



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA

Técnicas de biología celular y molecular
integradas en la actualización del manual de
laboratorio de Bioquímica Celular y de los
Tejidos I de la carrera de QFB

T E S I S

Que para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta

Margarita Aguilar Sánchez

Directora: Mtra. Leonor Aguilar Santelises

Asesora: M. en C. Araceli García Del Valle

México D.F., 2014





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna AGUILAR SÁNCHEZ MARGARITA,
con número de cuenta 304133235 de la carrera de Q. F. B.,
se le ha fijado el día 22 del mes de Septiembre de 2014 a las 13:00 hrs.,
para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes
profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Q.F.B. GRACIELA ROJAS VÁZQUEZ
VOCAL	MTRA. LEONOR AGUILAR SANTELISES
SECRETARIO	M. en C. ARACELI GARCÍA DEL VALLE
SUPLENTE	M. en C. RODRIGO A. MATEOS NAVA
SUPLENTE	M. en C. ROSA ELBA GALVÁN DUARTE

El título de la tesis que se presenta es: **Técnicas de biología celular
y molecular integradas en la actualización del manual de laboratorio de Bioquímica
Celular y de los Tejidos I de la carrera de QFB**

Opción de titulación: **Tesis Experimental**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a 14 de Agosto de 2014.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
DIRECCIÓN

RECIBÍ:

OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES
Y DE GRADO

Vo.Bo.

DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRIGUEZ
JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

*“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero...
¡Qué importa! hay que perseverar y sobre todo tener
confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para
realizar alguna cosa y que esa cosa hay que
alcanzarla, cueste lo que cueste”*

Marie Curie

*Agradecimiento a la **DGAPA** en el programa **PAPIME**
por haber financiado el proyecto **PE206913**.*

Agradecimientos

Gracias a mi Directora la Mtra. Leonor Aguilar y mi Asesora la M. en C Araceli García por el tiempo dedicado, por su paciencia, por los conocimientos y experiencia que compartieron conmigo fue un placer haber trabajado con ustedes.

A la Maestra Margarita Cruz, por la ayuda en el formato de mi tesis, por los consejos, experiencias y conocimientos compartidos, gracias por su compañía y amistad.

Al M. en C. Rodrigo Mateos por su paciencia, tiempo, y por compartir sus conocimientos en el área de biología molecular que fueron de gran importancia para mi tesis

A mis Sinodales, Q.F.B Graciela Rojas, y la M. en C. Rosa Elba Galván por haber revisado mi trabajo y orientarme para corregirlo.

A la máxima casa de estudios UNAM que por mucho tiempo fue como mi segunda casa y en donde conocí a muchas personas importantes en mi vida, el lugar en donde pase agradables experiencias, y en donde obtuve gran conocimiento y aprendí a crecer como persona y como profesional.

A mi Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por brindarme todo lo necesario para mi aprendizaje.

A mis profesores de la carrera que son parte fundamental para que yo esté cumpliendo esta meta tan importante gracias por enseñarme y transmitirme sus conocimientos.

Agradecimientos

Gracias a Dios por todas las bendiciones que me ha dado, por estar cuidando de mi en todo momento, por cada día de vida, por las cosas buenas que me suceden y por las malas también porque de ellas también aprendo, por permitirme tener a mis seres queridos en este momento y gozar de buena salud, por darme tu ayuda cuando tengo problemas y darme la oportunidad de seguir en este mundo cumpliendo mis metas.

A mis padres por el mejor regalo que me pudieron dar que es la oportunidad de estudiar esta carrera que tanto me gusta.

Dedicatorias

A mis Padres por darme todo lo necesario para que sea una persona de bien, por todos sus esfuerzos para lograr terminar esta carrera profesional, por su confianza, por los consejos y regaños, por cuidar de mí y estar conmigo cuando más lo necesito. Gracias por todo su apoyo.

Para mis hermanitos Edith y Arturo, gracias por preocuparse por su hermana menor, por compartir muchas cosas conmigo, y por apoyarme en este momento tan importante en mi vida.

A mis tres sobrinitos Kevin, Alex y Omar por que le han dado alegría a mi vida, por que espero ser un ejemplo para que ustedes sean hombres de bien y nunca se den por vencidos para lograr alcanzar sus metas.

A ti pekito Andy mi compañero de mucho tiempo, por toda tu paciencia y comprensión, por tus buenos consejos, porque me has demostrado que las cosas se pueden hacer y que requieren de esfuerzo y de sacrificios, gracias por motivarme hacer las cosas de la mejor manera y por brindarme a tu familia Paula, Ana, Elvira, Carmen y More que me han acogido como si fuera otro integrante de la familia y me han demostrado su apoyo incondicional.

Para mis mejores amigos de la carrera, Yayis, Liz, Yaz, Kary, Chendo, Chino, Richi, Mazto, y Cris, porque con ustedes mi estancia en la Universidad fue de lo mejor, gracias por su amistad, me llevo un recuerdo muy bonito de todos los momentos que compartimos juntos gracias por apoyarme en momentos difíciles, se que cuento con ustedes siempre bandita.

A mis amigos del área de Bioquímica clínica en especial a Elvia, Ari, y Michell gracias por la amistad que me demostraron y los momentos tan gratos que me hicieron pasar los últimos semestres.

A mis amigos del Laboratorio LIM; Rouss, Anita, Fidel, Néstor, Jesús, Luis y Ali por el trabajo realizado en equipo, por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio, y compartir sus conocimientos experiencias conmigo. Gracias por los buenos momentos que pase con ustedes y que nunca olvidare.

Contenido

1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 Bioquímica.....	3
2.2 Biología celular	3
2.3 Biología molecular.....	4
2. Estructura celular	5
2.5 Microscopia óptica	6
2.6 Mitosis.....	7
2.7 Manejo de micropipetas	9
2.8 Extracción, purificación y cuantificación de ácido desoxirribonucleico (ADN).....	10
2.9 Electroforesis de ADN	11
2.10 Electroforesis de proteínas	12
2.11 Validación.....	13
2.11.1 Validación de métodos cualitativos	14
2.11.2 Parámetros de Validación	16
2.11.3 Verificación del método	16
2.12 Manual de Laboratorio.....	17
2.12.1 Importancia del manual de laboratorio	18
2.12.2 Práctica de laboratorio.....	18
2.12.3 Elementos que contiene una práctica de laboratorio.....	19
2.13 Importancia de la actualización de información	22
3. Planteamiento del problema	23
4. Objetivos	24
5. Metodología	25
6. Resultados	28
7. Discusión	62
8. Conclusiones.....	74
9. Propuestas.....	75
10. Referencias.....	76
11. Anexos.....	80

1. Introducción

La bioquímica es la ciencia que se encarga del estudio de los componentes químicos de los seres vivos estos son: las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. Se basa en el concepto de que todo ser vivo contiene principalmente carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre. Estudia las moléculas que componen las células, los tejidos, las que catalizan las reacciones químicas que ocurren en el organismo, la fotosíntesis, la inmunidad y otras más. Gracias a las nuevas tecnologías y al desarrollo de técnicas como la cromatografía, la difracción de rayos X, marcadores moleculares, citoquímica, inmunocitoquímica, cultivos celulares, citometría de flujo, citogenética, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la microscopía electrónica se abrió el camino para el análisis detallado, el descubrimiento de nuevas moléculas y su función en la célula^{1,2}.

En la actualidad se ha investigado a detalle la estructura tridimensional de las macromoléculas de importancia biológica como los ácidos nucleicos y las proteínas, lo que ha permitido entender a nivel molecular sus funciones biológicas. El conocimiento de la estructura de los ácidos nucleicos ha ido aclarando los mecanismos de transmisión de la información genética de generación a generación y de aquellos que expresan esa información, la cual determina las propiedades y funciones de las células, los tejidos, los órganos y los organismos completos, todo esto con el resultado de descifrar el código genético casi por completo, al igual que la comprensión estructural de varias proteínas ha sido muy útil en la clarificación de los mecanismos de las reacciones enzimáticas que están implicadas en el metabolismo de los seres vivos².

Las nuevas tecnologías que se aplican en biología celular y molecular son una opción y esperanza que ofrecen una mejora de la condición humana. Son herramientas que prometen un avance importante en los próximos años. A los estudiantes de bioquímica les dan la posibilidad y facilidad de desarrollar de manera más sencilla y rápida el trabajo del laboratorio, así también de adquirir habilidades para su trabajo profesional ya que ofrecen una serie de instrumentos que permitirán estudiar y analizar a la célula como la estructura fundamental de los seres vivos.



En el módulo de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (BCT I) se estudian los procesos bioquímicos más importantes a nivel celular, así como la estructura, función e importancia biológica de las biomoléculas y es el primer contacto que tienen los alumnos de la carrera de Química Farmacéutico Biológica (QFB) con la bioquímica.

Este módulo se compone de la teoría y el laboratorio, en este último se realizan las prácticas que se encuentran en el manual de BCT I, las cuales contienen información teórica, los antecedentes académicos que se deben consultar, objetivos, material, método, presentación de resultados, cuestionario y bibliografía, todo esto debe actualizarse porque el material se encuentra antiguo y debe ser renovado.

El presente trabajo de tesis es una propuesta de las modificaciones que se realizaron a determinadas prácticas del manual de BCT I, el nombre de éstas son: Microscopía óptica, Estructura celular y Mitosis. Se integraron los protocolos siguientes: Manejo de micropipetas, Extracción, purificación, cuantificación* y electroforesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) humano y electroforesis de proteínas, con la finalidad de que los alumnos tengan los elementos básicos de estas técnicas de Biología molecular y celular que se aplican en el trabajo profesional. La información y las imágenes de los procedimientos de estas prácticas se cambiaron con bibliografía reciente, fotos de los procedimientos y las listas de los instrumentos y equipo que se utiliza realmente en el laboratorio con el fin de mejorar la presentación del manual anterior.

La modernización de este manual es de suma importancia ya que el estudiante se mantendrá a la vanguardia de las técnicas de Biología celular y molecular que se están aplicando en escenarios reales, además de que al realizar estas técnicas hará uso de los fundamentos en el estudio de la célula como una unidad fundamental requeridos en el desarrollo de la carrera de QFB.

* Ver anexo



2. Marco teórico

2.1 Bioquímica

Etimológicamente significa "química de la vida". Es una disciplina científica que se ocupa de los procesos químicos que ocurren en la materia viva, describe y analiza los fenómenos químicos que se producen en la célula estudiándolos desde el punto de vista de estructura y función. Su origen como ciencia está unido con la mayor parte de las disciplinas científicas, a intereses comerciales y a la investigación aplicada. La bioquímica moderna surgió en el siglo XIX a partir de los estudios sobre el cómo las levaduras transforman el azúcar o el almidón en vino o cerveza³.

El objetivo de la bioquímica es el conocimiento de la estructura y comportamiento de las moléculas biológicas, que son compuestos de carbono que forman las diversas partes de la célula y llevan a cabo las reacciones químicas que le permiten crecer, alimentarse, reproducirse, usar y almacenar energía, tiene sus raíces en la medicina, la nutrición, la agricultura, la fermentación y los procesos químicos de los productos naturales. Actualmente, se ocupa del estudio químico de las moléculas que se encuentran en el interior de los sistemas vivos o asociadas con éstos, en especial los procesos químicos relacionados con las interacciones de dichas moléculas⁴.

Esta ciencia está muy relacionada con la medicina y la biología, por lo que ayuda a comprender la biología celular, la microbiología, la nutrición, la farmacología y la fisiología molecular. La investigación de los mecanismos de los procesos patológicos (patogénesis) es uno de los objetivos de la bioquímica médica. El conocimiento de la bioquímica es útil en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades, y las pruebas que se realizan en los laboratorios de química clínica se utilizan para vigilar el tratamiento⁵.

2.2 Biología celular

La bioquímica se relaciona estrechamente con la biología celular, mediante el estudio de las reacciones químicas del metabolismo celular. Es una ciencia enriquecedora, integradora, que reúne estas disciplinas: biología, biofísica, biología



molecular, microscopia, genética, fisiología, computación y biología del desarrollo^{6,7}.

La investigación bioquímica y biología celular incluye el conocimiento de la acción específica de sustancias que afectan los procesos celulares, la función de los compuestos biológicamente activos. Estas ciencias se centran en la comprensión de los procesos bioquímicos y celulares subyacentes que forman parte del maravilloso complejo mecanismo de los organismos vivos: los procesos de transducción de señales, los sistemas proveedores de energía y los sistemas de síntesis para la producción de proteínas, ácidos nucleicos y otras macromoléculas⁸.

El desarrollo de la biología celular y en consecuencia los postulados de la Teoría celular, son los pilares fundamentales para el entendimiento de la biología del desarrollo, ya que ésta busca entender los procesos mediante los cuales los organismo crecen y se desarrollan desde un estado embrionario. Fue gracias al estudio de la biología celular, que hoy sabemos que todos los seres vivos están conformados por células⁷.

2.3 Biología molecular

Esta disciplina está muy relacionada con la bioquímica y la biología celular ya que estudia la composición, estructura y función de las moléculas importantes para la vida. El desarrollo de la biología molecular ha ido íntimamente ligado al desarrollo de las técnicas moleculares, propiciado principalmente por profesionistas Físicos y Químicos. Las primeras incursiones en este campo son a partir de los años 30-40 del siglo XX pero no es hasta la década de los 50, con la determinación de la secuencia de las primeras proteínas y la estructura del ADN que adquiere un importante impulso. En los años 80 se empiezan a obtener secuencias de ADN de forma rutinaria y a finales del siglo XX, la introducción de técnicas de secuenciación masiva permite abordar la secuenciación completa de diversos genomas⁹.

Los resultados experimentales con bacterias y virus a los que se les identificó un ácido nucleico (ADN y ARN) permitieron a los científicos realizar un control en gran parte de las funciones celulares, regulando la síntesis de las proteínas y de otras moléculas¹⁰.



Los descubrimientos de la biología molecular y sus ramificaciones hacia la medicina, la biología celular y la biotecnología no se pueden entender sin el avance de las herramientas de análisis, síntesis y modificación de las moléculas de la vida. Entre los múltiples métodos de los que se vale el biólogo molecular, cinco han sido pilares en el desarrollo de la biología molecular y son parte esencial de la investigación moderna. Estos métodos son: electroforesis, secuenciación, clonación, hibridación y reacción en cadena de la polimerasa¹¹.

A continuación se presentan los temas de las prácticas que se introdujeron en el Manual de BCT I.

2. Estructura celular

Las plantas y los animales así como las células tienen vida, ésta es la propiedad básica, además de ser las unidades más pequeñas que poseen tal naturaleza. A diferencia de cada una de las organelos que la conforman, los cuales se deterioran si se encuentran aislados, las células completas se pueden obtener de una planta o animal y cultivarse en un laboratorio donde se multipliquen con las condiciones adecuadas, por su pequeño tamaño solo pueden observarse con la ayuda de un microscopio que es un instrumento que aumenta la imagen de un objeto diminuto¹².

Las células fueron vistas y descritas por primera vez a mediados del siglo XVII. Anton Van Leeuwenhoek investigó los más variados objetos con ayuda de unos cristales de aumento que el mismo fabricó y describió diferentes tipos de células como los espermatozoides, bacterias y protozoarios. Fue Robert Hooke en 1665 quien las observó en un trozo de corcho a las que les da el nombre que se utiliza hoy en día¹³.

Los organelos que la componen son demasiado pequeños para observarlos y tocarlos de manera directa, pese a éste notable inconveniente es objeto de cientos de miles de publicaciones cada año, con análisis cuidadosos de casi todos los aspectos de su minúscula estructura. De muchas maneras el estudio de la biología celular y molecular permanece como tributo a la curiosidad humana por analizar, investigar, descubrir, y a la inteligencia creativa del ser humano para diseñar



instrumentos complejos así como técnicas elaboradas gracias a las cuales se pueden realizar nuevos descubrimientos¹².

2.5 Microscopia óptica

El término microscopio deriva etimológicamente del griego mikrós (pequeño) y skoopéo (observar) y fue acuñado por Jean Faber en 1624. Sin embargo, el impulsor más significativo de la microscopia fue el holandés Anton Van Leeuwenhoek (1632-1723). Anatomista y fisiólogo, construyó sus propios microscopios con lentes convexas que él mismo pulía¹⁴.

El microscopio es el instrumento por excelencia para el estudio de la anatomía microscópica, sin él no sería posible observar estructuras cuyo tamaño está por debajo del límite de resolución del ojo humano, el cual es de aproximadamente cincuenta micrómetros en condiciones óptimas¹⁵.

El microscopio óptico es el utilizado con más frecuencia y es de gran ayuda para el aprendizaje, en este el área observada está ampliamente iluminada y los objetos que se estudian aparecen más oscuros que el fondo. Se pueden dividir en simples y compuestos según el número y la posición de los lentes¹⁶.

Microscopio simples: Esta provisto de una lente o sistemas de lentes convergentes dispuestas de manera que proporcionan una imagen virtual, derecha y mayor que el objeto, que a su vez está situado entre la lente y el foco, estos también se conocen como lupas y pueden ser monoculares, binoculares¹⁶.

Microscopios compuestos: En este se combinan dos lentes o sistemas de lentes convergentes de amplificación de imagen, colocados en los extremos del tubo: el denominado objetivo, situado más cerca del objeto a observar; y el ocular más cercano al ojo del observador. Existen varios tipos: los de luz ultravioleta, fluorescencia, de contraste de fases, de campo oscuro, de polarización¹⁶.

El microscopio electrónico revolucionó el conocimiento de ciencias como la biología y la medicina. Tienen ventaja de alcanzar una extraordinaria amplificación. Puede dar un poder de resolución hasta mil veces mayor que el óptico, debido a que



emplea un haz de electrones en lugar de un haz de fotones, los nombres son: microscopio de barrido, de transmisión y confocal láser de barrido¹⁷.

2.6 Mitosis

El ciclo celular está construido por una serie ordenada de acontecimientos moleculares que llevan a la división celular y a la producción de dos células hijas, cada una de las cuales contiene cromosomas idénticos a los de la madre. Posee dos etapas principales, la Interfase (I) y la Mitosis (M)¹⁸.

Interfase: es el periodo entre las divisiones celulares, durante el cual los cromosomas se duplican y ocurren otras funciones celulares como crecimiento, movimiento y adquisición de nutrimentos. Se divide en tres fases conocidas por sus siglas en inglés G₁, S, G₂; donde G significa crecimiento (growth) y S síntesis (synthesis)^{19, 20}.

Mitosis: este término fue introducido por Walther Flemming en 1882, deriva del griego *mitos*, filamento y *osis*, estado o condición, la M conduce a la producción de células con características genéticas idénticas a las de su antecesora y es la base para producir células nuevas, ocurre en todos los organismos eucariotas y sólo puede durar alrededor de una hora.

Para su estudio y comprensión se divide en cinco fases (Fig.1):

- Profase: es la fase más larga de la mitosis. Se produce en ella la condensación del material genético (ADN) que normalmente existe en forma de cromatina, con lo que se forman los cromosomas; y el desarrollo bipolar del huso mitótico.
- Metafase: durante esta fase, las cromátidas hermanas, las cuales se encuentran conectadas a cada polo de la célula por los microtúbulos unidos a los centrómeros, comienzan a moverse continuamente, hasta que migra a la zona media de la célula o plano ecuatorial en la que forman una estructura llamada placa ecuatorial.
- Anafase: es la fase más corta de la mitosis, en la cual los microtúbulos del huso rompen los centrómeros longitudinalmente, lo que da lugar a la separación de las cromátidas hermanas las cuales se dirigen a polos opuestos.



- **Telofase:** el nuevo núcleo se organiza, se reconstituye la cromatina adoptando forma helicoidal los cromosomas, aparece el nucléolo, y se reconstruye la eucarioteca a partir del retículo endoplasmático²⁰.

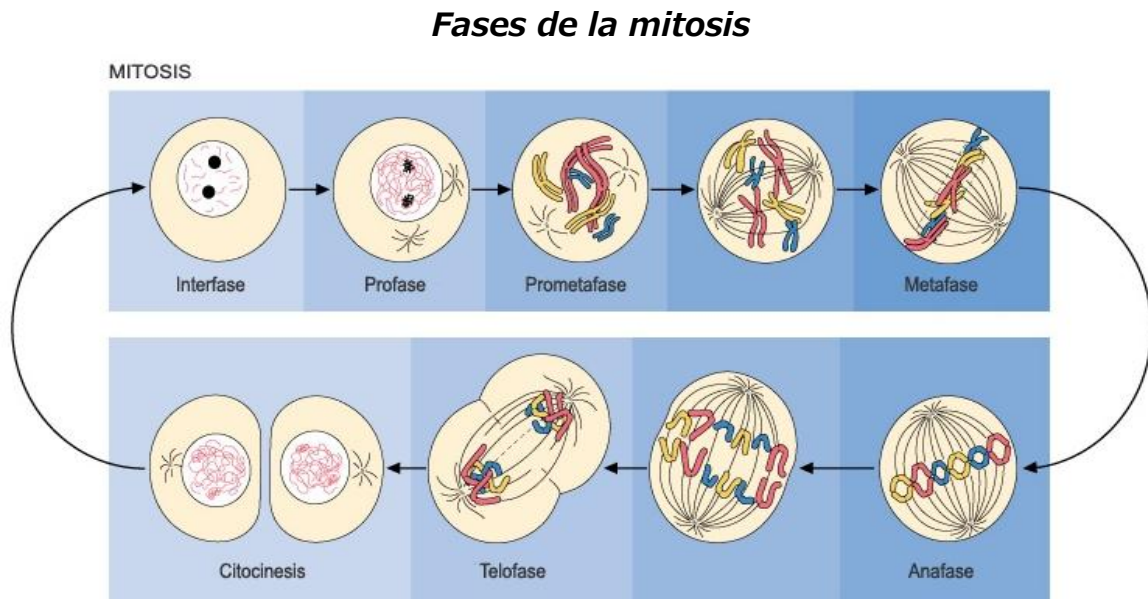


Fig. 1 Fases de la mitosis. Esquema de la mitosis en una célula que contiene un número diploide ($2n$) de seis cromosomas. Médicos en formación. http://medicosenformacion8.tripod.com/03_015.jpg Visitado el 16 de Enero de 2014

La mitosis es muy importante para el crecimiento y desarrollo del ser humano, es considerada un proceso fundamental para la vida, y tiene aplicaciones en la industria alimenticia, en ecología, en la agricultura, investigación médica como por ejemplo en la determinación de las características del cariotipo y la identificación cromosómica mediante técnicas de tinción convencionales y bandeo cromosómico. También, se evalúa el tamaño del genoma y se analiza el comportamiento meiótico de los cromosomas en razas, especies, híbridos y poliploides²¹.



2.7 Manejo de micropipetas

Las técnicas a microescala, de biología molecular, enzimáticas y algunas otras requieren de la habilidad para medir de manera exacta, y reproducible volúmenes muy pequeños de líquidos, para facilitar su transferencia y obtener resultados efectivos se utilizan dispositivos llamados micropipetas ya que por lo general miden volúmenes menores a 1 mL¹².

Las micropipetas son instrumentos que su unidad de volumen es en microlitros (μL). Tienen aspecto de jeringas y se llenan succionando (Fig. 2). El tipo de pipeta que es comúnmente utilizada en el laboratorio son las micropipetas automáticas (también llamadas tipo eppendorf[®]). El uso de éstas constituye una gran ventaja, ya que proporciona una mayor precisión en los trabajos y disminuye el agotamiento de las repetidas tareas de muestreo y dilución. Funcionan mediante un pistón y llevan puntas desechables de plástico para evitar contaminaciones. Existen tanto de volumen fijo como de volumen variable¹⁵.



Fig. 2 Fotografía de una micropipeta de la marca Gilson[®]

Las micropipetas son de distintas capacidades que van desde 0.1 μL hasta 5,000 μL , es decir su función es la misma que la de la pipeta pero con cantidades inferiores, de ahí su nombre. Se pueden encontrar dos tipos: manuales y automáticas. En las manuales el volumen deseado se selecciona haciendo girar una rueda que se encuentra en el extremo superior, existen también las de volumen fijo. Las automáticas se diferencian por un sistema digital al tener botones especiales de ajuste, son más modernas y exactas. Las micropipetas más comunes son de las siguientes capacidades: 0.1-1 μL , 0.5-10 μL , 10-100 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL , algunas de ellas solo transvasan volúmenes fijos pero la gran mayoría permiten un intervalo de microlitros que se puede seleccionar. Lo ideal sería tener un volumen fijo para cada cantidad, ya que sufren menos desgaste y no pierden la calibración con tanta facilidad^{15, 22}.



2.8 Extracción, purificación y cuantificación de ácido desoxirribonucleico (ADN)

En la actualidad las técnicas de manipulación del ADN son fundamentales para entender la estructura de los genes y por lo tanto del genoma así como su evolución, el conocimiento de la célula y de los organismos. Las técnicas de biología molecular no sólo han facilitado esto, también han complementado en gran parte una amplia serie de investigaciones bioquímicas clásicas que permiten postular los mecanismos de acción de diversas moléculas. El conocimiento de los genes, su estructura, función y regulación dan a conocer los sistemas en la célula los cuales ya están bien definidos.

El ADN es una molécula compleja que se compone de una secuencia de nucleótidos que contiene la información necesaria para poder controlar el metabolismo de un ser vivo y llevar la información necesaria para dirigir la síntesis de proteínas y su replicación, este material genético lo tienen todos los organismos celulares en forma de cromosomas situados en el núcleo de la célula, su duplicación es de forma semi-conservativa durante la fase S del ciclo celular, replicando la eucromatina y después la heterocromatina²⁰.

La mayoría de las moléculas de ADN poseen dos cadenas antiparalelas (una 5´-3´ y la otra 3´-5´) unidas entre sí mediante las bases nitrogenadas: adenina, timina, guanina y citosina por medio de puentes de hidrógeno, la adenina se une con la timina mediante dos puentes de hidrógeno mientras que la citosina se une con la guanina con tres puentes de hidrógeno²⁰.

Gran parte de las técnicas de biología molecular se basan en el aislamiento del ADN, ya que es necesario tener la materia prima de buena calidad y pureza para poder hacer manipulaciones enzimáticas o estudios analíticos. El procedimiento de aislamiento comúnmente utilizado se basa en la actividad proteolítica de la proteinasa K combinada con la capacidad desnaturizante del detergente iónico dodecil sulfato de sodio (SDS) y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) que se incluye en el amortiguador de digestión para inhibir DNAsas²³.



La habilidad para cuantificar ácidos nucleicos de una manera rápida y adecuada es un prerequisite de muchos de los métodos usados en bioquímica y biología molecular en la mayoría de los casos se lleva a cabo usando espectrofotometría la cual no es dañina y permite que las muestras sean recuperadas para otros análisis. La absorción máxima del ADN es aproximadamente a 260 nm, es cifra promedio de la absorción de los nucleótidos individuales que varía entre 256 y 281 nm, el cálculo de la concentración se realiza utilizando la absorción de la muestra multiplicada por el factor de dilución y por el coeficiente de reabsortividad⁷.

2.9 Electroforesis de ADN

La electroforesis en gel de agarosa es un método bastante utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. La agarosa es un polímero lineal extraído de algas marinas, en el cual las moléculas de ADN de doble cadena migran de manera inversamente proporcional al logaritmo en base 10 ($\log 10$) de sus tamaños moleculares. Dado que el ADN está cargado negativamente debido a los grupos fosfato de la molécula, la migración en la cámara de electroforesis ocurre del polo negativo al polo positivo²⁴.

Esta técnica es una herramienta muy importante con múltiples aplicaciones en diferentes áreas como la biología celular, la bioquímica, la biología molecular, la inmunología entre otras, debido a que permite separar muestras en cantidades del orden de microgramos, además que no es muy costosa, el aparato es de construcción manual, los corrimientos se realizan de 2 a 3 horas²⁵.

La electroforesis permite identificar una gran variedad de sustancias, desde péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, glicoproteínas, lipoproteínas, enzimas, hormonas, vitaminas, hasta materiales radioactivos, así como diferenciar entre fluidos normales y alterados por algún padecimiento, por ejemplo en suero sanguíneo, lo cual es muy útil en análisis clínicos, investigación biológica y biomédica²⁵



2.10 Electroforesis de proteínas

Las proteínas generalmente se separan en geles de agarosa o poliacrilamida, con un tamaño de poro característico, de manera que la separación de las moléculas se basa en la filtración por el gel (tamaño y forma) así como en la movilidad electroforética (carga eléctrica)¹.

Cuando se utiliza la electroforesis para estudiar proteínas membrana, primero se deben solubilizar los fragmentos de membrana con el detergente SDS, que desorganiza la mayoría de las uniones proteína-proteína y proteína-lípido²⁰.

Los polipéptidos solubilizados y cubiertos con SDS, se cargan entonces en la zona superior del gel de poliacrilamida, se aplica un potencial eléctrico que atraviesa el gel, de tal forma que la base del gel se convertirá en el ánodo cargado positivamente, debido a que los polipéptidos están cubiertos con macromoléculas de SDS cargadas negativamente, migrarán descendiendo por el gel hacia el ánodo (Fig. 3)²⁶.

Esquema de un sistema de electroforesis de proteínas

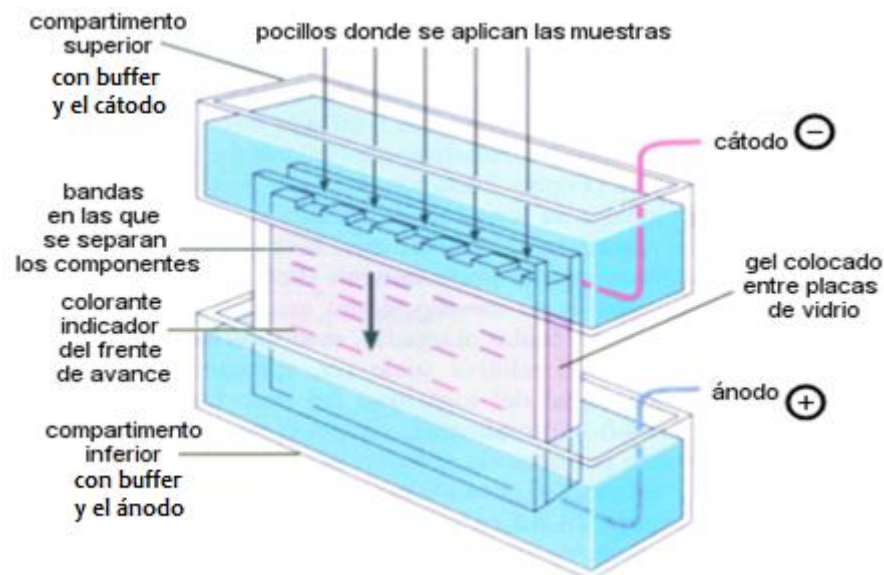


Fig. 3 Esquema de un sistema vertical de electroforesis. Electroforesis de proteínas y de ácidos nucleicos. <http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm>
Visitado el 23 de Enero de 2014



El gel de poliacrilamida es como una red fina que dificulta más el movimiento de las moléculas grandes que el de las moléculas pequeñas. El resultado es que los polipéptidos descienden por el gel a una velocidad que está relacionado inversamente a su tamaño. Cuando son más pequeños se acercan a la base del gel, y los de mayor tamaño quedan cerca del sitio de partida, cuando el proceso termina el gel se tiñe con un colorante que se une a los polipéptidos y se hacen visibles²⁶.

Las técnicas de biología celular y molecular necesitan estar validados para que sean reproducibles y confiables el siguiente apartado explica la forma de validar estos métodos.

2.11 Validación

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas y demostrativas de que un método de análisis es lo suficientemente fiable y reproducible para producir un resultado previsto dentro de intervalos definidos. Proporciona un alto grado de confianza y seguridad del método analítico²⁷.

En general, se establece que el laboratorio debe validar:

- Métodos no normalizados: corresponden a métodos desarrollados por el laboratorio o métodos nuevos (ejemplo: publicado en revista científica) o bien, a métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio pero que no están normalizados.
- Método normalizado: con una modificación significativa²⁸.

En caso de ser un método nuevo o uno antiguo del que no se dispongan de datos suficientes se debe realizar una validación prospectiva, generando a través de análisis datos experimentales.

En algunos casos se puede realizar lo que se conoce como validación menor o verificación cuando se trate de:

- Métodos normalizados.
- Métodos normalizados usados fuera de su alcance propuesto. Ejemplo: uso en otra matriz.



- Ampliaciones y modificaciones menores de métodos normalizados. Ejemplo: uso en otros analitos.
- Cuando se trate de métodos previamente validados, que hayan sufrido alguna alteración significativa por lo cual deben volver a evaluarse. Estas variaciones pueden ser; cambio de equipo, cambio de componentes de equipo como columnas, detectores, cambio analista, cambio de la matriz que contiene la muestra o de nivel de concentración del analito de interés, entre otros²⁸.

Para realizar la validación del método analítico se debe:

- Establecer las condiciones por cumplir. El responsable del análisis debe hacerlo de manera confiable y científica, basándose en las necesidades del usuario en alguna instancia oficial en caso de existir.
- Especificar los parámetros a considerar.
- Definir el tipo de muestra a utilizar.
- Aplicar el método a validar en las condiciones establecidas.
- Obtener los valores de los parámetros considerados.
- Evaluar los resultados de la validación por comparación de los parámetros estadísticos obtenidos con las condiciones establecidas previamente.
- Declarar la validez del método para el propósito establecido²⁹.

2.11.1 Validación de métodos cualitativos

Para el estudio de los sistemas cualitativos se pueden diferenciar dos grandes grupos: análisis cualitativo clásico o sensorial y el instrumental (Tabla 1)²⁹.

Cuadro 1. Tipos de sistemas para el análisis cualitativo²⁹

Detección sensorial	Detección instrumental
Color: cambio, aparición de color, olor, otros. Ejemplo: prueba de ELISA	Sensores: químicos, bioquímicos, otros. Ejemplos: UV-Visible, Fluorescencia, Potenciometría.



En el análisis *cualitativo sensorial* la detección se realiza con base a los sentidos humanos. El más utilizado es la vista ya que en la mayoría de los sistemas se basan en la aparición o no de un determinado color como resultado de una reacción química, bioquímica o inmunológica²⁹.

En este tipo de sistemas, la respuesta binaria SI/NO se obtiene de forma directa, sin ningún tratamiento de los datos. Generalmente la presencia de un analito se determina por comparación respecto a un blanco (muestra sin el analito), por ejemplo si se obtiene un determinado color hay analito, mientras que si no se obtiene (color del blanco) no lo hay. Dentro de este grupo de sistemas cualitativos se encuentran los denominados "*test kits*". Son dispositivos comerciales diseñados para una aplicación concreta que contienen todos los reactivos necesarios y en algunos casos incluyen un sistema instrumental sencillo necesario para la obtención de la respuesta²⁹.

El tipo de detección que se realiza en el análisis *cualitativo instrumental* es con base a una medida (colorimetría, fluorescencia, voltamperometría). La presencia o no de un determinado analito depende del nivel al que interese detectarlo. Bien puede ser al nivel del límite de detección o a un nivel superior que generalmente corresponde al establecido por la legislación²⁹.

En este tipo de sistemas de medida, la respuesta instrumental que se obtiene debe transformarse en respuesta binaria del tipo SI/NO y por lo tanto implica un tratamiento de datos. Primero hay que establecer la respuesta instrumental, por ejemplo un valor de absorbancia para la concentración correspondiente al valor al que se quiere cribar (nivel de concentración establecido por la legislación) y debe compararse con la respuesta instrumental obtenida para cada muestra. Si es superior, hay analito por lo que la respuesta binaria es SI, y si el valor es inferior la respuesta binaria es NO. Otro grupo de sistemas cualitativos que podemos considerar aparte son los que utilizan el método ELISA. Están basados en una reacción inmunológica y al igual que los "*test kits*", la detección puede ser tanto sensorial como instrumental²⁹.



2.11.2 Parámetros de Validación

Selectividad: se define como la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación o excipientes que pueden estar presentes en la muestra³⁰.

Linealidad: es la capacidad del método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito en un rango definido. Se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados obtenidos en el análisis del analito a diferentes cantidades o concentraciones. La selección del rango y del número de puntos experimentales está estrictamente relacionada con la aplicación del método³⁰.

Precisión: refleja la medida en que los valores de una serie repetida de ensayos analíticos que se realizan sobre una muestra homogénea son semejantes entre sí³⁰.

Exactitud: indica la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos posibles al valor verdadero. A diferencia de la precisión, que refleja el error aleatorio, la exactitud refleja el error sistemático o la tendencia a él³⁰.

2.11.3 Verificación del método

Una vez que el método ha sido validado, con el objeto de demostrar su correcto desempeño en el tiempo, se le verifica. Para llevar a cabo la verificación o seguimiento del desempeño del método analítico es importante diseñar e implementar un plan de control y aseguramiento de la calidad, que incluya controles que permitan monitorear todos los componentes del proceso analítico que puedan afectar los resultados. Lo ideal es que los controles estén en la misma matriz y sean tratados de la misma manera, desde la preparación de la muestra hasta la obtención de los resultados, que las muestras a analizar. El número y la frecuencia de los controles es definido por el fabricante o lo establece el laboratorio³¹.

En los análisis cualitativos por técnicas de amplificación de ácidos nucleicos en cada corrida se debe incluir:



- Un control positivo para cada analito, cuya concentración sea cercana al límite de detección. Un control negativo

- Un blanco

- Un control interno

Otro tipo de controles ó acciones que el laboratorio puede incluir en el plan de control y aseguramiento de la calidad, se mencionan a continuación:

- Tener en cuenta la calidad de los reactivos empleados para poder asegurar que se obtienen los resultados esperados y mantener la reproducibilidad del sistema

- Utilizar cartas de control que permitan identificar rápidamente posibles errores y el origen de los mismos

- Evaluar la competencia del personal

- Realizar el mantenimiento y calibración del equipo

- Participar en ensayos de aptitud externos e internos³¹.

El laboratorio deberá registrar los controles y acciones que realice para verificar los métodos. En todos los casos el resultado obtenido en las distintas actividades de verificación se debe confrontar con las condiciones establecidas previamente por el laboratorio. En el caso de exceder los límites se da la solución apropiada al problema, según el conocimiento y la experiencia adquirida³².

Las prácticas que se plantearon para el manual requieren de una estructuración que se describe en el siguiente apartado.

2.12 Manual de Laboratorio

El manual de laboratorio es la herramienta que apoya con información y fundamentación las técnicas que se desarrollarán durante el curso de la asignatura. Contienen procedimientos establecidos metódicamente que describen las acciones y operaciones que deben seguirse para llevar a cabo alguna práctica. Todo procedimiento implica, además de las actividades y las tareas del estudiante, la determinación del tiempo de realización, el uso de recursos materiales (reactivos, material biológico), la aplicación de métodos de trabajo y de control para llevar a cabo la práctica de una manera eficiente³³.



Las ventajas de contar con manual de prácticas son:

- a. Auxilian en la elaboración de la práctica
- b. Apoyan y refuerzan el conocimiento adquirido en clase
- c. Describen en forma detallada el procedimiento de la práctica
- d. Contiene fundamentos de las técnicas y aplicaciones³³.

2.12.1 Importancia del manual de laboratorio

Constituyen una fuente formal y permanente de información ya que orientan acerca de la manera de realizar un procedimiento. Establecen los lineamientos y mecanismos para la correcta ejecución de la práctica para dar una continuidad y coherencia de las actividades que se describen y sirven como base para la realización del método, con la finalidad de lograr la agilización, simplificación, automatización o desconcentración de las actividades³⁴.

2.12.2 Práctica de laboratorio

La práctica de laboratorio es una actividad didáctica basada en la experiencia en donde se cuestionan los conocimientos y habilidades de una o más disciplinas. Se pone en juego un conjunto de conceptos, procedimientos, métodos y tecnologías que permiten su ejecución. Otros elementos son la determinación de datos experimentales, la interpretación de esta información y la exposición coherente de los resultados para obtener conclusiones. Por ello es importante que la metodología empleada posibilite continuar la experimentación con la teoría, así como observar la relación de todos los componentes o elementos decisivos que intervienen en un problema³⁵.

En el diseño de una práctica de laboratorio para cualquier asignatura se deben de considerar los siguientes aspectos:

- a. Revisión del objetivo general y del contenido de la asignatura
- b. Consulta de cuando menos dos libros o artículos científicos acerca del problema que se plantea resolver, mismos que deben ser referidos en la bibliografía del manual de prácticas.
- c. Planificación del número adecuado de prácticas y de horas destinadas a esta actividad dentro del programa de la asignatura.



d. Selección y enunciado de los apartados que permitan describir la práctica, como son título, introducción, objetivo, fundamentos del tema, instrucciones generales, metodología, material y equipo, cuestionario, resultados, análisis y discusión.

e. Planificación, para cada actividad práctica, del tiempo que ocupará cada una de ellas contemplando un espacio para discutir sus resultados.

f. Bibliografía recomendada, la cual deberá estar disponible en las sesiones de laboratorio.

g. Evaluación se deben formular de manera explícita los criterios para determinar el grado en que el estudiante ha alcanzado el objetivo de la actividad, lo que incluye el formato para el reporte escrito propuesto y la fecha de entrega³⁵.

2.12.3 Elementos que contiene una práctica de laboratorio

Los apartados que frecuentemente integran una práctica son: introducción, objetivos, métodos, dinámicas de trabajo, materiales de apoyo y recursos con los que se formará el alumno (aprendizaje de las habilidades y actitudes), criterios coherentes de desempeño. Es necesario tener presente que las prácticas de laboratorio deben de estar coordinadas con las clases de teoría. Sin embargo, varias circunstancias hacen que esto no siempre sea posible a causa de la distribución horaria, el número de horas disponibles para el laboratorio, número de alumnos y la disponibilidad económica para comprar suficientes equipos y material³⁶.

Descripción de los elementos que integran una práctica.

Título: en este apartado se expresa el nombre de la práctica. El título debe ser sugerente, atractivo y relacionado con el tema o problema en estudio³⁶.

Introducción: integra una explicación de los aspectos teóricos del tema. En este apartado se anotan los conceptos teóricos y fundamentos que sustentan el experimento propuesto: teorías, leyes, métodos, técnicas y estrategias en las que se apoya. También se mencionan los antecedentes de la situación actual; es decir del problema que se está resolviendo, las técnicas usadas en el desarrollo de la práctica o proyecto experimental, según el caso, y toda aquella información que



permiten llevar a efecto la práctica. Debe ser breve, concreto, suficiente, y estar apoyado con las referencias bibliográficas utilizadas para su desarrollo³⁶.

Objetivo: señala la finalidad de la práctica. Está directamente relacionado con la comprobación, que se va a llevar a efecto o con la transformación de situaciones planteadas desde un principio. En la redacción puede proponerse un solo objetivo general o bien en ocasiones, desglosar diferentes niveles de éste; es decir, objetivos particulares o hasta específicos, mismos que pueden presentarse como incisos del objetivo general. Deberán ser redactados en forma clara, concisa, ordenada, con lenguaje sencillo y apegados a la situación que se busca, empleando siempre verbos en infinitivo³⁶.

El objetivo describe un resultado deseado, lo que el estudiante debe realizar para demostrar lo que domina. Se manifiesta en conducta observable: algo que se puede medir, seguir sus pasos y cuantificar. Un punto importante en la elaboración del manual de prácticas es lo relacionado con los objetivos, ya que constituyen un elemento central, la idea es que éstos determinan la relación conocimientos y práctica a lograr³⁶.

Recursos materiales y equipo: especifica todo lo requerido en cuanto al tipo de equipos, materiales, reactivos, material biológico, instrumentos, herramientas, instalaciones, tanto para la etapa de experimentación como para la reproducción a futuro del problema en estudio. No deberá escapar ningún detalle correspondiente al experimento en cuestión³⁶.

Se debe procurar que cada equipo sea manejado por un número pequeño de alumnos, según el tipo de prácticas. Lo habitual es que el recurso lo emplee un equipo de dos alumnos, para favorecer la discusión y la sana competencia entre ambos y, además, para mantenerlos activos a lo largo de la práctica. Un número mayor puede significar que algunos estudiantes se comporten sólo como espectadores, limitándose a copiar resultados de quienes realmente desarrollaron la práctica³⁶.

Metodología: describe el proceso y los pasos a seguir para el desarrollo del método. Se permite para ello utilizar diagramas, gráficas u otro tipo de representaciones. Lo importante es presentar claramente la secuencia en la



formulación y desarrollo de la experiencia en el laboratorio. También se puede presentar un esquema metodológico que relacione los fundamentos teóricos con la secuencia de los procedimientos de la experimentación, enmarcados todos ellos dentro del método experimental³⁶.

Bibliografía: en este punto se indica la bibliografía básica y complementaria con la que fueron elaborados los contenidos de la práctica. Se recomienda consultar las principales revistas que prioritariamente publican trabajos experimentales específicos del área en estudio, así como libros de reciente publicación sobre la temática³⁶.

Resultados: el propósito de este apartado es presentar los datos obtenidos en el desarrollo del experimento, los cuales ponen de manifiesto que la actividad práctica realizada representa una solución para el problema planteado, o es motivo del experimento. A través de los resultados se apreciará el grado alcanzado en el o los objetivos propuestos. Estos pueden ser ilustrados mediante gráficas, cuadros, diagramas o con cualquier representación adecuada, para darles mayor objetividad y facilitar su lectura e interpretación. Además, se deben proporcionar los detalles que el propio experimento exija y es necesario anexar el conjunto de elementos, datos, información, cálculos, utilizados y obtenidos durante la actividad, hasta que ésta llegue a término³⁷.

En algunos casos el alumno debe preparar un informe acerca de la práctica y sus resultados, junto con la presentación del modelo real utilizado. Éste debe tener una estructura congruente con las etapas seguidas en la experimentación y contener toda la información. Se puede citar de forma resumida textos, diagramas, tablas, ecuaciones, referencias bibliográficas, relacionados con el trabajo realizado³⁷.

Conclusiones: Comprenden las aportaciones personales o los juicios de valor propuestos a partir de los resultados de la práctica, o bien de las acciones derivadas de todo el proceso de experimentación. En algunos casos incluyen recomendaciones para futuros experimentos relacionados con el tema. También, de manera adicional, se puede agregar un pequeño cuestionario, tres a siete preguntas, para verificar los resultados y el tipo de interpretación que el grupo de alumnos ha realizado a partir de la discusión de los mismos³⁷.



Recomendaciones: En este apartado se presenta la serie de observaciones adicionales que deben considerarse en el diseño de una práctica de laboratorio, como por ejemplo: normatividad, condiciones de trabajo, manejo de los recursos, preparación previa de la actividad práctica, toma de datos y análisis de los mismos³⁷.

2.13 Importancia de la actualización de información

Tomando en cuenta la realidad en la que vivimos, se debe de considerar la importancia de tener un manual de laboratorio que proporcione las facilidades suficientes tanto para el docente como para el alumno, en vista de motivar y promover lo que hoy en día es requerimiento de la sociedad. Esta nueva actualización de información e implementación de prácticas de biología celular y molecular se enmarca en un modelo en el que es necesario que el profesional de hoy en día adopte una educación que además de permitirle un correcto desenvolvimiento en su área específica, pueda adaptarse a cualquier otra circunstancia o requerimiento laboral; es decir que cuente con los conocimientos generales, pero a su vez tenga una especialización y conocimiento a fondo de un área en particular³⁸.

Así, este aspecto reviste gran importancia en el ámbito educacional pues se refiere a modificar y actualizar el manual de laboratorio de bioquímica, partiendo de la información que el estudiante necesita para complementar sus conocimientos, las prácticas factibles para su aprendizaje y para que obtenga habilidades. En ese sentido podemos mencionar que estas prácticas promueven una enseñanza a la vanguardia, ya que dan a conocer los fundamentos de estas técnicas, los equipos y reactivos que se utilizan³⁸.

Por tanto el conocimiento actualizado y el aprendizaje general, propone ofertar al mercado laboral profesionales especializados pero adaptables a cualquier circunstancia, satisfechos por su realización personal y profesional, lo que implica calidad en su desempeño y por ende desarrollo del aparato productivo del país. Es necesario mantener los manuales permanentemente actualizados mediante revisiones anuales, a fin de tenerlos apegados a los conocimientos actuales³⁸.



3. Planteamiento del problema

El manual de prácticas de laboratorio de BCT I, es un complemento que le facilita al alumno tener información resumida de lo que se realizará en el experimento de una manera breve. Los manuales los utilizan las generaciones que cursan la carrera de QFB, por lo cual es de gran importancia utilizar un manual que esté actualizado y que contenga las prácticas que se van a realizar en el laboratorio, éstas deberán incluir información necesaria que ayude, facilite y oriente al alumno para llevar a cabo el experimento y que obtenga los resultados representativos de lo visto en clase, además de tener fundamento de técnicas y equipos de laboratorio que se ocuparán en las siguientes asignaturas como BCT II, microbiología, genética, química clínica, por mencionar algunas, incluso en la vida profesional. Al actualizar y complementar el manual con nuevas prácticas en donde se utilicen técnicas de Biología celular y molecular será de gran beneficio para los alumnos ya que los conocimientos y habilidades obtenidas podrán ser aplicadas en las subsecuentes materias, en el servicio social, en la realización de la tesis y en su trabajo profesional.



4. Objetivos

General:

Actualizar el manual de laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I modificando la información de prácticas ya establecidas e integrando nuevas prácticas de Biología celular y molecular.

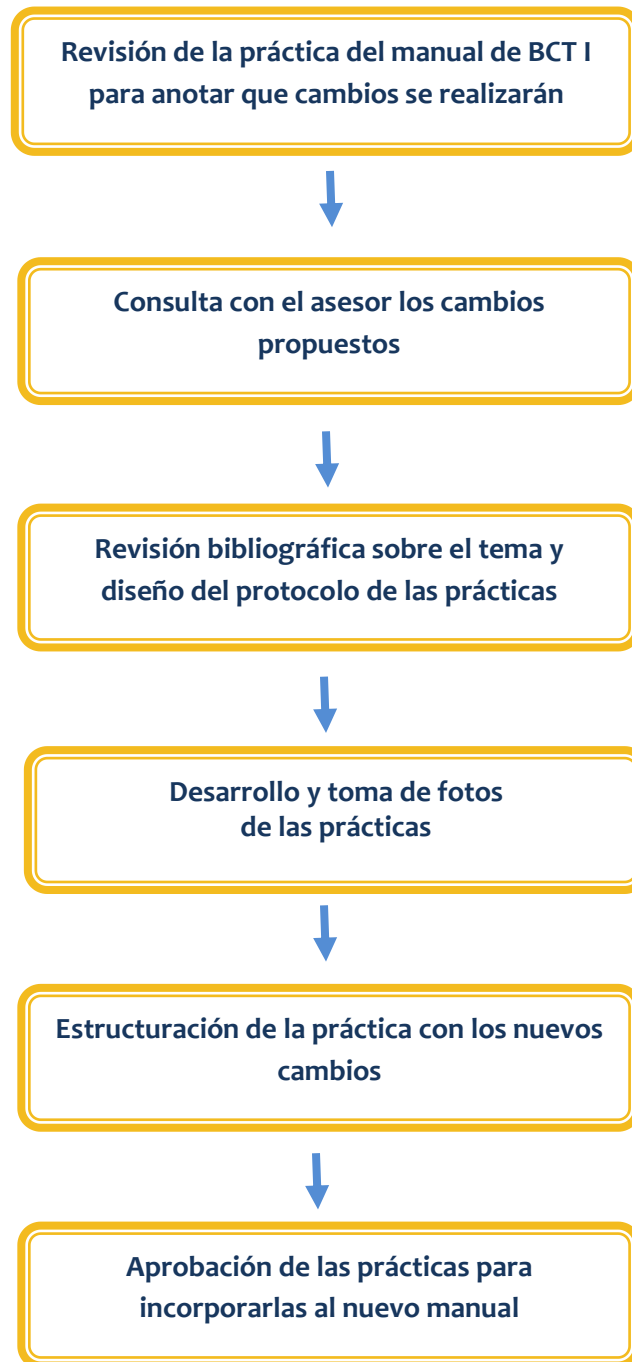
Particulares:

- Actualizar la información teórica, la descripción del método, preguntas sobre los temas de la práctica de Microscopía óptica, Estructura celular y Mitosis.
- Separar la práctica de Estructura celular de la práctica de Microscopía óptica.
- Elaborar un protocolo de Manejo de micropipetas e incorporarlo como una nueva práctica.
- Realizar e implementar por separado el protocolo de Extracción, purificación, cuantificación y electroforesis de ADN humano en el manual de prácticas de laboratorio.
- Instrumentar e incorporar al manual de laboratorio de BCT I, una nueva práctica de Electroforesis de proteínas.



5. Metodología

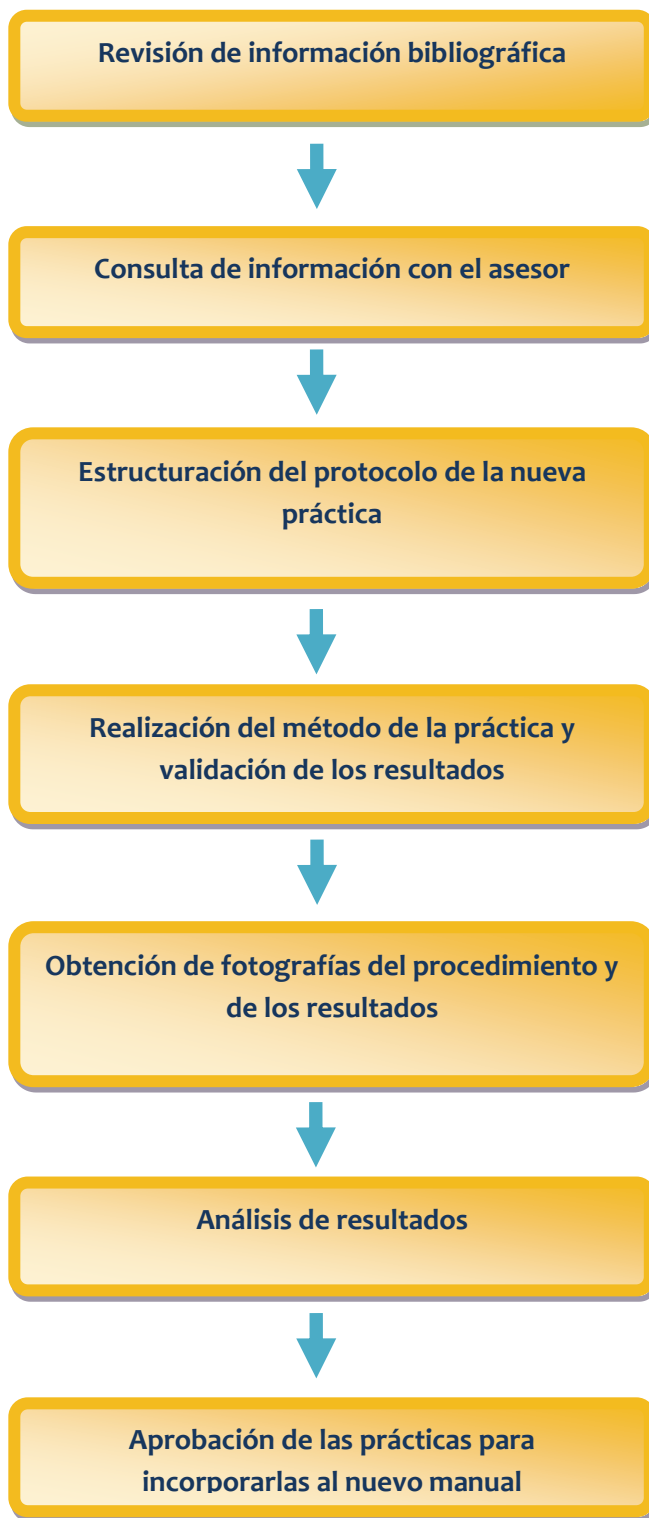
Modificación de la práctica de Microscopía óptica, Estructura celular y Mitosis.



Implementación de protocolos de las prácticas de Manejo de micropipetas, Extracción, cuantificación y electroforesis de ADN humano.



Instrumentación de una nueva práctica de Electroforesis de proteínas.



6. Resultados

El manual de laboratorio de bioquímica celular y de los tejidos I fue actualizado con bibliografía reciente, las prácticas se desarrollaron durante el horario de clases de los alumnos para obtener las fotos de los procedimientos de las distintas prácticas. La implementación de las nuevas prácticas se desarrollo en el Laboratorio de BCT I de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. A continuación se presentan los cambios efectuados y los resultados de cada una de las prácticas.

Microscopía óptica

Se realizó un protocolo para la práctica de Microscopia óptica por separado de la de Estructura celular. Los cambios realizados se describen a continuación:

- ✓ Diseño de la carátula
- ✓ Formulación y complementación de objetivos
- ✓ Enunciación de los antecedentes académicos
- ✓ Actualización de la introducción con bibliografía reciente
- ✓ Adición de un esquema de los componentes del microscopio óptico utilizado en laboratorio (Fig.4) y descripción de cada uno de ellos (Cuadro 2)
- ✓ Listado de material que se ocupa
- ✓ Ilustración del método: manejo y enfoque del microscopio (Cuadro 3)
- ✓ Mejoramiento de la calidad de las fotos
- ✓ Presentación de los resultados
- ✓ Implementación de un cuestionario
- ✓ Bibliografía complementaria y utilizada en la práctica.



COMPONENTES DEL MICROSCOPIO BINOCULAR MARCA CARL ZEISS MODELO "PRIMO STAR"

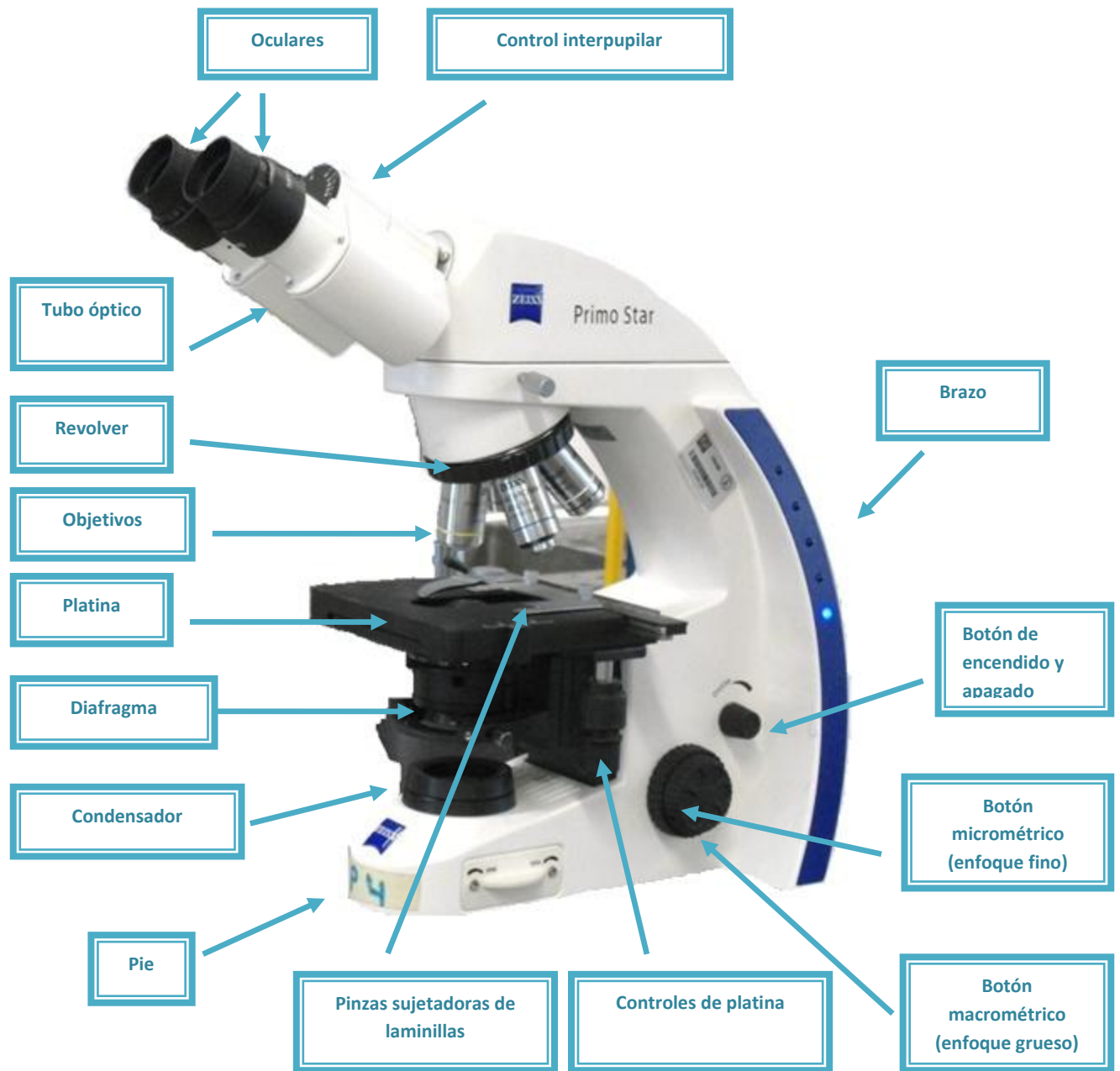


Fig. 4 Esquema de los componentes del microscopio que se integró a la práctica de Microscopía óptica del manual de BCT I



Cuadro 2. Información sobre los componentes del microscopio óptico

Partes del microscopio óptico y sus funciones

1. Los **oculares** por lo general están provistos con lentes 10X (el grado de amplificación es 10 veces). Las lentes magnifican la imagen intermedia formada por la lente objetivo en el tubo óptico, también limitan el área de visibilidad. La mayoría de los microscopios tiene un ocular fijo y uno no ajustable. Ambos deben utilizarse de modo correcto para un enfoque óptimo. Los oculares no deben intercambiarse con los de los otros modelos. Desde el punto de vista óptico, los oculares dispuestos en pares son compatibles.



2. El **control interpupilar** se utiliza para ajustar la separación lateral de los oculares para cada individuo. Cuando se ajusta de manera adecuada, el observador debe poder enfocar ambos ojos con comodidad en la muestra y visualizar una imagen nítida.

3. El **tubo óptico** conecta los oculares a la lente objetivo. En esta parte se forma la imagen intermedia. La longitud normal es de 160mm que, desde el punto de vista funcional, es la distancia desde el plano de la imagen real (oculares) hasta los objetivos.

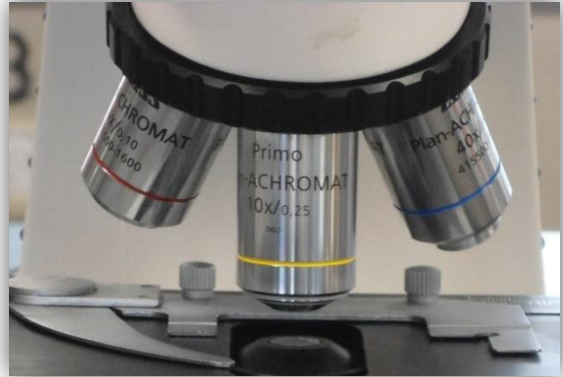
4. El **cuello o brazo** proporciona un sitio estructural de adherencia al portaobjetivo (revólver).

5. El **pie** es el apoyo vertical principal del microscopio. La platina, junto con el condensador y la base, están apoyados sobre el pie.

6. El **revólver** sostiene los objetivos y permite la rotación fácil de una lente objetivo a otra. La distancia de trabajo entre los objetivos y el portaobjeto varía con la marca y el modelo del microscopio.



7. Por lo general hay tres o cuatro lentes **objetivos** cada uno con un poder de aumento específico. En el cilindro de cada lente objetivo está grabado el poder de amplificación y la apertura numérica (AN). La AN se relaciona con el ángulo de luz recolectado por el objetivo, en esencia, indica la capacidad de apertura a la luz de la lente objetivo. Desde el punto de vista funcional, cuanto mayor es la AN, superior será la resolución (capacidad de distinguir entre los detalles finos de dos objetos situados cerca).



8. La **platina** permite el apoyo del portaobjeto que contiene el preparado a observar. Un conjunto de resortes asegura el portaobjeto a la platina.

9. Los **controles de foco** (o ajustes) pueden estar incorporados en una perilla o como dos controles separados. Cuando se utiliza una perilla, movida en una sola dirección, se activa el control grueso: la inversión de la perilla activa el control fino. Un intervalo de la graduación de gire es equivalente a $2\mu\text{m}$. Muchos microscopios están provistos con dos ajustes separados: el grueso y el fino (tonillo macrométrico y tornillo micrométrico). El orden de uso es el mismo: primero el ajuste grueso y luego el fino.

10. El **condensador**, que presenta varias lentes reunidas en una unidad, puede estar montado de modo permanente a o ser ajustable en sentido vertical con un mecanismo de engranaje. Capta, organiza y dirige la luz de la muestra. Adherido al condensador y en su parte inferior se encuentra la abertura del diafragma, un iris ajustable que contiene varias capas que controlan el ángulo y la cantidad de luz enviada a través de la muestra.

11. La **palanca del control** gira la lente ubicada arriba del condensador que esta fuera de posición.

12. Los **controles de la platina** ubicados debajo de ella la mueven en ejes x o y.

13. El **diafragma** de campo está ubicado debajo del condensador, dentro de la base. Cuando está abierto, permite que un círculo de luz de tamaño máximo ilumine el portaobjeto. Cuando se utiliza el poder bajo, un diafragma casi cerrado ayuda a centralizar el aparato condensador mediante el empleo de dos tornillos centradores. Algunos microscopios tienen condensadores centralizados en forma permanente, mientras que en otros tornillos se utilizan para esta función. El vidrio por encima del diafragma del campo lo protege del polvo y del daño mecánico.



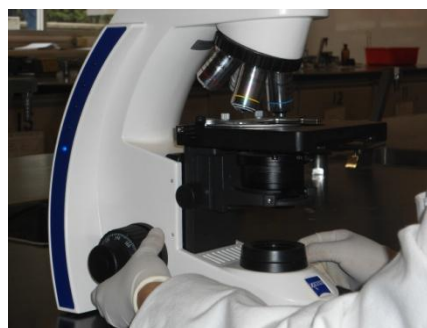
Cuadro. 3 Descripción de los pasos para el manejo del microscopio óptico que se integró al manual.

Manejo del microscopio

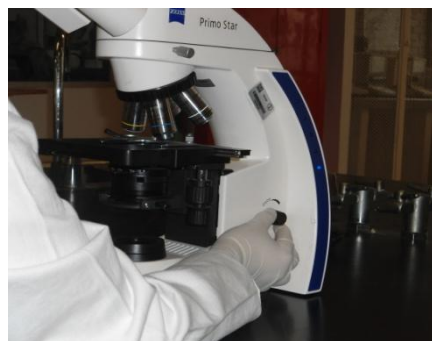
1. Accionando el revólver se selecciona el objetivo adecuado. Se sabe que el objetivo esta seleccionado adecuadamente cuando se percibe un audible clic. Generalmente se empieza enfocando con un objetivo de poco aumento y luego se pasa a otro de mayor aumento. Si se hace esto basta con mover ligeramente el micrométrico para enfocar la muestra con este último objetivo.



2. Bajar completamente la platina y colocar la preparación sobre ella, teniendo cuidado de no ponerla al revés. Accionando los tornillos reguladores de la platina, desplazar la preparación hasta situar la muestra sometida a estudio sobre el orificio de paso de luz.



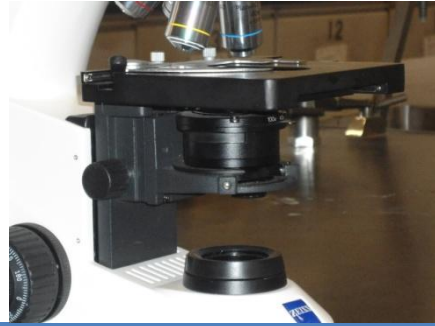
3. Encender la fuente de luz y regularla a una intensidad media para evitar que se sobrecaliente.



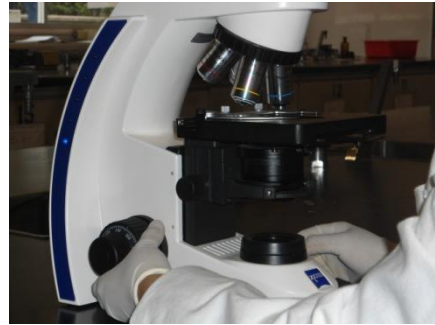
4. Situar el condensador.
 - Bajo, si se utiliza un objetivo de poco poder de ampliación (10X).



- En la mitad de su recorrido, si se emplea un objetivo de gran poder de amplificación (40X).
- Alto, si usan un objetivo de inmersión (100X).
- También conviene ascender el condensador si se observa una muestra deseada y teñida y descenderlo si se estudia una muestra en fresco.



5. Mirando por fuera de los oculares, hacer ascender la platina con el tornillo macrométrico hasta que el objetivo este muy cercano a la preparación.



6. Cuando se utiliza un objetivo de poco poder de ampliación el aparato tiene un tope que impide un acercamiento excesivo de aquel a la preparación.

7. Sin embargo, si se emplea el objetivo de inmersión, previamente hay que depositar una pequeña gota de aceite sobre la preparación y posteriormente, hacer ascender la platina hasta que aquél toque el aceite pero no la preparación.

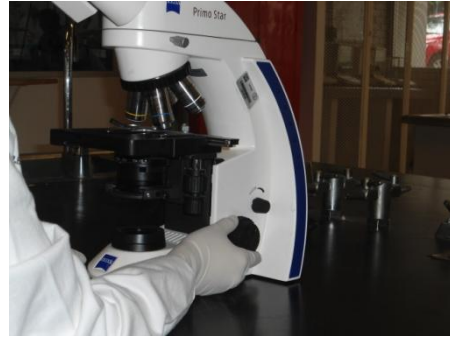
8. Ajustar la distancia interpupilar.



9. Moviendo el tornillo macrométrico, hacer descender lentamente la platina hasta que se vea, mirando por los oculares, la imagen de la muestra. Con el objetivo de inmersión, este nunca debe separarse tanto de la preparación como para perder el contacto con el aceite.



10. Afinar el enfoque con el tornillo micrométrico.



11. Se recomienda seguir los siguientes pasos para un mejor enfoque:

- Cerrar el ojo izquierdo y ajustar el enfoque del ojo derecho con el micrométrico.
- Cerrar el ojo derecho y ajustar el enfoque del ojo izquierdo con el anillo de ajuste. Terminar el ajuste, mirando con los dos ojos, y dando un pequeño toque de enfoque con el micrométrico.

12. Desplazando horizontalmente la platina con movimientos en zig-zag, recorrer con el objetivo toda la preparación, para realizar una correcta observación de la misma

13. Durante la observación, mover continuamente el tornillo micrométrico, para enfocar sucesivamente todos los planos de la muestra.

14. Una vez finalizada la observación, hacer descender totalmente la platina y retirar la preparación, limpiar los objetivos y oculares.

15. Apagar la luz de la fuente.



Estructura celular

El protocolo de la práctica de Estructura celular se realizó por separado, los cambios realizados se mencionan a continuación:

- ✓ Diseño de la caratula
- ✓ Formulación y complementación de objetivos
- ✓ Enunciación de antecedentes académicos
- ✓ Actualización de la introducción con bibliografía reciente, integrando información de las estructuras celulares que se observan al microscopio durante la práctica
- ✓ Descripción de los tipos de tinciones
- ✓ Integración de cuadros con los organelos celulares y tipos de células sanguíneas respectivamente ilustrados
- ✓ Listado de material que se ocupa
- ✓ Ilustración del método con fotos del procedimiento de la preparación de muestras en fresco y tinciones (simples y diferenciales) presentando los resultados con fotos de algunos ejemplos de estructuras celulares de levaduras (Fig. 5), plantas (Fig. 6), células de epiteliales (Fig. 7 y 8), protozoarios (Fig. 9), hongos (Fig. 10) bacterias teñidas con Gram (Fig. 11) y células sanguíneas teñidas con Wright (Fig. 12).
- ✓ Determinación en la forma de presentar los resultados
- ✓ Implementación de un cuestionario
- ✓ Bibliografía complementaria y utilizada en la práctica.



Preparaciones en fresco y tinciones simples

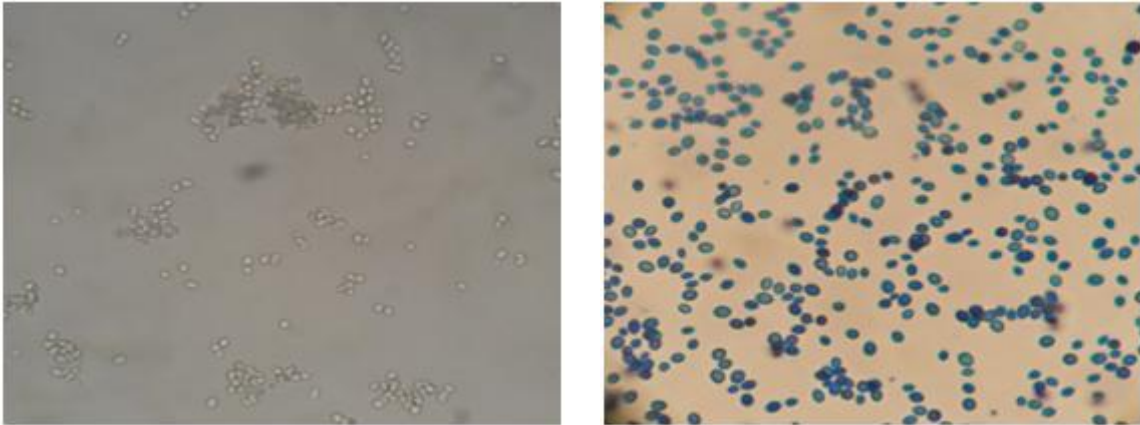


Fig. 5 Se observa de lado izquierdo levaduras de pan sin teñir y en el lado derecho están teñidas con azul de metileno vistas al microscopio a 400X.

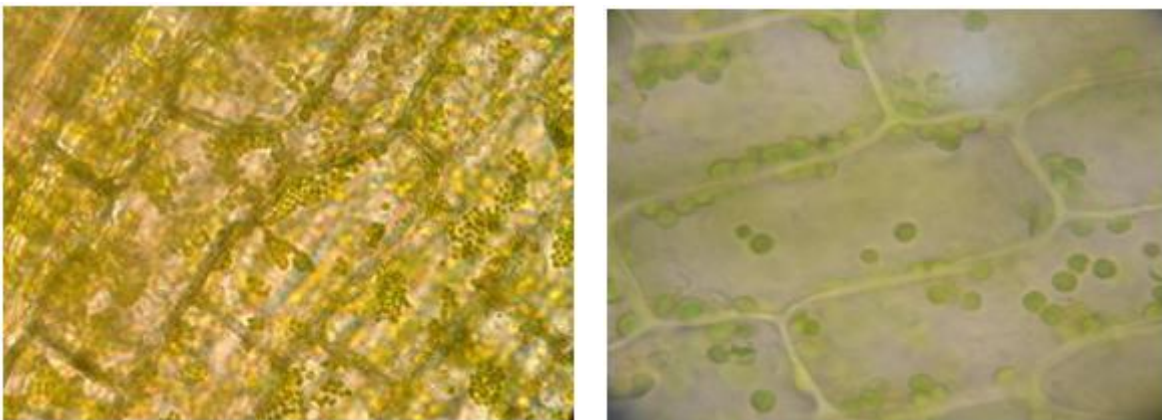


Fig. 6 Foto de la izquierda; preparación en fresco de la planta elodea vistas al microscopio a 400X y la foto a la derecha a 1000X (objetivo de inmersión) en donde se observan mejor las estructuras celulares como la pared celular y los cloroplastos.



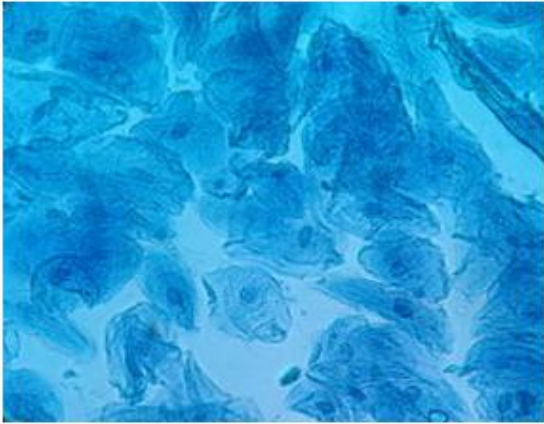


Fig. 7 Foto de células epiteliales de la cavidad bucal teñida con azul de metileno vistas al microscopio a 400X.

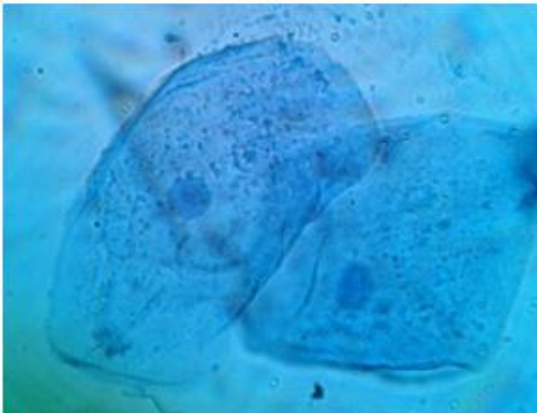


Fig. 8 Foto de células epiteliales teñidas con azul de metileno y vistas al microscopio a 1000X, los núcleos de las células se observan más oscuros y definidos al igual que la membrana celular.



Fig. 9 Foto del protozoario Paramecium que se encontró en el agua estancada en un florero, vista al microscopio a 1000X.



Hongos

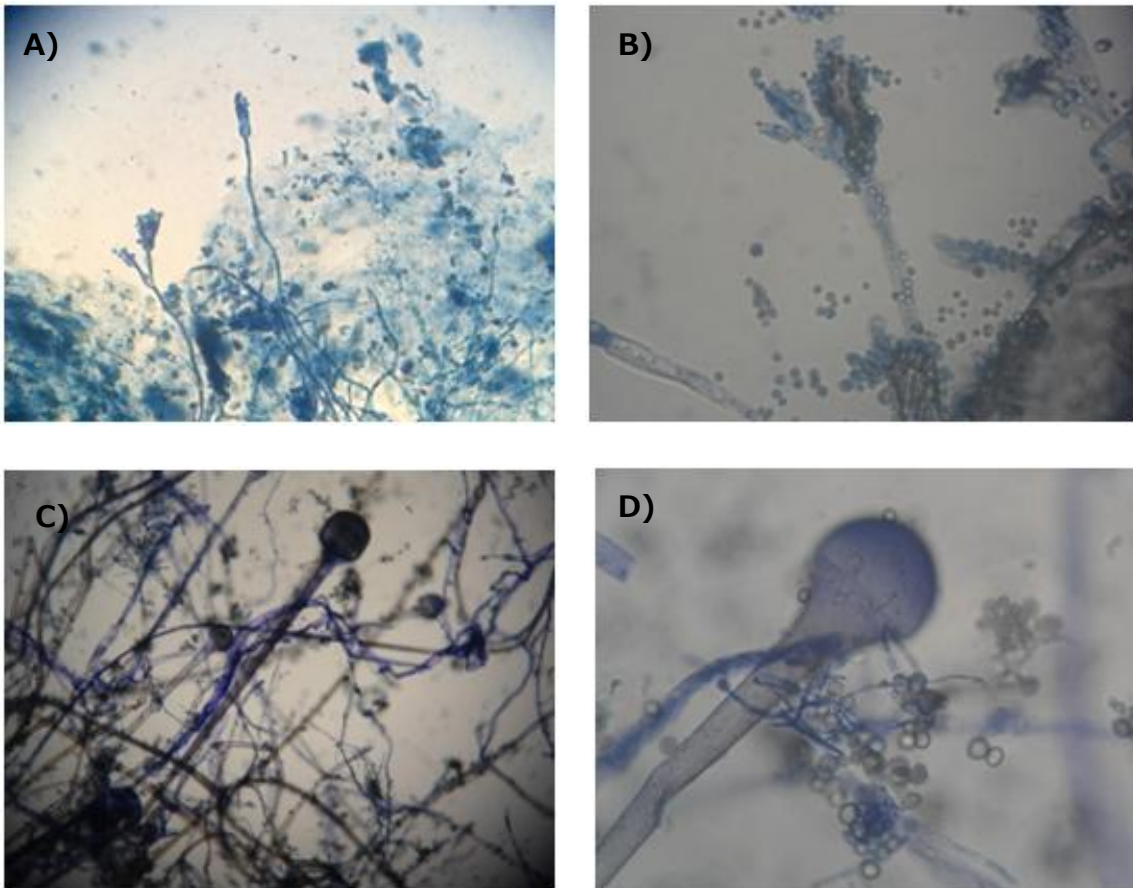


Fig. 10 Fotos A) y B) Hongo del género Penicillium sp. encontrado en fruta en estado de descomposición. Fotos C) y D) hongo del género Mucor sp. extraído de un jitomate descompuesto. Las imágenes de la izquierda fueron vistas al microscopio 400X y las de la derecha a 1000X, las muestras fueron teñidas con azul de metileno.



Bacterias observadas mediante la "tinción de Gram" (Tinciones diferenciales)

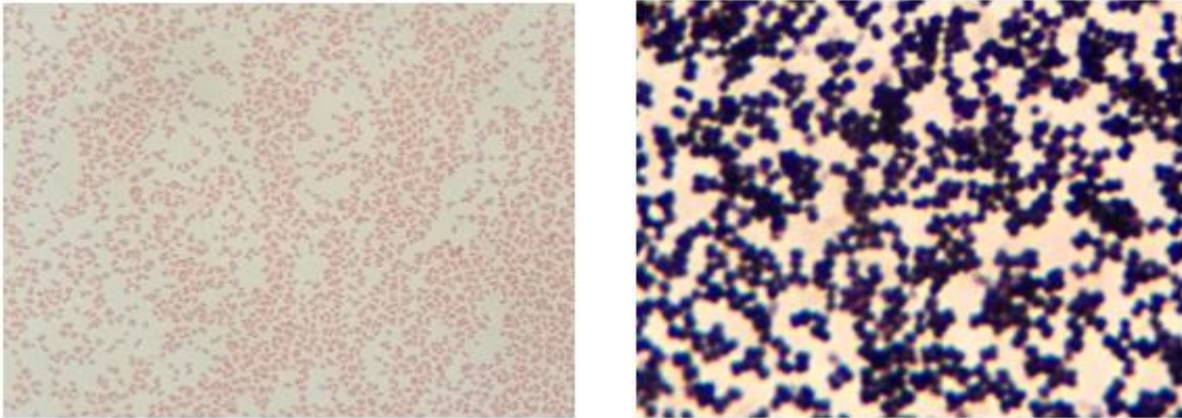


Fig. 11 Foto a la izquierda bacilos gram negativos correspondientes a la bacteria Escherichia coli, y en la derecha se muestran cocos gram positivos correspondientes a la bacteria Micrococcus luteus, observadas al microscopio a 1000X.

Células sanguíneas teñidas con Wright

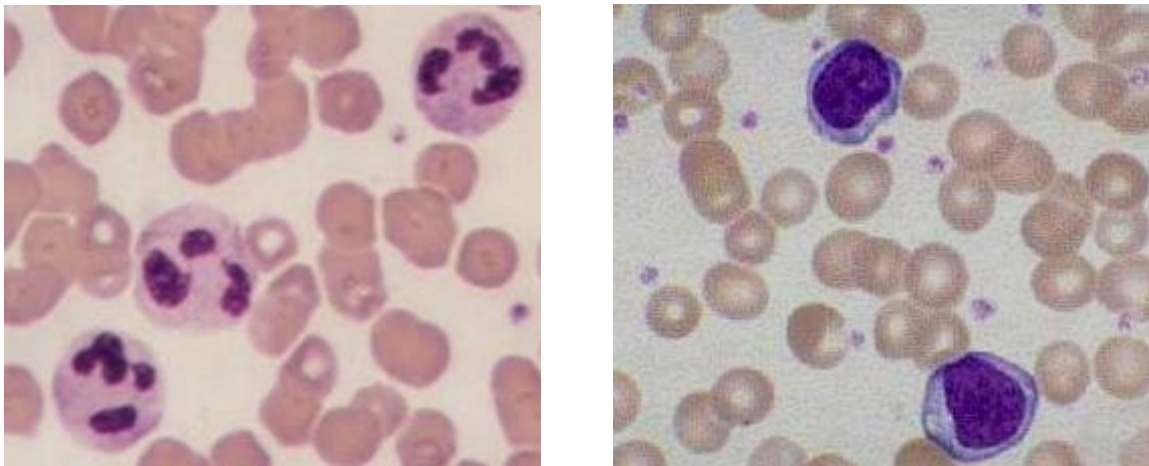


Fig. 12 Células sanguíneas humanas teñidas con Wright. En la foto de la izquierda se observan eritrocitos, tres Neutrófilos segmentados y plaquetas. En la foto de la derecha eritrocitos, dos linfocitos y plaquetas.



Mitosis

Los objetivos de la práctica de mitosis se modificaron y se complementaron con otros nuevos, se actualizó la información y se ilustraron las fases de la mitosis, el procedimiento de la práctica se esquematizó con fotos de lo realizado en el laboratorio. Los resultados también tienen fotos de algunas de las fases de la mitosis de las células vegetales de la raíz de cebolla teñidas y observadas en el microscopio (Fig. 13), en el cuadro 4 se presentan todas las fases que se pueden observar al realizar esta práctica. Las preguntas del cuestionario se cambiaron y en la presentación de resultados no se realizó ningún cambio.

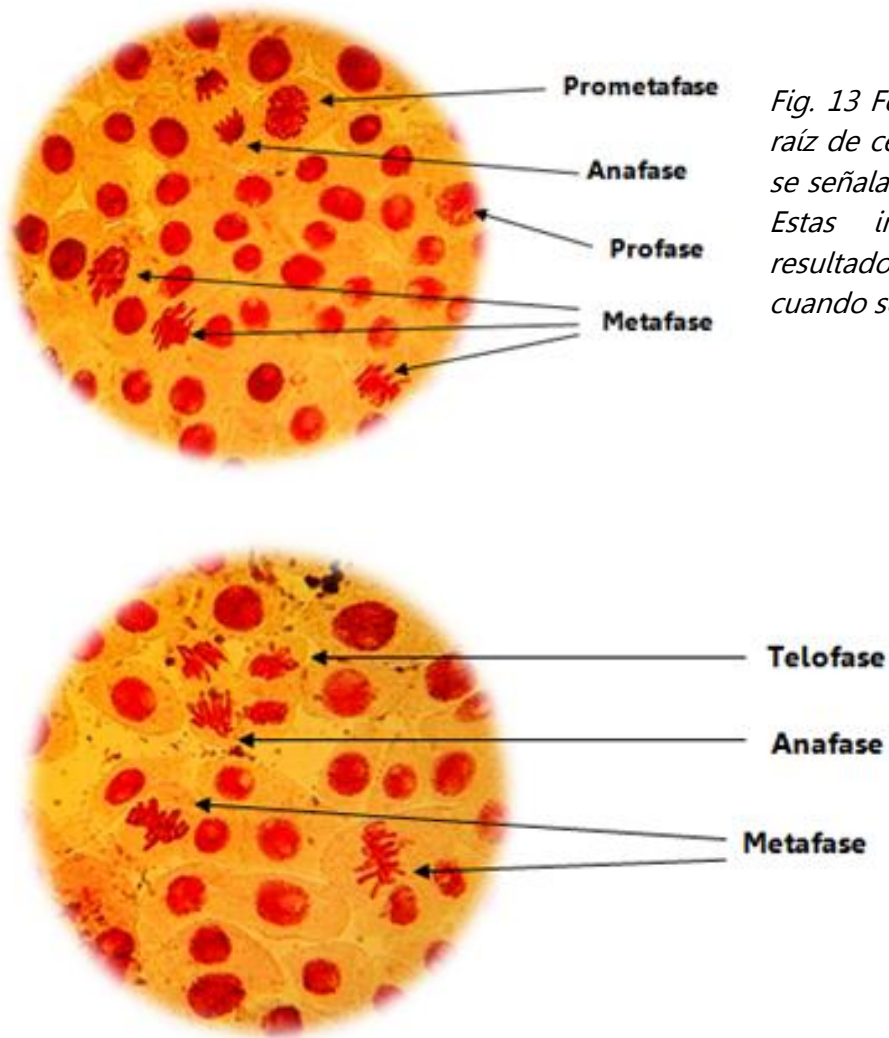

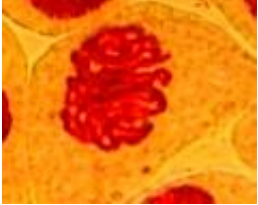


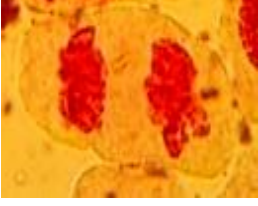


Fig. 13 Fotos de las células de la raíz de cebolla en mitosis, donde se señalan algunas de sus etapas. Estas imágenes ilustran los resultados que se obtienen cuando se realiza la práctica.



Cuadro 4. Células de cebolla en mitosis teñidas con acetocarmín

FASES DE LA MITOSIS DE CELULAS DE CEBOLLA	IMAGEN
<i>Profase</i>	
<i>Prometafase</i>	
<i>Metafase</i>	
<i>Anafase</i>	
<i>Telofase</i>	



Manejo de micropipetas

Para las prácticas de Extracción, purificación, cuantificación y extracción de ADN, debido a las pequeñas cantidades de reactivos que se ocupan, se utilizan las micropipetas, por este motivo se implementó el protocolo de manejo de micropipetas, se incluyeron objetivos, una introducción sobre las micropipetas, las precauciones que se deben de tener en cuenta para su manejo, la forma correcta de utilizarlas, el esquema de las partes que la componen (Fig.14), un cuestionario para complementar lo aprendido en la práctica y la bibliografía. La parte experimental de esta práctica consiste en el cálculo de la exactitud (E) y del coeficiente de variación (CV) para saber si las micropipetas se encuentran calibradas o no. Con estos resultados también se puede saber si la pipeta y la persona que utiliza las micropipetas tienen precisión y exactitud al realizar sus mediciones. Para corroborar los parámetros mencionados se aplicaron las fórmulas del cuadro número 5, se utilizó un juego de micropipetas de distinta capacidad que se ocupan en el modulo de BCT I, se calibraron manejando agua destilada, pesando diez veces en la balanza analítica ajustando la micropipeta con el valor mínimo y máximo de su capacidad, se registraron los pesos y se realizaron los cálculos sustituyendo los datos en las fórmulas para el cálculo de exactitud y el coeficiente de variación que se muestran a continuación en los resultados del cuadro 6.



Partes que integran una Micropipeta



Fig. 14 Esquema de las partes que componen un micropipeta de la marca Gilson®.



Cuadro 5. Fórmulas para obtener la exactitud (E) y el coeficiente de variación (CV) de las micropipetas.

Valores del control, utilizando Z dependiendo de la temperatura, presión atmosférica y líquido que se utilice para la calibración

Z = 1.0032 $\mu\text{L}/\text{mg}$: Perteneciente a 21.5 °C, 1013 mbar (hPa) y al uso de agua destilada

Volumen controlado (Vo): es el volumen en μL de la pipeta que se calibra

Valor nominal (mg) = Volumen controlado μL / Z ($\mu\text{L}/\text{mg}$)

Xi: cada uno de los registros del peso

Valor medio: $\bar{x} = \Sigma xi / n$

Σxi = promedio de las pesadas, n= número de pesadas

Volumen medio:

$$\bar{V} = \bar{x} * Z \quad \bar{x} = \text{promedio de las pesadas}$$

Z = factor

Exactitud:

$$E (\%) = \bar{V} - V_{\text{nominal}} / V_{\text{nominal}} * 100$$

Desviación estándar:

$$S = Z * \sqrt{\frac{\Sigma(xi-x)^2}{n-1}}$$

Coeficiente de variación:

$$CV (\%) = \frac{S}{\bar{V}} * 100$$



Cuadro 6. Resultados de la calibración de micropipetas de distintas capacidades de la marca Gilson® en donde se obtuvo el % de Exactitud y % Coeficiente de Variación.

Capacidad de la micropipeta	1-10 µL		2-20 µL		50-200 µL		200-1000 µL		1000-5000 µL	
Volumen controlado (Vo) µL	1.0000	10.0000	2.0000	20.0000	50.0000	200.0000	200.0000	1000.0000	1000.0000	2000.0000
Volumen nominal /Z	0.9968	9.9681	1.9936	19.9362	49.8405	199.3620	199.3620	996.8102	996.8102	1993.6204
X1 (µL)	0.9000	9.7000	1.9000	20.0000	48.9000	197.6000	194.8000	981.4000	972.2000	1962.0000
X2 (µL)	0.8000	9.0000	1.7000	19.3000	49.0000	195.8000	194.9000	975.7000	972.0000	1940.9000
X3 (µL)	0.8000	10.1000	1.9000	19.9000	48.3000	195.2000	195.3000	989.8000	974.1000	1944.9000
X4 (µL)	0.7000	9.8000	1.8000	19.5000	48.7000	194.8000	195.4000	977.5000	974.9000	1966.6000
X5 (µL)	0.8000	9.8000	1.7000	19.6000	48.7000	195.0000	195.3000	975.9000	974.0000	1965.3000
X6 (µL)	0.9000	9.5000	1.8000	19.9000	48.4000	195.2000	195.6000	974.8000	979.3000	1963.2000
X7 (µL)	0.8000	9.6000	1.8000	19.7000	48.4000	195.8000	194.8000	974.3000	972.7000	1964.9000
X8 (µL)	0.8000	9.9000	1.7000	19.6000	48.0000	195.4000	195.3000	974.3000	980.0000	1954.4000
X9 (µL)	0.8000	9.6000	1.8000	19.8000	48.4000	195.8000	194.9000	975.6000	980.0000	1968.2000
X10(µL)	0.8000	9.8000	1.8000	19.9000	48.7000	195.8000	194.6000	982.2000	976.4000	1967.3000
Valor medio	0.8125	9.7109	1.7957	19.7831	48.7053	196.2660	195.7142	981.2800	978.6817	1966.0412
Exactitud (%)	22.6830	2.6485	11.0207	0.7738	2.3307	1.5774	1.8638	1.5826	1.8523	1.4027
Desviación estándar	0.0567	0.2936	0.0370	0.2201	0.3027	0.7418	0.3281	4.9614	3.1844	9.7415
CV (%)	5.6946	2.9457	3.7011	1.1040	0.6074	0.3721	0.1645	0.4977	0.3194	0.4886



Extracción y purificación de ADN

Otros de los protocolos que se integraron al manual de BCT I por separado son las prácticas de biología molecular: Extracción y purificación de ADN humano, Cuantificación de ADN humano y Electroforesis de ADN, a estas prácticas se les agregó su correspondiente información con bibliografía actualizada, se colocó el material que será útil para cada una de ellas, los procedimientos se ilustraron con fotos; se formularon preguntas para los cuestionarios y la presentación de los resultados también se estableció para cada una de las prácticas.

En específico para la práctica de Extracción y purificación de ADN, se adecuó el método comercial "Wizard® Genomic DNA Purification Kit" de la marca Promega®, el volumen seleccionado fue de 3 mL de sangre, para que los alumnos al realizar la extracción, observen a simple vista la precipitación del ADN con la formación de las hebras (Fig. 15).

En el Cuadro 7 se indican los volúmenes que se ocupan de cada reactivo del kit así como los pasos que se siguieron para la extracción del ADN.

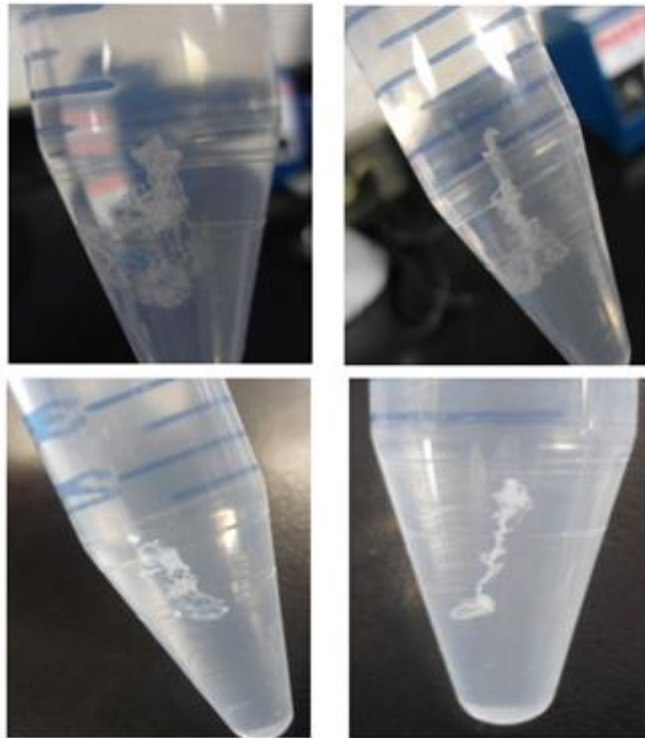


Fig. 15 ADN obtenido de cuatro muestras distintas de sangre humana extraídas con el kit Wizard de Promega®



Cuadro 7. Reactivos y cantidades utilizadas en la Práctica de Extracción y Purificación de ADN y la justificación de su uso.

Reactivo	Cantidad	Función
Solución de lisis celular	9 mL	Esta solución contiene amortiguadores y detergentes que ayudan a lisar la célula, sin hacerle daño al ADN. La adición de un detergente como el SDS es necesaria a menudo para eliminar las membranas ³⁹ .
Solución lisis de núcleos	3 mL	Esta solución contiene amortiguadores y detergentes que ayudan a lisar los núcleos, sin hacerle daño al ADN ³⁹ .
Solución RNasa	15 μ L	Las RNasas (Ribonucleasas) son enzimas que cortan las secuencias de ARN para su posterior degradación. Son importantes, porque cuando se hace la extracción de ADN, evitan la presencia de ARN en las muestras ⁴⁰ .
Solución de precipitación de proteínas	1 mL	El ADN se encuentra en el núcleo de las células asociado a proteínas, para liberarlo de las proteínas se utilizan una serie de agentes desnaturizantes. Se utilizan disolventes orgánicos para extraer las proteínas y que el ADN quede en la fase acuosa para precipitarlo ^{39, 41} .
Isopropanol	3 mL	El ADN es insoluble en alcohol, por lo tanto para precipitarlo se utiliza etanol frío o isopropanol, la muestra se centrifuga para eliminar las sales añadidas previamente que se encuentran en el sobrenadante ⁴⁰ .
Etanol al 70%	3 mL	Se utiliza para lavar el ADN si aun tiene algunas sales y reactivos que puedan interferir con análisis posteriores ⁴⁰ .
Solución de rehidratación	250 μ L	Esta solución posee amortiguadores que protegen el ADN y lo mantienen estable para su utilización ⁴¹ .



Cuantificación y electroforesis de ADN

En la práctica de cuantificación se utilizó el ADN que se extrajo en la práctica anterior, la medición se realizó con el equipo Biofotómetro de la marca Eppendorf[®], en donde se obtuvo la concentración y la pureza del ADN extraído como se observan los resultados en los cuadros 9, 10 y 11. Los pasos que se siguieron para la cuantificación también se ilustraron en el protocolo, indicando las diluciones a utilizar. El equipo proporciona las lecturas de las absorbancias a 260 y 280 nm, por lo que la concentración y la pureza también se pueden obtener aplicando las fórmulas que se escribieron en la parte teórica del protocolo realizado (Cuadro 8).

Se muestran las fotos de los geles (Figuras 16-23) logrados durante las pruebas para alcanzar la estandarización de este método, en estos geles se pueden observar que las bandas que se obtuvieron corresponden con la concentración de ADN que se cuantificó.

Se partió de un gel de agarosa al 1% utilizando buffer TBE (Tris, ácido bórico y EDTA) al 0.5X (Fig.16), pero se observó que las bandas de ADN eran definidas pero quedaban muy retenidas, además de que la cantidad utilizada del marcador de peso molecular no era la adecuada para que se observara con claridad en el gel. A mayor concentración de agarosa el poro del gel es más pequeño por lo tanto retiene más a las moléculas de mayor peso, y nuestra muestra es ADN total por lo que tiene un peso molecular elevado, por estas razones se realizaron otros dos geles comparando el porcentaje de 1% y el de 0.8%, manteniendo la concentración del buffer igual, y se observó que las bandas corrieron más con el gel de menor concentración (Figuras 17 y 18). Se realizó otro gel de agarosa con una concentración del 0.7% y se observó que las bandas corrieron mejor comparadas con el de 0.8% (Figuras 19 y 20), por lo que se estableció esta concentración para preparar el gel en la práctica, también se realizó una prueba aumentando la concentración del buffer TBE de 0.5X a 1X, pero se observó un mal corrimiento, las bandas se difuminaron (Fig.20), por esta razón se decidió mantener la concentración de TBE a 0.5X, estos geles se corrieron a 88 volts durante una hora diez minutos. El gel de la Fig. 21 representa las condiciones óptimas de electroforesis, el gel de agarosa está preparado a una concentración



de 0.7%, teñido con 5µL de Midori Green, amortiguador TBE 0.5X, aplicando voltaje a 88 volts, durante una hora veinte minutos.

Cuadro 8. Fórmulas para obtener la concentración y la pureza del ADN.

Concentración de DNA (µg /mL) = absorbancia de la muestra a 260nm x factor de dilución x 50µg/mL

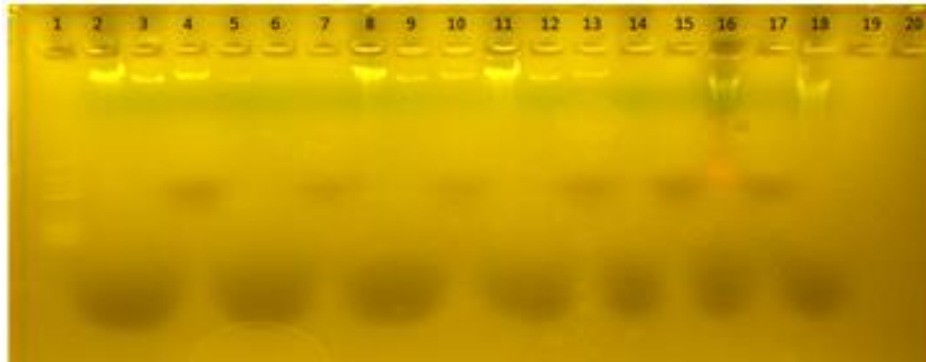
Pureza ADN = absorbancia 260nm / absorbancia 280nm

Cuadro 9. Resultados de la práctica individual (Geles; Fig. 16, 19, 20, 21)

Muestras	Dilución	Concentración µg/mL	260/280	260	280	Características de la muestra
1	1:40	24.04	1.84	0.481	0.261	RNasa
2	1:40	18.37	1.03	0.355	0.367	RNasa, tenía restos de hemoglobina
3	1:40	4.09	1.87	0.082	0.044	RNasa
4	1:40	10.11	1.87	0.202	0.108	RNasa

En este cuadro se muestran los resultados de la cuantificación de cuatro muestras sanguíneas distintas, en las cuales se obtuvo una pureza dentro de lo que marca la literatura (1.7 a 2.0 ADN de calidad), para medir la concentración se utilizó una dilución 1:40 ya que las muestras estaban muy concentradas.





No. De Pozo / Muestra /	Concentración
1	Marcador de peso 100pb
2	ADN 1 Concentrado (buffer green)
3	ADN 1 Diluido 1:40 (buffer green) 24.04 µg/mL
4	ADN 1 Diluido 1:40 (buffer azul)
5	ADN 2 Concentrado (buffer green)
6	ADN 2 Diluido 1:40 (buffer green) 18.37 µg/mL
7	ADN 2 Diluido 1:40 (buffer azul)
8	ADN 3 Concentrado (buffer green)
9	ADN 3 Diluido 1:40 (buffer green) 4.09 µg/mL
10	ADN 3 Diluido 1:40 (buffer azul)
11	ADN 4 Concentrado (buffer green)
12	ADN 4 Diluido 1:40 (buffer green) 10.11 µg/mL
13	ADN 4 Diluido 1:40 (buffer azul)
14	ADN Trigo 1 (buffer green)
15	ADN Trigo 2 (buffer azul)
16	ADN Trigo 3 (buffer green)
17	ADN Trigo 4 (buffer azul)
18	ADN Trigo 5 (buffer green)
19	NADA
20	NADA

Fig. 16 Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1%, teñido con 5µL de Midori Green, amortiguador TBE 0.5X, marcador de peso molecular de 100pb con corrimiento a 88 voltios durante 1 hora 10 minutos. El marcador de peso molecular no se percibe, las bandas se observan mejor definidas con la dilución 1:40 aunque no se observa un buen desplazamiento. En los pozos 16 y 18 que corresponden a muestras de trigo se observa el ADN degradado.

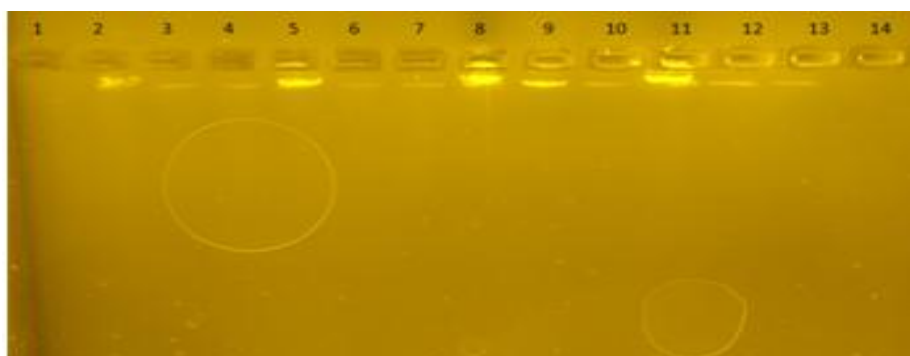


Cuadro 10. Resultados del curso de biología molecular (Geles; Fig. 17 a la 21)

En el curso de profesores se obtuvieron los siguientes resultados en donde la concentración de las muestras se midió utilizando dos diluciones (1:20 y 1:40), la pureza solo dio fuera del rango de aceptación en la muestra 1; las concentraciones fueron muy distintas en los cuatro equipos. El método de extracción y la forma de disolver el ADN son de gran importancia para obtener una muestra de calidad, asimismo es significativo que las muestras estén disueltas completamente al momento de realizar las lecturas de la concentración.

Equipo/ muestra	Dilución	Concentración $\mu\text{g/mL}$	260/280	260	280	Características de la muestra
1/5	1:20	7.2	1.85	0.144	0.078	RNasa
	1:40	14.2	1.50	0.417	0.283	
2/6	1:20	9.0	1.79	0.179	0.100	Sin RNasa
	1:40	No se realizó				
3/7	1:20	63.8	1.85	1.245	0.672	RNasa
	1:40	7.1	1.81	0.142	0.079	
4/8	1:20	19.9	1.85	0.398	0.215	Sin RNasa
	1:40	9.5	1.83	0.190	0.104	

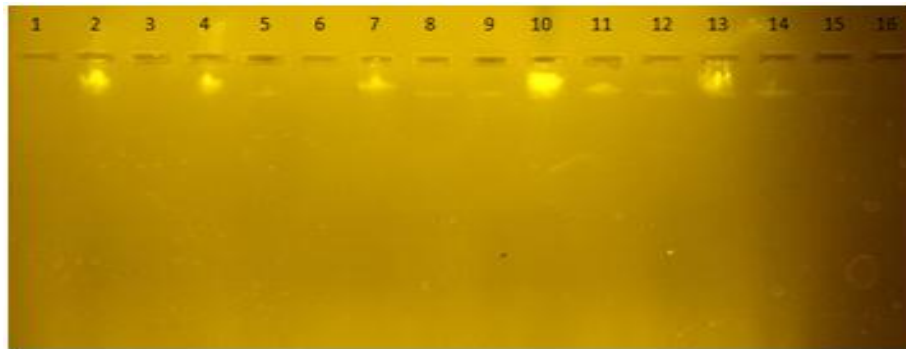




No. De Pozo / Muestra /	Concentración
1 Marcador de peso 100pb	
2 ADN EQ1 Concentrado	
3 ADN EQ1 Diluido 1:20	7.20 µg/mL
4 ADN EQ1 Diluido 1:40	14.20 µg/mL
5 ADN EQ2 Concentrado	
6 ADN EQ2 Diluido 1:20	9.00 µg/mL
7 ADN EQ2 Diluido 1:20	9.00 µg/mL
8 ADN EQ3 Concentrado	
9 ADN EQ3 Diluido 1:20	63.80 µg/mL
10 ADN EQ3 Diluido 1:40	7.10 µg/mL
11 ADN EQ4 Concentrado	
12 ADN EQ4 Diluido 1:20	19.90 µg/mL
13 ADN EQ4 Diluido 1:40	9.50 µg/mL
14 Marcador de peso 100pb	

Fig. 17 Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1%, teñido con 5µL de Midori Green, amortiguador TBE 0.5X, marcador de peso molecular de 100pb con corrimiento a 88 voltios durante 1 hora 10 minutos. Las bandas no tienen un buen desplazamiento, pero se observan definidas, el marcador de peso molecular no aparece.

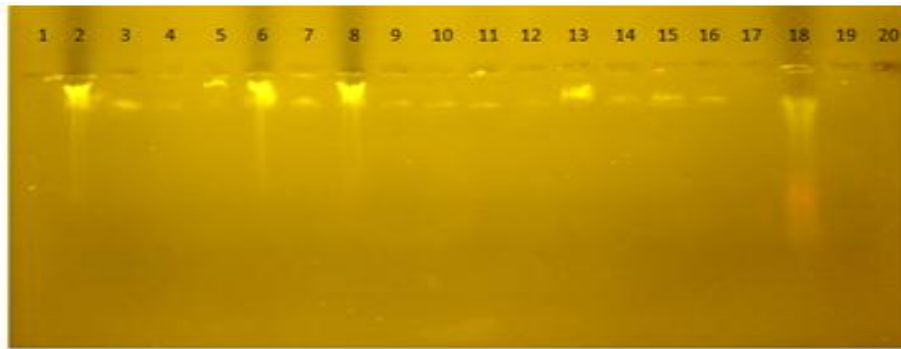




No. De Pozo / Muestra /	Concentración
1 Marcador de peso 100pb	
2 ADN EQ1 Concentrado	
3 NADA	
4 ADN EQ1 Concentrado	
5 ADN EQ1 Diluido 1:20	7.20 µg/mL
6 ADN EQ1 Diluido 1:40	14.20 µg/mL
7 ADN EQ2 Concentrado	
8 ADN EQ2 Diluido 1:20	9.00 µg/mL
9 ADN EQ2 Diluido 1:20	9.00 µg/mL
10 ADN EQ3 Concentrado	
11 ADN EQ3 Diluido 1:20	63.80 µg/mL
12 ADN EQ3 Diluido 1:40	7.10 µg/mL
13 ADN EQ4 Concentrado	
14 ADN EQ4 Diluido 1:20	19.90 µg/mL
15 ADN EQ4 Diluido 1:40	9.50 µg/mL
16 Marcador de peso 100pb	

Fig. 18 Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0.8%, teñido con 5µL de Midori Green, amortiguador TBE 0.5X, marcador de peso molecular de 100pb con corrimiento a 88 voltios durante 1 hora 10 minutos. Las bandas se observan un poco mas desplazadas, pero no se observan muy definidas, el marcador de peso molecular no aparece.

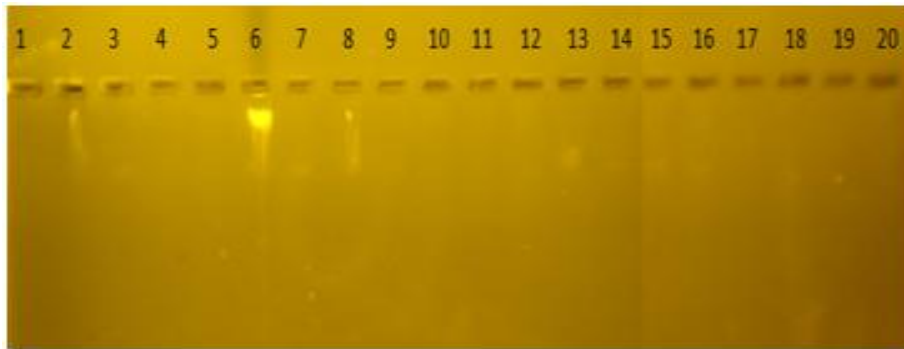




No. De Pozo / Muestra /	Concentración
1 Marcador de peso 100pb	
2 ADN 1 Concentrado	
3 ADN 1 Diluido 1:40	24.04 µg/mL
4 ADN 2 Concentrado	
5 ADN 2 Diluido 1:40	4.09 µg/mL
6 ADN 3 Concentrado	
7 ADN 3 Diluido 1:40	18.37 µg/mL
8 ADN 4 Concentrado	
9 ADN 4 Diluido 1:40	10.11 µg/mL
10 ADN EQ1 Diluido 1:20	7.20 µg/mL
11 ADN EQ1 Diluido 1:40	14.20 µg/mL
12 ADN EQ2 Diluido 1:20	9.00 µg/mL
13 ADN EQ3 Diluido 1:20	63.80 µg/mL
14 ADN EQ3 Diluido 1:40	7.10 µg/mL
15 ADN EQ4 Diluido 1:20	19.90 µg/mL
16 ADN EQ4 Diluido 1:40	9.50 µg/mL
17 ADN DE TRIGO 1	61.00 µg/mL
18 ADN DE TRIGO 3	57.70 µg/mL
19 ADN DE TRIGO 2	10.50 µg/mL
20 Marcador de peso 100pb	

Fig. 19 Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0.7%, teñido con 5µL de Midori Green, amortiguador TBE 0.5X, marcador de peso molecular de 100pb con corrimiento a 88 voltios durante 1 hora 10 minutos. Las bandas se observan un poco más desplazadas y definidas, el marcador de peso molecular no aparece.

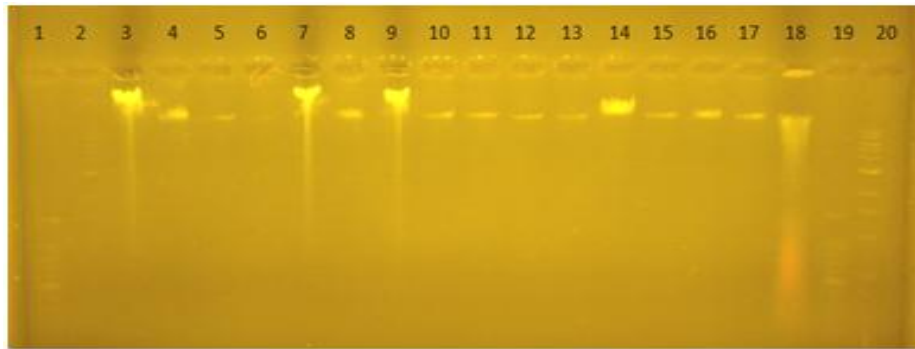




No. De Pozo / Muestra /	Concentración
1 Marcador de peso 100pb	
2 ADN 1 Concentrado	
3 ADN 1 Diluido 1:40	24.04 µg/mL
4 ADN 2 Concentrado	
5 ADN 2 Diluido 1:40	4.09 µg/mL
6 ADN 3 Concentrado	
7 ADN 3 Diluido 1:40	18.37 µg/mL
8 ADN 4 Concentrado	
9 ADN 4 Diluido 1:40	10.11 µg/mL
10 ADN EQ1 Diluido 1:20	7.20 µg/mL
11 ADN EQ1 Diluido 1:40	14.20 µg/mL
12 ADN EQ2 Diluido 1:20	9.00 µg/mL
13 ADN EQ3 Diluido 1:20	63.80 µg/mL
14 ADN EQ3 Diluido 1:40	7.10 µg/mL
15 ADN EQ4 Diluido 1:20	19.90 µg/mL
16 ADN EQ4 Diluido 1:40	9.50 µg/mL
17 ADN DE TRIGO 1	61.00 µg/mL
18 ADN DE TRIGO 3	57.70 µg/mL
19 ADN DE TRIGO 2	10.50 µg/mL
20 Marcador de peso 100pb	

Fig. 20 Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0.8%, teñido con 5µL de Midori Green, amortiguador TBE 1.0X, marcador de peso molecular de 100pb con corrimiento a 88 voltios durante 1 hora 10 minutos. Las muestras no tienen un buen corrimiento, no se desplazan bien, y el marcador de peso molecular no se observa.





No. De Pozo / Muestra /	Concentración
1 Marcador de peso 100pb 1	
2 Marcador de peso 100pb 2	
3 ADN 1 Concentrado	
4 ADN 1 Diluido 1:40	24.04 µg/mL
5 ADN 2 Concentrado	
6 ADN 2 Diluido 1:40	4.09 µg/mL
7 ADN 3 Concentrado	
8 ADN 3 Diluido 1:40	18.37 µg/mL
9 ADN 4 Concentrado	
10 ADN 4 Diluido 1:40	10.11 µg/mL
11 ADN EQ1 Diluido 1:20	7.20 µg/mL
12 ADN EQ1 Diluido 1:40	14.20 µg/mL
13 ADN EQ2 Diluido 1:20	9.00 µg/mL
14 ADN EQ3 Diluido 1:20	63.80 µg/mL
15 ADN EQ3 Diluido 1:40	7.10 µg/mL
16 ADN EQ4 Diluido 1:20	19.90 µg/mL
17 ADN EQ4 Diluido 1:40	9.50 µg/mL
18 ADN DE TRIGO 3	57.70 µg/mL
19 Marcador de peso 100pb 1	
20 Marcador de peso 100pb 2	

Fig. 21 Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0.7%, teñido con 5µL de Midori Green, amortiguador TBE 0.5X, marcador de peso molecular de 100pb con corrimiento a 88 voltios durante 1 hora 10 minutos. Las muestras tienen un buen desplazamiento, se observan bien definidas bien, y el marcador de peso molecular se observa mejor en el pozo número 20.

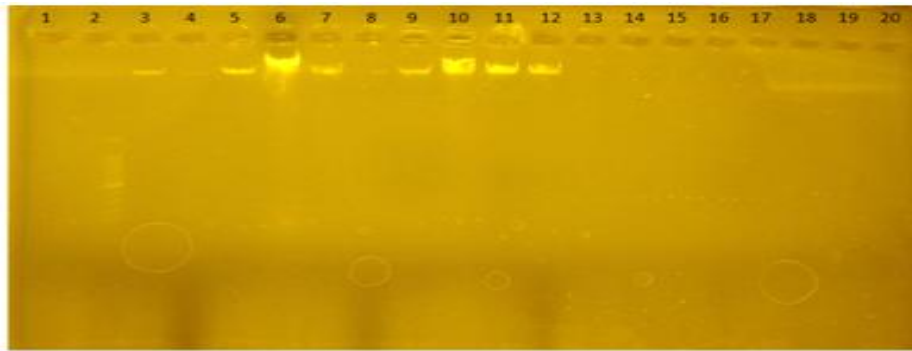


Cuadro 11. Resultados de la práctica realizada en el grupo de BCT I 2014-1 (Gel: Fig. 22, equipo 1 al 5, Gel: Fig. 23 equipo 6 al 10)

Después de haber validado las condiciones de electroforesis de ADN se realizó el protocolo de extracción, cuantificación y electroforesis de ADN humano con el grupo de BCT I, la pureza obtenida de la muestras en general es aceptable, con excepción del equipo 1, 4 y 9 que se encuentran fuera del rango aceptable, la dilución que utilizó fue de 1:20, ya que las bandas en el gel se observan definidas comparando con una muestra concentrada. La intensidad de la banda corresponde a la concentración obtenida en la cuantificación (Fig. 22 y 23).

Equipo/ muestra	Dilución	Concentración $\mu\text{g/mL}$	260/280	260	280	Características de la muestra
1/9	1:20	30.5	2.83	0.610	1.726	Sin RNasa
2/10	1:20	37.1	1.85	0.742	1.372	Sin RNasa
3/11	1:20	40.7	1.98	0.814	1.473	Sin RNasa
4/12	1:20	14.4	1.56	0.289	0.450	Sin RNasa
5/13	1:20	49.2	1.64	0.985	1.651	Sin RNasa
6/14	1:20	57.6	1.82	1.152	2.096	Sin RNasa
7/15	1:20	24.4	1.71	0.488	0.834	Sin RNasa
8/16	1:20	33.0	1.80	0.660	1.188	Sin RNasa
9/17	1:20	25.9	1.39	0.517	0.718	Sin RNasa
10/18	1:20	31.0	1.78	0.619	1.101	Sin RNasa

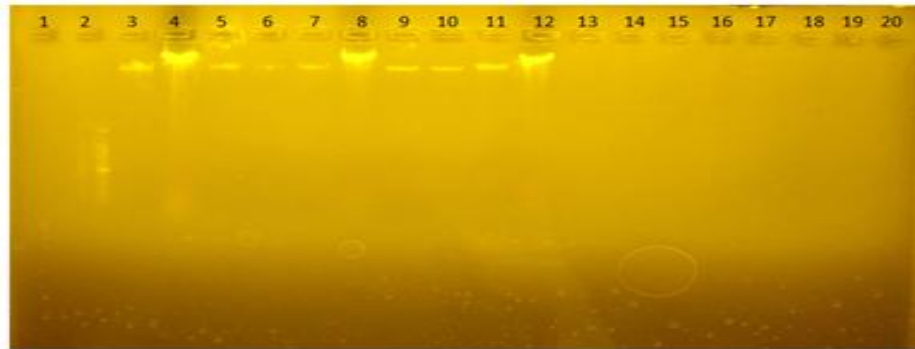




No. De Pozo / Muestra /	Concentración
1 NADA	
2 Marcador de peso 100pb	
3 ADN EQ1 Diluido 1:20	30.50 µg/mL
4 ADN EQ1 Diluido 1:40	
5 ADN EQ2 Diluido 1:40	
6 ADN EQ2 Diluido 1:20	37.10 µg/mL
7 ADN EQ3 Diluido 1:20	40.70µg/mL
8 ADN EQ3 Diluido 1:40	
9 ADN EQ4 Diluido 1:40	
10 ADN EQ4 Diluido 1:20	14.4 0µg/mL
11 ADN EQ5 Diluido 1:20	
12 ADN EQ5 Diluido 1:40	49.2 µg/mL
13 NADA	
14 NADA	
15 NADA	
16 NADA	
17 NADA	
18 NADA	
19 NADA	
20 NADA	

Fig. 22 Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0.7%, teñido con 5µL de Midori Green, amortiguador TBE 0.5X, marcador de peso molecular de 100pb con corrimiento a 88 voltios durante 1 hora 10 minutos. Este gel se realizó utilizando durante una práctica del grupo de BCT I con las condiciones que se validaron para esta técnica.





No. De Pozo / Muestra /	Concentración
1 NADA	
2 Marcador de peso 100pb	
3 ADN EQ6 Diluido 1:40	
4 ADN EQ6 Diluido 1:20	57.6 µg/mL
5 ADN EQ7 Diluido 1:20	24.4 µg/mL
6 ADN EQ7 Diluido 1:40	
7 ADN EQ8 Diluido 1:40	
8 ADN EQ8 Diluido 1:20	33.0 µg/mL
9 ADN EQ9 Diluido 1:20	25.9 µg/mL
10 ADN EQ9 Diluido 1:40	
11 ADN EQ10 Diluido 1:40	
12 ADN EQ10 Diluido 1:20	31.0 µg/mL
13 NADA	
14 NADA	
15 NADA	
16 NADA	
17 NADA	
18 NADA	
19 NADA	
20 NADA	

Fig. 23 Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 0.7%, teñido con 5µL de Midori Green, amortiguador TBE 0.5X, marcador de peso molecular de 100pb con corrimiento a 88 voltios durante 1 hora 10 minutos. Este gel se realizó utilizando durante una práctica del grupo de BCT I con las condiciones que se validaron para esta técnica.



Electroforesis de proteínas

En la instrumentación de esta práctica, se formularon los objetivos que los alumnos deben de alcanzar al realizar la práctica, se agregó información actualizada sobre la electroforesis de proteínas, se realizó un listado de los materiales, el equipo que se ocupa y de los reactivos y la forma de preparar los reactivos que se utilizarán, en la parte experimental se describe la forma de montar la cámara de electroforesis para preparar gel, el modo de preparar y colocar las muestras, el corrimiento electroforético y la tinción del gel, todo el método experimental tiene fotos de los pasos descritos, este protocolo también contiene la foto de los resultados que se obtienen cuando se realiza una electroforesis de una manera adecuada observando las bandas de las proteínas de suero que se obtienen al ser separadas éstas.

Resultado de la electroforesis de proteínas de suero humano

Gel de poliacrilamida: gel concentrador al 5%, y gel separador al 10%. Teñido con azul de coomassie. En la Fig. 24 se muestra el gel con las proteínas de suero separadas por medio de la electroforesis vertical, siguiendo el protocolo que se instrumentó. Se observan las bandas de las distintas muestras colocadas por repetición, en el pozo 1 está el marcador de peso molecular que sirve para corroborar el peso de las proteínas que se separaron, en los pozos 2 y 3 se colocaron muestras de globulinas pero no se observa la separación de estas globulinas, que no son puras porque está contaminada con albumina, en el pozo 6 y 7 se muestran las bandas gruesas que corresponden a la albúmina, estas bandas son intensas y pesan 69kD, además se observan intensas por que la albúmina se encuentra en un porcentaje alto en el suero sanguíneo. En los pozos 9 y 10 se colocó suero total diluido, aquí se observa la separación de muchas bandas porque son distintas proteínas que se encuentran en el suero entre ellas albúmina y globulinas con alto peso molecular que corresponden a 140kD.



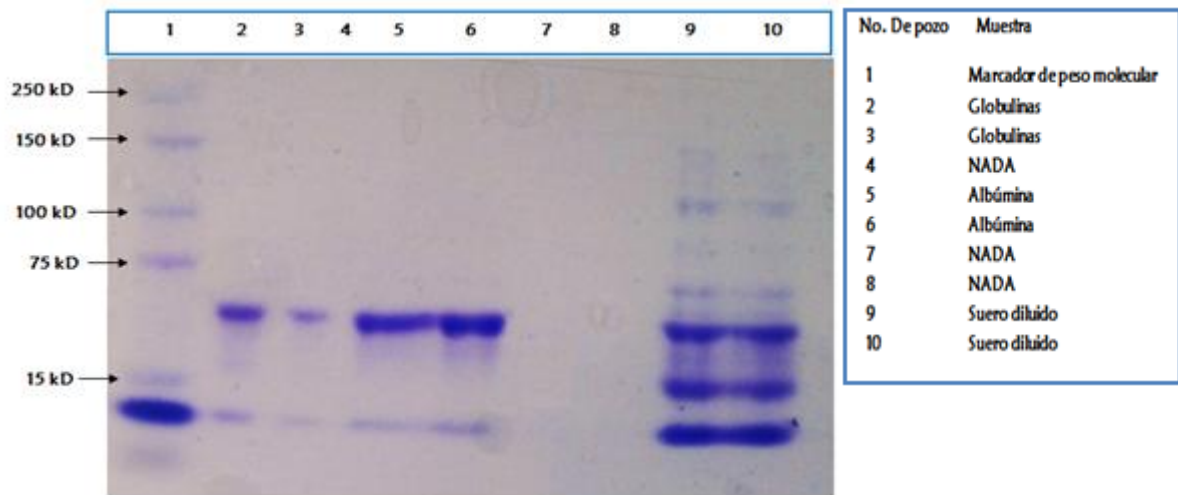


Fig. 24 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida, utilizando proteínas del suero: albúmina con peso molecular de 69kD y globulinas 140kD diluidas 1:20 y suero total diluido 1:1000.



7. Discusión

El manual de laboratorio de BCT I es una herramienta muy importante para los alumnos cuando se cursa este modulo, este laboratorio es el primer contacto que tienen los estudiantes de la carrera cuando comienzan a estudiar bioquímica, las prácticas que se establecen están muy relacionadas con un escenario real. En este laboratorio se ocupan equipos y técnicas que van a servir como base para los siguientes módulos porque proporcionaran al alumno habilidades que se requieren en las otras materias. Por estos motivos la actualización del manual es de gran importancia porque es un material indispensable que ayudará al estudiante a comprender los temas que se manejan en la teoría de una manera más fácil. Las prácticas que constituyen el manual tienen una estructura bien establecida que guiará al alumno paso a paso de lo que se realizará durante su clase, establece los objetivos que tiene al realizar esa práctica, los temas previos que deben de haberse consultado o estudiado para entender la práctica, contiene información teórica resumida con bibliografía actualizada sobre el tema, tiene una lista de material que se utilizará en la práctica, esto ayudará a realizar la práctica de una manera más ordenada y ahorrando tiempo, el método esta enumerado y contiene fotos reales de los procedimientos, también contiene un cuestionario para complementar los conocimientos adquiridos en la práctica y las referencias bibliográficas que pueden consultar para saber más sobre el tema y ampliar su conocimiento.

Una de las practicas que se actualizó fue la de microscopio óptico esta práctica es de gran relevancia porque este instrumento es utilizado en otras materias del plan de estudios de la carrera, en laboratorios de investigación, de diagnóstico, entre otros, este aparato necesitaba ser un práctica individual para que se le dé la importancia y la comprensión necesaria para su manejo, ya que si se aprende a manipularlo adecuadamente se obtienen buenos resultados. Muchos de los problemas que se enfrentan los estudiantes en semestres posteriores en materias donde utilizan el microscopio es que no saben manejarlo, tardan mucho tiempo en enfocar sus muestras, o no se saben los nombres ni las funciones de las partes del microscopio, precisamente porque el entrenamiento sobre el manejo de este instrumento no es efectivo, por eso en este protocolo se anexo un esquema del microscopio (Fig. 4) que se utiliza en este laboratorio indicando el nombre de cada una de sus partes y sus funciones (Cuadro 2) y también las indicaciones de cómo



se debe utilizar el microscopio desde su transporte al lugar de trabajo, el enfoque de las muestras, los materiales que se ocupan para su limpieza y la manera en que se debe de dar mantenimiento (Cuadro 3)⁴².

Esta práctica es muy completa y beneficiará a los alumnos para su aprendizaje porque los microscopios poseen en la actualidad una enorme importancia tanto en la ciencia, como en la industria a tal punto que en la Microbiología se estudian los microorganismos que solo son visibles a través del microscopio. En medicina es un importante avance, pues con él se pueden estudiar bacterias, virus que causan enfermedades y así estudiar y encontrar la medicina adecuada para su cura. Por otra parte puede estudiarse a los seres vivos y su composición: sus tejidos y células. Es utilizado en la microcirugía en operaciones que no podrían llevarse a cabo sin la ayuda de los microscopios como parte del instrumento necesario para los cirujanos. En la medicina forense, es el instrumento protagonista de esta área, se suelen tomar huellas, muestras de sangre, cabellos y otros elementos que son parte de la escena del crimen, y una vez en el laboratorio, los investigadores se ayudan de los microscopios para analizar estas evidencias con el fin de tener datos para inculpar a sospechosos. En la industria alimenticia los científicos usan los microscopios para estudiar la muerte de muchos cultivos donde las bacterias tienen mucho que ver. También se estudian la calidad de los alimentos, que estén en buen estado, que no presenten microorganismos que puedan dañar nuestra salud⁴³.

La continuación de la práctica de microscopio óptico es la de estructura celular, aquí se utiliza el microscopio y se le pide a los alumnos que consigan distintos tipos de muestras que contengan algún microorganismo para observar en el microscopio su estructura celular, por ejemplo de levaduras del pan como se observa en la Fig. 5, vegetales como las hojas de la planta elodea (Fig.6), protozoarios que se encuentran en el agua estancada (Fig.9), hongos que proliferan en alimentos descompuestos como en la Fig. 10. También se dan las bases para que los alumnos aprendan el modo en que se toma la muestra que se observará al microscopio y la forma en que se realizan las preparaciones en fresco (levaduras, muestras de plantas y hongos), estas preparaciones permiten valorar algunos elementos, como la movilidad que se observa en protozoarios, en el desplazamiento de cloroplastos (Fig. 6 y 9) de igual forma se utilizan en el



recuento de leucocitos, detección de parásitos y en la visualización de estructuras fúngicas⁴⁴.

En el método se describen los procedimientos las tinciones para observar otras estructuras celulares como bacterias, hongos, células de descamación, y células sanguíneas que requieren teñirse para identificarlas de una mejor manera. Las tinciones que se realizan son simples y diferenciales, en las simples se tiñen con azul de metileno o azul de algodón, como se muestra en la Fig. 7 y 8 que corresponden a las células del epitelio bucal en donde se distinguen sus núcleos y sus membranas celulares. En la Fig. 10 también se utilizó una tinción simple para observar las estructuras de hongos. En esta práctica se realizan tinciones que se ocupan en el área de microbiología como la tinción de Gram y en hematología y parasitología la tinción de Wright y Giemsa. Las tinciones microbiológicas permiten observar a los microorganismos en función de la capacidad de los mismos para retener, o no, determinados colorantes. En esta práctica se maneja la tinción de Gram (Fig. 11), esta tinción es de gran importancia y básica para el diagnóstico microbiológico; pertenece a las tinciones diferenciales que permiten distinguir a los microorganismos por alguna de sus características⁴⁴.

Otro tipo de tinción diferencial que se realiza es la de Wright o con Giemsa, que son las más utilizadas con frecuencia para frotis de sangre periférica o médula ósea, ambas contienen eosina y azul de metileno. El azul de metileno libre es básico y tiñe de azul los componentes ácidos como por ejemplo el RNA. La eosina libre es ácida y tiñe de rojo los componentes básicos, como la hemoglobina o los gránulos eosinófilos, los neutrófilos poseen gránulos citoplasmáticos que tienen pH neutro y admiten algunas características de ambas tinciones⁴⁵. La Fig. 12 muestra la tinción de células sanguíneas que se observan en la práctica de estructura celular, la tinción diferencial nos permite diferenciar a los distintos tipos de células que hay en la sangre, la importancia de realizar una buena tinción darán el éxito de observar la estructura celular de una manera más detallada, fina y clara.

Es importante señalar que en la observación de cada muestra se realiza con distintos aumentos del objetivo dependiendo del tamaño de la estructura celular que se vaya a observar. En esta práctica se agregó información de las estructuras celulares que comúnmente se encuentran en las muestras que los alumnos traen como ya se mencionaron, las fotos de las estructuras celulares que ilustran esta



práctica del manual muestran los resultados que se obtienen al realizar una buena técnica en la toma de las muestra, su tinción y el enfoque de la misma. Esto con la intención de estimular al alumno para que realice las técnicas de una manera eficiente y que obtenga resultados asertivos.

En el manual se abarcan temas de biología celular, por lo tanto es básico realizar una práctica que se relacione con el tema del ciclo celular. El ciclo celular es la base para la reproducción de los organismos. Su función no es solamente originar nuevas células sino asegurar que el proceso se realice en forma debida y con la regulación adecuada. El ciclo celular es de gran importancia para la célula ya que tiene como función la formación completa de una nueva célula, evitando en lo posible la creación de células con múltiples errores, lo cual le permite al organismo permanecer en un constante equilibrio, previniendo así aquellos desórdenes que puedan perjudicar su salud; de esta manera, todas las células están controladas por proteínas que no permiten que se presenten situaciones desastrosas para un ser vivo. La mitosis es un proceso en donde la célula madre reparte a la célula hija el material genético duplicado, a través de la segregación de los cromosomas. Se lleva a cabo en células somáticas de organismos eucariotes⁴⁶.

La mitosis es un tema muy importante que se debe de estudiar porque muchas de las técnicas de reproducción celular, biotecnologías y genéticas, tienen sus bases en la mitosis. Esta práctica se actualizó con información de bibliografía reciente. En la parte experimental de la práctica se utilizan células de cebolla porque en las plantas las raíces continúan creciendo mientras se mantienen en agua y nutrientes. Estas regiones de crecimiento sirven para estudiar el ciclo celular porque en cualquier momento se pueden encontrar células que están sufriendo mitosis, además que es fácil de conseguir y de darles tratamiento para obtener las células y observarlas al microscopio. La práctica se ilustró con fotos de distintas fases que se presentan en la mitosis (Fig. 13) se tomaron de muestras realizadas en el laboratorio, que fueron encontradas en preparaciones de células de cebolla teñidas con acetocarmín y observadas en distintos campos en el microscopio, en el cuadro 4 se observan las fases de la Mitosis.

Se realizó la implementación de una nueva práctica para el manual de BCT I que se titula Manejo de micropipetas, en esta práctica se le proporciona a los alumnos la información y los conocimientos necesarios para el uso correcto de la



micropipetas, el uso de este instrumento será habitual en las prácticas de este módulo ya que las micropipetas facilitan la medición de cantidades muy pequeñas que en algunas prácticas se requieren como en la de extracción, cuantificación de ADN y electroforesis de ADN y proteínas. Por estos motivos es importante que los alumnos aprendan a utilizarlas, además de que facilitará su trabajo durante el laboratorio. Otro punto importante de introducir este protocolo, es porque no todos los estudiantes saben manipular adecuadamente las micropipetas e incluso no saben cómo está conformada una micropipeta, por eso en la práctica se incluye un esquema que señala las partes de la micropipeta, el método se ilustra con fotos que indican paso a paso como se debe de medir y ajustar la cantidad de algún líquido o reactivo. También se mencionan las características, capacidades, y el código de colores que los fabricantes han adoptado en las micropipetas para facilitar el uso del tipo de punta adecuado según el volumen a dispensar y que en las de uso más general coincide con el color de las puntas utilizadas. Las micropipetas tienen un desgaste durante su uso, por lo cual necesitan de una calibración para saber si están midiendo correctamente los volúmenes a los que se ajusta⁴⁷.

En la parte experimental de la práctica se realiza la calibración de una micropipeta, la calibración es la comparación de un estándar de medición, o de un equipo, en este caso es la comparación del volumen controlado y el volumen medio, para detectar y cuantificar imprecisiones y reportarlas o eliminarlas mediante un ajuste. En este sentido, la calibración es la actividad de control de calidad más importante dentro de la medición, ya que establece la relación del valor medido por un equipo con un valor convencionalmente real, dando validez y trazabilidad a la medición⁴⁸.

Para evaluar las micropipetas se utilizan los parámetros de exactitud que nos indica una ausencia de error, por tanto, la exactitud de una medida o una serie de medidas de las micropipetas, nos expresa la cercanía al valor verdadero. El coeficiente de variación también se calcula, este valor nos indica que tan cercanos están los datos que se obtuvieron. En el Cuadro 5 están las fórmulas que se deben de utilizar para realizar los cálculos para obtener el porcentaje de exactitud y el coeficiente de variación. En los cálculos se utiliza un factor de corrección Z (es un número que ajusta los valores que se obtienen en la calibración dependiendo de las condiciones en que se realice y el líquido que se emplee, está asignado un valor en tablas), puede variar dependiendo de la temperatura, presión atmosférica



y líquido que se utilice para la calibración, en algunos catálogos de los distintos fabricantes de micropipetas vienen las tablas con distintos valores de Z que varían dependiendo de los datos mencionados⁴⁹.

En los resultados que se obtuvieron al calibrar algunas micropipetas del laboratorio de distintas capacidades se observa en el cuadro 6, que la exactitud y el coeficiente de variación, algunas de ellas están fuera de los rangos de tolerancia que se establecen en los catálogos de esta marca. Las especificaciones de las micropipetas de la marca PIPETMAN Classic son más rigurosas que las exigidas para cumplir con la norma ISO 8655. Se maneja que en las pipetas de menor capacidad el error sistemático para 1-10 μ L es de $\pm 0.025\mu\text{L}$, $\pm 0.100\mu\text{L}$, la de 2-20 μ L es de $\pm 0.10\mu\text{L}$, $\pm 0.20\mu\text{L}$, y para las de una capacidad mayor el rango de error permisible para una pipeta de 50-200 μ L $\pm 0.50\mu\text{L}$, $\pm 1.60\mu\text{L}$, 200-1000 μ L, ± 3.0 , ± 8.0 , 1000-5000 μ L, ± 12 , ± 30 ⁵⁰.

Con estos datos y observando los resultados de la calibración, los valores de las mediciones se encuentran fuera de las estimaciones indicadas, por ejemplo en la pipeta de 200-1000 μ L los datos de las mediciones están dentro de los rangos especificados pero esta pipeta no mide el volumen requerido por lo cual no tiene exactitud, y no está ajustada. Durante este procedimiento de calibración se pueden detectar los errores sistemáticos que son los que producen una desviación de las medidas, siempre en el mismo sentido, respecto al valor real o aceptado. Son debidos a fallas en el método de medida o a falta de calibración del instrumento, por lo general este tipo de error se puede corregir siempre y cuando se detecte. El error aleatorio son los que hacen que los resultados de un conjunto de medidas repetidas se dispersen al azar alrededor del valor medio, son debidas a la influencia de las variables incontroladas que siempre intervienen en el proceso de medida. No se pueden identificar fácilmente y por tanto es difícil corregirlos, pero se pueden disminuir⁵².

Este procedimiento es para verificar la calibración de las micropipetas para saber cómo se encuentra el instrumento de trabajo, la calibración de una micropipeta requiere de un equipo e instalaciones adecuadas, que mantengan las condiciones necesarias para realizar una calibración apropiada.



En el protocolo de extracción de ADN existen diferentes técnicas, aunque todas conservan el uso de los mismos principios y fundamentos. En la parte experimental de la práctica de extracción y purificación de ADN humano se ocupó el kit Wizard de Promega® que contiene todos los reactivos necesarios para la extracción de ADN. Con este kit se puede extraer ADN de distintos tejidos, de bacterias, plantas, insectos, sangre de humano y de ratón. La cantidad de sangre que se ocupó fue 3 mL, porque es la cantidad con la que el ADN precipita y se puede percibir fácilmente (Fig. 15) y el alumno lo podrá observar fácilmente al contrario que si ocuparan 300µL de sangre, que por lo general se utilizan en investigación, (aunque es más factible utilizar cantidades menores de sangre para que el kit de extracción rinda un poco más), pero la desventaja es que en cuestión de aprendizaje utilizar cantidades mayores se obtienen mejores resultados. Los reactivos que se utilizaron y las cantidades se describen en la Cuadro 7, en la cual también se mencionan qué función tienen en la extracción de ADN. Los reactivos que se manejan no son tóxicos, pero requieren de utilizarse con guantes para no hacer contaminaciones. El cloroformo y el fenol se ocupa en la mayoría de los protocolos de extracción, en este kit no contiene ninguno de los dos por lo que los alumnos no se exponen a agentes tóxicos. La importancia de la extracción y purificación del ADN es que permite identificar mutaciones, ver características propias de los tipos de ADN (Polimorfismo), para clonar (Genes específicos, fragmentos de cromosomas o individuos), aislar el afectado y compararlo con uno bueno, detectar en las muestras, la presencia de un largo espectro de agentes patogénicos, identificar resistencia microbiana, evaluar desordenes genéticos, neurodegenerativos, neoplásicos, inmunológicos, medicina forense para la identificación de personas, para hacer test de paternidad⁵³.

El objetivo principal en un experimento de extracción de ADN es obtener una preparación de buena calidad y en gran cantidad. La calidad se refiere a la posibilidad de almacenar el ADN por tiempo indefinido, manteniendo su estructura y propiedades y es la calidad del ADN el factor responsable de la reproducibilidad en experimentos posteriores. La cantidad, por su parte, es un concepto relativo que depende, entre otros, del número y estado de las células propias del tejido a estudiar. Por lo tanto, como regla general, un buen método de extracción debe mantener la integridad física y bioquímica del ADN e incrementar sus rangos de pureza y concentración⁵⁴.



Después de la práctica de extracción y purificación de ADN se realiza la de cuantificación del ADN, utilizando las muestras de ADN, esto con el fin de obtener la concentración y la pureza que tiene el ADN, la cuantificación se realizó en un biofotómetro, ocupando una dilución 1:40 con agua destilada, se probó previamente una dilución 1:20, sin embargo en algunos casos el equipo nos marca con cruces que hay un exceso de ADN y no es posible cuantificarlo. Además de indicarnos la concentración, este equipo nos da la absorbancia a 260 y 280 nm y la relación entre estas dos, lo que nos indica la pureza de la muestra de ADN. En el manual se agregaron las formulas del cuadro 8, para que los alumnos aprendan a obtener la concentración y la pureza, ya que si se ocupa un espectrofotómetro u otro equipo que no de las concentraciones directas, puedan obtenerla utilizando las absorbancias de sus muestras.

Los resultados de la cuantificación de las muestras que se purificaron se muestran en el Cuadro 9, 10 y 11, algunas de las muestras cuando se extrajeron no se les agrego RNasa, para observar si había alguna variación en los resultados, pero las muestras se comportaron igual. En promedio la pureza de las muestras se mantiene dentro del rango de 1.8 y 2.0 que indican que si se obtuvo el ADN puro, en el caso de una relación menor a 1.8 indica la presencia de proteínas u otros contaminantes, y si es mayor de 2 indica que la muestra puede estar contaminada con algún resto de reactivo.

En esta práctica se utiliza el biofotómetro, pero también se puede realizar empleando un espectrofotómetro, el cual detecta la radiación emitida por las bases nitrogenadas presentes en el ADN luego de ser excitadas con luz de 260 nm. De igual manera se puede emplear un fluorómetro, el cual cuantifica la emisión de energía de los compuestos químicos (fluorocromos) que se intercalan dentro del ADN. En cuanto a la concentración de las muestras estas varían algunas muy altas y otras bajas, por ejemplo en la muestra 8 la concentración de la dilución 1:20, es el doble de la dilución de 1:40, y esto es correcto, además de que la pureza se mantiene en 1.8 en las dos diluciones. Pero en el caso de la muestra 7 la dilución 1:20 y 1:40 son muy distintas esto probablemente se deba a que el ADN no está disuelto homogéneamente⁵⁵.

El ADN que ha sido extraído de un tejido debe ser cuantificado y su calidad verificada. El método más empleado para la determinación simultánea de estas



características es la electroforesis de agarosa que es un polisacárido extraído de algas marinas que tiene la propiedad de mantenerse en estado sólido a temperatura ambiente pero que a altas temperaturas se torna líquida. Esta característica permite una fácil preparación de una matriz porosa para ser usada en electroforesis: simplemente se pesa la cantidad de agarosa requerida, se disuelve en un amortiguador adecuado, se calienta y se deposita sobre un molde particular. Una ventaja que posee la agarosa sobre la acrilamida es que no es un compuesto tóxico y además permite el análisis de ácidos nucleicos con pesos moleculares muy variados. Sin embargo, su poder de resolución es menor que el de los geles de poliacrilamida⁵⁴.

Esta técnica consiste en la migración de partículas cargadas sometidas a la influencia de un campo eléctrico, de tal forma que las moléculas con carga positiva migran al cátodo (electrodo con carga negativa) y las moléculas con carga negativa migran al ánodo (electrodo con carga positiva). La velocidad de este desplazamiento se encuentra influenciada por las características de la biomoléculas, la intensidad del campo eléctrico y del soporte⁵¹.

La detección visual del ADN se lleva a cabo usualmente utilizando una sustancia sensible a la luz ultravioleta como es el bromuro de etidio. Este compuesto es un agente carcinogénico que actúa intercalándose dentro de la doble hélice del ADN. Por este motivo se cambio el reactivo de bromuro de etidio por un compuesto nombrado como Midori Green, este producto de tinción para ADN fue introducido como una alternativa para el bromuro de etidio. Sus principales características son; no es carcinogénico y que es significativamente menos mutagénico en comparación con el citado Bromuro de Etidio, pero además mantiene la misma sensibilidad a un precio bastante más competitivo. La gran aceptación que tuvo por parte de la comunidad científica en todo el mundo llevó a sus creadores a aumentar su portafolio de opciones para ofrecer un colorante para cualquier electroforesis de moléculas de ADN y ARN⁴⁰.

En el protocolo de electroforesis de ADN, se realizaron varios geles para estandarizar las condiciones en donde se obtuvieran bandas de ADN bien definidas además de un buen desplazamiento. Con los geles que se presentan en los resultados se puede corroborar los datos obtenidos en la práctica de cuantificación como es la concentración y la pureza de las muestras extraídas, las diluciones que



se ocuparon es 1:20 y 1:40, se escogió la segunda porque en algunos casos las muestras estaban muy concentradas y al medir la concentración con el biofotómetro no daba lectura. En el gel de la Fig. 21, se observa cualitativamente que las bandas más gruesas e intensas coinciden que hay una concentración alta de ADN como por ejemplo en el pozo 7 en donde la muestra está concentrada, por el contrario, en las bandas más delgadas y un poco menos intensas coinciden con las muestras de menor concentración de ADN y las que están diluidas por ejemplo en el pozo 8 donde es la misma muestra. En el gel se observa que las bandas están bien definidas lo que indica que nuestro ADN es de buena calidad y no está degradado, como en la muestra de ADN de trigo que se observa en el pozo 18. Las muestras de ADN obtenidas tienen un peso molecular muy alto, esto se observa al comparar las muestras con el marcador de peso molecular de 100 pares de bases.

La instrumentación de la práctica de electroforesis de proteínas requirió la preparación de reactivos que se utilizan en esta práctica, el tipo de electroforesis que se desarrolla en este protocolo es de tipo vertical discontinua, como soporte se pueden utilizar diferentes medios para evitar perturbaciones mecánicas y los efectos de las corrientes de convección en la separación. Se pueden utilizar papel, acetato de celulosa, geles de almidón, de agarosa o de poliacrilamida que son los que se utilizaron en esta práctica⁵⁷.

Los geles de poliacrilamida son el resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida. Controlando la concentración de ambas se obtienen geles de diferente grado de reticulación (diferente diámetro de poro). Uno de los métodos de electroforesis más comúnmente aplicado para proteínas es el que emplea geles de poliacrilamida (PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis) en presencia del detergente SDS. Esta técnica es conocida como SDS-PAGE, para ello se prepara un gel en placa vertical⁵⁷.

En la preparación del gel, la polimerización de los monómeros de acrilamida produce cadenas lineales. Al incluir bisacrilamida, ésta da lugar a puntos de ramificación en el polímero lo que permite formar una matriz tridimensional dando lugar al gel de poliacrilamida. El tamaño de los huecos o poros que forma la redícula del polímero depende de la concentración de acrilamida y del grado de entrecruzamiento (es decir, de la proporción de bisacrilamida con respecto al



total). Así, variando la concentración de acrilamida y bisacrilamida en la preparación del gel se consiguen distintos grados de porosidad y, por tanto, distintos intervalos de separación de proteínas. También se añade un buffer (comúnmente Tris-HCl), además se añade un agente iniciador de la polimerización como el persulfato de amonio, que al disolverse en agua genera radicales libres que transforman la acrilamida en radical libre y se inicia la polimerización. También se añade al medio TEMED (ácido etildiaminotetraacético) como catalizador porque puede existir en forma de radical libre⁵⁷.

Las muestras proteicas se tratan, previamente a su fraccionamiento con SDS a 100 °C. Como consecuencia de este tratamiento y de la presencia posterior de SDS durante toda la separación (tanto en el amortiguador de electroforesis como en la composición del gel), las proteínas se mantienen desnaturalizadas. El SDS tiene la propiedad de unirse a las cadenas polipeptídicas en una proporción masa: masa constante (1.4 g SDS/g de proteína), de modo que en el complejo SDS-proteína la carga de la proteína queda enmascarada por la de las múltiples moléculas de SDS y ésta es proporcional al tamaño (número de aminoácidos).

Esta electroforesis es discontinua pues utiliza dos geles: Un gel concentrador con bajo grado de reticulación y pH 6.8 (gel acumulador o "stacking gel"). Un gel separador con grado mayor con valores entre 6% y 15%, pudiéndose también utilizar gradientes de concentración de acrilamida (gel separador). En la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, la separación de proteínas se hace en función de la masa molecular. Tanto es así que la representación del logaritmo de la masa molecular frente a la distancia migrada obedece a una línea recta para gran número de proteínas. Para que esta dependencia sea correcta es preciso romper los puentes disulfuro intra e intercatenarios, para lo cual es frecuente añadir durante la preparación de la muestra un agente reductor, generalmente 2-mercaptoetanol. De este modo, la masa molecular observada corresponde a la de cada subunidad de una proteína, no a la proteína completa, al existir una relación lineal⁵⁸.

Para aplicar la muestra al gel, se le suele añadir un agente que la haga más densa, generalmente glicerina o sacarosa. Además, para seguir el avance de la separación, se añade un colorante como azul de bromofenol, que sirve como referencia (tracking dye). Éste tiene una movilidad mayor que la de cualquier



macromolécula y por tanto, si se aplica corriente hasta que el colorante esté a poca distancia del extremo inferior del gel, se tiene la seguridad de que ninguna macromolécula se ha salido del gel por avance excesivo⁵⁸.

La prueba de electroforesis de proteínas séricas (EFPS, o SPEP por sus siglas en inglés) mide proteínas específicas en la sangre para ayudar a identificar algunas enfermedades. Las proteínas son sustancias formadas por componentes básicos más pequeños llamados aminoácidos, tienen una carga eléctrica positiva o negativa, y se mueven en un líquido cuando se colocan en un campo eléctrico. La electroforesis de proteínas séricas usa un campo eléctrico para separar las proteínas en el suero sanguíneo en grupos de tamaño, forma y carga similares.

El suero sanguíneo contiene dos grupos principales de proteínas: albúmina y globulinas. Tanto la albúmina como las globulinas transportan sustancias por el torrente sanguíneo. Con la electroforesis de proteínas, estos dos grupos se pueden separar en cinco grupos más pequeños (fracciones): Albúmina, Alfa-1 globulina, Alfa-2 globulina, Beta globulina y Gamma globulina. Estas proteínas también son llamadas anticuerpos. Ayudan a prevenir y combatir infecciones. Las gamma globulinas se adhieren a sustancias extrañas, como bacterias o virus, haciendo que sean destruidas por el sistema inmunitario⁵¹.

Cada uno de estos cinco grupos de proteínas se mueve a una velocidad diferente en un campo eléctrico y juntos forman un patrón específico. Este patrón ayuda a identificar algunas enfermedades.

Esta práctica es un sistema vertical y es otra forma de realizar una electroforesis, el fundamento no cambia comparándola con la electroforesis de ADN, pero cambia el material biológico que se utiliza, el soporte, la forma en que se efectúa. Esto beneficiará a los alumnos aumentando sus conocimientos y habilidades en cuanto al uso de técnicas y equipos de biología molecular.



8. Conclusiones

- Se actualizó el manual de laboratorio de Bioquímica Celular y de los tejidos I modificando la información de las prácticas que se establecieron y se integraron nuevas prácticas de biología celular y molecular.
- Las prácticas de Microscopia óptica y Estructura celular se redactaron como protocolos independientes pero en la parte experimental se integran las dos prácticas como una sola.
- El protocolo de Manejo de micropipetas se incorporó al manual de prácticas con fotos de los procedimientos del uso adecuado.
- Las prácticas de Extracción y purificación, cuantificación y electroforesis de ADN humano, son protocolos distintos pero tienen un seguimiento en cuanto a la parte experimental.
- Se instrumentó la práctica de Electroforesis de proteínas obteniendo buenos resultados en su realización.
- Todas las prácticas fueron validadas de forma cuantitativa y probadas con el grupo de BCT I y con profesores con la finalidad de corroborar su funcionamiento con los procedimientos descritos en cada una de ellas.
- La actualización e integración de nuevas prácticas del manual de laboratorio de BCT I tienen gran importancia por que aportará conocimientos a los alumnos y técnicas que se utilizan en módulos posteriores y en el campo laboral.



9. Propuestas

- Proveer continuamente el laboratorio BCT I con material y equipo que se utiliza de biología molecular y celular.
- Publicar el manual de laboratorio a color para que los alumnos perciban el procedimiento de cada práctica de una manera más clara, comprensible y agradable para ellos.
- Procurar el mantenimiento a las micropipetas que se utilizan en el laboratorio de BCT I para obtener resultados más precisos.
- Complementar las prácticas con procedimientos normalizados del manejo de los equipos (biofotómetro, espectrofotómetro, cámara de electroforesis) que se utilizan en las prácticas para disminuir los errores en cuanto a su uso, y evitar que se descompongan.



10. Referencias

1. Voet D, Voet J. Pratt C. Fundamentos de Bioquímica: la vida a nivel molecular. 2ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.
2. Montuenga L, Esteban F, González A. Histología y Biología Celular. España: Elsevier; 2009.
3. Peretó J, Sendra R, Pamblanco M, Baño C. Fundamento de Bioquímica. España: Universidad Valencia; 2011.
4. Rivera J, Pertierra A. Fundamentos de Bioquímica Estructural. 2ª ed. Madrid: Tébar; 2006.
5. Baynes J, Dominiczak M. Bioquímica Médica. 3ª ed. España: Elsevier; 2011.
6. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J. Introducción a la Biología Celular. 3ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2011.
7. Freifelder D. Sistemas y métodos en biología molecular. Zaragoza: Acribia; 1988.
8. Remington A. Farmacia. 20ª ed. Buenos Aires. Médica Panamericana; 2003.
9. Dorcas J, Orengo F. Fundamentos de Biología Molecular. Barcelona: UOC; 2013.
10. Karp G. Biología celular y molecular conceptos y experimentos. 7ª ed. México: Mc Graw Hill; 2014.
11. Peña J, Gregorio O, Barrera B. Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. Educ. quím [revista en la Internet]. 2013 Abr [citado 2014 Jun 02]; 24(2): 237-246. Disponible en:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-893X2013000200009&lng=es.
12. Bolosover R, Jeremy S, Hyams E. Biología molecular. España: Acribia; 2008.
13. Jiménez L. Conocimientos Fundamentales de Biología. México: Pearson; 2006.
14. Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez M, Fraile B. Citología e histología vegetal y animal. 4ª ed. España: Mc Graw-Hill; 2007.
15. Casado E, Arias T, Barquero P, Paredes A. Operaciones básicas de laboratorio. España: Parainfo; 2012.
16. Cediell J, Cárdenas M, García A, Chuairé L, Payán C. Manual de Histología, tejidos fundamentales. Colombia: Universidad del Rosario; 2009.
17. García V. Introducción a la Microbiología. 2ª ed. Costa Rica: EUNED; 2004.
18. Pessarge E. Genética texto y atlas. 3ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2010.



19. Nájera J, Gómez P, Rivas M. Biología General. Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia; 2002.
20. Lodish H. Biología celular y molecular. 5ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006.
21. Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L, Levitus G. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Argentina. INTA; 2010.
22. Catálogo de Productos de Manejo de líquidos. LT800507/A. USA: Gilson S.A.S.; 2011.
23. González M. Técnicas de laboratorio en biología celular y molecular. México: Facultad de ciencias UNAM AGT editor S.A.; 2008.
24. Concepción J, Puerta B. Prácticas de biología molecular. Bogotá: Universidad Javeriana; 2005.
25. Nailini S, Chandar V. Biología molecular y celular. México: Wolters Kluwer Health; 2010.
26. Koolman J. Bioquímica: texto y atlas. 3ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2004.
27. Fernández A, Aguilera Y, Morales I Alonso E. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. Rev Cubana Farm. 2002; 36(1):28-34.
28. Boris D, Rojas F, Guerrero I, Roa L, Rodríguez L, Soto M. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. Santiago: Instituto de Salud Publica; 2010.
29. Ruisánchez I, r Trullols E, y Rius X. Validación de Métodos Analíticos Cualitativos. Grupo de Quimiometría y Cualimetría. Departamento de Química Analítica y Química. Tarragona; Orgánica. Universitat Rovira i Virgili. Pl. Imperial: Tárraco; 2006.
30. Sánchez J, Tejeda M, Wolfhard K, Mora G, Marroquín S, Hernández A. Validación de métodos analíticos no cuantitativos. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 2010; 41(1):15-24.
31. Barlandas N, Quintana S, Ramírez I. Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. México: CENAM; 2008.
32. Guardado J, Mercader F, EURACHEM. 2ª ed. Métodos Analíticos Adecuados a su propósito. México: CENAM; 2005.
33. Rodríguez J. Como elaborar y usar los manuales administrativos. México: ECAFSA; 2000.



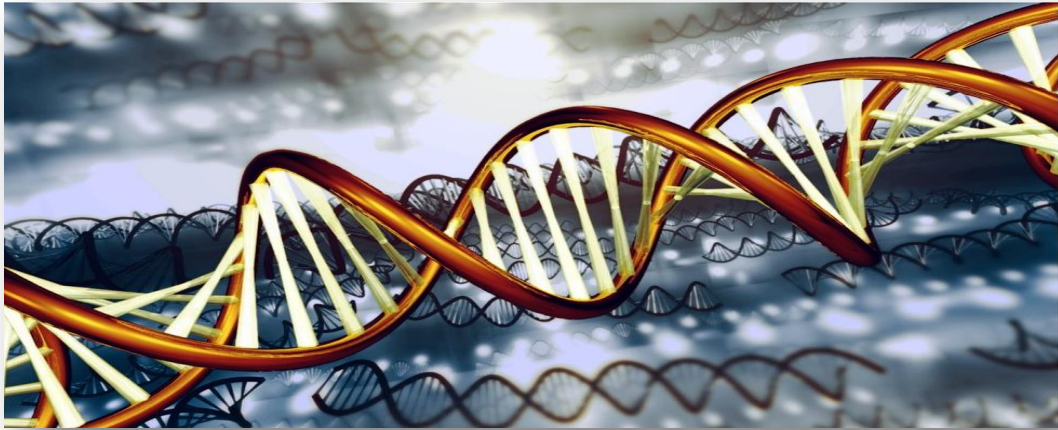
34. Álvarez M. Manual para elaborar Manuales de Políticas y Procedimientos. México: Panorama; 1997.
35. Pessoa A. El nuevo paradigma de la didáctica de las ciencias experimentales. Pensamiento Educativo. 2002;30(1):295-313.
36. Zabala V. La práctica educativa. Cómo enseñar. México: Graó; 2000.
37. Zabalza, M. y Marcelo, C. Evaluación de prácticas. Análisis de los procesos de formación práctica. Sevilla: GID; 1993.
38. Pozo J. Adquisición de conocimientos. Madrid: Morata; 2003.
39. Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C. Pre-PCR Processing Strategies to Generate PCR-Compatible Samples. Molecular Biotechnology. 2004; 26(1): 133-146.
40. Zabala J. Manual de técnicas básicas de biología molecular. México: Universidad Autónoma de Yucatán; 2005.
41. Boom R, Sol C, Salimans M, Jansen C, Wertheim-van J, Noordaa V. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of Clinical Microbiology. 1990; 28(3):495-503.
42. Wayne M, Becker J, Kleinsmith J. El mundo de la célula. 6ª ed. Madrid: Pearson; 2007.
43. Rubio F, Espinosa B, Carrasco M. Fundamentos y técnicas de análisis hematológico y citológico. España: Ediciones parainfo S.A.; 2004.
44. Zaragoza R. Microbiología aplicada al paciente crítico. Madrid: Panamericana; 2007.
45. Lomanto L. Cala O, El ciclo celular. Medicina UNAM : México Vol. 6 Número 16 2003.
46. Lincoln T. Fisiología vegetal. 3ª ed. USA: Publicaciones de las Universitat Jaume; 2006.
47. Rodak B, Carr H. Atlas de hematología clínica. 3ª ed. Buenos aires: Panamericana; 2010.
48. Harris D. Análisis Químico Cuantitativo. 3ª ed. España: Reverté; 2007.
49. Instrucciones de Trabajo Estándar para Pipetas. AESOP13640. Germany: Eppendorf AG; 2013.
50. Catálogo de Productos de Manejo de líquidos. LT800507/A. USA: Gilson S.A.S.; 2011.
51. Roca P, Oliver J, Rodríguez A. Bioquímica técnicas y métodos. España: Hélice; 2003.



52. Martínez J. Narros A. Experimentación en química general. España: Parainfo; 2009.
53. Oliva R, Ballesta F, Oriola J, Clària J. Genética Médica. 3ª ed. Barcelona: Universitat Barcelona, 2004.
54. Salavarieta R. Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. Laboratorio de Marcadores Moleculares, Área de Fisiología y Mejoramiento. 2002; 23(3): 9-17.
55. Wizard Genomic DNA Purification Kit Quick Protocol. 9FB022. USA: Promega Corporation; 2010.
56. Nippon Genetics Europe GmbH. Midori Green Advance DNA Stain. MG04. <http://www.nippongenetics.eu/dnarna-electrophoresis/dna-stains/midori-green-advance/>
57. García H. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Laboratorios Beterá. 2000; 1 (2):31-41
58. Segal C, Lule G. Manual de Prácticas de biología molecular de la célula I. México: Publidisa; 2005.



Extracción y purificación de ADN Humano



“Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las estrellas. Ahora sabemos que está en nuestros genes”

James Watson



Objetivos

- Analizar el fundamento de la extracción de ADN.
- Extraer el ADN de una muestra de sangre humana utilizando el equipo de reactivos "Wizard® Genomic DNA Purification".
- Revisar las distintas aplicaciones que tiene la obtención de ADN.

Antecedentes Académicos

- Función del ADN.
- Estructura del ADN.
- Propiedades fisicoquímicas del ADN.
- Métodos de extracción y purificación del ADN.

Introducción

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es un polímero que contiene varios millones de pares de nucleótidos organizados siguiendo una secuencia lineal, en el humano consta de aproximadamente 3000 millones, en los que se encuentra la información genética. La molécula de ADN presenta diferentes grados de compactación de la cromatina durante la interface del ciclo celular. Las secuencias codificantes del ADN se conocen con el nombre de genes que son transcripcionalmente activas y se encuentran en la cromatina menos condensada, eurocromatina, mientras que la cromatina altamente condensada, heterocromatina, es en apariencia genéticamente inactiva. El ADN se duplica de forma semi-conservativa, durante el periodo S del ciclo celular, replicando la eurocromatina tempranamente y la heterocromatina más tarde. El nucléolo es una estructura basófila que se encuentra en el núcleo de eucariontes que corresponde al sitio donde se expresan los genes que codifican para los ARN ribosomales. La molécula de ADN se forma por enlace covalente de miles de desoxinucleótidos. El desoxinucleótido, o unidad estructural del ADN, contienen un ácido fosfórico, un azúcar de cinco átomos de carbono o pentosa y una base nitrogenada.



El ADN contiene cuatro bases nitrogenadas: adenina (A) y guanina (G), que derivan de la purina y citosina (C) y timina (T) que derivan de la pirimidina (Fig.1). El enlace pentosa que es una desoxirribosa y una base nitrogenada forma una molécula denominada desoxinucleósido. La unión de un ácido fosfórico a esta molécula forma el desoxinucleótido.

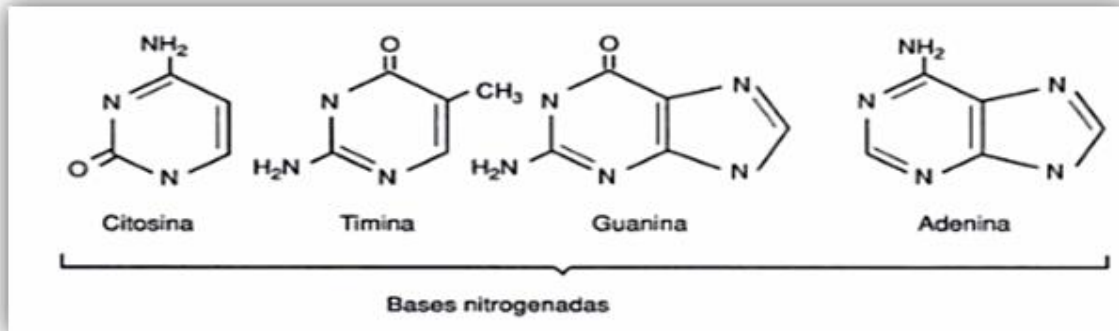


Fig. 1 Estructura química de las cuatro bases nitrogenadas que componen el ADN humano. Imagen tomada de Jiménez L. Merchant H. (2003). *Biología celular y molecular*.

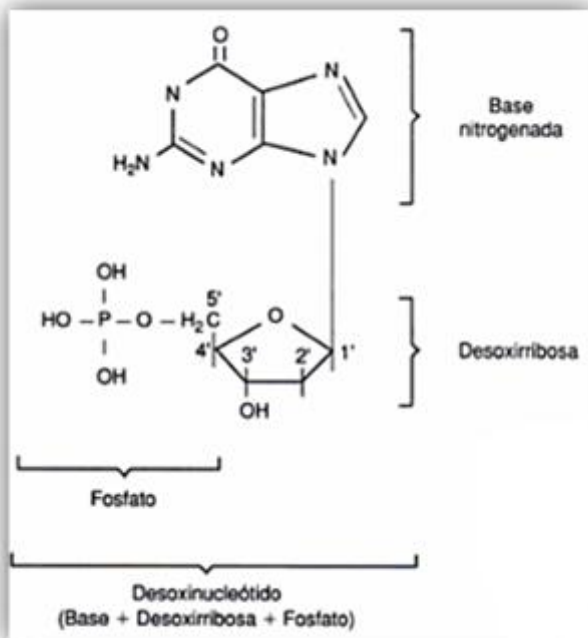


Fig. 2 Esquema del enlace químico que forma el polímero lineal de un desoxinucleótido. Imagen tomada de Jiménez L. Merchant H. (2003). *Biología celular y molecular*.

Los desoxinucleótidos se unen para formar el polímero lineal, en el cual el grupo fosfato en posición 5' de la desoxirribosa se une por un enlace éster con el hidroxilo 3' de la desoxirribosa del desoxinucleótido vecino, y así sucesivamente (Fig. 2). El polímero forma una hebra donde se alternan una desoxirribosa y un fosfato, mientras que las bases se unen perpendicularmente a está (Fig.3). La proporción relativa de cada una de las bases del ADN, así como el orden o secuencia en que se encuentran, varía en los organismos, ya que la secuencia de bases es específica para cada uno y contiene la información genética que lo define.



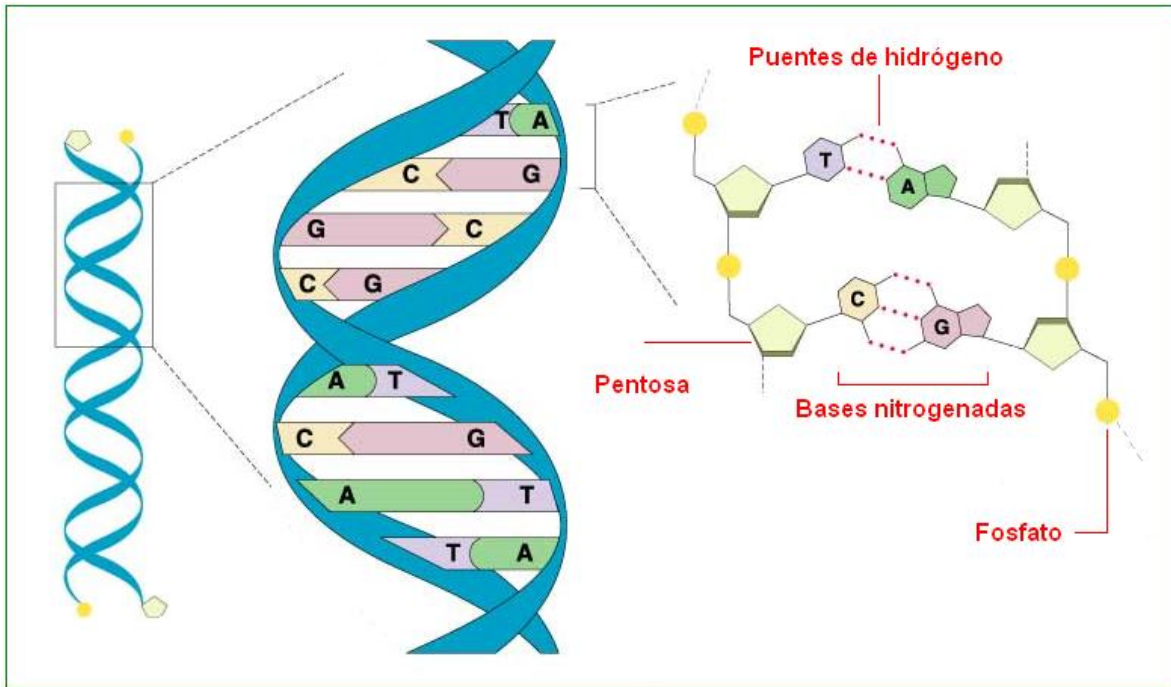


Fig. 3 Estructura secundaria del ADN. Imagen de Horacio N. Nachon Ciccirella, *Los ácidos nucleicos*, *Redes sociales educativas*, <http://eduredes.ning.com/profiles/blogs/los-acidos-nucleicos>

Extracción y purificación

El primer paso en cualquier análisis genético suele ser el aislamiento del material genético. Los métodos de extracción del ADN se remontan a 1869 cuando Miescher consiguió extraer del espermatozoide de salmón y de los leucocitos humanos lo que entonces denominó nucleína y que hoy es el ADN. Para aislar el ADN a partir de una muestra de sangre se procede a lisar los eritrocitos con choque hipotónico y en presencia de detergentes para eliminar el exceso de hemoglobina. Después se tratan los núcleos de los leucocitos con proteinasa K y se procede a la purificación del ADN a través de la extracción clorofórmica de las proteínas y precipitación del ADN con etanol.

El ADN extraído de esta forma es apto para la mayoría de los análisis moleculares. A parte de este método existen numerosas variantes metodológicas para purificar el ADN dependiendo de los distintos materiales de partida (sangre, tejidos, bacterias, levaduras) basados en solubilidad o precipitación diferencial de ADN o basados en su afinidad a distintos tipos de matrices. Normalmente el ADN se extrae a partir de muestras que contienen células nucleadas, ya que en el núcleo es donde está el ADN genómico. No obstante en algunos métodos se analiza el ADN circulante presente en el plasma, que es un ADN degradado en forma de fragmentos del tamaño del mononucleosoma, y que procede de los fenómenos apoptóticos que ocurren en distintos tejidos del organismo.



Material

- Tubos Vacutainer® con EDTA de 6 mL (tapón lila)
- Soporte de aguja
- Aguja para toma múltiple 21G x 38mm
- Torundas con alcohol
- Ligadura
- Guantes de látex
- Microtubos de 1.5 mL
- Tubos de 15 mL
- Equipo de reactivos " Wizard® Genomic DNA Purification"
- Micropipetas p1000 y p5000
- Puntas nuevas para las micropipetas
- Recipiente para baño de agua
- Isopropanol
- Etanol al 70%
- Termómetro
- Centrífuga
- Vortex
- Parrilla de calentamiento



Reactivos del Kit Wizard Genomic DNA

- Solución de lisis celular (Cell Lysis Solution).
- Solución de lisis de núcleos (Nuclei Lysis Solution).
- Solución de precipitación de proteínas (Protein Precipitation Solution).
- Solución RNasa (RNase Solution)
- Solución de rehidratación de ADN (DNA Rehydration Solution)



Extracción de ADN genómico a partir de un volumen de 3 ml de una muestra de sangre humana.

1. Realizar la técnica de extracción sanguínea de un integrante del equipo (Fig. 4) para obtener una muestra en un tubo que contenga anticoagulante EDTA (tapón color lila).



Fig. 4 Extracción de la muestra sanguínea

2. Utilizar un volumen de 3 mL de la sangre previamente mezclada (Fig. 5) y añadirla a un tubo de 15mL que contiene 9 mL de solución de lisis celular (Fig. 6). Mezclar de 5 a 6 veces.

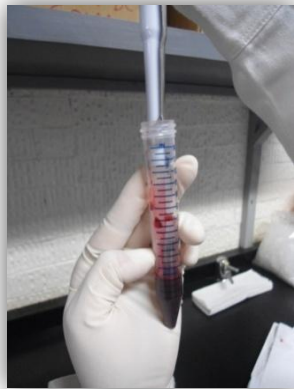


Fig. 5 Medición del volumen de la muestra de sangre

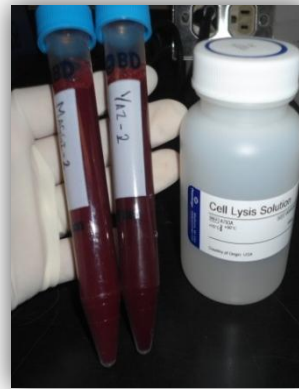


Fig.6 Lisis de eritrocitos



3. Incubar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente (invertir de 2-3 veces durante la incubación) para lisar las células rojas de la sangre y centrifugar a 3500 rpm (2,000 × g) durante 10 minutos a temperatura ambiente (Fig. 7).

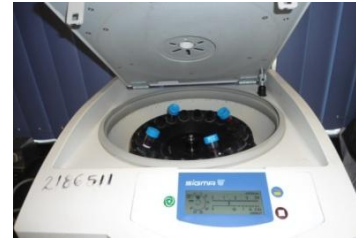


Fig. 7 Centrifugación de las muestras

4. Retirar y desechar la mayor cantidad posible de sobrenadante sin perturbar el sedimento visible blanco. Aproximadamente de 50–100µL de líquido residual deben permanecer en el tubo (Fig. 8). Si la pastilla parece contener sólo las células rojas de la sangre, añadir una alícuota adicional (1mL) de solución de lisis celular después de retirar el sobrenadante por encima del sedimento de células, y luego repetir los pasos 3 y 4.

Nota: para obtener la lisis celular eficiente, resuspender completamente las células blancas de la sangre.

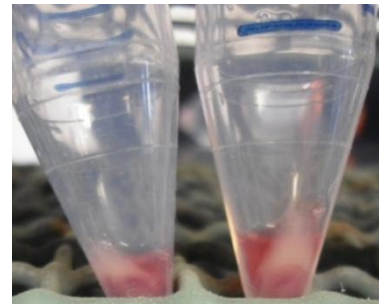


Fig. 8 Botón de células blancas con residuos de hemoglobina

5. Agitar el tubo vigorosamente en el vortex hasta que las células blancas de la sangre se vuelven a suspender (10-15 segundos) (Fig. 9).



Fig. 9 Agitación de la muestra en el vortex



6. Agregar 3 mL de solución de lisis de núcleos al tubo que contiene las células resuspendidas. Pipetear la solución 5-6 veces para lisar las células blancas. La solución se observará muy viscosa (Fig. 10).



Fig. 10 Formación de la solución viscosa

Si algunos grumos de células son visibles después de la mezcla, se debe de incubar la solución a 37 °C hasta que se rompan los grumos. Si éstos todavía son visibles después de 1 hora, añadir 1 mL de solución de lisis de núcleos y repetir la incubación (Fig. 11).

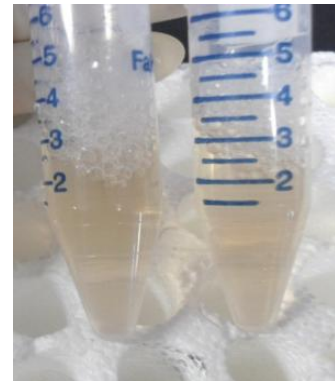


Fig. 11 Soluciones sin grumos de células

7. **OPCIONAL.** Agregar 15 μ L solución RNasa, al lisado nuclear, y mezclar la muestra invirtiendo el tubo 2-5 veces. Incubar la mezcla a 37 °C durante 15 minutos (Fig. 12), y después enfriar a temperatura ambiente.



Fig. 12 Incubación de las muestras cuando se le agrega RNasa



8. Añadir 1 mL de la solución de precipitación de proteína (Fig.13) al lisado nuclear y agitar vigorosamente durante 10 a 20 segundos. Pequeños grupos de la proteína pueden ser visibles después de agitación (Fig. 14). NOTA: Si se adicionó un exceso de solución de lisis de núcleos en el paso 6, deberá adicionar 1.3 mL de solución de precipitación de proteínas.



Fig. 13 Solución de precipitación de proteínas

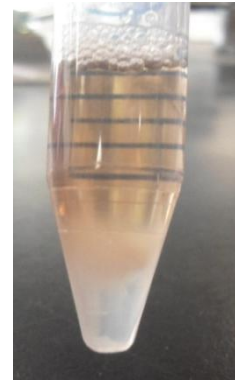


Fig. 14 Precipitación de proteínas

9. Centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Deberá observarse un color marrón oscuro del botón de proteínas (Fig. 15).



Fig. 15 Botón de proteínas

10. Transferir el sobrenadante a un tubo de centrífuga de 15 mL que contiene 3 mL de Isopropanol a temperatura ambiente.

11. Mezclar suavemente la solución por inversión hasta observar las hebras de color blanco que corresponden al ADN (Fig. 16).

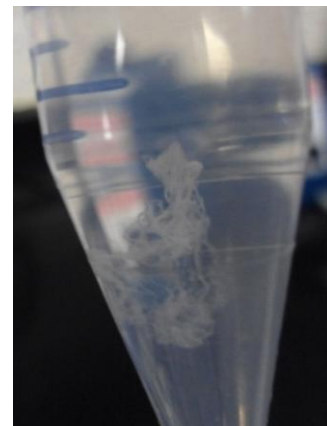


Fig. 16 ADN



12. Centrifugar a 3500 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. El ADN será visible como un pequeño precipitado blanco (Fig. 17).

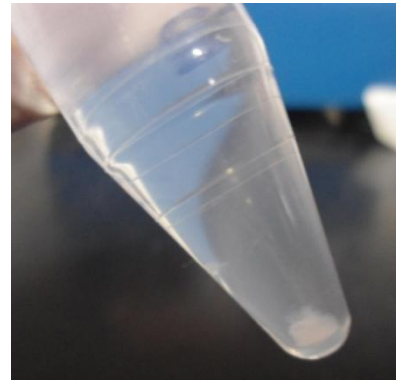


Fig. 17 Precipitado de ADN

13. Decantar el sobrenadante, y añadir 3 mL de etanol al 70% a temperatura ambiente (Fig. 18). Invertir suavemente el tubo varias veces para lavar el sedimento de ADN y los lados del tubo en donde está el ADN. Centrifugar como en el paso 12.



Fig. 18. Adición del Etanol a temperatura ambiente

14. Aspirar cuidadosamente el etanol utilizando una pipeta Pasteur. NOTA: El sedimento de ADN no es compacto en este punto por lo que se debe tener cuidado para evitar la aspiración del botón con la pipeta. Invertir el tubo sobre un pedazo de papel adsorbente y dejar secar al aire durante 10 minutos (Fig. 19).

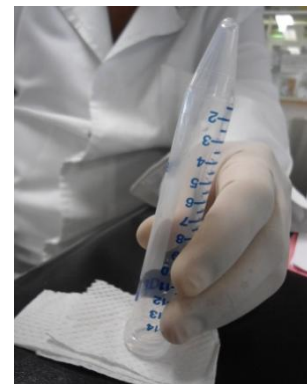
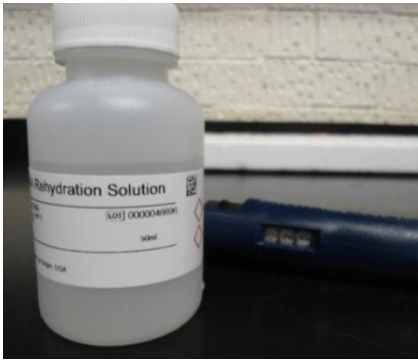


Fig. 19 Secado del ADN





15. Añadir 250 μ L de la solución de rehidratación de ADN (Fig. 20) al tubo y rehidratar el ADN mediante incubación a 65 ° C durante 1 hora. Periódicamente mezclar la solución golpeando suavemente el tubo. Almacenar el ADN a 2-8 °C hasta su uso. Alternativamente se puede rehidratar el ADN mediante la incubación de la solución durante la noche a temperatura ambiente o a 4 ° C.

Fig. 20 Solución de rehidratación de ADN

Resultados

Describir los cambios físicos que se presentan en cada uno de los pasos de la extracción y purificación de DNA..

Cuestionario

1. ¿Qué función tiene la RNasa?
2. ¿Para qué sirve cada uno de los reactivos que se ocupan en la extracción de ADN?
3. ¿Por qué se recomienda que el material que se ocupa debe de ser estéril?
4. ¿De qué otro tipo de células se podría obtener ADN?



Referencias

- González-Morán MG. Técnicas de Laboratorio en biología celular y molecular. México: Facultad de ciencias, UNAM, AGT Editor S.A.; 2008.
- Jiménez L, Merchant H. Biología celular y molecular. México: Pearson Educación; 2003.
- Virgili O. El Genoma humano. Nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento. Barcelona: Publicacions I Edicions de la Universitat de Barcelona; 2006.
- Voet D, Voet JG, Pratt ChW. Fundamentos de Bioquímica: La vida a nivel molecular. 2ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007.
- Wizard Genomic DNA Purification Kit Quick Protocol. 9FB022. USA: Promega Corporation; 2010.
- Technical Manual. "Wizard® Genomic DNA Purification Kit". TM050. USA: Promega Corporation; 2010.



Cuantificación de ADN humano



“Sin duda, la doble hélice es una molécula excepcional”

Francis Crick



Objetivos

- Cuantificar el ADN de una muestra problema, por el método espectrofotométrico, utilizando un biofotómetro.
- Determinar la pureza del ADN extraído de la práctica anterior.

Antecedentes Académicos

- Características fisicoquímicas del ADN.
- Funcionamiento del equipo *BioPhotometer*.

Introducción

La concentración del ADN se puede estimar utilizando un espectrofotómetro de luz ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 260nm, debido a que las bases púricas y pirimídicas del ADN tienen propiedad de absorber la luz UV a esta longitud de onda. Es importante tener en cuenta que, dado el emparejamiento de sus bases (puentes de hidrógeno), el ADN bicatenario absorbe menos que el monocatenario. Es así como una unidad (u) de densidad óptica (DO) a 260nm equivale a 50µg/mL de ADN de doble cadena, a 40µg/mL de ARN y ADN de cadena simple.

La concentración del DNA en una muestra puede ser calculada por la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de DNA } (\mu\text{g / mL}) = \text{absorbancia de la muestra } 260\text{nm} \times \text{factor de dilución} \times 50\mu\text{g/mL}$$

El análisis espectrofotométrico también nos permite valorar el grado de pureza de los ácidos nucleicos, empleando un análisis de la absorción a otras longitudes de onda en las cuales se sabe que las proteínas y polisacáridos tienen su máxima absorción. Las proteínas absorben fuertemente en 280nm y los polisacáridos se identifican por su máxima absorbancia a 230nm. Por lo tanto la proporción de mediciones de estas tres longitudes de onda 230, 260 y 280 indica el grado de pureza de la muestra del ácido nucleico. En muchos casos, la pureza y la concentración son más difíciles de llevar a cabo por la presencia de reactivos utilizados en el proceso de extracción.



La determinación de la pureza del ADN se establece mediante la relación de las lecturas de las absorbancias a 260 y 280nm.

$$\text{Pureza ADN} = \text{absorbancia 260nm} / \text{absorbancia 280nm}$$

Se consideran cifras óptimas de pureza aquellas que presentan un cociente de 1.7 a 2, cocientes menores indican la presencia de proteínas en el medio y cocientes mayores indican la presencia de otras sustancias contaminantes como etanol.

Efecto hipercrómico

Cuando una solución de ADN de doble hebra se calienta por encima de una temperatura determinada, su estructura nativa colapsa y sus dos hebras complementarias se separan y asumen conformaciones al azar. Este proceso de desnaturalización está acompañado de un cambio cualitativo de las propiedades físicas del ADN, por ejemplo, la alta viscosidad característica del ADN nativo en solución, debida a la resistencia a la deformación de sus moléculas dobles rígidas y con forma de rodillo, disminuye de manera drástica cuando el ADN se descompone en las hebras simples de conformación flexible. De modo similar, la absorbancia del ADN a la luz ultravioleta que se debe casi por completo a sus bases aromáticas, aumenta en un 40% al desnaturalizarse como consecuencia de la desnaturalización de las interacciones electrónicas entre las bases vecinas. El aumento de la absorbancia se conoce como efecto hipercrómico.

La gráfica que representa la medida de Absorbancia (A) a 260 en función de la temperatura se llama curva de fusión del DNA (Fig. 1). Esta curva presenta las siguientes características:

-La A₂₆₀ permanece constante hasta temperaturas por encima de las fisiológicas. En este intervalo, la molécula está en forma de doble hebra.

- El aumento de A₂₆₀ tiene lugar en un estrecho rango de temperaturas (6-8 °C). La A₂₆₀ empieza a aumentar cuando comienzan a romperse las uniones entre las bases en varios segmentos de la molécula. El número de pares de bases (PB) que se rompen aumenta con la temperatura, y con ella la A₂₆₀.

Al final del tramo ascendente, las dos hebras se mantienen juntas por unos cuantos PB.

- La A₂₆₀ máxima es aproximadamente un 37% mayor que el valor inicial, y corresponde al estado en que las dos hebras están completamente separadas.

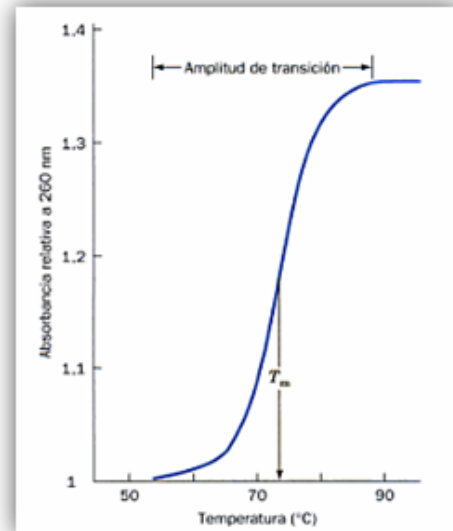


Fig.1 Ejemplo de una curva de fusión



Un parámetro muy útil para caracterizar la evolución de la fusión es la temperatura a la que el aumento de la A260 ha llegado a la mitad de su camino. Esta temperatura se llama temperatura de fusión (T_m). Se ha comprobado que la T_m aumenta con el contenido de G+C. Como el par de bases G-C está unido por tres puentes de hidrógeno (a diferencia del par A-T que sólo presenta 2) se requiere una temperatura más alta para desnaturalizarlo.

La estabilidad del ADN y por consiguiente su T_m , dependen de varios factores por ejemplo: la naturaleza del solvente, las identidades y las concentraciones de los iones en solución y el pH.

Material

- Equipo *BioPhotometer*
- Celdas
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Muestras de ADN
- Gradilla
- Agua destilada



Método

1. Mezclar la muestra de ADN (Fig. 2) y realizar una dilución 1:20 de la muestra concentrada (Fig. 3) en un volumen de 200 μ L (si la lectura es muy alta diluir 1:40 utilizando agua destilada).



Fig. 2 Mezcla de la muestra de ADN.



Fig. 3 Preparación de la dilución

2. Encender el equipo (Fig. 4) del botón que se encuentra en la parte posterior del equipo y seleccionar la función No. 7 que permite la medición de la concentración de ADN y de su pureza.



Fig. 4 Equipo biofotómetro

3. Utilizar 100 μ L agua destilada que se colocan en una celda de plástico, y coloca en el espacio que tiene el equipo para las celdas, el blanco sirve para ajustar el equipo a cero presionando el botón "blank" y se deben observar en la pantalla los ceros (Fig. 5).

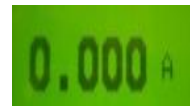


Fig. 5 Ajuste del equipo a cero.



Después de ajustar con el blanco, mezclar y colocar 100 μ L la muestra en la celda (Fig. 7), colocarla en el espacio del equipo para la celda, oprimir el botón *Sample* y anotar los datos que se obtienen en la pantalla: concentración, absorbancia a 260, 280 y el cociente de la relación de las dos absorbancias (260/230, 260/280).



Fig. 7 Pasos a seguir para medir la concentración de una muestra.



Resultados

Registrar las lecturas de las absorbancias de las muestras y de las relaciones 260/230 y 260/280.

Determinar la concentración utilizando la fórmula escrita en la teoría y teniendo en cuenta la dilución del ADN. Por ejemplo, para un ADN diluido 1/100 en un volumen final de 1mL y una lectura de 0.050 a 260nm se tienen que $0.050(\text{DO}) \times 50\mu\text{g}/\text{mL} \times 100$ (factor de dilución) = $250 \mu\text{g}/\text{ml} = 0.25 \mu\text{g}/\mu\text{L} = 250\text{ng}/\mu\text{L}$.

Verificar la pureza del ADN obtenido comparando los cocientes obtenidos de absorbancias a 260/230 y 260/280 con los teóricos.

Cuestionario

1. ¿Por qué otro método se puede cuantificar la concentración del ADN?
2. ¿Cuál es la importancia de obtener ADN con cociente 260/230 y 260/280 entre 1.7 y 2?
3. ¿Por qué se recomienda medir la absorbancia a 280 nm?

Referencias

- Concepción J, Puerta B. Prácticas de Biología Molecular. Bogotá: Editorial Pontificia Universidad Javeriana; 2005.
- Escrig A. Manual de Neurogenética. Madrid: Ediciones Díaz de Santos S.A.; 2003.
- González M. Técnicas de Laboratorio en Biología Celular y Molecular. México: Facultad de ciencias, UNAM, AGT Editor S.A.; 2008.
- Fonseca D, Mateus H. Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: su aplicación en genética básica. Bogotá: Universidad del Rosario; 2010.

