

Trabajo Práctico Nº 1 **Membranas Celulares**

Introducción:

Si la célula no opusiera ninguna barrera a la entrada y salida de materiales, quedaría muy expuesta a los cambios del medio, por más pequeños que éstos sean. Sin embargo, limitando el protoplasma se encuentra una estructura fina, flexible, llamada membrana plasmática o plasmalema, que regula el flujo de sustancias disueltas dentro y fuera de la célula y por ósmosis el flujo de agua.

La estructura básica de la membrana es similar en células eucarióticas y procarióticas y es explicada a través del llamado modelo de mosaico fluido. Según este modelo se considera a la membrana como constituida por una doble capa lipídica con la porción hidrofílica hacia el exterior y la porción hidrofóbica hacia el interior. Contiene moléculas de proteínas que “flotan” en la doble capa lipídica, con uno o ambos extremos hidrofílicos penetrando una o ambas superficies de la membrana. Las dos superficies de la membrana son diferentes entre sí.

Las moléculas de proteínas son básicamente de tres tipos según su función: proteínas catalíticas (enzimas), proteínas que constituyen canales y otras que facilitarían el pasaje de solutos a través de la membrana (transportadores o carriers). Según su disposición, las proteínas pueden ser integrales o intrínsecas cuando están estrechamente ligadas a todos los componentes de la membrana y su remoción es difícil; y periféricas o extrínsecas, cuando están débilmente unidas a una u otra superficie de la membrana. Algunas de éstas se encuentran ligadas a moléculas cortas y ramificadas de polisacáridos unidos a la superficie externa de la membrana. Una función importante de estos polisacáridos es la de reconocimiento de moléculas externas, como proteínas y otros polisacáridos secretados eventualmente, por ejemplo, por patógenos. La composición y el comportamiento de la membrana plasmática, entre otros factores, es determinante respecto a la sensibilidad de algunos organismos a las bajas temperaturas y a las heladas, ya que los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos de las membranas son más fluidos a bajas temperaturas que los ácidos grasos saturados, permitiendo, por ejemplo, a las plantas que tienen una mayor proporción de los primeros, más resistencia a heladas, mientras que las especies susceptibles poseen ácidos grasos saturados en mayor proporción.

Algunos organismos del tipo de los protistas y la mayoría de las células de hongos y plantas superiores presentan una pared celular, cuyos poros presentan un diámetro lo suficientemente grande como para permitir que el agua y los solutos disueltos en ella puedan moverse libremente por las paredes en el apoplasto. La pared celular es atravesada por plasmodesmos, que son canales de citoplasma que conectan protoplastos de células vecinas. Esta vía,

denominada simplasto, facilita la circulación tanto de solventes como de solutos entre células de un mismo tejido.

Las membranas celulares pertenecen al tipo de las semipermeables selectivas, lo que se refleja en el rápido movimiento del agua a través de ellas, con velocidades variables y menores para los solutos, es decir, regulan el transporte de sustancias (movimiento de moléculas y de iones entre diferentes compartimientos de un sistema biológico). Dentro del transporte se puede diferenciar el pasivo del activo.

Las modificaciones en la membrana plasmática causadas por factores de estrés incrementan la permeabilidad y la liberación de iones, lo cual puede medirse como el flujo de electrolitos.

Estimar el daño de la membrana celular en función de la liberación de iones en solución es un método fácil y es ampliamente utilizado para evaluar la resistencia ante factores de estrés.

Objetivos:

- Evidenciar la naturaleza lipoproteica de la membrana plasmática a través de tratamientos que afecten a sus componentes modificando su permeabilidad.
- Estimar daño en membranas celulares.

Materiales:

60 tubos de ensayo	Sacabocados
12 tubos de centrífuga	Agua destilada
Pipetas de 5 - 10 ml	Solución salina isotónica (0.9%)
4 cápsulas de Petri	Solución detergente
3 vasos de precipitados de 200 ml	Solución salina hipertónica (2%)
Gradillas	20 ml de soluciones 1M de:
Mecheros	HONa
Guantes de látex	HOK
Centrífuga	HONH ₄
Heladera	HCl
Pinza, bisturí	Acido acético
Microscopio	<u>Remolachas</u>
Balanza	<u>Hojas de distintas plantas (xerófitas y mesófitas)</u>
Agitador	
Conductivímetro	

Los materiales subrayados deben ser provistos por los alumnos.

Procedimiento:

I) Hemólisis

Para realizar esta experiencia utilizar guantes de látex y, una vez finalizadas las actividades, disponer el material utilizado en un balde con lavandina.

1. Tomar 10 ml de la sangre provista por la cátedra y colocar unas gotas de anticoagulante para poder manipularla.
2. Colocar en un tubo de ensayo 1 o 2 ml de sangre y cuatro partes de agua destilada.
3. Efectuar el mismo procedimiento con solución salina hiperosmótica.
4. Lo que resta de sangre diluirlo en 1:4 partes de solución salina isosmótica.
5. A 2 ml de la solución anterior, agregar 2 o 3 ml de solución detergente (agua saturada con benceno).
6. Tomar 3 tubos de ensayo y colocarle a cada uno 4 ml de la solución 4. Llevar a baño maría, uno a 40°C, otro a 70°C durante 10 minutos y el tercero a freezer durante 1 hora.
7. Tomar 5 tubos de ensayo y colocar en cada uno 4 o 5 ml de la solución 4. A uno agregarle unas gotas de una solución 1M de HONa; al 2^{do}, HOK; al 3^{ero} HONH₄, al 4^{to} HCl y al 5^{to} ácido acético. Guardar el resto como testigo (sn. isosmótica)
8. Observar y registrar los cambios ocurridos en forma macroscópica. En el caso de las soluciones hipo, iso e hiperosmóticas, observar al microscopio y graficar.
9. Llevar cada muestra a un tubo de centrifuga y centrifugar durante 2 minutos a 3000 rpm. Si la sustancia sobrenadante está coloreada de rojo, ha existido hemólisis. Graficar en función de la intensidad de coloración a partir de una escala arbitraria.

II) Tejido Vegetal:

1. Cortar trozos de raíz de remolacha de 4 x 1 cm lo más uniformemente posible y lavarlos con agua corriente durante 5 minutos, para eliminar el pigmento de las células seleccionadas.
2. Marcar 4 tubos de ensayo con las siguientes temperaturas: 0° C, T° ambiente, 40° C y 70° C
3. El trozo que corresponde a 0° C debe colocarse en refrigerador durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, colocar en agua corriente 30 minutos y retirar el trozo de remolacha
4. El trozo que corresponde a T° ambiente se coloca en agua y se deja durante 30 minutos. El resto se lleva a baño maría a las temperaturas indicadas unos 10 minutos, se deja descansar 30 minutos y se retiran los trocitos de remolacha.

5. Colocar otro trozo de remolacha en un tubo de ensayo con solución detergente (agua saturada con benceno). Dejar reposar 1 hora a temperatura ambiente y retirar la remolacha.
6. Rotular 5 tubos de ensayo para: HONa, HOK, HONH₄, HCl y ácido Acético. Colocar un trozo de remolacha en cada reactivo y esperar 30 minutos. Retirar los trozos de remolacha.
7. En todos los casos, observar y registrar los cambios ocurridos. Graficar en función de la intensidad de coloración a partir de una escala arbitraria.

III) Medición de daño de las membranas celulares

Las membranas celulares pueden sufrir daños en su estructura y composición por diferentes agentes de estrés entre ellos las bajas temperaturas.

1. Pesar 0,2gr de hojas de diferentes plantas (mesófitas, xerófitas) y colocarlas en el interior de tubos de ensayo para luego ser sometidas a diferentes temperaturas (temperatura ambiente, heladera y freezer) durante 1 hora.
2. Retirar de los tratamientos y agregar 10ml de agua destilada a cada tubo de ensayo.
3. Agitar con un agitador (Vortex) durante 1 hora.
4. Determinar la conductividad eléctrica de la solución con un conductímetro, que indica el grado de integridad de las membranas celulares. Para determinar el porcentaje de daño cada muestra será sometida a altas temperaturas (colocadas en baño maría) para obtener la conductividad eléctrica máxima.
5. Calcular el porcentaje de daño mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Daño(\%)} = \frac{\text{Conductividad eléctrica de la muestra inicial}}{\text{Conductividad eléctrica de la muestra final}} \times 100$$

6. Graficar temperatura en función del porcentaje de daño y determinar el LT50, que representa la temperatura a la cual se obtiene el 50% de conductividad eléctrica en solución lo cual representa daño celular irreversible.

Resultados:

Expresar los resultados obtenidos en forma de tablas, gráficos y/o dibujos.

Conclusiones:

Una vez representados y/o graficados los resultados obtenidos, elaborar las conclusiones acerca de las experiencias realizadas, teniendo en cuenta:

- los factores que influyen sobre el funcionamiento de la membrana celular.
- cómo afectan a la membrana los factores mencionados y sobre qué porción actúan específicamente.
- Comparación de la influencia de los diversos procedimientos en células animales y vegetales.

Bibliografía:

- ✓ Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; & Watson, J.- 1987- Biología Molecular de la célula- Ediciones Omega S.A.- Barcelona- 1232 pp.
- ✓ Curtis & Barnes, S. 1994- Biología- Ed. Interamericana
- ✓ Eckert, R.; Randall, D.; Burggren, W. & French, K.- 1999 Fisiología Animal- Mecanismos y adaptaciones—Ed. Interamericana- Mc Graw Hill- 4ta Edición- 795 pp-
- ✓ Guía de Trabajos Prácticos de Fisiología Vegetal. U.N.P.S.J.B. Comodoro Rivadavia.
- ✓ Guía de Trabajos Prácticos de Fisiología General. Univ. Córdoba.
- ✓ Guía de Trabajos Prácticos de Fisiología Vegetal y Fitogeografía. 1997. U.N.L.P.
- ✓ Salisbury, F. B. & Ross, C. W. 1994. Fisiología vegetal-Ed. Interamericana-759 pp.