y cuidando de mantener las condiciones de esterilidad, al cual se le adiciona 0,05 ml de suero fetal bovino (SFB), 0,1 ml de antibiótico (penicilina, estreptomycin o gentamicina, según la disponibilidad del momento) y 0,02 ml (2 gotas de pipeta de 1 cc o jeringa de tuberculina) de fitohemaglutinina (FHA). Estos componentes pueden variar en sus proporciones según el protocolo que se siga.
- Se agrega a continuación el volumen de sangre (1cc o 25 gotas de jeringa de 5-10cc) y se coloca por 72 – 96 hs en estufa a 37° C.
- Pasado este tiempo, se agregan 0,1 cc de colchicina (concentración 1 µg/ml de cultivo) y se deja durante 30 minutos a 37 °C.
- Se recupera todo el contenido del frasco en tubos cónicos de centrifuga.
- Se centrifuga durante 5 minutos a 800 rpm.
- Se elimina el sobrenadante y se agrega solución hipotónica de KCL 0,075 M hasta duplicar aproximadamente el tamaño del pellet. Es recomendable que la solución hipotónica se encuentre a 37° C antes de ser agregada al cultivo. A continuación, se resuspende MUY CUIDADOSAMENTE sin burbujear y se lleva a 37° C por espacio de 10 – 15 minutos
- Se centrifuga durante 5 – 6 minutos a 800 rpm.
- Se elimina el sobrenadante y se agregan 2 ml aproximadamente de fijador 3:1 (3 partes de metanol: 1 parte de acético glacial), el cual debe haber sido preparado unos minutos antes y enfriado en el freezer. Se debe colocar el fijador poco a poco con una pipeta Pasteur por las paredes del tubo, tratando de hacerlo penetrar hasta el fondo del *pellet*. Las células fijadas son fácilmente distinguibles debido a su coloración más oscura.
- Una vez que se alcanzó la fijación de todo el *pellet* (botón celular), se procede a una resuspensión suave del mismo.
- A continuación, se procede a 2 o 3 series de lavados (como mínimo), resuspensión y centrifugación con fijador 3:1.
- Se toman portaobjetos bien limpios y desengrasados, utilizando para su higiene etanol 70 % y se los coloca sobre una capa de hielo durante unos minutos, hasta que estén bien empañados.
- Se arroja sobre cada portaobjetos de 3 a 5 gotas del cultivo, dependiendo de la concentración del *pellet* celular utilizando una pipeta Pasteur, de manera de cubrir toda la superficie. A continuación, se procede al secado, el cual se realiza utilizando aire caliente de un mechero (CUIDANDO DE NO QUEMAR EL PREPARADO!!) o bien con secador de cabello en tibio o bien al aire a temperatura ambiente.
- Una vez seco, el material se tiñe con una solución de Giemsa 3 % en agua destilada durante 3 – 5 minutos.

Actividades

1. Observación y dibujo de metafases mitóticas
2. Cálculo del índice mitótico a partir de 1000 células observadas.

Bibliografía

- Morgan Harris. Cell culture and somatic variation. Ed. Holt, Rinehart and Winston, 1964.

- Ian R Freshney. Culture of Animal Cells. A manual of basic technique 2000. 4th Ed. Willey-Liss. NY. 577 pp.
- Ram S. Verma & Arvind Babu. Human Chromosomes. Principles and Techniques. 2nd Ed. Mc Graw-Hill, Inc. NY. 419pp, 1995.
- Parker R.C. Métodos de cultivo de los tejidos y las células. Ed. Atika S.A. Madrid, 1967.

IDENTIFICACIÓN DE LOS CROMOSOMAS MEDIANTE TÉCNICAS DE BANDAS CROMOSOMICAS

Objetivos

Realización de preparaciones para obtención de bandas G en cromosomas de mamífero y bandas C en vegetales.

Identificación y cariotipado de diversas especies de mamíferos y vegetales a partir de cromosomas con bandas C y G.

Conceptos básicos

El cariotipo que es posible elaborar mediante la técnica de tinción uniforme da una información muy limitada, ya que no permite la identificación individual de cada cromosoma. Las técnicas de bandas cromosómicas han colaborado notablemente en la ampliación de la información acerca, no sólo de la morfología cromosómica sino de sus cambios en los reordenamientos estructurales. Además de la construcción más ajustada de cariotipos, las técnicas de bandas permiten la descripción detallada de cada cromosoma y de cambios cromosómicos, localización de marcadores y la comparación de cromosomas entre especies relacionadas o dentro de una misma especie.

Las bandas cromosómicas se corresponden con variaciones en la estructura longitudinal de la cromátide/a, puestas en evidencia por las distintas técnicas de tinción. Cada par de cromosomas homólogos se diferencia de los otros pares por su contenido de secuencias de ADN repetitivo y por la constitución de la cromatina en términos de secuencias de bases. Las técnicas de bandas cromosómicas más utilizadas son **G, Q, R, C, DAPI y NOR**.

Organización cromosómica

Las moléculas de ADN asociadas con proteínas y ARN pasan a través de diferentes grados de compactación durante los diversos estadios del ciclo celular y es sólo en el estadio de máxima compactación durante la mitosis cuando pueden ser observados los cromosomas como entidades bien definidas.

Varios tipos de estructuras pueden ser observadas de acuerdo con los tratamientos o tinciones en la examinación cromosómica:

- **Eucromatina:** revelada por métodos de tinción que producen las llamadas bandas Q, G y R, corresponde al ADN que se transcribe. El nombre viene de **Q**uinacrina, **G**iemsa y **R**everse respectivamente. Algunos de los patrones que se producen pueden ser superpuestos:
 - bandas Q⁺ fluorescentes = bandas G⁺ fuertes = bandas R⁻ débiles
 - bandas Q⁻ poco fluorescentes = bandas G⁻ débiles = bandas R⁺ fuertes.
- **Heterocromatina constitutiva:** se tiñe con bandas C (centrómero). Es la fracción de cromatina que no se descondensa durante la interfase y la cual está presente en todos los cromosomas de casi todas las especies. Contiene ADN altamente repetitivo, rico en AT o GC y se replica tardíamente en la fase S.

- **Regiones teloméricas:** son reveladas con bandas T (Terminal). Compuestas por euromatina ya que constituyen una subfracción de las bandas R. Se hallan en telómeros y contienen repeticiones en tandem ricas en GC. Estas secuencias pueden ser detectadas por hibridación *in situ* con sondas de ADN telomérico.
- **Centrómeros:** aparecen luego de tinción con Giemsa. Pueden ser vistos por técnicas de inmunofluorescencia ya que estas estructuras contienen una región cinetocórica rica en proteínas específicas y ADN, considerado como heterocromatina constitutiva. Presentan regiones que son ricas en ADN repetitivo llamado satélite que también se puede caracterizar y poner en evidencia por la acción de distintas enzimas de restricción (ERs)
- **Organizadores nucleolares:** bandas NORs, se tiñen con plata y se encuentran en general asociados a regiones teloméricas si bien pueden tener también ubicación intersticial, correspondiendo siempre a la constricción secundaria ya que la primaria es el centrómero donde no hay NORs.

Técnicas basadas en la estructura del ADN

Las células no requieren tratamientos previos durante la fase de cultivo.

Bandas Q

Principio

Las bandas Q son producidas por tinción con Quinacrina, un fluorocromo que se pega al ADN por intercalación entre los planos de las sucesivas pares de bases o por uniones iónicas. La unión ocurre preferencialmente con pares AT y la fluorescencia de la quinacrina que se une a los pares AT es más alta comparada con la que se une a GC. Esta característica puede constituir la base de las bandas Q dado que los pares AT contenidos en el ADN varían a lo largo de los cromosomas. Sin embargo, esta hipótesis no explica por qué la quinacrina falla al teñir ciertas regiones heterocromáticas también ricas en AT.

Protocolo

1. Incubación 10 min a T° ambiente con solución 1X de Quinacrina
2. Lavado con Buffer Sorensen pH 6,8
3. Montaje y examinación con microscopio de fluorescencia

Observaciones

Los cromosomas muestran una serie de regiones brillantes y oscuras de diferentes tamaños de disposición longitudinal abarcando todo el (t, A) o los brazos cromosómicos (sm y m). La intensidad de la fluorescencia gradualmente disminuye durante la exposición a UV y por esta razón, las metafases con nítidas bandas deben ser fotografiadas rápidamente. La ventaja de las bandas Q es que no altera la estructura de los cromosomas, pudiéndose utilizar el preparado posteriormente para un sistema de bandas secuenciales.

Bandas G

Principio

Corresponden a los cromómeros de los cromosomas observados en paquitene sin tratamiento. Utiliza tanto los efectos de enzimas proteolíticas (tripsina) como la de una suave desnaturalización que

afectan las interacciones que estabilizan la estructura de las diferentes proteínas y ácidos nucleicos que componen la cromatina.

Varias hipótesis explican el mecanismo de las bandas G:

- El mecanismo se basa principalmente en las diferencias de composición proteica a lo largo de los cromosomas.
- Las bandas G causan reordenamientos cromatínicos llevando a la exposición de bandas similares al de los cromosomas meióticos.

La primera hipótesis está sustentada por el patrón característico de bandas R en secuencia ALU y secuencia KpnI en bandas G, las cuales varían en cuanto a su composición de bases.

La segunda sugiere que los tratamientos usados en bandas G tal como el de digestión previa y parcial con tripsina, lleva al despliegue de los *loops* de cromatina y permiten que el Giemsa tiña el esqueleto proteico asociado con los alineamientos en el cromosoma de las regiones ricas en AT.

Protocolo

1. Lavado con agua destilada
2. Incubación 10 – 20 segundos a T° ambiente con solución 0,25% de tripsina
3. Lavado con PBS para bloquear la tripsina
4. Tinción con solución de Giemsa (1:10 en agua destilada)
5. Montaje y examinación con microscopio óptico con filtro verde

Observaciones

Los patrones obtenidos son casi idénticos al que presentan las bandas Q. El patrón de bandas G no es fácilmente reproducible, dependiendo de la calidad de preparación y la edad de los preparados.

Bandas R

Principio

Las bandas R se corresponden con regiones ricas en GC, o sea, corresponde a un alineamiento cromosómico base específico. Esto se sustenta por:

- Tratamientos que sistemáticamente producen bandas R, involucran desnaturalización seguida por renaturalización diferencial del ADN y es sabido que un ADN enriquecido con secuencias GC es más resistente a la desnaturalización. Estos tratamientos entonces permiten que regiones de ADN desnaturalizado (bandas R) ricas en GC pero no ricas en AT (bandas G) se renaturalicen.
- Los patrones de bandas R pueden ser obtenidos sin desnaturalización mediante el uso de componentes fluorescentes tales como la cromomicina A₃ y la mitramicina, los cuales tienen alta afinidad por regiones ricas en GC.
- Las bandas R en humanos contienen secuencias ALU que se desnaturalizan más lentamente y se renaturalizan más rápidamente que las secuencias KpnI debido a que las primeras son más ricas en GC que las últimas, más cortas y por lo tanto menos complejas y a menudo, presentan también repeticiones invertidas.

Protocolo

1. Incubación a 87° C por 30 – 90 min con una solución Earle 1X a pH 5,3
2. Incubación a 87° C por 30 min con una solución Earle 1X a pH 6,5
3. Enjuagar con agua corriente
4. Tinción con solución de Giemsa (1:10 en agua destilada)

5. Montaje y observación en microscopio de contraste de fase con filtro naranja

Observaciones

Los cromosomas muestran una serie de bandas brillantes y opacas fluorescentes en mayor o menor medida, que son las inversas a las bandas Q o G.

Bandas DAPI

Principio

DAPI es un fluorocromo que tiene afinidad por las regiones AT y además produce un patrón de bandas similar al de las bandas Q. Raramente se usa sólo y usualmente está asociado con uno de contraste como la distamicina A. Esta asociación intensifica el teñido de ciertas regiones.

Protocolo

1. Incubación en oscuridad durante 15 – 30 min con *buffer* Macllvaine´s pH 7, conteniendo DAPI en una concentración de 0,04 µg/ml.
2. Enjuague con el mismo *buffer*.
3. Montaje y observación en microscopio de fluorescencia.

Tinción de heterocromatina: Bandas C

Principio

La técnica de bandas C tiñe selectivamente la heterocromatina constitutiva en todos los estadios del ciclo celular. En los cromosomas mitóticos, las bandas C están principalmente localizadas en las regiones centroméricas. Las bandas C son reveladas por sucesivos tratamientos con ácido, álcali y sal a alta temperatura seguido de una tinción con Giemsa. Estos tratamientos extraen preferencialmente el ADN de las regiones que no se corresponden con las zonas oscuras que se revelan a nuestra vista como bandas C, dejando intacto el ADN de la heterocromatina constitutiva el cual es el que se tiñe intensamente con Giemsa y por eso lo vemos oscuro respecto del resto del cromosoma.

Las condiciones ácidas hidrolizan los enlaces glicosídicos entre las bases púricas del ADN y el azúcar, las condiciones alcalinas desnaturalizan el ADN y la condición salina, a alta temperatura, rompe el ADN en pequeños fragmentos, los cuales son extraídos. La alta resistencia a la extracción del ADN localizado en las bandas C puede estar relacionada con la presencia de proteínas no histónicas fuertemente pegadas a la heterocromatina y la rápida renaturalización de las secuencias de ADN altamente repetitivo que contiene las bandas C.

Protocolo

1. Hidrólisis en una solución de HCl 0,2N a 60°C durante un minuto.
2. Incubar en solución de Ba (OH)₂ 5% o de NaOH a T° ambiente por 10 – 12 min.
3. Lavar bajo agua corriente durante 1 minuto.
4. Incubar en 2xSSC (solución de ClNa y citrato de sodio) a 60°C por 10 min.
5. Después de un rápido lavado en agua destilada, los preparados se colorean en Giemsa 3% en buffer fosfato pH 6,8-7,0 controlando la coloración bajo microscopio.
6. Interrumpir la coloración mediante un breve enjuague en agua destilada.
7. Dejar secar y montar en medio de montaje DPX.

Observaciones

En cromosomas humanos, todas las regiones centroméricas se tiñen y contienen ADN alfa repetitivo. Los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos también se tiñen. Su composición es compleja dado que contiene varios tipos de ADN repetitivo. Se ha visto que las regiones centroméricas de cromosomas de mamíferos en general son teñidas con bandas C. Hay distintas bandas C por su localización en el cromosoma metafásico (Figura 2).

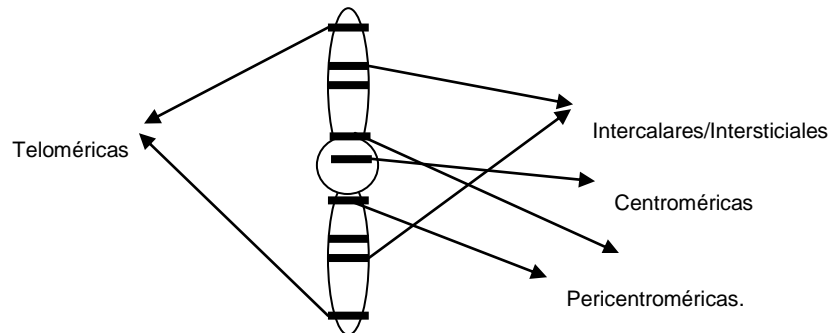


Figura 2. Localización posible de bandas C en un esquema de cromosoma eucarionte.

Tinción de regiones de organizadores nucleolares (NOR)

Principio

Los NOR es el sitio cromosómico que contiene los genes para el ARN ribosomal y en el cual se forma el nucleolo. Los NORs pueden ser revelados en los cromosomas luego de tratamiento en condiciones alcalinas que causan la extracción del ADN, ARN e histonas, seguido de una tinción con nitrato de plata que reacciona con las proteínas asociadas específicamente con los NORs. Sólo aquellos NORs que hayan participado en la formación de nucleolos durante la interfase que precedió a la digestión celular son revelados por el nitrato de plata. Esto indica que las proteínas teñidas por el nitrato de plata son aquéllas envueltas en la transcripción de los genes de ARN ribosomal.

Protocolo

1. Incubación en *buffer* borato pH 9,2 por 30 min a temperatura ambiente.
2. Enjuague con agua destilada y secado.
3. Tratamiento con una solución 50% de nitrato de plata e incubación en baño de agua a 65° C por 1 hora.
4. Enjuague con agua destilada y tinción con Giemsa 1% por 1 minuto.
5. Montaje y observación en microscopía óptica.

Trabajos Prácticos Nº 12 y 13

Actividades

1. A partir de preparaciones cromosómicas realizadas por aplastamiento de cromosomas vegetales tratados con venenos mitóticos (Colchicina, 8 Hidroxiquinoleina) y de suspensiones celulares de humanos, se realizarán las técnicas de bandas C y G aplicando los protocolos descritos

previamente.

2. A partir de la utilización de estas técnicas se procederá a la identificación de los cromosomas y a la confirmación de los cariotipos de las especies estudiadas por el armado de metafases con bandas.

Bibliografía

- Sumner, A. T. Chromosomes: organization and function. 1ra. edn, (Blackwell Science Ltd, 2003).
- Lacadena, J.R. Citogenética.(Editorial Complutense. 931pp, 1996).
- Macgregor, H.C. An introduction to animal cytogenetic. 1 edn, (Chapman & Hall, 1993).
- Popescu, P., Hayes, H. & Dutrillaux, B. Techniques in Animal Cytogenetics (Principles and practice). (Springer-Verlag, 2000).
- Mahabal Ram. Fundamentals of Cytogenetics and Genetics. PHI Learning Pvt. Ltd., pp. 653, 2010.

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANORMALIDADES CROMOSÓMICAS EN MITOSIS Y MEIOSIS

Objetivos

Detectar y caracterizar una anomalía cromosómica numérica en cariotipos con cromosomas mitóticos con bandas G.

Detectar y caracterizar una anomalía cromosómica estructural en cariotipos mitóticos de cromosomas con bandas G.

Detectar y caracterizar las configuraciones meióticas que presentan organismos con diferentes reordenamientos estructurales y/o numéricos en homocigosis y heterocigosis.

Conceptos básicos

El análisis del cariotipo en el hombre permite la identificación de alteraciones cromosómicas que pueden ser causa de síndromes clínicos, infertilidad o repetición de abortos entre otras manifestaciones clínicas. En la actualidad se conocen más de 100 síndromes asociados a anomalías cromosómicas. Estas alteraciones pueden estar presentes en todas las células del individuo o, menos frecuentemente, en forma de mosaicismo.

En el cariotipo humano, las alteraciones cromosómicas pueden estar presentes en 0,7 % de los nacidos muertos, 2 % de los embarazos (en mujeres menores de 35 años) y 50 % de los abortos espontáneos. Por otra parte, las alteraciones cromosómicas tienen un papel importante en la patogénesis del cáncer. En determinadas neoplasias las células tumorales presentan números anormales de cromosomas, mientras que sus células se corresponden con el cariotipo humano normal. También existen casos de neoplasias hereditarias en los cuales un individuo ha heredado una alteración cromosómica que lo predispone a un determinado tipo de cáncer.

Las alteraciones cromosómicas se clasifican en **numéricas** y **estructurales**. Las alteraciones numéricas más frecuentes son las aneuploidías. Dentro de ellas las más importantes son las trisomías 21, 13 y 18 y las que afectan a los cromosomas sexuales: 47, XXY; 47, XYY; 47, XXX; 45, X. Entre las alteraciones estructurales, las más importantes son las translocaciones (recíprocas o robertsonianas) que presentan una frecuencia de 1/500 no nacidos.

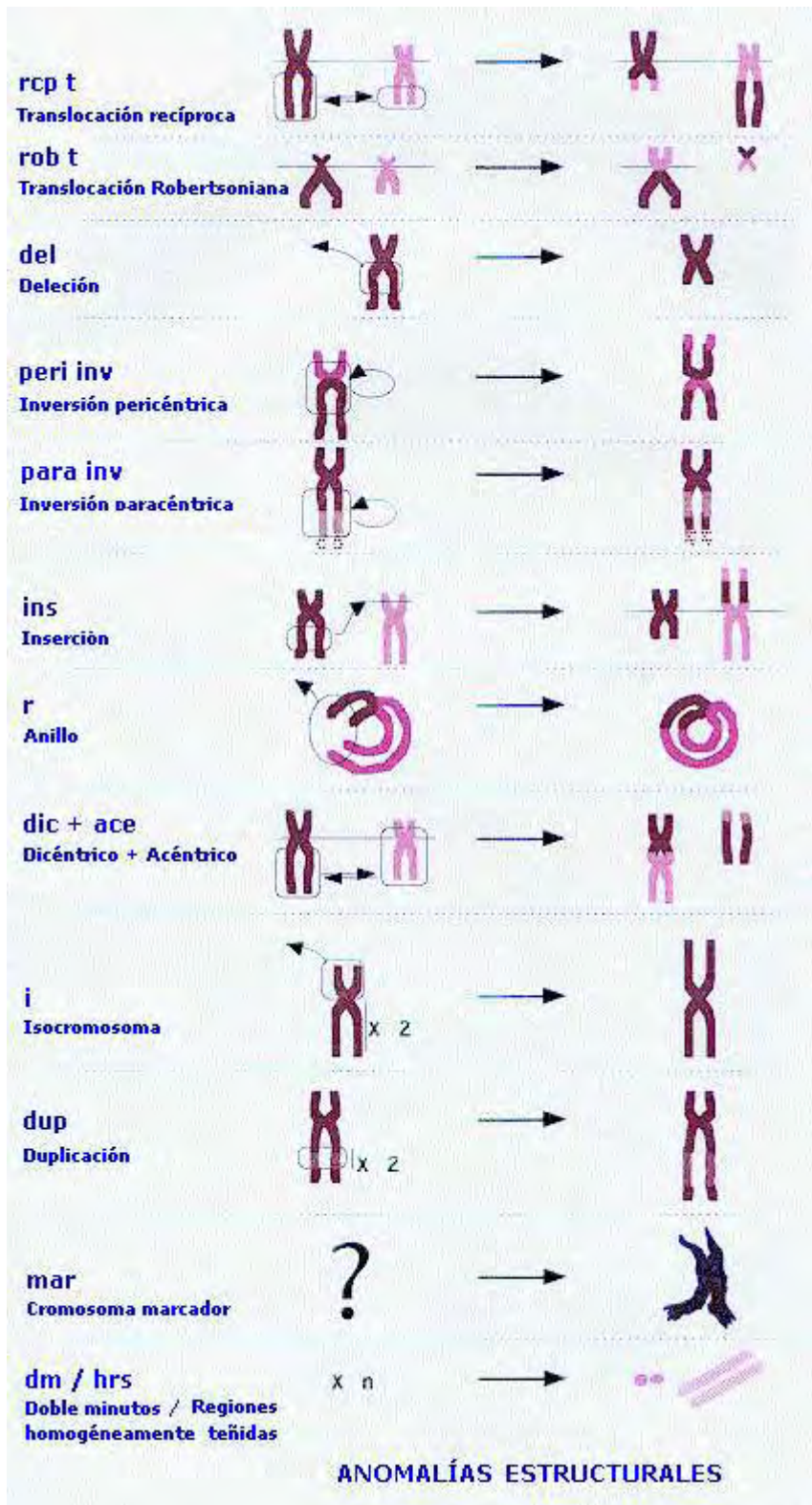


Figura 1. Principales anomalías estructurales. Imagen tomada de Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology

Trabajos Prácticos N° 14 y 15

Actividades

1. A partir de preparaciones realizadas con material vegetal (*Rhoeo discolor*, *Secale cereale* y distintas especies de Compositae) y animal (distintas especies de ortópteros) deberán observar, dibujar e interpretar los diferentes tipos de alteraciones presentes.

Bibliografía

- Solari, A. J. Genética Humana. Fundamentos y aplicaciones en medicina. (Editorial Médica Panamericana, 2004).
- Sumner, A. T. Chromosomes: organization and function. 1ra. edn, (Blackwell Science Ltd, 2003).
- Lacadena, J.R. Citogenética.(Editorial Complutense. 931pp, 1996).
- Griffiths A.J.F., Wessler S.R., Lewontin R.C., Carroll, S.B. Genética. 9º edn. Mc Graw Hill, 840 pp. 2008.
- Mahabal Ram. Fundamentals of Cytogenetics and Genetics. PHI Learning Pvt. Ltd., pp. 653, 2010.

EVOLUCION DEL CARIOTIPO EN ESPECIES VEGETALES Y ANIMALES

Objetivos

Conceptos básicos

El conjunto de características morfológicas externas de los cromosomas de un individuo, especie o taxón mayor, clasificado de una manera sistemática en la que los pares de cromosomas se ordenan en relación con su tamaño y forma se denomina cariotipo. Las características estructurales y cuantitativas del cariotipo son importantes en investigaciones taxonómicas y evolutivas. Los taxónomos y evolucionistas están familiarizados con el hecho de que los cromosomas son parte de un sistema dinámico que está moldeando el proceso de evolución. Esta variación se expresa en características fácilmente analizables como el número, forma y tamaño de los cromosomas y no está relacionada con complejidad genética u orgánica.

Cromosomas y evolución

Los cambios genotípicos son los eventos básicos que proporcionan el material para el proceso evolutivo, ya que pueden producir nuevos fenotipos que, mediante interacciones con los factores ambientales y a través de varias generaciones, pueden originar nuevas especies. Los cambios en el genoma pueden ser cambios génicos o cambios cromosómicos, que también pueden implicar cambios génicos.

La citogenética evolutiva estudia las formas cromosómicas de las especies actuales y, mediante la comparación de sus cariotipos, hace inferencias sobre los cambios cromosómicos (reorganizaciones) que se han podido producir a lo largo del proceso evolutivo de los diferentes grupos taxonómicos, sean o no la causa del proceso de divergencia de las especies. A pesar de que se pueden identificar las reorganizaciones cromosómicas que explicarían la separación entre especies, la existencia de reorganizaciones cromosómicas no sería la única causa de especiación. Sin embargo, en los primates y en los mamíferos en general, la mayoría de las especies se caracterizan por presentar un cariotipo propio, lo que indica que se han producido cambios cromosómicos íntimamente asociados a su divergencia, o posteriores a la misma, que se han fijado en las diferentes especies. En la literatura existen numerosas publicaciones que insisten en la implicancia de las reorganizaciones cromosómicas en el proceso de especiación (Wilson y col. 1975; Coyne 1984; King 1987).

Además del número y morfología cromosómica, es importante analizar la distribución y cantidad de heterocromatina mediante distintas técnicas de bandas, distinguir citoquímicamente tipos de heterocromatina utilizando fluorocromos, localizar las regiones organizadoras del nucleolo y, en algunos casos, identificar ADN genómico satélite y relacionarlo con bandas heterocromáticas. Varios parámetros del cariotipo pueden ser alterados por reordenamientos estructurales. En algunos casos puede variar el número cromosómico y la simetría del cariotipo. Un ejemplo de este caso lo constituyen las fusiones céntricas entre cromosomas con centrómero subterminal produciendo cromosomas metacéntricos de mayor tamaño, con o sin eliminación de regiones centroméricas. El fragmento con centrómero puede persistir como un cromosoma supernumerario o cromosoma B.

El número cromosómico también puede variar por poliploidía. Nuevos números básicos que no tengan relación directa con los ancestrales pueden surgir si ocurren nuevas reestructuraciones o hibridación entre poliploides con distintos números básicos (Poggio, 1994).

En otros casos no se encuentra variación en el número cromosómico, ya que en muchos géneros el número y, a veces, la morfología cromosómica son constantes entre las distintas especies que lo componen.

Variaciones en el cariotipo pueden ocurrir sin cambios notorios en el exofenotipo. Sin embargo, reordenamientos en condiciones heterocigota pueden ocasionar disturbios en el apareamiento meiótico e iniciar aislamiento reproductivo. Si se dan las condiciones adecuadas para la fijación de estos reordenamientos pueden iniciarse eventos especiogénicos que involucren reordenamientos cromosómicos. Estos procesos pueden conducir, en algunos casos, a la existencia de especies crípticas o hermanas, con pocas diferencias a nivel bioquímico o morfológico pero con diferencias cromosómicas que las mantendrían aisladas reproductivamente (Poggio, 1994).

Un análisis más preciso de la variación cariotípica puede obtenerse empleando técnicas de bandas que revelan marcadores cromosómicos (secuencias de ADN altamente repetidas ricas en AT o GC, regiones organizadoras del nucleolo, etc.) (Sumner, 1990). La técnica de bandas C es la que se utiliza de rutina y revela heterocromatina constitutiva compuesta por secuencias cortas repetidas en tandem. La heterocromatina constitutiva es un componente aditivo del genoma y presenta, en muchos grupos, variación intra e interespecífica. Aunque la heterocromatina constitutiva no contiene genes activos, podría tener importancia en eventos regulatorios, en el desarrollo y en la organización tridimensional de los cromosomas en el núcleo.

Bennett (1983, 1988) crea el término “cariotipo natural” para referirse al ordenamiento de los cromosomas de acuerdo a la posición real que los mismos ocupan en el núcleo interfásico. El modelo de Bennett y colaboradores postula que los genomas haploides están separados espacialmente y que la posición relativa de los cromosomas que lo componen estarían determinados por el volumen de los mismos (Heslop-Harrison y Schwarzscher, 1993). Este modelo explica por qué cromosomas no homólogos de tamaño semejante poseen patrones de bandas similares. Diversos mecanismos moleculares amplificarían secuencias repetidas y éstas se transpondrían sobre brazos contiguos en interfase (Kenton, 1991). Este modelo de organización supracromosómica en los núcleos eucariontes no es universal pero es indudable que la información genética no está contenida caóticamente en el núcleo sino que está ordenada de acuerdo a patrones que actualmente no conocemos. La evolución del cariotipo puede ser analizada a través del desarrollo de técnicas diversas que poseen distinto grado de complejidad y permiten explicar distintos aspectos de la evolución cromosómica.

Cambios cromosómicos

Los mecanismos de reparación del ADN no siempre son eficaces en la reparación de las lesiones producidas; por ello, tras una rotura cromosómica se pueden producir reorganizaciones de la cromatina. Las roturas cromosómicas son generalmente reparadas volviendo a unir los extremos rotos, y dejando a los cromosomas intactos. Sin embargo, los extremos rotos pueden unirse a otros extremos rotos en el mismo cromosoma o a extremos rotos de otros cromosomas no homólogos. Las roturas cromosómicas que favorecerán la formación de reorganizaciones, pueden ser inducidas experimentalmente mediante radiaciones ionizantes (Evans, 1962). Sin embargo, los cromosomas

también pueden presentar roturas, sin la acción de agentes externos conocidos, probablemente debido a errores en la maquinaria de replicación y de reparación del ADN.

La mayoría de autores está de acuerdo en considerar que las reorganizaciones cromosómicas podrían ser uno de los factores implicados en la divergencia de las especies, produciendo una barrera de fertilidad que podría actuar como mecanismo de aislamiento reproductivo. Las reorganizaciones cromosómicas pueden interferir en el curso de la meiosis, y provocar la formación de gametos desequilibrados en el individuo heterocigoto (White 1973; Fredga 1977; Lande, 1979; Bengston, 1980). Sin embargo, no todas las reorganizaciones cromosómicas producen gametos desequilibrados en la meiosis y, en consecuencia, disminución en la fertilidad del híbrido.

Desde un punto de vista teórico se pueden clasificar los cambios cromosómicos en dos categorías: a) reorganizaciones cromosómicas (inversiones, translocaciones recíprocas, activaciones/inactivaciones centroméricas, fusiones y fisiones) que pueden tener consecuencias en el comportamiento meiótico de los mamíferos y b) cambios cromosómicos (por ejemplo, variaciones cuantitativas y de localización de la heterocromatina constitutiva) sobre los que no hay evidencias claras que determinen su implicación en el aislamiento reproductivo.

Reorganizaciones cromosómicas y evolución

Modelo del Tamaño de la Población (Lande, 1979): está basado en las observaciones de Wright (1941) sobre la disminución en la fertilidad de los híbridos para algunas reorganizaciones cromosómicas, con respecto a los homocigotos para la forma cromosómica original o para la nueva forma cromosómica (Figura 1).

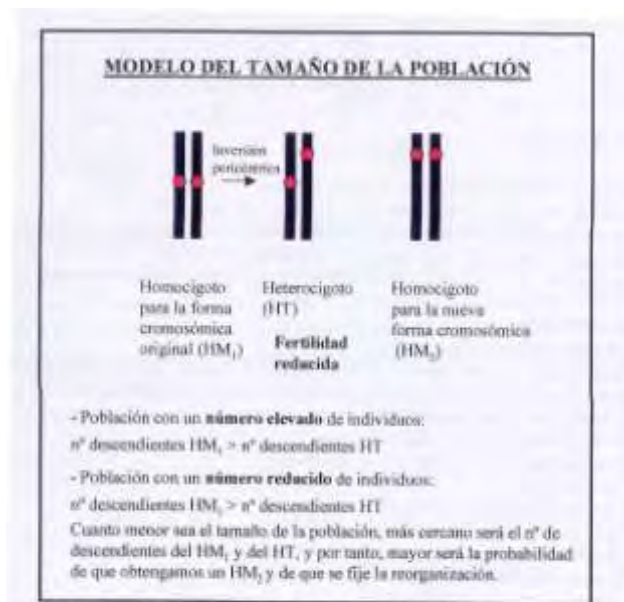


Figura 1. Figura tomada de: García-Haro, F. 2001. Evolución cromosómica en Simiiformes. Homologías, Reorganizaciones y Heterocromatina. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, España.

<http://tdx.cat/handle/10803/3724>

Si el tamaño de la población en la que ha aparecido la nueva forma cromosómica es grande, hay pocas posibilidades de que ésta se fije. En cambio, si el tamaño de la población es pequeño, o se

trata de un grupo semiaislado dentro de una población grande, hay más posibilidades de que se originen individuos homocigotos para la nueva forma cromosómica y por tanto, de que ésta se fije en la población. Este hecho podría conducir a la separación de los individuos homocigotos para la forma cromosómica original, de los homocigotos para la nueva. Una variante de este modelo sería el caso de especies que presentan una estructura social con un grupo numeroso pero con un macho dominante. En este caso, a pesar de existir varios machos, el dominante es el que tiene más posibilidades de reproducirse, y por tanto, un cambio cromosómico en los gametos del macho dominante podría propagarse en la población y por tanto, podría fijarse.

Modelo del Cariotipo Adaptativo (Bickham y Baker, 1979): es una extensión de la teoría de la selección natural de Darwin (Figura 2).

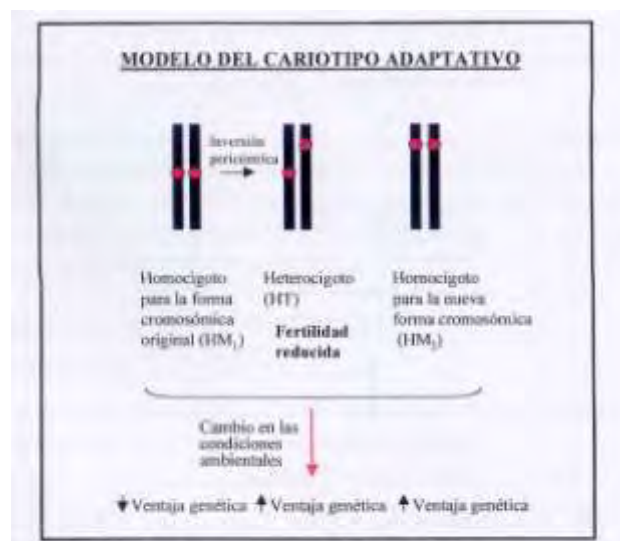


Figura 2. Figura tomada de: García-Haro, F. 2001. Evolución cromosómica en Simiiformes. Homologías, Reorganizaciones y Heterocromatina. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, España. <http://tdx.cat/handle/10803/3724>

Este modelo está basado en la idea de que el cariotipo es adaptativo y bajo determinadas circunstancias, la selección natural puede favorecer la incorporación de una nueva forma cromosómica. Este modelo se puede aplicar sólo si se cumplen tres premisas: 1) la nueva forma cromosómica proporciona al poseedor un beneficio genético; 2) el beneficio genético lo poseen tanto el heterocigoto como el homocigoto para la nueva forma cromosómica y 3) la magnitud del beneficio es mayor que la disminución en la fertilidad del heterocigoto. En este modelo, el tamaño de la población no es un factor importante ya que la ventaja del heterocigoto es mayor que la del homocigoto para la forma cromosómica original. Además, el homocigoto para la nueva forma cromosómica posee las ventajas que le confiere la nueva forma cromosómica, y carece de los problemas meióticos del heterocigoto.

Como se acaba de detallar, las reorganizaciones cromosómicas pueden simplemente establecerse de forma polimórfica en la población y no originar, por tanto, problemas meióticos, o pueden provocar la aparición de gametos desequilibrados y, por tanto, aislamiento reproductivo. Una reorganización cromosómica compleja puede aparearse de formas diferentes y segregarse de forma equilibrada en un individuo y de forma desequilibrada en otro. Por tanto, el que se produzcan problemas meióticos o no

como consecuencia de una reorganización cromosómica parece depender, además del tipo de reorganización, del proceso meiótico de cada individuo.

A modo de resumen, se pueden establecer cuáles serían las condiciones para que una reorganización cromosómica que puede provocar problemas meióticos, y por tanto iniciar el proceso de especiación mediante el aislamiento reproductivo, pueda fijarse en una población (Figura 3).



Figura 3. Figura tomada de: García-Haro, F. 2001. Evolución cromosómica en Simiiformes. Homologías, Reorganizaciones y Heterocromatina. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, España.

<http://tdx.cat/handle/10803/3724>

Análisis meiótico en híbridos y poliploides vegetales

Una especie diploide con reproducción sexual para ser fértil debe poseer un comportamiento meiótico normal, i.e. debe poseer buen apareamiento entre cromosomas homólogos y, consecuentemente, formación de bivalentes. Ello determina que exista buena segregación y formación de gametos balanceados y fértiles. En general, el grado de apareamiento meiótico es una medida de la homología que existe entre los cromosomas de una dada especie. Esto es cierto cuando son normales los genes que regulan fisiológicamente todas las etapas y procesos de la división meiótica.

Estos principios han permitido realizar rápidas evaluaciones de la homología genómica entre dos entidades vegetales por medio del estudio meiótico de su híbrido F1, cuando éstos han sido posibles de obtener artificialmente o se los ha encontrado en poblaciones naturales. Si el híbrido analizado es fértil y posee formación de bivalentes se puede concluir que hay afinidad (homología) entre los genomas parentales. El grado de irregularidades meióticas es una estimación de diferencias génicas y estructurales de las entidades en estudio. Configuraciones meióticas anormales como univalentes, bivalentes heteromórficos o multivalentes en profase-metafase I y, en estadios posteriores (puentes, fragmentos, cromosomas con cromátidas desiguales, husos multipolares, etc.), pueden deberse a heterocigosis para distintos tipo de reordenamientos estructurales. Si el híbrido es estéril habrá que

analizar si el aislamiento reproductivo postcigótico obedece a causas génicas o cromosómicas.

La formación de univalentes podría significar falta de homología entre los cromosomas de los progenitores y, en estos casos, el poliploide artificial debería poseer meiosis regular y fertilidad elevada. Sin embargo, podría ocurrir que aunque las especies parentales tuvieran una elevada homología en cuanto a las secuencias de ADN, los híbridos fueran estériles con formación de univalentes en su meiosis. Esto último podría deberse a la acción de genes que interfieren con el proceso normal de apareamiento (formación del complejo sinaptonémico, ocurrencia y/o posición de sobrecruzamientos) o alteran la disposición espacial de los genomas en el núcleo provocando asinapsis.

En algunos casos la formación de univalentes en los híbridos se debería a divergencia cuantitativa en el número de copias de secuencias de ADN altamente repetidas. Este mecanismo disminuye el valor adaptativo del heterocigota por provocar disturbios en la alineación estructural de los cromosomas.

Otro caso frecuente en la naturaleza es la existencia de híbridos diploides con formación regular de bivalentes y desarrollo normal de los estados II de la meiosis, pero elevada esterilidad. Este fenómeno es muy común en híbridos entre distintas especies de *Amaranthus*, *Prosopis* y *Bromus* entre otros. Stebbins (1971) ha denominado a este fenómeno «hibridez estructural críptica» y ocurriría cuando las especies progenitoras se diferencian en pequeños reordenamientos estructurales. En estos casos se pueden formar bivalentes pero se segregan combinaciones génicas inviables a las gametas.

El comportamiento meiótico puede también verse alterado por interacciones particulares «núcleo - citoplasmáticas». En los híbridos el citoplasma puede ejercer una acción diferencial sobre la condensación cromosómica de los genomas parentales o en el ritmo de contracción cromosómica durante la meiosis (alociclia genómica). El estudio meiótico de poliploides e híbridos entre taxa con distinto nivel de ploidía aporta mayor información que el realizado en híbridos diploides puesto que se puede analizar la afinidad relativa de distintos genomas en el mismo fondo genético. En estos casos la formación de multivalentes es decisiva para establecer las relaciones entre genomas.

Se han dado varios ejemplos en los cuales el análisis meiótico ha permitido dilucidar el origen y postular modos de especiación en varios grupos. Como ya se ha discutido, el apareamiento puede estar bajo control genético (por ejemplo genes tipo Ph) y a menudo estos genes pueden constituir un sistema mucho más simple que los que controlan caracteres diagnósticos de especies y géneros.

El establecimiento de sistemas taxonómicos basados en relaciones genómicas deben, en lo posible, estar apoyados por estudios citogenéticos completos (cariotipo, bandas C y fluorescentes, contenido de ADN, etc.), morfológicos, bioquímicos y moleculares. Además de la utilidad en estudios taxonómicos y evolutivos el conocimiento de la meiosis es de importancia fundamental en estudios aplicados. En la producción de híbridos o poliploides de importancia agronómica se debe lograr un máximo de fertilidad y esto está relacionado con el comportamiento cromosómico. Aunque no siempre la esterilidad es de origen cromosómico, éste es un parámetro que debe ser controlado.

Variación intra e interespecífica en el tamaño del genoma: evolución y significado adaptativo

Durante el proceso evolutivo ocurren cambios cuantitativos y cualitativos en el contenido de ADN total. En Angiospermas el tamaño del genoma es muy variable entre grupos, oscilando entre 0,2 pg en *Arabidopsis thaliana* a 127,4 pg en *Fritillaria assyriaca* no estando esta variación relacionada

necesariamente con nivel de ploidía. El contenido de ADN (valor C) se evalúa mediante microdensitometría o citometría de flujo. Si se descarta la variación en el nivel de ploidía, las principales causas de variación (intra o interespecífica) del contenido de ADN serían: aneuploidía, polimorfismo numérico para cromosomas accesorios o supernumerarios, reordenamientos cromosómicos con pérdida o duplicación de material genético y variación en el número de copias de secuencias no codificantes.

La variación del tamaño del genoma se encuentra, a grandes rasgos, relacionada con diferencias en la complejidad orgánica pues los virus tienen genomas más pequeños que las bacterias y éstas a su vez, menores que el de los eucariotas. Sin embargo en organismos superiores se encontró que el aumento en el valor C no estaba relacionado con complejidad orgánica, ni era explicable por la existencia de mayor número de genes funcionales (el contenido de ADN de un alga unicelular, por ejemplo, puede ser igual al de una angiosperma leñosa). Esta paradoja o enigma del valor C (C: contenido de ADN del genoma haploide no replicado) fue explicada, en parte, cuando se demostró que en angiospermas la variación del tamaño del genoma involucra cambios en la cantidad y proporción de secuencias de ADN repetidas (Thomas, 1971).

Los estudios moleculares han revelado gran complejidad dentro de los genomas existiendo, además del ADN codificante, secuencias repetidas que no codifican tales como ADN satélite, minisatélites, microsátélites, y elementos transponibles.

En general, la relación «ADN génico, no génico» disminuye con el aumento del tamaño del genoma y en angiospermas con elevado contenido de ADN las secuencias repetidas pueden representar hasta 90% del ADN total. Estos resultados explican la naturaleza de la variación pero plantean interrogantes acerca del significado evolutivo de esta arquitectura repetida del genoma: ¿cuál es el origen, función y/o significado de esta variación? ¿Cuál es el papel del ADN repetido, típicamente no codificante?, ¿qué relación poseen estos cambios con la fluidez y plasticidad del genoma en plantas y en animales? y ¿cuál es la dirección, distribución y extensión de estos cambios en distintos grupos vegetales y/o animales?

Un enfoque para comprender el significado del tamaño del genoma fue analizar las relaciones que existían entre el contenido de ADN y características celulares, orgánicas y geográficas. En varios grupos de plantas se vio que las variaciones en el contenido de ADN total están correlacionadas positivamente con: volumen o longitud cromosómicas, área y volumen celular, porcentaje de heterocromatina, longitud del complejo sinaptonémico, duración del ciclo mitótico, duración de la meiosis, tiempo mínimo de generación, factores fenológicos, latitud y altitud. Bennett (1987) crea el término «nucleotipo» para referirse a los aspectos del ADN nuclear que afectan al fenotipo independientemente del ADN codificante. En la literatura existen muchos datos que sugieren que el tamaño del genoma posee significado adaptativo y que los parámetros nucleotípicos juegan un papel importante en la evolución, diversificación y adaptación a distintos ambientes, limitando el rango de expresión fenotípica que puede ser alcanzado por acción génica. Por otro lado, varios autores opinan que las secuencias de ADN no génico que pueden variar en el genoma no poseen significado adaptativo constituyendo ADN «egoísta, parásito o ignorante». Otros investigadores señalan que no puede descartarse la existencia de mecanismos moleculares que generen ADN repetido no codificante que, en forma oportunista, actúe como mutágeno y/o agente regulador.

En algunos organismos se ha demostrado que la transposición de elementos móviles retrovirales

puede alterar la dinámica del genoma provocando una inestabilidad que se puede traducir en una súbita explosión de variabilidad.

Se conocen procesos de escisión/inserción de elementos móviles produciendo por ejemplo, plantas variegadas. Estos procesos pueden, además, producir reestructuraciones cromosómicas alterando el orden y posición de los genes. Estos cambios rápidos pueden ser potentes mecanismos evolutivos ya que concomitantemente con el aislamiento reproductivo que implica la diferencia en reordenamientos estructurales, los mismos pueden involucrar efectos de posición que, en algunos casos, poseen valor adaptativo. Todos estos procesos tienen, además relevancia en aspectos aplicados más inmediatos ya que un cambio en la posición de un gen puede cambiar la expresión o la función bioquímica del mismo.

Se ha demostrado que el genoma de las plantas es inestable y responde al estrés provocado por alteraciones genómicas, ambientales, cromosómicas o citoplasmáticas. Estos factores físicos, bioquímicos o genéticos inducen mecanismos de inestabilidad insercional o modifican el número de copias de secuencias de ADN no codificante. La hibridación, en la naturaleza o en prácticas de mejoramiento, ha sido, en algunos casos, un factor que desencadena mecanismos de aumento de ADN repetido. Otros experimentos han mostrado que la interacción entre el genoma y el medio resulta en una rápida generación de variación. En lino, por ejemplo, se encontraron diferencias en el número de copias de ADN repetido entre líneas que crecían en medios con diferentes nutrientes. En líneas aloplásmicas de maíz hemos encontrado que el citoplasma de "teosinte" provocaba activación de elementos transponibles concomitantemente con aumento de secuencias de ADN repetido correspondientes a las zonas heterocromáticas.

El análisis del contenido de ADN ha permitido evaluar rápidamente fenómenos de aneuploidía y poliploidía generados por estrés durante prácticas de cultivo de tejidos. La variabilidad intraespecífica en el contenido de ADN fue informada y probada en varios grupos taxonómicos. El maíz y especies silvestres relacionadas constituyen un ejemplo de variación intraespecífica donde está bien demostrada la variación en el contenido de ADN debida a variación en porcentaje de heterocromatina (ADN repetido) y en el número de cromosomas supernumerarios. En veintiuna razas nativas de maíz del noroeste argentino ubicadas a lo largo de un gradiente altitudinal encontramos una correlación lineal negativa significativa entre el contenido de ADN de los cromosomas normales (A) y la altitud de cultivo, esto significa que el contenido de ADN de los cromosomas del maíz es menor en lugares de cultivo elevado, sugiriendo que las diferencias no pueden ser al azar y obedecen a procesos selectivos. Es interesante señalar que esta disminución del contenido de ADN de los cromosomas A se correlaciona con un aumento en la frecuencia de cromosomas accesorios no codificantes (B). Aunque se desconocen las causas de este cline discordante entre dos tipos de ADN supernumerario no codificante (ADN repetido-cromosomas B), su repetibilidad en distintos ambientes sugiere que existen fuerzas selectivas involucradas en su mantenimiento. La presencia de cromosomas accesorios (heterocromáticos, no codificantes sin funciones vitales para el organismo), en razas nativas de plantas cultivadas tales como maíz y centeno, es una de las incógnitas actuales de la biología evolutiva y aun no se comprende el papel que pueden jugar los mismos en futuros planes de mejoramiento.

El particular modo de herencia de estos cromosomas accesorios (con mecanismos de impulso que hacen que se hereden con mayor frecuencia que la esperada por herencia mendeliana) abre un

nuevo campo de investigación en lo que se refiere a su utilidad como portadores de genes útiles en programas de mejora. En resumen, la evolución del genoma eucariota ha involucrado casos de amplificación, divergencia, reamplificación y delección de secuencias de ADN repetido. Estos procesos han llevado a grandes diferencias en el tamaño del genoma, quedando aun muchas cuestiones por resolver en lo que se refiere a los mecanismos moleculares involucrados, la frecuencia con que ocurren estos eventos y la relación de los mismos con factores ambientales, genéticos ó fisiológicos. Resolver estas cuestiones permitirá comprender el papel de la variación del tamaño del genoma en la evolución y analizar la relevancia de la variación del contenido de ADN con relación a características de importancia agronómica.

(Extractado de Poggio, L y Naranjo C.A. Citogenética. Parte II Capitulo 5 en Biotecnología y Mejoramiento Vegetal: Echenique, Rubinstein y Mroginski Editores. Ediciones INTA 2004: 69-79)

Trabajo Práctico Nº 16

I. Evolución del cariotipo en plantas con cromosomas monocéntricos

Familia Zygophyllaceae: *Bulnesia*

Los recuentos cromosómicos son estudios que proveen información acerca del número mínimo de grupos de ligamiento y cuántas veces éstos se repiten. El número cromosómico puede ser muy variable entre y dentro de grupos. En palmeras, por ejemplo, existen especies con $2n= 32$ y otras con $2n= 600$ cromosomas (Johnson et al. 1989). Este único dato no permite inferir el significado biológico y evolutivo de estas variaciones. Cuando se realizan estudios poblacionales se pueden detectar polimorfismos y politipismos para variaciones estructurales. Muchos de estos reordenamientos estructurales producen variación en el número de cromosomas (fusiones, fisiones, entre otras) El número cromosómico puede, también, variar por poliploidía y, al igual que en el caso de las variaciones por rearrreglos estructurales, no necesariamente se detectan cambios en el fenotipo.

No siempre se encuentra variación en el número cromosómico, ya que en muchos casos el número y la morfología cromosómica son constantes entre las distintas especies de un grupo. En otros casos, el número cromosómico puede ser constante pero con variaciones morfológicas, las cuales se evalúan a través de índices de asimetría (A_1 , A_2), posición del centrómero, longitud y volumen cromosómico total, etc.

Bulnesia (Zygophyllaceae) es un género con distribución disjunta que se encuentra en el Norte y el Sur de Sud América y comprende ocho especies. *Bulnesia retama*, *B. chilensis*, *B. foliosa* y *B. schickendantzii* se caracterizan por tener semillas albuminadas, semillas y frutos pequeños y flores actinomórficas pequeñas. El par *B. retama*-*B. chilensis* es el más xerofítico del género, posee varias adaptaciones histofisiológicas xéricas. *Bulnesia arborea*, *B. carrapo*, *B. sarmiento* y *B. bonariensis* se caracterizan por poseer semillas exalbuminadas, semillas y frutos grandes y flores grandes, ligeramente zigomórficas, excepto en *B. sarmiento*.

Bulnesia bonariensis es una especie octoploide ($2n= 104$), mientras que el resto de las especies son diploides ($2n= 26$). Siete de las ocho especies poseen el mismo número cromosómico, pero existen diferencias importantes en la morfología de los mismos.

Actividades

1. Compare los cariotipos de las distintas especies mediante el análisis de la Tabla 1 y de los cariogramas de *Bulnesia* que se entregarán en clase.
2. Grafique los índices de asimetría A1 vs. A2 (en un plano determinado por un par de coordenadas ortogonales) y ubique los datos en el esquema tridimensional que se le suministra al final de este volumen. ¿Cuál es la especie con mayor asimetría cromosómica?

Tabla 1. Fórmulas cariotípicas, nivel de ploidía e índices de asimetría en *Bulnesia*

| TAXA | 2n | Nivel de Ploidía | Fórmula cariotípica | A ₁ | A ₂ |
|---------------------------|-----|------------------|------------------------------------|----------------|----------------|
| <i>B. sarmientoi</i> | 26 | 2x | 10 m + 10 sm + 2 st + 2 st-t + 2 t | 0.50 | 0.25 |
| <i>B. foliosa</i> | 26 | 2x | 18 m + 8 sm | 0.31 | 0.17 |
| <i>B. schickendantzii</i> | 26 | 2x | 20 m + 2 m-sm + 4 sm | 0.34 | 0.20 |
| <i>B. chilensis</i> | 26 | 2x | 8 m + 2 sm + 2 sm-st + 14 st | 0.58 | 0.14 |
| <i>B. retama</i> | 26 | 2x | 4 m + 12 sm + 2 sm-st + 8 st | 0.55 | 0.21 |
| <i>B. bonariensis</i> | 104 | 8x | ----- | --- | ---- |

Datos tomados de Poggio y Hunziker, 1986; Poggio et.al, 1986; Poggio y Naranjo 1990. A1 y A2= Índices de asimetría intra e intercromosómica (Romero-Zarco, 1986).

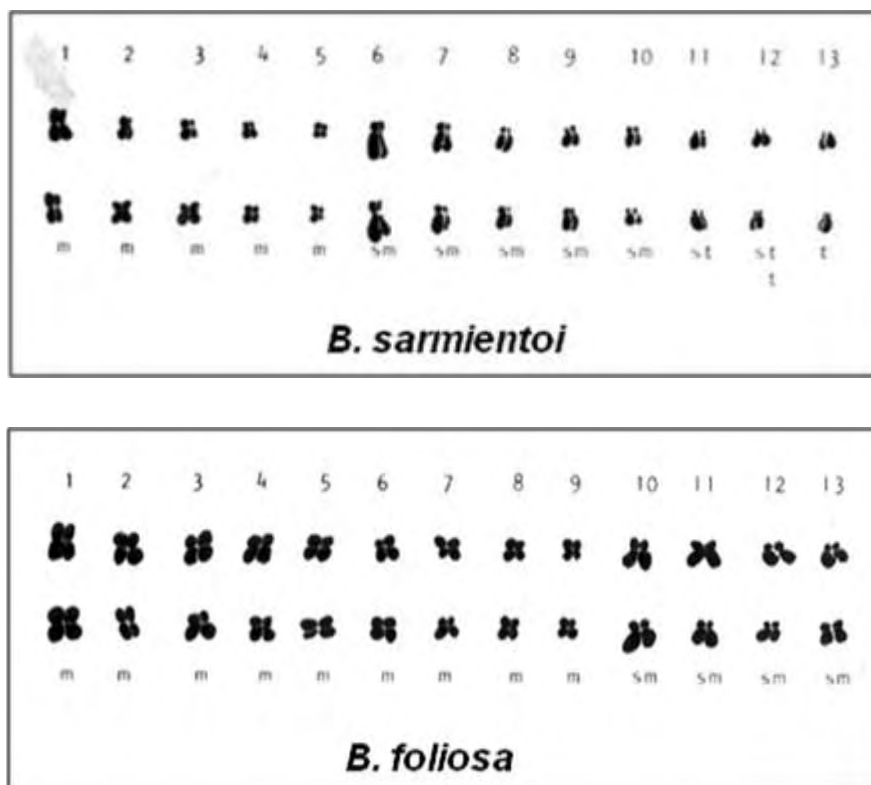


Figura 1. Cariotipos de: *Bulnesia sarmientoi*, *B. foliosa*.

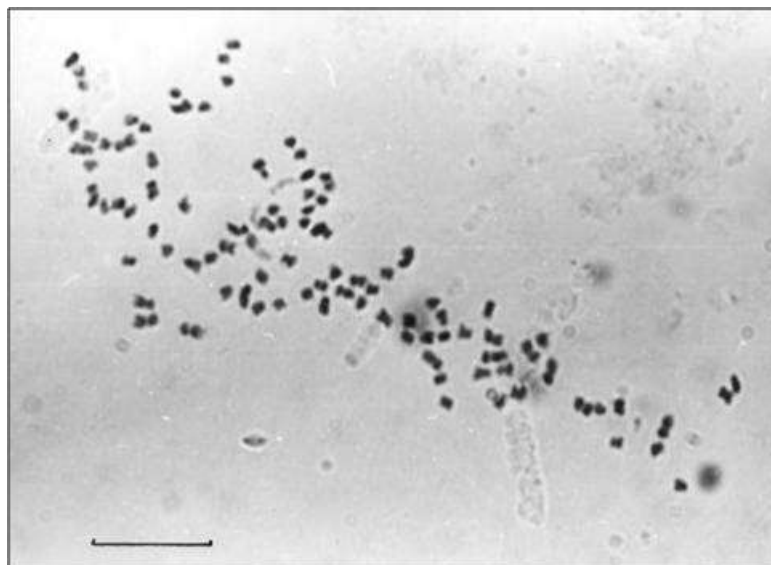
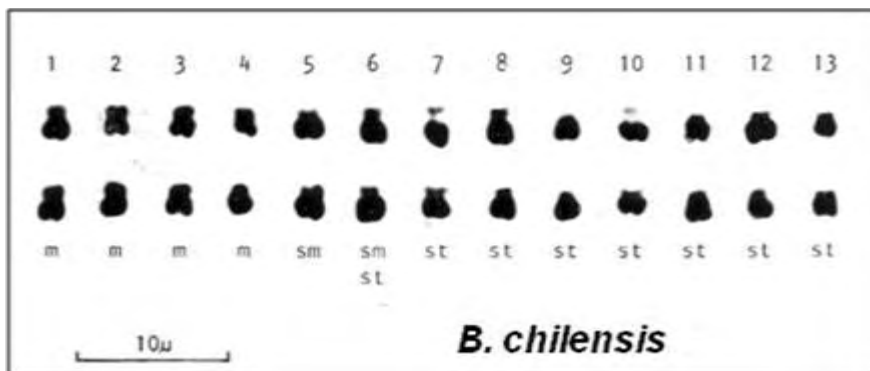
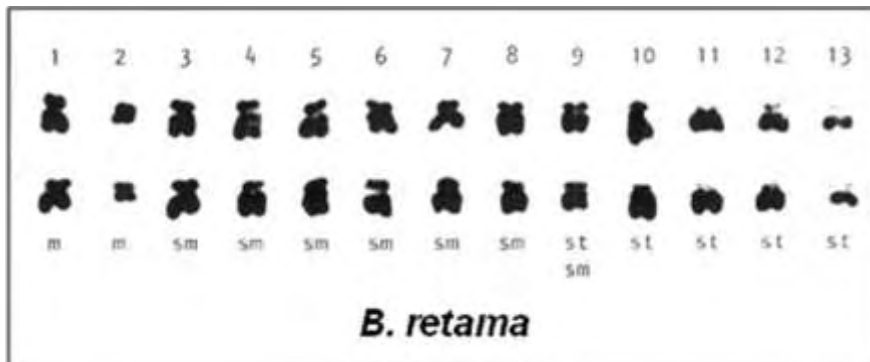
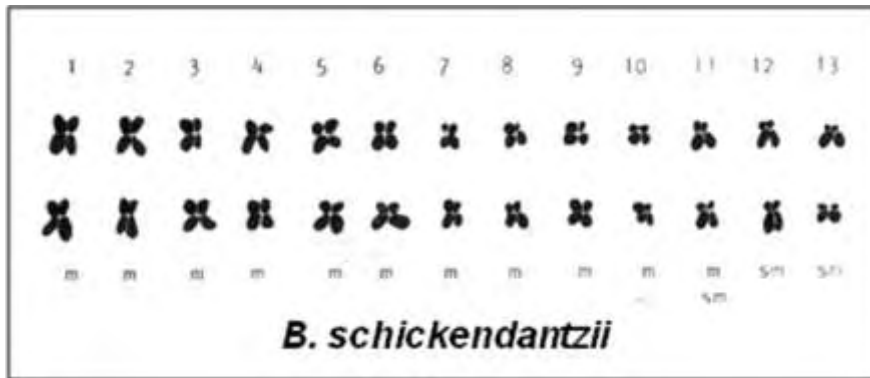


Figura 2. Cariotipos de: *B. schickendantzii*, *B. chilensis*, *B. retama*, *B. bonariensis*.

Tabla 2. Se indica el contenido de ADN, la longitud y el volumen cromosómico total en varias especies del género *Bulnesia* y en *Pintoa chilensis*.

| TAXONES | Nivel de ploidía | LCT (μm) $\bar{x} \pm \text{E.S.}$ | VN (μm^3) $\bar{x} \pm \text{E.S.}$ | ADN (2C) pg* | % relativo de heterocromatina |
|---------------------------|------------------|---|--|--------------------|-------------------------------|
| <i>Bulnesia x=13</i> | | | | | |
| <i>B. sarmientoii</i> | 2x | 27.3 \pm 0.91 | 11.11 \pm 1.16 | 0.724 | 5 |
| <i>B. foliosa</i> | 2x | 33.6 \pm 1.12 | 22.13 \pm 2.50 | 1.116 | 15 |
| <i>B. schickendantzii</i> | 2x | 34.3 \pm 2.31 | 26.83 \pm 3.01 | 1.184 | 15 |
| <i>B. chilensis</i> | 2x | 60.0 \pm 1.91 | 57.30 \pm 2.68 | 2.928 | 68 |
| <i>B. retama</i> | 2x | 73.3 \pm 3.58 | 83.23 \pm 5.92 | 4.538 | 100 |
| <i>B. bonariensis</i> | 8x | 94.5 \pm 0.00 | 82.84 \pm 9.80 | 2.208 | 10 |
| <i>Pintoa x=10</i> | | | | | |
| <i>P. chilensis</i> | 2x | | | 5.45 | |

Tomado de Poggio & Hunziker (1986), Poggio et al. 1992. LCT: longitud cromosómica total. VN: volumen nuclear.

3. Sobre la base de la observación de los cariotipos en las Figura 1 y 2 y de los datos que se dan en la Tabla 2, compare los distintos cariotipos y sitúe las especies en el esquema tridimensional que se le suministra al final de este volumen, graficando en las coordenadas: A1, A2 y contenido de ADN.
4. Teniendo en cuenta la morfología de los cromosomas, la simetría de los cromosomas y la proporción y distribución de heterocromatina: proponga los posibles cambios cromosómicos que han ocurrido dentro del género *Bulnesia*.
5. ¿Cree Ud. que estas diferencias cromosómicas habrían originado un proceso de especiación cromosómica?. Justifique su respuesta.
6. El hecho de que las especies de *Bulnesia* presenten un elevado porcentaje de heterocromatina en todos los cromosomas a excepción de un par, indica en forma inequívoca que la heterocromatina tiene valor adaptativo?

Los ejemplos mencionados en la familia Zygothylaceae muestran que variaciones en el contenido de ADN están relacionadas con el tamaño (longitud total y volumen) de los cromosomas y simetría del cariotipo. A continuación discuta si:

7. Un aumento de ADN ¿conduce a una mayor o menor simetría intracromosómica?
8. ¿Qué es un cariotipo bimodal y cómo se originaría?

Trabajo Práctico Nº 17

II. Evolución del cariotipo en animales

Insecta: Orthoptera: Familia Acrididae: *Dichroplus*

Estudios citogenéticos en poblaciones naturales de este grupo de insectos han provisto de numerosos ejemplos de variación cromosómica entre especies distintas y también dentro de una misma especie. Las transformaciones evolutivas que se observan con mayor frecuencia son reordenamientos cromosómicos tales como:

- a. Fusiones céntricas o en tándem entre cromosomas no homólogos:
 - a.1. X-autosómicas, determinando un sistema neo-X/neo-Y
 - a.2. autónoma-autosómica, determinando la formación de cromosomas m o sm, a partir de dos st.
- b. Fisiones céntricas
- c. Inversiones pericéntricas
- d. Cromosomas y segmentos supernumerarios.

El cariotipo fundamental de los acrididos es $2n=23$ (22 A+X) en machos y $2n=24$ (22 A+XX) en hembras. La morfología cromosómica dominante es la acrocéntrica con un sistema de determinación del sexo XO/XX. La aparición de cromosomas metacéntricos en algunas especies se considera un carácter derivado originado por fusiones céntricas. Según algunos autores, estas reestructuraciones habrían jugado un papel importante durante la evolución del cariotipo, favoreciendo la aparición de mecanismos de aislamiento reproductivo y por lo tanto de especiación (Mesa et al., 1982).

El análisis citogenético de distintos géneros de la familia Acrididae permitió estudiar la mayoría de las variaciones cromosómicas previamente mencionadas.

En el género *Dichroplus*, Sáez & Perez Mosquera (1971) describieron alrededor de 40 especies en las cuales se determinó la existencia de rearrreglos cromosómicos, algunos de ellos se fijaron en las distintas poblaciones, mientras que otros se mantienen formando polimorfismos.

Según estos autores, a partir del número diploide ancestral que presentan especies tales como *D. elongatus* y *D. punctulatus*, se ha llegado al caso extremo de *D. silveiraguidoi* con $2n= 8$ (machos y hembras) y $NF= 12$. Entre ambos extremos existe una serie numérica y estructural constituida por varias especies. Así, en *D. bergii* ($2n= 22$) y en *D. vitattus* ($2n= 20$) que presentan un sistema de determinación sexual neo-X/neo-Y, el NF es 23 y en *D. pratensis* ($2n= 19$; machos) el NF es 19 (sistema X libre, no fusionado).

En algunas de las especies mencionadas se han encontrado numerosos polimorfismos en distintas poblaciones. Para *D. pratensis* se han descrito polimorfismos de fusión que involucran distintos pares de cromosomas. Algunas poblaciones son polimórficas para dos fusiones céntricas entre dos pares de autosomas largos; una de estas fusiones es entre cromosomas de igual tamaño, y la otra entre cromosomas de distinto tamaño dando lugar a un total de 9 cariomorfos posibles (Sáez y Pérez Mosquera, 1971). Otras poblaciones presentan polimorfismos de fusión más complejos que se habrían originado en forma independiente y que involucran a los 6 autosomas más largos (Bidau, 1983).

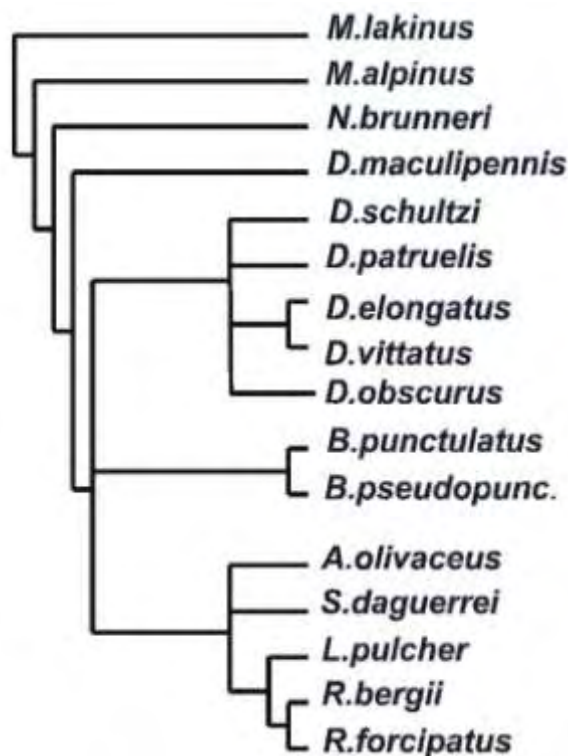
Otros géneros de la familia Acrididae son igualmente interesantes para el estudio de reordenamientos cromosómicos. Por ejemplo, numerosas especies del género *Trimerotropis* presentan polimorfismos para cambios en la posición del centrómero en distintos cromosomas; estos reordenamientos son considerados como inversiones pericéntricas (Goñi et al., 1985; Vaio et al., 1979; Confalonieri, 1988). Las especies de este género presentan un patrón de distribución cromosómica a lo largo de clines altitudinales, latitudinales y longitudinales que indicaría la presencia de fuerzas evolutivas determinísticas (selección natural) operando en el mantenimiento de los mismos (Confalonieri, 1994).

Actividades

Sobre la base de sus observaciones de las preparaciones cromosómicas de distintas especies del género *Dichroplus* durante la cursada:

- Determine el número somático, NF, sistema de cromosomas sexuales y pincosis diferencial (en el caso que existiera) para las diferentes especies,
- Confeccione idiogramas de los cariotipos de las especies en estudio,
- Discuta las posibles relaciones evolutivas que existen entre las especies del género *Dichroplus* y los mecanismos que pudieron conducir al origen de las mismas.

Sobre la base de la morfología, varias especies originalmente incluídas en el género *Dichroplus* han sido separadas y asignadas a otros géneros descritos recientemente, tales como *Ponderacris*, *Baeacris* y *Ronderosia*. Así, por ejemplo, *D. punctulatus* pasó a ser *B. punctulatus*, *D. bergii* pasó a *R. bergii*. Con el objeto de corroborar las nuevas asignaciones y verificar si las especies de *Dichroplus* constituyen un grupo filogenético natural, es decir si el género *Dichroplus* es monofilético, se realizó un análisis utilizando caracteres moleculares correspondientes a una porción de la secuencia del gen codificante para la proteína mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) (Colombo et al. 2002, 2005). A continuación se presenta el árbol obtenido por máxima parsimonia a partir de los datos de secuencia.



Responda y discuta las siguientes preguntas:

1. ¿Cree Ud., según el árbol obtenido, que el género *Dichroplus* es monofilético?
2. Si se superponen los caracteres cromosómicos a este árbol, ¿los reordenamientos cromosómicos (fusiones autosómicas y fusiones X-autosoma) resultan en sinapomorfías de grupo?

Trabajo Práctico N° 18

III. Evolución del cariotipo en organismos con cromosomas holocinéticos

Insecta: Heteroptera: Belostomatidae: *Belostoma*

Los sistemas holocinéticos difieren de los sistemas monocéntricos o con centrómero localizado en cuanto a los cambios cromosómicos preponderantes en la evolución del cariotipo. En los sistemas monocéntricos, son frecuentes las inversiones, las translocaciones, y las fusiones y fisiones céntricas; en los casos de fusiones y fisiones céntricas, los cromosomas resultantes del reordenamiento deben presentar un único centrómero a fin de persistir en las siguientes divisiones celulares. Por lo tanto, la presencia de un centrómero juega un papel limitante en la evolución del cariotipo. Esta limitación no existe en los sistemas holocinéticos, ya que al estar la actividad cinética en toda la longitud del cromosoma, los cromosomas resultantes de una fusión o fragmentación pueden persistir en las sucesivas divisiones celulares, dando origen a un nuevo complemento cromosómico (Castro, Cámara & Malheiros, 1949; Grant, 1989; Hughes Schrader & Ris, 1941; Hughes Schrader & Schrader, 1961). Se ha denominado agmatoploidía (del griego agmos= fractura) al proceso de fragmentación de cromosomas holocinéticos (Malheiros Gardé & Gardé, 1950, 1951). Dado que hasta el presente se han encontrado muy pocos polimorfismos cromosómicos para translocaciones, o individuos heterocigotas para translocaciones o inversiones, la mayoría de los citogenetistas sostiene que las fusiones, la agmatoploidía y la poliploidía serían los principales mecanismos involucrados en la evolución del cariotipo.

Actividades

El número cromosómico modal del género es $2n=28=26+XY$ (machos), entendiéndose por número modal al número cromosómico más frecuente en un grupo (una familia, aunque más frecuentemente una tribu o un género). En la siguiente tabla se presentan los resultados citogenéticos obtenidos en varias especies de *Belostoma* (Papeschi, 1988, 1991, 1992). Estos incluyen el número diploide, sistema cromosómico de determinación del sexo, contenido haploide (C) de ADN expresado en pg y porcentaje de heterocromatina detectable por bandas C.

| ESPECIE | 2n | ADN (pg) | % het. C positiva |
|------------------------|----------|----------|-------------------|
| <i>B. oxyurum</i> | 6+XY | 0.53 | 30 |
| <i>B. micantulum</i> | 14+XY | 0.88 | 15 |
| <i>B. discretum</i> | 26+X1X2Y | 1.02 | 38 |
| <i>B. martini</i> | 26+X1X2Y | 1.11 | 25 |
| <i>B. gestroi</i> | 26+X1X2Y | 1.13 | 37 |
| <i>B. elegans</i> | 26+X1X2Y | 1.55 | 60 |
| <i>B. bifoveolatum</i> | 26+X1X2Y | 1.21 | 60 |
| <i>B. elongatum</i> | 26+X1X2Y | 1.74 | 59 |
| <i>B. dentatum</i> | 26+X1X2Y | 1.93 | 58 |

Datos tomados de la Tesis Doctoral de la Alba Graciela Papeschi (Papeschi, A.G. in Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales VII+259 (Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires; 1992)

- Observe células meióticas masculinas en MI de *B. elegans*, *B. micantulum* y *B. oxyurum*. Compare el número y tamaño de los cromosomas.

- Observe fotos de células meióticas masculinas con bandas C de esas especies, analizando la presencia/ausencia, disposición y localización de la heterocromatina.
- Confeccione idiogramas de los cariotipos de las especies en estudio.
- Teniendo en cuenta los antecedentes citogenéticos ($2n$, sistema de cromosomas sexuales, bandas C), sus observaciones y los resultados de la Tabla, discuta el probable origen de los complementos cromosómicos de las distintas especies de *Belostoma* a partir del cariotipo modal.

Bibliografía

- Bennett, M.D. and Leitch, I. 1995. Nuclear DNA amount in Angiosperms. *Ann.of Bot.*7:113-176.
- Bennett, M. D., Parmjit, B, I. Leitch. 2000. Nuclear DNA amount in angiosperms and their Modern uses. *Annals of Botany* 86: 859-909
- Papeschi, A.G. 1991. DNA content and heterochromatin variation in species of *Belostoma* (Heteroptera). *Hereditas (Suecia)* 115(2): 109-114.
- Papeschi, A.G. and Bressa, M.J. Evolutionary cytogenetics in Heteroptera. *J. Biol. Res.* 5, 3-21 (2006).
- Papeschi, A.G. in Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales VII+259 (Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires; 1992).Poggio, L.y Hunziker, J.H. 1986. Nuclear DNA content variation in *Bulnesia*. *J. Hered.* 77:43-48.
- Poggio, L., Wulff, A.F. y Hunziker, J.H. 1986. Chromosome size, nuclear volume and DNA content in *Bulnesia* (Zygophyllaceae). *Darwiniana* 27: 25-38.
- Poggio, L. y Naranjo, C.A. 1990. Contenido de ADN y evolución en plantas superiores. *Acad. Nac. Cs. Ex. Fís.Nat.* 5:27-37.
- Price, H.J. 1988. Nuclear DNA content variation with Angiosperms species. *Evolutionary Trends Plants*, Vol.2(1): 56-60.
- Remis, M.I. and Vilardi, J.C. 1986, Meiotic behaviour and dosage effect of B-chromosomes on recombination in *Dichroplus elongatus*. *Cariologia* 39 :287-301.
- Hesslop-harrison, J. S.; Schwarzacher, T., 1993. Molecular cytogenetics-biology and application in plant breeding. *Chromosome Today* 11. Summer, A. T.; Chandley, A. (Eds.). Chapman & Hall, London pp. 191-198.
- Pablo Colombo, María M. Cigliano, Andrea S. Sequeira, Carlos E. Lange, Juan C. Vilardi and Viviana A. Confalonieri. Phylogenetic relationships in *Dichroplus* Stal (Orthoptera: Acrididae: Melanoplinae) inferred from molecular and morphological data: testing karyotype diversification. *Cladistics* 21 (2005) 375–389.

ALGUNAS REGLAS BÁSICAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD EN LABORATORIOS

Las medidas de Seguridad en Laboratorios son un conjunto de medidas preventivas destinadas a proteger la salud de los que allí se desempeñan frente a los riesgos propios derivados de la actividad, para evitar accidentes y contaminaciones tanto dentro de su ámbito de trabajo, como hacia el exterior.

Las reglas básicas aquí indicadas son un conjunto de prácticas de sentido común realizadas en forma rutinaria.

El elemento clave es la actitud proactiva hacia la seguridad y la información que permita reconocer y combatir los riesgos presentes en el laboratorio. Será fundamental la realización meticulosa de cada técnica, pues ninguna medida, ni siquiera un equipo excelente puede sustituir el orden y el cuidado con que se trabaja.

1. Se deberá conocer la ubicación de los elementos de seguridad en el lugar de trabajo, tales como: matafuegos, salidas de emergencia, mantas ignífugas, lavaojos, gabinete para contener derrames, accionamiento de alarmas, etc.
2. No se permitirá comer, beber, fumar o maquillarse.
3. No se deberán guardar alimentos en el laboratorio, ni en las heladeras que contengan drogas.
4. Se deberá utilizar vestimenta apropiada para realizar trabajos de laboratorio y cabello recogido (guardapolvo preferentemente de algodón y de mangas largas, zapatos cerrados, evitando el uso de accesorios colgantes).
5. Es imprescindible mantener el orden y la limpieza. Cada persona es responsable directa de la zona que le ha sido asignada y de todos los lugares comunes.
6. Las manos deben lavarse cuidadosamente después de cualquier manipulación de laboratorio y antes de retirarse del mismo.
7. Se deberán utilizar guantes apropiados para evitar el contacto con sustancias química o material biológico. Toda persona cuyos guantes se encuentren contaminados no deberá tocar objetos, ni superficies, tales como: teléfono, lapiceras, manijas de cajones o puertas, cuadernos, etc.
8. No se permitirá pipetear con la boca.
9. No se permitirá correr en los laboratorios.
10. Siempre que sea necesario proteger los ojos y la cara de salpicaduras o impactos se utilizarán anteojos de seguridad, viseras o pantallas faciales u otros dispositivos de protección. Cuando se manipulen productos químicos que emitan vapores o puedan provocar proyecciones, se evitará el uso de lentes de contacto.
11. No se deben bloquear las rutas de escape o pasillos con equipos, máquinas u otros elementos que entorpezcan la correcta circulación.
12. Todo material corrosivo, tóxico, inflamable, oxidante, radiactivo, explosivo o nocivo deberá estar adecuadamente etiquetado.
13. No se permitirán instalaciones eléctricas precarias o provisorias. Se dará aviso inmediato a la Secretaría Técnica en caso de filtraciones o goteras que puedan afectar las instalaciones o equipos y puedan provocar incendios por cortocircuitos (Interno 355).
14. Se requerirá el uso de mascarillas descartables cuando exista riesgo de producción de aerosoles (mezcla de partículas en medio líquido) o polvos, durante operaciones de pesada de sustancias tóxicas o

biopatógenas, apertura de recipientes con cultivos después de agitación, etc.

15. Las prácticas que produzcan gases, vapores, humos o partículas, aquellas que pueden ser riesgosas por inhalación deben llevarse a cabo bajo campana.

16. Se deberá verificar la ausencia de vapores inflamables antes de encender una fuente de ignición. No se operará con materiales inflamables o solventes sobre llama directa o cerca de las mismas. Para calentamiento, sólo se utilizarán resistencias eléctricas o planchas calefactoras blindadas. Se prestará especial atención al punto de inflamación y de autoignición del producto.

17. El material de vidrio roto no se depositará con los residuos comunes. Será conveniente ubicarlo en cajas resistentes, envuelto en papel y dentro de bolsas plásticas. El que sea necesario reparar se entregará limpio al taller.

18. Será necesario que todo recipiente que hubiera contenido material inflamable, y deba ser descartado sea vaciado totalmente, escurrido, enjuagado con un solvente apropiado y luego con agua varias veces.

19. Está prohibido descartar líquidos inflamables o tóxicos o corrosivos o material biológico por los desagües de las piletas, sanitarios o recipientes comunes para residuos. En cada caso se deberán seguir los procedimientos establecidos para la gestión de residuos. Consultar al Servicio de Higiene y Seguridad (Interno 275).

20. Cuando sea necesario manipular grandes cantidades de materiales inflamables (más de 5 litros.) deberá tenerse a mano un extintor apropiado para ese material en cuestión.

21. Cuando se trasvase material combustible o inflamable de un tambor a un recipiente más pequeño, realice una conexión con una cadena del tambor a tierra y con otra entre el tambor y el recipiente de manera de igualar potenciales y eliminar la posible carga estática.

22. Al almacenar sustancias químicas considere que hay cierto número de ellas que son incompatibles pues almacenadas juntas pueden dar lugar a reacciones peligrosas. Ante dudas consultar al Servicio de Higiene y Seguridad (Interno 275).

23. No almacene en estantes sobre mesadas sustancias corrosivas, hágalo en estantes bajo mesadas y en caso de ácidos o álcalis concentrados (mayor de 2N) deben ser mantenidas dentro de lo posible en bandejas de material adecuado.

24. Los cilindros de gases comprimidos y licuados deben asegurarse en posición vertical con pinzas, grampas y correas o cadenas a la pared en sitios de poca circulación, protegidos de la humedad y fuentes de calor, de ser posible en el exterior.

25. Los laboratorios contarán con un botiquín de primeros auxilios con los elementos indispensables para atender casos de emergencia.

26. Se informará al Dpto. de Seguridad y Control cuando se necesiten dejar equipos funcionando en ausencia del personal del laboratorio.

27. Se anotará en un lugar visible desde el exterior los teléfonos de los responsables de cada laboratorio para que puedan ser consultados en caso de alguna anomalía verificada por el personal de Seguridad y Control en su recorrida fuera de los horarios habituales de trabajo.

Procedimientos ante emergencias:

- Emergencias médicas

Si ocurre una emergencia tal como: cortes o abrasiones, quemaduras o ingestión accidental de algún producto químico, tóxico o peligroso, se deberá proceder:

1. A los accidentados se les proveerán los primeros auxilios.
2. Simultáneamente se tomará contacto con el Servicio Médico (Interno 482), o al Servicio Médico de Deportes (4784-4351 / 3948)
3. Avise al Jefe de Laboratorio o autoridad del Departamento, quienes solicitarán asistencia de la Secretaría Técnica (interno 380) para que envíen personal del Dpto. de Mantenimiento, Seguridad y Control o Servicios Generales según correspondan.
4. El Jefe de Departamento notificará el accidente al Servicio de Higiene y Seguridad para su evaluación e informe, donde se determinarán las causas y se elaborarán las propuestas para modificar dichas causas y evitar futuras repeticiones.
5. Centros para requerir ayuda médica:

S.A.M.E. Teléfono 107

Hospital Pirovano

Av. Monroe 3555 Tel. 4542-5552 / 9279

Intoxicaciones

Hospital de Niños. Dr. R. Gutiérrez

Sánchez de Bustamante 1399. Capital Federal. Tel: 4962-6666.

Hospital de Niños. Dr. P. de Elizalde

Av. Montes de Oca 40 Tel. 4307-7491 Toxicología 4300-2115

Quemaduras

Hospital de Quemados

P.Goyena 369

Tel. 4923-4082 / 3022

Oftalmología

Hospital Santa Lucía

San Juan 2021

Tel. 4941-7077

Hospital Dr. P. Lagleyze

Av. Juan B. Justo 4151

Tel. 4581-0645 / 2792

- Incendio:

1. Mantenga la calma. Lo más importante es ponerse a salvo y dar aviso a los demás.
2. Si hay alarma, acci6nala. Si no grite para alertar al resto.
3. Se dará aviso inmediatamente al Dpto. de Seguridad y Control (Interno 311) informando el lugar y las características del siniestro.
4. Si el fuego es pequeño y sabe utilizar un extintor, úselo. Si el fuego es de consideración, no se

arriesgue y manteniendo la calma ponga en marcha el plan de evacuación.

5. Si debe evacuar el sector apague los equipos eléctricos y cierre las llaves de gas y ventanas.
6. Evacúe la zona por la ruta asignada.
7. No corra, camine rápido, cerrando a su paso la mayor cantidad de puertas. No utilice ascensores. Descienda siempre que sea posible.
8. No lleve consigo objetos, pueden entorpecer su salida.
9. Si pudo salir por ninguna causa vuelva a entrar. Deje que los equipos especializados se encarguen.

- **Teléfonos útiles**

- BOMBEROS Teléfono 100

- DIVISIÓN CENTRAL DE ALARMA: 4381-2222 / 4383-2222 / 4304-2222.

- CUARTEL V DE BELGRANO:

- Obligado 2254 Capital Tel. 4783-2222

- BOMBEROS DE VICENTE LÓPEZ

- Av. Maipú 1669 Vicente López. Tel. 4795-2222

- BOMBEROS DE SAN ISIDRO:

- Santa Fe 650 Martínez. Tel. 4747-2222

- **Derrame de productos químicos**

1. Atender a cualquier persona que pueda haber sido afectada.
2. Notificar a las personas que se encuentren en las áreas cercanas acerca del derrame. Coloque la cinta de demarcación para advertir el peligro.
3. Evacuar a toda persona no esencial del área del derrame.
4. Si el derrame es de material inflamable, apagar las fuentes de ignición, y las fuentes de calor.
5. Evite respirar los vapores del material derramado, si es necesario utilizar una máscara respiratoria con filtros apropiados al tipo de derrame.
6. Ventilar la zona.
7. Utilizar los elementos de protección personal tales como equipo de ropa resistente a ácidos, bases y solventes orgánicos y guantes.
8. Confinar o contener el derrame, evitando que se extienda. Para ello extender los cordones en el contorno del derrame.
9. Luego absorber con los paños sobre el derrame.
10. Deje actuar y luego recoger con pala y colocar el residuo en la bolsa roja y ciérrela.
11. Comuníquese con el Servicio de Higiene y Seguridad para disponer la bolsa con los residuos.
12. Si el derrame es de algún elemento muy volátil deje dentro de la campana hasta que lo retire para su disposición.
13. Lave el área del derrame con agua y jabón. Seque bien.
14. Cuidadosamente retire y limpie todos los elementos que puedan haber sido salpicados por el derrame.
15. Lave los guantes, la máscara y ropa.

CUPÓN PARA ENTREGAR AL DOCENTE

Fecha:

El /La alumno/a.....

de la materia.....

ha leído minuciosamente la guía de Normas Mínimas de Seguridad que acompaña esta guía.
