



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Actualización de la Práctica de Electroforesis de Proteínas
y Conservación de muestras en preparaciones
permanentes para el Módulo de BCT I**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

CECILIA GARCÍA MARTÍNEZ



DIRECTOR DE TESIS:

Directora: Mtra. Leonor Aguilar Santelises

Asesora: M. en C. Araceli García del Valle

2016

Proyecto PAPIMEPE 210815

Ciudad de México



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

"Para empezar un gran proyecto, hace falta valentía. Para terminar un gran proyecto, hace falta perseverancia."

Autor Anónimo.

Agradecimiento a la DGAPA que por medio del programa PAPIME ha financiado el proyecto PE210815

Agradecimientos.

Quiero agradecer a mi Directora de Tesis Mtra. Leonor Aguilar Santelises y a mi Asesora M. en C. Araceli García del Valle por todo el apoyo brindado para realizar el presente trabajo, por su orientación y consejo, por todo el tiempo dedicado y su inmensa paciencia, fue todo un gusto haber trabajado bajo su tutela.

A la Mtra. Margarita Cruz Millán por su constante apoyo y ánimo para sacar adelante este proyecto, por todas las enseñanzas compartidas, gracias.

Al Mtro. Rodrigo Aníbal Mateos Nava por toda la ayuda, consejos y asesoría brindados para la realización de la técnica experimental expuesta en este trabajo.

A mis sinodales: Q.F.B. Graciela Rojas Vázquez, Q.F.B. Rocío Ramírez Hernández y la M. en C. Claudia Fabiola Martínez por tomarse el tiempo de revisar y enriquecer este trabajo.

A la máxima casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México, que ha sido un segundo hogar para mí durante mucho tiempo, en donde quedan grabadas muchas de mis experiencias no solo del ámbito académico sino en el ámbito personal.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por abrirme sus puertas para completar mi desarrollo profesional y personal.

A todos mis profesores que durante mi formación me brindaron todo su conocimiento y por todas aquellas enseñanzas de vida.

Dedicatorias

Dedico este trabajo a mi madre por todo su amor y comprensión, por su esfuerzo para que yo pudiera realizar lo que me he propuesto.

A mi hermano quien me han brindado todo su apoyo para que pudiera llevar a término este gran proyecto de vida.

A mis grandes amigos quienes me han brindado su apoyo y consejo, especialmente a Miriam, Claudia y Alejandro quienes me han apoyado, alegraron mi día cuando lo necesitaba y regañado cuando hacía falta.

Contenido	
INTRODUCCIÓN	8
MARCO TEÓRICO	11
Biología molecular.....	11
Proteínas.....	13
Estructura de las proteínas.....	15
Funciones de las proteínas.....	22
Proteínas plasmáticas.....	22
Purificación y análisis de proteínas plasmáticas.....	24
Electroforesis de proteínas.....	25
Velocidad de migración.....	26
Tipos de electroforesis.....	27
Métodos electroforéticos zonales	27
Microscopía	34
Diseción o extracción de partes de una muestra	35
Fijación y conservación de las muestras.....	35
Inclusión y montaje de la muestras	36
Tinción de las muestras.....	36
Montaje.....	37
Validación	37
Elementos de una validación.....	38
Validación de métodos cualitativos.....	38
Tipos de sistemas de medida cualitativos	39
Manual de laboratorio.....	41
Prácticas de laboratorio.....	42
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	45
OBJETIVOS GENERALES	46
Objetivos particulares	46
MATERIAL Y MÉTODO	47

Electroforesis de proteínas	47
Realización de preparaciones permanentes.....	48
RESULTADOS	49
Resultados electroforesis de proteínas.....	49
Resultados de realización de preparaciones permanentes para la práctica de Mitosis.	57
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	61
Pasos críticos a cuidar.....	70
CONCLUSIONES	72
REFERENCIAS	73
Anexo 1: Práctica actualizada de electroforesis de proteínas plasmáticas.	78
Anexo 2: Preparaciones permanentes para la práctica de Mitosis.....	99

INTRODUCCIÓN

La electroforesis constituye una parte importante del procedimiento rutinario del análisis de proteínas, ya que es un método analítico–semipreparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico, fue empleado por primera vez por Tiselius en el año 1937. En 1959 Raymond y Weintraub fueron los primeros en usar como soporte un gel de poliacrilamida (PAGE por sus siglas en inglés), posteriormente el método fue perfeccionado por varios investigadores como Davis y Ornstein, lográndose un aumento de la resolución. En 1970 se introduce en esta técnica el dodecil-sulfato de sodio (SDS), y ya en 1972 se emplean agentes reductores y SDS en la determinación del peso molecular de proteínas en lo que se denominó electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)¹.

La electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida, es una técnica usada ampliamente para caracterizar mezclas complejas de proteínas, ya que es un método conveniente, rápido y económico a nivel de muestra, puesto que se requieren sólo cantidades del orden de microgramos de proteína². Actualmente la electroforesis es utilizada mayormente en el ámbito clínico para identificar la presencia de proteínas anómalas, la ausencia de alguna de las proteínas normales o detectar anomalías en grupos de proteínas ya sea que estén aumentados o disminuidos. De esta manera se permite orientar el diagnóstico hacia una enfermedad u otra. La presencia de una anomalía en un patrón electroforético raramente es diagnóstica por sí misma, aunque sí proporciona una pista³.

Debido a la importancia de esta técnica en el ámbito profesional es indispensable la actualización constante de las prácticas referentes al análisis de proteínas, para que los alumnos reciban durante su formación las herramientas necesarias para enfrentarse al mundo laboral y su aplicación clínica o de investigación. Por lo cual en el siguiente trabajo se llevó a cabo la actualización de la práctica de electroforesis de proteínas usando el equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems de BIO-RAD con el fin de implementar la práctica en el laboratorio del módulo de BCT I.

Por otro lado, la microscopía óptica ha sido utilizada siempre como técnica básica en estudios de morfología general, y actualmente en Biología Celular junto a la Biología Molecular lo que permitió el estudio de las estructuras a nivel molecular haciendo que las técnicas de inmunohistoquímica e inmunocitoquímica sean tan importantes en microscopía óptica como lo pueden ser en microscopía electrónica⁴.

Por lo cual la preparación, manipulación y conservación, adecuada de las muestras es fundamental para llevar a cabo su correcto estudio microscópico. El uso de preparaciones permanentes es conveniente para el docente, para mostrar al alumno el material idóneo para realizar las observaciones y por lo tanto realizar un estudio microscópico correcto. En el presente trabajo se realizaron preparaciones permanentes donde se pueden observar las fases de la mitosis (profase, metafase, anafase temprana y tardía, telofase) que sirvan como apoyo didáctico para el trabajo realizado en el laboratorio de BCT I, esto es debido a que

en algunas ocasiones el alumno no es capaz de observar dichas fases aun cuando se sigue el procedimiento adecuado en el tratamiento de las muestras.

MARCO TEÓRICO

Biología molecular.

La biología molecular es una ramificación de la ciencia referente a actividad biológica a nivel molecular. El campo de la biología molecular traslapa con biología y química y particularmente, genética y bioquímica.

Un ámbito fundamental de la biología molecular se refiere a entender cómo los diversos sistemas celulares interactúan para llevar a cabo la síntesis del ADN, ARN y de las proteínas.

Las técnicas específicas usadas en biología molecular son nativas al campo pero se pueden también combinar con métodos y conceptos referentes a genética y a bioquímica, de allí que no exista una gran distinción entre estas disciplinas.

Sin embargo, cuando los campos se consideran independientemente uno del otro se puede decir que la bioquímica se refiere a los materiales químicos y a los procesos esenciales que ocurren en organismos vivos. El papel, la función y la estructura de biomoléculas son ámbitos fundamentales del enfoque bioquímico, al igual que la química detrás de funciones biológicas y de la producción de biomoléculas.

Por otro lado, la genética estudia la forma en como las características de los organismos vivos, sean éstas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas o conductuales, se transmiten, se generan y se expresan, de una generación a otra, bajo diferentes condiciones ambientales.

La biología molecular observa los mecanismos moleculares detrás de procesos de replicación, transcripción, traducción y la función de las células. Una manera de describir la base de la biología molecular es decir que se refiere a entender cómo los genes se transcriben en el ARN y cómo el ARN se traduce a la proteína. Sin embargo, este proceso simplificado es reconsiderado y revisado actualmente debido a los nuevos descubrimientos referentes al papel del ARN ⁵.

En biología molecular, la mayoría de los estudios básicos y aplicados requieren el uso de la electroforesis; sin embargo, este procedimiento presenta variaciones de acuerdo al tipo de estudio que se piensa ejecutar. En la electroforesis de tipo vertical, se analizan tanto moléculas de ADN como proteínas, mientras que en la electroforesis horizontal generalmente se trabaja con ADN o ARN. Por otro lado, existen otros métodos electroforéticos que presentan ciertas modificaciones, así tenemos la electroforesis en campo pulsado, mayormente usada para separar fragmentos muy grandes de ADN (ADN genómico), la electroforesis bidimensional para un análisis más sofisticado de las proteínas, etc.

El principio básico de la electroforesis consiste en la migración de las moléculas a través de un gel u otro tipo de matriz de naturaleza porosa, en el cual, por acción de un campo eléctrico, serán separadas de acuerdo a su tamaño o peso molecular. Para controlar el avance de la separación de las moléculas en la matriz y establecer un patrón de fragmentos, las moléculas deberán ser teñidas con diferentes colorantes. Estos pasos facilitan la visualización de las moléculas a manera de simples bandas las cuales serán posteriormente analizadas e interpretadas⁶.

La electroforesis se utiliza para separar mezclas complejas de proteínas (por ejemplo, a partir de células, fracciones subcelulares, fracciones de la columna, o inmunoprecipitados), para investigar composiciones de subunidades y para verificar homogeneidad de las muestras de proteínas. También puede servir para purificar proteínas para su uso en otras aplicaciones. En el caso de la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), las proteínas migran en respuesta a un campo eléctrico a través de poros en la matriz de gel; el tamaño del poro disminuye con el aumento de las concentraciones de acrilamida, y es la combinación del tamaño de poro del gel y la carga de la proteína, sumado a su tamaño, y forma lo que determina la tasa de migración de la proteína⁷.

Las proteínas son moléculas cuya carga neta depende del contenido de una serie de aminoácidos (fundamentalmente ácido glutámico, ácido aspártico, lisina, arginina e histidina) y del grado de ionización de éstos al pH considerado. En los soportes no restrictivos, la separación depende de la densidad de carga de las moléculas y así, cuanto mayor sea la densidad, mayor será la velocidad de migración en un campo eléctrico hacia el polo que determine su carga neta⁸.

Proteínas

Las proteínas son biomoléculas poliméricas lineales constituidas por α -L-aminoácidos en enlace peptídicos (20 aminoácidos) arreglados en una secuencia lineal.

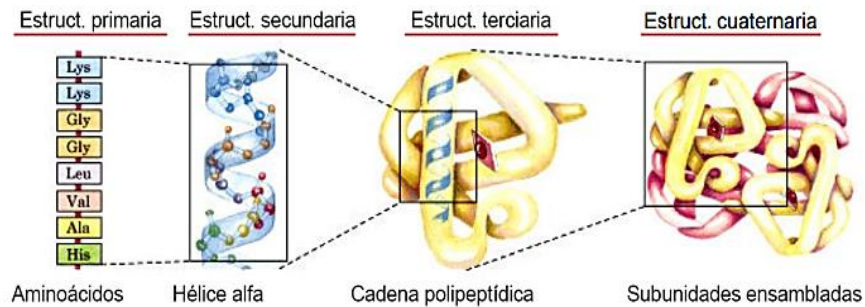


Fig. 1- Niveles de organización estructural.

(Lehninger Principles of Biochemistry. 3th. Ed. Nelson. 2000.)

Las proteínas se encuentran tanto en células animales como en células vegetales y se pliegan en una estructura tridimensional característica que les confiere una gran variedad de funciones, ya sea como componentes estructurales o como receptores moleculares; algunas también participan en los procesos de replicación, transcripción y traducción de la información genética; otras más forman parte de la primera línea de defensa de nuestro sistema o transportan el oxígeno a todas nuestras células. Entre todas ellas son las enzimas quizás las más importantes, pues ellas regulan todo el metabolismo y son pieza clave en todos los aspectos bioquímicos del organismo⁹.

Las proteínas se encuentran presentes en todas las estructuras de la célula y son las moléculas más activas en la vida celular. Las proteínas son sustancias complejas formadas necesariamente por los elementos: C, H, O, N, S y en algunos casos fósforo. Son de alto peso molecular (entre 5000 a varios millones Daltons), en solución forman dispersiones coloidales^{10, 11}.

Debido a que su conformación se mantiene por fuerzas débiles, es fácilmente alterada por un ligero cambio de pH, temperatura o disolventes. Son muy reactivas ya que tienen muchas cadenas laterales con restos de aminoácidos con grupos

aniónicos o catiónicos. Así mismo, la hidrólisis parcial de una proteína se realiza por medio de ácidos, bases o enzimas para la obtención de moléculas más pequeñas, por otro lado con una hidrólisis total se obtienen los aminoácidos que la componen¹⁰.

Estructura de las proteínas

Estructura primaria

La estructura primaria de una proteína es la secuencia de aminoácidos de su cadena polipeptídica, o cadenas si la proteína está formada por más de un polipeptido¹⁰. Todas las proteínas están constituidas por un conjunto básico de 20 aminoácidos, los más abundantes son Leu, Ala, Gly, Ser, Val y Glu; los menos comunes son Trp, Cys, Met e His. Los átomos que conforman la cadena están dispuestos en forma de zig-zag con un ángulo de 120° aproximadamente, los átomos C y N se sitúan en la línea principal de la cadena, y los grupos R, el O y el H se extienden hacia los lados de la cadena¹⁰.

La estructura primaria de una proteína corresponde con la secuencia lineal de aminoácidos codificada en su correspondiente unidad de transcripción y suele representarse por medio de una cadena donde cada letra identifica a un aminoácido o residuo¹² (Tabla 1).

Tabla 1: Nomenclatura de los 20 aminoácidos esenciales.

Letra	Abreviación	Aminoácido	Letra	Abreviación	Aminoácido
A	ALA	Alanina	M	MET	Metionina
C	CYS	Cisteína	N	ASN	Asparagina
D	ASP	Aspartato	P	PRO	Prolina
E	GLU	Glutamato	Q	GLN	Glutamina
F	PHE	Fenilalanina	R	ARG	Arginina
G	GLY	Glicina	S	SER	Serina
H	HIS	Histidina	T	THR	Treonina
I	ILE	Isoleucina	V	VAL	Valina
K	LYS	Lisina	W	TRP	Triptófano
L	LEU	Leucina	Y	TYR	Tirosina
X	-	desconocido			

(http://www.vaxasoftware.com/doc_edu/bio/aminoacidos.pdf)

Estructura secundaria

Es el ordenamiento espacial de un esqueleto de átomos del polipéptido sin considerar las conformaciones de sus cadenas laterales¹¹. La disposición espacial de la cadena proteica es especialmente en estructuras planas o filamentosas, predominando la dimensión longitudinal¹⁰. Los tipos más comunes de estructuras secundarias son¹³:

- Hélices α
- Conformaciones β
- Giros β

En la estructura helicoidal, las cadenas polipeptídicas tiene una orientación helicoidal común, esta es la llamada α -hélice dextrógira, en la que cada $\Phi = -60^\circ$ y cada $\chi = -57^\circ$ aproximadamente, siendo Φ y χ ángulos elementales que se establecen entre dos sistemas cartesianos. La estabilidad de esta hélice depende

de que exista poco o nulo amontonamiento o solapamiento de los átomos, sobre todo entre los grupos R laterales de los aminoácidos y que los dipolos C=O y N-H de los enlaces peptídicos vecinos tengan una orientación óptima, lo que significa una interacción dipolo-dipolo máxima, que produce la formación de puentes de hidrógeno cooperativos intracatenarios.

Las especificaciones características de la hélice α son: el paso de la hélice es de 5.4 Å, hay 3.6 residuos de aminoácidos por cada vuelta completa y el dipolo N-H del residuo n está unido por puentes de hidrógeno al dipolo C=O del residuo $n+4$ ¹⁴ (Fig. 2).

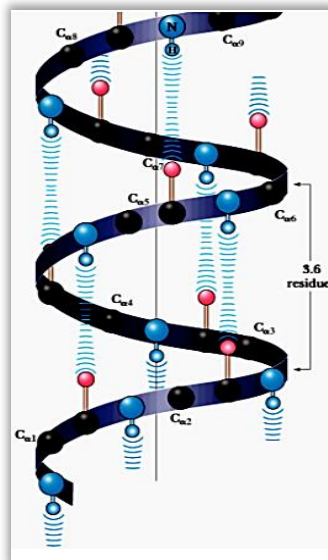


Fig.2- Estructura de la α -hélice.

(Garret, R.H. and Grisham. Biochemistry. 2da ed. 1999)

La estructura laminar está compuesta por láminas, que son segmentos cortos de cadenas polipeptídicas que les permiten realizar un cambio en la dirección. Estas láminas están compuestas de cuatro residuos de aminoácidos en una

configuración compactada en la cual se presentan puentes de hidrógeno y como resultado se obtiene la estabilización de la estructura gracias al enlace que existe entre el primer y cuarto residuo¹⁴.

Las estructuras laminares intracatenarias, se dan sobre todo en las proteínas globulares mientras que las estructuras intercatenarias se presentan en las proteínas fibrosas. En ambos casos son posibles dos formas laminares, según el alineamiento de las cadenas o segmentos, si se alinean en la misma dirección de una terminal a otra, recibe el nombre de lámina β paralela, si se encuentran en direcciones opuestas se llama lámina β antiparalela¹⁴ (Fig. 3).

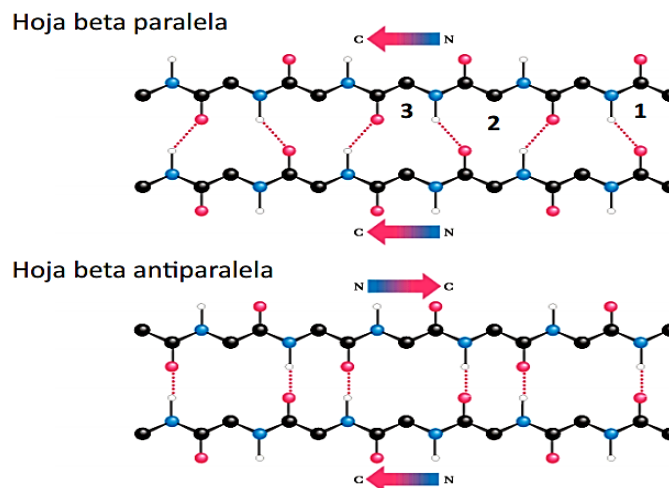


Fig.3- Tipos de estructura laminar.

(Garret, RH and Grisham, C.M. Biochemistry. 2^{ed}. Saunders College Publishing. 1999.)

Los giros son muy abundantes en las proteínas globulares. Las cuales tienen una estructura plegada en forma compacta. Éstos conectan las terminaciones de dos segmentos adyacentes de una lámina antiparalela.

Los aminoácidos Gly y Pro, son los que más frecuentemente forman los giros, debido a su tamaño pequeño en el caso de la Gly y a su flexibilidad en el caso de la Pro¹⁵ (Fig.4).

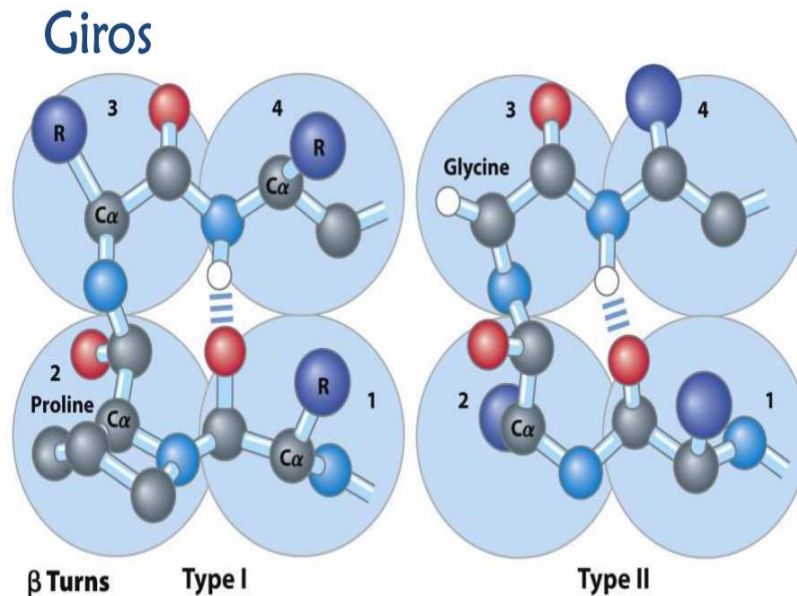


Fig. 4-Tipos de giros.

(Lehninger Principles of Biochemistry. 3th. Ed. Nelson. 2000.)

Estructura terciaria

Se refiere a la estructura tridimensional de un polipéptido íntegro, incluidas sus cadenas laterales¹¹. Las interacciones locales entre los aminoácidos próximos generan hélices α , hojas β u otras formas de estructura secundaria. Estos subconjuntos se organizan en dominios, de 30 y 150 aminoácidos, y que actúan a modo de unidades más o menos coherentes¹¹.

Las superficies externas de la macromolécula presentan los grupos funcionales capaces de interactuar químicamente con otras moléculas de la célula, las interacciones entre los grupos R son las que determinan la estructura terciaria.

Estas interacciones determinan la estructura terciaria¹⁶:

- Los puentes disulfuro covalentes mantienen a un polipéptido plegado en su sitio.
- Las cadenas laterales hidrófobas se ubican al interior de una proteína provocando el plegamiento del polipéptido.
- Las fuerzas de Van der Waals pueden estabilizar las interacciones entre las cadenas laterales hidrófobas.
- Los enlaces iónicos pueden formarse entre las cadenas laterales con carga positiva y negativa que existan en el interior de la proteína formando un puente salino.
- Los puentes de hidrógeno estabilizan los plegamientos de las proteínas.

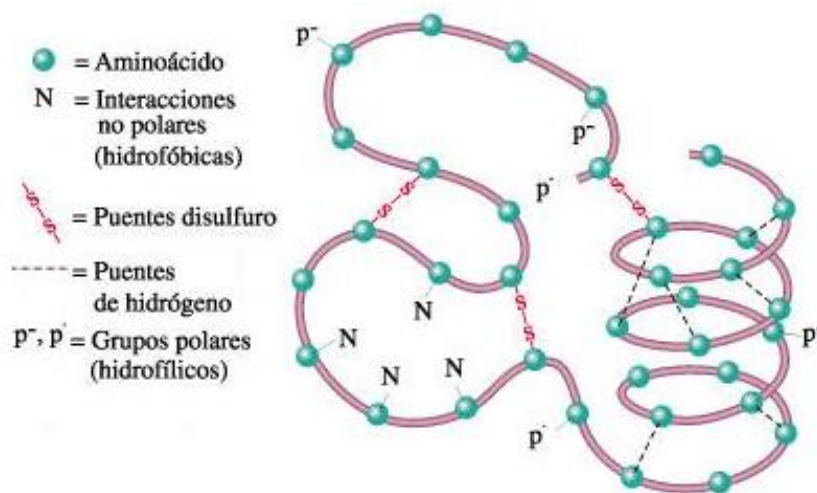


Fig. 5-Tipos de enlaces que estabilizan la estructura terciaria de una molécula de proteína. Estos mismos tipos de enlace también estabilizan la estructura de las moléculas de proteínas formadas por más de una cadena polipeptídica.

(http://www.fisicanet.com.ar/biologia/introduccion_biologia/ap12_aminoacidos_y_proteinas.php)

Estructura cuaternaria

Muchas de las proteínas están compuestas por dos o más cadenas polipeptídicas, llamadas subunidades. La estructura cuaternaria es el ordenamiento espacial de dichas subunidades⁹. Estas se encuentran ubicadas en las cinco clases siguientes, diferentes en función de la presencia y disposición de hélices α y hojas β ¹¹:

- Clase I: proteínas α totales.
- Clase II: proteínas β totales.
- Clase III: proteínas $\alpha+\beta$.
- Clase IV: proteínas α/β .
- Clase V: proteínas en espiral.

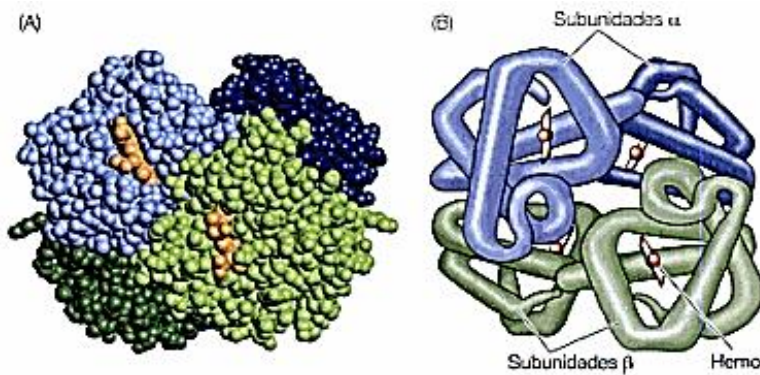


Fig.6-Estructura cuaternaria: la hemoglobina muestra 4 subunidades.

(Savada. Vida, 8va Ed. Editorial Panamericana, 2009)

Funciones de las proteínas

Una de las funciones más relevantes de las proteínas es constituir la parte fundamental de las enzimas. Las proteínas funcionan también como hormonas (mensajeros químicos entre las células), por ejemplo: la insulina, el glucagón, la hormona adrenocorticotrópica y demás hormonas tróficas de la hipófisis: tirotropina, luteinizante, prolactina, hormona del crecimiento; así como los factores liberadores del hipotálamo. Además de ser el principal ingreso de nitrógeno al organismo¹¹.

Por otra parte, las proteínas membranales además de servir como marcadores de la individualidad celular, se ocupan de realizar los principales tipos de transporte activo y pasivo de la célula: difusión facilitada, uniporte, simporte y antiporte. También funcionan prominentemente como acarreadores de diferentes tipos de sustancias y participan en los sistemas de defensa del organismo funcionando como anticuerpos: inmunoglobulinas G, M, A, D y E; y también formando todos los componentes del complemento¹⁷.

Proteínas plasmáticas.

La sangre es un tejido que circula dentro de un sistema virtualmente cerrado, el de los vasos sanguíneos y se encuentra compuesta por elementos sólidos (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) suspendidos en un medio líquido, el plasma. El plasma está formado por agua, electrolitos, metabolitos, nutrientes, proteínas y hormonas.

En la actualidad se han aislado y caracterizado alrededor de 100 proteínas del plasma, sin embargo las funciones de una gran parte de ella permanecen aún

desconocidas, la mayoría son glicoproteínas, presentando en algunos casos variaciones genéticas¹⁸.

Las proteínas plasmáticas pueden clasificarse en los siguientes grupos o sistemas:

Inmunoglobulinas¹⁹.

- Sistema del complemento.
- Sistema de coagulación y fibrinólisis.
- Inhibidores de las proteinasas.
- Sistema de lipoproteínas.
- Proteínas de transporte.
- Proteínas de función desconocida.
- Enzimas y otras proteínas.

El plasma sanguíneo humano contiene normalmente 6.5 a 8.0 g/dL de diferentes proteínas con funciones específicas, que pueden ser separadas mediante diversas técnicas. Después de la precipitación de la mayor parte de las proteínas, el plasma aun contiene cierta cantidad de proteínas, llamadas proteínas residuales, provenientes del metabolismo de las sustancias nitrogenadas de los alimentos. Estas proteínas residuales están formadas en un 50% por carbámidos, que son grupos amínicos libres unidos a anhídrido carbónico, por aminoácidos (25%), creatinina, ácido úrico y otros componentes nitrogenados no bien identificados.

Las principales proteínas plasmáticas son: fibrinógeno, albúmina y globulinas (se conocen tres: alfa, beta y gamma globulina)²⁰, en la Tabla 2 se presentan algunas proteínas que se encuentran en sangre con sus respectivos pesos moleculares.

Tabla 2. Proteínas plasmáticas con sus respectivos pesos moleculares ^{18,19, 20}.

Nombre de la proteína	Peso molecular KDa
Prealbúmina	62
Albúmina	69
α_1 -globulina	54
α_2 -globulina	160
β -globulina	380
Transferrina	80
C ₃	185
Fibrinógeno	340
IgG	150
IgA	320
IgM	850
Hemoglobina	64.5

Purificación y análisis de proteínas plasmáticas.

La purificación de una sustancia requiere de métodos para detectarla de forma cuantitativamente, por lo que debe diseñarse un ensayo que sea específico, sensible y conveniente.

Entre los ensayos más simples están aquellos para enzimas que catalizan reacciones con productos detectables con facilidad. Los ensayos más comunes son los siguientes¹¹:

- Inmunoensayos: radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).
- Químico: Ensayo de Bradford.

Las proteínas se purifican mediante procedimientos de fraccionamiento, la idea de esto es eliminar en forma selectiva los demás componentes de la mezcla, de manera que quede sólo la sustancia deseada. Entre estos procedimientos resaltan:

- Fraccionamiento por disminución de la solubilidad (“salting out”).
- Cromatografía.
- Electroforesis.
- Ultracentrifugación.

El método más común para analizar las proteínas plasmáticas es la electroforesis, (la migración de proteínas por acción de un campo eléctrico), existen diversos tipos de ésta y cada una usa un medio de soporte diferente. El uso de la electroforesis permite, después de un proceso de tinción, la resolución de 5 bandas de proteínas plasmáticas. Designadas albúminas, α_1 , α_2 , β y γ , éstas últimas son globulinas¹¹.

Electroforesis de proteínas.

La técnica de electroforesis constituye una parte importante del procedimiento rutinario del análisis de los ácidos nucleicos y proteínas¹⁸. La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; Estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. Es de destacar que a escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza. Se pueden conocer también mediante estas técnicas, las características ácido-básicas de las proteínas presentes en un extracto crudo, lo que da la información necesaria si se pretende realizar una separación por

electroforesis basada en diferencias de carga. Es útil además para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoeléctrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas²¹.

Velocidad de migración.

La velocidad de migración (v) de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga efectiva (q) y al gradiente de potencial eléctrico (E) e inversamente proporcional al coeficiente de fricción (f) relativo al tamaño y forma de la molécula, o sea, a la resistencia que le ofrece el medio.

La movilidad electroforética (Me) es un caso particular de la velocidad de migración de un ión, cuando se aplica un campo eléctrico de 1 V/cm. Su signo es igual al de la carga de la partícula. La velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga / peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis.

El voltaje no se puede incrementar indiscriminadamente porque se genera un excesivo calor. En contraste, al aplicar bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación, por causa de la difusión por tiempo muy prolongado de la corrida electroforética²².

La mayoría de las biomacromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos) poseen determinada carga eléctrica con grupos aniónicos y catiónicos capaces de disociarse. La carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con pequeñas moléculas de iones u otras macromoléculas. De lo anterior se deduce que el pH influye sobre la velocidad de migración de las moléculas. En el punto isoeléctrico de la biomolécula, pH al cual

su carga neta es 0, esta no migra. Por debajo del punto isoeléctrico tiene carga neta positiva y migra hacia el cátodo, y por encima del punto isoeléctrico tienen carga neta negativa y migra hacia el ánodo²³.

Tipos de electroforesis.

Se suele hablar de 3 tipos de electroforesis²⁴.

- De frente móvil: los componentes de la muestra están presentes en toda la disolución y se determina ópticamente la posición del frente de avance o frontera con el disolvente.
- Zonal: la muestra se aplica como una mancha o banda y sus componentes migran a través de un disolvente, utilizando además un medio de soporte. En este caso no se determina la movilidad, sino que el único objetivo de la técnica es separar los componentes de la muestra. Este tipo de electroforesis es la más usada.
- Continua: la muestra se aplica también en una zona, pero se suministra continuamente a lo largo del proceso.

Métodos electroforéticos zonales

Son útiles para lograr la separación de componentes de mezclas complejas. Se aplican pequeñas cantidades de la disolución de proteínas a un soporte sólido, que se impregna con una solución de tampón. Los soportes son en general polímeros y forman un gel poroso que restringe el movimiento de las moléculas a

través del medio durante la electroforesis y disminuyen los flujos de convección del disolvente. Como soportes se han utilizado papel (celulosa), almidón, poliacrilamida, agarosa, acetato de celulosa, etcétera²¹. Este método tiene gran poder resolutivo porque se aplica una cantidad pequeña de proteína a una zona estrecha, mientras que la longitud del trayecto es mucho mayor que la zona de aplicación. El equipamiento requerido es simple (fuente de poder y cubeta vertical u horizontal donde se coloca el soporte y dos electrodos)²².

Electroforesis en gel de poliacrilamida.

La electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida (PAGE, 'polyacrilamide gel electrophoresis') es sin duda alguna una de las técnicas más ampliamente usada para caracterizar mezclas complejas de proteínas (aunque existen otras como la electroforesis capilar, isoelectroenfoque, electroforesis en dos dimensiones, etc¹⁷). La electroforesis en poliacrilamida es un método conveniente, rápido y económico a nivel de muestra pues se requieren sólo cantidades del orden de microgramos de proteína.

Una ventaja importante de los geles de poliacrilamida es que son químicamente inertes, transparentes y estables en un rango amplio de pH, temperatura y fuerza iónica²³.

La separación ocurre en el gel separador, donde la migración está determinada por la carga y el tamaño molecular de las partículas. Encima de este gel se sitúa el gel concentrador, generalmente de una menor altura (1/3 del gel separador), en el

que la muestra se concentra en una zona muy estrecha; lo que determina la separación en bandas finas en el gel separador y alto poder de resolución²⁴.

Luego de la electroforesis, las bandas separadas pueden visualizarse en el gel si se sumergen en una solución de un colorante (azul brillante de Coomassie), que se une fuertemente a proteínas. Así también, si las proteínas en la muestra son radioactivas, el gel puede secarse y luego apoyarse sobre una película sensible a los rayos X (autorradiografía). Si se cuenta con un anticuerpo contra la proteína de interés, se puede utilizar un proceso llamado inmunotransferencia o Western Blot²⁵.

Formación del gel de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida y del monómero entrecruzador N, N'-metilen-bis-acrilamida (Fig.7).

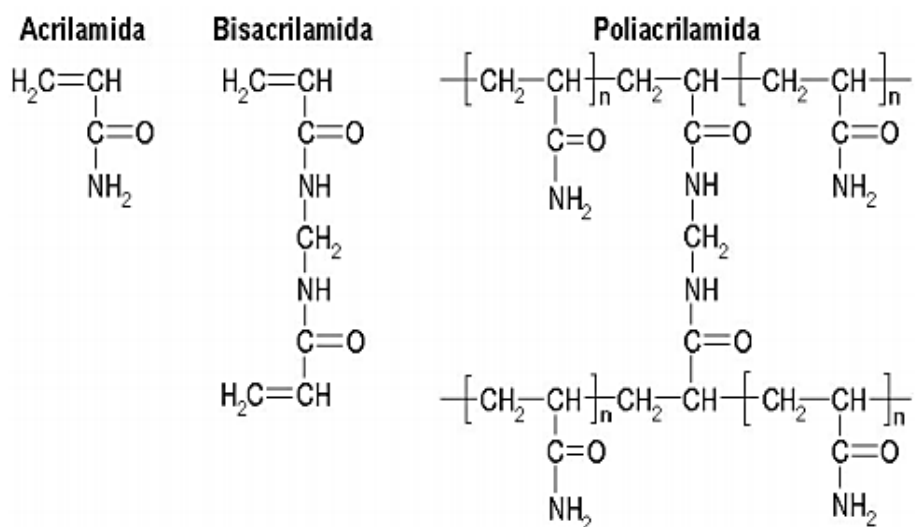


Fig.7- Estructura de la acrilamida, bisacrilamida y poliacrilamida.

(Cultek. Soluciones Electroforesis. Protocolo y Técnicas. c2006. pp. 1-17.)

La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por radicales libres de oxígeno, por causa de la acción de iones persulfato. Las aminas terciarias como el N, N, N', N''-tetrametilen-diamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato. Esta reacción es fuertemente inhibida por altos niveles de oxígeno por lo que la solución debe ser desgasificada para lograr una formación de gel reproducible.

Hay muchos factores que desempeñan una función importante en la separación electroforética, como son pH, fuerza iónica, gradiente de potencial, tiempo de corrida, concentraciones de acrilamida y bisacrilamida, etc. Las condiciones óptimas de una buena separación, en la práctica se determinan experimentalmente, con el análisis de cómo influyen los diferentes factores en la electroforesis en cuestión. Los factores que gobiernan la talla del poro del gel son complicados, pero en general el tamaño del poro disminuye con el incremento del % de acrilamida²⁶ (Fig.8).

La polimerización no ocurre a pH ácidos, ya que requiere radicales de monómeros libres formados por catálisis básica de los radicales de oxígeno del persulfato.

↑ [poliacrilamida] ↓ tamaño poro

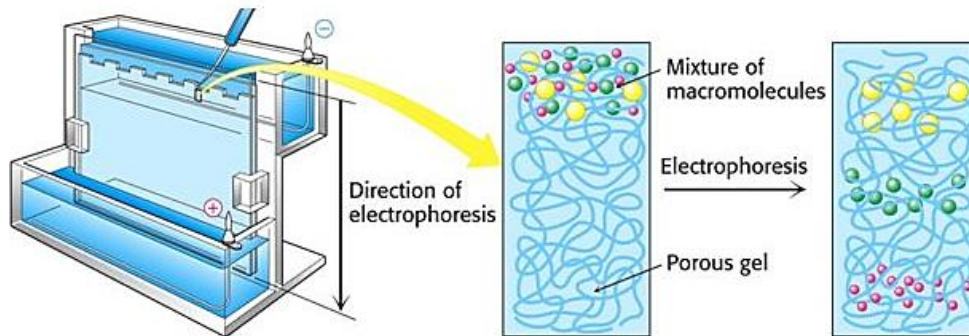


Fig.8- Polimerización del gel de electroforesis.

(<http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm>)

Sistemas de tampón que se emplean en la electroforesis en geles de poliacrilamida

En la electroforesis: los efectos de absorción de agua, la no-homogeneidad del material, el intercambio iónico con grupos cargados del soporte y la electroendósmosis, pueden influir sobre la movilidad y la calidad de la separación. La electroendósmosis generalmente ocurre porque grupos cargados del soporte se ionizan en soluciones tampón, neutras o ácidas y los contraiones libres hidratados (H_3O^+) migran hacia el cátodo, esto provoca un movimiento relativo del disolvente respecto al soporte sólido y que las moléculas no cargadas sean transportadas hacia el cátodo a pesar de no tener grupos ionizados. La electroforesis en geles de poliacrilamida puede realizarse en el rango de pH de 2 a 11, sin embargo la desaminación de las proteínas o las reacciones hidrolíticas

pueden ser severas a valores de pH inferiores a 3 y superiores de 10. La mayoría de las proteínas con puntos isoeléctricos comprendidos entre pH 4 y 7,5 son separadas en geles con pH entre 8 y 9²⁶.

PAGE-SDS

La electroforesis con SDS es un excelente método para identificar y monitorear las proteínas durante un proceso de purificación; también se emplea para la determinación del peso molecular de las subunidades de proteínas. El detergente empleado en esta variación de la electroforesis es el SDS, el cual desnaturaliza por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie y todos los complejos SDS-proteína toman carga neta negativa (que excede la carga intrínseca de las cadenas de aminoácidos). El tratamiento concomitante con un agente reductor de puentes bisulfuro, como el beta mercaptoetanol (β ME) o el DTT desnaturaliza las proteínas y las rompe en las subunidades que la componen. Por lo que el complejo SDS-proteína tiene generalmente mayor densidad de carga y menor tamaño que las proteínas nativas. La migración de los derivados proteína-SDS hacia el ánodo es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular ²⁴. Se aprecia una progresiva difusión del borde de migración en la medida en que aumenta la concentración de T⁸. Se demostró que el ión glicinato no se concentra con el gel concentrador, lo que puede estar provocado por una interacción entre la glicina y el SDS.

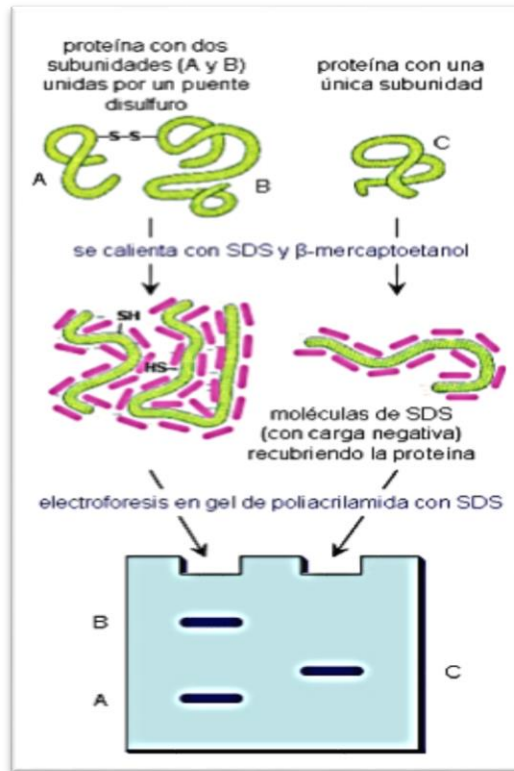


Fig. 10- Electroforesis PAGE-SDS.

(<http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.html>)

El peso molecular (PM) de las proteínas puede determinarse por electroforesis al comparar las movibilidades electroforéticas de varios marcadores de peso molecular conocido. Existen patrones (mezclas de proteínas de peso molecular conocido y que se tiñen uniformemente) de varios rangos de peso molecular, se debe aplicar el que abarque el peso molecular esperado para la proteína que se quiere determinar. Estos patrones deben ser tratados de manera similar a la muestra²¹.

Para controlar el avance del frente de electroforesis (posición de máxima movilidad) se añade a la muestra un colorante marcador ("tracking dye"), molécula cargada y de pequeño tamaño que avanza más que cualquier componente de la muestra; el más habitual es el azul de bromofenol²⁷.

Microscopía

Con el propósito de apoyar a la práctica docente se realizaron preparaciones permanentes para los alumnos del módulo de BCT I y esto debido a que el estudio detallado de los componentes de células y tejidos animales o vegetales, por el tamaño que poseen, requieren el uso de instrumentos que permitan ampliar muchas veces más la imagen de las estructuras que los constituyen, es decir se requiere del uso de microscopios. El microscopio es un instrumento que sirve para observar objetos o estructuras pequeñas¹⁸. Existen varios tipos de microscopios como por ejemplo:⁴

- Microscopio electrónico de transmisión.
- Microscopio electrónico de barrido (SEM).
- Microscopio óptico.
- Microscopio confocal espectral, etc.

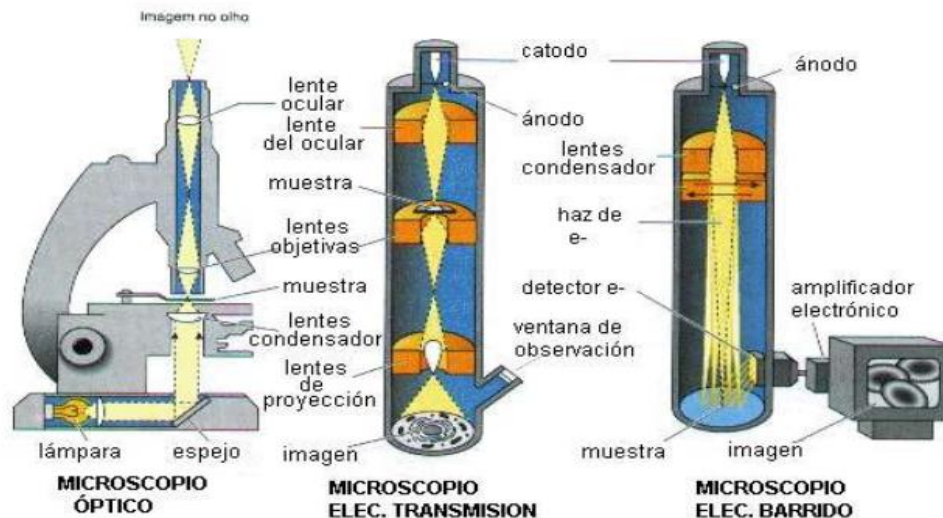


Fig. 11- Tipos de microscopios más comunes y sus partes.

(<http://laboratorios.tap-ecosur.edu.mx/LMEB/APUNTES%20MEB%20CURSO%202010.pdf>)

La preparación, o manipulación, adecuada de las muestras es fundamental para llevar a cabo su correcto estudio microscópico. Una deficiente preparación de la muestra puede llevarnos a su incorrecta visualización y, por tanto, a un mal estudio e interpretación. Las técnicas para la manipulación y la preparación de las muestras son muy numerosas y cada una está orientada a conseguir resultados concretos; pero el tipo de muestra y lo que queramos ver en ella también es determinante en la elección de una técnica u otra. Los procedimientos para la preparación de muestras se pueden dividir en diferentes fases, o pasos técnicos, aunque, dependiendo del tipo de muestra, no todos son necesarios. Estos pasos se pueden englobar en: fijación, conservación, disección o extracción de partes, tinción, inclusión, y montaje²⁸.

Disección o extracción de partes de una muestra

Las muestras se pueden estudiar “*in toto*” (en su totalidad), cuando por su tamaño se han de preparar en su totalidad, o parcialmente, cuando sólo es necesario extraer estructuras o hacer secciones finas de la misma (usando micrótomos).

Fijación y conservación de las muestras

La fijación y conservación se aplica comúnmente a muestras de origen biológico, aunque también en algunas inertes. Ambos procesos, se pueden llevar a cabo en pasos distintos o al mismo tiempo. La elección del fijador está relacionada con el origen de la muestra biológica y el tipo de estudio a realizar ²⁸.

Los fijadores se clasifican en dos grandes grupos ²⁹:

a) **Oxidantes:** el tetraóxido de osmio (ácido ósmico), el bicromato de potasio, ácido crómico, bicloruro de mercurio o “*sublimado corrosivo*”, ácido pícrico, ácido acético.

b) **Reductores:** el formaldehído, el glutaraldehído, el alcohol etílico, el alcohol metílico.

Finalmente, la congelación es también un método de fijación en muestras de origen biológico.

Inclusión y montaje de la muestras

Las muestras que se van a estudiar en secciones deben ser incluidas previamente, para facilitar que puedan ser cortadas. La inclusión consiste simplemente en embeber la muestra en una sustancia que se endurece posteriormente formando un cuerpo, de manera que la muestra se pueda manipular y cortar fácilmente.

Existen una serie de sustancias de inclusión. Unas son solubles en agua (gelatina, carbowax, glicol metacrilato), otras son solubles en disolventes orgánicos (parafina, celoidina, resinas epóxicas)²⁹.

Tinción de las muestras

Las muestras se pueden estudiar directamente al microscopio una vez montadas, aunque en numerosas ocasiones es necesario contrastarlas. Para ello se pueden utilizar colorantes que nos permitan una buena diferenciación de los elementos que constituyen la muestra. En algunas muestras es necesario realizar la despigmentación y, en ocasiones, la eliminación de materia orgánica²⁸.

Montaje.

Concluido el proceso de la tinción de los cortes, éstos se deben colocar en condiciones de protección para poder ser utilizarlos infinidad de veces sin que se deterioren. Para alcanzar tales propósitos se recurre a realizar un montaje. Este consiste en colocar encima del corte coloreado y diafanizado una gota de una sustancia adherente, diluida (generalmente en xilol), y encima de ellos, una laminilla cubreobjetos, cuidando que no queden burbujas de aire entre la resina ³⁰.

Validación

Para la implementación de la técnica de electroforesis de proteínas plasmáticas se llevó a cabo la validación para métodos cualitativos, con el fin de conocer la confiabilidad, para ello es necesario conocer que es la validación de métodos y los parámetros a cumplir para llevarla a cabo.

La versión más reciente de la definición de validación se presenta en la norma ISO 9000:2000 en donde se establece que la validación es la confirmación y provisión de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos para un uso o aplicación prevista³¹. También se puede definir la validación de métodos como el proceso de establecer las características de desempeño y las limitaciones de un método y la identificación de las influencias que pueden cambiar esas características, y en qué medida. Como alternativa, se establece que la validación de métodos es el proceso de verificar que un método es apropiado para un propósito dado, es decir, para usarse en la solución de un problema analítico particular³².

Un laboratorio debe de llevar a cabo una validación cuando se trata de métodos no normalizados ya sea porque el método es de nuevo desarrollo o es un método que no cuenta con una validación previa, además se validaran métodos normalizados cuando estos hayan sufrido una modificación significativa³³.

Elementos de una validación

Los elementos en un proceso de validación son los siguientes:

- La herramienta u objeto de la validación
- La función o uso previsto
- Los requisitos para la función
- La característica de la herramienta
- La actividad de examinar
- La expresión del resultado

La validación se vuelve necesaria cuando se plantea el problema de asegurar que la herramienta propuesta sirva para satisfacer una función determinada, un uso previsto. Se asume que tal herramienta no ha sido probada previamente para esa función³⁴.

Validación de métodos cualitativos.

En los laboratorios de análisis es frecuente la introducción de sistemas de medida de respuesta rápida que generan respuestas más de tipo cualitativo que cuantitativo. La respuesta cualitativa suele ser binaria del tipo SI/NO y puede responder a distintas situaciones: presencia/ausencia de un determinado analito

en una muestra, presencia/ausencia por encima de un determinado nivel (normalmente de concentración). Estos sistemas se denominan habitualmente sistemas de screening o de cribado³⁵.

Tipos de sistemas de medida cualitativos.

Si atendemos al tipo de sistema utilizado para la obtención de la respuesta (detección) podemos diferenciar dos grandes grupos: análisis cualitativo clásico o sensorial y análisis cualitativo instrumental.

En el análisis cualitativo clásico la detección es de tipo sensorial y se realiza en base a los sentidos humanos como pueden ser la vista, olfato, etc. Dentro de este grupo de sistemas cualitativos se encuentran los denominados 'tests 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 respuesta.

El análisis cualitativo instrumental se basa en la detección realizada en base a una medida instrumental (colorimetría, fluorescencia, voltamperometría, etc.). Están basados en una reacción inmunológica y al igual que los test kits, la detección puede ser tanto sensorial como instrumental.

El resultado de un análisis cualitativo también se caracteriza por dos valores, el primero es binario 'SI/NO', y el segundo es la probabilidad de error asociada a la decisión tomada³⁶.

Parámetros a evaluar en una validación de método cualitativo.

Para validar un método analítico cualitativo se deben evaluar los siguientes parámetros³⁴:

- Adecuabilidad: consiste en corroborar que los componentes y reactivos involucrados en la obtención de datos funcionen apropiadamente³⁴.
- Homogeneidad o Selectividad: se evalúa aplicando la prueba al mismo número de muestras o testigos verdaderos positivos y de testigos verdaderos negativos, investigando el comportamiento del método analítico en ambas poblaciones³⁷.
- Sensibilidad: es la probabilidad de que la respuesta analítica resulte positiva cuando en la muestra estudiada está realmente presente el sustrato de interés diagnóstico en los límites de detección o por arriba de ellos ^{38,39}.
- Especificidad: es la probabilidad de que la respuesta analítica resulte negativa debido a que en la muestra estudiada NO existe físicamente el sustrato o sustancia de interés diagnóstico o se encuentra por debajo de los límites de detección^{38, 39}.
- Valor Predictivo: Es la probabilidad de que el sustrato de interés esté físicamente ausente o en cantidad inferior a la mínima detectable cuando la prueba resultó negativa^{36, 37}.
- Confiabilidad Diagnóstica: es la probabilidad de que en una serie de muestras a doble ciego, se detecte correctamente el metabolito, reactivo o sustancia de interés diagnóstico debido a que ocurrió una adecuada

reacción o interacción del reactivo o reactivos con el sustrato generando una respuesta analítica positiva^{37, 38}.

- Límite de Detección: es la mínima cantidad de sustrato en una muestra, que bajo las condiciones de operación establecidas, sea capaz de generar una respuesta analítica positiva en el método analítico³⁹.

Manual de laboratorio.

Debido a que los protocolos tanto de electroforesis de proteínas como la realización de preparaciones fijas fueron hechos con el fin de poderse anexar al manual de prácticas del laboratorio de BCT I, es necesario conocer los aspectos a cubrir para formar parte de dicho manual.

El manual de prácticas de laboratorio es utilizado en el proceso de enseñanza y aprendizaje como un medio didáctico, junto con los recursos materiales y educativos, lo que en conjunto puede cumplir diversas funciones como lo son ⁴⁰:

- a. Proporcionar explícitamente información del tema en estudio, de sus métodos y procedimientos.
- b. Guiar el aprendizaje de los alumnos al instruir, ayudar a organizar la información, relacionar conocimientos, crear nuevos conocimientos y aplicarlos.
- c. Ejercitar habilidades, entrenar al alumno en técnicas, métodos y acciones que exigen una determinada respuesta lógica o psicomotriz.
- d. Motivar, despertar y mantener el interés por temas específicos.

- e. Evaluar los conocimientos y las habilidades que se tienen, a partir de ponerlos en práctica y del cuestionamiento de los resultados obtenidos.
- f. Propiciar, además, la corrección de los errores, explícitos o implícitos, de los alumnos.
- g. Proporcionar simulaciones en actividades previas a la ejecución de la práctica, al ofrecer entornos para la observación, exploración y experimentación.

Prácticas de laboratorio.

Una práctica de laboratorio, es una actividad didáctica basada en una experiencia en la que 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 conclusiones⁴¹.

Elementos que componen una práctica de laboratorio.

Frecuentemente una práctica se encuentra integrada por una 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 desempeño⁴².

- I. Título de la práctica, experimento o proyecto: El título deberá ser sugerente, atractivo y relacionado con el tema o problema en estudio.

- II. Introducción: Aquí se anotan los conceptos teóricos que sustentan el experimento propuesto: teorías, leyes, métodos, técnicas y estrategias en las que se apoya.
- III. Objetivo de la práctica: Señala la finalidad del experimento o actividad específica.
- IV. Metodología: Se describe el proceso técnico o los pasos a seguir para el desarrollo del experimento.
- V. Recursos materiales y equipo: Especifica todo lo requerido en cuanto al tipo de equipos, materiales (reactivos, didácticos y referenciales), tecnologías, instrumental, herramientas, instalaciones, software y personal, tanto para la etapa de experimentación como para la reproducción, a futuro, del problema en estudio.
- VI. Descripción del desarrollo de la práctica: Aquí se describe la secuencia de la actividad práctica experimental, relacionando los métodos, los procedimientos y las técnicas en una secuencia rigurosa y coherente, para el estudio del objeto o fenómeno.
- VII. Evaluación: Un objetivo fundamental de la evaluación es acoplar información pertinente para conocer la eficacia de la acción, la cual no depende sólo del alumno sino de un cúmulo de componentes de naturaleza variada: la adecuación de lo que se pretende respecto de la capacidad y actitudes de los estudiantes, el ritmo de aprendizaje, los medios de que se dispone, los momentos elegidos, la relación del profesor con los alumnos dentro del ambiente de aprendizaje.

- VIII. Referencias bibliográficas: Indica la bibliografía básica y complementaria con la que fueron elaborados los contenidos de la práctica⁴².
- IX. Resultados y conclusiones: El resultado de la práctica se traducirá en un breve informe, a partir del conjunto de datos que los alumnos obtuvieron durante el desarrollo de la actividad. Por otro lado las conclusiones comprenden las aportaciones personales o los juicios de valor propuestos a partir de los resultados de la práctica o del experimento, o bien de las acciones derivadas de todo el proceso de experimentación⁴³.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente la electroforesis es utilizada mayormente en el ámbito clínico para identificar la presencia de proteínas anómalas, la ausencia de alguna de las proteínas normales o detectar anomalías en grupos de proteínas ya sea que estén aumentados o disminuidos. Debido a su importancia es de sumo valor que los alumnos durante su formación aprendan a utilizar dicha técnica con equipos e instrumentos en constante actualización. Asimismo, la microscopía óptica tiene aplicaciones tanto en Ciencia básica como en las áreas de: Biología, Biotecnología, Ciencias de la Salud, Ciencias forenses, Ciencias agropecuarias, Ciencias de los materiales, Geología, Arqueología, Metalurgia, etc., y puesto que la preparación, manipulación y conservación adecuada de las muestras es fundamental para llevar a cabo su correcto estudio microscópico, es importante el uso de preparaciones permanentes para uso docente, ya que el alumno contará con material para llevar a cabo un estudio microscópico y podrá familiarizarse con dicha técnica.

OBJETIVOS GENERALES

- Actualizar la práctica de Electroforesis de proteínas de plasma sanguíneo (albúmina y α , β , γ globulinas) para el módulo de BCT I en cámara Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems de BIO-RAD.
- Conservar material biológico en laminillas fijas, mediante técnicas de tinción y conservación para su observación en el microscopio para el laboratorio de BCT I.

Objetivos particulares

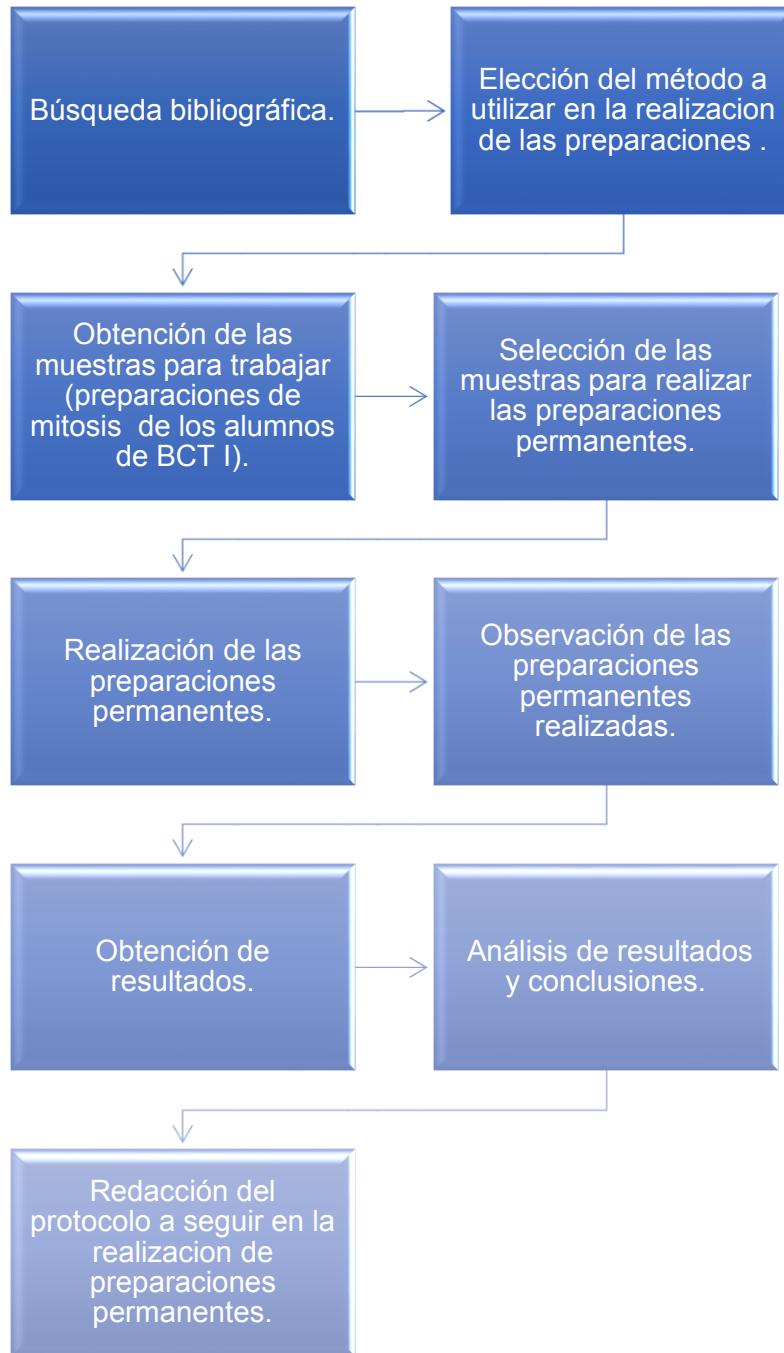
- Elaborar una propuesta de protocolo para la práctica de Electroforesis de proteínas para el módulo de BCT utilizando una cámara Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems de BIO-RAD.
- Elaborar una propuesta de protocolo para la realización preparaciones permanentes útiles en la práctica de Mitosis para el módulo de BCT I.
- Realizar preparaciones fijas para la práctica de Mitosis del módulo de BCT I.

MATERIAL Y MÉTODO

Electroforesis de proteínas



Realización de preparaciones permanentes



RESULTADOS

Resultados electroforesis de proteínas.

Se realizó la obtención de plasma a partir de la toma de muestras de 4 donantes, para ello se utilizaron tubos de 4 mL de EDTA Vacutainer®. Una vez obtenido el plasma éste presentaba señales de hemólisis, pese a ello se siguió trabajando con dichas muestras conforme a lo descrito en la práctica de extracción de proteínas plasmáticas del Manual de BCT I⁴⁴, con el fin de obtener proteínas totales y albúmina.

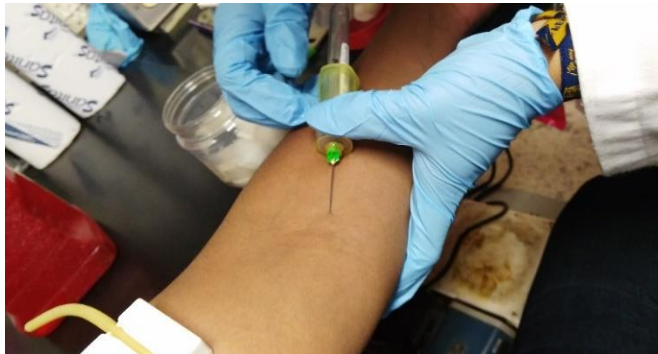


Fig. 12- Toma de muestras sanguínea.

Para esta primera corrida se usaron 2 geles de poliacrilamida, cuyas muestras se corrieron durante 40 minutos en el gel concentrador a 87 V y posteriormente 2 horas a 145 V usando baño de hielo para el gel separador (Fig. 13)

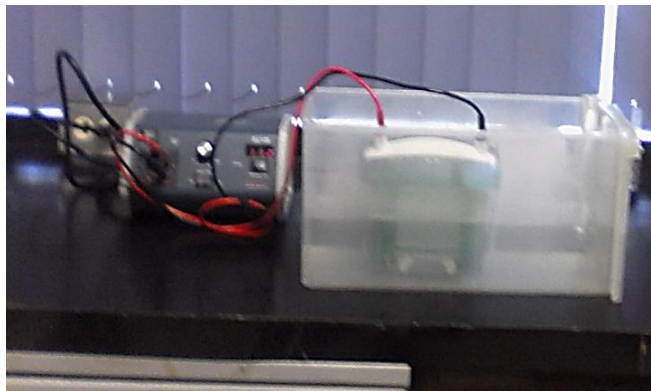


Fig. 13- Electroforesis de proteínas en baño de hielo.

Una vez obtenidos los geles de electroforesis se tiñeron durante 1 hora en azul de Comassie y se dejó en solución desteñidora durante 24 hrs y refrigeración. Cabe

destacar que esta primera corrida se realizó conforme lo descrito en la práctica de electroforesis existente ya en el Manual de BCT I adaptándola al equipo Mini-PROTEAN®Tetra Cell Systems de BIO-RAD.

A estos geles no se les dio tratamiento posterior puesto que no existía ningún protocolo para realizar su conservación. Se realizó una segunda corrida usando las mismas muestras de la primera corrida pero con 3 semanas de antigüedad.

Con estos geles se redujo el tiempo de tinción a 30 minutos y se trataron con una solución fijadora por 5 minutos:

- 50% de metanol
- 10% de ácido acético glacial
- 40% de agua destilada.

Posteriormente se sumergieron en glicerol y se colocaron dentro de un protector de acetatos para su conservación.

Para la tercera corrida se realizó la extracción y purificación de proteínas plasmáticas de 2 donadores, se utilizó un nuevo buffer de Laemli a partir de los siguientes reactivos con las cantidades ajustadas como se describen:

- 6.6 mL de TRIS-HCl pH 6.8
- 2.6 mL de glicerol
- 0.21 g de SDS
- 0.001 g de Azul de bromofenol.
- 0.5 mL de β -mercaptoetanol.

Se dejó correr las muestras durante 2 horas 30 minutos en baño de hielo a 87 V y después a 160 V, se realizó el mismo tratamiento posterior que a los geles de la segunda corrida.

Se realizó una cuarta corrida cambiando las concentraciones de las diluciones de las muestras quedando como indica la Tabla 3.

Tabla 3- Diluciones para las muestras que se usaran en electroforesis de proteínas.

Muestra	Cantidad de muestra	Volumen añadido de NaOH 0.1N
Plasma	2 µL	1000 µL
Proteínas totales	10 µL	150 µL
Albúmina	15 µL	200 µL

Se ajustó el volumen de marcador de peso a 8 µL y se depositaron 20 µL de muestra en cada pocillo. Se corrieron las muestras durante 3 horas a 87 V y después a 111 V a temperatura ambiente. Los geles se trataron de manera posterior según lo descrito con anterioridad.

Con los resultados obtenidos se realizó el ajuste y adecuación de la técnica así como la redacción de la práctica para realizarse bajo las condiciones del laboratorio docente y se decidió llevar a cabo el pilotaje de la práctica actualizada con dos grupos de alumnos que cursan el módulo de BCT I.

Debido a los resultados obtenidos de este pilotaje con los alumnos, se decidió aumentar la concentración de las diluciones de plasma, proteínas totales y utilizar albúmina estándar. Para ello se realizó una nueva corrida utilizando las concentraciones presentadas en la Tabla 4:

Tabla 4- Diluciones para las muestras que se usaran en electroforesis de proteínas.

Muestra	Dilución en NaOH 0.1N
Plasma sanguíneo	1:200; 1:400; 1:600; 1:800; 1:100
Proteínas Totales	1:10; 1:20
Albúmina estándar(100mg/mL)	5:20
Albúmina	1:10

Se preparó nueva solución de Azul de Comassie R-250 al 0.1% siguiendo las siguientes proporciones:

- 50% metanol
- 7% ácido acético glacial
- 43% agua destilada
- 0.1% azul de Comassie

Además se cambió la solución desteñidora a una nueva proporción quedando de la siguiente manera:

- 500 mL de Metanol
- 20 mL de Ácido Acético
- 480 mL de Agua destilada.

Una vez finalizado el corrimiento de las muestras se tiño en azul de Comassie durante 1 h y se destiño durante 30 min.

Se decidió cambiar el agente reductor (β -mercaptoetanol) por Ditiotreitol (DTT) al 0.1M y correr un gel sin presencia de agente reductor, esto para observar si existía una diferencia apreciable en el corrimiento de las muestras y cuál era la mejor

opción a usar durante la realización de la técnica. Se colocaron 30 μ L de muestra en cada pocillo, usando las diluciones según Tabla 4. Se usó Azul de Comassie G-250 al 0.1% (Se preparó en una proporción de 0.1:50:10:40, Azul de Comassie G-250: metanol: ácido acético: agua) para teñir ambos geles durante 30 min. Posteriormente se destiñeron durante 30 min.

Se realizó una nueva corrida usando DTT como agente reductor usando diluciones recién preparadas con las concentraciones de la tabla 3. Un gel se tiñó durante 15 min y el otro durante 30 min, ambos desteñidos durante 30 min.

Una vez analizados los geles se realizaron los ajustes necesarios a la práctica actualizada de electroforesis de proteínas quedando redactada como se indica en el *anexo 1*.

Esta práctica fue probada por profesores de BCT I. Se realizaron los ajustes indicados por los profesores y se corrieron nuevamente cuatro geles, dos geles con una concentración del 10% del gel separador y dos geles con una concentración del 8% del gel separador (Tabla 5), para observar si había una diferencia apreciable entre ellos. Además se realizó un nuevo ajuste a las concentraciones de las muestras (Tabla 6), siguiendo las recomendaciones hechas durante el curso obteniéndose los siguientes resultados: Fig.14, Fig. 15, Fig.16 y Fig.17.

Tabla 5. Orden de adición y cantidades para preparación de gel separador.

Reactivos	Gel separador 8% (10 mL)
Agua destilada	4.6 mL
Acrilamida-bisacrilamida 30%	2.7 mL
TRIS 1M pH 6.8	2.5 mL
SDS10%	0.1 mL
Persulfato de amonio 10%	0.1 mL
TEMED	0.006 mL

Tabla 6. Preparación de muestras para electroforesis de proteínas.

Muestra	Cantidad de muestra	Volumen añadido de NaOH 1N
Plasma	10 µL	90 µl
Proteínas totales	10 µL	90 µL
Albúmina	10 µL	90 µL
Albúmina estándar	2 µL	78 µL
Globulinas	20 µL	80 µL

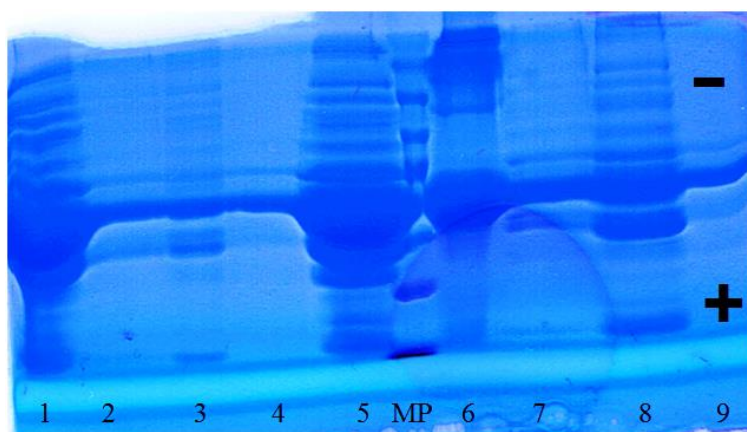


Fig. 14- Gel de electroforesis cámara 1, teñido en azul de Coomassie. Gel separador al 10%. MP=Marcador de peso molecular; 1,5=Plasma; 2,7= Proteínas totales; 3,8= Globulinas; 4,9= Albúmina; 6= Albúmina estándar.

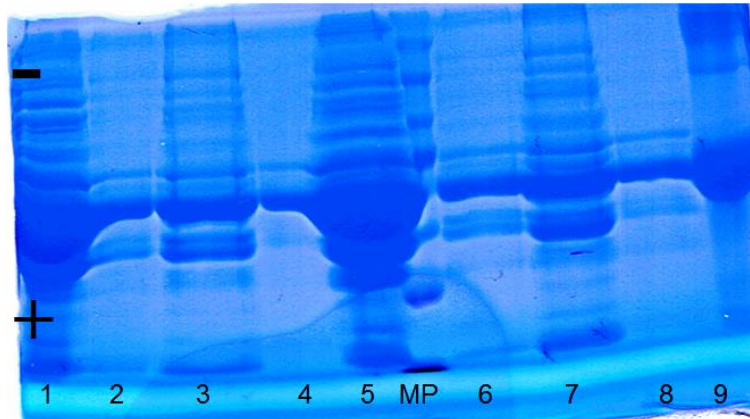


Fig. 15- Gel de electroforesis cámara 1, teñido en azul de Comassie. Gel separador al 10%. MP=Marcador de peso molecular; 1,5=Plasma; 2,6= Proteínas totales; 3,7= Globulinas; 4,8= Albúmina; 9= Albúmina estándar.

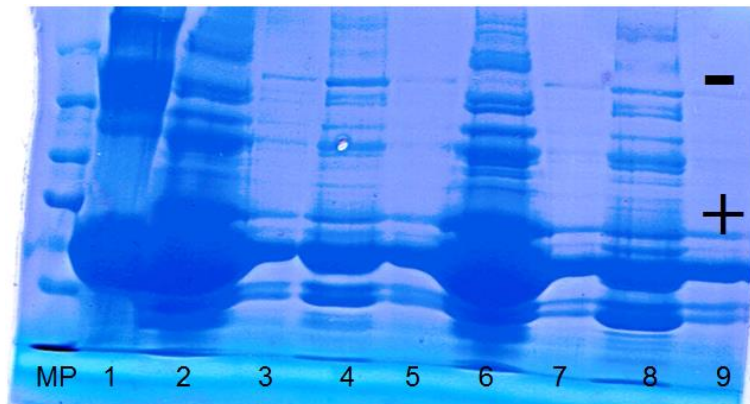


Fig. 16- Gel de electroforesis cámara 1, teñido en azul de Comassie. Gel separador al 8%.
MP=Marcador de peso molecular; 1= Albúmina estándar; 2,6=Plasma; 3,7= Proteínas totales; 4,8= Globulinas; 5,9= Albúmina.

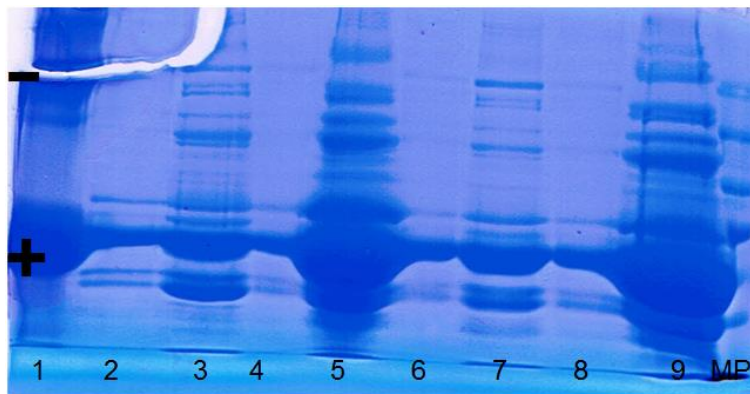


Fig. 17- Gel de electroforesis cámara 1, teñido en azul de Comassie. Gel separador al 8%.
MP=Marcador de peso molecular; 1= Albúmina estándar; 2,6= Albúmina; 3,7= Globulinas; 4,8= proteínas totales; 5,9= Plasma.

El resultado obtenido se comparó con lo reportado en la bibliografía (Fig. 18), encontrándose una buena separación por lo cual se procedió a realizar las correcciones necesarias, para obtener la versión final de la práctica de electroforesis para el Laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (Fig. 19).

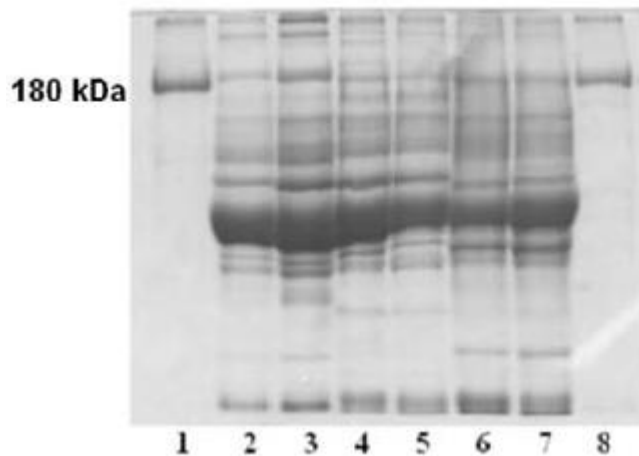


Fig. 18-SDS PAGE de plasmas de animales normales (N) y en el último tercio de la gestación (G). 1= α_2 M humana purificada; 2=plasma humano N; 3= plasma humano G; 4= plasma ovino de pelo N; 5= plasma ovino de pelo G; 6; plasma bufalino N; 7= plasma bufalino G; 8= PZP humana purificada.

BARRERA, Daniel I; GIRALDO, Jorge H; CARLOS M, Duque and ARBELAEZ, Luis F. Identificación electroforética de α_2 -macroglobulina en plasma de ovino de pelo (Ovisaries) y búfalo (Bubalus bubalis). Rev Colomb CiencPecua [online]. 2007, vol.20, n.3 [cited 2016-02-09]. pp. 304-311.)



Fig. 19- Prácticas realizadas para el laboratorio del módulo de BCT I

Resultados de preparaciones permanentes para la práctica de Mitosis.

Para la realización de las preparaciones permanentes se procedió a seleccionar las preparaciones que realizaron los alumnos del módulo de BCT I durante la práctica de Mitosis (Fig. 20).

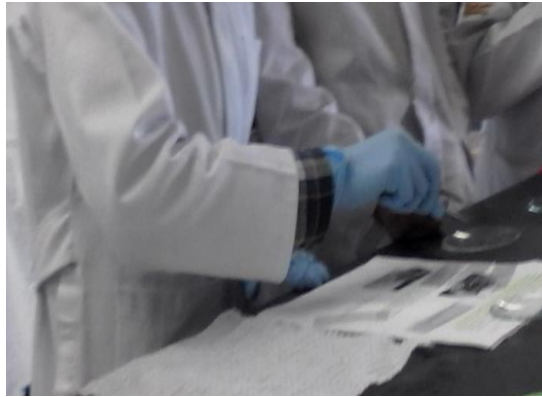
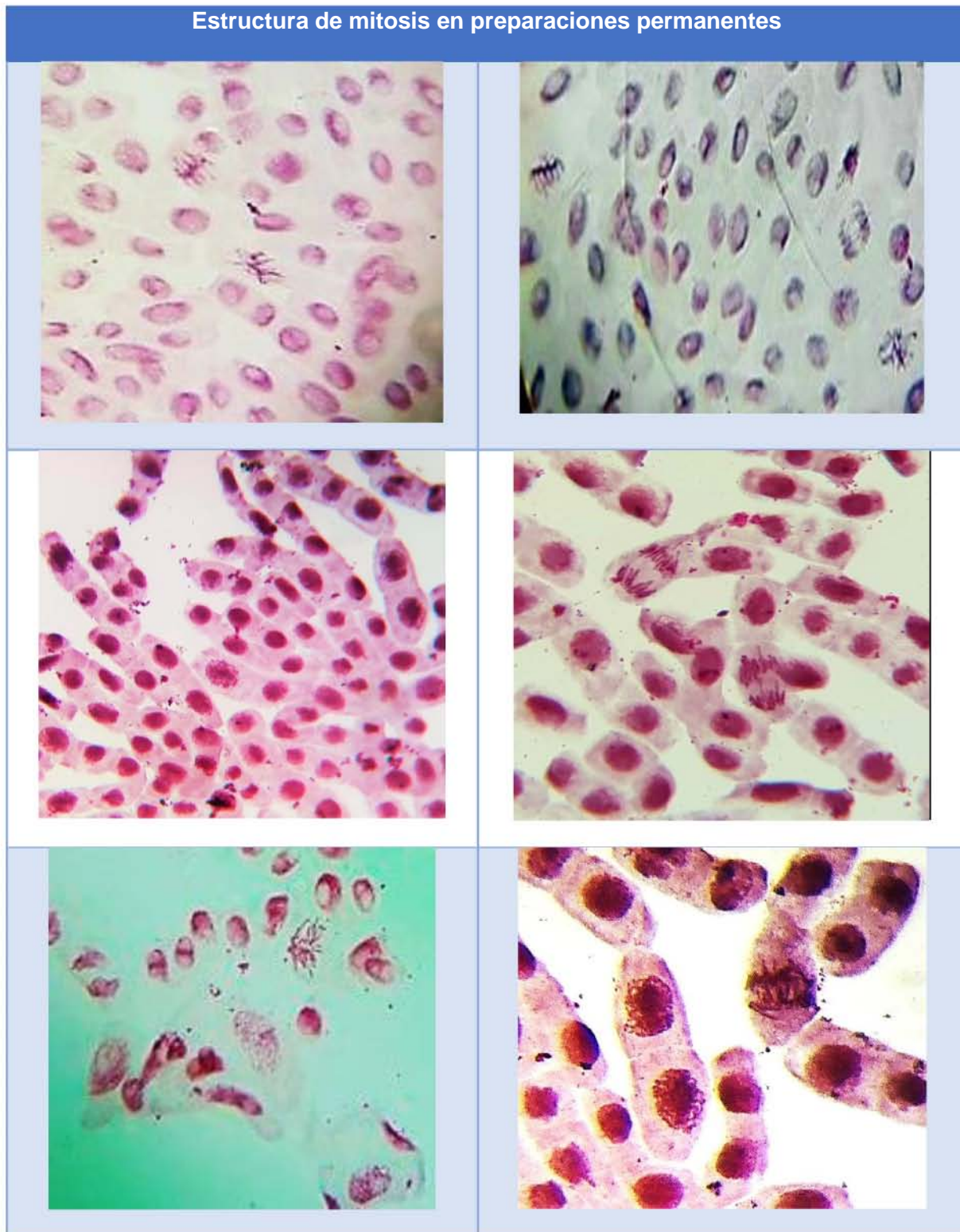


Fig. 20-Realización de preparaciones para la práctica de mitosis por los alumnos de BCT I.

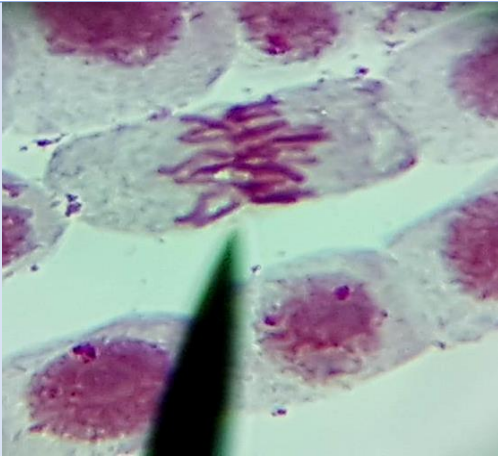
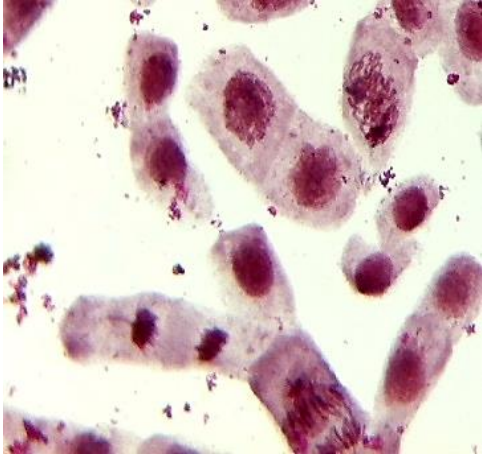
Las preparaciones permanentes se hicieron según lo previsto en el protocolo ya existente⁴⁵. Pero debido a la poca practicidad de dicho protocolo se decidió realizar algunas adecuaciones al mismo y se redactó un nuevo protocolo (*ver anexo 2*).

Con este nuevo protocolo se realizaron nuevas preparaciones permanentes que se observan en la Tabla 7, para ello se usó un objetivo de 40X y se realizó un acercamiento.

Tabla 7- Preparaciones permanentes observadas a 40 X con acercamiento, tinción con Acetocarmín.



Estructura de mitosis en preparaciones permanentes



Estas estructuras se compararon con las reportadas en la bibliografía (Fig. 21) y se observó que en las preparaciones permanentes realizadas se pueden observar las diferentes fases de la mitosis vegetal.

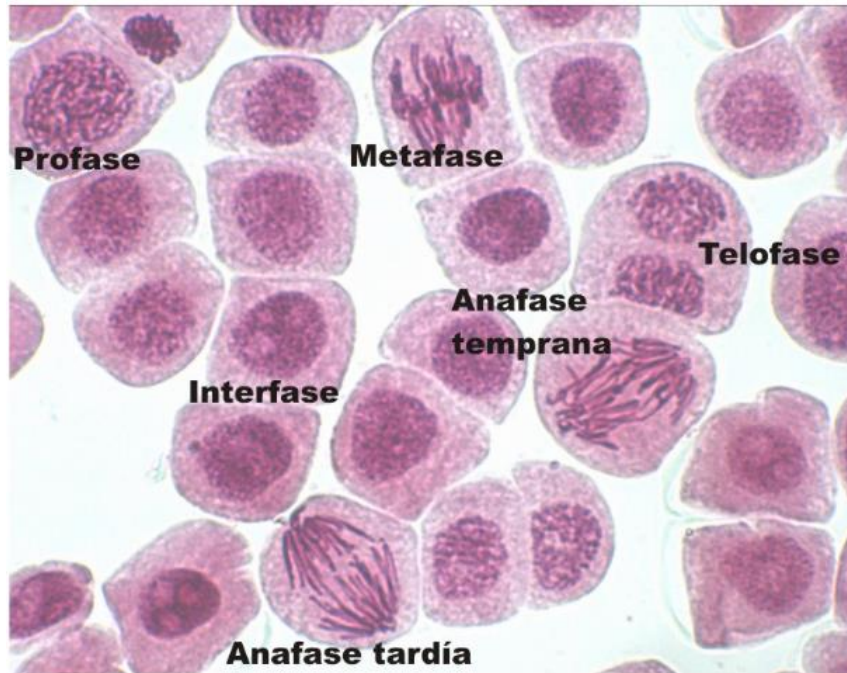


Fig.21- Fases de la mitosis en tejido meristemo de la raíz de cebolla

(<http://www.cunoc.edu.gt/medicina/Biologiamitosis24y252015.pdf>)

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

El uso de pruebas clínicas como electrocardiogramas, bioquímica sanguínea, los exámenes endoscópicos, electroencefalogramas, la electroforesis, etc., representan un apoyo primordial para el área médica, ya que a través de los análisis realizados en ellos se pueden diagnosticar diferentes patologías y establecer el tipo de tratamiento que se debe administrar al paciente⁴⁶. Así como la relevancia de estas metodologías en el área de investigación.

De ahí la importancia que tiene que los alumnos de la carrera de QFB no sólo conozcan dichas técnicas de manera teórica sino que también realicen los procedimientos de tal manera que estén en contacto directo con los equipos, comprendan su manejo e interpreten los resultados.

Por consiguiente, siendo el laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I que se imparte en 4° semestre de la carrera de QFB en la FES Zaragoza, para la mayoría de los alumnos su primer contacto con pruebas clínicas es indispensable contar con un manual de prácticas actualizado para que puedan obtener el conocimiento y las habilidades necesarias para desarrollarse en un futuro de manera profesional.

La electroforesis de proteínas representa una de las técnicas rutinarias dentro de un laboratorio clínico o de investigación por lo que es importante que el alumno se familiarice con dicha técnica, que, aunque el fundamento sigue siendo el mismo desde que fue propuesta, los equipos son modificados constantemente para hacer la técnica más eficiente, por lo cual en este trabajo se realizó la actualización de la práctica con equipo recién adquirido y adaptándolo para fines de docencia.

De esta manera para comenzar a trabajar se inició con la revisión de manuales de los equipos y hojas de seguridad de los reactivos.

El primer paso fue la extracción de sangre en tubos con EDTA como anticoagulante, durante la primera corrida al realizar la extracción de sangre esta se encontraba lisada, pese a ello se decidió seguir trabajando con la muestra pues se quería observar si esto afectaba de manera determinante el corrimiento en el gel de electroforesis, no encontrándose variación. La separación de las proteínas plasmáticas se llevó a cabo separando primero el plasma por centrifugación, posteriormente por el método de "Salting out" agregamos sulfato de sodio para separar proteínas totales y éter etílico para obtener albúmina y globulinas, esto debido a que se pretende utilizar las muestras obtenidas por los alumnos en una práctica que realizan con anterioridad.

Para la primera corrida se usó un baño de hielo como se puede observar en la Fig. 13 esto fue con el fin de evitar el calentamiento producido por el mismo paso de corriente que nos podría provocar un fenómeno conocido como smiling (Fig. 22) que afecta el corrimiento de las muestras.

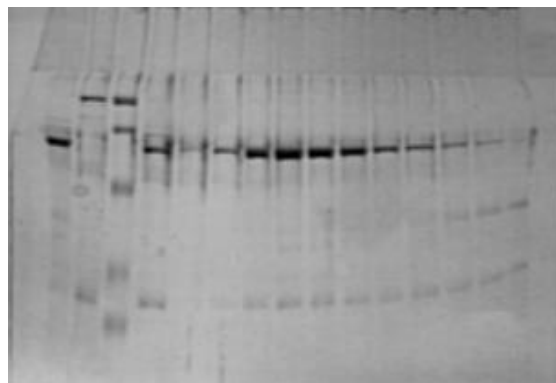


Fig.22- Gel de electroforesis en SDS-PAGE para proteínas mostrando el efecto "sonrisa" o smiling.

(<http://www.cas.vanderbilt.edu/bsci11a/protein-electro/protein-electro.htm>).

Debido a que la concentración de poliacrilamida es la que nos da el tamaño de poro; se optó por usar un gel concentrador al 5% que nos ayudara a alinear las muestras para que corran al mismo tiempo, un gel separador al 10% ya que es el reportado en diferentes protocolos⁴⁷ para proteínas plasmáticas.

La electroforesis en geles de poliacrilamida puede realizarse en el rango de pH de 2 a 11, sin embargo la desaminación de las proteínas o las reacciones hidrolíticas pueden ser severas a valores de pH inferiores a 3 y superiores de 10, para este caso se usó un pH de 8.3 para el buffer de electroforesis.

El buffer empleado para la preparación del gel separador se ocupó con un pH de 8.8, debido a que la mayoría de las proteínas con puntos isoeléctricos comprendidos entre pH 4 y 7,5, son separadas en geles con pH entre 8 y 9.

Para la preparación de las muestras se empleó buffer de Laemli el cual contiene TRIS como regulador de pH, SDS como agente desnaturizante (al unirse a las moléculas de proteínas este les conferirá una carga negativa), azul de bromofenol que nos indica el frente de corrimiento de las muestra, glicerol que le otorga peso a la muestra para que esta se encuentre depositada en los pocillos y no difunda en el medio además de β -mercaptoetanol como agente reductor de enlaces disulfuro ayudando a la desnaturalización completa de las proteínas y separando las subunidades siempre y cuando éstas se encuentren unidas por enlaces disulfuro.

El marcador de peso molecular empleado es de la marca BIO-RAD® cat #161-0375 (Fig. 23), este contiene una mezcla de proteínas con pesos moleculares distintos las cuales se encuentran marcadas con colorantes, lo que al separarse permite observar las bandas que indican el peso molecular en KDa, esto facilita a los alumnos la visualización del avance del corrimiento y la interpretación de los resultados.

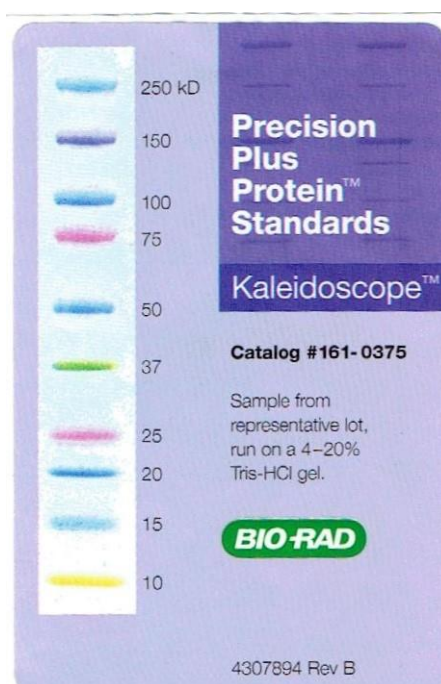


Fig. 23- Inserto del Marcador de peso molecular usado en electroforesis de proteínas.

Se usó azul de Comassie para la tinción de los geles durante 1 h y se dejó en solución desteñidora durante 24 h, donde sólo pudo observarse la banda de albúmina cuyo peso molecular es de 69 KDa.

Las muestras se conservaron en congelación para su conservación y se volvieron a correr después de 3 semanas observándose al final de la destinción que las muestras se encontraban degradadas, podemos decir que el sistema se

encontraba en condiciones óptimas ya que el marcador de peso molecular si presentó el corrimiento esperado. Cabe destacar que se redujo el tiempo de destinción a 1 h, aunque no se encontró presencia de muestras en los geles se decidió iniciar un tratamiento de conservación para observar su funcionalidad (se han observado durante 6 meses y no se han notado signos de degradación o contaminación en dichos geles).

Para la tercera corrida se emplearon muestras nuevas de plasma, además se colocó un estándar de albúmina y un blanco de reactivos para descartar alguna interferencia debida a ellos. Asimismo con el fin de ajustar los tiempos para las sesiones de laboratorio (4 hrs cada sesión), se probó detener el corrimiento del gel separador a la mitad del tiempo (una hora) y guardar el tanque sin la tapa en refrigeración hasta el día siguiente, de ésta manera continuar el corrimiento en la siguiente sesión y realizar los pasos posteriores para visualizar las bandas que nos indican la separación de las proteínas plasmáticas.

La cuarta corrida se realizó con un cambio en las concentraciones de las muestras debido a que en todos los geles anteriores sólo se observaba de manera clara la banda de albúmina, y aunque en esta corrida se pueden observar algunas bandas de manera tenue en la zona de α_1 y la correspondiente a la prealbúmina por su peso molecular de 62 KDa, no se observaron las bandas de las otras globulinas; aun así se decide probar un pilotaje con los alumnos del laboratorio de BCT I, esto con el fin de ver los pasos cruciales para los alumnos ya que hay que recordar que aún no poseen ciertas habilidades y eso quedó demostrado durante este pilotaje, pues la mayoría de los equipos al hacer las diluciones no colocaron de manera

adecuada la muestra ya que no están familiarizados con el uso de las micropipetas.

Durante la quinta corrida se decidió realizar una curva de concentraciones (Tabla 4) para observar cuál sería la mejor dilución a usar, debido a que ninguna mostró el resultado deseado, nuevamente se ajustaron las diluciones según la Tabla 4, tanto los geles como las diluciones de las muestras se dejaron en refrigeración durante una semana. Se cambió el agente reductor (β - mercaptoetanol) por DDT al 0.1M y el otro gel se realizó en condiciones no reductoras, esto con el fin de observar cuál nos permitiría una mejor observación de las bandas electroforéticas, además de preparar Azul de Comassie nuevo ya que la concentración de este podría haber variado y esto podría estar afectando la tinción. Después de realizar todo el corrimiento y los tratamientos de tinción-destinción no se encontró presencia de proteínas (sólo se observa la albúmina estándar que se preparó el día del corrimiento y sólo se encuentra definida la banda con el uso de agente reductor), esto debido a que las proteínas no son estables en dilución con NaOH durante mucho tiempo, por lo que se decidió que las muestras deben de ser preparadas el mismo día o uno antes del corrimiento.

La sexta corrida sólo se realizó con DTT al 0.1M como agente reductor, al usar este agente reductor la muestras tiene signos de degradación, además de que no son tan definidas como lo son con el uso de β -mercaptoetanol, la preparación de dicho reactivo es más laboriosa así como su conservación debido a su poca estabilidad, por lo que se opta por seguir trabajando con β -mercaptoetanol como agente reductor.

Durante el curso realizado con los profesores de BCT I se detectaron algunos problemas con el manejo de las muestras al llevar a cabo el tratamiento (después de añadir el buffer de Laemli a las muestras, éstas deben de ser inmediatamente colocadas en el baño maría a 95° C, esto con el fin de evitar la degradación de las proteínas). También el tiempo de uso de los reactivos ya que hasta este momento no se habían vuelto a preparar, se decidió cambiar el tiempo de tinción a 30 min y de destinción a 1 h o hasta obtener la coloración deseada (variable dependiendo del resultado de la tinción) y por último un nuevo ajuste a las diluciones quedando como se indica en la Tabla 6, estas concentraciones fueron calculadas a partir de la concentración teórica de cada proteína en plasma (albúmina, α , β y γ globulinas) de una persona “sana” con el fin de observar todas las bandas electroforéticas.

Con estos ajustes se realizó una nueva corrida con reactivos recién preparados, con las diluciones indicadas en la Tabla 6, los resultados observados en las figuras 14, 15, 16 y 17 muestran que estas concentraciones permiten observar las bandas electroforéticas de albúmina, la zona de α , β y γ globulinas. Asimismo, se variaron las concentraciones de poliacrilamida en el gel separador, se utilizó al 10% (Fig. 14 y 15) y al 8% (Fig. 16, 17), con la finalidad de determinar con que gel la separación es mejor. Habiendo terminado la corrida y tratamientos posteriores, se pudo observar que los geles separadores preparados al 8%, presentan una mejor separación de las bandas electroforéticas, sin embargo al ser tan delgados son poco adecuados con fines docentes debido a que los alumnos aún no consiguen la destreza requerida para su manejo, por lo que se dejó planteado en la práctica el uso de geles separadores al 10% que si bien no tienen tan buena

separación son más fáciles de manejar. Además, se propuso una nueva forma de conservación de los geles que resulta más segura para los alumnos ya que sólo se necesita agua destilada como reactivo.

Con los resultados obtenidos en este último corrimiento se efectuaron los ajustes a la práctica, anotaciones y aclaraciones, con el fin de que la realización de la práctica por los alumnos sea ejecutada sin problemas operativos y asimismo, sirva como base de conocimiento para el futuro desarrollo académico y profesional de los alumnos de QFB.

Siguiendo con el objetivo de crear material que ayude a los alumnos con su aprendizaje se realizaron preparaciones permanentes para la práctica de mitosis, éstas serán empleadas cuando los alumnos que a pesar de haber tratado sus muestras de la manera correcta no observan en el microscopio las estructuras que la práctica requiere.

Para lograr lo anterior se modificó un protocolo ^{45,46} ya existente, se realizaron pruebas y se redactó uno nuevo (*véase anexo 2*), que resulta más fácil de trabajar. En la Tabla 7 se muestran las imágenes obtenidas y se observa que debido al tratamiento que se realiza a las preparaciones éstas sufren cambios, como la disminución del tamaño de las células por deshidratación, cambio de tonalidad del colorante debido a los disolventes utilizados, además si la técnica de “squash” no es realizada de manera correcta la muestra tiende a desprenderse del porta-cubreobjetos, lo que significa su pérdida.

Es importante tener en cuenta la calidad de los reactivos utilizados ya que por ejemplo, si el bálsamo de Canadá no se encuentra en buen estado, el cubreobjetos se desprende al limpiar la preparación con etanol absoluto.

Para todas las preparaciones se utilizó una placa de calentamiento en 30 °C (se recomienda el uso de estufas), lo que provocó que se necesitara mayor cantidad de tiempo para el secado de las preparaciones.

Pasos críticos a cuidar

Electroforesis de proteínas plasmáticas.

- Para la práctica de electroforesis, se requiere que los distintos buffers utilizados sean constantemente renovados (reutilizar el buffer de electroforesis máximo cuatro veces con el fin de no aumentar el tiempo de corrimiento debido a la pérdida de iones del buffer).
- Cuando sea necesario ajustar el número de sesiones de laboratorio, se recomienda preparar los geles de electroforesis y guardarlos sin retirarlos del soporte de fundición, colocarlos dentro de una bolsa de plástico que contenga sanitas humedecidas con agua destilada, cerrar perfectamente la bolsa y colocar en refrigeración (máximo 4 días).
- Sólo detener el corrimiento si es muy necesario, ya que el azul de bromofenol difunde en el medio y ya no será posible observar el frente de corrimiento una vez que se reinicie (sin embargo, aún si no se ve el frente de corrimiento es posible observar la muestra después de la tinción), para conservar el sistema, guardar sólo el tanque con los geles y el buffer, **sin tapa** dentro del refrigerador.
- Emplear agua desionizada al preparar los geles, para evitar algún cambio de pH.
- Ser muy cuidadoso al realizar las diluciones, ya que un mal manejo se verá sólo al haber concluido toda la técnica.
- Si un carril no contiene muestra colocar buffer de Laemli, esto evitará que las muestras de los demás carriles difundan hacia un carril vacío.

- Durante todo el corrimiento de la muestra vigilar la temperatura del sistema.

Realización de preparaciones permanentes.

- Para la realizar las preparaciones permanentes, usar reactivos en buen estado.
- Para un secado de preparaciones más rápido, utilizar estufa en lugar de placa de calentamiento.

CONCLUSIONES

- I. Se actualizó la práctica de Electroforesis de proteínas de plasma sanguíneo (albúmina y α , β , γ globulinas) para el Laboratorio del módulo de BCT I utilizando una cámara Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems de BIO-RAD, redactándose un protocolo.
- II. Durante el pilotaje de la práctica de electroforesis con los alumnos, se logró detectar los puntos críticos de la misma, de tal manera que se tomaron en cuenta estos puntos para la redacción del protocolo propuesto.
- III. El realizar la práctica de electroforesis de proteínas plasmáticas, en el laboratorio de docencia, apoyará a los estudiantes a desarrollarla adecuadamente y familiarizarse con su aplicación en laboratorios de análisis clínicos y de investigación. Obteniendo herramientas para lograr una formación más acorde al campo profesional.
- IV. Con el curso para profesores del módulo de BCT I, se obtuvieron propuestas para mejorar el protocolo y hacerlo más funcional para ser utilizado con los alumnos del Laboratorio de BCT I.
- V. Se elaboró un protocolo para la realización de preparaciones permanentes útiles en la práctica de mitosis para el módulo de BCT I.
- VI. Se prepararon laminillas fijas, mediante técnicas de tinción y conservación para su observación en el microscopio para el laboratorio de BCT I, que se utilizarán como apoyo a la práctica de mitosis.

REFERENCIAS

- 1- García HP. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Universo Diagnóstico [Internet].2000. [citado mayo 2015];1(2): pp. 31-41. Disponible desde: http://bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.htm
- 2- Bioquímica [Internet]. España: Universidad de la Laguna, Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular [citado mayo 2015]. Disponible desde: <http://bioquibi.webs.ull.es/practicas/4.pdf>.
- 3- Lab Test online [Internet]. España: American Association for Clinical Chemistry [citado mayo 2015]. Disponible desde: <http://www.labtestsonline.es/tests/Electrophoresis.html?tab=3>.
- 4- Microscopía. Servicio de Apoyo a la investigación (SAI) [Internet]. España: Universidad de Murcia [citado mayo 2015]. Disponible desde: <https://sumsaiumu.wordpress.com/trabajo/tecnicas-2/>. Microscopia.
- 5- Ananya M, What is Molecular Biology?[Internet]. News Medical; 2014. [citado octubre 2015]. Disponible desde: <http://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Molecular-Biology>
- 6- Gallagher RS, One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins. Current Protocols in Molecular Biology. California; 2012.
- 7- Lomonte B. Inmunología general: Manual de laboratorio. 3ª ed. Costa Rica: 2009. Capítulo 13, Electroforesis en gel de poliacrilamida; 92-101.
- 8- Cultek. Soluciones Electroforesis. Protocolo y Técnicas. 2006. pp. 1-17.
- 9- Arboledas Brihuega, D. Jerarquía estructural de las proteínas. San Vicente [del Raspeig], Alicante: Club Universitario; 2011.
- 10-Bioquímica interactiva [Internet]. México: Facultad de Medicina [citado mayo 2015]. Disponible desde: <http://laguna.fmedic.unam.mx/~3dmolvis/proteina/>.
- 11-Teijón MR. Bioquímica estructural. Conceptos y test. 2ª ed. España: Editorial Tebar; 2001.
- 12-Contreras MB, Estructura de macromoléculas. [Internet]. Universidad Nacional Autónoma de México; 2006. [citado octubre 2015]. Disponible

desde:http://www.ccg.unam.mx/~contrera/estructura_macromoleculas/node9.html

- 13-Navas MJ, Bioquímica Estructural y Metabólica, Tema 3. Proteínas: composición y estructura.[Internet]. Universidad de Cantabria; 2011. [citado octubre 2015]. Disponible desde: <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/bioquimica-estructural-y-metabolica/pdf>
- 14-Melo Ruiz, V. and Cuamatzi Tapia, O. Bioquímica de los procesos metabólicos. Barcelona: Reverté; 2007.
- 15-Estructura secundaria de las proteínas. [Internet]. Facultad de Química, UNAM; 2011. [citado octubre 2015]. Disponible desde:http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/1.2.ESTRUCTURA2,3,4,PLEGAMIENTO_24469.pdf.
- 16-Sadava D. Life, the science of biology. Sunderland, MA: Sinauer Associates; c2008.
- 17-Voet D, Voet JG, Pratt CW. Fundamentos de Bioquímica: la vida a nivel molecular. 2ª ed. Buenos Aires: Médica panamericana; 2009.
- 18-Brandan N, Llanos C, Barrios M, Escalante A, Ruiz D. Proteínas plasmáticas. Buenos Aires: Universidad Nacional del Nordeste; 2008.
- 19-Koolman J, Rohm K, Reschetov P, Corkina T. Naglyadnaiabiochimiya. Moskva: Mir; 2000.
- 20-Biblioteca digital de la Universidad de Chile, Proteínas plasmáticas [Internet]. Chile: Universidad de Chile [citado mayo 2015]. Disponible desde: <http://www.bibliotecadigital.uchile.cl/client/sisib>.
- 21-García Pérez HM, Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Laboratorios Beterá; 2000.
- 22-Dunbar B. Protein blotting. Oxford: IRL Press at Oxford University Press; 1994.
- 23-Chávez Planes MA, Díaz Brito J, Pérez U, Delfín J. Temas de enzimología. Tomo 2. Facultad de Biología Universidad de La Habana, 1990.
- 24-Nochumson S, inventors; FMC Corporation, assignee. Polyacrylamide cross-linked with a polysaccharide resin as electrophoretic gel medium. US patent 4, 542,200. 1985Sep 17.

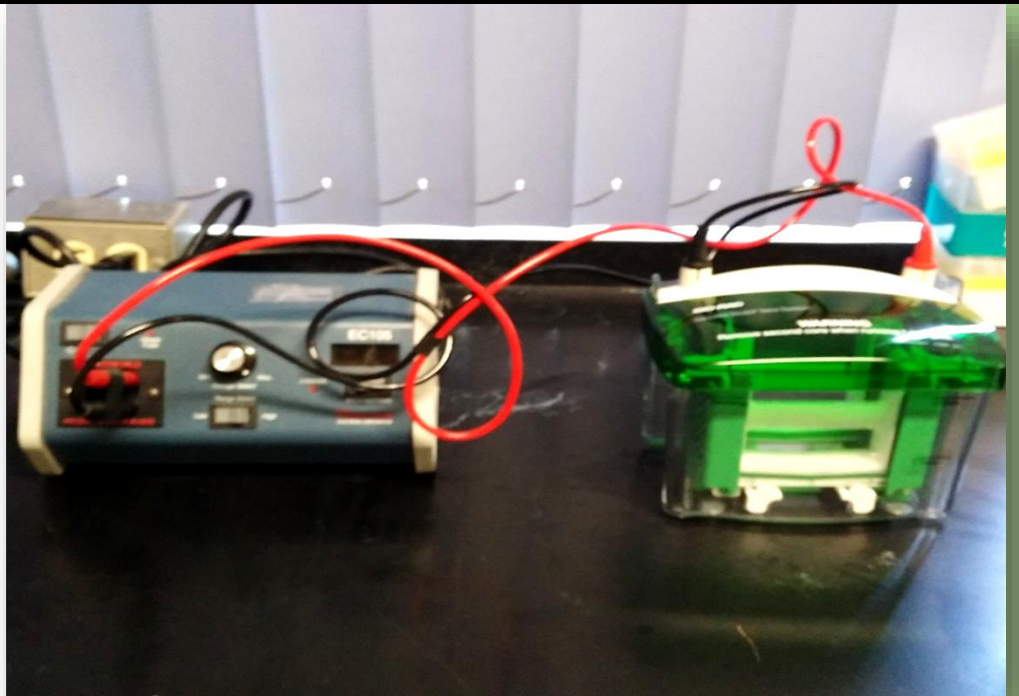
- 25-Biomodel.uah.es. Técnicas de laboratorio en bioquímica [Internet]. 2016 [citado Octubre 2016]. Disponible desde: <http://biomodel.uah.es/tecnicas/inicio.htm#elfo>
- 26-García HM. Adaptación de geles de poliacrilamida a sistema PhastSystem. [Tesis de Maestría.] Facultad de Biología UH. Diciembre del 2000
- 27-Yábar C. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Serie de Normas Técnicas N. 38 [Internet]. Lima; Instituto Nacional de Salud. Lima; 2013.[citado mayo 2015]. Disponible desde: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/contenido/4691.pdf>.
- 28-Montalvo Arenas CE. Microscopia. Facultad de Medicina [Internet].2010, Agost.[citado mayo 2015]: pp. 1-18. Disponible desde: http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/2_microscopia.pdf
- 29-Ubero Pascal N. Técnicas de microscopias aplicadas a ciencias forenses [Internet]. España: Universidad de Mursia [citado mayo 2015]. Disponible desde: <http://ocw.um.es/gat/contenidos/ubero/microscopia.pdf>
- 30-Montalvo Arenas CE. Técnicas Histológicas. Facultad de Medicina [Internet].2010, Agosto.[citado mayo 2015]: pp. 1-12. Disponible desde: http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/3_tecnica_histologica.pdf.
- 31-ISO 9000:2015, Sistemas de gestión de la calidad-fundamentos y vocabulario.
- 32-The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. EURACHEM Guide[Internet]. 1998. [citado octubre 2015]. Disponible desde: <http://www.eurachem.ul.pt/>.
- 33-NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.

- 34-Lazos MR, Hernández GI. La validación de métodos: un enfoque práctico. Simposio de metrología; 2004.
- 35-Ruisánchez I, Trullols F, Ruis XF. Validación de métodos analíticos cualitativos. Universitat Rovira i Virgili. 2002.
- 36-Hernández A., Vicente, León V., Alfredo De, Sánchez R., Juan Francisco, Marroquín S., Rubén, Sánchez G., Elizabeth Guadalupe, Mora G., José Luis Alfredo, Islas P., Valentín, Koch, Wolfhard, Tejeda R., María Elena, Validación de métodos analíticos no cuantitativos. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas [internet] 2010, 41 (Abril-Junio) : [citado: octubre 2015] Disponible en:<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57914151003> ISSN 1870-0195
- 37-Daniels W.W. Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. 4a Ed. LimusaWiley, México cap. 13. Estadística no paramétrica y de libre distribución; 2008.
- 38-Beth D.S., Trapp R.G. Bioestadística Médica. 3a Ed Manual Moderno México; 2000, pp 275-288.
- 39-Sánchez R.J.F., Mora G.J.L.A., Hernández A.V.J. Validación de Métodos Analíticos. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM; 2006.
- 40-Alemán Suarez JD, Mata Mendoza MA. Guía para la elaboración de un manual de prácticas de laboratorio, taller o campo: asignaturas teórico prácticas. Universidad Autónoma de Chapingo; 2006.
- 41-Pessoa, De C. A. M. El nuevo paradigma de la didáctica de las ciencias experimentales. Pensamiento Educativo; 2002: pp. 295.
- 42-Zabalza, V. A. La práctica educativa. Cómo enseñar. Ed. Graó; 2000.
- 43-Zabalza, M., y Marcelo, C. Evaluación de prácticas: Análisis de los procesos de formación práctica. Sevilla. GID; 1993.
- 44-Aguilar-Santelises L, García del Valle A, Corona-Ortega MT. Manual de prácticas de Bioquímica Celular y de los Tejidos Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.
- 45-García-del Valle A. Prácticas de Laboratorio Integral de Biología I. México: ENEP Zaragoza, UNAM: 1989, pp 136-137.

- 46-Lastra U, Delgado M, Marulanda A, Estandarización de la técnica citogenética "squash" para conteo de cromosomas mitóticos en *Rubus glaucus benth. scientia Et Technica* [internet] 2010, XVII: [Fecha de consulta: octubre de 2016] Disponible desde: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84920977013>
- 47-Ministerio de salud pública y asistencia social. Manual de Procedimientos Técnicos de Laboratorio clínico del primer nivel de atención. El salvador; 2007.
- 48-Sambrook J, Russell DW. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. 2006.

Anexo 1: Práctica actualizada de electroforesis de proteínas plasmáticas.

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS



*“Las ciencias aplicadas no existen, sólo las aplicaciones de la ciencia ”
Louis Pasteur*

Objetivos

- Separar las proteínas plasmáticas, mediante la técnica de electroforesis vertical en poliacrilamida (PAGE-SDS) en un equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems de BIO-RAD.
- Manejar adecuadamente el equipo y reactivos necesarios para realizar la electroforesis PAGE-SDS.
- Identificar el tipo de proteína al que corresponden cada una de las bandas observadas en el gel de electroforesis.

Antecedentes académicos

- Estructura de las proteínas.
- Métodos de purificación de proteínas.
- Carga eléctrica de las proteínas.
- Fundamento de la técnica de electroforesis.
- Proteínas presentes en el plasma sanguíneo.

Introducción

Las proteínas se encuentran presentes en todas las estructuras de la célula y son las moléculas más activas en la vida celular. Las proteínas son sustancias complejas formadas necesariamente por los elementos: C, H, O, N, S y en algunos casos fósforo. Son de alto peso molecular (entre 5000 a varios millones de Daltons), forman dispersiones coloidales y están compuestas por L-alfa-aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos (20 aminoácidos), arreglados en secuencia lineal y se pliegan en una notable diversidad de formas tridimensionales, que les proporcionan una correspondiente variedad de funciones.

Debido a que su conformación se mantiene por fuerzas débiles, es fácilmente alterada por un ligero cambio de pH, temperatura o disolventes. Son muy reactivas ya que tienen muchas cadenas laterales con restos de aminoácidos con grupos aniónicos o catiónicos. Asimismo, la hidrólisis parcial de una proteína se realiza por medio de ácidos, bases o enzimas para la obtención de moléculas más pequeñas, por otro lado con una hidrólisis total se obtienen los aminoácidos que la componen.

La electroforesis constituye una parte importante del procedimiento rutinario del análisis de proteínas, ya que es un método analítico-semipreparativo cuyo principio básico consiste en la migración de las moléculas a través de un gel u otro tipo de matriz de naturaleza porosa, en el cual, por acción de un campo eléctrico, serán separadas de acuerdo a su tamaño o peso molecular. Para controlar el avance de la separación de las moléculas en la matriz y establecer un patrón de fragmentos, las moléculas deberán ser teñidas con diferentes colorantes. Estos pasos facilitan la visualización de las moléculas a manera de simples bandas las cuales serán posteriormente analizadas e interpretadas.

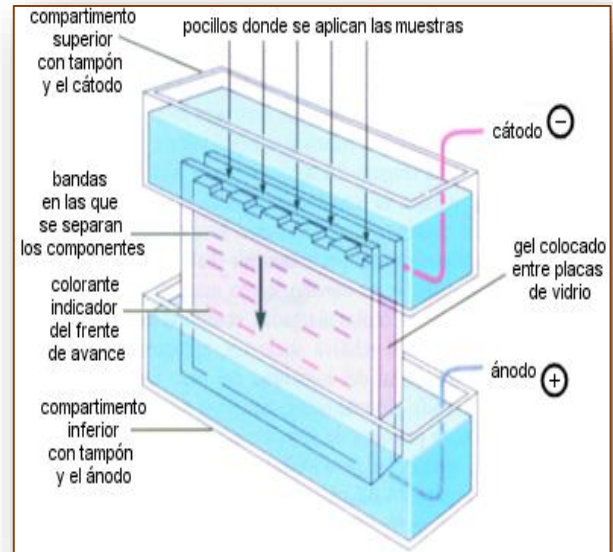


Fig. 1- Esquema de una electroforesis vertical.
(<http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/>)

La electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida (PAGE, 'polyacrilamide gel electrophoresis') es sin duda alguna una de las técnicas más ampliamente usadas para caracterizar mezclas complejas de proteínas (aunque existen otras variantes como la electroforesis capilar, isoelectroenfoque, electroforesis en dos dimensiones, etc.). La electroforesis en poliacrilamida es un método conveniente, rápido y económico a nivel de muestra ya que se requieren sólo cantidades del orden de microgramos de proteína.

Las proteínas presentan una carga eléctrica neta que depende del contenido de una serie de aminoácidos (fundamentalmente ácido glutámico, ácido aspártico, lisina, arginina e histidina) y del grado de ionización de éstos al pH del medio en el que se encuentren. Si se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoeléctrico tienen la propiedad de desplazarse cuando se someten a un campo eléctrico.

En los soportes no restrictivos, la separación depende de la densidad de carga de las moléculas y, así, cuanto mayor sea la densidad, mayor será la velocidad de migración en un campo eléctrico hacia el polo que determine su carga neta. Asimismo la velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa más rápida será la migración. Una ventaja importante de los geles de poliacrilamida es que son químicamente inertes, transparentes y estables en un rango amplio de pH, temperatura y fuerza iónica.

Luego de la electroforesis, las bandas separadas pueden visualizarse en el gel si se sumergen en una solución de un colorante (azul brillante de Comassie), que se une fuertemente a proteínas. Si las proteínas en la muestra son radioactivas, el gel puede secarse y luego apoyarse sobre una película sensible a los rayos X (autorradiografía). Si se cuenta con un anticuerpo contra la proteína de interés, se puede utilizar un proceso llamado inmunotransferencia o Western Blot.

Actualmente la electroforesis es utilizada mayormente en el ámbito clínico para identificar la presencia de proteínas anómalas, la ausencia de alguna de las proteínas normales o detectar anomalías en grupos de proteínas, ya sea que estén aumentados o disminuidos. De esta manera se permite orientar el diagnóstico hacia una enfermedad u otra. La presencia de una anomalía en un patrón electroforético raramente es diagnóstica por sí misma, aunque sí proporciona una pista.

Proteínas plasmáticas.

La sangre es un tejido que circula dentro de un sistema virtualmente cerrado, el de los vasos sanguíneos y se encuentra compuesta por elementos sólidos (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) suspendidos en un medio líquido, el plasma. El plasma está formado por agua, electrolitos, metabolitos, nutrientes, proteínas y hormonas.

En la actualidad se han aislado y caracterizado alrededor de 100 proteínas del plasma, sin embargo las funciones de una gran parte de ella permanecen aún desconocidas, la mayoría son glicoproteínas, presentando en algunos casos variaciones genéticas.

Las proteínas plasmáticas pueden clasificarse en los siguientes grupos o sistemas:

- Inmunoglobulinas.
- Sistema del complemento.
- Sistema de coagulación y fibrinólisis.
- Inhibidores de las proteinasas.
- Sistema de lipoproteínas.
- Proteínas de transporte.
- Proteínas de función desconocida.
- Enzimas y otras proteínas.

El plasma sanguíneo humano contiene normalmente 6.5 a 8.0 g/dL de diferentes proteínas con funciones específicas, que pueden ser separadas mediante diversas técnicas. Aún después de la precipitación de las proteínas, el plasma contiene todavía, cierta cantidad de ellas, llamadas proteínas residuales, provenientes del metabolismo de las sustancias nitrogenadas de los alimentos. Están formadas en un 50% por carbámidos, que son grupos amínicos libres unidos a anhídrido

carbónico, por aminoácidos (25%), creatinina, ácido úrico y otros componentes nitrogenados aún no bien identificados.

Las principales proteínas plasmáticas son: fibrinógeno, albúmina y globulinas, de estas últimas se conocen tres: alfa, beta y gamma.

El uso de la electroforesis permite, después de un proceso de tinción, la resolución de 5 bandas de proteínas plasmáticas. Designadas albúminas, y globulinas α_1 , α_2 , β y γ .

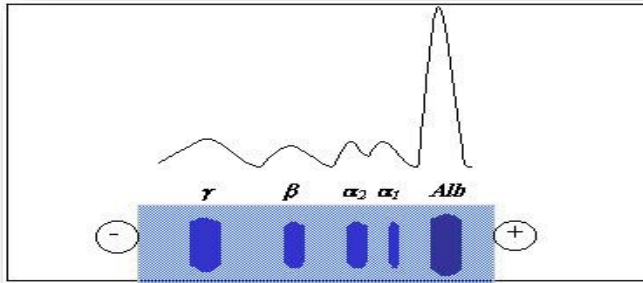


Fig. 2- Bandas de proteínas plasmáticas observadas en una electroforesis.

(<http://perso.wanadoo.es/sergioram1/Proteinas.htm>)

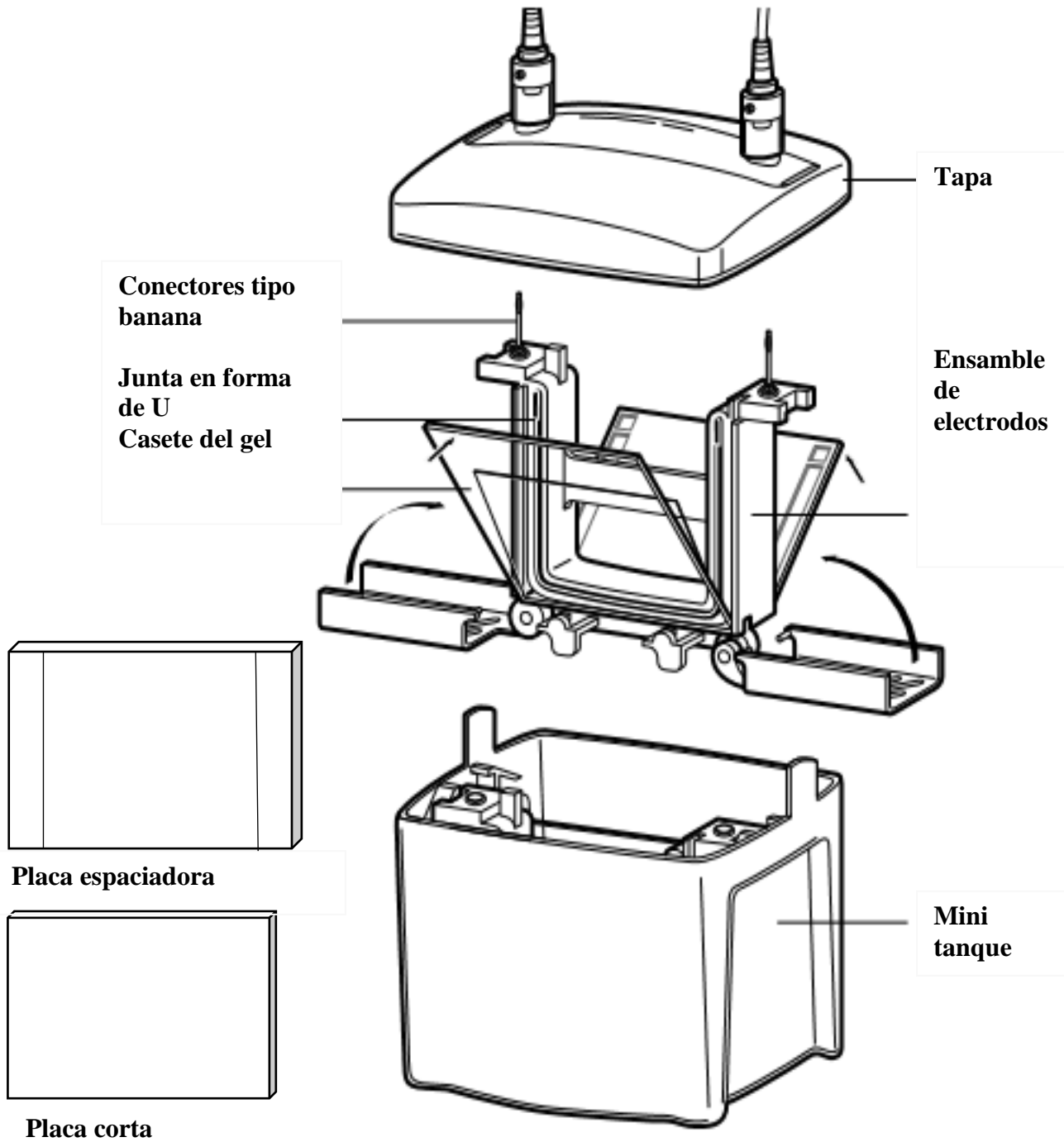
Albúmina

La proteína más abundante del plasma es la albúmina, con una concentración de aproximadamente 4.5 g/dL. Por su alta concentración esta proteína contribuye a la conservación de la presión coloidosmótica de la sangre y representa una de las reservas corporales más importantes de aminoácidos. La albúmina tiene sitios de unión para sustancias no polares y por eso puede funcionar como una proteína transportadora de ácidos grasos de cadena larga, de bilirrubina, fármacos y algunas hormonas esteroideas y vitaminas. La seroalbúmina fija además los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} . Entre las proteínas plasmáticas importantes esta es la única no glucosilada. La transferrina o prealbúmina transporta la hormona tiroidea tiroxina y sus metabolitos.

Globulinas

Las globulinas α y β participan en el transporte de lípidos, hormonas, vitaminas y de los iones metálicos. Además constituyen los factores de coagulación, inhibidores de las proteasas y las proteínas del sistema de complemento. Las γ -globulinas participan en los sistemas de defensa del organismo funcionando como anticuerpos: inmunoglobulinas G, M, A, D y E.

Esquema 1. Cámara de electroforesis de proteínas Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems de BIO-RAD y partes que la componen.



Nota: Esquema obtenido del manual de Bio-RAD

Material

- Micropipetas de p20, p200, p1000 y p5000.
- Puntas nuevas para cada tipo de micropipeta.
- Puntas especiales para electroforesis vertical para micropipeta de p20.
- Guantes.
- Cubrebocas.
- Tubos eppendorf.
- Balanza analítica.
- Cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems.
- Fuente de poder.
- Parrilla de calentamiento.
- Regla y plumón negro.
- Papel filtro.
- Tubos de plástico con tapa de 15 mL de capacidad.
- Gradilla.
- Vasos de precipitados.
- Recipiente rectangular de plástico.

Reactivos

- Plasma sanguíneo en dilución 1:20.
- Dilución de albúmina 1:10.
- Dilución de albumina estándar 1:20.
- Dilución de globulinas 2:10.
- Dilución de proteínas totales 2:20.
- Marcador de peso molecular para proteínas.
- Tris 1.5M (pH 8.8).
- Tris 1M (pH 6.8).
- Doudecildisulfato (SDS) al 10%.
- Persulfato de amonio 10%.
- Tetrametiletileno-diamina (TEMED).
- Mecaptoetanol o DTT al 0.1M.
- Mezcla de acrilamida-bisacrilamida al 30%.
- Buffer de electroforesis 1X
- Solución de azul de Comassie R-250.
- Buffer de Laemli 2X.
- Solución desteñidora.
- Hidróxido de sodio 0.1N.

Método

❖ Montaje para la preparación de geles para electroforesis.

1. Localizar las partes que contiene el módulo para montajes de geles (Fig. 3)

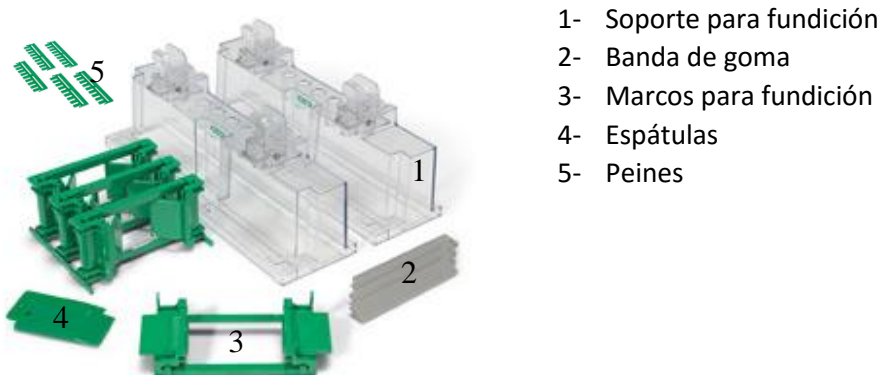


Fig. 3-Esquema y partes del módulo de montaje.

2. Colocar la banda de goma en la parte inferior del soporte para fundición (Fig.4).



Fig. 4- Soporte de fundición con banda de goma.

3. Comenzar por limpiar la placa corta y placa espaciadora con un poco de agua destilada (Fig. 5).

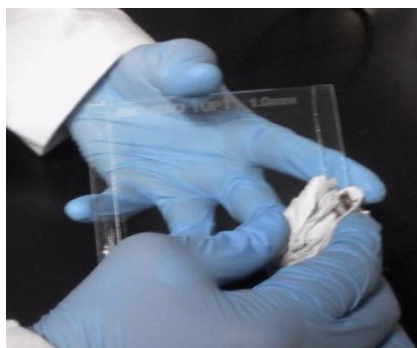


Fig. 5- Limpieza de las placas

- Colocar el peine en el extremo de la placa corta y con ayuda de un plumón realizar una marca un centímetro debajo del límite del peine (Fig. 6).



Fig. 6- Placa corta con marca.

- Alinear ambas placas, de manera que las muescas de la placa espaciadora queden hacia dentro (Fig. 7) y colocarlas dentro de los marcos para fundición cuidando que no se desalineen las placas (Fig.8).

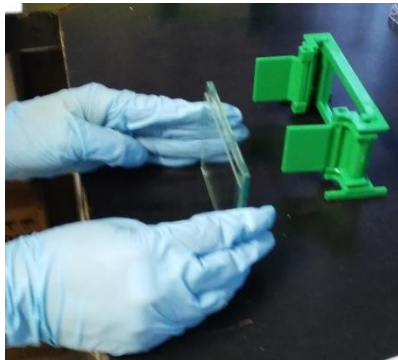


Fig. 7- Alineación de las placas.

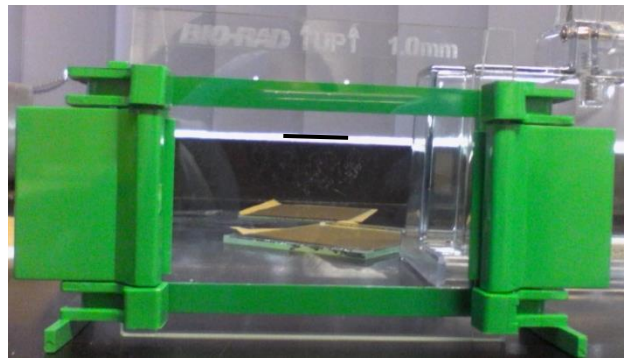


Fig. 8- Marcos de fundición con placas.

- Colocar los marcos para fundición que contienen las placas en el soporte para fundición. Nota: **Cuidar que las placas queden completamente selladas con la banda de goma (Fig. 9).**

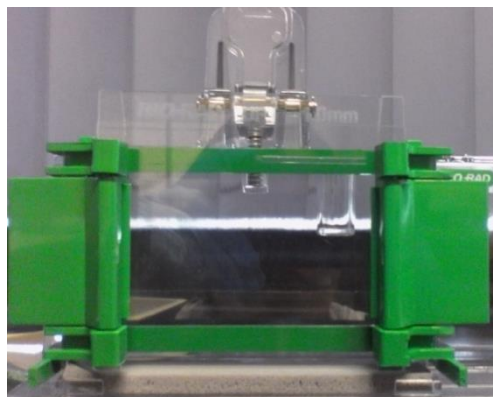


Fig. 9- Colocación de las placas en el soporte para fundición.

CECILIA GARCIA MARTINEZ

- **Preparación de gel para electroforesis PAGE-SDS.**

1- Preparar el gel separador en un tubo de plástico con tapa de 15 mL con las cantidades expresadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Orden de adición y cantidades para preparación de gel separador.

Reactivos	Gel separador 10% (5 mL)
Agua destilada	4.0 mL
Acilamida-bisacilamida 30%	3.3 mL
TRIS 1M pH 6.8	2.5 mL
SDS10%	0.1 mL
Persulfato de amonio 10%	0.1 mL
TEMED	0.004 mL

2- Mezclar rápidamente y adicionar la mezcla entre las dos placas (Fig.10), colocar una capa de agua destilada para evitar la entrada de aire durante la polimerización del gel (Fig.11). Nota: **Si no se vierte la mezcla con rapidez el gel puede polimerizar en el tubo.**



Fig. 10- Adición del gel separador en las placas.

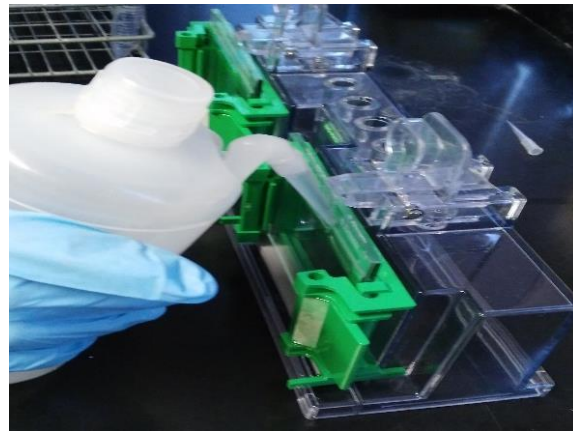


Fig. 11- Adición de la capa de agua destilada.

3- Cuando el gel separador haya polimerizado, vaciar la capa de agua con cuidado en la tarja (Fig. 12) y quitar el exceso de agua con papel filtro (Fig.13). Nota: **Usar el gel sobrante del tubo como patrón para observar la polimerización.**



Fig. 10- Retirar capa de agua destilada.

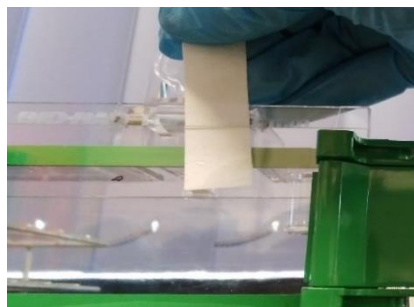


Fig. 11- Retirar exceso de agua con papel filtro.

- 4- Preparar el gel concentrador en un tubo de plástico con tapa de 15 mL con las cantidades expresadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Orden de adición y cantidades para preparación de gel concentrador.

Reactivos	Gel concentrador 5% (10 mL)
Agua destilada	3.4 mL
Acrilamida-bisacrilamida 30%	0.83 mL
TRIS 1M pH 8.8	0.63 mL
SDS10%	0.05 mL
Persulfato de amonio 10%	0.05 mL
TEMED	0.005 mL

NOTA: El gel separador y el gel concentrador pueden prepararse al mismo tiempo, pero sin añadir el TEMED al gel concentrador hasta que el gel separador haya polimerizado.

- 5- Mezclar rápidamente y adicionar la mezcla entre las dos placas, llenando hasta el ras (Fig. 14), colocar el peine evitando la entrada de aire (Fig.15).
Nota: **Si no se vierte la mezcla con rapidez el gel puede polimerizar en el tubo.**



Fig. 14- Adición del gel



Fig. 15- Colocación de los peines para formación de pocillos.

CECILIA GARCIA MARTINEZ

- 6- Cuando el gel concentrador haya polimerizado retirar el peine con cuidado de no romper los pocillos formados. Nota: **Usar el gel sobrante del tubo como patrón para observar la polimerización.**
- 7- Retirar los marcos para fundición del soporte para fundición (Fig. 16) y posteriormente retirar las placas de los marcos de fundición **con cuidado de no desalinear las placas, para evitar la entrada de aire** (Fig. 17).

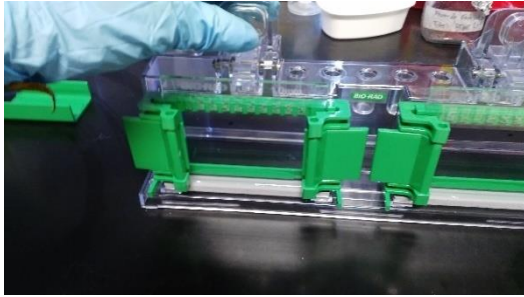


Fig. 16- Retirar los marcos para fundición del soporte.

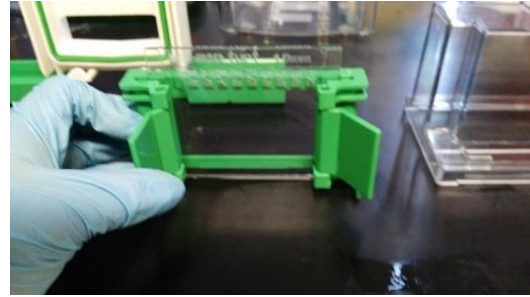


Fig. 17- Retirar las placas de los marcos.

- 8- Colocar las placas que contienen el gel en el ensamble de electrodos y ajustar y colocar en el tanque de electroforesis (Fig. 18 y 19). Nota: **La placa corta debe quedar hacia el interior, de no encontrarse las placas totalmente alineadas éstas pueden romperse al ajustarse en el ensamble de electrodos.**

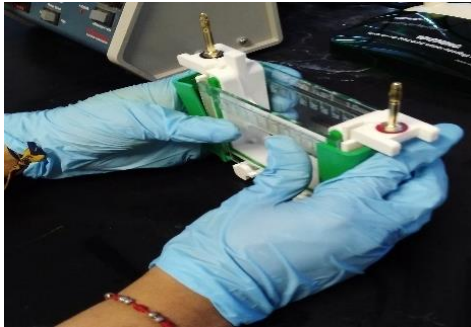


Fig. 18- Gel en ensamble de electrodos.

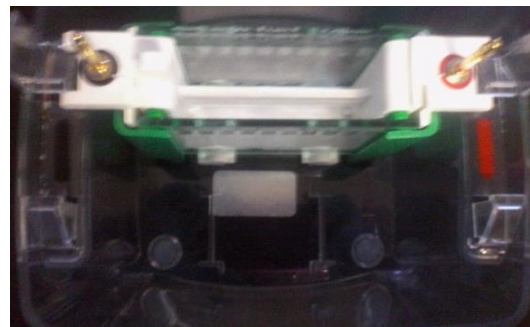


Fig. 19- Colocación del ensamble de electrodos dentro del tanque.

- 9- Llenar la cámara interior con buffer de electroforesis 1X hasta el ras de la placa espaciadora, cubriendo totalmente los pocillos (Fig.20), posteriormente llenar el tanque de electroforesis con buffer de electroforesis 1X (Fig.21).

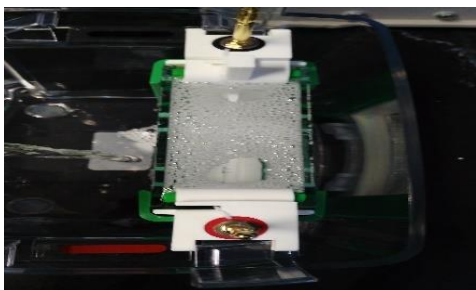


Fig. 20- Llenado de cámara interior.



Fig. 21- Llenado de tanque de electroforesis

NOTA: El buffer de electroforesis 1X debe de estar frío y el tanque de electroforesis se llenará según la cantidad de geles en corrimiento y lo que indique las marcas en el mismo tanque.

- Preparación de muestras para electroforesis de proteínas.

10- Diluir las muestras según la tabla 3.

Tabla 3. Preparación de muestras para electroforesis de proteínas.

Muestra	Cantidad de muestra	Volumen añadido de NaOH0.1N
Plasma	10 μ L	190 μ L
Proteínas totales	10 μ L	90 μ L
Albúmina	20 μ L	80 μ L
Albúmina estándar	5 μ L	95 μ L
Globulinas	20 μ L	80 μ L

11- Tomar 20 μ L de cada muestra diluida (plasma, proteínas totales y albúmina) adicionar 12.5 μ L de buffer de Laemli y mezclar, hervir inmediatamente durante cinco minutos en baño maría y cubrir de la luz cuando se retiren las muestras del baño maría y colocar en un baño de hielo (*cuidar que las muestras no se congelen*). Nota: **Las diluciones son poco estables por lo que deben realizarse el mismo día que se correrán las muestras o un día antes.**

12- Con ayuda de una micropipeta p20 tomar 8 μ L de marcador de peso molecular para proteínas y colocarlos en el primer pocillo, en los siguientes pocillos colocar 25 μ L de cada una de las muestra, si es posible usar un blanco de reactivos. Nota: **Usar las puntas especiales para electroforesis vertical, si un pocillo no contiene muestra colocar buffer de Laemli.**



Fig. 22- Carga de muestras en el gel de electroforesis.

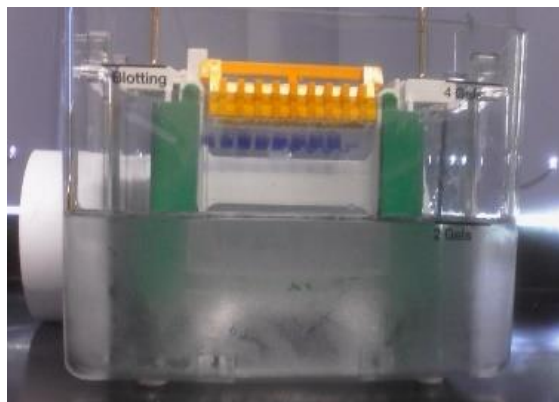


Fig. 23- Cámara de electroforesis cargada.

- 13-Al terminar de cargar los geles colocar la tapa del tanque de electroforesis, conectar los electrodos a la fuente de poder, usando los colores como guía, y correr las muestras a 87 V por aproximadamente 30 min, permitiendo que las muestras queden alineadas. Una vez transcurrido el tiempo aumentar la corriente a 110-125 V y correr las muestra por aproximadamente 3 hrs. Nota: **Supervisar el corrimiento para evitar que el frente de corrimiento salga del gel.**

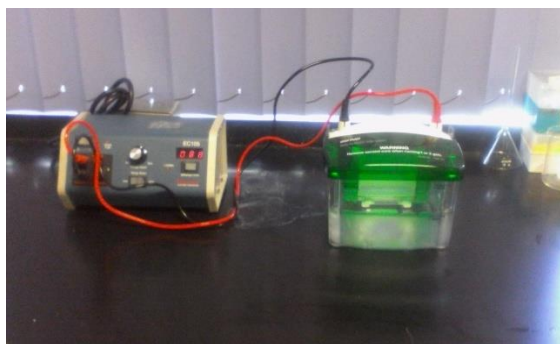


Fig. 24- Cámara de electroforesis conectada a fuente de poder.

- 14-Una vez transcurrido el tiempo, apagar la fuente de poder, desconectar los electrodos de la fuente de poder, quitar la tapa del tanque de electroforesis sacar el ensamble de electrodos y vaciar el buffer de electroforesis de la cámara interior.

- **Tinción del gel de electroforesis resultante.**

- 1- Desmontar las placas del ensamble de electroforesis, retirar con ayuda de una espátula (Fig. 25) la placa corta, cuidando de no romper el gel o rayar el vidrio, retirar el gel concentrador con la misma espátula. Nota: **Realizar lo anterior en un recipiente que contenga buffer de electroforesis 1X.**



Fig. 25- Manejo del gel de electroforesis.

- 2- Retirar el gel separador de la placa espaciadora y dejar en el buffer de electroforesis 1X. Retirar el buffer y añadir solución de Azul de Comassie al recipiente y dejar en tinción el gel durante 30 min, en agitación constante.



Fig. 26- Tinción del gel de electroforesis.

- 3- Retirar la solución de Azul de Comassie y colocar el gel en solución desteñidora, durante aproximadamente 1 hrs, cambiando la solución desteñidora ocasionalmente.



Fig. 27- Desteñir el gel de electroforesis.

- 4- Retirar la solución desteñidora y observar las bandas presentes en el gel de electroforesis.

Resultados.

- ❖ Comparar las bandas obtenidas en el gel de electroforesis contra la escalera del marcador de peso molecular.
- ❖ Investigar el peso molecular esperado de las proteínas plasmáticas y analizar si coinciden con los pesos moleculares determinados por comparación con la escalera del marcador de peso molecular.

Cuestionario.

- ¿Cuáles son los métodos de separación para proteínas plasmáticas y cuándo se utiliza cada uno de ellos?
- ¿Qué tipo de soporte son utilizados en electroforesis de proteínas y cuál es la diferencia entre ellos?
- ¿Qué ocurre al modificar la concentración del gel?
- ¿Cómo se puede cuantificar la concentración de proteínas a partir del gel obtenido en una electroforesis de proteínas?
- ¿Qué significa velocidad de migración y de qué depende en la electroforesis?

Referencias.

- ✚ García HP. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Universo Diagnóstico [Internet].2000. [Citado mayo 2015];1(2): pp. 31-41. Disponible desde: http://bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.htm
- ✚ Bioquímica [Internet]. España: Universidad de la Laguna, Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular [citado mayo 2015]. Disponible desde: <http://bioquibi.webs.ull.es/practicas/4.pdf>.
- ✚ Lab Test online [Internet]. España: American Association for Clinical Chemistry [citado mayo 2015]. Disponible desde: <http://www.labtestsonline.es/tests/Electrophoresis.html?tab=3>.
- ✚ Lomonte B. Inmunología general: Manual de laboratorio. 3ª ed. Costa Rica: c2009. Capítulo 13,Electroforesis en gel de poliacrilamida; 92-101.
- ✚ Cultek. Soluciones Electroforesis. Protocolo y Técnicas. c2006. pp. 1-17.
- ✚ Bioquímica interactiva[Internet]. México: Facultad de Medicina [citado mayo 2015]. Disponible desde: <http://laguna.fmedic.unam.mx/~3dmolvis/proteina/>.
- ✚ TeijónMR. Bioquímica estructural. Conceptos y test. 2ª ed. España: Editorial Tebar; c2001.
- ✚ Voet D, Voet JG, Pratt CW. Fundamentos de Bioquímica: la vida a nivel molecular. 2ª ed. Buenos Aires: Médica panamericana; c2009.
- ✚ Brandan N, Llanos C, Barrios M, Escalante A, Ruiz D. Proteínas plasmáticas. Buenos Aires: Universidad Nacional del Nordeste; c2008.
- ✚ Biblioteca digital de la Universidad de Chile, Proteínas plasmáticas [Internet]. Chile: Universidad de Chile [citado mayo 2015]. Disponible desde: <http://www.bibliotecadigital.uchile.cl/client/sisib>.
- ✚ Yábar C. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN Serie de Normas Técnicas N. 38 [Internet]. Lima; Instituto Nacional de Salud. Lima; 2013.[citado mayo 2015]. Disponible desde: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/contenido/4691.pdf>.
- ✚ Koolman J, Röhm KH. Bioquímica, Texto y Atlas. 3ª ed. España: Editorial Panamericana; c2004.

Preparación de reactivos.

Hidróxido de sodio 1N. Pesar 0.4 g de hidróxido de sodio en la balanza analítica. Colocar aproximadamente 30 mL de agua destilada en un matraz aforado de 100 mL y colocar el hidróxido, disolver y aforar con agua destilada.

TRIS 1.5M (pH 8.8). Pesar 18.2 g de TRIS, disolver en aproximadamente 75 mL de agua, ajustar a pH 8.8 con HCl, aforar a 100 mL. Guardar en refrigeración.

TRIS 1M (pH 6.8). Pesar 12.1 g de TRIS, disolver en aproximadamente 75 mL de agua, ajustar a pH 6.8 con HCl, aforar a 100 mL. Guardar en refrigeración.

Duodesildisulfato (SDS) al 10%. Pesar 1 g de SDS y disolver en 10 mL de agua destilada.

Persulfato de amonio al 10%. Pesar 0.5 g de persulfato de amonio y adicionar 5 mL de agua destilada, hacer alícuotas de 1 mL y guardar en congelación.

Mezcla acrilamida-bisacrilamida (30%). Pesar 0.8 g de bisacrilamida y 30 g de acrilamida. Disolver la bisacrilamida en 100 mL de agua destilada, una vez disuelta se adicionan los 30 g de acrilamida y se calienta el matraz hasta que se haya disuelto la acrilamida. **Ambos reactivos son altamente tóxicos, usar cubre bocas y guantes durante su manipulación.**

Buffer de electroforesis 5X. Pesar 2.5 g de SDS, 72 g de glicina y 15.15 g de TRIS. Disolver primero SDS en 800 mL de agua, a continuación adicionar la glicina y el TRIS. Ajustar el pH a 8.3 con HCl y aforar a 1000 mL.

Buffer de Laemli. Usar 6.6 mL de TRIS 1M pH 6.8, 0.21 g de SDS, 0.001 g de azul de bromofenol, 2.63 mL de glicerol y 0.5 mL de mercaptoetanol. Completar a 10 mL con agua destilada. **NOTA: Si se cuenta con buffer de Laemli 2X Bio-Rad® catalogo 161-0737 agregar 5 μ L de β -mercaptoetanol por cada 100 μ L de Buffer.**

Nota: Se puede usar DTT al 0.1M, en una proporción de 12.5 μ L de buffer de Laemli y añadir 2.5 μ L de DTT a cada 25 μ L de muestra, en lugar del mercaptoetanol.

Solución azul de Comassie R-250 al 0.1%. Pesar 0.1 g de azul de Comassie y disolverlo en una solución de metanol-ácido acético-agua 50:7:43.

Solución desteñidora. Mezclar 500 mL de metanol, 20 mL de ácido acético y 480 mL de agua destilada.

I. Fijación y conservación del gel de electroforesis.

- 1- Después de desteñir, colocar el gel en una solución fijadora (Tabla 4), durante 5 min.

Tabla 4. Orden de adición y cantidades para preparación de solución fijadora.

Reactivos	Porcentaje en la mezcla
Agua destilada	50%
Metanol	10%
Ácido acético	40%

- 2- Retirar el gel de la solución fijadora y colocar el gel en glicerol cuidando que quede totalmente sumergido.
- 3- Colocar el gel de electroforesis en medio de papel celofán transparente. **Se pueden usar protectores de hojas o porta acetatos.**

Nota: Realizar toda la manipulación del gel con ayuda de la espátula y con sumo cuidado evitando el rompimiento del gel de electroforesis.

II. Conservación del gel de electroforesis.

- 1- Una vez terminado el proceso de destinción de los geles de electroforesis, colocarlos en un recipiente y enjuagarlos con agua destilada.
- 2- Colocar papel celofán dulce hidratado sobre una placa de vidrio de manera que quede totalmente extendido sobre la placa y colocar los geles de electroforesis sobre el papel celofán dulce.
- 3- Cubrir los geles de electroforesis con papel celofán dulce hidratado cuidando que no queden burbujas de aire, sujetar el papel celofán a la placa de vidrio con ayuda de unos clips (Fig. 1).

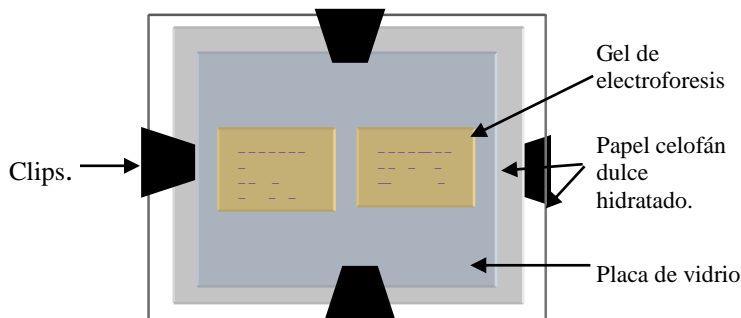


Fig.1- Conservación de geles de electroforesis en papel celofán dulce.

- 4- Dejar que sequen durante un día y retirar de la placa de vidrio. Cortar el exceso de papel celofán y guardar los geles de electroforesis.

Nota: Para hidratar el papel celofán colocar agua destilada en un recipiente y sumergir el papel celofán completamente en el agua destilada (Fig.2).

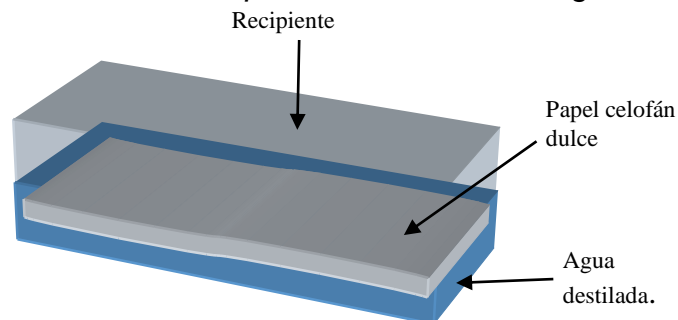
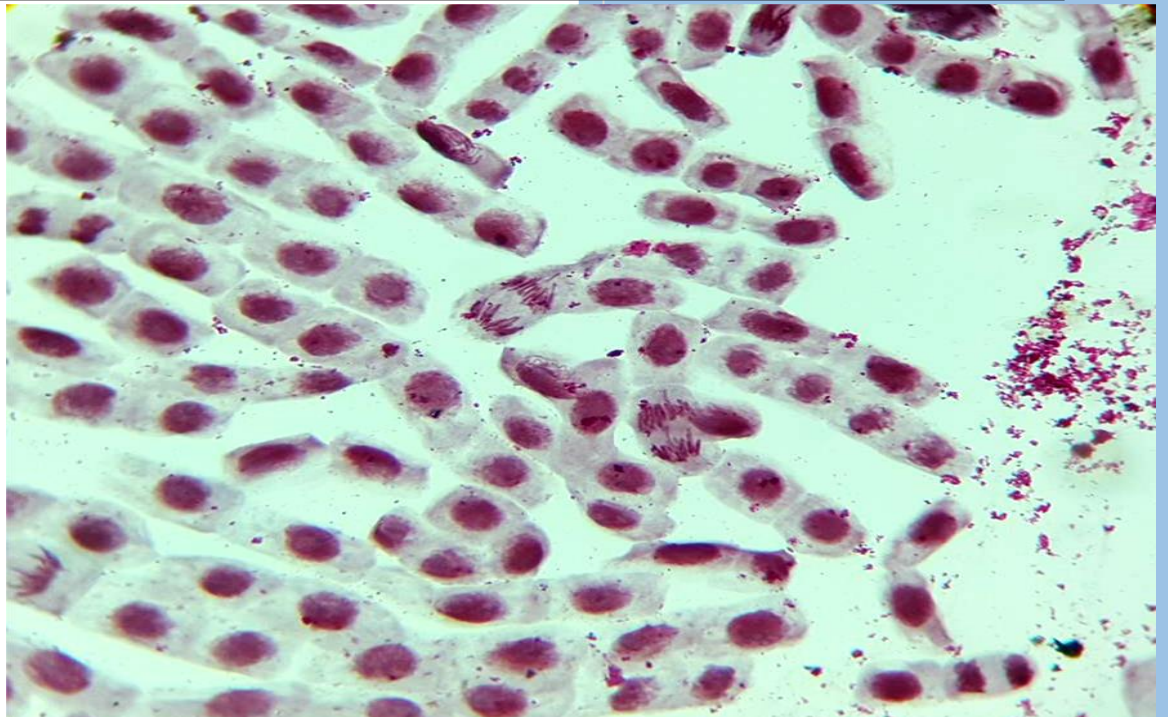


Fig. 2- Forma de hidratar el papel celofán dulce.

Anexo 2: Preparaciones permanentes para la práctica de Mitosis.

Elaboración de preparaciones permanentes para Mitosis



*El experimentador que no sabe
lo que está buscando no
comprenderá lo que encuentra.*

Claude Bernard (1813-1878)

Objetivo

- Realizar preparaciones permanentes como método de conservación de muestras utilizadas en la práctica de mitosis celular del módulo de BCT I.

Antecedentes académicos

- Microscopio óptico.
- Métodos de conservación de preparaciones para microscopía óptica.
- Preparaciones fijas.
- Fases de la mitosis.

Introducción.

El estudio detallado de los componentes de células y tejidos animales o vegetales, por el tamaño que poseen, requieren el uso de instrumentos que permitan ampliar muchas veces más la imagen de las estructuras que los constituyen, es decir se requiere del uso de microscopios. Por lo tanto la microscopía óptica ha sido utilizada siempre como técnica básica en estudios de morfología general, y actualmente en Biología Celular junto a la Biología Molecular, ya que permitió el estudio de las estructuras a nivel molecular haciendo que las técnicas de inmunohistoquímica e inmunocitoquímica sean tan importantes en microscopía óptica como lo pueden ser en microscopía electrónica.

Existen varios tipos de microscopios como por ejemplo:

- Microscopio electrónico de transmisión.
- Microscopio electrónico de barrido (SEM).
- Microscopio óptico.
- Microscopio confocal espectral, etc.

La preparación, o manipulación, adecuada de las muestras es fundamental para llevar a cabo su correcto estudio microscópico. Una deficiente preparación de la



Fig. 1- Microscopio óptico
(<http://www.cidanalitica.com/equipos.html>)

muestra puede llevarnos a su incorrecta visualización y, por tanto, a un mal estudio e interpretación. Las técnicas para la manipulación y la preparación de las muestras son muy numerosas y cada una está orientada a conseguir resultados concretos; pero el tipo de muestra y lo que queramos ver en ella también es determinante en la elección de una técnica u otra. Los procedimientos para la preparación de muestras se pueden dividir en diferentes fases, o pasos técnicos, aunque, dependiendo del tipo de muestra, no todos son necesarios. Estos pasos se pueden englobar en: fijación, conservación, disección o extracción de partes, tinción, inclusión, y montaje.

Fijación y conservación de las muestras

La fijación y conservación se aplica comúnmente a muestras de origen biológico, aunque también en algunas inertes. Ambos procesos, se pueden llevar a cabo en pasos distintos o al mismo tiempo. La elección del fijador está relacionada con el origen de la muestra biológica y el tipo de estudio a realizar.

Los fijadores se clasifican en dos grandes grupos:

- Oxidantes: el tetraóxido de osmio (ácido ósmico), el bicromato de potasio, ácido crómico, bicloruro de mercurio o “sublimado corrosivo”, ácido pícrico, ácido acético.
- Reductores: el formaldehído, el glutaraldehído, el alcohol etílico, el alcohol metílico.

Finalmente, la congelación es también un método de fijación en muestras de origen biológico.

Disección o extracción de partes de una muestra

Las muestras se pueden estudiar “in toto”, cuando por su tamaño se han de preparar en su totalidad, o parcialmente, cuando sólo es necesario extraer estructuras o hacer secciones finas de la misma (usando micrótomos).

Inclusión y montaje de la muestras

Las muestras que se van a estudiar en secciones deben ser incluidas previamente, para facilitar que puedan ser cortadas. La inclusión consiste simplemente en embeber la muestra en una sustancia que se endurece posteriormente formando un cuerpo, de manera que la muestra se pueda manipular y cortar fácilmente.

Tinción de las muestras

Las muestras se pueden estudiar directamente al microscopio una vez montadas, aunque en numerosas ocasiones es necesario contrastarlas. Para ello se pueden utilizar colorantes que nos permitan una buena diferenciación de los elementos que constituyen la muestra. En algunas muestras es necesario realizar la despigmentación y, en ocasiones, la eliminación de materia orgánica.

Montaje.

Concluido el proceso de la tinción de los cortes, éstos se deben colocar en condiciones de protección y de poder utilizarlos ininidad de veces sin que se deterioren. Para alcanzar tales propósitos se recurre a realizar un montaje. Este consiste en colocar encima del corte coloreado y diafanizado una gota de una sustancia adherente y encima de ellos, una laminilla cubreobjetos.

Material

- Preparaciones de Mitosis.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Papel filtro.
- Pinzas de disección.
- Cajas Petri.
- Bisturí o navaja de disección.
- Papel seda.
- Microscopio óptico.
- Lápiz diamante.
- Placa de calentamiento.

Reactivos:

- Ácido acético al 45%.
- Ácido acético al 10%.
- Ácido acético glacial.
- Alcohol etílico absoluto.
- Bálsamo de Canadá.

Método

1. Eliminar el sellador en caso de ser necesario, utilizando una navaja (**cuidar de no introducir la navaja entre el cubreobjetos y el portaobjetos**), para eliminar el sellador por completo pasar un trapo humedecido en ácido acético al 45%.
2. Separar el cubreobjetos del portaobjetos colocando la preparación en una caja Petri con ácido acético al 10%, (**colocar la preparación de manera que el cubreobjetos quede hacia abajo**), hasta que se desprenda el cubreobjetos.

Nota: **se puede colocar una calza con una varilla de vidrio o un portaobjetos, con el fin de facilitar el paso anterior (Fig. 2).**

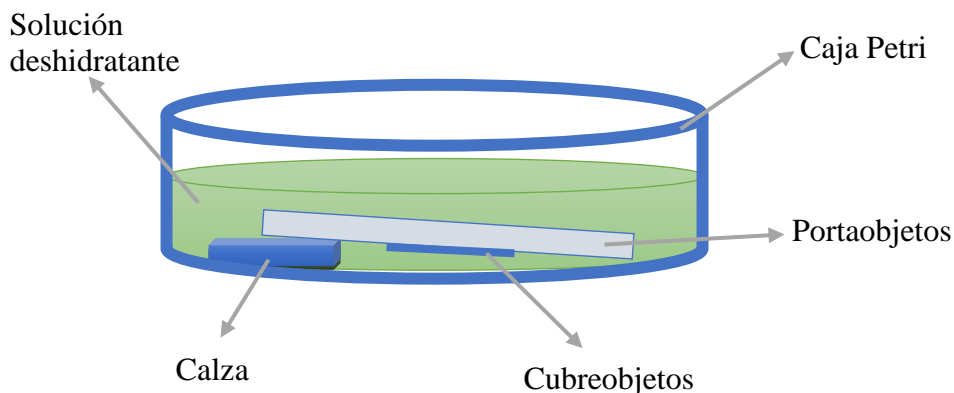


Fig. 2. Forma de desprender el cubreobjetos del portaobjetos.

3. Colocar tanto el portaobjetos como el cubreobjetos en las soluciones descritas en la Tabla 1 durante 20-30 segundos, esto con el fin de deshidratar las preparaciones. Nota: **Cuidar de escurrir el exceso de cada solución.**

Tabla 1. Soluciones para deshidratar las preparaciones.

Reactivo	Solución 1	Solución 2	Solución 3	Solución 4
Ácido acético glacial	10 mL	5 mL	2 mL	-----
Alcohol etílico absoluto	10 mL	15 mL	18 mL	20 mL

4. Al terminar la secuencia anterior colocar una pequeña gota de bálsamo de Canadá sobre la muestra del portaobjetos y dejar caer suavemente un cubreobjetos limpio. Repetir la operación con los cubreobjetos con muestra, en este caso colocar la gota de bálsamo de Canadá en un portaobjetos nuevo y dejar caer suavemente el cubreobjetos con muestra.
5. Una vez montadas las preparaciones, dejar secar sobre una placa de calentamiento o estufa caliente (a 48 o 50 °C), por aproximadamente 30 min.
6. Colocar una pequeña tuerca o pila seca sobre el cubreobjetos, con el fin de que la capa de bálsamo de Canadá sea lo más delgada posible. Dejar secar aproximadamente 2 semanas en la estufa a 40-50 °C.
7. Limpiar el exceso de resina con una navaja de afeitar y posteriormente con un trapo humedecido con alcohol etílico.
8. Por último rotular cada preparación con un lápiz de diamante o una pequeña etiqueta.

Resultados

- Observar las estructuras de las preparaciones a través de un microscopio óptico e identificar cada una de las fases de la mitosis.

Cuestionario

- ¿Qué otros métodos de conservación de preparaciones existen?
- ¿Cuál es la utilidad de realizar preparaciones permanentes?
- ¿Por qué es necesario deshidratar las muestras antes de realizar el montaje de la preparación?
- ¿Por qué es necesario colocar algún tipo de resina entre el cubreobjetos y el portaobjetos?

Referencias

- 1- Microscopía. Servicio de Apoyo a la investigación (SAI) [Internet]. España: Universidad de Mursia [citado mayo 2015]. Disponible desde: <https://sumsaiumu.wordpress.com/trabajo/tecnicas-2/>. Microscopia.
- 2- Montalvo Arenas CE. Microscopia. Facultad de Medicina [Internet].2010, Agost. [citado mayo 2015]: pp. 1-18. Disponible desde: http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/2_microscopia.pdf
- 3- Ubero Pascal N. Técnicas de microscopias aplicadas a ciencias forenses [Internet]. España: Universidad de Mursia [citado mayo 2015]. Disponible desde: <http://ocw.um.es/gat/contenidos/ubero/microscopia.pdf>
- 4- Montalvo Arenas CE. Técnicas Histológicas. Facultad de Medicina [Internet].2010, Agosto. [citado mayo 2015]: pp. 1-12. Disponible desde: http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/3_tecnica_histologica.pdf.
- 5- García-del Valle A. Prácticas de Laboratorio Integral de Biología I. México: ENEP Zaragoza, UNAM: 1989, pp 136-137.