

DIVISIÓN CELULAR: MITOSIS Y MEIOSIS

10 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de esta práctica es que los estudiantes identifiquen y diferencien varias etapas en la mitosis y la meiosis. Las puntas de raíz de cebolla se tiñen para identificar las diversas etapas y la duración de la mitosis. Los estudiantes también tendrán la oportunidad de analizar el mecanismo involucrado en la pérdida del control del ciclo celular en el cáncer. En esta práctica también veremos la meiosis y el cruce en *Sordaria*.

2. COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

Investigación I y IV:

COMPONENTES	Conservación
Limpiadores de pipa de 3 cm de largo (en 2 colores)	Tª ambiente
Cuentas	Tª ambiente
Bolsas pequeñas de plástico	Tª ambiente

Investigación II:

COMPONENTES	Conservación
Tinción de Carbol-fuschin (Ziehl-Neelson)	Tª ambiente
Lecitina (fitohemaglutinina PHA-M de <i>Phaseolus vulgaris</i>)	Tª ambiente
Porta y cubreobjetos de microscopio	Tª ambiente
10 vasos de plástico (para el crecimiento de las puntas de raíz de cebolla)	Tª ambiente
Arena	Tª ambiente
Tubos cónicos de 50 ml	Tª ambiente

Investigación III:

COMPONENTES
Imágenes de cariotipo de individuos normales
Imágenes de cariotipo de los pacientes 1, 2 y 3

Investigación V:

COMPONENTES
Imágenes de <i>Sordaria fimicola</i> (se recomiendan el uso de imágenes en color)

NOTA: Tras la recepción, almacenar los componentes a las temperaturas indicadas (**temperatura ambiente**).

NOTA: ESTE EXPERIMENTO NO CONTIENE ADN HUMANO. Ninguno de los componentes de este kit se ha preparado a partir de material humano.

NOTA: Todos los componentes de este kit están destinados a la investigación educativa. No pueden ser utilizados con fines de diagnóstico o médicos, ni pueden ser administrados o consumidos por seres humanos o animales.

2.1 Material requerido y no suministrado

Investigación I y IV:

- Lápices de colores (2 colores)

Investigación II:

- Microscopio
- 10 cebollas verdes (o cebollinos o chalotas) con raíces
- Etanol
- Ácido acético glacial (12M)
- Ácido clorhídrico
- Hojas de afeitar o cúter
- Tijeras
- Toallitas de limpieza científica (Kimwipes) o similares
- Guantes desechables y gafas de seguridad

Investigación I y IV:

- Fotocopiadora

NOTA: Asegúrense que el material de vidrio esté limpio, seco y libre de residuos de jabón. Para mayor comodidad, se pueden comprar pipetas de transferencia desechables adicionales.

3. INTRODUCCIÓN

MITOSIS Y MEIOSIS

El crecimiento y desarrollo de cada organismo depende de la replicación precisa del material genético durante cada **división celular**. Este es un hecho destacable sobre todo si tenemos en cuenta que como individuos todos hemos surgido de la fertilización de un solo huevo con un solo espermatozoide. A partir de esta única célula, nos desarrollamos en individuos únicos con tipos de tejidos altamente diferenciados. Las instrucciones para el momento preciso del desarrollo, crecimiento y maduración están todas contenidas dentro del **ADN**, que está organizado como **nucleótidos** que codifican **genes** específicos, que están organizados en **cromosomas**. Cada célula contiene este conjunto de información. La **expresión genética diferencial** es lo que explica las diferencias obvias entre los diversos tipos de tejidos que componen los nervios, la piel, los músculos y los órganos, como los riñones, el hígado y el bazo.

El **ciclo celular**, la secuencia de eventos que abarca el período comprendido entre la finalización de una división celular hasta el final de la siguiente división, implica tanto la **división del núcleo** de la célula (**cariocinesis**) como la **división del citoplasma** (**citocinesis**). Hay dos tipos de división nuclear: **mitosis** y **meiosis**. Nuevas células corporales (**somáticas**) están formadas por **mitosis**. Cada división celular produce dos nuevas células hijas con el mismo número y tipo de cromosomas que la célula principal. La formación de gametos masculinos y femeninos en células animales o esporas en células vegetales es por **meiosis**. Los gametos y las esporas tendrán la mitad del número de cromosomas de las células progenitoras.

Interfase

Interfase, que comienza cuando la división celular finaliza y continúa hasta el comienzo de la siguiente ronda de división, se organiza en tres fases. La **fase G1**, es el primer período de crecimiento de la interfase. El núcleo y la célula aumentan de tamaño y los cromosomas se extienden por completo. La célula gasta grandes cantidades de energía en la síntesis de ARN y proteína. Durante la fase G1, la célula lleva a cabo funciones normales específicas para su tipo (es decir, nervio, hígado, bazo). La **fase S**, la siguiente sección de la interfase, está marcada por un aumento dramático en la síntesis de ADN y la síntesis de **histonas** que son proteínas celulares principales unidas al ADN. La célula se está preparando para el comienzo de la mitosis. Los cromosomas se duplican longitudinalmente, y cada cromosoma consta de dos "**cromátidas**" idénticas. La **fase G2**, el segmento final, está marcado por la síntesis continua de proteínas. Una célula en interfase tiene un núcleo con uno o más **nucleolos** teñidos de oscuro y una fina red de hilos, la **cromatina**.

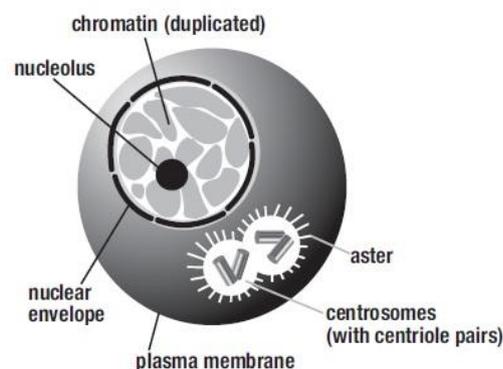


Figura 1: Interfase

Mitosis

La **mitosis** es la siguiente fase del ciclo celular. Es el proceso de replicación cromosómica coordinada antes de la división celular. Es esencialmente lo mismo si se considera una planta simple o un organismo altamente evolucionado, como un ser humano. La principal función de la mitosis es replicar con precisión y precisión la información genética, o **cromosomas**, de modo que cada célula hija contenga la misma información. El complejo enzimático, una **ADN polimerasa**, realiza esta tarea con un promedio de menos de un error, o un cambio de un par de bases por 1×10^9 , nucleótidos sintetizados. El genoma humano contiene aproximadamente $3,3 \times 10^9$ pares de bases, por lo que se producirían menos de 3 errores durante una división celular típica.

El proceso de mitosis es un evento continuo que se puede segmentar en varias etapas identificables. Durante la fase mitótica, se activa un complemento único de genes. Estos genes codifican proteínas que actúan solo transitoriamente durante la mitosis y están ausentes de otras fases del ciclo celular. En orden, estas etapas son: **profase**, **metafase**, **anafase** y **telofase**. La **citocinesis**, el proceso real de división celular, ocurre durante la telofase. En plantas como la cebolla, esto se ve como la formación de la placa celular entre las dos células hijas.

Profase

En la **profase** es cuando comienzan a producirse los mayores cambios dentro del núcleo de la célula. Los cromosomas se vuelven más gruesos, cortos y fácilmente visibles bajo el microscopio óptico cuando se tiñen. Dos "cromátidas hermanas" se unen cerca de su centro en una estructura llamada **centrómero**. El **nucléolo**, el sitio de la síntesis activa de ARNr y la **membrana nuclear** desaparece. El aparato mitótico, el **huso**, comienza a organizarse dentro de la célula. Los **microtúbulos** son barras delgadas de proteína responsables de tirar de cromosomas replicados hacia cada mitad de la célula. En los animales, el centrosoma se divide en dos **centriolos** que se mueven hacia los polos de la célula. El huso parece irradiar desde estos dos centriolos.

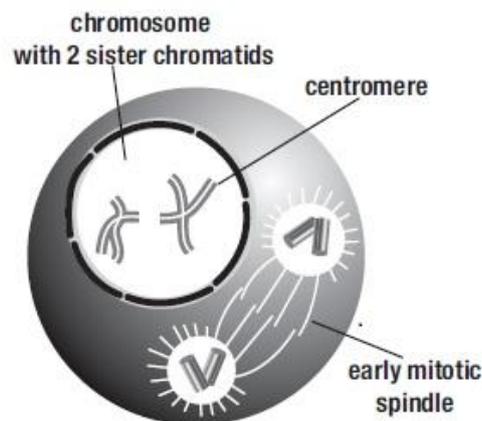


Figura 2: Profase

Metafase

Durante este período, los cromosomas se alinean en el punto medio o ecuador entre los polos de la célula y se encuentran en su estructura más gruesa y más corta. Se identifican fácilmente como dos cromátidas hermanas doblemente longitudinales. En los animales y las plantas, las cromátidas están conectadas (en sus centrómeros) al aparato fusiforme, que se ha formado entre los dos centriolos ubicados en los polos de la célula. En muchas plantas, los centriolos están ausentes. Sin embargo, el eje aún está presente y los cromosomas de la planta están unidos de forma similar a las fibras microtubulares del huso.

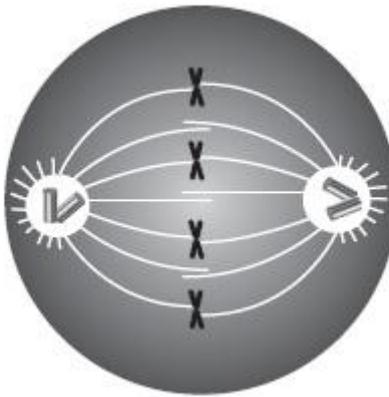


Figura 3: Metafase

Anafase

En esta fase corta, las cromátidas hermanas comienzan a separarse y migrar a los polos. Una vez que las dos cromátidas se separan, cada una se llama **cromosoma**. Para los humanos, con un **número diploide** de 46 cromosomas, habrá 46 cromosomas moviéndose hacia cada polo. Las cebollas tienen 16 cromosomas diploides y, por lo tanto, 16 cromosomas se mueven a cada polo. Durante la anafase hay una segregación cuantitativa e igual del número diploide de cromosomas en dos núcleos en desarrollo en los polos de la célula anafásica.

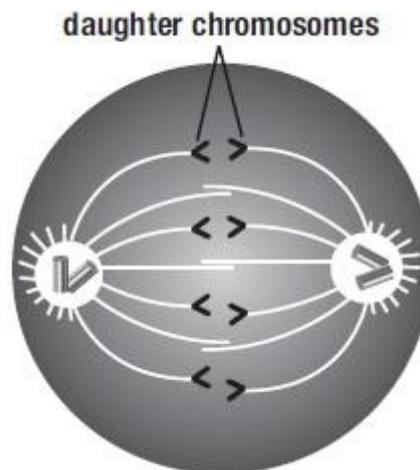


Figura 4: Anafase

Telofase y citocinesis

La fase mitótica final del ciclo celular se reconoce por la formación de dos nuevos núcleos que abarcan el cromosoma separado en los polos celulares. El aparato mitótico desaparece y los cromosomas comienzan a alargarse a medida que se desenrollan. La citocinesis, la formación de una nueva membrana celular, se produce a mitad de camino entre los núcleos hijos. En los animales, existe la formación del surco de escisión indentado. En las plantas, como las células de la raíz de la cebolla, esto se ve como la formación de una placa celular, dividiendo la célula original en dos células hijas (supuestamente equivalentes). Las células ahora entran en la etapa G1 de interfase en el ciclo celular y el proceso comienza de nuevo.

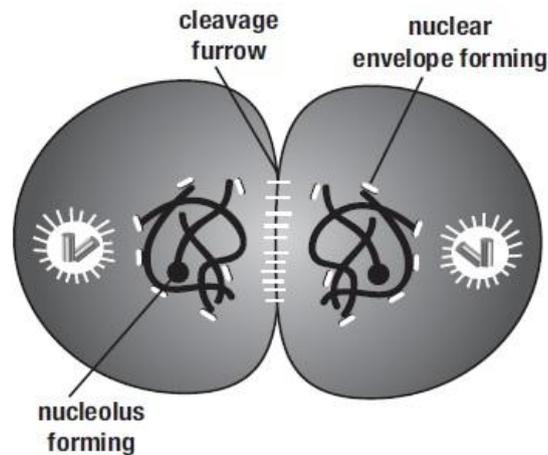


Figura 5: Telofase y citocinesis

Meiosis

La **meiosis** es un tipo especializado de división celular que comparte muchas características con la mitosis. La principal diferencia es que la meiosis involucra dos divisiones nucleares sucesivas que producen cuatro **células haploides**. Cada gameto, o célula sexual, contiene la mitad del número de cromosomas. En los humanos, cada gameto contiene 23 cromosomas. La fertilización de un óvulo por un espermatozoide, que contiene 23 cromosomas, restaura el número diploide de 46 cromosomas. La meiosis consiste en dos rondas de división celular, **Meiosis I** y **Meiosis II**, cada una con su propia fase, metafase, anafase y telofase.

En animales, los gametos, espermatozoides y óvulos, de animales generalmente se forman directamente a partir de tejido diploide y no a partir de una generación de gametófitos haploides de plantas como el maíz. En los animales, el óvulo y el espermatozoide se unen para formar el cigoto diploide que se desarrolla en un adulto maduro. En las plantas, uno de los gametos masculinos del polen (formado en los estambres) se une con el gameto femenino en el pistilo para formar el cigoto diploide fertilizado. El otro gameto masculino se combina con el núcleo del endosperma diploide para formar un tejido de endosperma triploide. Ambos están en la semilla de maíz.

DIVISIÓN MEIOTICA I

Profase I

Los cromosomas comienzan a acortarse y espesarse. En algunas plantas, parecen agregarse juntas en un lado del núcleo. En animales, pueden parecer que se orientan con un extremo más cercano a la membrana nuclear adyacente al centríolo. La primera gran diferencia entre la mitosis y la meiosis es que los pares de cromosomas homólogos se unen o forman sinapsis. El resultado es una tétrada que consiste en cuatro cromátidas. Este complejo permite que se produzca el "cruce" entre los pares de cromosomas homólogos. El punto de cruce aparece como una estructura en forma de X, llamada **quiasma**. Durante la formación del quiasma, hay un cruce o intercambio genético entre cromosomas homólogos. Existe una ruptura catalizada por enzimas y la reparación de los cromosomas sin sinapsis. El cruce es muy importante porque conduce a un aumento en la aleatoriedad genética y la diversidad genética/de especies. El último paso es el final de la formación de quiasma, la desaparición del nucleolo y la membrana nuclear y la formación del huso mitótico.

Metafase I

Los pares homólogos de sinapsis de cromosomas llegan al punto medio, o ecuador, entre los polos. Los pares sin sinapsis se orientan de tal manera que un miembro de cada par se enfrenta al polo opuesto de la célula, con los 23 pares de cromosomas dispuestos completamente al azar. No hay tendencia para que un miembro de la pareja se enfrente a uno de los polos. Este surtido aleatorio también contribuye en gran medida a la diversidad genética dentro de una especie.

Anafase I

Los pares de cromosomas homólogos, cada uno longitudinalmente doble (**tétradas**), comienzan a separarse y migrar a los polos celulares. En contraste con la mitosis, los cromosomas enteros, frente a las cromátidas hermanas, se mueven a cada polo. Esta es la segunda gran diferencia entre la mitosis y la meiosis. Cada polo recibe aleatoriamente el cromosoma materno o paterno de cada pareja homóloga. Por lo tanto, hay una reducción a la mitad exacta del número de cromosomas diploides durante la etapa de meiosis de Anafase I.

Telofase I

Los cromosomas llegan a los polos de la célula al comienzo de esta fase. La membrana nuclear se forma y el nucleolo comienza a reorganizarse. Las **citoquinas** son, división celular física, ocurren durante esta fase, aunque no en todas las especies de animales o plantas. En el maíz, hay una separación física durante esta etapa. En la planta *Trillium*, la Telofase I parece omitirse por completo. Interfase II (intercinesia). El tiempo que se pasa en esta fase depende del tipo de organismo, la formación de nuevas envolturas nucleares y la cantidad de desenrollamiento cromosómico. Una tercera gran diferencia entre la mitosis y la meiosis es que la replicación del ADN no se produce durante la intercinesia.

DIVISIÓN MEIOTICA II

Para reducir la cantidad de ADN a la mitad se necesita una segunda división meiótica para separar las cromátidas de los cromosomas en las dos células hijas formadas en la Meiosis I.

Profase II

Esta fase se asemeja a la profase mitótica, excepto que los cromosomas no se acortan dramáticamente. El nucléolo, el sitio de la síntesis de ARNr activo, desaparece. La membrana nuclear también desaparece y el aparato mitótico, el huso, comienza a organizarse dentro de la célula.

Metafase II

El número monoploide de cromosomas se organiza en el punto medio (ecuador) entre los polos. Cada cromosoma está compuesto por dos cromátidas hermanas.

Anafase II

Las cromátidas hermanas comienzan a separarse y migrar a los polos como en la mitosis. Esta etapa termina cuando están en los polos. Cada cromátida tiene su propia región centrómera ahora, y se llama **cromosoma**.

Telofase II

Los cromosomas comienzan a alargarse, el núcleo se reforma y el nucleolo se reorganiza. Se produce citocinesis y el resultado final de la meiosis es cuatro células, cada una de las cuales contiene el número de cromosomas del cromosoma haploide. La meiosis, por lo tanto, es un proceso que produce diversidad de gametos: surtido independiente. Este surtido independiente proporciona cromosomas sin cruce (**Figura 6**) y cromosomas con cruce (**Figura 7**). El **cruce cromosómico** (o cruce) es el intercambio de material genético entre cromosomas homólogos que da como resultado **cromosomas recombinantes**. Es una de las fases finales de la **recombinación genética**, que ocurre durante la profase I de la meiosis.

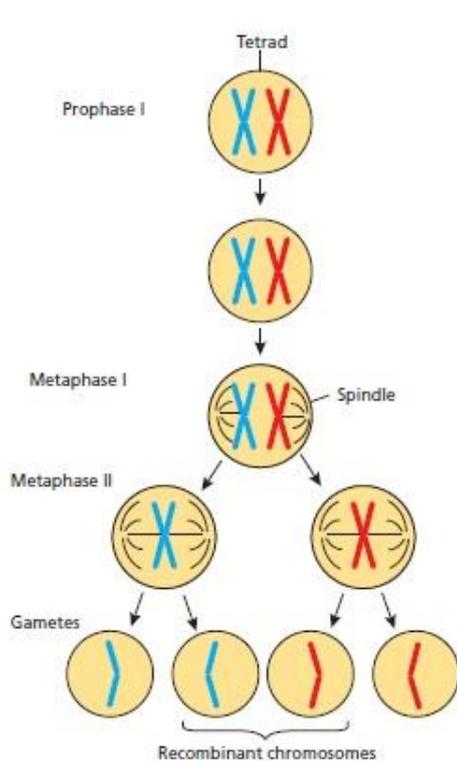


Figura 6: Meiosis sin cruce.

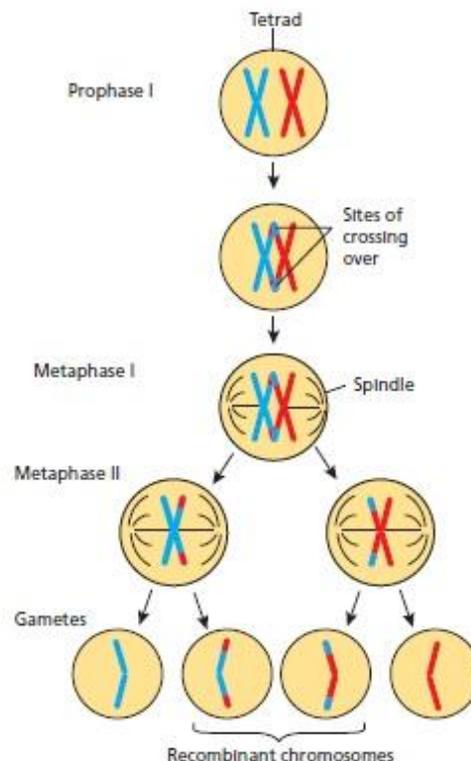


Figura 7: Meiosis con cruce.

CICLO CELULAR Y PUNTOS DE CONTROL

La división celular está estrechamente controlada por complejos formados por varias proteínas específicas que contienen enzimas llamadas **quinasas dependientes de ciclina (CDK)**. Los CDK activan o desactivan los diversos procesos que tienen lugar en la división celular. Las **ciclinas** son otra familia de proteínas con las que CDK se asocia. Por ejemplo, CDK se activa cuando está unido a ciclina, interactúa con varias otras proteínas y permite que la célula pase de G2 a mitosis.

Ciclinas y CDK no permiten que la célula progrese a través de su ciclo automáticamente. Hay tres puntos de control que una célula debe atravesar durante su ciclo: el punto de control G1, el punto de control G2 y el punto de control del eje M (**Figura 8**). Los puntos de control del ciclo celular son vías regulatorias que controlan el orden y el momento de las transiciones del ciclo celular y aseguran que los eventos críticos como la replicación del ADN y la segregación cromosómica se completen con alta fidelidad. Además, los puntos de control responden al daño deteniendo el ciclo celular para proporcionar tiempo para la reparación e induciendo la transcripción de genes que facilitan la reparación. La pérdida del punto de control produce inestabilidad genómica y se ha visto implicada en la evolución de las células normales hacia las células cancerosas.

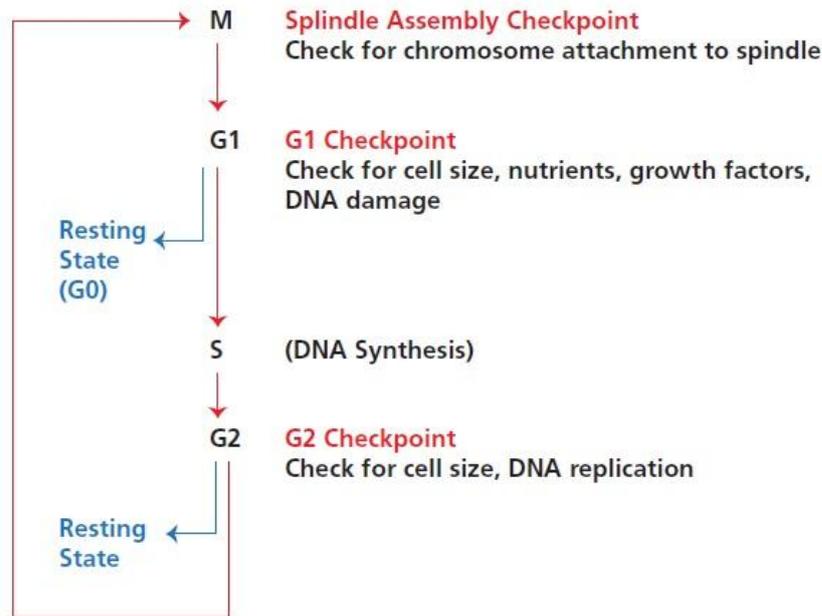


Figura 8: Ciclo celular con los puntos de control G1 y G2.

El punto de control G1 (restricción) es donde se toma la decisión de si la célula se dividirá, la división demorada o pasará a la etapa de reposo. En el punto de control G2, se verifica el éxito de la replicación del ADN de la fase S. Si se pasa este punto de control, la célula inicia muchos procesos moleculares que señalan el comienzo de la mitosis. El punto de control M asegura que los husos mitóticos o los microtúbulos están unidos correctamente a los cinetocoros. Si los husos no están anclados correctamente, la célula no continúa a través de la mitosis. Las mutaciones en los genes del ciclo celular que interfieren con el control adecuado del ciclo celular se encuentran muy a menudo en las células cancerosas.

Los **trastornos cromosómicos humanos** ocurren como resultado de la pérdida de control durante el ciclo celular. La no disyunción ocurre cuando los homólogos no se separan durante la anafase I de la meiosis, o las cromátidas hermanas no se separan durante la anafase II. El resultado es que un gameto tiene 2 copias de un cromosoma y el otro no tiene copia de ese cromosoma. (Los otros cromosomas se distribuyen normalmente)

Si alguno de estos gametos se une con otro durante la fecundación, el resultado es **aneuploidía** (número anormal de cromosomas)

- Una **célula trisómica** tiene un cromosoma adicional ($2n + 1$) = ejemplo: **trisomía 21**. (La **poliploidía** se refiere a la condición de tener tres cromosomas homólogos en lugar de dos)
- Una **célula monosómica** tiene un cromosoma menos ($2n - 1$) = generalmente letal a excepción de uno conocido en humanos: el **síndrome de Turner** (monosomía XO).

El **síndrome de Patau** es una anomalía cromosómica en la cual un individuo tiene un cromosoma 13 adicional debido a una ausencia de disyunción del cromosoma durante la meiosis. El **síndrome de Down** es el resultado de una copia adicional del cromosoma 21. Las personas con síndrome de Down pueden llegar a vivir más de 47 años. El síndrome de Down afecta a 1:700 niños y altera el fenotipo del niño de forma moderada o severa. El **síndrome de Edward** es un trastorno genético en el que una persona tiene una tercera copia del material del cromosoma 18, en lugar de las dos copias habituales.

MEIOSIS Y CRUCE EN *SORDARIA FIMICOLA*

Sordaria fimicola (*S. fimicola*) ofrece grandes ventajas para los estudios genéticos, ya que tienen un ciclo de vida corto, de 7-12 días, y se cultivan fácilmente en laboratorio. La forma más común de *S. fimicola* es de color marrón oscuro, mientras que ciertos mutantes son grises o tostados. La *S. fimicola* produce peritecios negros que contienen asci. Cada ascus contiene ocho ascosporas, en una disposición lineal.

En la última parte de la práctica (Investigación III), los estudiantes descubrirán cómo la *S. fimicola* puede darnos información sobre el cruce durante la meiosis. Si no se cruza, hay un patrón de 4:4, 4 esporas negras y 4 esporas de color canela alineadas. Si se produce el cruce, hay un patrón visible 2:2:2:2, o un patrón 2:4:2. Los asci de tipo parental tienen cuatro esporas negras y cuatro tostadas seguidas (patrón 4:4), mientras que las asci recombinantes no tendrán este patrón (**Figura 9**).

La frecuencia de los cruces parece estar dirigida en gran parte por la distancia entre los genes, o en este caso, entre el gen del color del pelaje de las esporas y el centrómero. La probabilidad de que se produzca un cruce entre dos genes particulares en el mismo cromosoma (**genes vinculados**) aumenta a medida que aumenta la distancia entre esos genes. La frecuencia de cruce, por lo tanto, parece ser directamente proporcional a la distancia entre los genes.

Una **unidad de mapa** es una unidad de medida arbitraria que se utiliza para describir las distancias relativas entre genes vinculados. El número de unidades de mapa entre dos genes o entre un gen y el centrómero es igual al porcentaje de recombinantes.

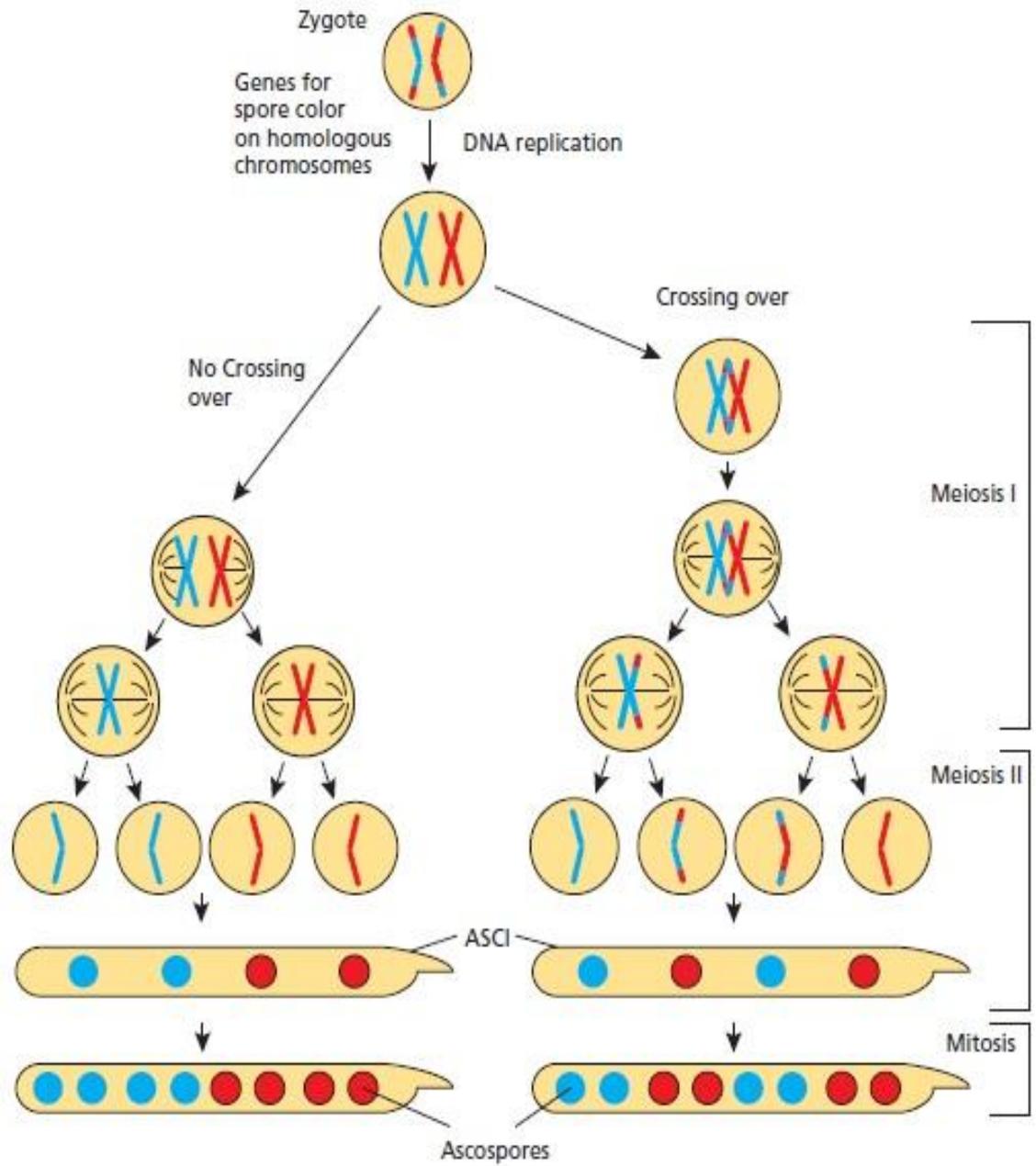


Figura 9: Meiosis y cruzamiento en *Sordaria*.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

El objetivo de esta práctica es que los estudiantes identifiquen y diferencien varias etapas en la mitosis y la meiosis. Las puntas de raíz de cebolla se tiñen para identificar las diversas etapas y la duración de la mitosis. Los estudiantes también tendrán la oportunidad de analizar el mecanismo involucrado en la pérdida del control del ciclo celular en el cáncer. En esta práctica también veremos la meiosis y el cruce en *Sordaria*.

4.1 Precauciones

1. Se deben usar los guantes y gafas de protección de forma rutinaria como buenas prácticas de laboratorio durante todo el procedimiento.
2. Deben tener mucho cuidado al trabajar con equipos que utilizan calor y/o fusión de los reactivos.
3. NO PIPETEAR LOS REACTIVOS CON LA BOCA - PIPETEAR CON PERAS DE SUCCIÓN.
4. Lavarse bien siempre las manos con agua y jabón después de manipular reactivos o materiales biológicos del laboratorio.
5. Tener cuidado al usar cualquier equipo eléctrico en el laboratorio.
6. Si no está seguro de algo, ¡PREGÚNTELE AL PROFESOR DE PRÁCTICAS!

4.2 Requisitos de tiempo (aproximado) de los procedimientos de la práctica

El horario de cada profesor y los requisitos de tiempo determinarán cuándo se deben preparar.

Esta práctica requiere un mínimo de cuatro clases de laboratorio de aproximadamente 45 minutos cada una, más el tiempo necesario para explicar el control del ciclo celular (**Investigación III**). Además, se debe tener en cuenta el tiempo que será necesario para que los estudiantes puedan comentar sus resultados de las **Investigación II y V**.

El profesor de prácticas también necesitará tiempo para preparar los cromosomas modelo con los limpiadores de tubos (**Investigación I y IV**).

La preparación del bulbo de cebolla llevará una hora y para el tratamiento de las puntas de raíz dos horas más el tiempo de fijación (de 4-18 horas). Esto podría hacerse una semana antes de la práctica de laboratorio. Las puntas de las raíces pueden almacenarse en etanol al 70% durante varias semanas (**Investigación II**).

Se necesita poco tiempo para la preparación de la práctica de los cruces de *Sordaria* (**Investigación V**).

4.3 Preparaciones previas

Notas a los preparativos del profesor de la práctica

El tamaño de la clase, la duración de las clases de prácticas y la disponibilidad de los equipos son factores que deben ser considerados en la planificación e implementación de esta práctica con sus alumnos. Estas directrices pueden adaptarse para encajar en sus circunstancias específicas.

Registro de las actividades de laboratorio

Los científicos documentan todo lo que ocurre durante un experimento, incluyendo condiciones experimentales, pensamientos y observaciones durante la realización del experimento y, por supuesto, cualquier información recopilada. Hoy, los estudiantes documentarán su práctica en una libreta de laboratorio o en una hoja de trabajo separada.

Los alumnos deben registrar en su libreta de prácticas las actividades indicadas a continuación.

Antes de iniciar la práctica:

- Escribir una hipótesis que refleje la práctica.
- Predecir los resultados experimentales.

Durante la práctica:

- Registrar (dibujar) sus observaciones, o fotografiar los resultados.

Al finalizar la práctica:

- Formular una explicación de los resultados.
- Determinar lo que podría cambiar en la práctica si la repites.
- Escribir una hipótesis que refleje este cambio.

Instrucciones generales

PREPARATIVOS ANTES DE LA PRÁCTICA

INVESTIGACIÓN I Y IV: MODELANDO LA MITOSIS Y LA MEIOSIS

1. Preparar las copias de la **Hoja de trabajo 1 – MITOSIS (ANEXO 1)** y la **Hoja de trabajo 2–MEIOSIS (ANEXO 2)**, y organizarlas en conjuntos. Cada conjunto tendrá una plantilla de Mitosis y una de Meiosis. Distribuir 1 conjunto a cada grupo de estudiantes.

2. Preparar múltiples conjuntos de cromosomas modelo de limpiadores de tubos de la siguiente manera:

- a. Cortar los limpiadores de tubo COLOR n.º1 en trozos de unos 3 cm de largo. Repetir con los limpiadores de tubo COLOR n.º2.
- b. Juntar 2 piezas de limpiadores de tubo COLOR n.º1 a través de 1 cuenta para crear una dobla cadena. Repetir con los limpiadores de tubo COLOR n.º2. Asegurarse que las 2 piezas de limpiadores de tubos queden bien ajustadas en 1 cuenta.
- c. Colocar los siguientes materiales en una pequeña bolsa de plástico y distribuir una bolsa a cada grupo de estudiantes.
 - 5 piezas individuales, color 1
 - 5 piezas individuales, color 2
 - 3 piezas dobles, color 1
 - 3 piezas dobles, color 2
 - 1 hoja de mitosis
 - 1 hojas de meiosis

INVESTIGACIÓN II: ESTUDIAR LOS EFECTOS DEL MEDIO AMBIENTE EN LA MITOSIS

A. Soluciones para la preparación de las puntas de raíz de cebolla

1. Preparar el **fijador de Carnoy** añadiendo 75 ml de ácido acético glacial a 225 ml de etanol al 95%. Dispensar 25 ml de solución de fijador de Carnoy por grupo.

2. Preparar la **solución de lecitina** disolviendo todo el polvo de lecitina en 250 ml de agua destilada. Dispensar 25 ml de solución de lecitina por grupo.

B. Preparación de la punta de raíz de cebolla (aproximadamente 48 horas antes del día de laboratorio)

NOTA: La preparación de puntas de cebolla puede realizarla el profesor de prácticas o plantearse como una clase de prácticas y ser realizada por los propios alumnos.

Seguir las siguientes instrucciones para preparar una punta de raíz de cebolla por grupo.

1. Lavar las cebollas bajo el agua para eliminar el exceso de suciedad y pelar la piel exterior seca.
2. Preparar los bulbillos cortando las hojas verdes, dejando un bulbo de 7 cm de alto. También cortar las raíces secas a la base del bulbo (con una cuchilla de afeitar o cúter).
3. Colocar el bulbo en el centro del vaso para que toque el fondo de la taza.
4. Mientras sostiene el bulbo, comenzar a agregar arena fina en el vaso hasta que la arena llene unos 3 cm del vaso.
5. Agregar la solución de lecitina (25 ml) para humedecer la arena.
6. Guardar el vaso en la oscuridad durante un día y medio o dos.
7. Una vez transcurrido el tiempo (uno día y medio o dos), cosechar las puntas de la raíz de la cebolla quitando los bulbos de la arena y enjuagando la arena con agua destilada.
8. Cortar las raíces recién crecidas de cada bulbillo usando tijeras de disección finas.
9. Colocar las puntas de raíz cortadas en el tubo cónico de 50 ml que contenga aproximadamente 25 ml de fijador de Carnoy durante 4-18 horas.
10. Decantar el fijador de Carnoy del tubo cónico y lavar el tubo con agua destilada.

NOTA: Tener mucho cuidado de no perder las puntas de raíz al decantar o lavar el tubo cónico.

11. Agregar 25 ml de etanol al 70% en el tubo cónico. Mantener las puntas de las raíces en el etanol durante 5 minutos.

12. Desechar el etanol. Las puntas de raíz están ahora listas para realizar las preparaciones de microscopio.

NOTA: Las puntas de raíz de cebolla se pueden almacenar en etanol al 70% a 4°C durante varias semanas.

INVESTIGACIÓN III: PÉRDIDA DEL CONTROL DEL CICLO CELULAR EN EL CÁNCER

1. Preparar copias de los cariotipos masculino y femenino normales (figuras 10 y 11).
2. Preparar copias de la **Hoja de trabajo 3-Identificación de los cariotipos de pacientes con trastornos cromosómicos (ANEXO 3)** que contiene el cariotipo de los pacientes 1, 2 y 3.
3. Organizar en conjuntos las copias preparadas. Cada conjunto tendrá un cariotipo masculino normal, un cariotipo femenino normal y una **Hoja de trabajo 3** (que contiene el cariotipo de los pacientes 1, 2 y 3.)
4. Distribuir 1 conjunto de copias a cada grupo de estudiantes.

INVESTIGACIÓN V: MEIOSIS Y CRUCE EN SORDARIA

1. Preparar copias de la **Hoja de trabajo 4-Identificación de asci y tipos de padres recombinantes (ANEXO 4)**.
2. Distribuir 1 **Hoja de trabajo 4** para cada grupo de estudiantes.

4.4 Material que debe recibir cada grupo

Cada grupo de prácticas debe recibir los siguientes materiales antes de iniciar el procedimiento experimental:

Investigación I y IV: Modelado de mitosis y meiosis

PARA CADA GRUPO
5 piezas individuales COLOR 1
5 piezas individuales COLOR 2
3 piezas dobles COLOR 1
3 piezas dobles COLOR 2
1 hoja de trabajo 1-MITOSIS (ANEXO 1)
1 hoja de trabajo 2-MEIOSIS (ANEXO 2)

Investigación II: Estudiar los efectos del medio ambiente en la mitosis

PARA CADA GRUPO
Cebolla
25 ml fijador de Carnoy
25 ml solución de lecitina
Agua destilada
Arena
1 vaso de plástico
1 tubo cónico 50 ml

PARA CADA GRUPO
5 ml HCl 12M
Agua destilada
Etanol 70%
5 ml fijador de Carnoy
1 tubo cónico 50 ml
50 µl colorante Carbol-fuschin
1 copia Tabla 1

Investigación III - Pérdida del control del ciclo celular en el cáncer

PARA CADA GRUPO
1 copia cariotipo masculino normal (figura 10)
1 copia cariotipo femenino normal (figura 11)
1 Hoja de trabajo 3-Identificación cariotipos (ANEXO 3)

Investigación V: Meiosis y Cruce en *Sordaria*

PARA CADA GRUPO
1 Hoja de trabajo 4-Identificación asci (ANEXO 4)
1 copia Tabla 2

4.5 Evitar los errores más comunes

1. Seguir las instrucciones cuidadosamente.

5. PRÁCTICA

5.1 Procedimientos

Investigación I y IV: Modelado de mitosis y meiosis

Notas:

- Esta práctica se realiza mejor después de que los alumnos hayan estudiado la parte teórica de la mitosis y la meiosis y/o hayan visto un video o una animación que muestre estos dos procesos. La práctica está diseñada para ayudar a los estudiantes a comprender las diferencias críticas entre lo que sucede con los cromosomas durante la mitosis y la meiosis.
- Los profesores de prácticas han de proporcionar orientación a medida que los estudiantes usen los limpiadores de tubos para simular la duplicación y el movimiento de los cromosomas durante la mitosis y la meiosis.

MITOSIS:

Los estudiantes trabajarán en grupos para manipular los "cromosomas-limpiadores de tubos" como modelo que muestra las etapas de un par de cromosomas durante la mitosis. Colocar el cromosoma modelo en un círculo que simule la célula (usar como plantilla la **Hoja de trabajo 1**) y manipular los cromosomas modelo siguiendo sus posiciones durante las diferentes etapas de la mitosis bajo la supervisión del profesor de prácticas.

1. Cada limpiador de tubos simula un **cromosoma**

- a. Un limpiador de tubos COLOR 1 (p.ej. amarillo) representa un cromosoma heredado de la madre.
- b. Un limpiador de tubos COLOR 2 (p. ej. verde) representa un cromosoma heredado del padre.

2. Dos limpiadores de tubos unidos por una cuenta (**centrómero**) representan un cromosoma duplicado en dos nuevos filamentos (**cromátidas**), cada uno de los cuales se convierte en un cromosoma duplicado cuando el centrómero se divide al comienzo de la anafase.

3. Comprobar el material que simulará el cromosoma: antes de iniciar la práctica y al terminarla, contar todas las piezas que se necesitan para la simulación. Avisar al profesor de prácticas si hay piezas en exceso o faltan. **NO RETIRAR LAS CUENTAS DE LOS LIMPIADORES DE TUBOS DOBLES.**

4. Ordenar las piezas en la **Hoja de trabajo 1 – MITOSIS (ANEXO 1)**, que muestra los movimientos cromosómicos esenciales durante la mitosis. **NO** son necesarias todas las piezas durante esta parte de la práctica. Cuando se terminó la simulación, levantar la mano o llamar al profesor de prácticas para revisar el trabajo realizado.

5. Cuando se aprueba el diseño de la MITOSIS realizado, copiar los movimientos en la **Hoja de trabajo 1 - MITOSIS**, usando dos lápices de colores diferentes.

6. Retirar todas las piezas y proceder a organizarlas en las dos **Hojas de ejercicios 2 - MEIOSIS.**

Recordar:

- Profase: la matriz de cromosomas en Profase y las células hijas es aleatoria, con los mismos dos cromosomas en cada célula.
- Metafase: los cromosomas duplicados (en cromátidas o "cromosomas hijos") **NO** están emparejados, sino que están alineados en el centro, en ninguna secuencia particular, de arriba abajo.
- Anafase: la secuencia vertical que se muestra en metafase debe seguirse con la misma secuencia en la Anafase.

MEIOSIS

Los estudiantes trabajarán en grupos para manipular los “cromosomas-limpiadores de tubos” como modelo que muestra las etapas de un par de cromosomas durante la mitosis. Colocar el cromosoma modelo en un círculo que simule la célula (usar como plantilla la **Hoja de trabajo 2**) y manipular los cromosomas modelo siguiendo sus posiciones durante las diferentes etapas de la meiosis bajo la supervisión del profesor de prácticas.

1. Cada limpiador de tubos simula un **cromosoma**

- a. Un limpiador de tubos COLOR 1 (p.ej. amarillo) representa un cromosoma heredado de la madre.
- b. Un limpiador de tubos COLOR 2 (p. ej. verde) representa un cromosoma heredado del padre.

2. Dos limpiadores de tubos unidos por una cuenta (**centrómero**) representan un cromosoma duplicado en dos nuevos filamentos (**cromátidas**), cada uno de los cuales se convierte en un cromosoma duplicado cuando el centrómero se divide al comienzo de la anafase.

3. Comprobar el material que simulará el cromosoma: antes de iniciar la práctica y al terminarla, contar todas las piezas que se necesitan para la simulación. Avisar al profesor de prácticas si hay piezas en exceso o faltan. **NO RETIRAR LAS CUENTAS DE LOS LIMPIADORES DE TUBOS DOBLES.**

4. Ordenar las piezas en la **Hoja de trabajo 2–MEIOSIS (ANEXO 2)**, que muestra los movimientos cromosómicos esenciales durante la meiosis. En este caso **SI** son necesarias todas las piezas durante esta parte de la práctica. Cuando se terminó la simulación, levantar la mano o llamar al profesor de prácticas para revisar el trabajo realizado.

5. Cuando se aprueba el diseño de la MEIOSIS realizado, copiar los movimientos en la **Hoja de trabajo 2-MEIOSIS**, usando dos lápices de colores diferentes.

6. Como ejercicio adicional, se puede pedir a los estudiantes que repitan la mitosis y el proceso de meiosis usando dos pares de cromosomas. Es muy importante que los estudiantes sigan el camino vertical de manera consistente.

Recuerda:

1. Profase: matriz de cromosomas en Profase es aleatoria.

2. Metafase I: los cromosomas duplicados están emparejados (dos largos están uno al lado del otro, lo mismo para dos pantalones); la secuencia vertical puede variar, del mismo modo para qué cromosoma de cada par quede a la izquierda. Por ejemplo, puede haber un verde (COLOR 1) largo sobre un rojo (COLOR 2) corto a la izquierda, como se muestra, o un rojo corto sobre un rojo largo, etc. (Verde y rojo son solo dos limpiadores de tubos de diferentes colores en nuestro ejemplo).

3. Anafase I y Metafase II: la secuencia vertical que se muestra en Anafase I y Metafase II debe seguirse con la misma secuencia en Metafase I. Esto es importante.

4. Los varones deben mostrar los cromosomas en los espermatozoides, las hembras en los ovulos y los cuerpos polares. Solo un cromosoma en cada célula sexual, con colores que coinciden con los colores de Metafase II.

Investigación II: Estudiar los efectos del medio ambiente en la mitosis

Realizar preparaciones con secciones de raíz de cebolla teñidas, que permitirán identificar etapas importantes de la mitosis. El profesor de prácticas debe preparar cebollas con raíces que sean frescas para usar en esta práctica. Recordar que son las puntas de las nuevas raíces emergentes las que contienen la mayor proporción de células que experimentan mitosis.

A. Preparaciones cromosómicas:

1. Coger un vaso de plástico que contenga una cebolla fresca recién enraizada de las preparadas por el profesor de prácticas.

2. Cortar aproximadamente 1-2 mm de la punta de la raíz usando una cuchilla de afeitar de borde recto o un bisturí.

NOTA: Manipular con extrema precaución y bajo la supervisión del profesor de prácticas cualquier utensilio cortando utilizado en el laboratorio.

3. Agregar 5 ml de HCl 12 M a un tubo cónico. Transferir la punta de raíz de cebolla cortada al tubo que contiene el HCl e incubar durante 4 minutos.

NOTA: Manipular el HCl con extrema precaución y bajo la supervisión del profesor de prácticas utilizado siempre el material de protección del laboratorio (batas, gafas de seguridad, guantes, etc).

4. Desechar el HCl. Lavar el tubo con agua destilada. Desechar los restos de agua que puedan quedar en el interior del tubo.

5. Agregar 5 ml de solución de fijación de Carnoy al tubo. Transferir la punta de raíz a la solución de fijación de Carnoy y mantenerla sumergida durante 4 minutos.

6. Lavar rápidamente los portaobjetos con etanol al 70% y secarlo con una toalla de papel.

NOTA: Tener mucho cuidado de no perder las puntas de raíz al decantar o lavar el tubo cónico.

7. Colocar la punta de raíz de cebolla en el portaobjetos y la parte distal del corte de 1-2 mm de las puntas. Desechar el resto de la punta de raíz de cebolla.

8. Agregar aproximadamente 50 μ l de colorante Carbol Fuschin para cubrir la punta de raíz de cebolla. Dejar la punta de raíz de cebolla sumergida en el colorante durante 2 minutos.

9. Eliminar el exceso de colorante con una toalla de papel.

10. Cubrir la punta de raíz de cebolla con 1-2 gotas de agua destilada.

11. Colocar el cubreobjetos sobre la punta de raíz de cebolla.

12. Aplicar una ligera presión, cuidadosa y suavemente, en la parte superior del cubreobjetos. Esto extenderá la punta de raíz de cebolla teñida para su visualización.

B. Contando células y analizando datos:

1. Siempre que se visualice material bajo el microscopio, se debe comenzar con el aumento más bajo del lente para localizar los objetos de interés. A continuación, cambiar a aumentos de lente más altas para una mayor visualización.

2. Dibujar las fases que se observan. Se deberían poder identificar todas las etapas mitóticas, incluidas: profase, metafase, anafase, telofase y la fase no divisoria, interfase.

3. Registrar el número de células en cada etapa. Contar las células de al menos tres campos de visión completos. Se deberían de haber contado más de 200 células.

4. Registrar los datos obtenidos en la **Tabla 1**.

TABLA 1

Fase celular	Número de células				% células total contadas	Tiempo en cada etapa
	Campo 1	Campo 2	Campo 3	Total		
Interfase						
Profase						
Metafase						
Anafase						
Telofase						
Células totales contadas						

5. Calcular el **porcentaje de células en cada fase** y anotarlo en la **Tabla 1**. Estimar el tiempo empleado en cada etapa mediante el siguiente cálculo:

$$\% \text{ células etapa} = \text{Número de células en etapa} / \text{Total de células en todas las etapas}$$

6. Calcular el **tiempo invertido en cada fase del ciclo celular** a partir del porcentaje de células en esa etapa y anotarlo en la **Tabla 1**. En promedio, las células de la punta de raíz de cebolla tardan 1440 minutos (24 horas) en completar el ciclo celular.

$$\text{Tiempo (minutos) en cada fase ciclo celular} = \% \text{ de células etapa} \times 1440 \text{ minutos}$$

Investigación III - Pérdida del control del ciclo celular en el cáncer

Las **Figuras 10** y **11** son imágenes de 46 cromosomas humanos en una célula somática, detenidos en metafase. ¿Es posible ver que las cromátidas hermanas duplicadas?

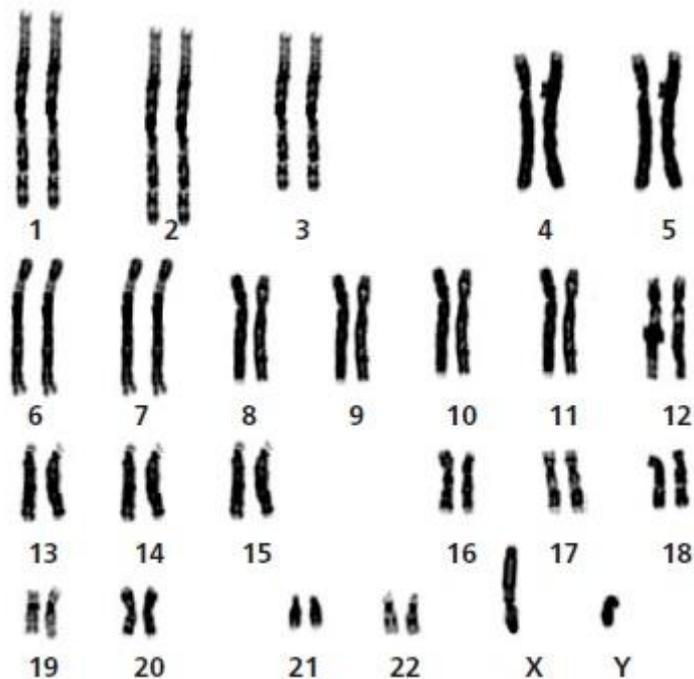


Figura 10: Cariotipo normal masculino, 46 XY

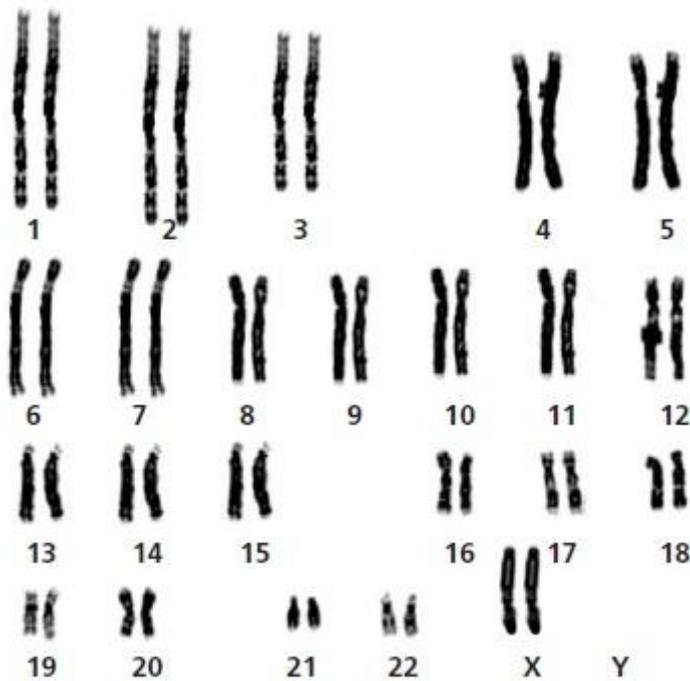


Figura 11: Cariotipo normal femenino, 46 XX

1. En función del conocimiento sobre los trastornos cromosómicos humanos y la ausencia de disyunción debida a la pérdida de control durante el ciclo celular, es posible identificar el nombre de los síndromes y cariotipos de los pacientes que se presentan en la **Hoja de trabajo 3-Identificación de los cariotipos de pacientes con trastornos cromosómicos (ANEXO 3)**.

Investigación V: Meiosis y Cruce en *Sordaria*

En esta práctica, los estudiantes medirán las frecuencias de cruce y los resultados genéticos en un hongo. Los estudiantes examinarán el asci de *Sordaria fimicola* producida cruzando el tipo salvaje (negro) con padres de color tostado.

Cada asci contiene ocho esporas. El asci de tipo parental tiene cuatro esporas negras y cuatro tostadas seguidas (patrón 4: 4). El asci recombinante no tendrá este patrón.

Estudiar las imágenes de *Sordaria* en la **Hoja de trabajo 4-Identificación de asci y tipos de padres recombinantes (ANEXO 4)** proporcionada por el profesor de prácticas contando al menos 50 asci y anotándolas como parentales o recombinantes.

- Si las ascosporas están dispuestas en 4 oscuras/4 claras, se debe contar el asci como "**Sin cruzar**".
- Si la disposición de las ascosporas está en cualquier otra combinación, se debe contar el asci como "**Cruce**".
- Registrar el resultado en la **Tabla 2**.

TABLA 2

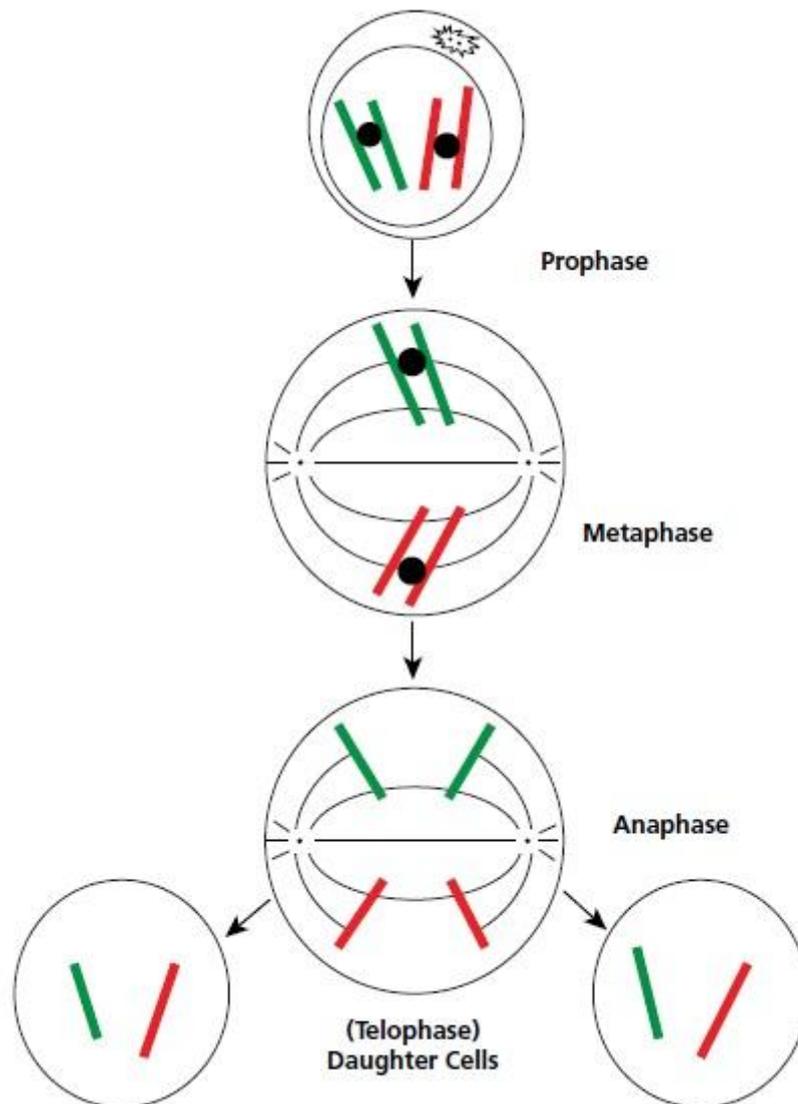
Nº asci que NO muestran cruce	Nº asci que SI muestran cruce	Total	% Asci que SI muestran cruce	Distancia del gen al centrómero (unidades mapa)

1. Una vez se haya determinado si se ha producido un cruce en al menos 50 asci híbridas, registrar los datos en la **Tabla 2**.
2. En función de los recuentos, determinar el porcentaje de asci que muestran cruce. Registrar los datos en la **Tabla 2**.
3. Dividir el porcentaje que muestra cruce por 2. Esta es la distancia del gen al centrómero. (El porcentaje de asci de cruce se divide entre 2 porque solo la mitad de las esporas en cada asi son el resultado de un evento de cruce).

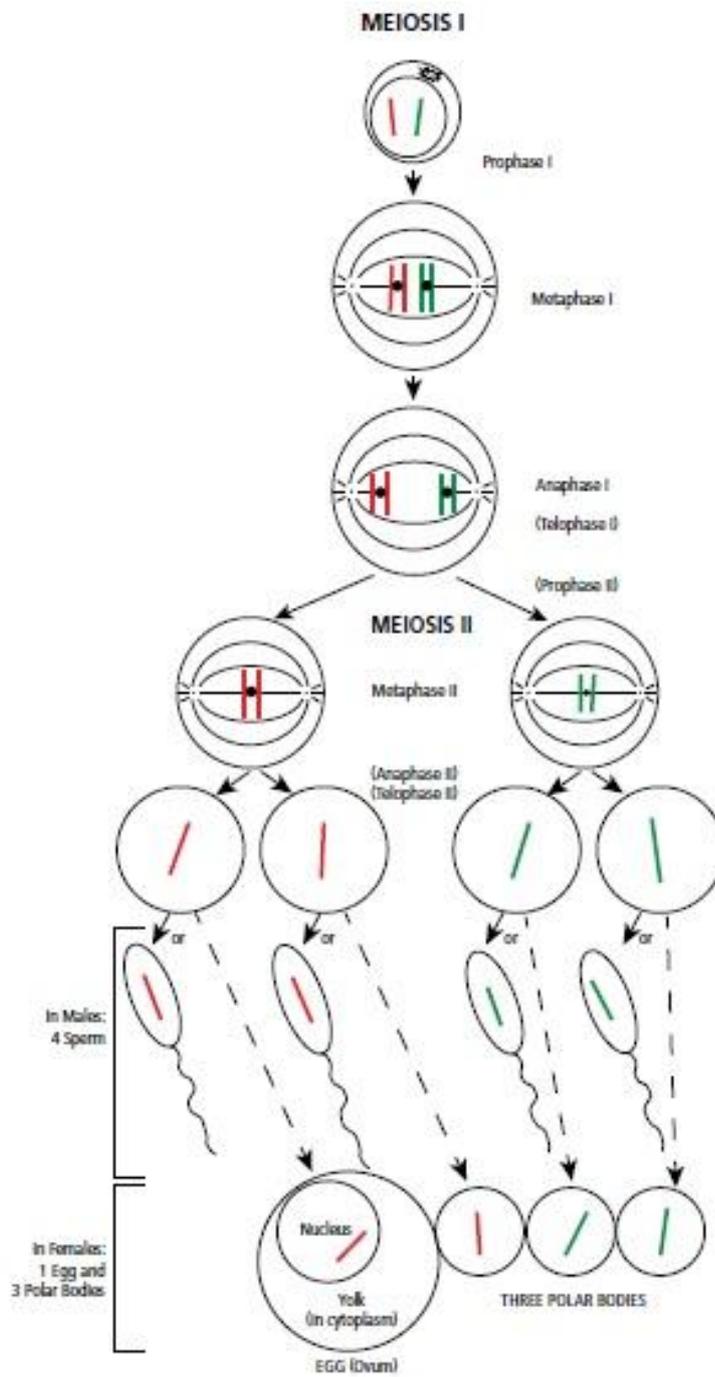
6. RESULTADOS Y PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

6.1 Resultados

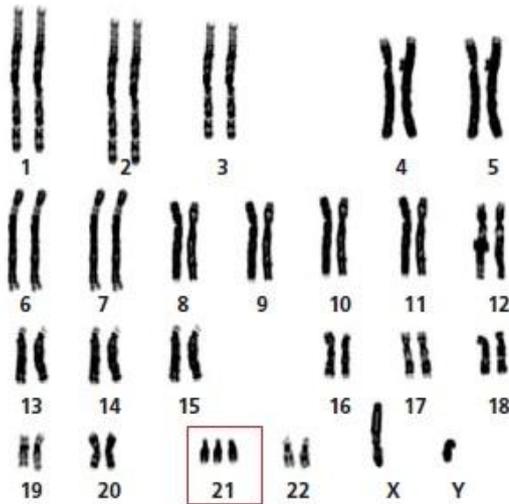
Hoja de trabajo 1-MITOSIS



Hoja de trabajo 2-MEIOSIS



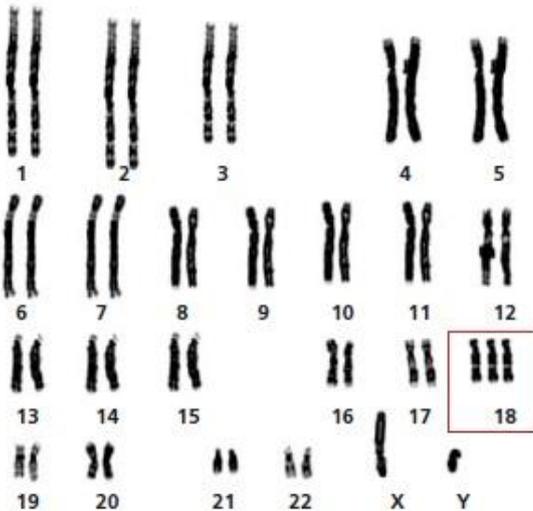
Hoja de trabajo 3-Identificación de los cariotipos de pacientes con trastornos cromosómicos.



Cariotipo Paciente 1

Cariotipo: 47, XY, +21

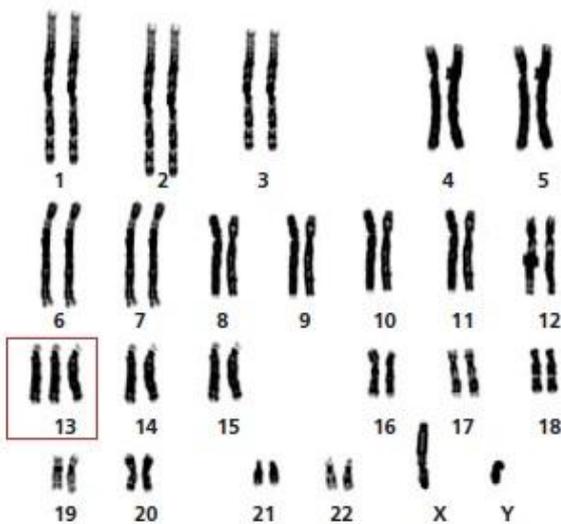
**Identificación del Síndrome:
Síndrome de Down**



Cariotipo Paciente 2

Cariotipo: 47, XY, +18

**Identificación del Síndrome:
Síndrome de Edward**



Cariotipo Paciente 3

Cariotipo: 47, XY, +13

**Identificación del Síndrome:
Síndrome de Patau**

INVESTIGACIÓN V: MEIOSIS Y CRUCE EN *SORDARIA FIMICOLA*

Cuatro ascosporas negras seguidos en fila junto a cuatro ascosporas de color tostado seguidos en fila indican que **NO** se ha producido el cruce. Cualquier otra disposición de ascosporas indica que **SI** ha tenido lugar el cruce.

Los resultados publicados indican que la distancia del mapa desde el centrómero del gen del color de la espora en *S. fimicola* es de 26 unidades de mapa (corresponde al 52% de frecuencia de cruce).

¿Se aproximan los resultados de la clase a los resultados publicados? Calcular el porcentaje de error.

6.2 Preguntas

1. ¿Cuál es el significado de la fase "S" de la Interfase de la división celular?
2. ¿Cuáles son las diferencias específicas entre la cariocinesis y la citocinesis en animales y plantas?
3. Según la cantidad de células que se encuentran en cada etapa de la mitosis en la punta de la raíz de la cebolla, ¿qué etapa de la mitosis es la más larga?
4. Enumerar y explicar las 3 principales diferencias entre la mitosis y la meiosis durante la Profase I, Anafase I e Interfase II.
5. Comparar la mitosis y la meiosis completando la **Tabla 3**:

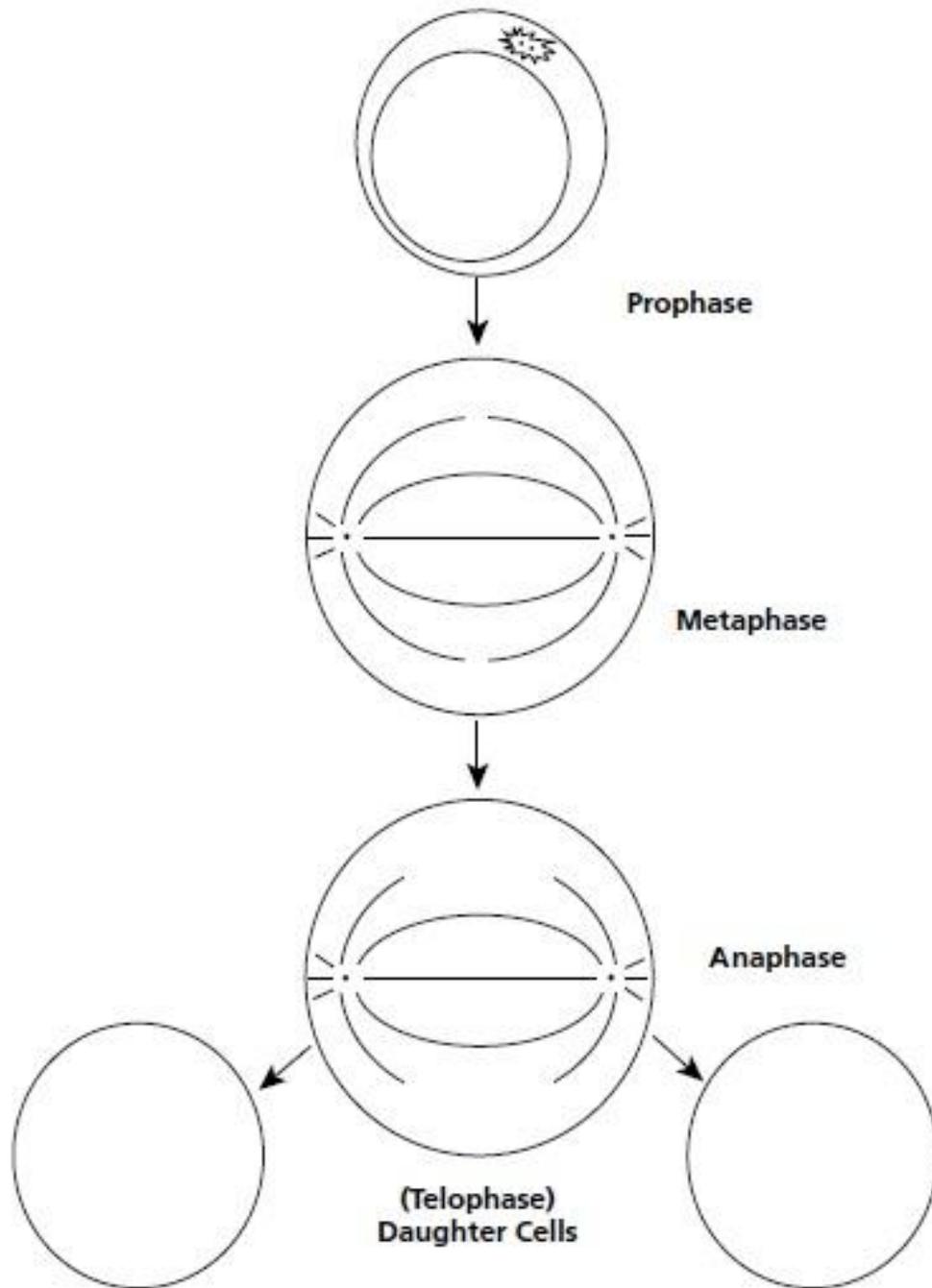
TABLA 3

	Mitosis	Meiosis
Número de cromosomas de las células progenitoras		
Número de replicaciones de ADN		
Número de divisiones celulares		
Número de células hijas producidas		
Número de cromosomas de las células hijas		
Mayor importancia		

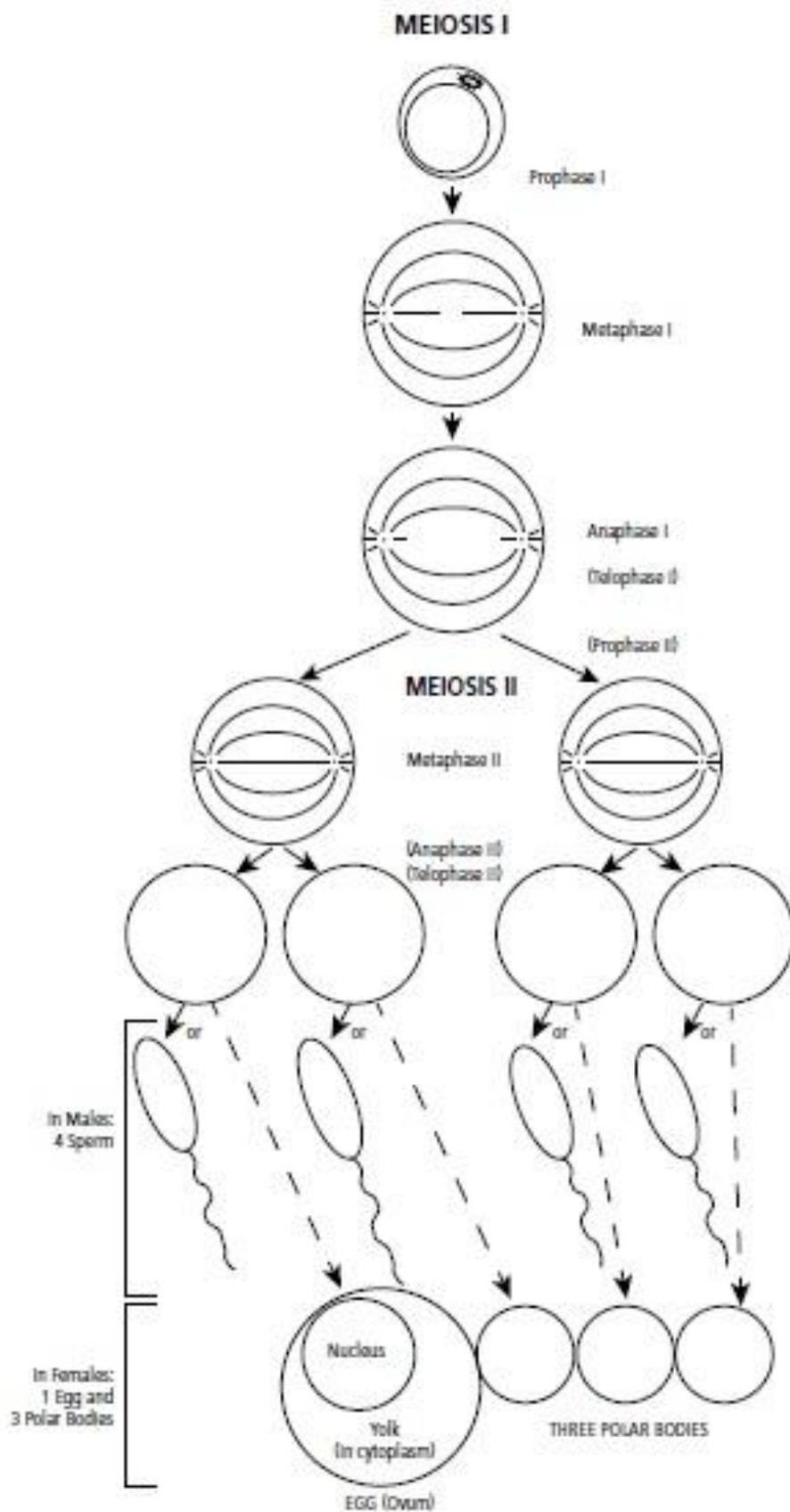
6. ¿Cuál es la principal diferencia entre Meiosis I y Meiosis II?
7. ¿Cuándo ocurre el cruce? ¿Por qué es esto significativo?
8. ¿Cómo se relaciona la frecuencia del cruce con la distancia entre los genes?
9. ¿Por qué es importante conocer el porcentaje de recombinantes en la descendencia?
10. ¿Qué es una unidad del mapa?

Para cualquier duda o consulta adicional, por favor, contacte con nosotros info@bioted.es

ANEXO 1: Hoja de trabajo 1-MITOSIS



ANEXO 2: Hoja de trabajo 2-MEIOSIS



ANEXO 3: Hoja de trabajo 3-Identificación de los cariotipos de pacientes con trastornos cromosómicos.

En función del conocimiento sobre los trastornos cromosómicos humanos y la ausencia de disyunción debida a la pérdida de control durante el ciclo celular, identificar el nombre de los síndromes y cariotipos de los pacientes que presentan los siguientes cariotipos (Figuras 12, 13 y 14):

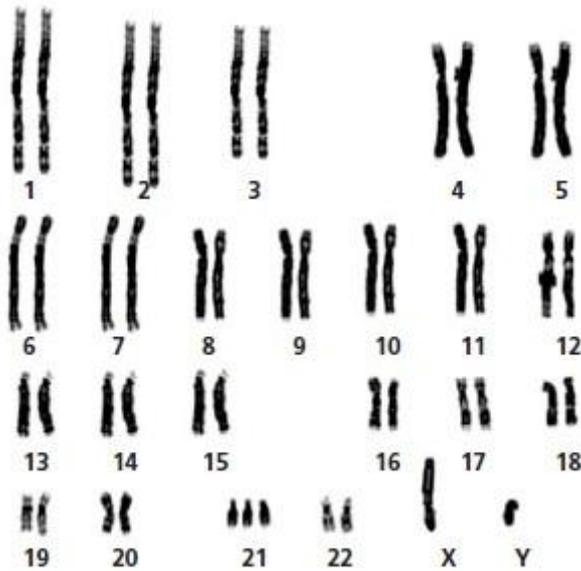


Figura 12: Cariotipo Paciente 1

Cariotipo:

Identificación del Síndrome:

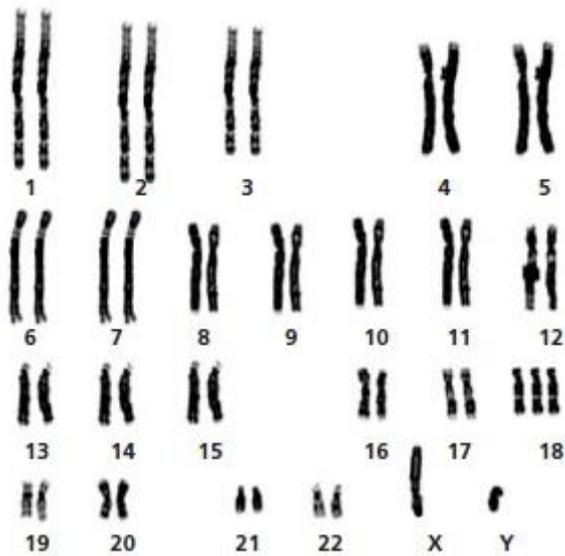


Figura 13: Cariotipo Paciente 2

Cariotipo:

Identificación del Síndrome:

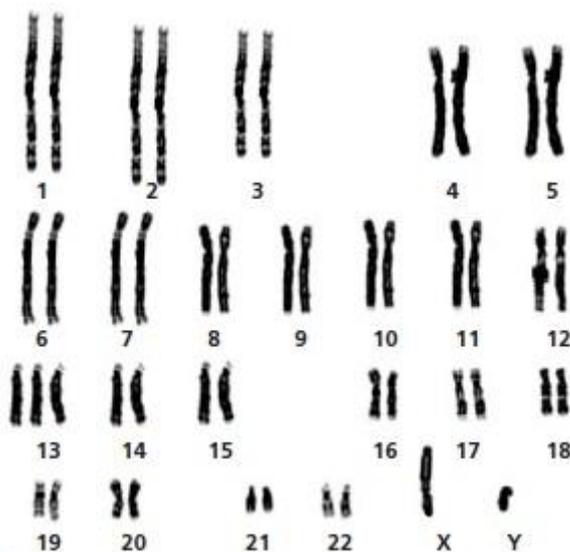


Figura 14: Cariotipo Paciente 3

Cariotipo:

Identificación del Síndrome:

ANEXO 4: Hoja de trabajo 4-Identificación de asci y tipos de padres recombinantes.

