ISSN 2545-7683

Material
Didáctico
para Estudiantes

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS:

Biología Celular
Y
Biología Celular y Molecular

FQByF
Facultad de Química , Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional
de San Luis

2019

ISSN 2545-7683

SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES

Guías de Trabajos Prácticos: BIOLOGÍA CELULAR/ BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Licenciatura en Biología Molecular
Licenciatura en Biotecnología
Licenciatura en Ciencias Biológicas

Dr. Juan Gabriel CHEDIACK
Mg. Guido FERNÁNDEZ MARINONE
Lic. Belén JERÉZ
Dr. Juan Manuel PÉREZ IGLESIAS

FACULTAD DE
QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2019

Decana

Dra. Mercedes Edith CAMPDERRÓS

Vice Decana

Dra. Lucía Beatriz FUENTES

Secretaria académica

Dra. Estela Isabel GASULL

Comisión de la Serie Didáctica

Coordinadora

Dra. María Cristina ALMANDOZ

Integrantes

Departamento de Bioquímica
y Ciencias Biológicas

Dra. Susana I. SÁNCHEZ

Dra. Verónica P. FILIPPA

Departamento de Farmacia

Dr. Luis A. DEL VITTO

Dra. Alejandra O. MARIA

Departamento de Química

Dra. Yamina A. DÁVILA

Dra. María de los Ángeles ÁLVAREZ

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 estudios 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 acorde 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/mda.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 10/12), 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 de 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. El objetivo de esta propuesta es ampliar su formación en la disciplina, mediante la resolución de problemas, discusión de trabajos científicos, entre otros, aportando una nueva herramienta de aprendizaje autónomo.

En esta guía se encuentran todas las actividades prácticas que se realizan durante el dictado de la asignatura. Estas actividades están orientadas a reforzar los conceptos teóricos de Biología Celular, para lo cual 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 alumnos adquieran habilidades en el manejo de instrumental de laboratorio; c) charlas debate, a partir del estudio de películas de ciencia ficción, drama y documentales sobre temas inherentes al quehacer científico (por ej: bioética), esta estrategia es innovadora en esta asignatura, aunque es utilizada para el aprendizaje en otras ramas de la ciencia, por ejemplo, la Física. Nuestro propósito con esta actividad es que los estudiantes generen preguntas, bajo la guía de los docentes. Por último, d) la búsqueda de información científica, en diferentes buscadores científicos, tanto en español como en inglés, y posteriormente el análisis de un trabajo científico, en este caso resaltaremos la importancia de buscar en sitios confiables.

Autores de la Guía:
Dr. Juan Gabriel Chediack
Mg. Guido Fernández Marinone
Lic. Belén Jeréz
Dr. Juan Manuel Pérez Iglesias

INDICE

Medidas de seguridad en el laboratorio…….III

Actividad Nº 1……10

Trabajo Práctico de Laboratorio. Cuantificación de proteínas en muestras biológicas.

Actividad Nº 2……17

Trabajo Práctico de Laboratorio. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. "SDS-PAGE"

Actividad Nº 3……25

Trabajo Práctico de Laboratorio. Fraccionamiento celular

Actividad Nº 4……30

Trabajo Práctico de Laboratorio. Extracción de ADN

Actividad Nº 5……33

Charla Debate ¿Son previsibles los avances científicos?

Actividad Nº 6……35

Trabajo Práctico de Laboratorio. Técnicas de ADN recombinante

Actividad Nº 7 ……43

Seminario de discusión. Ecología molecular aplicada a la conservación de especies

Actividad Nº8..……..……..…49

Trabajo Práctico de Laboratorio. Aislamiento y cultivo de células

Actividad Nº 9……..56

Trabajo Práctico de Aula. Laboratorio virtual de Investigación Biomédica

Actividad Nº 10……58

Trabajo Práctico de Aula. Análisis de un trabajo científico

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.

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 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 sin estar presente el Jefe de Trabajos Prácticos.
- Seguir todas las indicaciones del Jefe de Trabajos Prácticos.
- 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.
- Nunca probar, ni oler en forma directa ningún producto 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 esta 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. En el caso de accidentalmente, tocar 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 involucre 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 autorizadas 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 el uso de lavandina 5%, alcohol al 70%.
- Cubrir adecuadamente con elementos protectores heridas o abrasiones preexistentes en la piel.
- El derrame o caída de muestras contaminadas, diluciones, etc. debe 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 A UTILIZAR	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, láminas 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 de forma inmediata a los servicios sanitarios. El aviso ha de ser claro y conciso, indicando el lugar exacto donde ha ocurrido la emergencia, las condiciones de especial riesgo que pudieran concurrir en el laboratorio atendiendo a la existencia de agentes químicos, cancerígenos y biológicos y las primeras impresiones sobre la persona o personas afectadas y las precauciones a tener en cuenta.
- No mover al accidentado salvo que sea necesario para protegerle de los riesgos aún presentes en el laboratorio.
- No dar de beber ni medicar al accidentado.

En caso de fuego 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 cristal 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.

ACTIVIDAD N°1: TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO

Cuantificación de proteínas en muestras biológicas

Objetivos:

- Propiciar los conocimientos, para que el alumno comprenda los fundamentos de algunas técnicas de uso común en laboratorios de Biología Celular.
- Conocer y saber cuándo aplicar los principales métodos químicos de cuantificación de proteínas.
- Construir una curva de calibración de concentración de proteínas mediante el uso de un kit comercial que se basa en el método de Biuret.
- Determinar la concentración de proteínas en distintas muestras biológicas.

Temario: Proteínas. Composición química. Funciones. Importancia biológica. Cuantificación de proteínas en muestras biológicas. Métodos de determinación de proteínas.

Conceptos básicos

Las proteínas son biomoléculas que forman parte importante de los seres vivos. Estas constituyen unidades estructurales que forman a la célula llegando a representar la mayor parte de su biomasa. Además de darle forma y estructura, cumplen la mayor parte de las funciones celulares por ejemplo enzimáticas, transportadoras, estructurales, motoras, de señalización, receptoras y reguladoras génicas.

Son macromoléculas lineales constituidas por la unión de aminoácidos, esta secuencia de aminoácidos representa la estructura primaria. Estas estructuras lineales se pliegan adquiriendo una estructura tridimensional (estructuras secundaria y terciaria) particular que determinará su función.

La enorme complejidad del conjunto total de proteínas de los organismos vivos obliga al empleo de diversas técnicas para **separar** dichas proteínas. Durante la separación es importante poder **cuantificar** el rendimiento del proceso de purificación de proteínas de interés, utilizándose diferentes técnicas espectroscópicas (fluorescencia, espectrofotometría).

Métodos más comunes de valoración 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. Muchos de estos métodos se basan en:

a) la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz en el UV.

b) la formación de derivados químicos.

c) la capacidad que tienen las proteínas de unirse a ciertos colorantes.

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. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas (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.
- Absorción en el ultravioleta: las proteínas poseen una banda de absorción a 280 nm como consecuencia de la absorción de los residuos aromáticos en esta región del espectro. Es un método no destructivo. El rango de concentración que se puede determinar depende del contenido de los aminoácidos aromáticas, y oscila entre 0,05 y 2 mg/ml.
- Métodos inmunológicos: métodos altamente específicos, basados en la reacción antígeno- anticuerpo.. Pueden alcanzar sensibilidades del orden de ng/ml.

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*. Además, se medirá la concentración proteica de muestras de leche entera y descremada de distintas marcas. La determinación de la concentración de proteínas será llevada a cabo por el método de Biuret.

Método de Biuret (Gornall, A.G *et al*., 1949, J. Biol. Chem., 177-766):

Si una solución fuertemente alcalina de sulfato cúprico ($CuSO_4$) se añade a una solución de proteína se forma un complejo entre el ion cúprico y los enlaces peptídicos, con aparición de una coloración violeta-púrpura, que presenta un máximo de absorción a **540 nm**. El nombre de la reacción procede del compuesto coloreado formado por la condensación de dos moléculas de urea con eliminación de amoníaco.

El método permite cuantificar soluciones que contengan entre 01 y 6mg de proteínas por mililitro y no depende de la composición de aminoácidos.

Las características más importantes de la reacción son:

- La reacción del Biuret (Fig. 1) se aplica, a partir de los tetrapéptidos, a todos los péptidos y proteínas.
- No depende de la composición de aminoácidos.
- Algunos compuestos (NH_4, Tris, etc.) también reaccionan con el reactivo 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 componenetes. 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.

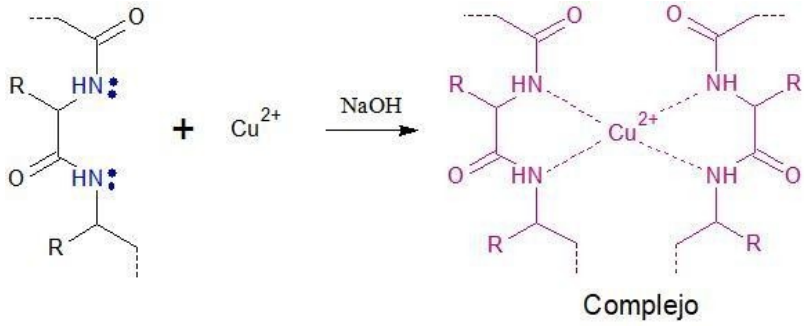


Fig 1: Reacción de Biuret. Imagen extraída de http://blog.pucp.edu.pe.

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. 2).

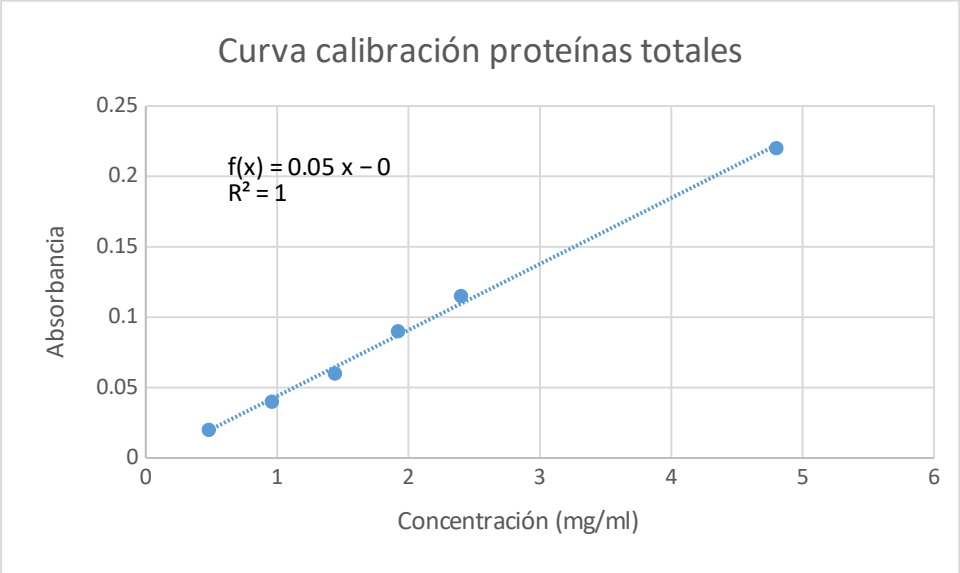


Fig 2: *Curva patrón de proteína.*

PROCEDIMIENTO

I. 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 14 tubos de ensayos limpios y secos. Los tubos se enumeran del 1 al 14 con un marcador (cada tubo tendrá una concentración y un duplicado).

3. Con pipetas adecuadas al volumen a medir, colocar en cada tubo los volúmenes de solución patrón de albumina de suero bovino (4,8 mg/ml) y de agua destilada que se indican en la siguiente tabla:

Tubo (N°)		Patrón de proteínas (µl)	Agua (µl)
1	1´	0	200
2	2´	20	180
3	3´	40	160
4	4´	60	140
5	5´	80	120
6	6´	100	100
7	7´	200	0

4. Añadir a cada tubo de ensayo 1,75 ml del reactivo de Biuret, tapar e invertir dos veces para mezclar o vortexear.

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 a 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 y su duplicado). Luego se miden las absorbancias de los tubos 3 a 14 y se anotan las medidas de absorbancia en el cuaderno de laboratorio.

8. 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 20 µl de proteínas totales BSA 4,8 mg/ml y se han diluido a un volumen de 200 µl con agua destilada. Por lo tanto, la concentración de proteína (BSA) en el tubo será:

(20 µl x 4,8 mg/ml) / 200 µl = 0,48 mg/mL

9. 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.

II. Determinación de concentración de proteínas en muestras biológicas

La concentración de proteínas totales se medirá utilizando el método de Biuret.

1. Encender el espectrofotómetro y ajustar la longitud de onda del espectrofotómetro a 540 nm.
2. Colocar en una gradilla tubos de ensayos 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 25 µl de muestras problemas (homogenato de intestino, homogenato de hígado, leche).
4. Añadir a cada tubo de ensayo 1,75 ml del reactivo de Biuret, tapar con papel parafilm e invertir dos veces para mezclar.
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 a 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.

Para pensar y responder….

1. La masa del intestino de esa ave era de aproximadamente 342 mg y se hizo

una homogenización del tejido con buffer Tris en una proporción 1:5, el hígado tuvo un peso de 467 mg y se homogenizó de la misma manera ¿qué proporción de proteínas tendrá cada tejido?

2. ¿Qué característica determina la gran variedad de funciones que desempeñan las proteínas?

3. ¿Qué método emplearía si necesita determinar la concentración de una proteína en el rango entre los 0,1 a 2 mg? ¿Y en el caso de una muestra que se piensa tiene aproximadamente 10 ng? Explique qué ocurriría si emplea un método demasiado sensible o poco sensible para analizar su muestra.

4. ¿Qué enlaces intervienen en la conformación de la estructura terciaria de las proteínas?

Bibliografía

- Berg, J.M.; John, L.T.; Lubert, S. (2008) *Bioquímica*. 2ª ed. Reverté, Barcelona.
- Segal, C. (2005) *Manual de prácticas de biología molecular de la célula*. Editorial Publidisia.
- Harris, D.C. (2003). *Quantitative chemical analysis*. San Francisco: W.H. Freeman.
- Beas C., D. Ortuños y J. Armendariz (2009) *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones*. Editorial Mc Graw-Hill.
- El mundo de la Célula. 2007. 6ta Edición. Becker W, Kleinsmith L, Hardin J. Editorial Pearson Education S.A. Madrid.
- Introducción a la Biología Celular. 2011.3º Edición. Alberts B, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Biología Celular y Molecular". 2016. Lodish y col. 7ma. Edición. Editorial Médica Panamericana.

ACTIVIDAD N°2: 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 Northem 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 isoeléctrico (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

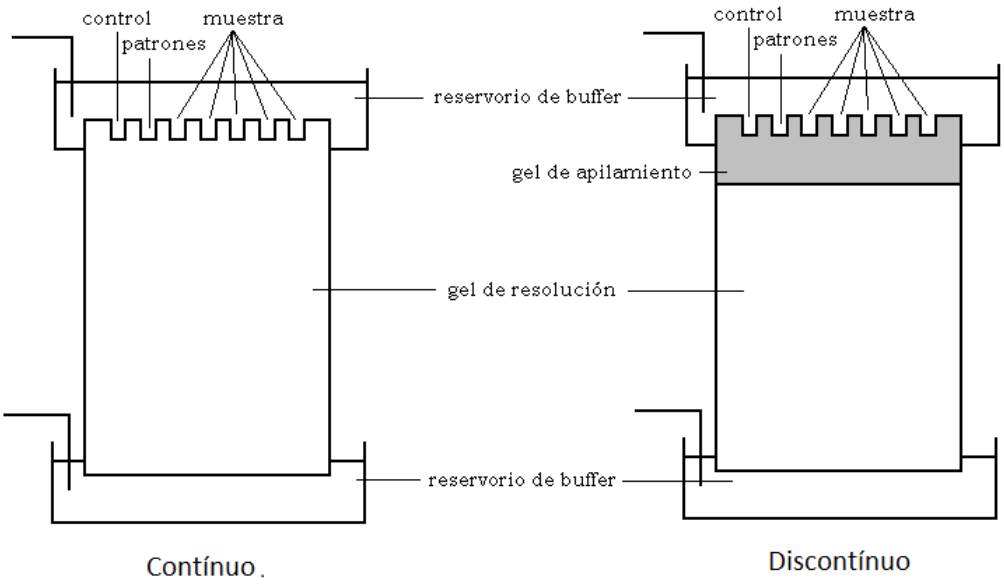
un detergente aniónico como el dodecilsulfato sódico (SDS), las proteínas adquieren una carga neta negativa y la separación electroforética se produce solamente debido a su masa. Esto es debido a que el SDS tiene la propiedad de unirse a las cadenas polipeptídicas en una proporción constante (1,4 g SDS/g 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 poliacrilamida son el resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida. 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 bisacrilamida, ésta da lugar a puntos de ramificación en el polímero, lo que permite formar una matriz tridimensional, dando lugar al gel de poliacrilamida. El tamaño de los huecos o poros que forma la retícula del polímero depende de la concentración de acrilamida y del grado de entrecruzamiento (es decir, de la proporción de bisacrilamida con respecto al total). Así, variando la concentración de acrilamida y bisacrilamida en la preparación del gel se consiguen distintos grados de porosidad y, por tanto, distintos intervalos de separación de proteínas. También se añade 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 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 discontínuos 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.



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) si, 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 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 canales 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

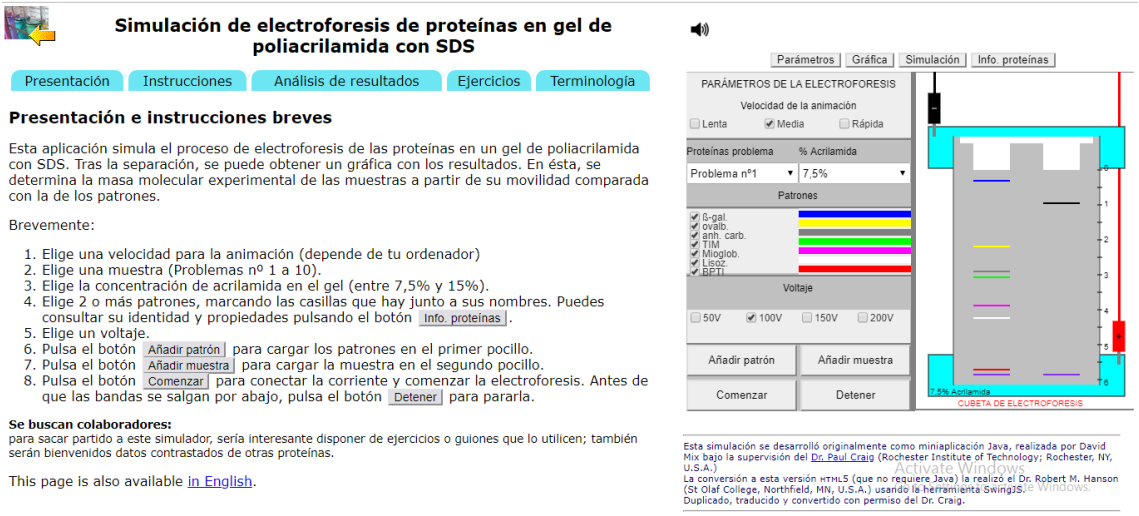
Métodos de tinción

1. Azul Coomassie es el más utilizado, detecta 1 μg de proteína/mm^2.
2. Nitrato de Plata, detecta 0,01 μg de proteína/mm2. Es un método muy sensible, se deben usar siempre guantes porque las queratinas de las manos pueden dar bandas negativas.
3. Fluorescencia, normalmente se usa fluoroscaína, tiene una sensibilidad similar al coomassie.

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 de laboratorio manual.

http://biomodel.uah.es/lab/SDS-PAGE/inicio_v.htm



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 esquipo.

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 mismo.

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 aplican la solución del gel separador entre los dos cristales hasta 2-3 mm por debajo de la pieza verde del soporte (Figura 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.

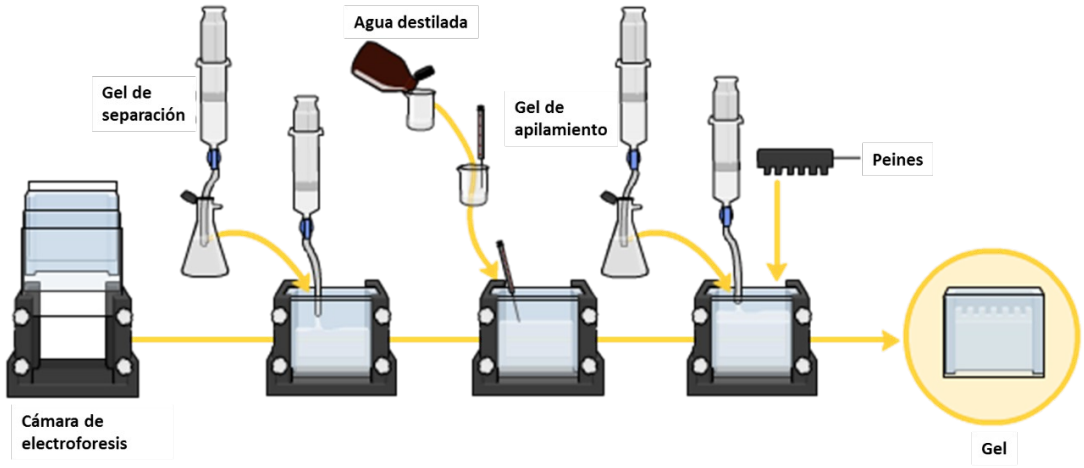


Fig 1. Armado del gel de electroforesis.

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 (Figura 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

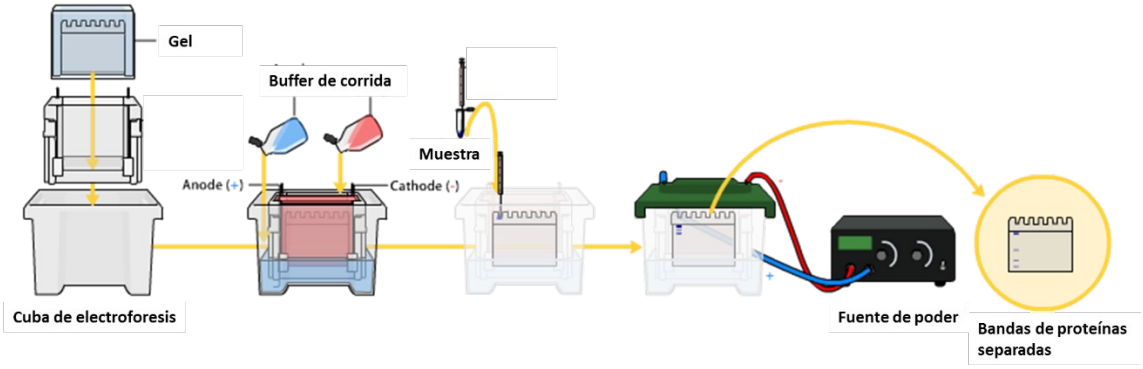


Fig 2. Extraído y modificado de: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SDS-PAGE_Electrophoresis.png

V. Preparación de las muestras

Las muestras se diluyen 3:1 en un buffer de siembra (buffer siembra 3X) y luego se calientan a 90ºC, 5 min, para producir la desnaturalización de las proteínas. Posteriormente, se aplican en los pocillos preformados en la parte superior del gel de apilamiento (Figura 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 45 minutos, más o menos, o hasta que el frente de azul de bromofenol salga del gel.

VII. Resultados

Las muestras que se encuentren más cerca a los posillos 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)
- Imágenes extraídas y modificadas de: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SDS-PAGE_Acrylamide_gel.png

ACTIVIDAD N°3: TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO

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 medio 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 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. 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 centrífuga a 10000 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.

AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS A PARTIR DE TEJIDO DE HIGADO DE POLLO

PROCEDIMIENTO

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

1) Tomar el tejido hepático y pesarlo.
2) Romper el tejido hepático utilizando el homogeneizador y solución buffer 0,25 M de sacarosa.
3) Agregar 5 ml de sacarosa 0,25 M por gramo de hígado.
4) Colocar la solución (hígado y sacarosa) en un tubo de centrífuga.
5) Centrifugar 3000 g durante 10 minutos.
6) Pasar el sobrenadante a otro tubo y centrifugar 10000 g durante 20 minutos.
7) Descartar el sobrenadante.
8) Agregar 0,2 ml de buffer fosfato pH 7 y mezclar.
9) Guardar en heladera (0-5°C).

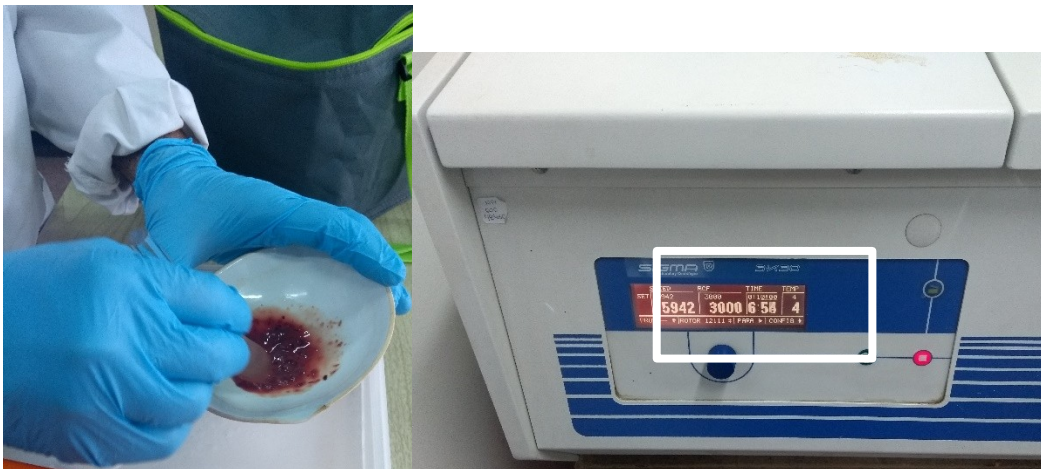


Fig 1. Imágenes de la metodología a emplear

a) Una gota de la solución de mitocondrias colocarlas sobre un portaobjetos, agregarle una gota de verde Jano (0.01%) y observar al microscopio. Esquematizar lo observado.

b) A la solución mitocondrial separarla en distintos tubos y realizar el siguiente experimento.

Tubos	1	2	3	4	5	6
Buffer	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Mitocondrias	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
Azul metileno	1 gota	1 gota	1 gota	1 gota	1 gota	1 gota
Buffer de sacarosa	0,4	0,4	0,2	0,2	-	-
Barbital*	-	-	-	-	0,2 ml	0,2 ml
Piruvato	-	-	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

*Barbital: es un sedativo y somnífero, el cual interfiere en el proceso de respiración celular. Por ello una sobredosis puede llevar a la muerte.

Describir el resultado obtenido y explique el porqué.

II. Tinción de mitocondrias de células epiteliales humanas

Materiales

-Hisopo estéril -Verde Jano B 0,01% en solución salina

-Cubreobjetos -Portaobjeto

Procedimientos

1. Con el hisopo estéril raspar suavemente la parte interna de la mejilla. Se colectarán un gran número de células de esta manera.

2. Suavemente frotar el hisopo sobre el portaobjetos en una dirección para esparcir las células. Dejar secar las células.

3. Poner unas gotas de la solución de verde Jano y dejar actuar por 5-10 min.

4. Luego de los primeros 5, lavar las células suavemente 1 vez con agua destilada. Montar las células en una gota de agua destilada con un cubreobjeto y observar bajo el microscopio.

Se debe ver en cada célula un gran número de cuerpos pequeños y alargados. Generalmente no se tiñen fuertemente, aparecen como pecas. Podemos distinguir a las mitocondrias de una bacteria debido a que las últimas se tiñen intensamente.

OBSERVACIONES Y PREGUNTAS:

¿Qué estructuras celulares pudo observar en estas células?

Observe varias células y establezca la posición de las organelas.

I. Aislamiento de la fracción de cloroplastos

1. Pese 4 g de hojas frescas de espinaca, a las cuales se les remueve la nervadura central

2. Corte las hojas en pequeños pedazos y colóquelas en un mortero frío. Añada 2 ml de la solución amortiguadora de Tris-HCl pH=8 fría, 8ml de solución de NaCl 0,35M y arena purificada. 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 centrífuga de 15 ml frío. Luego trasvase el líquido a varios tubos de 1,5 ml.

4. Centrifugue el líquido filtrado a 500g por 3 minutos, para sedimentar fragmentos de tejido y organelas grandes. Verifique que los tubos de centrífuga estén balanceados.

5. Recupere el sobrenadante a un tubo nuevo y centrifugue a 3000 g por 10 minutos, en esta centrifugación la mayor parte de los cloroplastos sedimentan formando un pellet.

6. Descarte el sobrenadante y usando una pipeta automática, añada 250µl de la solución NaCl 0,35 M al “pellet” que quedó en cada tubo de la centrífuga. Resuspenda suave y lentamente con una pipeta Pasteur.

7. Adicione 500 µl más de la solución de NaCl 0,35 M.

8. Centrifugue a 3000 g durante 10 minutos para lavar los cloroplastos.

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

10. Tape el tubo y colóquelo en hielo.

II. Observación microscópica de la fracción de cloroplastos

1. Con una pipeta Pasteur remueva una gota de la suspensión de cloroplastos y lleve a cabo una preparación húmeda. Use una pequeña gota de modo que no tenga que ejercer presión sobre el cubreobjetos, dañando los cloroplastos.

2. Examine los cloroplastos bajo el objetivo de mayor aumento en seco (40X) y luego bajo el objetivo de inmersión en aceite (100X).

3. Observa la morfología de varios cloroplastos. Identifica los cloroplastos que tengan una morfología interna poco homogénea.

OBSERVACIONES Y PREGUNTAS:

¿Qué estructuras celulares pudo observar en

estas células? Observe varias células y establezca la

posición de las organelas.

Bibliografía

- Laboratory Investigations in Cell and Molecular Biology. Bregman, Allyn. 1990. 3ra Ed. John Wiley & Sons, N.Y.
- Protocols on cell biology experiments. Indian Society of Biology
- El mundo de la Célula. 2007. 6ta Edición. Becker W, Kleinsmith L, Hardin J. Editorial Pearson Education S.A. Madrid.
- Introducción a la Biología Celular. 2011.3º 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. 7ma. Edición. Editorial Médica Panamericana.

ACTIVIDAD N°4: TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO

Extracción de ADN

Objetivos

- Practicar el manejo de diferentes técnicas de laboratorio para extraer el ADN de un producto natural.
- Comparar cualitativa y cuantitativamente distintas técnicas de extracción 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.

En este trabajo práctico se presentarán dos técnicas de extracción de ADN plasmídico. El sistema Quickprep es más rápido, pero se obtiene un ADN plasmídico con más restos moleculares que usando la segunda técnica, conocida como Miniprep.

Protocolo de extracción de ADN plasmídico

ATENCIÓN: se deberá trabajar con sumo cuidado, con guantes durante todo el proceso. Limpiar el lugar de trabajo antes y después de la experiencia y trabajar siempre sobre papel secante. Recuerde son bacterias resistentes a antibióticos

SEPARACIÓN RÁPIDA DE ÁCIDOS NUCLEICOS (Quickprep)

1) Tomar 100 µL de cada cultivo y transferirlo a un tubo eppendorf.

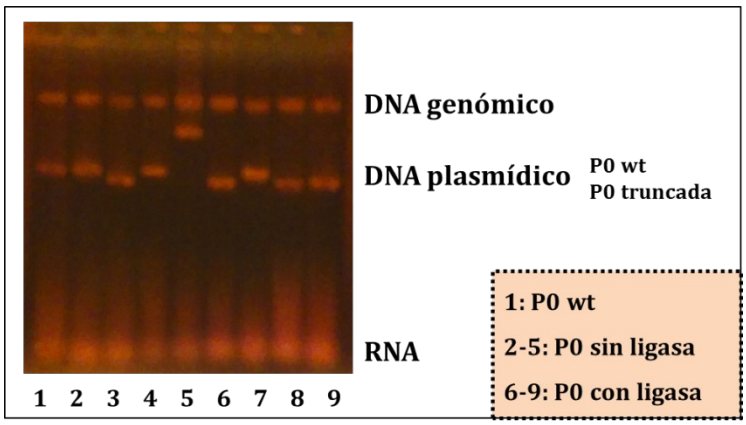
2) Agregar 10 µL de Buffer de Muestra para DNA 6X.

3) Agregar 50 µL de Fenol: Cloroformo equilibrado a pH 8.0.

4) Vortexear.

5) Centrifugar a 5000 rpm x 5 min.

6) Sembrar 20 µL de la fase acuosa (superior) en un gel de agarosa 1 %.



Gel de agarosa 1% de una quickprep. Imagen cedida por la Dra. Ludmila Campos. Area de Biología Molecular. UNSL.

MINIPREPS DE DNA PLASMÍDICO

- Tomar 1,4ml de los cultivos de bacterias seleccionadas y pasarlos a tubos de 1,5 ml.
- Centrifugar 10000 rpm por 10 min. Descartar el sobrenadante.
- Agregar al pellet 300ul de solución I y resuspender suavemente.

Nota: las bacterias sin plásmido forman un pellet más compacto y difícil de resuspender.

- Agregar 300 ul de solución II y mezclar por inversión. NO VORTEXEAR!!!!!
- Agregar 300 ul de la solución III, (para precipitar el DNA genómico, el plasmídico queda en el sobrenadante). Incubar en hielo 15 min
- Centrifugar a 13200 rpm por 15 min a 4°C.
- En tubos nuevos poner 2 ul de RNASA (sobre hielo).
- Trasvasar el sobrenadante a tubos con 2 ul (20mg/ml) de RNasa. Incubar 1 h a 37°C. en estufa.
- *Extracción de proteínas*: Agregamos 600 ul de cloroformo: isoamílico (24:1). Vortexear.
- Centrifugar 13200rpm a temperatura ambiente (TA) por 2 min.
- Recuperar el sobrenadante (fase acuosa superior).

- *Precipitación:* Agregar 600 ul de isopropanol 100 %. Mezclar por inversión e incubar a TA 1h (o toda la noche a 4°C).
- Centrifugar 13200rpm a 4°C por 30 min.
- Descartar el sobrenadante y lavar e l pellet con 500ul de EtOH 70% en agua ultrapura (MQ) (despegar el pellet).
- Centrifugar 12000 rpm por 10 min a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante y secar el pellet a 37°C por 5 min.
- Resuspender en H_2O MQ (30 ul).
- Guardar en freezer de -20°C para utilizarlo en el TP N°4, para proceder a la técnica de ADN recombinante y una posterior electroforesis

SOLUCIÓN	PREPARACIÓN	FUNCIÓN
I	25 mM de Tris-HCl, pH=8; 50 mM de glucosa; 10mM de EDTA	Es para resuspender a las bacterias.
II	Se prepara en el momento; 0,2 N NaOH; 1% SDS	Lisis de bacterias
III	60ml de acetato de potasio 5 M; 11,5 ml de ácido acético glacial; 28,5ml de H2O. VF=100 ml	Precipita el ADN genómico dejando al ADN plasmídico en solución.

Bibliografía:

- 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.
- El mundo de la Célula. 2007. 6ta Edición. Becker W, Kleinsmith L, Hardin J. Editorial Pearson Education S.A. Madrid.
- Introducción a la Biología Celular. 2011.3º Edición. Alberts B, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.

ACTIVIDAD N°5: 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? 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).

Actividad: se estimulará a los alumnos que elaboren preguntas en base a los ejes temáticos 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°6: TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO

Técnicas de ADN recombinante

Objetivos

- Practicar el manejo de diferentes técnicas de uso común en laboratorios de biología celular y molecular.
- Resolver problemas relacionados con las técnicas de ADN recombinante.

Temario: Estructura del ADN. Plásmidos bacterianos. Endonucleasas de restricción, separación del ADN. Electroforesis de ácidos nucleicos. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Clonado de ADN.

Guía de problemas:

1. Marque cuál de los siguientes pares de enzimas son isoesquisómeros:

Enzima de restricción	Mbo I	EcoR I	Bst1107 I
Cadena 5´-3´	NGATCN	GAATTC	GTATAC
Cadena 3´-5´	NCTAGN	CTTAAG	CATATG
Enzima de restricción	Eco32 I	Cla I	BamH I
Cadena 5´-3´	GATATC	ATCGAT	GGATCC
Cadena 3´-5´	CTATAG	TAGCTA	CCTAGG

En el medio de los nucleótidos subrayados es donde se encuentra el sitio de corte de la enzima.

2. Trabajando con bacterias en el laboratorio se observó que una cepa de bacterias *E. coli* no estaban produciendo una proteína necesaria para la hidrólisis del monosacárido manosa. Se desea reconocer si esta observación se debe a algún evento que esté ocurriendo a nivel del ADN de la bacteria. ¿Cuál sería la hipótesis más probable de este problema? ¿Cómo haría para evaluar esta hipótesis?

3. En un laboratorio de Biología Molecular se logró identificar y aislar una secuencia de nucleótidos que se piensa es el gen de la mioglobina de llamas (alpacas andinas). Posteriormente esta secuencia fue amplificada por la técnica de PCR, ahora usted

debe:

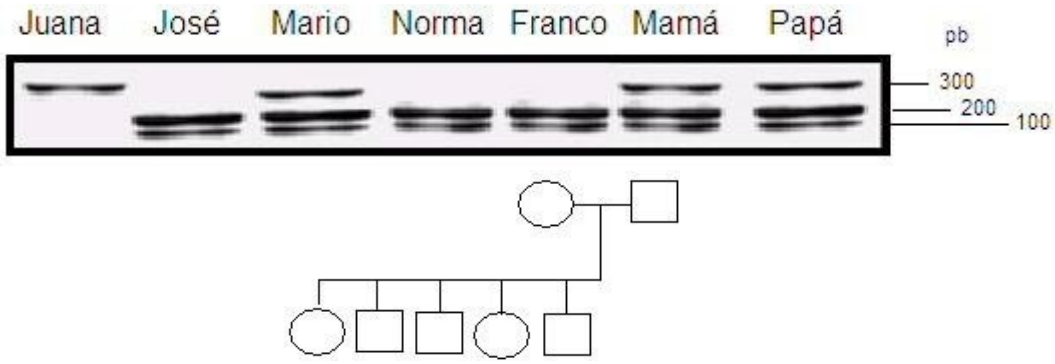
a) determinar si ese fragmento identificado es el gen de interés.

b) ¿Cómo haría si usted quiere producir esa proteína en altas concentraciones para estudiarla? Analice varias posibilidades.

4. Se ha hecho un estudio de filogenia molecular para armar el árbol genealógico de la familia Cortés, lo que se sabe de ellos, es que muchos de los miembros de la familia padecen una enfermedad genética muy rara, producida por la mutación del gen H, “Ñ fobia”, los afectados por este mal, no pueden pronunciar, ni ver la letra Ñ debido a que les produce mal de ojo.

- El procedimiento fue el siguiente: se obtuvo ADN genómico de los familiares y se amplificó por PCR el exón 4 del gen H (fragmento de 300pb). Se digiere el mismo con la enzima de restricción Vod K y se hizo una corrida electroforética.
- Cuando el individuo es sano, el fragmento de 300pb, es diana para Vod K y se obtienen dos fragmentos uno de 100pb y otro de 200pb. Pero cuando está afectado la mutación hace que el exón 4 del gen H ya no sea diana de la enzima.

Analizar en función de la explicación anterior la electroforesis del siguiente gel de agarosa al 3%, indicando quienes estarán afectados y quiénes no.



a) ¿Qué criterios ha seguido para identificar los fragmentos?

b) ¿Se hubiesen obtenidos resultados parecidos con otras enzimas de restricción?

¿Está seguro de su respuesta?

5- Suponga que usted desea localizar en el cromosoma el gen que codifica para la insulina en el lagarto overo. Para esto la información que usted conoce de la insulina es la secuencia de aminoácidos de la proteína y además posee las herramientas para sintetizar una molécula artificial con la secuencia de nucleótidos que usted elija. ¿Cómo haría para llevar a cabo su objetivo?

Suponga que desea separar el gen de la insulina del resto del cromosoma. ¿Cómo procedería?

6- Para identificar si una persona tiene el virus del HIV se realizan diferentes estudios, primeramente un ELISA, que si da positivo se realiza un Western Blot (presencia de las glicoproteínas gp41 y gp121). En caso de que el paciente presente esas proteínas es necesario contar la cantidad de virus mediante el uso de sondas Taqman (qPCR). Además se debe analizar por citometría de flujo las poblaciones de las células del sistema inmune que participan en respuesta a esa infección (CD4+ y CD8+)

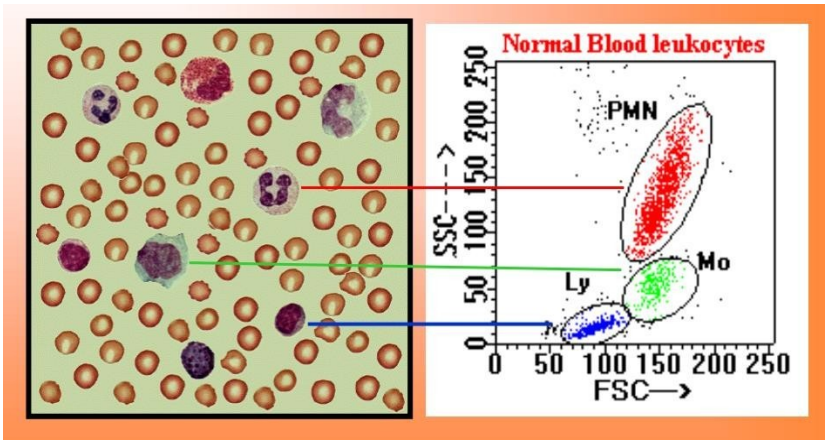


Imagen extraída de: http://www.grupocitometria.org.ar/wp-ontent/uploads/2013/08/ABA-CLASE-CUANTIFICACION-CD4.pdf

Analizar los siguientes resultados:

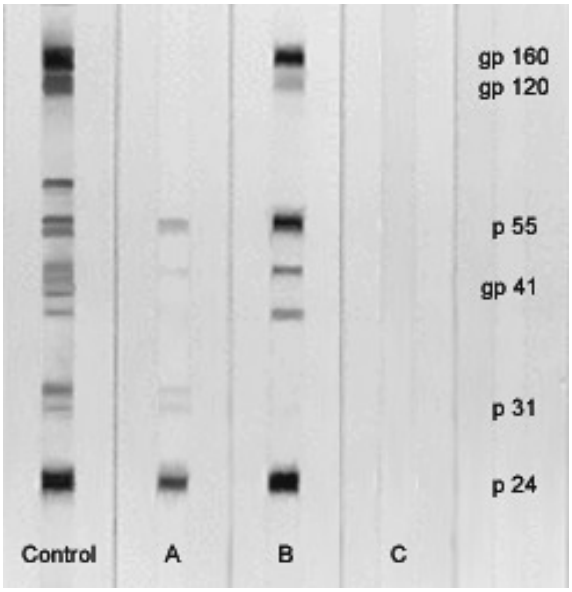


Imagen extraída de: http://www.grupocitometria.org.ar/wp-content/uploads/2013/08/ABA-CLASE-CUANTIFICACION-CD4.pdf

¿Qué puede decir respecto al western blot anterior?

Antes de comenzar el tratamiento el paciente tenía 25000 copias de virus/ml de muestra. Luego de 6 meses de tratamiento se repite el conteo y da como resultado: **ARN de virus, no detectado.**

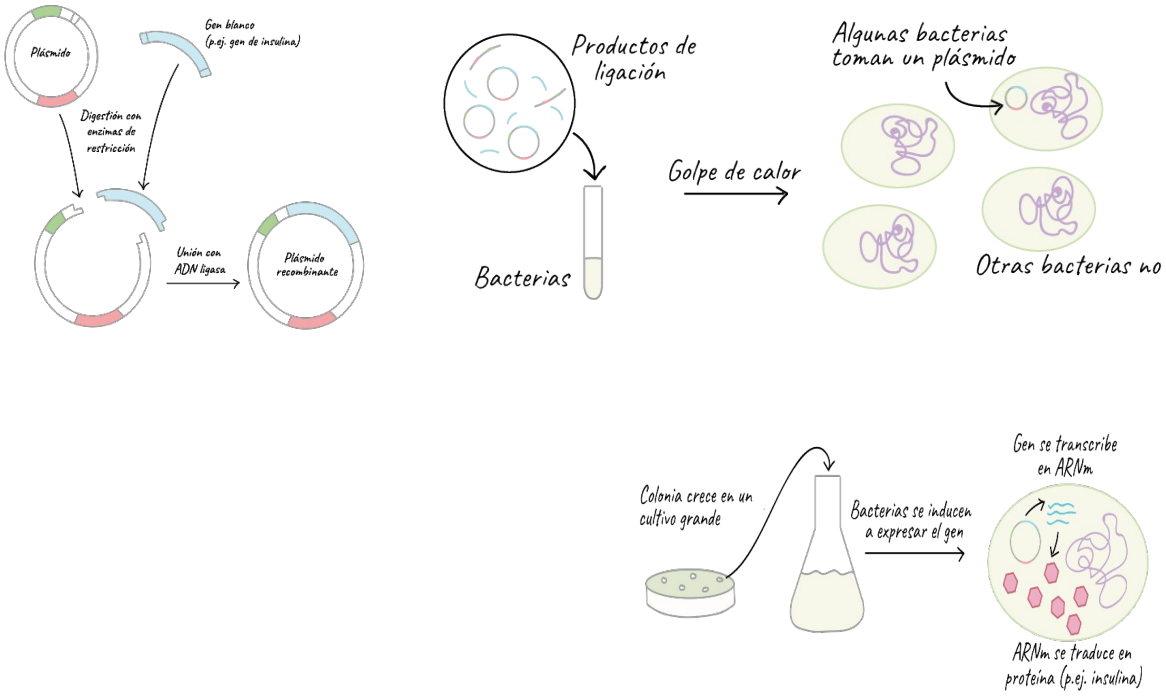
¿Qué indica esto?

7- El ornitorrinco probablemente es el mamífero “más raro” de todos, durante mucho tiempo desconcertó a los biólogos debido a sus características. Sin embargo, al analizar por sonda el genoma se descubrió lo siguiente:

Presenta genes específicos de mamíferos (gen de la caseína, necesario para la composición de la leche materna), pero a su vez una gran cantidad de genes de reptiles. ¿Qué nos dice esto?

PARTE PRÁCTICA:

Digestión con enzima de restricción para obtener un producto de PCR que fue previamente ligado a un plásmido (ver anexo).

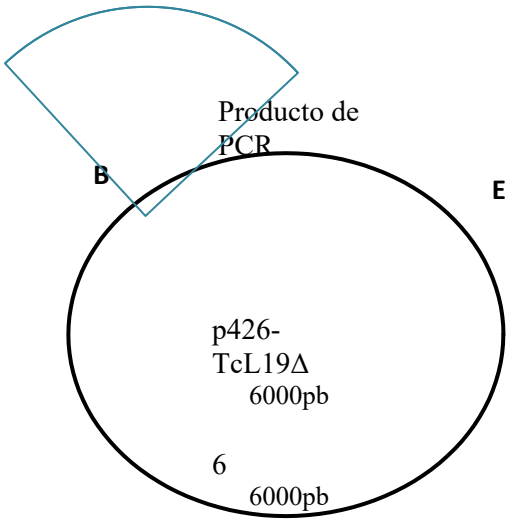


Secuencia extraída de: https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/overview-dna-cloning

1- Digestión con enzimas de restricción

En el práctico se realizará la digestión con enzimas de restricción para recuperar el

producto de PCR del plásmido. Para esto se incubarán los plásmidos ligados al producto de PCR con las enzimas de restricción durante 1 hora a 37°C.



Enzimas de restricción a utilizar para digerir el plásmido

Sitio B: BamHI 5'-G/GATCC-3'

Sitio E: EcoRI 5'-G/AATTC-3'

Posteriormente se hará una corrida en un gel de agarosa al 2,5%. La electroforesis se llevará a cabo utilizando buffer TBE 0,5X (poner que contiene el buffer), a voltaje constante (50 mV/cm) durante 90 minutos. El gel se teñirá con Gelred para luego observarse en un transiluminador (luz UV).

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.
- El mundo de la Célula. 2007. 6ta Edición. Becker W, Kleinsmith L, Hardin J. Editorial Pearson Education S.A. Madrid.
- Introducción a la Biología Celular. 2011.3º Edición. Alberts B, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Sumanas, Inc. Multimedia Development Services. [Internet]. Disponible en: http://www.sumanasinc.com

- Animación de Southern Microbiology. 6ª Ed. Prescott Harley Klein. En: http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072556781/student_view0/chapter14/animation_quiz_5.html

ANEXO (previo al práctico)

Preparado de placas y medio de cultivo

Medio LB Vf: 500ml

El medio LB (caldo Luria Bertani), es un medio nutricional con los siguientes componentes:

5g de triptona	1%
2,5g de extracto de levadura	0,5%
5g de NaCl	1%

Estos reactivos proveen fuentes de proteína e hidratos de carbono, necesarias para e correcto crecimiento bacteriano de nuestra cepa DH5α de *Escherichia coli.* Otros procariotas pueden precisar otros requerimientos.

Llevar a 475ml con H_2O Ultrapura (MQ), llevar a pH y completar 500 ml

Para medio sólido agregar 15g/l de agar.

Antibiótico preparado: 125ul (200mg/ml). Trifacilina 1000 + 5ml de H_2O(d)

Siempre trabajamos en condiciones estériles y en este caso el uso del antibiótico nos permite seleccionar sólo las bacterias que tienen el plásmido insertado (porque presenta resistencia a este antibiótico).

LIGACIÓN

Este proceso es una de las principales etapas para realizar el subclonado. Aquí nuestro producto de PCR de interés es insertado en el vector de clonación (plásmido). De esta manera, ahora el vector tiene un mayor tamaño, porque el producto de PCR se encuentra inserto en él.

-2ul H_2O

-1ul solución salina

-1ul vector

-2ul producto de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

VF: 6ul

La concentración óptima es 1:3 del inserto:vector

Transformación de células competentes con los productos de ligación (Modificado del protocolo TOPO TA cloning kit de Invitrogen).

Una vez que nuestro vector ha sido modificado, debemos colocarlo en nuestras células, este proceso se denominan transformación.

Aclaración! no todas recibirán un plásmido y además no todos los plásmidos tienen el inserto.

- Mezclar y hacer un spin (centrifugación corta). Dejar 15-20min de incubación a temperatura ambiente (TA) para optimizar la ligación.
- Se agregan 2ul de la ligación a cada tubo con bacterias competentes. Se incuba 15min en hielo.
- Se realiza un shock térmico 42°C por 30min para permitir el ingreso del plásmido a la bacteria.
- Incubar en hielo 5min y luego agregar 250ul de SOC (medio de cultivo que viene con el kit de transformación) a temperatura ambiente.
- Incubar en agitación horizontal a 200rpm 1h a 37°C.
- Mientras tanto, preparar las placas con X-gal 2% en DMF (40 ul por placa). El X-gal es un sustrato de ✓-galactosidasa (el gen para esta enzima se encuentra en el vector), y cuando se encuentra esta enzima, las colonias se ponen azules. El inserto del PCR se coloca en el medio de este gen, por lo cual, las colonias de interés serán las azules. Es el método para saber que está nuestro inserto presente.
- Sembrar en placas de LB+antibiótico (100ug/ul) e incubar durante toda la noche a 37 °C.
- Colocar las placas en heladera unos minutos (ayuda a distinguir las azules de las blancas)
- Para cultivar a cada tubo se le agrega medio líquido LB con antibiótico, unos 3ml.
- Elegir sólo colonias blancas o celeste (las azules no tienen el inserto).
- Cultivar 24hs.
- Proceder a obtener el ADN plasmídico con nuestro inserto (Minipreps).

Análisis de placas de células transformadas

- Seleccionar 4 colonias transformadas (blancas) y una celeste de cada placa con antibiótico. Para distinguirlas mejor se las puede colocar unos minutos en la heladera.

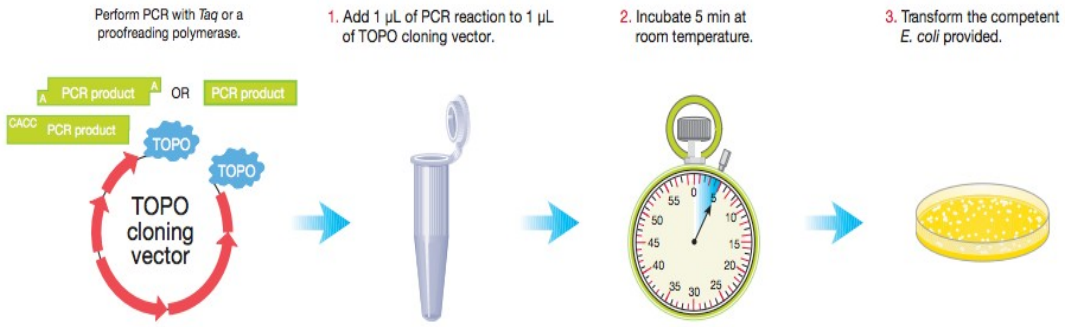


Imagen extraída de:

https://www.thermofisher.com/ar/es/home/life-science/cloning/topo/topo-ta-cloning.html

ACTIVIDAD N°7: 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; Primack et al., 2001). 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; ente 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:

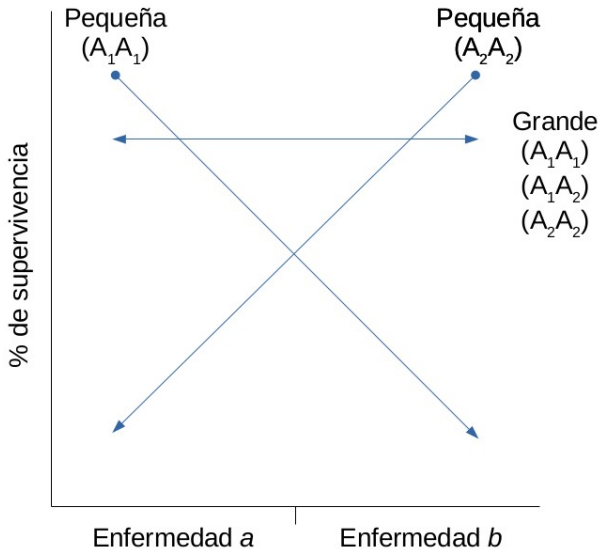
1. Determinar cuál campo de la Ecología Molecular se estudió en cada caso.
2. Seleccionar los términos ampliamente utilizados en la Ecología Molecular.
3. Identificar los marcadores moleculares más utilizados. Identifique marcadores moleculares no conocidos y su utilidad.
4. Discuta en detalle la importancia 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.

D. A partir del texto anexo “El paradigma de la baja diversidad en especies raras o amenazadas” discuta entre sus compañeros:

1. El caso de las especies raras, el tamaño mínimo viable, metapoblaciones y la importancia de la genética en la conservación de especies en peligro y no amenazadas.
2. La medición de la diversidad genética. ¿Qué marcadores genéticos pueden tipificarse siguiendo un muestreo no invasivo?
3. La diversidad genética. ¿Qué forma de diversidad genética considera más importante para retener el potencial evolutivo? ¿Por qué?

Bibliografía

- Introduction to Conservation Genetics. 2010. 2da edicion. Richard Frankham, Jonathan D. Ballou, David A. Briscoe. Cambridge University Press.
- Ecología Molecular. Cap 8: Ecología Molecular de la Conservación. 2007. Rocha M. Gasca Jaime.Editor: Moreno-Letelier A. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- 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. 3ra Edición. Alberts B, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.

Trabajos científicos para analizar

- 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. Link de descarga: https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/74534
- 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. Link de descarga: https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/69218
- 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. Link de descarga: https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3728
- Pardo Pérez, E., Martínez Bula, M. T., Zambrano Charrasquiel, 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. Link de descarga: http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n36/0122-9354-rmv-36-00027.pdf

- 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. Link de descarga: https://revistas.unc.edu.ar/index.php/BSAB/article/view/20583

ACTIVIDAD N°8: TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO

Aislamiento y cultivo de células

Objetivos

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

Temario: Interacciones entre las células y su entorno. Uniones celulares. Matriz extracelular.

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 O_2, CO_2, 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 descriptas 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

- **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.

- **Disociación química**

El aislamiento celular puede también ser fácilmente realizado por medio de la incubación del intestino delgado con compuestos químicos, principalmente agentes quelatos, 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 quelatos, el

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

- **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.

Determinación de la viabilidad celular por exclusión con azul tripán.

Una vez aisladas las células se debe conocer el estado de salud de la célula, para lo cual se realiza la tinción de 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).

El procedimiento general es el siguiente: Se mezcla una fracción de solución de azul tripán con la suspensión celular y luego de esa mezcla se siembran 10 μl en un portaobjeto especial denominado cámara de Neubauer (figura 1), y 1 minuto después se lleva al microscopio 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:

Nº de células/ml = (Nº de células contadas/Nº de cuadros contados) x 16 x 10^4 x 5

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

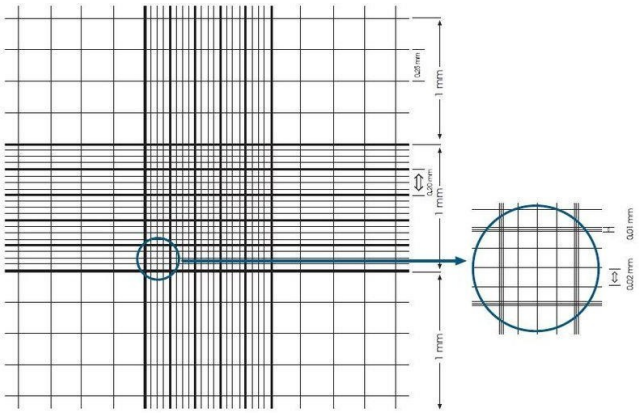


Fig 1: cámara de Neubauer

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 Dulbeco (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

- Substancias 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: 9 Penicilina (100 U/mL) / 1 Estreptomicina (100 µg/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

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 0.05%. Agregar cantidad necesaria hasta que los tejidos queden sumergidos en la solución.
3. Llevar a estufa a 37ºC durante 30 min y agitar cada 15 minutos. Después de este período de tiempo se obtendrá la suspensión celular que contiene a todas las células presentes en ese tejido.
4. Recoger con pipeta el sobrenadante en tubos de 1,5 ml.
5. Centrifugar a 500g por 5min. Eliminar el sobrenadante y lavar los pellets celulares con medio de cultivo dos veces, centrifugando nuevamente a 500g por 5min.
6. Resuspender las células aisladas en medio de cultivo con suero y antibióticos, posteriormente evaluar la viabilidad celular con solución de tripán.

7. Observar en microscopio óptico.

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

Se utilizarán 250 ul de azul tripán 0,4% en PBS, 150 μl de HBSS-manitol y 100 μl de la suspensión celular, lo cual diluye dicha suspensión 5 veces (dilución 1/5). Todo este procedimiento es llevado a cabo a 4ºC, con el fin de minimizar la actividad de las proteasas. Realizar los pasos especificados anteriormente en la guía.

d. Realización de un cultivo celular.

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).

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.
- El mundo de la Célula. 2007. 6ta Edición. Becker W, Kleinsmith L, Hardin J. Editorial Pearson Education S.A. 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 secuential isolation of epithelial cells from avian intestine.2008. Mac Donal O, Chediack JG and Caviedes-Vidal E. Biocell; 32(3):219- 27.

ACTIVIDAD N°9: TRABAJO PRÁCTICO DE AULA

Laboratorio virtual de Investigación Biomédica

Objetivos

- Integrar el aprendizaje de técnicas en Biología Molecular mediante recursos informáticos (usos de TICs).

Link para acceder al laboratorio virtual:
https://www.xplorehealth.eu/es/media/investiga-una-cura-para-el-cancer-colorrectal

Imagen extraída de Xplore Health

Fundamento teórico:

Es importante implementar nuevas estrategias de enseñanza, o nuevos escenarios didácticos que permitan a los estudiantes otras formas de adquirir ciertas competencias como el pensamiento científico y metodología de investigación. En la aplicación de estos escenarios, los laboratorios virtuales son herramientas que resultan atractivas ya que despiertan motivación y curiosidad por el conocimiento científico en los alumnos. Entre las ventajas que presentan podemos mencionar la posibilidad de repetir cada experiencia tantas veces como el alumno la necesite sin restricciones horarias ni de tipo económico. Además, como en los mismos la información se brinda en el momento en la cual es necesaria, permite una comunicación más eficiente con el alumno, al evitar los “ruidos” habituales en

un laboratorio presencial donde la relación no es uno a uno, y las indicaciones pueden ser desoídas al ser enunciadas cuando el alumno está abocado a otra tarea.

Bibliografía:

- Infante Jiménez, Cherlys. 2014. Propuesta pedagógica para el uso de laboratorios virtuales como actividad complementaria en las asignaturas teórico-prácticas. Revista mexicana de investigación educativa, 19(62), 917-937.
- Biología Celular y Molecular, 7ª ed. 2016. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scout MP, Zipursky L, Darnell J. Editorial Médica Panamericana. Madrid.
- El mundo de la Célula. 2007. 6ta Edición. Becker W, Kleinsmith L, Hardin J. Editorial Pearson Education S.A. Madrid.
- Introducción a la Biología Celular. 2011.3º Edición. Alberts B, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Laboratorio virtual Xplore Health. [Internet]. Disponible en: https://www.xplorehealth.eu/es/media/investiga-una-cura-para-el-cancer-colorrectal.

ACTIVIDAD N° 10: TRABAJO PRÁCTICO DE AULA

Análisis de un trabajo científico

Objetivos

- Conocer la importancia de comunicar los resultados de una investigación científica.
- Analizar el avance de la Biología Celular a través de la búsqueda bibliográfica.
- Discutir la importancia de la rigurosidad en la difusión/divulgación de la ciencia.
- Conocer y entender cuáles son las partes principales de un artículo científico.

GENERACIÓN Y DIVULGACIÓN 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, colectar 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 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. La forma más común para comunicarlo entre pares o colegas investigadores es la publicación la investigación “artículo” en una revista científica. Lo que se investiga y no se publica, es como si no se hubiera hecho. 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, 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. Esta es una de las normas básicas del método científico. 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 todos los países. 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 de los artículos científicos tienen 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.

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 (duplicados) 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 académico coloquial, 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. Las revistas científicas, más serias y exigentes en cuanto a calidad de los trabajos, publican los trabajos en inglés. Aunque también hay revistas que publican trabajos científicos tanto en inglés como en español. Todas estas revistas publica trabajos con distinta frecuencia, algunas son semanales, otras quincenales, mensuales, bimensuales, etc… muchas veces depende del área temática que publiquen. 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, las más notorias son Nature y Science (Nature se edita semanalmente en Londres desde el año 1869, Science fue fundada en 1880 en Estados Unidos y también se edita semanalmente) y otras dedicadas a una disciplina en particular (por ejemplo: Journal of Microbiology, 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 (http://www.scimagojr.com/). Es importante resaltar que todos los resultados obtenidos en una investigación científica son importantes, aún los negativos, 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.

Existen grandes bibliotecas digitales en donde se encuentran indexados todos los artículos científicos 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/

Sicencedirect http://www.sciencedirect.com/

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

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

Actividad Práctica

A- Buscar en el buscador PubMed trabajos científicos que contengan la palabra apoptosis, exosomas ("exosomes"), células madre ("stem cells"), ciclo celular (cell cycle"), etc… y averigüe desde que año se registran publicaciones y cuantas se registran en los últimos 5 años. ¿qué conclusión puede sacar con respecto al avance de la biología celular en estos últimos 30 años?

B- Se formarán grupos de no más de tres alumnos y buscarán un artículo científico de su interés en alguno de estos buscadores. Una vez elegido el trabajo científico contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Es el título del paper claro y adecuadamente informativo? ¿Podemos predecir de qué tratará el artículo?
2. Basándose en el resumen, ¿se puede describir brevemente de qué trata el artículo? ¿Qué entendió? Escríbalo para discutirlo con sus compañeros.
3. ¿Cuál es la hipótesis del experimento? ¿Está redactada claramente? ¿Se predicen los resultados?
4. ¿Cuál o cuáles son los objetivos del estudio?
5. ¿Se detalla en forma suficiente la metodología usada en los experimentos?
6. Localice en el texto referencias a otros artículos. ¿Cuál es el rango de fechas de los trabajos de referencia?
7. ¿Qué tipo de tablas, gráficas y figuras utilizan los autores?
8. Muestre dónde en la discusión se comparan los resultados con investigaciones previas del mismo autor o de otros autores.
9. ¿Sigue el artículo el método científico?

C- Analizar un trabajo científico “paper” que se le va a entregar en el Trabajo Práctico y responda las preguntas detalladas anteriormente.

Bibliografía:

• Golombek D (Comp.). Demoliendo papers. La trastienda de las publicaciones científicas. 2007. Colección Ciencia que ladra. Buenos Aires: Siglo XXI Editores.