

Guía Teórico-Práctica:
BIOLOGÍA CELULAR
BIOLOGÍA CELULAR Y
MOLECULAR

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia-UNSL



MATERIAL DIDÁCTICO
PARA ESTUDIANTES

2023

SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES

Guía de Trabajos Prácticos :

BIOLOGÍA CELULAR

BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Dr. Juan Gabriel Chediack

Mg. Guido Fernández Marinone

Dra. Nadia Bach

Lic. Gabriel Boldrini

Dra. Patricia Colombetti

Ilustraciones: Estudiante Gonzalo Martínez



FACULTAD DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2023

RESPONSABLES DE LA PUBLICACIÓN

Decano

Dra. Sebastián ANDUJAR

Secretaría Académica

Dra. Mónica OLIVELLA

*Comisión de la Serie Didáctica:
Material Didáctico para Estudiantes*

Coordinadora

Dra. Yamina DÁVILA

Integrantes

Departamento de Biología

Mg. Karina Ethel MARCHEVSKY

Dra. María Beatriz NÚÑEZ

Departamento de Bioquímica

Dra. Verónica FILIPPA

Dra. Ethelina CARNELUTTI

Departamento de Farmacia

Dra. Cecilia PERALTA

Dra. Ana VICARIO

Departamento de Química

Dr. José A. BOMBASARO

Dra. Cinthya A. MAGALLANES NOGUERA

Edición

Secretaría de Investigación, Vinculación y Extensión

SUMARIO

La publicación periódica Serie Didáctica ha sido creada en el ámbito de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (Ordenanza N° 008/07-CD) con el fin de proporcionar material de estudio a los estudiantes de las Carreras de grado impartidas en la Facultad.

Actualmente, la SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES (Resolución N°269/16) ofrece guías de Trabajos Prácticos de Laboratorio y de campo, guías de resolución de problemas, material teórico, propuestas de estudio dirigidos y comprensión de textos, entre otros materiales, elaborados por el cuerpo docente de las diferentes Áreas de Integración Curricular de la Facultad. Estas producciones didácticas significan un aporte para cubrir necesidades académicas acordes al enfoque de cada asignatura o que no se encuentran habitualmente en bibliografía específica. Las mismas están disponibles en la página de la UNSL (<http://www.fqbf.unsl.edu.ar/mde.html>) lo que facilita la accesibilidad por parte de los estudiantes, docentes y comunidad educativa en general, garantizando la calidad de la visualización y la amplia difusión del material publicado en este sitio. De igual modo, la Serie Didáctica realiza una extensión invitando a docentes y alumnos de diferentes niveles educativos a participar, crear, producir y utilizar este espacio fomentando así el vínculo entre esta Institución y la comunidad.

En nuestra opinión, es de vital importancia producir y compartir el conocimiento con los estudiantes y la sociedad. De este modo, se tiende a facilitar los procesos de enseñanza y de aprendizaje y la transmisión de una idea directriz de conducta humana y científica, fortaleciendo los vínculos entre docentes-alumnos-conocimientos y sociedad.

Dado que la presente SERIE DIDÁCTICA resulta de la participación de numerosos actores, ante los posibles errores humanos y cambios en la ciencia, ni los editores ni cualquier otra persona que haya participado en la preparación del material didáctico garantizan íntegramente que la información sea precisa o completa.

Esta guía de Trabajos Prácticos corresponde a los cursos de Biología Celular para las carreras de Licenciatura en Biología Molecular (Plan de Estudios Ord. CD 15/14), Licenciatura en Biotecnología (Plan de Estudios Ord. CD 7/17) y el curso Biología Celular y Molecular de la Licenciatura en Ciencias Biológicas (Plan de Estudios Ord. CD 8/13). Estas carreras se dictan en la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis. Estos cursos corresponden al ciclo básico y se dictan en el 2º cuatrimestre del Segundo año en estas carreras. Posee un crédito horario de 105 horas, con 4 horas de clases teóricas y 3 horas de trabajos prácticos semanales. Se utiliza como complemento educativo el uso de un Aula virtual con todos los temas abordados en el programa dispuestos en videos cortos, a modo de guía y ayuda de los contenidos teóricos a desarrollar. Además, cada tema es acompañado por problemas que sirven como disparadores de la aplicación de los conocimientos teóricos.

En esta guía se encuentran todas las actividades prácticas que se realizan durante el dictado de las asignaturas y que están orientadas a reforzar los conceptos teóricos de Biología Celular (y Molecular), además de discutir aspectos transversales al quehacer científico, como lo es la bioética. Las presentes actividades están organizadas de manera que los estudiantes puedan seguir una secuencia concatenada de las mismas, permitiendo un abordaje más integral de los conocimientos.

Se utilizarán diferentes estrategias didácticas de abordaje del aprendizaje:

- a) Trabajos de Aula con resolución de problemas o casos de estudio, seminarios y laboratorios virtuales, en este contexto se promoverá el estudio grupal, independiente y autónomo mediante el uso de búsqueda de información en internet y libros.
- b) Trabajos Prácticos de laboratorio para que los estudiantes adquieran: a) las destrezas básicas para el trabajo en el laboratorio experimental mediante la familiarización con técnicas de relevancia en la actividad científica de los laboratorios de Biología Celular y Molecular; b) aplicar el método científico para el estudio de procesos biológicos y discutir el diseño de los experimentos (metodologías) para obtener ese conocimiento.
- c) Charlas debate, a partir del análisis de material audiovisual (películas o series de ciencia ficción, drama y documentales) sobre temas inherentes al quehacer científico (por ej: bioética, el científico como ser social, etc.). El principal objetivo en esta actividad es que los propios estudiantes generen preguntas, bajo la guía de los docentes, acerca de la aplicación de la ciencia y el impacto en la sociedad.

- d) Búsqueda de información científica, en diferentes buscadores académicos, tanto en español como en inglés, para contrastar con información publicada en diferentes medios masivos de comunicación (diario o redes sociales). Aquí el objetivo es que los estudiantes comprendan la importancia de la rigurosidad en la difusión y divulgación de la ciencia.

Nuestro objetivo pedagógico es ampliar la formación de los estudiantes en la disciplina, mediante la resolución de problemas, la generación de preguntas relevantes (para promover el pensamiento crítico), discusión de trabajos científicos, entre otros, con el fin de aportar herramientas para el aprendizaje autónomo y a través de situaciones posibles en su campo laboral.

Recopiladores de Trabajos Prácticos de la Guía:

Dr. Juan Gabriel Chediack

Mg. Guido Fernández Marinone

Dra. Nadia Bach

Lic. Gabriel Boldrini

Dra. Patricia Colombetti

Ilustraciones: Estudiante Gonzalo Martínez

ÍNDICE

Medidas de seguridad en el laboratorio de Biología.....	8
Recomendaciones generales para un mejor desarrollo del curso.....	15
Actividad N° 1	18
Trabajo Práctico de Aula. Generación y divulgación del conocimiento: Análisis de artículos de divulgación científica en periódicos y redes sociales	
Actividad N° 2	25
Trabajo Práctico de Laboratorio. Aislamiento de células del epitelio intestinal.	
Actividad N° 3	33
Trabajo Práctico de Laboratorio. Aislamiento de mitocondrias de células animales y vegetales por fraccionamiento celular. Identificación de la acción redox de las mitocondrias.	
Actividad N° 4	40
Trabajo Práctico de Laboratorio. Cuantificación de proteínas en muestras biológicas.	
Actividad N° 5	45
Trabajo Práctico de Laboratorio. Separación de proteínas en gel de poliacrilamida con SDS. “SDS-PAGE”.	
Actividad N° 6	53
Trabajo Práctico de Laboratorio. Extracción de ADN de distintas muestras biológicas Electroforesis de ADN aislado y de fragmentos de ADNc, en gel de agarosa.	
Actividad N° 7	57
Charla Debate ¿Son previsibles los avances científicos?	
Actividad N° 8	60
Seminario de discusión. Ecología molecular aplicada a la conservación de especies	
Actividad N° 9	66
Charla Debate Los científicos: ¿Cómo son y cómo deberían ser?.	

MEDIDAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA

Objetivo

➤ Contribuir a la instrumentación de medidas de seguridad básicas que prevengan, protejan y/o eliminen los riesgos físicos, químicos y biológicos en los Laboratorios de Trabajos Prácticos de Biología.

A continuación, se delinearán las medidas generales de seguridad, en el momento de la cursada.

Introducción teórica

Cuando se trabaja en un laboratorio existe el peligro potencial de accidentes, debido a las sustancias químicas y elementos que se utilizan y a la posibilidad de cometer algún error al realizar un experimento. Por tal motivo la seguridad y la protección de la salud son indispensables para un ambiente de estudio y trabajo seguro en un laboratorio. Todo estudiante, profesor o empleado debe cumplir las reglas de seguridad e higiene en el laboratorio.

Buenas Prácticas de Laboratorio:

- No entrar al laboratorio en ausencia del Jefe de Trabajos Prácticos.
- Seguir todas las indicaciones del JTP.
- Leer y estudiar cada trabajo práctico antes de clase.
- Familiarizarse con los elementos de seguridad disponibles: salidas, extintores, duchas, lavaojos.
- No usar el teléfono celular durante la realización del trabajo de laboratorio.
- Está prohibido comer, beber (incluye tomar mate), almacenar alimentos, fumar, maquillarse o manipular lentes de contacto en el laboratorio.
- El área de trabajo debe estar limpia y ordenada. No deben colocarse libros, abrigos o bolsas sobre las mesadas. Se deberá verificar que la mesa de trabajo esté limpia al comenzar y al terminar el trabajo realizado.
- NO tocar, probar ni oler en forma directa ningún producto químico en el laboratorio.
- Prohibido pipetear con la boca. Se podrán utilizar pipetas de vidrio o plástico

con propipetas o pipetas automáticas.

- Manejar con especial cuidado el material frágil, por ejemplo, el vidrio.
- Antes de encender un mechero asegúrese que lo hace en un lugar permitido donde no haya material inflamable a su alrededor. Al encender el mechero hágalo con la menor apertura posible del robinete. No abandone el laboratorio sin haber apagado los mecheros.
- Utilizar pinzas de madera para calentar tubos de ensayo, sujetar el instrumental de vidrio y retirarlo del fuego para evitar quemaduras. Cuando caliente no mirar directamente al interior del tubo por su abertura ni dirigir ésta hacia algún compañero.
- Antes de trasladar o desarmar un aparato eléctrico, desconectarlo de la red.
- No utilizar ninguna herramienta o máquina sin conocer su uso, funcionamiento y normas de seguridad específicas.
- Toda herida, aún los pequeños cortes, que se produzca durante un trabajo práctico deben ser informados obligatoriamente al docente.
- Al terminar la práctica, limpiar y ordenar el material utilizado y el espacio de trabajo.

Recuerde: su seguridad y la de sus compañeros en el laboratorio depende del conocimiento de las buenas prácticas, el sentido común y la solidaridad en el ambiente de trabajo.

Vestimenta adecuada en el laboratorio

- **Guardapolvo de manga larga** que cubra la ropa de calle, preferentemente de algodón (que no será utilizado fuera del laboratorio), zapatos cerrados (no sandalias ni ojotas) y tener el pelo recogido.
- **Guantes apropiados** acorde a los riesgos y los reactivos que se manipulen. Los guantes de látex previenen el contacto con agentes tóxicos o biológicos. Los guantes deberán descartarse al alejarse de la mesada de trabajo, no se tocarán con ellos lapiceras, carpetas, picaportes, teclados, etc. Sí, accidentalmente, se toca algún producto químico en forma directa, no llevarse las manos a la cara y lavar inmediatamente.
- **Antiparras o anteojos de seguridad**, en aquellos Trabajos Prácticos que así lo

requieran. Los ojos absorben rápidamente algunos compuestos químicos (aerosoles y vapores). Las gafas son de uso personal y no pueden ser intercambiadas entre los alumnos.

Riesgos en el laboratorio











Todo producto químico debe ser considerado un tóxico potencial por sí mismo o por su reacción con otros. Es por eso que en el laboratorio:

- Se debe almacenar la menor cantidad posible de drogas y reactivos. Los mismos deberán estar debidamente etiquetados.
- Todos los productos inflamables deben almacenarse en un lugar adecuado y separados del resto (ácidos, bases y reactivos oxidantes).
- Antes de cada experimento, observar los signos de peligrosidad indicados en la etiqueta de los frascos de los productos químicos que se disponga a usar (ver pictogramas de peligrosidad).
- Cuando el experimento involucra gases, vapores, humos o partículas sólo podrá realizarse bajo campana.
- Los ácidos y las bases fuertes han de manejarse con mucha precaución, ya que la mayoría son corrosivos y, si caen sobre la piel o la ropa, pueden producir heridas y quemaduras importantes.
- Al mezclar algún ácido (por ejemplo, ácido sulfúrico) con agua, **añadir el ácido sobre el agua**, nunca, al contrario, pues se producen proyecciones del ácido y podría provocar quemaduras en la cara y los ojos.
- No dejar destapados los frascos ni aspirar su contenido. Sustancias líquidas como alcohol, éter, cloroformo, amoníaco etc. emiten vapores tóxicos.
- Evitar el contacto de sustancias inflamables (gases, alcohol, éter, etc.) con fuentes de calor. Si hay que calentar tubos con estos productos, se hará a **baño María, nunca directamente a la llama**.
- No devolver nunca a los frascos de origen los sobrantes de los productos utilizados.

Pictogramas de peligrosidad

En las etiquetas de algunos reactivos pueden encontrarse 1 ó 2 de los pictogramas mostrados a continuación. Estos símbolos muestran, gráficamente, el nivel de peligrosidad de

la sustancia etiquetada:

	T+ Muy Tóxico		E Explosivo
	O Comburente		F Fácilmente inflamable
	Xn Nocivo		F+ Extremadamente inflamable
	Xi Irritante		C Corrosivo
	N Peligro para el medio ambiente		T Tóxico

Riesgos biológicos:

La manipulación de microorganismos (incluidos los genéticamente modificados), cultivos celulares, animales, muestras de fluidos o tejidos, etc. debe realizarse con extrema precaución y los protocolos de trabajo deben estar aprobados por autoridades pertinentes.

Algunas de las precauciones a tomar para evitar riesgos son:

- Desinfectar y ordenar las zonas de trabajo antes de comenzar y al terminar con una solución de lavandina al 5% y alcohol al 70%.
- Cubrir adecuadamente con elementos protectores las heridas o abrasiones preexistentes en la piel.
- El derrame o caída de muestras contaminadas, diluciones, etc. deben ser informadas al docente, de forma inmediata. El área afectada debe ser tratada con solución desinfectante, y recogida con papel absorbente. Una vez limpia la zona, tratar nuevamente con desinfectante.
- Desactivar y eliminar residuos patológicos en forma correcta (ver tabla de desactivación y eliminación).

Desactivación y eliminación de residuos generados en los laboratorios

Con el fin de disminuir los riesgos en el laboratorio se han implementado formas de desactivación y eliminación de residuos, las cuales están resumidas en la siguiente tabla:

RESIDUO	TIPO DE RECIPIENTE	DISPOSICIÓN Y/O DESACTIVACIÓN
Ordinarios o comunes Residuos sólidos de oficinas, áreas comunes y de uso general.	Bolsa Negra o común	Son recolectados por la dependencia correspondiente.
Residuos de riesgo biológico infecciosos. Residuos que contienen microorganismos tales como bacterias, parásitos, virus, hongos.	Bolsa Roja	Son recolectados por la empresa habilitada
Residuos de animales Animales y/o residuos de animales utilizados en experimentación.	Bolsa Roja	Son recolectados por la empresa habilitada
Elementos cortantes Agujas, hojas de bisturí o vidrio y cualquier otro elemento punzo cortante.	Recipiente para elementos cortantes	Se almacenan en los recipientes que después son recolectados por el personal autorizado.
Residuos ácidos o básicos Residuos líquidos provenientes de sustancias con carácter ácido o alcalino.	Almacenar en recipientes especiales resistentes a la corrosión	Estos residuos se deben neutralizar con una base o ácido débil según sea el caso, hasta obtener un pH cercano a la neutralidad.

Primeros auxilios en caso de accidente

La rápida actuación ante un accidente puede salvar la vida de una persona o evitar el empeoramiento de las posibles lesiones que padezca. Por ello es necesario conocer tanto las actuaciones básicas generales frente a una emergencia, como las actuaciones específicas frente a agentes químicos, cancerígenos y biológicos que permitan controlar adecuadamente la situación.

- Mantener la calma
- Evaluar la situación
- Proteger al accidentado asegurando que tanto él como la persona que lo socorre estén fuera de peligro. Esto es especialmente importante cuando la atmósfera no es respirable, se ha producido un incendio, existe contacto eléctrico o una máquina está en marcha.
- Avisar a emergencia inmediatamente y de forma clara y concisa. Indicar el lugar exacto del incidente, las condiciones de riesgo que pudieran existir en el laboratorio (existencia de agentes químicos, cancerígenos y biológicos) e indicar las primeras impresiones sobre la/s persona/s afectadas.
- No mover al accidentado salvo que sea necesario para protegerse de los riesgos aún presentes en el laboratorio.
- No dar de beber ni medicar al accidentado.

En caso de fuego en el laboratorio: Evacuar el laboratorio, por pequeño que sea el fuego, por la salida principal o la salida de emergencia. Avisar a todos los compañeros de trabajo sin que se extienda el pánico y conservando siempre la calma, avisar al servicio de extinción de incendios. Si el fuego es pequeño y localizado, apagar utilizando un extintor adecuado, arena, o cubriendo el fuego con un recipiente de tamaño adecuado que lo ahogue. Retirar los productos químicos inflamables que estén cerca del fuego. No utilizar nunca agua para extinguir un fuego provocado por la inflamación de un disolvente.

Quemaduras: Las pequeñas quemaduras producidas por material caliente, baños, placas o mantas calefactoras, etc., se tratan lavando la zona afectada con agua fría durante 10-15 minutos. Las quemaduras más graves requieren atención médica inmediata.

Cortes: Los cortes producidos por la rotura de material de vidrio son un riesgo común en el laboratorio. Estos cortes se tienen que lavar bien, con abundante agua y jabón. Si son pequeños y dejan de sangrar en poco tiempo, lavar con agua y jabón y tapar con una venda o apósitos adecuados. Si son grandes y no paran de sangrar, requieren asistencia médica inmediata.

Lesión por productos químicos sobre la piel: Los productos químicos que se hayan vertido sobre la piel han de ser lavados inmediatamente con agua corriente abundante, como mínimo durante 15 minutos. Es necesario sacar toda la ropa contaminada a la persona afectada lo antes posible. Recuerde que la rapidez en el lavado es muy importante para reducir la

gravedad y la extensión de la herida. Acudir al médico con prontitud aportando la información contenida en la etiqueta o ficha de datos de seguridad del producto.

Corrosiones en los ojos: En este caso el tiempo es esencial (menos de 10 segundos). Cuanto antes se lave el ojo, menos grave será el daño producido. Lavar los dos ojos con agua corriente abundante durante 15 minutos como mínimo en una ducha de ojos. Es necesario mantener los ojos abiertos con la ayuda de los dedos para facilitar el lavado debajo de los párpados. Es necesario recibir asistencia médica, por pequeña que parezca la lesión.

Ingestión de productos químicos: Antes de cualquier actuación concreta pedir asistencia médica. Si el paciente está inconsciente, ponerlo en posición inclinada, con la cabeza de lado. Si está consciente, mantenerlo apoyado. No provocar el vómito si el producto ingerido es corrosivo.

Inhalación de productos químicos: Conducir inmediatamente la persona afectada a un sitio con aire fresco. Pedir asistencia médica lo antes posible.

Bibliografía:

- Mc Cormack ML, Manacorda AM. Manual de higiene y seguridad para laboratorios universitarios de enseñanza e investigación. Áreas: química, biología y microbiología. 2007. Editorial Educo. Universidad Nacional de Comahue.
- Recalde Ruiz D, Laborada Grima R, Tolsa Martínez R, Marqués Jiménez N. Manual de seguridad para operaciones en laboratorios de biotecnología y de tipo biológico. 2002. Universidad Politécnica de Valencia.
- Menéndez CJA. Seguridad e higiene: manual para laboratorios químicos y biológicos. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. 2008. Universidad Nacional de San Luis.

RECOMENDACIONES GENERALES

- Antes de concurrir a la explicación de cada Trabajo Práctico, se recomienda leer y analizar la guía del TP que se realizará cada semana, a fin de evacuar todas las dudas que puedan surgir de las actividades que se llevarán a cabo en el laboratorio.
- Tener en cuenta las normas de bioseguridad en el laboratorio. Para cada laboratorio que se realiza hay medidas de seguridad específicas y necesarias para las buenas prácticas en el laboratorio.
- En la actividad de charla debate se discutirán películas, documentales o series, de los cuales pueden encontrar todos los detalles más abajo. Es recomendable que a medida que vayan teniendo tiempo, se organicen para verlas a lo largo del cuatrimestre. Tener todo el material audiovisual visto le permitirá un intercambio más provechoso de opiniones durante el desarrollo de la actividad.
- Los Trabajos Prácticos tanto de Aula, como de Laboratorio están relacionados con los contenidos teóricos, por eso es importante aprovechar los espacios de consultas para evacuar todas las dudas de los temas vistos en clase.

Listado de películas que se discutirán a lo largo del curso

GATTACA (País de origen. USA, Año 1997). Duración 112 min. Dirigida por Andrew Niccol, con Ethan Hawke, Uma Thurman, Alan Arkin, Ernest Borgnine.

Sinopsis corta: Ambientada en una sociedad futura, en la que la mayor parte de los niños son concebidos *in vitro* y con técnicas de selección genética. Vincent (Ethan Hawke), uno de los últimos niños concebidos de modo natural, nace con una deficiencia cardíaca y no le auguran más de treinta años de vida. Se le considera un inválido y, como tal, está condenado a realizar los trabajos más desagradables. Su hermano Anton, en cambio, ha recibido una espléndida herencia genética que le garantiza múltiples oportunidades.

Mundo Jurásico (Jurassic World) (País de origen. USA, Año 2015). Duración 124 min. Dirigida por Colin Trevorrow, con Rick Jaffa, Amanda Silver, Derek Connolly, Colin Trevorrow.

Sinopsis: Veintidós años después de lo ocurrido en Jurassic Park, la isla Nublar ha sido transformada en un enorme parque temático, Jurassic World, con versiones

«domesticadas» de algunos de los dinosaurios más conocidos. Cuando todo parece ir sobre ruedas y ser el negocio del siglo, un nuevo dinosaurio de especie desconocida, pues ha sido creado manipulando genéticamente su ADN, y que resulta ser mucho más inteligente de lo que se pensaba, se escapa de su recinto y comienza a causar estragos entre los visitantes del Parque.

Selección antinatural. Capítulo 1. Cortar, pegar, vida. Serie de Netflix. Dirigida por Leeor Kaufman, Joe Egender.

Sinopsis: El ADN, la esencia misma de la vida, ya puede ser alterado. No sólo por geneticistas de Harvard y corporaciones multimillonarias, sino también por biohackeadores rebeldes que trabajan desde el garaje de su casa.

Je-bo-ja (El confidente) (País de origen: Corea del Sur, Año 2014). Duración: 113 min. Dirigida por Soonrye Yim, con Park Hae-Il, Lee Kyung-young, Yoo Yeon-seok, Park Won-sang, Lee Mi-do, Ryu Hyun-kyung, Song Ha-yoon.

Sinopsis: El periodista Yoon Min-Cheol, decide investigar el caso sobre el posible fraude del Doctor Lee acerca de la clonación de células madres. Para ello contará con la ayuda de un informante muy cercano al Doctor. Pero también tendrá una barrera social formada por miles de ciudadanos que creen en la autenticidad de Lee.

Un Fuegoito, la historia de César Milstein (País de origen: Argentina, 2010). Duración 70 min. Dirigida por Ana Fraile.

Sinopsis: “Un fuegoito” es una película documental que rinde tributo a César Milstein, el último Premio Nobel argentino. A lo largo del film se pueden disfrutar de diferentes testimonios y material de archivo que deja al descubierto la manera en la que siente y piensa un científico. De esta manera, los espectadores tienen la posibilidad de conocer mucho más a fondo la historia de vida de Milstein, quien ha brindado un gran aporte a la medicina, la biología y la inmunología.

La vida inmortal de Henrietta Lacks (País de origen: USA, Año 2017) Duración 93 min. Dirigida por George C. Wolfe, con Oprah Winfrey, Rose Byrne, Courtney B. Vance, Renee Goldsberry.

Sinopsis: Una mujer afroamericana se vuelve pionera en el mundo de la medicina cuando sus células son usadas para crear la primera serie de células humanas inmortales a principios de los años 50.

Otras películas/documentales que pueden ser de interés para el curso:

La Mosca, (País de origen: USA, Año 1986) Duración 95 min. Dirigida por David Cronenberg, y protagonizada por Jeff Goldblum junto a Geena Davis y John Getz. Esta película es un remake de la película de 1958. Esta versión tuvo una segunda parte llamada La mosca II (The Fly II) en 1989. La película pertenece al subgénero de la ciencia ficción biopunk.

Sinopsis: Un científico se utiliza a sí mismo para la realización de un complejo experimento de teletransportación. La prueba es un éxito, pero empieza a sufrir unos extraños cambios en su cuerpo. Al mismo tiempo, descubre que dentro de la cápsula donde realizó el experimento con él se introdujo una mosca.

La granja del Dr. Frankenstein, (Documental, País de origen, Reino Unido, Año 2007). Duración 180 min. Dirigida por Jeremy Turner.

Sinopsis: Vacas con el doble de su masa muscular, un súper salmón que puede crecer en su primer año de vida cuatro veces más de su talla normal, gallinas sin una sola pluma, conejos que resplandecen en la oscuridad ya que tienen genes de medusa, o el "arroz de oro", que gracias a una bacteria y los genes del narciso es capaz de producir beta caroteno, uno de los elementos básicos de la vitamina A. Éstos son algunos de los seres vivos que el documental reúne en una granja de ficción poblada solamente por plantas y animales que han sido objeto de alguna forma de manipulación genética.

El documental, conducido por la científica Olivia Judson y el nutricionista Giles Coren, guía a los espectadores por esta granja virtual con el fin de explorar los principios científicos y morales que hay detrás de la ciencia moderna. Con los conocimientos actuales de la genética los científicos sólo están limitados por su imaginación...las posibilidades son infinitas.

ACTIVIDAD N° 1: TRABAJO PRÁCTICO DE AULA

Generación y divulgación del conocimiento. Análisis de artículos de divulgación científica en periódicos y redes sociales.

Autores: Juan G. Chediack y Guido Fernández Marinone
Licencia CC-BY

Objetivos

- Conocer la importancia de comunicar los resultados de una investigación científica en forma fidedigna.
- Discutir la importancia de la rigurosidad en la difusión/divulgación de la ciencia.
- Discutir el impacto de “noticias falsas o fake news” en la sociedad y la importancia de una divulgación científica fidedigna y del pensamiento crítico.

Difusión científica o del conocimiento

El conocimiento científico contribuye a explicar y comprender los fenómenos de la naturaleza y se genera a partir de la aplicación del método científico, el cual consta de una serie de pasos sistemáticos para resolver un problema real mediante una investigación. Estos pasos son: observación del fenómeno, hacer preguntas, proponer hipótesis, diseñar y realizar un experimento, coleccionar los datos resultantes, elaborar tablas y gráficas para realizar una interpretación de estos resultados y finalmente llegar a las conclusiones.

Sin embargo, la tarea del investigador no termina cuando finaliza la fase de campo de su experimento, es decir cuando ha dilucidado cómo actúa una enzima o cómo las aves migratorias optimizan la utilización de la energía para llegar a su destino. El trabajo estará concluido cuando otros investigadores puedan hacer uso de los resultados y de los métodos empleados en la investigación. Esto es, la divulgación del conocimiento generado a partir de una investigación utilizando el método científico. La forma más común para comunicarlo entre pares o colegas investigadores es la publicación de la investigación en un formato particular en una revista científica (esta publicación, o artículo científico, es comúnmente llamada “paper”).

Lo que se investiga y no se publica, es como si no se hubiera hecho, ya que nadie se va a enterar de los hallazgos encontrados. En este sentido es importante saber que la ciencia es dinámica, es decir, cambia constantemente. Toda teoría puede reinterpretarse o ser reemplazada

por otra, si nuevas observaciones demuestran que es incorrecta. Debido a esto, resulta imprescindible que cada experimento que se realice sea reproducible (es decir, que el mismo resultado pueda ser obtenido por distintos investigadores bajo las mismas condiciones de experimentación), para que los resultados obtenidos en las distintas instancias sean comparables, y de esa manera se corrobora el conocimiento generado anteriormente.

La ciencia empírica (o experimental) nunca es definitiva, y esta es una de las normas básicas del progreso de la ciencia. Cada investigador mira el problema desde una perspectiva distinta y genera distintas preguntas, incluso puede utilizar distinta metodología o diseño experimental, para abordar el mismo problema. Para que esto ocurra, uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta es que, el procedimiento escrito y la expresión de los resultados de toda actividad, puedan ser interpretados por toda la comunidad científica de cualquier país del planeta. Es relevante la homogeneidad en la expresión ya que permite el preciso intercambio de procedimientos y resultados en la investigación científica. Esto hace que las hipótesis puedan ser corroboradas y así la ciencia avance. Una vez que se tienen las conclusiones el próximo paso es redactar un artículo y publicarlo en una revista científica; de esta forma la investigación pasa a formar parte del conocimiento científico y está disponible para una cantidad mucho mayor de personas.

La estructura del artículo científico tiene en general las siguientes características:

Título: refleja en forma sintética el tema del trabajo y anticipa la principal conclusión a la que se llegó.

Autores: el orden en que se ubican la lista de autores refleja la contribución de cada uno al trabajo científico, generalmente el primer autor es el que ha tenido la mayor participación en cuanto a la realización de los experimentos y el diseño experimental, mientras que el último es común que sea el director del proyecto quién aporta en cuanto al diseño experimental, financiamiento y/o escritura del trabajo. Es cada vez más frecuente que en los trabajos científicos se coloque la contribución de cada autor al trabajo.

Resumen: esta sección sintetiza o resume todas las partes del trabajo científico que se detallarán posteriormente (introducción, objetivos, metodología, resultados y conclusiones).

Introducción: en esta sección se plantea ¿cuál fue el problema abordado y por qué? Es decir, esta parte incluye los antecedentes que se conocen de la problemática a tratar (información relacionada con el trabajo, escrito u observado por otros autores), explica la importancia del estudio, plantea los objetivos y la hipótesis del trabajo.

Materiales y Métodos: en esta parte se detalla cómo, cuándo y dónde se hizo la investigación. Se expone el material y la metodología usada. Se debe explicar en detalle, ya que los experimentos deben ser reproducibles (replicados) por otros colegas investigadores. Se mencionan los análisis estadísticos realizados.

Resultados: En esta sección se reflejan cuáles fueron los hallazgos encontrados, a partir de la representación de los datos y resultados en forma concisa y clara. Según la naturaleza del trabajo los resultados pueden ser imágenes, tablas, gráficos, dibujos, videos, etc. En algunas ocasiones los resultados están organizados mediante subtítulos, con una breve reseña de lo que expresan, para facilitar la lectura e interpretación.

Discusión: En esta sección se responde el siguiente interrogante ¿Qué significado o implicancia tienen los resultados? Para ello se discuten nuestros hallazgos, la interpretación de los datos obtenidos, con los hallazgos obtenidos por otros autores, después analizamos y expresamos opiniones fundadas sobre la validez de los resultados que obtuvimos. Al final de esta sección se colocan las conclusiones.

Agradecimientos: esta sección hace referencia a las personas e instituciones que ayudaron de alguna menor manera en la realización de la investigación.

Bibliografía: se citan todos los trabajos o artículos científicos que hicieron un aporte, en cuanto a metodología, importancia de la problemática y discusión de la investigación.

Publicación de un artículo científico

Los trabajos o artículos científicos en el lenguaje técnico-académico, se conocen como “paper” o publicación científica. En general se publican en idioma inglés, ya que es el idioma más utilizado en el ambiente científico para intercambiar estos conocimientos. Aunque también hay revistas que publican trabajos científicos tanto en inglés como en español. En Biología Celular y Molecular la mayoría de las publicaciones son en inglés y podemos encontrar cientos o miles de trabajos sobre cada tema en particular.

Hay revistas que incluyen publicaciones de diversas ramas de las ciencias experimentales, quizás las más conocidas por su trayectoria son Nature y Science, que publican artículos de varias disciplinas científicas. En el sitio Scimago (www.scimagojr.com/) pueden encontrar las revistas más leídas, en la mayoría de los casos son más específicas y otras dedicadas a una disciplina en particular, por ejemplo: Cell, Journal of Microbiology, Journal of Experimental Biology, Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, Journal of Cell Biology, etc.). Actualmente existen miles de revistas científicas, que abarcan todas las

especialidades científicas, aproximadamente 23000 según el sitio Scimago. Es importante resaltar que todos los resultados obtenidos en una investigación científica son importantes, aún los negativos, Esto es una tendencia que están aplicando ciertas revistas, por ejemplo la Editorial PLOS tiene una sección denominada The Missing Pieces: A Collection of Negative, Null and Inconclusive Results, dedicada a la publicación de resultados inconclusos, inesperados o controversiales.

Existen grandes bibliotecas digitales en donde se encuentran registrados todos los artículos científicos “papers” de estas revistas a disposición del público en general, y de los científicos en particular.

Algunos de estos buscadores científicos son:

Artículos en español publicados en revistas de América latina:

RedALyC: <http://www.redalyc.org>

SciELO: <http://scielo.org>

Latindex: <http://www.latindex.org>

Artículos en inglés publicados en revistas internacionales:

PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

Scencedirect <http://www.sciencedirect.com/>

DOAJ (Directory of Open Access Journals): <http://www.doaj.org>

Google Académico: <https://scholar.google.com.ar/>

Divulgación científica

La divulgación científica es una rama de la comunicación por la cual se realiza la difusión del conocimiento científico con una terminología coloquial y narrativa simple. Esto permite, a todos los ciudadanos de una sociedad, poder entender los progresos que ocurren en la comunidad científica, y que tienen su impacto en una mejor calidad de vida de la sociedad.

La difusión de ciencia y la divulgación científica son complementarias, permiten que ese conocimiento pase a toda la población y se democratice el saber científico (la ciencia). A su vez, los artículos de divulgación científica permiten difundir la investigación de una manera accesible para que sea comprensible por el público en general, favoreciendo la cultura general y el pensamiento crítico y objetivo de la población. De esta manera, la divulgación científica puede otorgarnos las herramientas necesarias para reconocer las noticias falsas o “Fake News”.

Actualmente, las herramientas de difusión de la divulgación científica son variadas, programas de radio, diarios, revistas, programas televisivos, redes sociales, podcasts, entre

otros. En la mayoría de los casos existen rigurosos controles en la producción de los contenidos a comunicar. Sin embargo, como en toda actividad humana, existen conductas inadecuadas o antiéticas de alguno de los integrantes de la sociedad. En este contexto surgen las noticias falsas o mejor conocidas como “Fake News”.

Divulgación de la ciencia: ¿cómo puede ayudar contra las noticias falsas?

Autor: Jason Woolford (*)

Las "noticias falsas o fake news" están en todas partes y donde hay noticias falsas, hay ciencia falsa. Este tipo de noticias tiene antecedentes desde la antigüedad, como el "Gran engaño lunar" que tuvo lugar en el siglo XIX, pero actualmente el desarrollo de las nuevas tecnologías permitió que la dispersión de noticias falsas sea mucho más rápida, ubicua y potencialmente dañina para la sociedad. Si bien las historias falsas del pasado tuvieron un alcance limitado a los periódicos, las reuniones sociales o los rumores locales; con las herramientas actuales como las redes sociales, la ciencia falsa puede globalizarse en un instante, alentada por los negacionistas o anticientíficos, que buscan sembrar dudas en la ciencia a fin de satisfacer sus necesidades, su agenda propia y cosmovisión.

Contra este mar de desinformación, ¿cómo pueden los científicos hacer retroceder la marea creciente?

Antes de responder el cómo, es importante enfatizar por qué debemos luchar contra las noticias científicas falsas. Porque las consecuencias de no hacer nada pueden ser catastróficas. La falta de información confiable sobre, por ejemplo, asuntos de salud, puede resultar en un aumento de enfermedades graves, evitables e incluso mortales. Quizás el ejemplo más infame sea el estudio científico publicado en 1998 por Andrew Wakefield, que insinuó que la vacuna Triple Viral causa autismo. La continua difusión de esta idea fraudulenta, especialmente a través de las redes sociales, ha llevado a un resurgimiento mundial del sarampión y también ha impulsado el desarrollo de la "duda en la vacunación" en muchos países. Este ejemplo solo demuestra cómo la información falsa puede alterar la percepción pública y las actitudes hacia incluso una ciencia bien establecida.

Es fácil sentir que superar la montaña de noticias científicas falsas es insuperable para un científico común y corriente. Sin embargo, los científicos en general siguen siendo una de las profesiones de mayor confianza pública en todo el mundo (en el Reino Unido en 2018: el 83% de los encuestados tenían confianza en las opiniones de los científicos) y esto nos da una posición única que debería aprovecharse para ayudar a difundir los hechos. No es ficción.

Entonces, ¿cómo pueden ayudar los científicos que comunican ciencia?

Al comunicar la ciencia públicamente, ponemos una cara humana en un campo que puede verse como frío y distante. Los científicos son respetados, pero el público no entiende mucho sobre lo que hacen los científicos. Al usar todas las herramientas de redes sociales del siglo XXI, los científicos pueden crear contenido persuasivo que llegue rápidamente a grandes audiencias para contar las diversas y coloridas historias detrás de la ciencia y los investigadores que la llevan a cabo.

Pensando a largo plazo, es vital para los comunicadores de ciencia enfocarse y abogar por la educación de las generaciones más jóvenes. Los científicos deben hablar cuando ven información falsa y ser proactivos con las mentes jóvenes en la transmisión contra la ciencia falsa. Eventualmente, esto promoverá una mayor alfabetización científica en la sociedad en general, otorgando a las personas de habilidades y conocimientos necesarios para comprender y tomar decisiones sobre la ciencia y sus aplicaciones en la vida cotidiana.

Este tipo de intervención temprana en los jóvenes se conoce como "pre-bunking" y la investigación sugiere que es más eficaz que la desacreditación. Es difícil convencer a una persona para que cambie de opinión cuando ya ha incorporado el conocimiento falso.

(*) Jason Woolford es el curador de la comunidad de química en Twitter #RealTimeChem. Obtuvo un doctorado en química en la Universidad de Sussex. Desde 2013, ha trabajado en publicaciones científicas como editor.

Actividad Práctica

A- Buscar en el buscador *PubMed* trabajos científicos que contengan la palabra “cell apoptosis”, “exosomes” (exosomas), “stem cells” (células madre), “cell cycle” (ciclo celular), SARS-CoV2, “breast cancer” (cáncer de mama), etc... y averigüe desde que año se registran publicaciones y cuantas se registran en los últimos 5 años.

Discuta con sus compañeros de grupo: ¿cómo ha sido el avance del conocimiento en tópicos de biología celular en estos últimos años?

Resulta llamativo que sea diferente el avance del conocimiento científico para cada uno de los distintos temas ¿Cuál será la razón de este fenómeno? o ¿Qué criterios cree se deberían tener en cuenta para direccionar el avance científico?

A pesar de haberse descubierto recientemente el SARS CoV2, ¿cómo fue posible obtener tanta información en tan poco tiempo?

B- Busquen al menos dos notas periodísticas donde describan algún descubrimiento científico (divulgación) en algún Diario, preferentemente uno de gran tirada o más conocido y uno de menor tirada o menos conocido. Fijarse si cita la fuente científica de donde el periodista obtuvo la información. Validar la información del artículo de divulgación buscando en los buscadores científicos, el trabajo científico citado o, en caso de no tener citas, los trabajos científicos que validen la información que está exponiendo el periodista científico a través de su artículo en el diario. Los periodistas o divulgadores científicos deben citar la fuente de dónde sacaron la información para divulgarla. Indague si los artículos poseen la veracidad o rigurosidad de la divulgación realizada.

C- Usted se encuentra trabajando en la sección de ciencia del Diario “La Pura Verdad” y le piden que elabore una noticia a partir de algún conocimiento científico nuevo, puede tomar algún trabajo científico buscado anteriormente en el punto **A**, que le sirva como tema para su nota. Su jefe le pide que sea una noticia sensacionalista. Elabore un Título para su nota del diario.

D- Discuta con sus compañeros la importancia de una sociedad con conocimientos básicos de ciencia y con pensamiento crítico. Piense en lo ocurrido en el año 2020 durante la pandemia, cuando el Presidente de los EEUU Donald Trump insinuó que el uso de desinfectantes intravenosos podía matar el virus en el cuerpo. Busque más ejemplos y discútanlos con sus compañeros.

Bibliografía:

- El mundo de la Célula. 2007. 6^{ta} Edición. Becker W, Kleinsmith L, Hardin J. Editorial Pearson Education S.A. Madrid.
- Introducción a la Biología Celular. 2011. 3^o Edición. Alberts B, Hopkin J, Lewis R, Roberts W. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Alfabetización científica y tecnológica. 1997. FOUREZ, G. Ediciones Colihue. Buenos Aires, Argentina.

Webgrafía

- Science Communication: how can it help against fake news?. 2020. J. Woolford. Opinion. Science Communication. *Hindawi Publishing*. Licencia *CC-BY*.

Podcast Spotify

- La Ciencia Pop – Temporada 1 Capítulo 39: La enfermedad de los Nobel.

ACTIVIDAD N°2: TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO

Aislamiento de células del epitelio intestinal

Autores: Juan G. Chediack y Guido Fernández Marinone
Licencia CC-BY

Objetivos

- Conocer técnicas que permiten el aislamiento de células para su cultivo.
- Conocer la importancia de los cultivos celulares en la investigación científica.
- Determinar la viabilidad celular del grupo de células aisladas.
- Conocer las morfologías de distintos tipos celulares.

Temario: Técnicas de uso común en laboratorios de Biología Celular y Molecular. Interacciones entre las células y su entorno. Uniones celulares.

Conceptos básicos

Los cultivos de células “*in vitro*”, es decir en el laboratorio, consisten en un sistema formado por células provenientes de un órgano o un tejido, normal o tumoral, mantenidas en medios de cultivo de composición química definida (nutrientes y factores de crecimiento) y concentraciones controladas de O₂, CO₂, pH y humedad. De esta manera, es posible su supervivencia y multiplicación, manteniendo todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenían en el huésped.

El cultivo celular tuvo su origen en el siglo XIX, como un método para el estudio del comportamiento de las células animales libres de las variaciones sistémicas ocurridas dentro del organismo y bajo el estrés de un experimento. En la actualidad, pueden cultivarse en el laboratorio células procedentes de una amplia gama de tejidos y organismos diferentes. Particularmente en experimentos de biología celular, las técnicas de cultivo celular permiten el estudio de múltiples procesos celulares: procesos metabólicos, mecanismos de control del ciclo celular, regulación de la expresión génica, el estudio de numerosos procesos del cáncer y su diagnóstico, etc.

Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original recién extraído (por ejemplo: extracción de hepatocitos del hígado), este cultivo recibe el

nombre de Cultivo Primario. Cuando este cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confieren capacidad ilimitada de multiplicación, recibe el nombre de Línea Celular.

Los cultivos de células animales también se pueden clasificar de acuerdo a su capacidad de adherencia o no a una superficie determinada, pudiendo crecer en forma de monocapa, en una placa de cultivo, o en suspensión en frascos de cultivo.

Métodos de aislamiento de células epiteliales del intestino

El cultivo de células intestinales, como así su aislamiento permite el estudio de diversas funciones intestinales, tales como, mecanismos de digestión enzimática y proteínas transportadoras de nutrientes. Como dijimos, el aislamiento de células a partir de un tejido consiste en reducir el mismo a una suspensión celular. Esto se consigue mediante la ruptura de las uniones celulares (de gran importancia y abundancia en el tejido epitelial), existentes entre las células y con la matriz extracelular.

Una amplia variedad de técnicas han sido descritas para la preparación de suspensiones de células aisladas a partir del epitelio del intestino delgado. La mayoría de estas técnicas proporcionan una gran cantidad de células y usualmente permiten una separación razonable entre células de las vellosidades y células de las criptas. Estas técnicas pueden ser agrupadas de acuerdo al principio empleado para la disociación (o disgregación) del epitelio intestinal: Disociación Mecánica; Disociación Química y Digestión Enzimática

a) Disociación mecánica

El aislamiento de las células epiteliales a partir del intestino delgado es posible mediante la aplicación de distintas fuerzas mecánicas sobre este órgano. Dentro de los métodos de aislamiento mecánico se encuentran: raspado de la mucosa intestinal y agitación del tejido cortado en trozos, siendo éste último el más usado.

b) Disociación química

El aislamiento celular puede también ser fácilmente realizado por medio de la incubación del intestino delgado con compuestos químicos, principalmente agentes quelantes, que permiten liberar las células de sus interacciones dependientes de calcio (Ca^{+2}) y magnesio (Mg^{+2}) entre sí y con la membrana basal.

Entre los reactivos empleados para aislamiento por medio de agentes quelantes, el

EDTA (ácido Etilendiaminotetraacético) ha sido el más empleado, aunque también han sido usados el citrato de sodio y el EGTA.

c) Digestión enzimática

La digestión por medio de enzimas consiste en la ruptura de las proteínas que conforman las diferentes uniones celulares, liberando las células. Las **enzimas** proteolíticas más usadas para la separación celular del epitelio intestinal incluyen **tripsina, hialuronidasa, colagenasa y dispasa**, siendo la tripsina en bajas concentraciones la más usada.

En ocasiones se pueden realizar técnicas mixtas, por ejemplo, usar soluciones de EDTA con Tripsina en bajas concentraciones, de esta manera se acelera el aislamiento de células. Por otro lado, la elección de las distintas técnicas va a depender del tipo de diseño experimental y los procesos celulares que quieran estudiarse.

Existen dos formas de producir el aislamiento del epitelio intestinal: a) Aislamiento en una etapa y b) Aislamiento en más de una etapa (aislamiento secuencial).

a) Aislamiento del epitelio intestinal en una etapa

Es utilizado principalmente para la producción de cultivos primarios y líneas celulares. También se lleva a cabo con el fin de comparar diferentes técnicas de disociación, estudiar reacciones metabólicas en enterocitos aislados, e incluso el estudio del proceso de diferenciación de las células madre intestinales.

b) Aislamiento secuencial del epitelio intestinal

El aislamiento secuencial, el cual implica que las células son aisladas en más de una etapa, se realiza principalmente con el fin de separar sub-poblaciones de enterocitos a lo largo del eje cripta-vellosidad, con el fin de estudiar la función del enterocito *in vitro*, por medio de la determinación de la actividad de diversos marcadores, principalmente enzimas y transportadores de membrana ligados al proceso de diferenciación celular. También es posible realizar este aislamiento secuencial para aislar tipos celulares más indiferenciados, con el fin de producir cultivos celulares sin interferencia de fenotipos diferenciados.

El enterocito es el tipo de célula más importante que pertenece al epitelio intestinal, constituye más del 90% de las células epiteliales en las criptas y más del 95% de las células de las vellosidades. Una vez aisladas las células se debe conocer el estado de salud de las mismas,

para lo cual se realiza la tinción con azul tripán. La reactividad del azul tripán está basada en que el cromóforo no interacciona con las células a menos que la membrana esté dañada, por lo cual, las células azules, en las que ha penetrado el colorante, se consideran no viables (muertas).

Cultivo celular

Teniendo en cuenta la cantidad de células por mililitro en la suspensión obtenida, se procede a realizar la siembra en cajas de petri, placas de cultivo o frascos de cultivo, con un medio de cultivo apropiado para el tipo celular.

Medios de cultivo

Un medio de cultivo consta de un gel o una solución que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos, células, tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas. Según lo que se quiera hacer crecer, el medio requerirá unas u otras condiciones. Generalmente se presentan desecados en forma de polvo fino o granular antes de ser preparados; ya preparados pueden encontrarse en estado sólido, semisólido o líquido.

Composición

- Macronutrientes.
- Micronutrientes o elementos traza.
- Factores de crecimiento

Algunos de los medios más utilizados son:

1. Medio Basal de Eagle (BME)
2. Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM)
3. R.P.M.I. 1640.
4. Medio MEM modificado por Dulbecco (DMEM).
5. Modificación de Iscove del medio DMEM (IMDM).

En el práctico usaremos DMEM el cual es una modificación del medio basal medium Eagle (BME), contiene una mayor concentración de aminoácidos y vitaminas, así como la adición de antibióticos y la suplementación con suero fetal bovino. El suero fetal bovino (SFB) es un subproducto derivado del faenamiento de vacas preñadas. Aunque la composición, los efectos y las interacciones exactas de todos los componentes de SFB tienen todavía que ser esclarecidas (descubiertas), los componentes principales pueden ser resumidos como sigue:

- Proteínas necesarias para la adherencia de las células a la matriz de soporte
- Enzimas y Hormonas proteicas

- Factores específicos de promoción del desarrollo celular
- Factores de inhibición del desarrollo celular
- Hormonas no proteicas
- Lípidos esenciales para el desarrollo, diferenciación y multiplicación celular
- Minerales
- Metabolitos y nutrientes
- Sustancias con capacidad de tampón (buffer).
- Inhibidores de proteasas
- Ligantes
- Inactivantes de materiales tóxicos

Además, con el fin de evitar el crecimiento de contaminantes en el cultivo, se suele suplementar éste con sustancias antibióticas de diferente espectro de acción. La adición de antibióticos debe ser estrictamente controlada para evitar efectos nocivos sobre el cultivo. Una de las mezclas de uso más común es: penicilina en una concentración de 100,000 U/mL y estreptomicina en una concentración de 100 mg/mL.

ACTIVIDADES:

a. Observación de tejido de intestino

Observación microscópica de un corte histológico de intestino delgado coloreado con hematoxilina-eosina. Observar detenidamente, dibuje e identifique las partes constituyentes del epitelio intestinal.

b. Aislamiento de enterocitos a partir de intestino de paloma por digestión enzimática

1. Colocar la muestra de tejido en solución buffer salina en una caja de Petri en baño de hielo, y cortar con bisturí o tijera quirúrgica hasta obtener pequeños trozos de tejido.

2. Trasvasar en un tubo de ensayo y tratar la muestra con una solución de Tripsina/EDTA 0.25%. Agregar cantidad necesaria hasta que los tejidos queden sumergidos en la solución.

3. Llevar a estufa o baño termostático a 37 °C durante 30 min y agitar cada 5 minutos. Después de este período de tiempo se obtendrá la suspensión celular que contiene a todas las células presentes en ese tejido.

4. Agitar para desprender las células y luego recoger con pipeta el medio líquido

con las células, evitando los restos de tejido, en tubos de 1,5 ml.

5. Centrifugar a 800 g por 5min. Eliminar el sobrenadante y lavar los pellets (o precipitados) celulares con medio de cultivo dos veces, centrifugando nuevamente a 800 g por 5min.

6. Resuspender las células aisladas en medio de cultivo con suero y antibióticos, y posteriormente evaluar la viabilidad celular con solución de azul tripán.

7. Observar en microscopio óptico. Regular la intensidad de la luz a través del diafragma y el condensador.

c. **Determinación de la viabilidad celular. Técnica de azul tripán**

Se utilizarán 250 µl de azul tripán al 0,4 % en PBS (buffer fosfato), 150 µl de HBSS-manitol (solución salina balanceada de Hanks) y 100 µl de la suspensión celular, lo cual diluye dicha suspensión 5 veces (dilución 1/5). Todo este procedimiento es llevado a cabo en baño de hielo (~4°C), con el fin de minimizar la actividad de las proteasas. Posteriormente, se siembran 10 µl de la mezcla en un portaobjeto especial denominado cámara de Neubauer (figura 1), y 1 minuto después se lleva al microscopio (objetivo de 40X) y se comienza a contar, el número de células hasta el minuto 15, como máximo (pasado ese tiempo la mayoría de las células se tiñen). Las células totales (transparentes y azules) y viables (transparentes) se cuentan al mismo tiempo y se realiza el cálculo final de viabilidad y número de células por ml mediante esta fórmula.

$$\text{N}^\circ \text{ de células/ml} = (\text{N}^\circ \text{ de células contadas} / \text{N}^\circ \text{ de cuadros contados}) \times 16 \times 10^4 \times 5$$

Donde 5 es el factor de dilución de la suspensión celular.

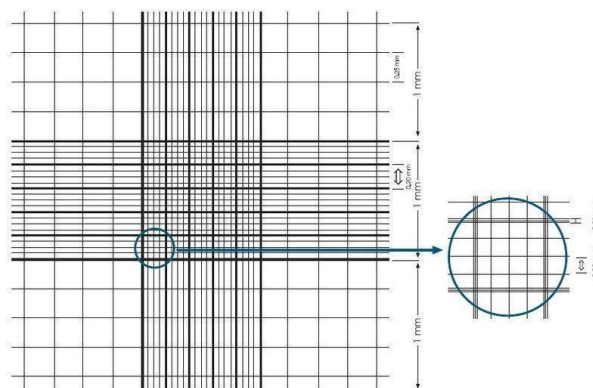


Figura 1: cámara de Neubauer

d. **Realización de un cultivo celular (a modo demostrativo).**

Se realizará la siembra de células en un medio de cultivo suplementado con 10 % de

suero fetal bovino y antibióticos (para evitar contaminación), en cajas de Petri tratadas con colágeno (como proteína de adherencia).

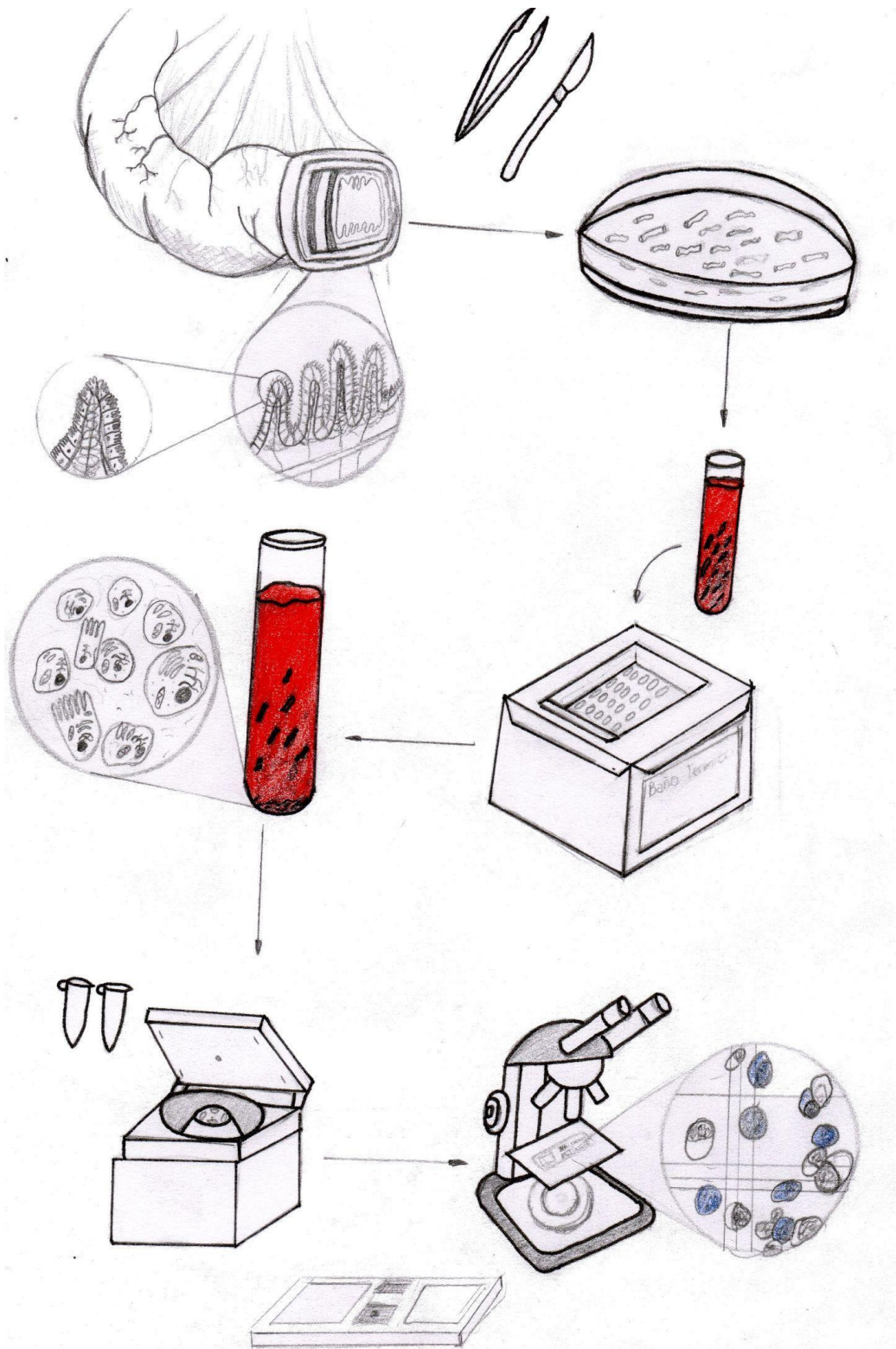


Figura 2: Esquema del procedimiento (Gonzalo Martínez, licencia CC-BY-NC).
Complete la figura colocando las condiciones del aislamiento y el equipamiento.

Bibliografía

- Biología Celular y Molecular, 7ª ed. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scout MP, Zipursky L, Darnell J. 2016. Editorial Médica Panamericana. Madrid.
- Introducción a la Biología Celular. 2011.3º Edición. Alberts B, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Isolation and Culture of Intestinal Epithelial Cells. Booth C. and O'Shea J. 2002. Second Edition. 303-335. R. Ian Freshney (Editor), Mary G. Freshney (Editor).
- Evaluation of three methods for sequential isolation of epithelial cells from avian intestine.2008. Mac Donal O, Chediack JG and Caviedes-Vidal E. Biocell; 32(3):219-27.

ACTIVIDAD N° 3: TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO

Aislamiento de mitocondrias de células animales y vegetales por fraccionamiento celular

Objetivos

- Entender el principio físico utilizado para la separación de organelas.
- Aislar e identificar mitocondrias de tejido animal.
- Aislar e identificar cloroplastos.
- Observar/examinar esas fracciones microscópicamente.
- Experimentar con fracciones aisladas de mitocondrias.

Temario: Métodos y técnicas fundamentales para el estudio de la Célula. Microscopía óptica. Organelas: estructura y función.

Conceptos básicos

El fraccionamiento celular o fraccionamiento subcelular es una técnica de laboratorio, donde, luego de la disgregación de las células del tejido, se intenta reagrupar las partículas, generalmente células y organelas, en función de sus propiedades biofísicas. Mediante el fraccionamiento celular se consigue separar conjuntos homogéneos, por lo general de organelas, a partir de una población heterogénea de células. Esta metodología es usada para investigar la bioquímica y fisiología de las mismas fuera del ambiente complejo de la célula.

Homogenización

Para preparar los tejidos para el fraccionamiento celular, primero se los debe suspender en un medio apropiado (una solución amortiguadora isotónica). Para mantener la integridad de las organelas y enzimas durante el procedimiento del fraccionamiento, todas las soluciones y material de vidrio deben mantenerse en frío. Después de seccionar el tejido, este está preparado para la homogenización, procedimiento que rompe los enlaces celulares y libera el contenido celular, sin dañar el contenido liberado en suspensión. La suspensión de células fragmentadas se llama homogenato. Para los tejidos de plantas, la homogenización se debe realizar con un mortero, a la cual se le puede añadir arena como abrasivo.

Centrifugado

Debido a las diferencias en tamaño y densidad, cada componente celular está sujeto a una determinada fuerza centrífuga. La fuerza generada por la centrífuga se expresa como fuerza centrífuga relativa (RCF) o en unidades g (unidades de gravedad). La RCF es una función de velocidad de centrifugación en revoluciones por minutos (rpm) y la distancia de partículas desde el eje de rotación. Cuando decimos "centrifugamos a 100000 g" queremos decir que centrifugamos con una fuerza de 100000 veces mayor que la de la gravedad.

Centrifugación diferencial

En la centrifugación diferencial, el homogenato es centrifugado repetidas veces a altas velocidades, sedimentándolo progresivamente en pequeñas partículas. El método está ilustrado en la figura 1.a. La primera centrifugación es a 600 g por 10 minutos, el cual sedimenta la fracción nuclear. Este sedimento o más usualmente llamado "pellet" contiene el núcleo, células intactas y tejido. La próxima separación es el sobrenadante postnuclear o partículas suspendidas en líquido sobre el "pellet" nuclear, el cual es transferido a otro tubo de centrífuga y se centrifuga a 7000 g por 30 minutos en una centrífuga. El material sedimentado se conoce como fracción mitocondrial; éste contiene mitocondria y microsomas.

Mitocondria. Las mitocondrias son teñidas con el colorante verde Jano (a una concentración de 0,01%). Después de la tinción, la mitocondria se tiñe azul-verdosa, que es el color del colorante en su forma oxidada. El verde Jano se mantiene en estado oxidado por el sistema de oxidasa citocromo de la mitocondria.

ACTIVIDADES:

1. Tinción de mitocondrias de células epiteliales humanas

Materiales

- Hisopo estéril -Verde Jano B 0,01% en solución salina – Cubreobjetos-
Portaobjeto.

Procedimiento:

1. Con hisopo estéril, raspar suavemente la parte interna de la mejilla, colectándose de esta manera un gran número de células.
2. Frotar el hisopo suavemente sobre el portaobjeto, en una sola dirección, para esparcir las células. Dejar secar.

3. Poner unas gotas de la solución verde Jano y dejar actuar por 5-10 min.
4. Posteriormente, lavar las células suavemente una vez con agua destilada. Montar las células en una gota de agua destilada con un cubreobjeto y observar bajo microscopio.

OBSERVACIONES Y PREGUNTAS:

¿Qué estructuras celulares pudo observar en estas células? Esquematice lo observado.

Observe varias células y establezca la posición de las organelas.

2. Aislamiento de mitocondrias a partir de tejido de hígado de ave.

ATENCIÓN: TODO EL PROCEDIMIENTO DEBE SER HECHO SOBRE HIELO Y TRABAJAR CON CENTRÍFUGA REFRIGERADA.

- 1) Tomar el tejido hepático y pesarlo.
- 2) Agregar 5 ml de buffer de sacarosa 0,25 M por gramo de hígado y romper el tejido hepático utilizando un homogeneizador de tejido.
- 3) Colocar la solución (hígado y sacarosa) en un tubo de centrífuga (Fig. 1.b).
- 4) Centrifugar 1000 g durante 10 minutos.
- 5) Pasar el sobrenadante a otro tubo y centrifugar 10000 g durante 15 minutos.
- 6) Descartar el sobrenadante.
- 7) Agregar 1 ml de buffer fosfato pH 7 al pellet y centrifugar a 10000 g durante 10 minutos para lavar las mitocondrias
- 8) Agregar 1 ml de buffer fosfato pH 7 y mezclar.
- 9) Guardar en heladera (0-5°C).

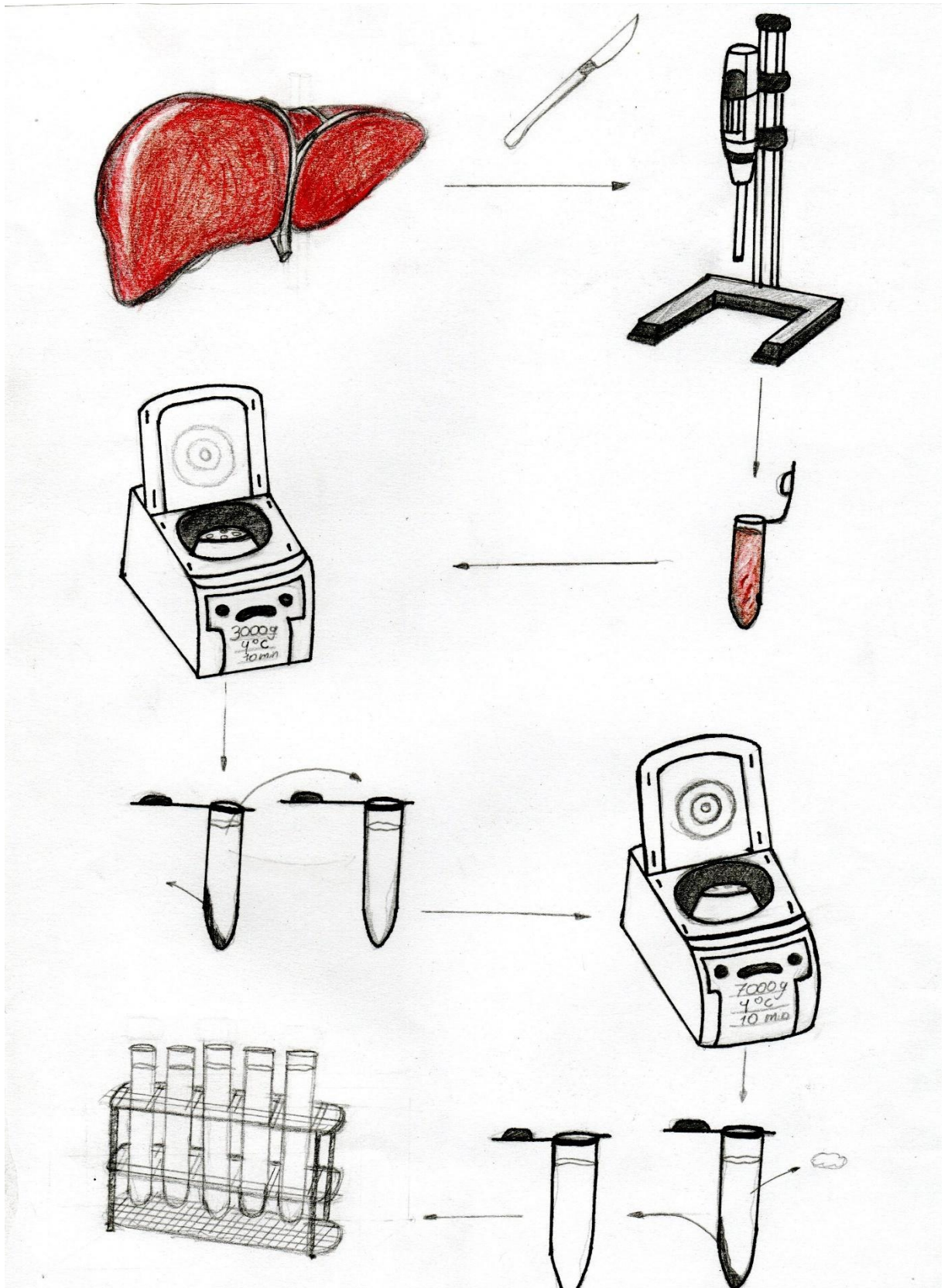


Figura 1.a. Imagen representativa del proceso de fraccionamiento celular (Gonzalo Martínez, licencia CC-BY-NC).

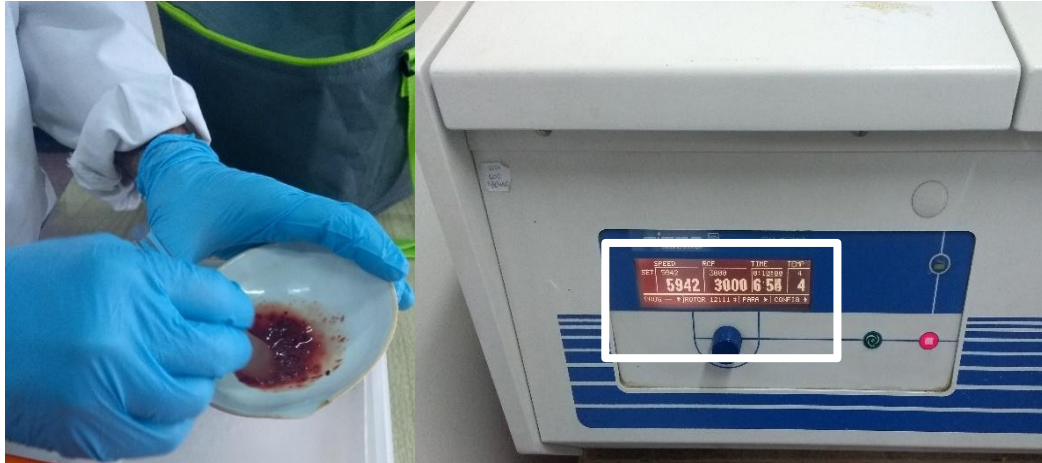


Fig 1.b. Fotografías de la metodología (Guido Fernández, licencia CC-BY-NC)

3. Aislamiento de mitocondrias en células vegetales.

1. Pesar 1 g de hojas frescas de espinaca u otra hoja verde, a las cuales se les remueve la nervadura central.
2. Corte las hojas en pequeños pedazos y colóquelas en un mortero frío. Añada nitrógeno líquido para congelarlas y romperlas, luego adicione 2 ml de la solución amortiguadora de Tris-HCl pH=8 fría y 8ml de solución de NaCl 0,35 M. Macere el tejido por 4 minutos colocando el mortero sobre el hielo para inactivar las enzimas hidrolíticas que se liberan durante la ruptura celular.
3. Filtre la suspensión a través de algodón a un tubo de centrifuga de 15 ml frío. Luego trasvase el líquido a varios tubos de 1,5 ml.
4. Centrifugue el líquido filtrado a 1000 g por 5 minutos, para sedimentar fragmentos de tejido y organelas grandes. Verifique que los tubos de centrifuga estén balanceados.
5. Recupere el sobrenadante colocándolo en un tubo nuevo y centrifugue a 10000 g por 10 minutos, en esta centrifugación se obtendrán las mitocondrias sedimentadas formando un pellet.
6. Descarte el sobrenadante y usando una pipeta automática, añada 1000 µl de la solución NaCl 0,35 M al “pellet” que quedó en cada tubo de la centrifuga. Resuspenda suave y lentamente con una pipeta Pasteur.
7. Centrifugue a 10000 g durante 10 minutos para lavar las mitocondrias.

8. Descarte con cuidado el sobrenadante y resuspenda el pellet en 2 ml de solución amortiguadora (Tris-HCl 0,2 M, pH=8) para concentrar las mitocondrias en una sola muestra.

9. Tape el tubo y colóquelo en hielo.

4. Determinación de la actividad mitocondrial

Reactivos:

- Azul de metileno 0.001 M (diluido 1/100): colorante orgánico; mientras hay oxígeno disuelto en la disolución, está en su forma oxidada de color azul (su forma reducida es incolora).

- Buffer 0,25 M de sacarosa

- Succinato de sodio 0,1M: sustrato de la enzima succinato deshidrogenasa (enzima mitocondrial)

Procedimiento:

1) Con las soluciones mitocondriales obtenidas previamente, realizar el procedimiento detallado en la tabla 1.

2) En 5 tubos de ensayo, previamente rotulados, agregar en orden los siguientes reactivos en las cantidades indicadas:

Tubos	1	2	3	4	5
Succinato de sodio	0,9 ml		0,9 ml	0,9 ml	0,9 ml
Buffer de sacarosa	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Agua destilada	2,1	2	0,9	1,1	1,1
Azul metileno	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Mitocondrias		1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Mezclar por inversión					

Tabla 1: Ensayos a partir del aislamiento de mitocondrias.

3) Agregar cuidadosamente 1 mL de vaselina líquida a los tubos del 1 al 4. Esto formará una capa en la parte superior que evitará que las soluciones con las mitocondrias entren en contacto con el oxígeno del aire.

4) Colocar tapones de goma en los tubos del 1 al 4, dejando el tubo 5 completamente expuesto al aire.

5) Observar e interpretar los cambios producidos.

Bibliografía

- Laboratory Investigations in Cell and Molecular Biology. Bregman, Allyn. 1990. 3^{ra} Ed. John Wiley & Sons, N.Y.
- Protocols on cell biology experiments. Indian Society of Biology
- El mundo de la Célula. 2007. 6^{ta} Edición. Becker W, Kleinsmith L, Hardin J. Editorial Pearson Education S.A. Madrid.
- Introducción a la Biología Celular. 2011. 3^o Edición. Alberts B, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Biología Celular y Molecular". 2016. Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell. 7^{ma}. Edición. Editorial Médica Panamericana.

ACTIVIDAD N° 4: TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO

Cuantificación de proteínas en muestras biológicas

Objetivos

- Entender el principio químico utilizado para la cuantificación de proteínas.
- Analizar y comprender las diferentes concentraciones de proteínas que poseen las muestras biológicas.

Métodos más comunes de cuantificación de proteínas

Determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica es una técnica de rutina básica cuando se aborda un esquema de purificación. Existen diferentes métodos para la **cuantificación** de proteínas. Los métodos varían según el tipo de muestra y la sensibilidad necesaria para tener un valor preciso de la concentración proteica de la muestra.

Los métodos más usuales para el estudio de la cantidad de proteínas son:

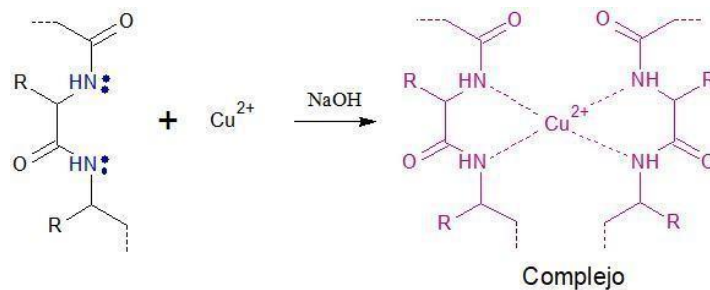
- Reacción del Biuret: reacción colorimétrica basada en la unión de Cu^{+2} en medio alcalino con los grupos amino de las proteínas.
- Método de Lowry: método colorimétrico, basado en la utilización de una mezcla que contiene molibdato, tungstato y ácido fosfórico (reactivo de Folin-Ciocalteu), que sufre una reducción cuando reacciona con proteínas, en la presencia del catalizador cobre (II). Produce un compuesto con absorción máxima a 750 nm (coloración azulada).
- Método de Bradford: es un método colorimétrico basado en el cambio de color del colorante Coomassie brilliant blue G- 250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos. La unión del colorante con proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm.

Procedencia de las proteínas que queremos cuantificar en el trabajo práctico

Se determinará la concentración de proteínas en homogenato de intestino y de hígado de aves de la especie *Passer domesticus*. La determinación de la concentración de proteínas será llevada a cabo por el método de Biuret.

Método de Biuret:

El método comprende un ensayo colorimétrico de un paso donde se cuantifica la formación de un complejo estable entre proteínas y cobre (II). Se basa en la formación de un complejo coloreado entre el ión Cu^{+2} y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. Un Cu^{+2} se acompleja con 4 NH. El complejo presenta un color violeta-púrpura, que presenta un máximo de absorción a 540nm. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos) y la reacción no presenta interferencias con otros componentes. La sensibilidad del método es baja (rango de 1 a 6 mg/ml) y sólo se recomienda para la cuantificación de proteínas en preparados muy concentrados, como por ejemplo en suero.



Reacción de Biuret. Imagen extraída de Química de los Alimentos (<http://blog.pucp.edu.pe>).

El color generado por este método es poco estable y depende de las condiciones de reacción, por lo que se debe realizar una curva de calibración con soluciones de una proteína de concentración conocida. La curva de calibración es un método de química analítica empleado para medir la concentración de una sustancia en una muestra por comparación con una serie de soluciones de concentración conocida. Se basa en la existencia de una relación en principio lineal entre un carácter medible (por ejemplo, la absorbancia) y la variable a determinar (concentración). Para ello, se efectúan diluciones de una solución de concentración conocida y se comienza su lectura y el consiguiente establecimiento de una función matemática que relacione ambas. Después, se lee el mismo carácter en la muestra problema y, mediante la sustitución de la variable independiente de esa función, se obtiene la concentración de la muestra. De este modo empleando la curva de calibración, se puede interpolar el dato de la muestra problema hasta encontrar la concentración (Fig. 1).

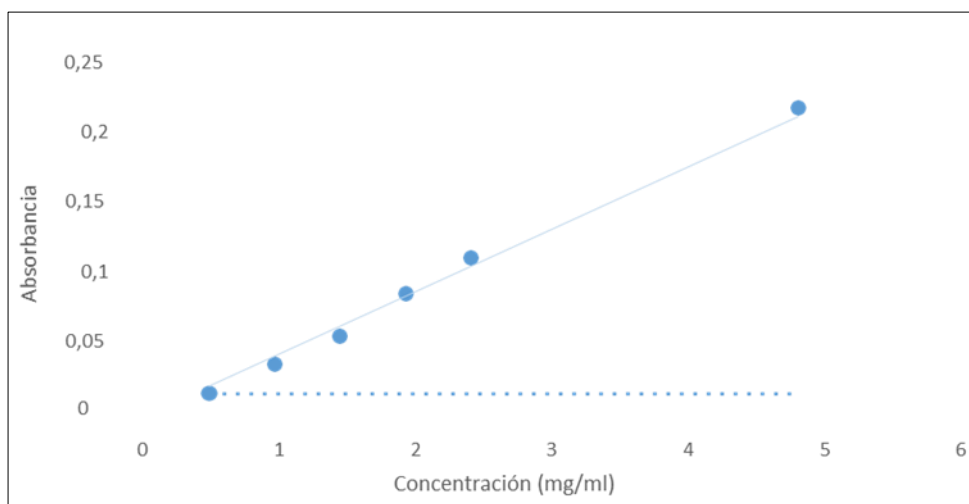


Fig 1: Curva patrón de proteína.

Ecuación de la curva: $y = 0,0469x - 0,003$
 $R^2 = 0,9974$

PROCEDIMIENTO:

1. **Construcción de curva de calibración para el método de Biuret**
1. Encender el espectrofotómetro y ajustar la longitud de onda del espectrofotómetro a 540 nm.
2. Colocar en una gradilla 6 tubos de ensayo limpios y secos. Los tubos se enumeran del 1 al 6 con un marcador (cada tubo tendrá una concentración).
3. Con pipetas adecuadas al volumen a medir, colocar en cada tubo los volúmenes de solución patrón de albumina de suero bovino (5 mg/ml) y de agua destilada que se indican en la siguiente tabla:

Tubo (N°)	Patrón de proteínas (µl)	Agua (µl)
1	0	1000
2	200	800
3	400	600
4	600	400
5	800	200
6	1000	0

4. Colocar en una gradilla 12 tubos de ensayo limpios y secos. Los tubos se enumeran del 1 al 6 con un marcador (cada tubo tendrá una concentración y un duplicado, ej: 1, 1d, 2, 2d, etc...).
5. Añadir a cada tubo de ensayo agregar 20 μ l de la concentración correspondiente, luego se agrega 2 ml del reactivo de Biuret y se mezcla suavemente.
6. Colocar la gradilla con los tubos en un baño termostático a 37°C durante 15 min.
7. Una vez transcurrido los 15 min, retirar los tubos del baño y dejar a enfriar unos minutos a temperatura ambiente.
8. Proceder a medir en el espectrofotómetro, para lo cual primero se ajusta el cero de absorbancia con la solución blanco, exenta de proteína (tubo 1 y su duplicado). Luego se miden las absorbancias de los tubos 2 a 6 y se anotan las medidas de absorbancia en el cuaderno de laboratorio.
9. Calcular la concentración de proteína que se ha colocado en cada uno de los tubos de ensayo. Como ejemplo: en el ensayo de Biuret, en el tubo 2 se han colocado 200 μ l de proteínas totales BSA 5 mg/ml y se han diluido a un volumen de 1000 μ l con agua destilada. Por lo tanto, la concentración de proteína (BSA) en el tubo será: $(200 \mu\text{l} \times 5 \text{ mg/ml}) / 1000 \mu\text{l} = 1 \text{ mg/mL}$. Calcule cuantos mg/ml va a tener en los 20 μ l que va a poner en el tubo 1, 1d y los siguientes.
10. En una hoja de cálculo de Excel, representar los valores experimentales de absorbancia obtenidos frente a la concentración de proteína estándar calculada de cada uno de los tubos en una recta ajustada por el método de mínimos cuadrados. Así se obtiene una curva calibración donde las abscisas (x) representan la concentración de proteína (mg/mL) y las ordenadas (y) los valores de absorbancia. Obtener la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2), es importante saber su valor, porque es un porcentaje de variación de la variable de respuesta que explica su relación con las variables predictoras. Mediante la ecuación de la recta se puede calcular la concentración de proteína en una muestra despejando los valores de x de la ecuación de la recta.

2. Determinación de concentración de proteínas en muestras biológicas mediante el método Biuret

1. Encender el espectrofotómetro y ajustar la longitud de onda del

espectrofotómetro a 540 nm.

2. Colocar en una gradilla tubos de ensayo limpios y secos. Los tubos se rotulan para cada muestra biológica.
3. Con pipetas adecuadas al volumen a medir, colocar en cada tubo un volumen de 20 μ l de muestras problema (homogenato de intestino, homogenato de hígado, etc...).
4. Añadir a cada tubo de ensayo 2 ml del reactivo de Biuret y mezclar suavemente.
5. Colocar la gradilla con los tubos en un baño termostático a 37°C durante 15 min.
6. Una vez transcurrido los 15 min, retirar los tubos del baño y dejar enfriar unos minutos a temperatura ambiente.
7. Proceder a medir en el espectrofotómetro, para lo cual primero se ajusta el cero de absorbancia con la solución blanco exenta de proteína (tubo 1). Luego se miden las absorbancias de los tubos restantes y se anotan las medidas de absorbancia en el cuaderno de laboratorio.
8. Mediante la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración se puede calcular la concentración de proteínas en las muestras despejando los valores de x de la ecuación de la recta.

Bibliografía

- Berg, J.M.; John, L.T.; Lubert, S. (2008) *Bioquímica*. 2ª ed. Reverté, Barcelona.
- Beas C., D. Ortuños y J. Armendariz (2009) *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones*. Editorial Mc Graw-Hill.
- Introducción a la Biología Celular. 2011.3ª Edición. Alberts B, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.

ACTIVIDAD N°5: TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO

Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS “SDS-PAGE”

Objetivos

- Conocer los fundamentos de una técnica de uso frecuente para la investigación en laboratorios de Biología Celular.
- Realizar entrenamiento en el armado de geles de poliacrilamida.
- Realizar la separación de proteínas de una muestra biológica.

Temario: Principales técnicas y métodos para estudiar las células y sus partes. Identificación de componentes moleculares: cromatografía, electroforesis, Western, Southern y Northern blot.

Fundamentos teóricos de la electroforesis

La electroforesis es una técnica separativa de biomoléculas que utiliza la carga neta de las mismas para su separación o purificación. El término electroforesis se utiliza para describir la migración de una partícula cargada (iones o partículas coloidales) a través de un soporte de dispersión, bajo la influencia de un campo eléctrico. Las moléculas se separan en función de su carga eléctrica, migran al electrodo de carga contraria y a mayor velocidad cuanto mayor sea la carga de la molécula. Entre los soportes más comunes figuran: papel, acetato de celulosa, geles de almidón, agarosa o poliacrilamida. Los métodos electroforéticos son muy utilizados, fundamentalmente con fines analíticos, en la separación de las proteínas y los ácidos nucleicos.

Electroforesis de Proteínas – SDS-PAGE

La separación de proteínas sobre la base de su carga eléctrica depende de sus propiedades ácido-básicas, las cuales se hallan determinadas en gran medida por el número y los tipos de grupos R ionizables en sus cadenas polipeptídicas. Cada proteína tiene un pH isoelectrónico (PI) característico, que es aquel en el cual la molécula no porta carga eléctrica neta y es incapaz de migrar en un campo eléctrico. Dado que las proteínas adquieren una carga neta a un pH distinto al PI, puede migrar, y su velocidad de migración dependerá de la densidad de carga de la proteína (relación entre carga/masa). Sin embargo, en presencia de un detergente

aniónico como el dodecilsulfato sódico (SDS), las proteínas adquieren una carga neta negativa y la separación electroforética se produce solamente debido a su masa. Esto es debido a que el SDS tiene la propiedad de unirse a las cadenas polipeptídicas en una proporción constante (1,4 g SDS/g de proteína), de modo que en el complejo SDS-proteína la carga de la proteína queda enmascarada por la de las múltiples cargas de las moléculas de SDS.

Los geles de poli(acrilamida) son el resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bis(acrilamida). Controlando la concentración de ambas obtenemos geles de diferente grado de reticulación (diferente diámetro de poro). En la preparación del gel, la polimerización de los monómeros de acrilamida produce cadenas lineales. Al incluir bis(acrilamida), ésta da lugar a puntos de ramificación en el polímero, lo que permite formar una matriz tridimensional, dando lugar al gel de poli(acrilamida). El tamaño de los huecos o poros que forma la red del polímero depende de la concentración de acrilamida y del grado de entrecruzamiento (es decir, de la proporción de bis(acrilamida) con respecto al total). Así, variando la concentración de acrilamida y bis(acrilamida) en la preparación del gel se consiguen distintos grados de porosidad y, por tanto, distintos intervalos de separación de proteínas. También se añade una solución amortiguadora de pH (pH 8,8 y pH 6,8), comúnmente Tris-HCl (buffer Tris-HCl 1 M). Para poder iniciar la reacción se añade persulfato amónico (agente iniciador), que al disolverse en agua genera radicales libres que transforman la acrilamida en radical libre y se inicia la polimerización. El TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina), que también debe agregarse a la solución actúa como catalizador.

Sistemas de soluciones amortiguadoras continuas y discontinuas:

El sistema de buffer continuo es aquel donde los iones del buffer se encuentran en la muestra, gel, reservorios electródicos, a un pH constante. En estos sistemas la muestra proteica se coloca directamente en el gel, en el cual ocurrirá la resolución. Este gel tiene tamaño de poro lo suficientemente pequeño como para fraccionar según tamaño, los distintos componentes de la muestra durante la electroforesis.

En cambio, un sistema discontinuo (multifásico) emplea distintos buffers en el gel, respecto de los que existen en los compartimentos electródicos. Generalmente, los sistemas discontinuos tienen discontinuidades no sólo en la composición del buffer sino también en el pH. En este tipo de sistema, la muestra se coloca en un gel de apilamiento (“stacking”) de poro grande que se encuentra polimerizado con un gel de poro chico. La ventaja que posee este sistema es que permite utilizar grandes volúmenes de muestras diluidas (Figura 1).

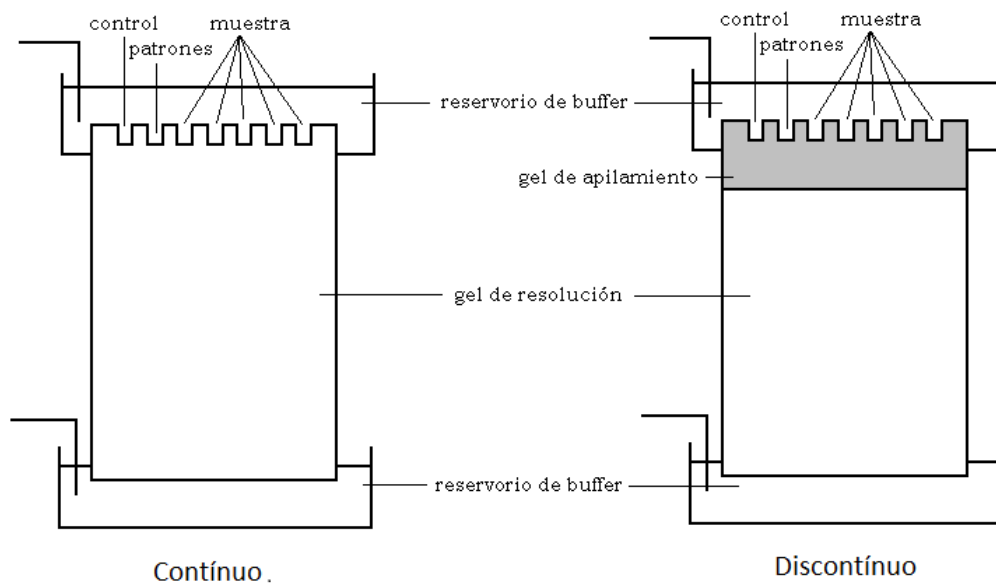


Figura 1: esquema tipos de sistemas (Juan Chediack, licencia CC-BY-NC).

Elección del pH

La electroforesis en gel de PAGE puede realizarse en un rango de pH 3 a 10. En los sistemas disociantes (o desnaturalizantes, como el SDS-PAGE) el pH no es crítico, pero en los sistemas no-disociantes (o nativos) sí, ya que las proteínas se separan en función de su tamaño y de la carga neta, la cual se ve alterada por el pH. En la elección del pH en estos sistemas se debe tener en cuenta el rango de pH en el cual las proteínas son estables. Dentro de éste rango, se selecciona el pH teniendo en cuenta los PI.

Análisis del gel luego de la electroforesis

Preparación de las muestras:

El buffer de siembra* está compuesto por:

- Glicerol, que le confiere mayor densidad a las muestras, y las hace a precipitar en el fondo del pocillo, para que no queden flotando en el buffer.
- Dos colorantes para ver a simple vista el avance de la corrida electroforética de las muestras. El azul de bromofenol (BPB): una molécula pequeña, que va a ir al frente de la corrida. Y el Xileno-Cianol (XCl): migra más lento, va a marcar la mitad de la corrida.
- Luego se colocan las muestras en los pocillos que se forman en el gel por acción de los dientes del peine, y comienza la corrida de las muestras.
- En los carriles se corren las muestras, un patrón de peso molecular y un negativo, que puede ser agua (para verificar que no haya interferencia de ningún tipo).

*Por lo tanto, el buffer de siembra nos permite que la muestra no quede flotando en el pasillo y a su vez podemos visualizar el recorrido de la misma a través de los colorantes empleados.

Cuantificación de la concentración proteica de la muestra.

Se realizará la determinación de la concentración de proteínas en las muestras biológicas mediante un kit comercial de determinación de concentración proteica. Primero deberán hacer una curva de calibración con estándares de albúmina y posteriormente determinar la concentración proteica de la muestra a utilizar (ver Anexo 1).

Métodos de tinción

1. Azul Coomassie es el más utilizado, detecta 1 µg de proteína/mm².
2. Nitrato de Plata, detecta 0,01 µg de proteína/mm². Es un método muy sensible, se deben usar siempre guantes ya que la tinción con plata puede detectar proteínas de queratina en la piel.

Trabajo Práctico Virtual

Para comenzar a adquirir entrenamiento y conocer los distintos componentes de esta técnica, pueden acceder a este laboratorio virtual, de uso libre (creative commons). En este simulador podrán encontrar toda la información y podrán ejercitar lo que posteriormente realizarán en la práctica presencial de laboratorio.

<http://biomodel.uah.es/lab/SDS-PAGE/inicio.htm>

Simulación de electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con SDS

Presentación Instrucciones Análisis de resultados Ejercicios Terminología

Presentación e instrucciones breves

Esta aplicación simula el proceso de electroforesis de las proteínas en un gel de poliacrilamida con SDS. Tras la separación, se puede obtener un gráfica con los resultados. En ésta, se determina la masa molecular experimental de las muestras a partir de su movilidad comparada con la de los patrones.

Brevemente:

1. Elige una velocidad para la animación (depende de tu ordenador)
2. Elige una muestra (Problemas nº 1 a 10).
3. Elige la concentración de acrilamida en el gel (entre 7,5% y 15%).
4. Elige 2 o más patrones, marcando las casillas que hay junto a sus nombres. Puedes consultar su identidad y propiedades pulsando el botón [Info. proteínas](#).
5. Elige un voltaje.
6. Pulsa el botón [Añadir patrón](#) para cargar los patrones en el primer pocillo.
7. Pulsa el botón [Añadir muestra](#) para cargar la muestra en el segundo pocillo.
8. Pulsa el botón [Comenzar](#) para conectar la corriente y comenzar la electroforesis. Antes de que las bandas se salgan por abajo, pulsa el botón [Detener](#) para pararla.

Se buscan colaboradores:
para sacar partido a este simulador, sería interesante disponer de ejercicios o guiones que lo utilicen; también serán bienvenidos datos contrastados de otras proteínas.

This page is also available [in English](#).

Parámetros Gráfica Simulación Info. proteínas

PARÁMETROS DE LA ELECTROFORESIS

Velocidad de la animación
 Lenta Media Rápida

Proteínas problema % Acrilamida
Problema nº1 7,5%

Patrones

B-gal.
 ovalb.
 amf. carb.
 TIM
 Mioglob.
 LisoC
 BPTI

Voltaje
 50V 100V 150V 200V

Añadir patrón Añadir muestra

Comenzar Detener

7,5% Acrilamida

CUBETA DE ELECTROFORESIS

Esta simulación se desarrolló originalmente como miniaplicación Java, realizada por David Mix bajo la supervisión del Dr. Paul Craig (Rochester Institute of Technology; Rochester, NY, U.S.A.)
La conversión a esta versión HTML5 (que no requiere Java) la realizó el Dr. Robert M. Hanson (St Olaf College, Northfield, MN, U.S.A.) usando la herramienta SwingsJS.
Duplicado, traducido y convertido con permiso del Dr. Craig.

Trabajo Práctico de laboratorio

Materiales y reactivos:

I. Soluciones empleadas:

- **Solución A:** acrilamida al 30 % (p/v) y bisacrilamida al 0.8 % (p/v) en agua destilada
- **Solución B:** Tris 1.0 M, pH 8.8.
- **Solución C:** Tris 1.0 M, pH 6.8
- **Persulfato amónico (APS):** 15 mg/ml en agua destilada. Se prepara en el momento y es un agente generador de radicales libres
- **Tetrametiletilendiamina (TEMED):** catalizador de la reacción de polimerización

IMPORTANTE: USAR GUANTES. La acrilamida es NEUROTÓXICA en estado líquido, al contacto con la piel.

II. Armado del equipo

Montaje de los cristales donde se formará el gel. Colocar los cristales en el soporte de polimerización. (Figura 1)

III. Preparación de los geles

Gel de separación:

El gel de separación o resolución es la matriz de poliacrilamida donde las moléculas de ADN o proteínas, van a migrar generando un perfil de bandas o patrón electroforético. Dicho patrón varía de acuerdo al peso molecular de cada una de las moléculas y a la concentración del gel.

Gel de Separación al 10%	Sol. A	Tris pH 8.8	Tris pH 6.8	SDS 10%	H2O	TEMED 5%	APS	VF
	2664 µl	3000 µl	---	80 µl	1896 µl	120 µl	240 µl	8 ml

- En un tubo, mezclar todos los ingredientes SALVO EL TEMED Y EL APS (disparan la reacción de polimerización en minutos. Sólo se añaden cuando se tenga todo listo para preparar los geles). Mezclar
- Se aplica la solución del gel separador entre los dos cristales hasta 2-3 mm por debajo de la pieza verde del soporte (Fig. 1).
- Inmediatamente después se añade agua destilada para conseguir un frente “liso”.
- Se deja polimerizar en un sitio cálido.
- Una vez polimerizado el gel se descarta el agua destilada.

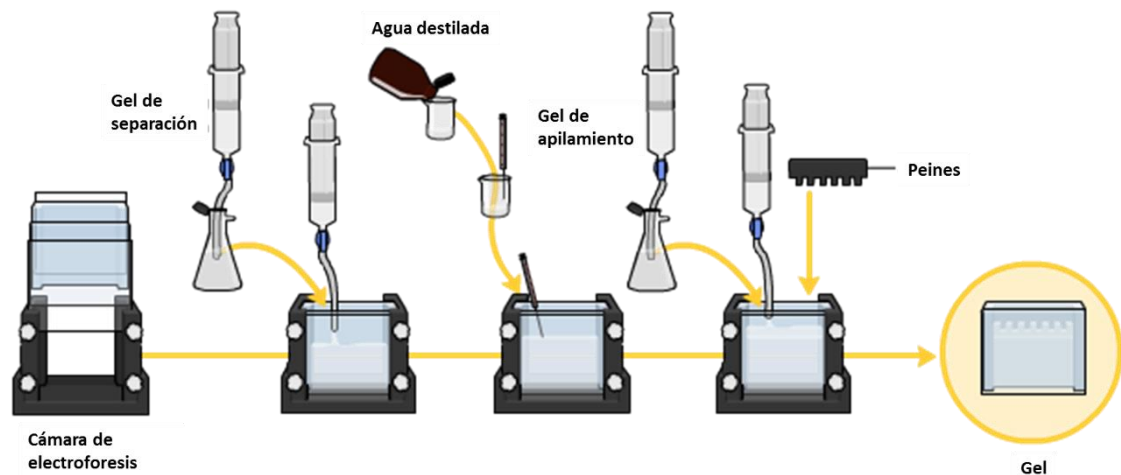


Figura 1. Armado del gel de electroforesis. Extraído y modificado de: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SDS-PAGE_Electrophoresis.png (Licencia CC-BY 3.0, Attribution: Bensaccount at English Wikipedia)

Gel de apilamiento:

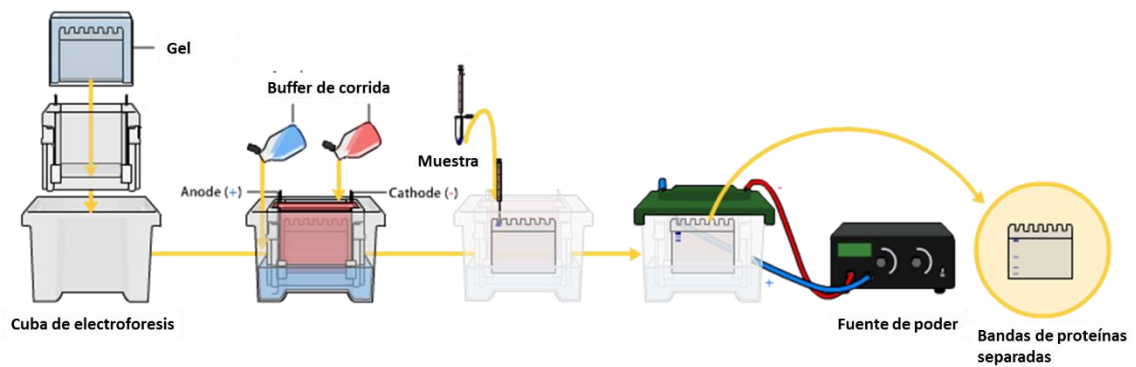
El gel de apilamiento es la matriz de poliacrilamida que tiene como característica retener a las proteínas manteniéndolas uniformes antes que ellas migren hacia el gel de resolución. Este proceso permite mejorar la resolución de las proteínas en la electroforesis.

Gel de Apilamiento al 4%	Sol. A	Tris pH 8.8	Tris pH 6.8	SDS 10%	H2O	TEMED 5%	APS	VF
	530 µl	-----	460 µl	40 µl	2610 µl	240 µl	120 µl	4 ml

- En un tubo, mezclar todos los ingredientes SALVO EL TEMED Y EL APS (disparan la reacción de polimerización en minutos. Sólo se añaden cuando se tenga todo listo para preparar los geles). Mezclar

- Añadir la mezcla poco a poco evitando las burbujas hasta que rebose por el borde superior.
- Se introduce el peine entre los dos cristales para formar los pocillos donde se depositarán, posteriormente, las muestras (Fig. 1).
- Se deja polimerizar.
- Se saca el peine con cuidado de no introducir burbujas de aire dentro de los pocillos y se monta el sistema de electroforesis en la cubeta.

IV. Armado de la cámara de electroforesis



Esquema extraído y modificado de: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SDS-PAGE_Electrophoresis.png.

(Licencia CC-BY 3.0, Attribution: Bensaccount at English Wikipedia)

V. Preparación de las muestras

Las muestras se diluyen 3:1 en un buffer de siembra (buffer siembra 3X) y luego se calientan a 90 °C, 5 min, para producir la desnaturalización de las proteínas. Posteriormente, se aplican en los pocillos preformados en la parte superior del gel de apilamiento (Fig. 1).

Previamente, ha sido necesario medir la cantidad de proteínas que contiene nuestra muestra, de manera que hemos ajustado nuestro extracto para que se carguen 20 µg de proteínas totales. Se preparan 40 µl de volumen de siembra y **se siembran 20 µl**.

Muestra para siembra:

_____ µl de muestra + _____ µl de tampón 3X. Volumen final= 40 µl.

VI. Corrida electroforética

Se programa la fuente de alimentación a 25 mA por gel. Se deja correr aproximadamente 45 minutos o cuando el frente de azul de bromofenol alcance el borde inferior del gel.

VII. Resultados

- 1- Teñir el gel con una solución de azul de Coomassie, en cantidad suficiente para cubrir el gel.
- 2- Agitar suavemente durante 20 min.
- 3- Lavar durante 10 min con H₂O Milli-Q. Repetir si es necesario.

Las muestras que se encuentren más cerca de los pocillos serán las de mayor peso molecular

Bibliografía:

- Yábar Varas, Carlos. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Lima. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2003. 59 p. (Serie de Normas Técnicas; 38)
- Biología Celular y Molecular, 7^a ed. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scout MP, Zipursky L, Darnell J. 2016. Editorial Médica Panamericana. Madrid.
- Introducción a la Biología Celular. 2011.3^o Edición. Alberts B, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Imágenes extraídas y modificadas de:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SDS-PAGE_Acrylamide_gel.png

ACTIVIDAD N° 6: TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO

Extracción de ADN. Electroforesis de ADN aislado en gel de agarosa

Objetivos

- Practicar el manejo de diferentes técnicas de uso común en laboratorios de biología celular y molecular.
- Comparar cualitativa y cuantitativamente distintas técnicas de extracción de ADN
- Realizar entrenamiento en el armado de geles de agarosa.
- Realizar la separación de fragmentos de ADN.

Temario: La molécula de ADN: estructura y conformaciones. Cromatina: componentes proteicos. Las histonas: distintos tipos y propiedades. Nucleosomas.

Fundamento:

La extracción de ADN de una muestra celular se basa en el hecho de que los iones salinos son atraídos hacia las cargas negativas del ADN, permitiendo su disolución y posterior extracción de la célula. El primer paso es lisar (romper) las células mediante un detergente, vaciándose su contenido molecular en una disolución amortiguadora o tampón en la que se disuelve el ADN. En ese momento, el tampón contiene ADN y diferentes restos moleculares: ARN, carbohidratos, proteínas y otras sustancias en menor proporción. Las proteínas asociadas al ADN, se desnaturalizan por acción del detergente y por lo tanto se separan de él. Sólo queda, por tanto, extraer el ADN de esa mezcla de tampón y detergente, para lo cual se utiliza etanol absoluto o isopropanol.

ACTIVIDADES:

Protocolo Extracción de ADN (Fig. 1)

- 1- Agregar 50 ul de buffer a 65°C y homogeneizar. Enjuagar con 50ul de buffer.
- 2- Centrifugar a 10000 g por 15 seg para bajar y precipitar.
- 3- Poner tubos a 65°C por 20 min.

- 4- En tubos tibios agregar 13 ul 8M acetato de K (ó 1 8ul 5M). Mezclar golpeando suavemente el fondo del tubo..
- 5- Incubar en hielo 30 min.
- 6- Centrifugar a 12000 g a temperatura ambiente (TA) por 15 min.
- 7- Pasar el sobrenadante y agregar 200 ul de etanol 100%. Mezclar por inversión. Incubar 5 min TA.
- 8- Centrifugar a 12000 g a 4°C por 15-20 min. Pipetear el etanol.
- 9- Agregar 200 ul de etanol 80% para lavar el pellet.
- 10- Repetir el paso 9 con etanol 100% (no se forma pellet).
- 11- Secar al aire.
- 12- Disolver el ADN en 50-100ul de agua ultrapura MilliQ.

Buffer Grind

- 0.08 M NaCl
- 0.16 M Sacarosa
- 0.06 M EDTA
- 0.1 M Tris-HCl pH 9
- 0.5 % SDS
- Agua estéril

Posteriormente se realizará una electroforesis en un gel de agarosa al 2,5%. La electroforesis se llevará a cabo utilizando buffer TBE 0,5X (Tris-Borato-EDTA), a voltaje constante (50 mV/cm) durante 90 minutos. El gel se teñirá con GelRed para luego observarse en un transiluminador (luz UV).

- Si luego de la corrida electroforética y tinción, no observa nada ¿cuáles son los posibles motivos? ¿Cómo identificaría una desnaturalización de ADN?

Bibliografía:

- Yábar Varas, Carlos. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Lima. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2003. 59 p. (Serie de Normas Técnicas; 38)
- Biología Celular y Molecular, /ª ed. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scout MP, Zipursky L, Darnell J. 2016. Editorial Médica Panamericana. Madrid.
- Introducción a la Biología Celular. 2011.3º Edición. Alberts B, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.

ACTIVIDAD N° 7: CHARLA DEBATE

¿Son previsibles los avances científicos?

Objetivos:

- Analizar películas de ciencia ficción para debatir acerca de los límites éticos y técnicos de la ciencia.
- Analizar los avances biotecnológicos planteados en las películas y plantear su factibilidad de realización en el mundo real.
- Concientizar acerca de la manipulación génica y sus implicancias sociales y evolutivas.

Introducción

En esencia, el avance científico tiene por finalidad mejorar la calidad de vida de todos los integrantes de la sociedad. Los avances técnicos en el área de la biomedicina han permitido grandes logros en cuanto a generar mejores condiciones de vida. Sin embargo, ¿ha llegado este avance científico a todos los habitantes?

Mucha investigación científica desarrollada al límite de la ética ha permitido grandes avances científicos, esto ha generado un conflicto en la ciencia sobre beneficios y riesgos como complementarios de cada avance técnico. Sin embargo, el avance de la técnica y sus aplicaciones ¿pueden ir más allá de los principios morales y éticos de la sociedad?

Con la observación de estos films se discutirá los límites técnicos, éticos y morales de la ciencia para el mejoramiento de la calidad de vida de la sociedad.

Películas

- 1- Parque Jurásico (Jurassic Park) (País de origen. USA, Año 1993). Duración: 126 min. Dirigida por Steven Spielberg.

Esta película de ciencia ficción se trata de la creación de un parque temático en una Isla, en donde, por medio de un equipo de científicos genetistas (y una inversión millonaria) se crean dinosaurios clonados que habitan la misma como animales silvestres.

- 2- GATTACA (País de origen. USA, Año 1997). Duración 112 min. Dirigida por Andrew Niccol.

El eje temático central de esta película de ciencia ficción se trata de la modificación

genética de embriones y las implicancias sociales de hacer bebés a medida, con determinadas características.

3- Mundo Jurásico (Jurassic World) (País de origen. USA, Año 2015). Duración 124 min. Dirigida por Colin Trevorrow.

Esta película de ciencia ficción, es una secuela de Parque Jurásico, en donde, 10 años después de la inauguración, se ha seguido investigando sobre los dinosaurios. Para lo cual, se continuó clonando y modificando genéticamente a los dinosaurios (invirtiendo millones de dólares en esa experimentación).

4- Selección antinatural. Capítulo 1. Cortar, pegar, vida.

Serie de Netflix sobre los avances científicos y la posibilidad cada vez más cercana de la edición génica y la posibilidad de generar kits comerciales que permitan a cualquier persona experimentar con la modificación genética.

Actividad:

Ver las películas y el primer capítulo de la serie antes de la charla debate.

Buscar información acerca de edición génica en diarios actuales e indagar sobre la técnica CRISPR.

Discutan con sus compañeros áreas de controversia en la biología. ¿Es necesaria la ciencia? ¿Se puede detener el avance científico?

Discutan con sus compañeros los futuros escenarios en la biología que puedan tener impacto en la sociedad y alternativas.

Elaborar las preguntas, tanto técnicas como éticas, que subyacen en los ejes temáticos de estos medios y debatan sobre las mismas.

Bibliografía

●Sierra-Cuartas, Carlos Eduardo de Jesús. 2007. Fortalezas epistemológicas y axiológicas de la ciencia-ficción: un Potosí pedagógico mal aprovechado en la enseñanza y divulgación de las ciencias. Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias. Vol. 4 núm. 1, pp. 87-105.

●Petit, M.F. y Solbes, J. 2016. El cine de ciencia ficción en las clases de ciencias de

enseñanza secundaria (II). Análisis de películas. Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias, 13 (1), 176-191.

● Barnett, M., Wagner, H., Gatling, A., Anderson J., Houle M., Kafka A. 2006. The Impact of Science Fiction Film on Student Understanding of Science. Journal of Science Education and Technology. Volume 15, Issue 2, pp 179–191.

ACTIVIDAD N°8: SEMINARIO DE DISCUSIÓN

Ecología molecular aplicada a la conservación de especies

Objetivos

- Discutir sobre el uso de herramientas de Biología Molecular en ecología de poblaciones.
- Analizar los alcances de la Biología Molecular en la conservación de las especies.

Introducción

La Ecología Molecular utiliza herramientas moleculares para resolver problemas ecológicos, evolutivos y de biodiversidad. Tiene como objetivo principal investigar aspectos de biología evolutiva, sistemática molecular y genética de la conservación en especies nativas y exóticas. Específicamente puede proveer información valiosa sobre: diversidad y variabilidad genética, movimiento de los individuos (migraciones), endogamia, restos de individuos), identificación de nuevas especies, patrones históricos de dispersión, filogeografía y biogeografía, patrones epidemiológicos y control de especies exóticas invasoras.

Los orígenes de la genética de la conservación se dan poco después de haber surgido la biología de la conservación, cuando se hicieron evidentes varios problemas genéticos asociados con las especies en peligro de extinción. Por ejemplo, se resaltó que la disminución de los tamaños poblacionales iba acompañada de la pérdida de diversidad genética y que la fragmentación de los hábitats tenía un efecto en la estructura poblacional. Desde el punto de vista evolutivo, se hizo entonces necesario entender los procesos de extinción de las especies (Simberloff, 1988, Eguiarte y Piñero, 1990). Sobre las bases de la teoría de biogeografía de islas, en los años 70, se desarrolló la teoría para el diseño de refugios y para la toma de decisiones al planear los tamaños y formas óptimas de las reservas, así como la conectividad entre ellas. En la década de los 80 comenzaron a usarse sistemáticamente los análisis genéticos en especies en cautiverio, se realizaron los primeros experimentos en laboratorio y se avanzó en los estudios de metapoblaciones, enfocados en la cuantificación de la variación genética y los tamaños poblacionales efectivos. El avance en el uso de marcadores moleculares permitió a su vez una espectacular recopilación de datos genéticos de las poblaciones naturales de especies

amenazadas o en peligro y mostró la relevancia de los factores genéticos, particularmente en casos como la depresión por endogamia (Meffe y Carroll, 1994; Eguiarte y Piñero, 1990). En la década de los 90 los principales avances estuvieron relacionados con los nuevos métodos moleculares y computacionales que permitieron nuevos análisis y predicciones, dando mayor importancia al reconocimiento de las unidades fundamentales de conservación (especies, subespecies y ESU o Unidades Evolutivamente Significativas -ver más adelante). El rápido avance de la genética de la conservación se puso de manifiesto con la publicación en el año 2000 de la revista *Conservation Genetics* y la aparición de libros como *Introduction to conservation genetics* (Frankham et al., 2002), así como la sección Population and conservation genetics en la revista *Molecular Ecology*.

Los marcadores moleculares ampliamente utilizados en las investigaciones para medir la diversidad a nivel del ADN son: la diversidad de *microsatélites* (repeticiones de secuencias simples: SSR, o repeticiones cortas en tándem: STR); así como las *aloenzimas*, las *RAPD* (ADN polimórfico amplificado aleatoriamente), las *AFLP* (polimorfismo de la longitud del fragmento amplificado) y las huellas dactilares o *fingerprints* del ADN (minisatélites o repeticiones en tándem de número variable: VNTR) revelan niveles de diversidad genética por locus y proporcionan comparaciones más poderosas de amenazas y especies no amenazadas, mejor discriminación en la paternidad; *variación del ADN mitocondrial* (ADNmt), que se utiliza ampliamente para evaluar las relaciones taxonómicas y las diferencias entre las poblaciones dentro de las especies; la detección de *alelos deletéreos* que causan enfermedades genéticas en humanos y otras especies; los *caracteres cuantitativos* de los individuos varían en reproducción y supervivencia (por ejemplo, edad de la primera reproducción, tamaño de la camada, conjunto de semillas, producción reproductiva de por vida, longevidad) que pueden ser caracteres medidos. La variación de los caracteres cuantitativos se debe a causas genéticas y ambientales. Un componente genético se demuestra por la respuesta a la selección artificial, o por semejanzas entre parientes que no se deben a un ambiente común; los *cromosomas*; el número, tamaño y forma de los cromosomas entre individuos dentro de las especies son generalmente los mismos, pero los cromosomas a menudo difieren entre especies; el *ADN nuclear* como por ejemplo en el estudio del locus de la alcohol deshidrogenasa (*Adh*) mediante el análisis de intrones y exones en moscas de la fruta para determinados polimorfismos; entre otros. Dichos marcadores moleculares nos permiten, entre otras cuestiones, cuantificar la diversidad genética, rastrear el movimiento de los individuos, medir endogamia, identificar restos de individuos, caracterizar nuevas especies y trazar patrones históricos de dispersión. Todas estas aplicaciones son de gran

interés académico y se usan frecuentemente para investigar cuestiones ecológicas prácticas, tales como cuáles son las poblaciones que están en mayor riesgo de extinción dado su nivel de endocria, o también cuánta hibridación ocurrió entre cultivos genéticamente modificados y sus parientes salvajes. Cada vez es más sencillo y menos costoso adquirir datos de marcadores moleculares, y como consecuencia de esto, muchos laboratorios en todo el mundo pueden lograr objetivos antes impensables tales como la identificación del origen geográfico de especies invasoras a partir de unas pocas muestras, o monitorear poblaciones de especies esquivas a partir de un único pelo.

Por todo lo expuesto, es fundamental que los futuros biólogos orientados hacia la genética evolutiva y la ecología, o aquellos profesionales que ya utilicen esta disciplina como parte de sus investigaciones, tengan la oportunidad de adquirir los conocimientos básicos y las herramientas fundamentales en relación a esta temática.

ACTIVIDADES DEL SEMINARIO

A. Leer entre los diferentes grupos los siguientes trabajos científicos anexados al final de la guía:

- a) Análisis de ADN mitocondrial en una muestra de restos óseos precolombinos de norte de Santander, Colombia (Área Cultural Chitarera).
- b) Presencia de haplotipos no africanos incrementa la diversidad genética en pacientes con anemia falciforme en Colombia.
- c) Variabilidad genética de *Aedes aegypti* en el departamento de Sucre, Colombia, mediante el análisis de la secuencia de nucleótidos del gen mitocondrial ND4.
- d) Primer reporte de la variabilidad genética del gato (*Felis catus*), con marcadores fenotípicos en Coveñas, Sucre.
- e) Variabilidad genética en poblaciones de *Elionurus muticus* (Poaceae) de Corrientes, Argentina, a partir de marcadores moleculares de ADN nuclear y cloroplástico.

Responda:

1. Determinar el campo de la Ecología Molecular que se estudió en cada caso.
2. Seleccionar los términos ampliamente utilizados en la Ecología Molecular.
3. Identificar los marcadores moleculares más utilizados. Reconocer marcadores moleculares no conocidos y su utilidad.

4. Discuta en detalle la importancia sobre la aplicación de la Ecología Molecular y los marcadores moleculares en las problemáticas actuales de epidemias y pérdida de la biodiversidad.

5. ¿En qué otros campos de su interés considera que podrían ser útiles los marcadores moleculares? Discuta con sus compañeros.

B. Recorrido por un laboratorio de Ecología Molecular: <http://www.ebd.csic.es/visita-virtual>

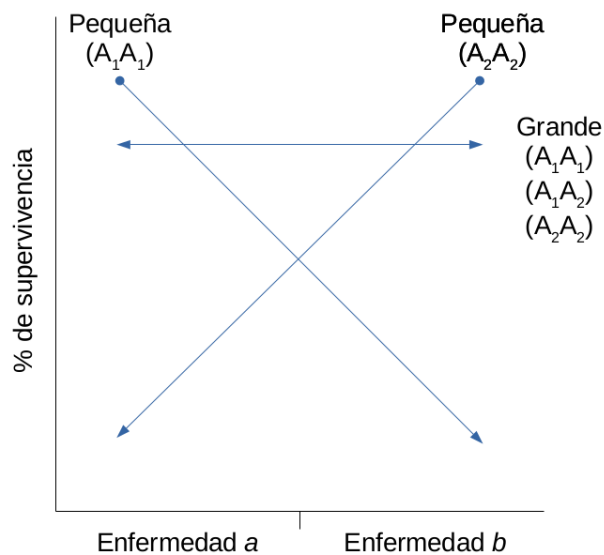
Luego del recorrido,

1. Mencione que instrumentos y técnicas aprendidas en la materia son empleadas en los laboratorios de investigación internacional.

2. ¿Qué tipos de investigación realizan en el laboratorio internacional? ¿Qué marcadores considera que son utilizados en estas investigaciones?

3. Indique que le llamo la atención luego de la visita virtual y que aspectos considera novedosos para aplicar en la ecología.

C. Observe la siguiente figura:



1. Explique desde la genética de conservación ¿qué sucede con la resistencia de las poblaciones pequeñas cuando ocurre una enfermedad? ¿cómo se conoce el proceso evolutivo que explica este tipo de fenómenos?

2. Explique la utilidad del estudio de la diversidad genética para los casos de epidemia.

Bibliografía

- Atencia, M. C., Pérez, M. D. J., Caldera, S. M., Jaramillo, M. C., Bejarano, E. E. 2018. Variabilidad genética de *Aedes aegypti* en el departamento de Sucre, Colombia, mediante el análisis de la secuencia de nucleótidos del gen mitocondrial ND4. *Biomédica*, 38(2), 267-276.
- Casas-Vargas, A., Romero, L. M., Rodríguez, J. V., Usaquén, W. 2018. Análisis de ADN mitocondrial en una muestra de restos óseos precolombinos de Norte de Santander, Colombia (Área Cultural Chitarera). *Acta Biológica Colombiana*, 23(3), 263-273.
- Ecología Molecular. Cap 8: Ecología Molecular de la Conservación. 2007. Rocha M. Gasca Jaime. Editor: Moreno-Letelier A. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Eguiarte, L. E., y Piñero, D. 1990. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. *Ciencias, Número especial*, 4, 34-47.
- Fong, C., Barreto, G. 2018. Presencia de haplotipos no africanos incrementa la diversidad genética en pacientes con anemia falciforme en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 23(3), 253-262.
- Frankham, R., Briscoe, D. A., y Ballou, J. D. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press.
- *Introduction to Conservation Genetics*. 2010. 2da edición. Richard Frankham, Jonathan D. Ballou, David A. Briscoe. Cambridge University Press.
- *Introducción a la Biología Celular*. 2011. 3o Edición. Alberts B, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Meffe, G. K., & Carroll, C. R. 1994. *Principles of conservation biology*. Sinauer Associates.
- Moreno, E. M. S., Almirón, N. E., Peichoto, M. C., Neffa, V. G. S. 2018. Variabilidad genética en poblaciones de *Elionurus muticus* (Poaceae) de Corrientes, Argentina, a partir de marcadores moleculares de ADN nuclear y cloroplástico. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 53(2), 255-266.

- Pardo Pérez, E., Martínez Bula, M. T., Zambrano Charrasqui, J. D. 2018. Primer reporte de la variabilidad genética del gato (*Felis catus*), con marcadores fenotípicos en Coveñas, Sucre. Revista de Medicina Veterinaria, (36), 27-36.
- Simberloff, D. 1988. The contribution of population and community biology to conservation science. Annual Review of Ecology and Systematics, 19(1), 473-511.

ACTIVIDAD N° 9: CHARLA DEBATE

Los científicos: ¿Cómo son y cómo deberían ser?

Autores: Juan G. Chediack, Nadia Bach y Rocío Santos.

Licencia CC-BY

Objetivos

- Analizar material audiovisual y de lectura sobre hallazgos científicos para debatir acerca de cómo se hace ciencia y cómo se comportan los científicos.
- Concientizar acerca de la ética en la actividad científica y sus implicancias sociales.
- Humanizar la ciencia a través de la historia de vida de un científico argentino galardonado con el Premio Nobel de Medicina (1984).

Introducción

El propósito de la ciencia es estudiar el mundo que nos rodea y desentrañar los misterios de la naturaleza; y el progreso debido al avance científico, tiende a mejorar la calidad de vida de la sociedad. Por esto, debemos tomar conciencia de los riesgos que conllevan las malas prácticas en la ciencia y de la responsabilidad de los científicos con la sociedad. Sin embargo, es importante entender que son muchos los factores que pueden estar detrás de estos sucesos de mala praxis, ya que el sistema científico actual, en línea con el sistema político-económico reinante, lleva consigo una fuerte competitividad y una cierta presión a avanzar con rapidez, en donde el sistema de evaluación premia la cantidad sobre la calidad, esto hace que el sistema de evaluación sea poco saludable. Además, vemos a diario que esta presión sobre los investigadores ha generado prácticas poco éticas, un ejemplo claro son los fraudes científicos, que aparecen cada tanto en las noticias de los diarios, producto de una estructura que obliga a los científicos a un cierto nivel de producción que va en detrimento de lo que realmente debería ser la generación del conocimiento, un proceso de reflexión para ampliar el conocimiento humano, a partir de preguntas relevantes y realmente integrativas de un proceso.

Los fraudes han ocurrido desde la aparición de la ciencia moderna, cuando empezó a basarse en datos experimentales más que en teorías filosóficas, el crecimiento extraordinario de la ciencia en todo el mundo se ha acompañado de un incremento de las diversas modalidades de fraude científico. En muchos casos, hay una alteración de los datos u observaciones mediante un manejo inescrupuloso de los análisis estadísticos, modificaciones de las fotografías (por

ejemplo de micrografías histológicas o de inmunohistoquímica, de geles de proteínas o ácidos nucleicos o de cualquier otro material gráfico), para que parezcan más claros o más convincentes. El fraude propiamente dicho va desde el invento de resultados donde ni siquiera se hicieron los experimentos, hasta la modificación de los resultados obtenidos para que concuerden con la hipótesis generada por el autor. Otro tipo de fraude es el de plagio de enfoques experimentales, de resultados o de interpretaciones, presentándose como propios y originales a pesar de haber sido copiados de una investigación ya publicada. No es de extrañar que en muchas áreas del conocimiento haya fraude y la ciencia no es la excepción, podemos encontrar múltiples ejemplos en los que podemos ahondar. A continuación, se nombrarán algunos:

-Andrew Wakefield quien publicó en la revista The Lancet un artículo relacionando la vacuna triple viral (SRP) con el origen del autismo, dicho artículo fue retirado doce años después de la fecha de publicación (1998-2010). Hoy en día se lo considera el principal responsable del movimiento antivacunas.

-Paul Kammerer, zoólogo vienés de principios de siglo, afirmó haber conseguido que un sapo de vida terrestre ("Alytes obstetricans") desarrollara rugosidades en la mano y antebrazo, similares a los de anfibios acuáticos, después de hacer copular a estos anfibios terrestres en el agua por 6 generaciones. De este modo, pretendía demostrar la teoría de la herencia de los caracteres adquiridos. Sin embargo, posteriormente se descubrió que las protuberancias de estos anfibios terrestres no eran más que tinta china inyectada por el científico.

Existen muchos casos más, que se pueden encontrar en la literatura. Dentro del material para leer y ver tienen otros ejemplos. La idea central es que a partir de la observación de estos films y el estudio de los casos del "Hombre de Piltdown" y "La Generación de Células Madre por Estrés Ácido", se genere una discusión sobre la necesidad de la ética y la integridad en la investigación como base para el desarrollo científico. Siendo el eje temático la responsabilidad de los científicos cuando hacen ciencia.

Material para ver, leer y analizar:

- 1- [Je-bo-ja \(Whistle Blower\)](#) (País de origen: Corea del Sur, Año 2014) Duración: 113 minutos. Dirigida por Soonrye Yim.

Es una película basada en un caso real de un científico sur coreano (Dr. Hwang Woo-Suk), que

hizo fraude científico en el área de las células madre a principios de los 2000s. Es un claro ejemplo de cómo el fraude en las investigaciones científicas sigue vigente en el siglo XXI.

- 2- [Un Fueguito](#), la historia de César Milstein (País de origen: Argentina, 2010). Duración 70 min. Dirigida por Ana Fraile.

Este documental narra la vida de César Milstein, el último Premio Nobel en Medicina Argentino. En el film se pueden observar distintas aristas de un científico, desde la manera en que siente y piensa, hasta cómo puede la política científica condicionar el crecimiento de un país.

- 3- Material audiovisual acerca del caso del “Hombre de Piltdown”

[El mayor fraude del mundo de la ciencia: El hombre de Piltdown - Bully Magnets - Historia Documental](#)

Este corto describe uno de los casos de fraude científico más conocidos del siglo XX. ¿Qué otros fraudes relacionados a las ciencias biológicas conocen? Compare similitudes y diferencias con el caso de “El hombre de Piltdown”. ¿Considera que hoy en día es tan sencillo ocultar la evidencia científica como lo era en el siglo pasado?

- 4- Artículo editorial acerca del caso de “Generación de Células Madre por Estrés Ácido” (lo pueden descargar de la bibliografía del TP más abajo).

Para este caso puede recurrir no sólo al artículo, también pueden buscar entrevistas a la investigadora Haruko Obokata. Luego de haberse informado, ¿considera que puede existir una presión extra sobre los investigadores asiáticos debido a la alta competencia entre pares para alcanzar la excelencia? Compare con el fraude realizado por el científico surcoreano Hwang Woo-Suk.

Algunas preguntas para reflexionar

1. ¿Qué causas podrían empujar a un científico a cometer fraude?
2. ¿Qué consecuencias laborales, sociales y penales podría enfrentar un científico que falsea datos en sus investigaciones?
3. ¿Cómo cree que debería actuar el sistema legal y comunidad científica frente a quién comete fraude científico?
4. ¿Qué consecuencias tiene para la percepción de la ciencia por parte de la sociedad, para la propia comunidad científica y para el sistema de publicación?
5. ¿Qué implicancias tiene para la ciencia en general los casos de fraude comprobados?

Reflexión final

“El científico o tecnólogo es un ser social, un integrante de la sociedad en su conjunto, por tanto su actividad siempre estará influenciada por su postura ante la sociedad en la que vive y también en base a sus principios éticos. Al igual que cualquier integrante de la sociedad que realice cualquier actividad. Los principios éticos y morales son inherentes al ser humano y no a la actividad que él realice, para mantener su dignidad”

Bibliografía

- Sierra-Cuartas, Carlos Eduardo de Jesús. 2007. Fortalezas epistemológicas y axiológicas de la ciencia-ficción: un Potosí pedagógico mal aprovechado en la enseñanza y divulgación de las ciencias. Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias. Vol. 4 núm. 1, pp. 87-105.
- Petit, M.F. y Solbes, J. 2016. El cine de ciencia ficción en las clases de ciencias de enseñanza secundaria (II). Análisis de películas. Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias, 13 (1), 176-191.
- Barnett, M., Wagner, H., Gatling, A., Anderson J., Houle M., Kafka A. 2006. The Impact of Science Fiction Film on Student Understanding of Science. Journal of Science Education and Technology. Volume 15, Issue 2, pp 179–191.
- N. López Moratalla. Deontología biológica, capítulo 13: Ética de la investigación científica.
- Rafael Camacho Carranza y José Víctor Calderon Salinas. Generación de células madre por estrés ácido ¿un gran descubrimiento o un gran engaño? Y un problema ético. Rev. educ. bioquím vol.33 no.1 Ciudad de México mar. 2014.
- Ricardo Tapia. La ética y los fraudes en investigación científica. Rev. educ. bioquím vol.32 no.1 Ciudad de México mar. 2013.