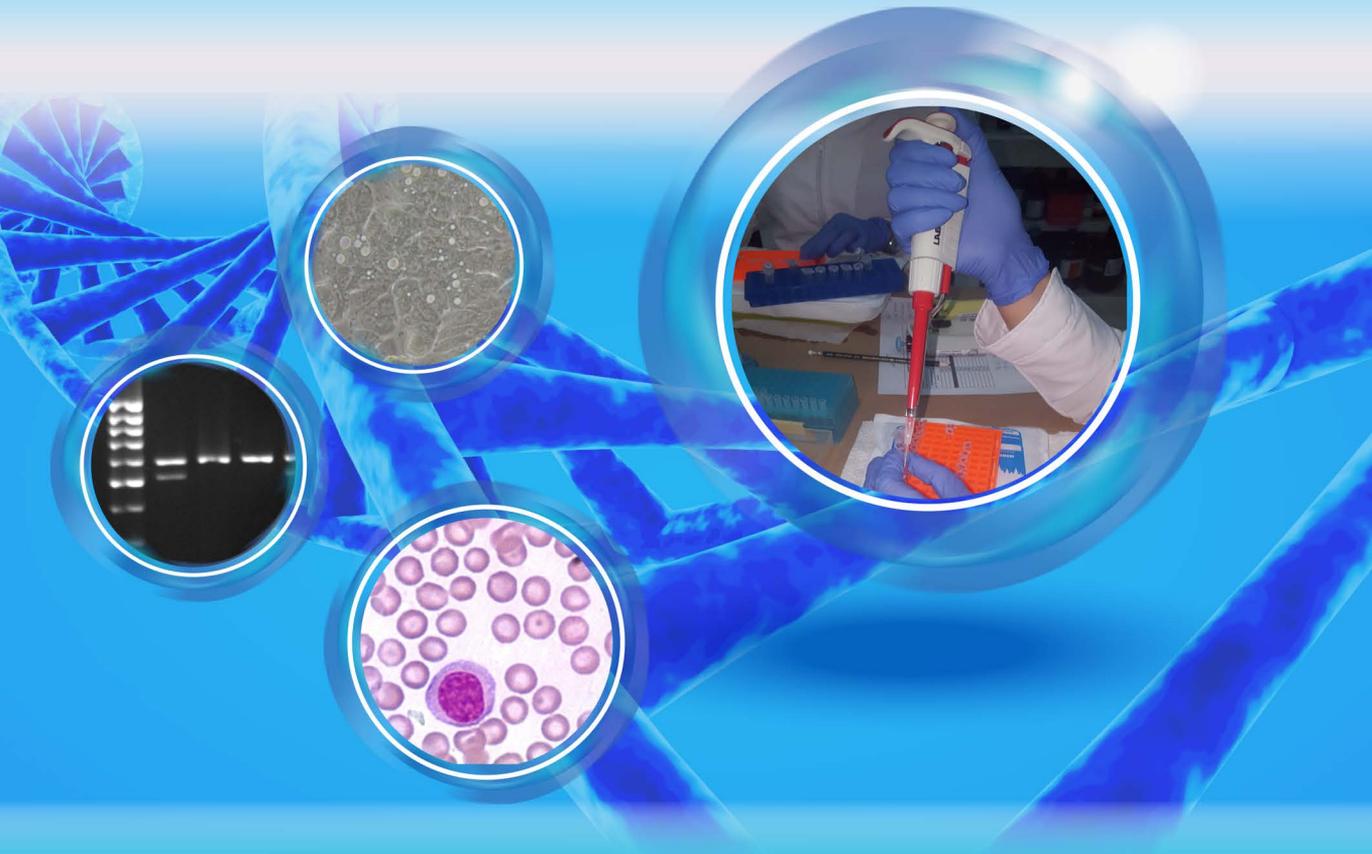


**Karina Caballero Gallardo  
Maricela Viola Rhenals  
Neda Álvarez Ortega**

# **Ensayos de Bioquímica aplicados a programas del área de la salud**





# ENSAYOS DE BIOQUÍMICA APLICADOS A PROGRAMAS DEL ÁREA DE LA SALUD

**Karina Caballero Gallardo. Ph.D.**

*Docente Facultad de Ciencias Farmacéuticas  
Investigador Grupo de Química Ambiental y Computacional  
Universidad de Cartagena*

**Maricela Viola Rhenals. Ph.D.**

*Docente Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Director Grupo de Bioquímica y Biología Celular del Cáncer  
Universidad de Cartagena*

**Neda Álvarez Ortega. M.Sc.**

*Estudiante de Doctorado en Toxicología Ambiental  
Investigador Grupo de Química Ambiental y Computacional  
Universidad de Cartagena*

ENSAYOS DE BIOQUÍMICA APLICADOS A PROGRAMAS DEL ÁREA DE LA SALUD

Autor: Karina Caballero Gallardo. Ph.D., Maricela Viola Rhenals. Ph.D., Neda Álvarez Ortega. M.Sc

Primera Edición

ISBN: 978 958 5439 00 9

Rector:	Édgar Parra Chacón
Vicerrector de Docencia:	Federico Gallego Vásquez
Vicerrector de Investigación:	Jesús Olivero Verbel
Vicerrector Administrativo:	Orlando Alvear Tristancho
Secretaria General:	Marly Mardini Llamas

---

572 / G135

Ensayos de bioquímica aplicados a programas del área de la salud / Karina Caballero Gallardo, Maricela Viola Rhenals, Neda Álvarez Ortega; Freddy Badran Padauí, editor - Cartagena de Indias: Editorial Universitaria, c 2016

218 páginas.

ISBN 978 958 5439 00 9

1. introducción al laboratorio de bioquímica-Guías, 2. Ácidos nucleicos-Guías, 3. Expresión génica-Guías, 4. Bioinformática aplicada a la predicción de proteínas-Guías, 5. Marcadores bioquímicos de la función hepática-Guías, 6. Enzimas antioxidantes-Guías, 7. Proteínas-Guías, 8. Cultivo celular-Guías, 9. Diagnóstico clínico de la diabetes contenido-Guías, 10. Perfil lipídico-Guías. 11. Extendido de sangre periférica-Guías, I. Caballero Gallardo, Karina II. Viola Rhenals, Maricela III. Álvarez Ortega, Neda IV. Badran Padauí, Freddy, Ed.

CEP: Universidad de Cartagena. Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación – Biblioteca José Fernández de Madrid.

---

Editor: Freddy Badrán Padauí, Jefe de Sección de Publicaciones

Universidad de Cartagena

Diseño de Portada: Jorge Barrios Alcalá

Diagramación: Alpha Editores

Derechos

©

Editorial Universitaria, Centro, Calle de la Universidad, Cra. 6, N° 36-100,  
Claustro de San Agustín, primer piso  
Cartagena de Indias, 2016

## CONTENIDO

Agradecimientos	7
Abreviaciones	9
Presentación	13
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN AL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA <i>Karina Caballero Gallardo</i>	15
CAPÍTULO 2. ÁCIDOS NUCLEICOS <i>Karina Caballero Gallardo</i>	45
CAPÍTULO 3. EXPRESIÓN GÉNICA <i>Karina Caballero Gallardo</i>	79
CAPÍTULO 4. BIOINFORMÁTICA APLICADA A LA PREDICCIÓN DE PROTEÍNAS <i>Karina Caballero Gallardo</i>	99
CAPÍTULO 5. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE LA FUNCIÓN HEPÁTICA <i>Neda Álvarez Ortega</i>	113
CAPÍTULO 6. ENZIMAS ANTIOXIDANTES <i>Maricela Viola Rhenals</i>	139
CAPÍTULO 7. PROTEÍNAS <i>Maricela Viola Rhenals</i>	155

CAPÍTULO 8. CULTIVO CELULAR <i>Maricela Viola Rhenals</i>	171
CAPÍTULO 9. DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LA DIABETES CONTENIDO <i>Neda Álvarez Ortega</i> <i>Karina Caballero Gallardo</i>	183
CAPÍTULO 10. PERFIL LIPÍDICO <i>Neda Álvarez Ortega</i> <i>Karina Caballero Gallardo</i>	199
CAPÍTULO 11. EXTENDIDO DE SANGRE PERIFÉRICA <i>Neda Álvarez Ortega</i> <i>Karina Caballero Gallardo</i>	205
Glosario	211

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores expresan sus más sinceros agradecimientos a las siguientes personas y entidades:

La Universidad de Cartagena, por brindarnos las condiciones y el apoyo necesario para desarrollar nuestras actividades docentes e investigativas.

Al doctor Jesús Olivero Verbel, por su apoyo y confianza en permitirnos compartir su conocimiento y experiencia en este documento.

A la Ingeniera de Alimentos Adriana Ripoll Arboleda, por su valiosa ayuda durante la revisión del documento.

Al Grupo de Química Ambiental y Computacional de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas.

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias), por el apoyo a Karina Caballero y Neda Álvarez a través de las Convocatorias No. 567 (2012) y No. 727 (2015), respectivamente para estudios de Doctorado en Colombia.



## ABREVIACIONES

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN <sub>c</sub>	ADN complementario
ALT	Alanina aminotransferasa
ARN <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
ARN <sub>r</sub>	Ácido ribonucleico ribosomal
ARN <sub>t</sub>	Ácido ribonucleico de transferencia
ARP	Atención de riesgos profesionales
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CAP	Centro de Atención Primaria
CAT	Catalasa
Cu/ZnSOD	Cobre/Zinc superóxido dismutasa
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
E%	Porcentaje del error relativo
EDTA	Etilendiamino tetra acético sódico
ERO	Especie reactiva de oxígeno
gDNA	ADN genómico
GDM	Diabetes gestacional
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GTP	Trifosfato de guanosina

h	Horas
HbA <sub>1</sub> C	Hemoglobina glicosilada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogeno
IMDM	Modificación de Iscove del medio DMEM
KDa	KiloDalton
KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O	Tartrato de sodio y potasio
KOH	Hidróxido de potasio
Medio Basal de Eagle	Medio Basal de Eagle
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MnSOD	Manganeso superóxido dismutasa
NaCl	Cloruro de sodio
NADPH <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (forma reducida)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (forma oxidada)
NaOH	Hidróxido de sodio
NBT	Azul de nitrotetrazolio
NDMV	Diabetes mellitus neonatal
ng	Nanogramos
nkat/L	Nanokatal por Litro
nm	Nanómetros
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión radical superóxido
O <sub>3</sub>	Ozono
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLP	Fosfato de piridoxal
PTOG	Prueba de tolerancia oral a la glucosa
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
ppt	Partes por trillón
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
rpm	Revoluciones por minuto

s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sodio
FBS	Suero fetal bovino
SOD	Superóxido dismutasa
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
U/L	Unidades internacionales por litros
UV	Ultravioleta
$\alpha$ -GT	Gamma-glutamyltransferasa
OH <sup>-</sup>	Anión hidroxilo
OH <sup>·</sup>	Radical hidroxilo
$\mu$ kat/L	Microkatal por litro
FAL	Fosfatasa alcalina
$\mu$ L	Microlitros
$\mu$ M	Micromolar
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxígeno singlete



## PRESENTACIÓN

El libro “*Ensayos de bioquímica aplicados a programas del área de la salud*” fue creado como texto guía para la academia, el cual brinda al estudiante la oportunidad de conocer y aplicar algunos de los ensayos más utilizados en bioquímica. Esta obra incluye análisis de macromoléculas tales como carbohidratos, lípidos y proteínas, de igual forma aislamiento y manipulación de los ácidos nucleicos, reacción en cadena de la polimerasa, cinética enzimática, cultivo celular entre otros. Además, el estudiante también se familiarizará con algunos de los equipos frecuentemente empleados en las prácticas de bioquímica.

*Capítulo 1.* Se refiere a las habilidades básicas de laboratorio, en el mismo los estudiantes aprenderán cómo son reportados los resultados obtenidos en el laboratorio. Además, se hará énfasis en las normas de seguridad a tener en cuenta durante su desempeño en el laboratorio. Finalmente, aprenderán a medir con exactitud y precisión pequeños volúmenes de líquidos, así como evitar contaminación de la muestra.

*Capítulo 2.* Hace referencia a los ácidos nucleicos representados por el ADN (ácido desoxirribonucleico) y el ARN (ácido ribonucleico). Este cuenta con ensayos de laboratorio relacionados con la extracción, cuantificación y verificación de la pureza de ADN y ARN, así como su integridad.

*Capítulo 3.* Está orientado a una de las técnicas de mayor importancia en biología molecular como lo es la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR. Realizar PCR o PCR en tiempo real para obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular.

*Capítulo 4.* Es realizada una introducción a la predicción de propiedades y estructuras de las proteínas con el uso de herramientas bioinformáticas, la cual

emplea técnicas computacionales, matemáticas y estadísticas para el análisis, interpretación y generación de datos biológicos.

*Capítulo 5.* Relaciona los marcadores bioquímicos de la función hepática, abordando las características generales de enzimas tales como alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (FAL), y gamma-glutamilttransferasa (GGT), así como los fundamentos y técnicas empleadas para su determinación en suero o plasma sanguíneo.

*Capítulo 6.* El estudiante podrá conocer las enzimas antioxidantes que puede monitorear, así como la importancia de estas contra el estrés oxidativo, el cual puede conducir a daños a las macromoléculas tales como proteínas, lípidos o ADN. Varias prácticas son presentadas en este capítulo sobre las enzimas frecuentemente determinadas en bioquímica.

*Capítulo 7.* Hace énfasis a las proteínas, y son detallados métodos sencillos para su monitoreo, los cuales están basados en la capacidad de formar complejos coloreados que pueden ser cuantificados con la ayuda de un espectrofotómetro.

*Capítulo 8.* Contempla el mantenimiento de cultivos celulares, área que ha venido ganando importancia con el paso del tiempo ya que constituye una de las metodologías que permite la obtención de resultados reproducibles y exactos.

*Capítulo 9.* Abarca una de las pruebas para el diagnóstico y seguimiento de la diabetes.

*Capítulo 10.* Describe los diferentes componentes de las células de la sangre como eritrocitos, leucocitos y plaquetas, así como sus alteraciones.

*Capítulo 11.* En esta parte han sido incluidas dos prácticas relacionadas con perfil lipídico.

Es importante anotar que algunos de los ensayos de laboratorio son resultado de investigaciones realizadas en los dos grupos de investigación de los cuales las autoras hacen parte activa, y algunas han sido desarrolladas con base en la literatura.

**Profesora Karina Caballero Gallardo. Ph.D.**

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN AL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA

*Karina Caballero Gallardo*

### CONTENIDO

<b>1.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>18</b>
<b>1.2. NORMAS DE SEGURIDAD</b>	<b>18</b>
1.2.1. Normas generales	18
1.2.2. Responsabilidad del estudiante	19
1.2.3. Normas de limpieza	20
1.2.4. Material o productos peligrosos	21
1.2.5. Procedimientos de accidentes y emergencias	22
1.2.6. Acuerdo	22
1.2.7. Evitar problemas de contaminación	23
1.2.8. Micropipeta: uso adecuado y advertencias	23
1.2.9. Uso de los equipos	23
<b>1.3. INFORME DE LABORATORIO</b>	<b>24</b>
1.3.1. Guía breve para el reporte de práctica en el informe de laboratorio	24
<b>1.4. EQUIPOS FRECUENTEMENTE EMPLEADOS EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA</b>	<b>27</b>
1.4.1. Espectrofotómetro	27
1.4.2. Centrífugas	27
1.4.3. Baño serológico	28
1.4.4. Vórtex	29
1.4.5. Balanza analítica	29
1.4.6. Cámaras de electroforesis	29

1.4.7. Termocicladores	29
1.4.8. Microscopio óptico	30
1.4.9. Fotodocumentador	30
1.4.10. Analizador de bioquímica sanguínea semiautomático	30
<b>1.5. REFERENCIAS</b>	<b>31</b>
<b>1.6. ACTIVIDADES</b>	<b>31</b>
<b>1.7. GUÍA No. 1. MANEJO Y VERIFICACIÓN DE LA CALIBRACIÓN DE MICROPIPETAS</b>	<b>32</b>
1.7.1. Objetivos	32
1.7.2. Introducción	32
1.7.3. Materiales, reactivos y equipos	34
1.7.4. Procedimiento	35
1.7.5. Referencias	39
1.7.6. Videos sugeridos	39
1.7.7. Actividades	40
<b>1.8. GUÍA No. 2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES EN ppm, ppb Y ppt</b>	<b>41</b>
1.8.1. Objetivo	41
1.8.2. Introducción	41
1.8.3. Materiales, reactivos y equipos	41
1.8.4. Procedimiento	42
1.8.5. Referencias	44
1.8.6. Actividades	44

## **FIGURAS**

Figura 1.1. Forma correcta de ubicación de tubos de centrífuga para equilibrarla antes de su uso	21
Figura 1.2. Equipos frecuentemente utilizados en el laboratorio de bioquímica. Imágenes propias	28
Figura 1.3. Esquema general de las partes de una micropipeta	33
Figura 1.4. Forma de leer el indicador de volumen de la micropipeta	33
Figura 1.5. Puntas de diferentes volúmenes de las micropipetas	34

## **TABLAS**

Tabla 1.1. Puntas que deben ser utilizadas teniendo en cuenta el volumen de la solución a pipetear	34
--	----

## 1.1. INTRODUCCIÓN

Las prácticas de bioquímica pretenden proporcionar al estudiante una primera aproximación experimental a las técnicas básicas empleadas habitualmente en un laboratorio de bioquímica, lo cual le permitirá aprender posteriormente otras más complejas y con mayor facilidad.

Cada práctica presenta una breve introducción teórica que centra al estudiante sobre los objetivos de la misma, detallando los reactivos, materiales, equipos y métodos que serán utilizados en el desarrollo de esta. Seguidamente, es planteado un cuestionario, el cual debe ser resuelto. Finalmente, en el informe de laboratorio deberá anotar los resultados experimentales obtenidos, realizar el informe indicado con los mismos, anotar las incidencias que hubieran podido ocurrir y responder a las preguntas formuladas en el laboratorio; esto debe ser efectuado para cada guía de laboratorio, cuando esta lo requiera.

Para el buen aprovechamiento de las prácticas de laboratorio de bioquímica es necesario que el estudiante lea con atención las instrucciones descritas en este capítulo y, en particular, cada práctica antes de iniciar el laboratorio. Las posibles dudas se resolverán brevemente al inicio de la misma. De igual forma, es importante la asistencia y puntualidad al laboratorio.

## 1.2. NORMAS DE SEGURIDAD

La seguridad en el laboratorio de bioquímica implica una actitud cautelosa y un conocimiento de los peligros potenciales. Por lo general, los accidentes se pueden prevenir. Si se siguen las medidas de seguridad, se producirá un menor número de estos eventos, el cual se puede reducir si cada estudiante sigue todas las instrucciones dadas en el experimento y por el docente. A continuación son detalladas algunas de las normas de seguridad que se deben tener en cuenta durante la realización de las prácticas de laboratorio de bioquímica:

### 1.2.1. Normas generales

- Para que un estudiante realice experimentos en el laboratorio necesita un permiso o ser autorizado por el docente o auxiliar. Así mismo, alguno de estos debe estar presente durante el desarrollo de los análisis.
- Cuando se rompa material de vidriería, estos deben ser cuidadosamente eliminados en la caneca dispuesta para este tipo de desechos.

- Los dispositivos electrónicos, como teléfonos celulares y cualquier otro aparato para entretenimiento personal, deben estar en silencio antes del comienzo de cada práctica de laboratorio.
- Dentro del laboratorio, deben estar solamente los estudiantes matriculados en la asignatura, no se permite la entrada de ningún tipo de visita, a menos que se tenga el consentimiento previo del docente.
- El incumplimiento de las normas y reglamentos de laboratorio dará lugar a la expulsión del laboratorio.

### **1.2.2. Responsabilidad del estudiante**

- Localización de los dispositivos de seguridad. El estudiante debe ubicar el lavajos, ducha de seguridad, extintores de fuego, botiquín de primeros auxilios y todas las salidas que van a ser utilizadas en caso de emergencia.
- Protección de los ojos. Gafas de seguridad deben ser usadas en todo momento mientras se trabaja con sustancias que lo requiera la práctica del laboratorio.
- El cabello largo debe ser recogido, y no deben llevarse pulseras, ni cualquier otro accesorio colgante que pudieran interferir en la manipulación de reactivos, equipos e instrumentos, ya que esto podría generar accidentes lamentables. Así mismo, las mangas de la bata no deben ser anchas.
- Los zapatos para trabajar en el laboratorio deben cubrir los pies completamente. Vidrios partidos y derrame de productos químicos son los incidentes más comunes en el laboratorio, sus pies necesitan una protección más adecuada que usar zapatos o sandalias con aberturas o plásticas.
- Los estudiantes deben estar vestidos apropiadamente para el laboratorio. Use ropa que le proporcione una máxima protección y cobertura. No usar ropa corta.
- La bata de laboratorio es, ante todo, un elemento de protección. Su uso es obligatorio. Esta deberá mantenerse cerrada. En ningún caso se utilizará la ropa del laboratorio fuera de éste (en la cafetería, biblioteca, entre otros sitios).
- Cuando lo indique el docente, se utilizarán guantes, mascarillas y/o gafas de seguridad.
- No se debe ingerir comida o bebida en el área del laboratorio.
- No se debe fumar en el laboratorio.
- No se debe probar ninguna sustancia química con o sin intención. Para evitar la entrada de cualquier sustancia a la boca, lo mejor es no poner objetos en la misma, tales como bolígrafos, lápices o dedos durante el desarrollo de los experimentos. Una vez finalizada la práctica de laboratorio, las manos se deben lavar con agua y jabón antes de salir de este.

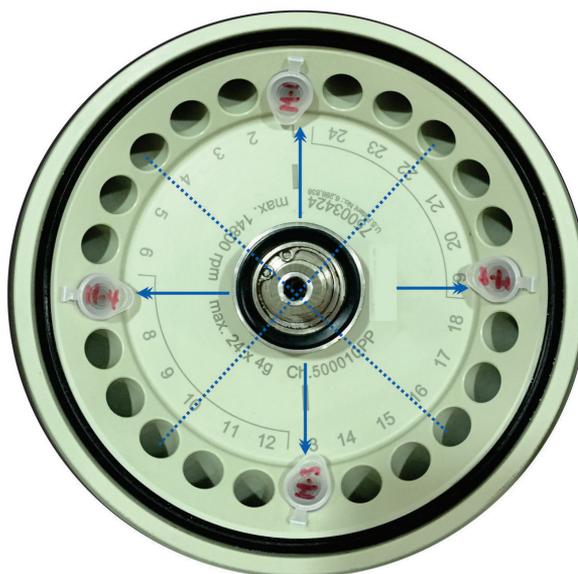
- No oler sustancias directamente. Use su mano para hacer flotar el olor a la nariz, si es que se requiere notar un olor en un procedimiento experimental.
- No manejar aparatos eléctricos con las manos mojadas o cuando se está sobre superficies húmedas.
- Asegurarse de enfriar los materiales antes de usar directamente las manos para cogerlos.
- Cuando se trata de cualquier material biológico o químico, tomar todas las precauciones necesarias para evitar el contacto con la piel, use equipos y ventilación adecuada y el tratamiento de todas las muestras con extremo cuidado.
- Use guantes cuando se trabaja con las muestras y los productos químicos.

### 1.2.3. Normas de limpieza

- Evitar acumular objetos como prendas de ropa, carteras, morrales, entre otros, en el área de trabajo.
- Informe sobre todos los derrames de sustancias químicas a su docente y/o auxiliar de laboratorio. Limpie todos los derrames sólidos y líquidos inmediatamente.
- Tener especial cuidado en no eliminar por el desagüe, ni siquiera en pequeñas cantidades, productos que reaccionan violentamente con el agua, muy tóxicos, inflamables, lacrimógenos, no biodegradables y cancerígenos. Gran parte de los residuos químicos serán dispuestos en frascos de residuos para tal fin.
- Use recipientes para sacar cantidades de la solución madre “stock” y obtener reactivos de trabajo. Si de esta sobra una vez es utilizada la cantidad requerida para la solución, no devuelva el excedente de nuevo al “stock”, esto contamina el reactivo. Dependiendo del tipo de reactivo utilice los frascos para residuos o deséchelos en la caneca de residuos peligrosos.
- Lea la etiqueta en todas las soluciones de valores y productos químicos cuidadosamente.
- No coloque la pipeta dentro de un recipiente de solución madre. Vierta una pequeña cantidad de esta solución en un vaso y luego introduzca la pipeta en este.
- No coloque papel o residuos sólidos en los lavamanos.
- Las Hojas de Datos de Seguridad de Materiales [por sus siglas en inglés Material Safety Data Sheet (MSDS)] están disponibles para todos los productos químicos utilizados en el laboratorio.
- Al finalizar la práctica, recoger los materiales y reactivos y apagar los equipos.
- Dejar el mesón limpio y los reactivos ordenados en los estantes del laboratorio.

#### 1.2.4. Material o productos peligrosos

- **Manejo de material de vidrio.** examinar siempre el material de vidrio antes de usarlo, para evitar cortes en las manos por material quebrado.
- **Sustancias tóxicas y corrosivas.** El manejo de productos químicos tóxicos o corrosivos, debe llevarse a cabo con gran cuidado. En el laboratorio de bioquímica está prohibido pipetear con la boca. Los geles de electroforesis que contengan bromuro de etidio deben ser colocados en un recipiente de vidrio para su disposición final.
- **Centrífugas.** Cuando se utilicen centrífugas, hay que asegurarse de que los tubos están equilibrados. Para tal fin, estos son colocados uno en frente del otro para hacer contrapeso y establecer un equilibrio dentro de ella como se observa en la siguiente imagen para el caso de una centrífuga de tubos de centrífuga de 2 mL (**Figura 1.1**).
- **Uso de material biológico.** Para la medida de volúmenes de sangre o suero hay que utilizar siempre micropipetas automáticas. Las agujas deben ser colocadas en guardianes (recipientes para desechos de materiales cortopunzantes usados con muestras biológicas).



**Figura 1.1.** Forma correcta de ubicación de tubos de centrífuga para equilibrarla antes de su uso.  
Imágenes propias.

### 1.2.5. Procedimientos de accidentes y emergencias

- Cada estudiante debe reportar cualquier accidente, por pequeño que sea, al docente de laboratorio. Si es necesario, el docente dará un informe escrito del incidente al Departamento Académico de procedencia.
- En caso de que ocurra un accidente mayor y un personal o miembro de la facultad no está disponible de inmediato, se debe contactar con el Centro de Atención Primaria, CAP, de la Facultad de Enfermería, el cual se encuentra ubicado en Zaragocilla en el Campus de San Pablo, esto con el fin de obtener asistencia, o para llamadas de emergencia marcar al 132 (Cruz Roja, para servicios médicos).
- De igual forma se debe contar con información de seguros médicos y hospitalización.
- Si el estudiante está involucrado en un accidente, todos los gastos médicos serán su responsabilidad. En su caso, consulte con sus docentes para ver si este está cubierto por el seguro médico o atención de riesgos profesionales.

### 1.2.6. Acuerdo

*Si usted no presenta el acuerdo firmado a su docente de laboratorio, no será recibido en el laboratorio y no se les permitirá realizar cualquier trabajo en este.*

El abajo firmante, ha leído la discusión de las buenas normas y prácticas de seguridad de laboratorio presentado en este manual de laboratorio de bioquímica. Yo reconozco que es mi responsabilidad de acatar estas prácticas y precauciones mientras esté presente en el mismo. Entiendo que si no cumplo, el docente podrá solicitar mi retiro del laboratorio. Yo entiendo que si ocasiono daño en algún material o equipo del laboratorio, debo asumir los costos que este genere.

---

Firma del estudiante

Fecha

---

Nombre completo

Semestre

---

Docente del laboratorio de bioquímica

### **1.2.7 Evitar problemas de contaminación**

- Se deben usar guantes cuando se trabaja con muestras biológicas.
- Cambie periódicamente sus guantes dependiendo del ensayo (análisis que requieran esterilidad, dado que estos pueden haberse contaminado).
- Los desechos biológicos deben ser colocados en bolsas rojas y llevadas directamente al sitio de disposición de estas.
- Se deben etiquetar o rotular todas las muestras claramente con su nombre, fecha y contenido.
- Las puntas de las micropipetas se cambian entre cada muestra. Ellas no necesitan ser cambiadas cuando se hacen alícuotas con agua, tampones, u otros líquidos en repetidas ocasiones en tubos limpios.
- Equipos como centrifugas, micropipetas, vórtex, entre otros, deben ser limpiados antes y después de cada uso.
- Los reactivos se almacenan dependiendo de las indicaciones del MSDS, así como las muestras de acuerdo con la práctica.

### **1.2.8. Micropipeta: uso adecuado y advertencias**

- No gire la rueda de graduación del volumen de las pipetas después del volumen máximo, esto hará dañar la pipeta, y usted será responsable por el costo del reemplazo.
- Sea consistente en su técnica. Coloque la punta por debajo de la superficie de la muestra más o menos a la misma profundidad cada vez. Del mismo modo, la presión se pone en el primer tope.
- Siempre de un vistazo a lo que está haciendo.
- Si usted está preocupado sobre la exactitud de la pipeta, realice una verificación de la calibración en una balanza utilizando diferentes pesos de agua destilada tomados con la micropipeta (guía de laboratorio 1).
- Si no está seguro de la técnica adecuada de la micropipeta, revise la guía de laboratorio 1 y consulte al docente.

### **1.2.9. Uso de los equipos**

- No use equipos de laboratorio sin el entrenamiento del docente.
- El docente autorizará el uso de los equipos dependiendo de la práctica y previo entrenamiento.

### **1.3. INFORME DE LABORATORIO**

Para presentar el informe de laboratorio el estudiante debe apoyarse en la libreta de laboratorio, la cual es una herramienta efectiva de trabajo, en donde documentará todo lo desarrollado en la práctica y escribirá los resultados, fecha, hora, responsable, equipos y reactivos usados, así como problemas con el experimento. Lo anterior, con el objeto de que cualquier otra persona pueda repetir el experimento que usted ha realizado, obteniendo los mismos resultados.

Después de la realización de las prácticas en el laboratorio hay que realizar el informe y entregarlo en la próxima práctica o cuando el docente lo indique, de acuerdo con la guía breve para el reporte de práctica en el informe de laboratorio.

#### **1.3.1. Guía breve para el reporte de práctica en el informe de laboratorio**

El informe de laboratorio que presentarán los estudiantes una vez haya sido realizada la práctica incluirá los siguientes aspectos:

##### **Introducción**

Breve resumen de conceptos y/o importancia del tema. La información debe tener relevancia para la práctica y no debe ser una copia de un libro o de internet. Es importante que esté soportada con referencias bibliográficas actualizadas.

##### **Objetivo**

En esta parte se debe incluir cual fue el objetivo de la práctica, ¿por qué se hace? y ¿para qué?.

##### **Parte experimental**

Describir de forma general cual fue la metodología desarrollada durante la práctica. En esta parte pueden además apoyarse de cómo se escribe en los artículos científicos.

##### **Resultados y discusión**

Se describen los resultados obtenidos, se indican los cálculos, tablas, gráficas o figuras, así como una explicación con fundamentos científicos del porqué se obtuvieron esos resultados y comparar con otros resultados ya publicados cuando sea el caso.

## Cuestionario

Algunas guías tendrán preguntas para resolver, las cuales deben contestar, dado que están relacionadas con los fundamentos, relevancia, ampliación y/o aplicación de los resultados o los métodos empleados durante el desarrollo de la práctica.

## Bibliografía

Reportar las fuentes utilizadas con el formato estándar: Para libros: Autor(es), año de publicación, título en cursiva, editorial y páginas consultadas; en el caso de internet señalar la dirección completa y colocar el día de acceso. Para el caso de revistas científicas: Autor(es), año, nombre del artículo, nombre de la revista abreviada, volumen, páginas. A continuación son mostrados los ejemplos para cada caso:

- *Libros*

Begon, M., Harper, J.L., Townsend, C.R. (1996). *Ecology: Individuals, Populations and Communities*. Editorial Sintesis, 3rd edn. 129 p.

- *Página web*

FAO. (2014). Gestión de plagas y de plaguicidas. <http://www.fao.org/agriculture/crops/mapa-tematica-del-sitio/theme/pests/gestion-de-plagas-y-de-plaguicidas/es/>. Último acceso: Julio 20 de 2014.

- *Revista científicas*

-Un autor

Ates, I. (2011). Possible effect of gene polymorphisms on the release of TNF $\alpha$  and IL1 cytokines in coal workers' pneumoconiosis. *Exp. Toxicol. Pathol.* 63: 175-179.

Citación en el texto: (Ates, 2011)

-Dos autores

Ates, I., Yucesoy, B. (2011). Possible effect of gene polymorphisms on the release of TNF $\alpha$  and IL1 cytokines in coal workers' pneumoconiosis. *Exp. Toxicol. Pathol.* 63: 175-179.

Citación en el texto: (Ates y Yucesoy, 2011)

-Más de dos autores

Ates, I., Yucesoy, B., Yucel, A., Suzen, S.H., Karakas, Y., Karakaya, A. (2011). Possible effect of gene polymorphisms on the release of TNF $\alpha$  and IL1 cytokines in coal workers' pneumoconiosis. *Exp. Toxicol. Pathol.* 63: 175-179.

Citación en el texto: (Ates et al., 2011)

-Cuando hay varias referencias en la misma citación se colocan en orden cronológico de menor a mayor y separados por punto y coma (;) como se muestra a continuación:

Citación en el texto: (Ates, 2000; Yucesoy et al., 2011; García y Durán, 2014).

**Nota: existen programas para las referencias bibliográficas que pueden ser empleados para el manejo de las referencias. Si el estudiante lo requiere será realizada una introducción para el uso de estas herramientas.**

### **Evaluación de las prácticas**

- **Asistencia:** la realización de todas las prácticas es obligatoria. La no asistencia implica declarar la práctica perdida, incluso en el caso de que se aprobara el examen de laboratorio.
- **Informe de laboratorio:** Su entrega es obligatoria. Será entregado un informe por cada grupo. Este debe tener lo anteriormente descrito en la “**Guía breve para el reporte de práctica en el informe de laboratorio**”.
- En caso contrario, el informe no será admitido y se colocará una mala calificación. La calificación obtenida en él se tendrá en cuenta en la nota final. Una vez evaluados, los informes de laboratorio serán entregados por el docente en la práctica siguiente.
- **Examen:** En cada cohorte serán evaluadas solamente las prácticas vistas para la misma.

## **1.4. EQUIPOS FRECUENTEMENTE EMPLEADOS EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA.**

Un equipo de laboratorio es un conjunto de instrumentos con funciones específicas, útiles para desarrollar un trabajo de diagnóstico y/o investigación. Las aplicaciones son variadas, según el campo del conocimiento en el que se involucren y el propósito que se les asigne. Los equipos frecuentemente utilizados en el laboratorio de bioquímica son descritos a continuación y mostrados en la **Figura 1.2**.

### **1.4.1. Espectrofotómetro**

Es un equipo usado para medir la concentración y pureza en muestras de ADN, ARN o proteínas, mediante espectrofotometría y utilizando 1  $\mu\text{L}$  de la muestra, con gran exactitud y reproducibilidad.

### **1.4.2. Centrífugas**

Equipos diseñados para utilizar la fuerza centrífuga para separar sólidos suspendidos en un medio líquido por sedimentación o para separar líquidos de diversa densidad. Los movimientos rotacionales permiten generar fuerzas mucho más grandes que la gravedad, en períodos de tiempo controlados.

En el laboratorio las centrífugas son usadas generalmente en procesos como la separación por sedimentación de los componentes sólidos de los líquidos biológicos y, en particular, en la separación de los componentes de la sangre tales como glóbulos rojos, glóbulos blancos, plasma y plaquetas, entre otros, y para la realización de múltiples pruebas y tratamientos.

Existe una amplia diversidad de centrífugas para poder atender necesidades específicas de la industria y la investigación; sin embargo, para el caso de las prácticas de bioquímicas las utilizadas son las siguientes:

Minicentrífugas para tubos de 0.2 y 2 mL, son empleadas para ensayos moleculares.

Centrífugas refrigeradas de mesa para tubos (15 y 50 mL) y microplacas (48 y 96 pozos), es utilizada para ensayos moleculares y muestras de sangre, cuando estos requieran mantener temperaturas de refrigeración.

Centrífugas de mesa para tubos de 2 mL, son utilizadas para ensayos moleculares.

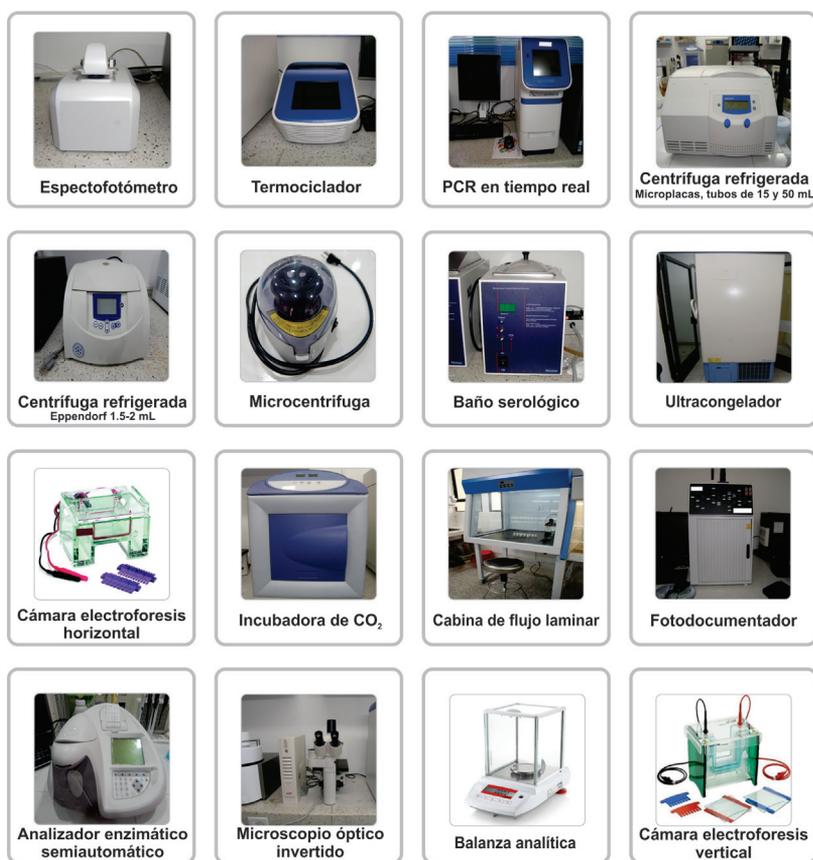


Figura 1.2. Equipos frecuentemente utilizados en el Laboratorio de bioquímica. Imágenes propias.

### 1.4.3. Baño serológico

Este equipo se utiliza para el calentamiento indirecto, por convección térmica del medio y de sustancia; está basado en un método empleado para conferir la temperatura uniforme a una sustancia líquida o sólida, sumergiendo el recipiente que lo contiene en otro mayor con agua destilada. En el laboratorio de bioquímica es empleado para realizar procedimientos de incubación, inactivación, entre otros. Los rangos de temperatura en los cuales normalmente son utilizados, están entre temperatura ambiente (20-22 °C) y los 95 °C. También se pueden seleccionar temperaturas de 100 °C.

#### 1.4.4. Vórtex

Es un instrumento que tiene la función de agitar pequeños tubos o frascos de líquido. En el laboratorio de bioquímica es utilizado para los diferentes experimentos, tales como ensayos moleculares y preparación de diluciones.

#### 1.4.5. Balanza analítica

Es un instrumento cuya función es determinar la masa de un cuerpo. Las balanzas se caracterizan por su exactitud, precisión y sensibilidad. La primera se refiere a la propiedad que posee cualquier instrumento físico para suministrar el resultado de una medida con un valor cercano al verdadero; ello implica que el error sea lo más reducido posible. Por su parte la precisión está relacionada con la dispersión de una serie de mediciones. La sensibilidad está determinada por la aptitud de determinar con exactitud resultados de valores muy reducidos, y puede expresarse como la diferencia entre valores extremos de varias medidas de la misma magnitud.

#### 1.4.6. Cámaras de electroforesis

Son equipos utilizados en el campo de la biología molecular para el análisis (separación, purificación, preparación) de los ácidos nucleicos y proteínas.

#### 1.4.7. Termocicladores

En el laboratorio de bioquímica pueden ser empleados dos equipos de PCR, estos son:

- **Termociclador:** Equipo usado para amplificar muestras de ADN y ARN por la reacción en cadena de la polimerasa [PCR (polymerase chain reaction), por sus siglas en inglés]. El modelo más común consiste en un bloque de resistencia eléctrica que distribuye una temperatura homogénea a través de una placa durante tiempos que pueden ser programables para que se lleve a cabo la desnaturalización, hibridación y extensión de una molécula de ADN. Dado que las reacciones incubadas en el aparato son en soluciones acuosas, suelen incluir en la tapa una placa calentada constantemente a 103 °C para evitar la condensación del agua en las tapas de los tubos donde ocurre la reacción, y así evitar que los solutos se concentren, lo que modificaría las condiciones óptimas para la enzima polimerizante (Taq Polimerasa) y la termodinámica

del apareamiento de los iniciadores conocidos como primers o cebadores. El material genético amplificado puede ser utilizado en muchas aplicaciones posteriores tales como la clonación, secuenciación, análisis de la expresión, y genotipificación.

- **Termociclador de tiempo real:** es un equipo que utiliza reactivos de PCR basados en fluorescencias para proporcionar tanto detección cuantitativa de las secuencias de ácido nucleico del gen diana mediante análisis a tiempo real, como detección cualitativa de secuencias de ácido nucleico del gen diana mediante análisis a punto final y curva de fusión “melting”.

#### **1.4.8. Microscopio óptico**

Es un instrumento que tiene más de un lente de objetivo. Empleado para examinar objetos transparentes y laminas muy finas. Se utiliza para poder ampliar o aumentar las imágenes de objetos no visibles a simple vista. El microscopio óptico está formado por dos partes, una mecánica que comprende el pie, columna, tubo, platina y el tornillo macro-micrométrico y una óptica, encargada de reproducir y aumentar las imágenes mediante el conjunto de lentes que lo componen y consta de algunas partes importantes.

#### **1.4.9. Fotodocumentador**

Equipo utilizado para la visualización de bandas de ácidos nucleicos y proteínas mediante luz ultravioleta.

#### **1.4.10. Analizador de bioquímica sanguínea semiautomático**

Es un equipo utilizado para la realización de diferentes pruebas en bioquímica clínica tales como colesterol, glicemia, entre otros ensayos colorimétrico, además de ensayos enzimáticos como alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (FAL), entre otras; cuenta con un diseño ergonómico, una mecánica fiable y un avanzado e innovador sistema óptico basado en una fuente de luz tipo diodo emisor de luz (LED, light-emitting diode por sus siglas en inglés).

## 1.5. REFERENCIAS

Bonham, A.J., Ragan, E., Drotar, A., Elkins, K.M. (2014). *Biochemistry laboratory manual*. CHE 4350 Spring 2014.

## 1.6. ACTIVIDADES

1. Describa las normas de seguridad que deben tenerse en cuenta para trabajar en el laboratorio de bioquímica.
2. Enumere y diga la función de los implementos de seguridad del laboratorio de bioquímica, puede hacer gráficos y dibujos, entre otras.
3. Detalle la función e importancia de los equipos que se emplean en el laboratorio de bioquímica.
4. Realice un esquema con imágenes sobre los diferentes residuos que pueden generarse en un laboratorio de bioquímica y su manejo.
5. Realice un plan de emergencia en caso de que sea generado un accidente en el laboratorio, imagine una situación y plantee la solución a la misma.

# GUÍAS DE LABORATORIO

## CAPÍTULO 1

### 1.7. GUÍA No. 1. MANEJO Y VERIFICACIÓN DE LA CALIBRACIÓN DE MICROPIPETAS

#### 1.7.1. Objetivos

- Conocer las partes y el funcionamiento de las micropipetas.
- Adquirir destreza en la utilización de micropipetas para la medición de volúmenes entre 1 y 1000  $\mu\text{L}$ .
- Verificar la calibración de las micropipetas dependiendo de su volumen.

#### 1.7.2. Introducción

Esta práctica tiene la intención de introducir al estudiante en una serie de habilidades que son esenciales para el éxito en el laboratorio. En bioquímica, tiene que ser capaz de utilizar micropipetas de volumen variable para agregar y transferir pequeñas cantidades de reactivos y muestras. Las pipetas automáticas se utilizan para transferir con precisión volúmenes de líquidos pequeños. Las pipetas de vidrio no son muy precisas para volúmenes de menos de 1 mililitro (1 mL), pero las micropipetas son tanto exactas (menos de 1% de error), como precisas (menos de 0.5%).

Cada micropipeta (**Figura 1.3**) se puede configurar para transferir cualquier volumen dentro de su propio rango (**Figura 1.4**) utilizando puntas especialmente diseñadas para los diferentes volúmenes de pipeteo (**Tabla 1.1** y **Figura 1.5**). Cabe destacar que el uso de micropipetas permite emplear distintos líquidos sin tener que lavarlas, para ello, se utilizan las puntas desechables.

La utilidad y confiabilidad de un análisis depende del control de las fuentes de variación, entre ellas, la verificación y/o calibración de las micropipetas, debido a que estas son utilizadas en los ensayos de bioquímica es necesario su revisión para garantizar resultados confiables. Además, las cantidades que se requieren en muchos casos para las reacciones son pequeñas, por lo que si la micropipeta está descalibrada estarían tomando volúmenes equivocados.

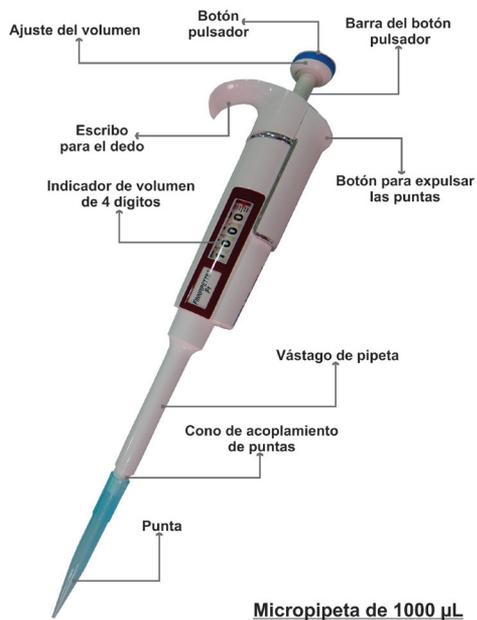


Figura 1.3. Esquema general de las partes de una micropipeta. Imágenes propias.

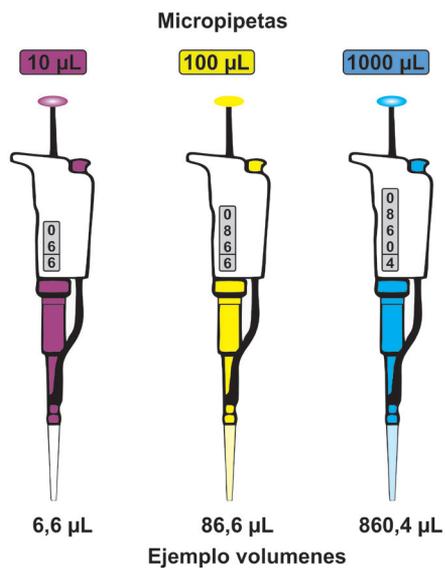


Figura 1.4. Forma de leer el indicador de volumen de la micropipeta.

**Tabla 1.1.** Puntas que deben ser utilizadas teniendo en cuenta el volumen de la solución a pipetear.

Tipo de micropipeta ( $\mu\text{L}$ )	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Tipo de punta
2	0.5 - 2	Blancas
10	0.5 - 10 ó 1 - 10	Amarillas o blancas
20	2 - 20	Amarillas o blancas
50	5 - 50	Amarillas o blancas
100	10 - 100	Amarillas
200	20 - 200	Amarillas
1000	100 - 1000	Azules o blancas



**Figura 1.5.** Puntas de diferentes volúmenes de las micropipetas. Imágenes propias.

### 1.7.3. Materiales, reactivos y equipos

- Materiales

Puntas para las micropipetas

Microplacas de 96 pozos o tubos para microcentrífuga

- Reactivos

Agua destilada

- Equipos

Micropipetas de volúmenes variables (1000, 200 y 10  $\mu\text{L}$ )

Balanza analítica

## 1.7.4. Procedimiento

### • Manejo de micropipetas

#### Llenado de la micropipeta

- Tomar la punta dependiendo del volumen de la micropipeta.
- Colocar el pulgar sobre el botón pulsador de la micropipeta.
- Oprimir el botón pulsador. Cuando el émbolo se presiona sentirá un punto de resistencia. Este es el primer "alto" o "tope". Si continúa presionando encontrará un punto donde el botón pulsador ya no se mueve hacia abajo, este corresponde al segundo "alto" o "tope".
- Oprimir el botón pulsador hasta el primer tope y colocar la punta dentro del líquido hasta una profundidad de 2 a 3 mm. De una manera lenta y controlada, disminuya la presión del émbolo para permitir que se desplace hacia arriba. No suelte el émbolo abruptamente, al permitirlo causará que el líquido pueda salpicar dentro de la punta produciendo volúmenes inexactos y generando contaminación de la micropipeta. Una vez el botón pulsador se haya desplazado hasta arriba mantenga la micropipeta en el líquido durante un segundo, esto evita que se aspire aire en la parte final.

#### Expulsión de la muestra

Llevar la micropipeta al envase en el cual quiere añadir el líquido. Se apoya la punta en la pared del recipiente sin evitar la salida de la muestra. Oprima el émbolo hasta el primer tope y luego hasta el segundo tope. Haga este procedimiento a una velocidad moderada, hacerlo muy rápido hará que queden gotas de muestra en la punta. Si observa cuidadosamente, notará que al oprimir hasta el segundo alto se expulsa todo el líquido de la punta. Finalmente, quite la punta y deséchela en la bolsa de residuos (se puede rotular un vaso de vidrio o de plástico como "residuos" con un marcador no borrable para su uso durante el laboratorio y luego se descartan las puntas usadas en la bolsa de basura o autoclave, al final de la clase, según proceda).

Lo anterior es cierto para la mayoría de soluciones acuosas, excepto para las soluciones de alta viscosidad. Para solventes orgánicos o para soluciones conteniendo grandes cantidades de proteína (plasma y suero), es difícil sacar todo el líquido de la punta. En estos casos, es mejor pipetear una vez la solución

expulsándola y luego llevando hacia arriba el líquido a medir en un segundo tiempo. Para soluciones de alta viscosidad el llenado y la expulsión deben ser más lentas.

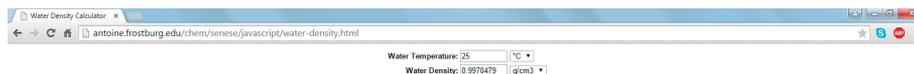
Es importante que se tenga en cuenta que si es usada inadecuadamente, la micropipeta transferirá volúmenes inexactos.

**Nota:** Nunca exceda el máximo o mínimo volumen de las micropipetas, los límites para cada una son mostrados en la **Tabla 1.1**.

### Práctica de pipeteo

En este experimento, se pipetea agua destilada en un tubo de centrífuga. Pesando el agua y luego la conversión de su peso a volumen (usando la densidad del agua) usted determinará la cantidad de agua dispensada. Puede colocar el tubo de centrífuga vacío y se tara (eliminar el peso), presione para poner a cero la escala, y luego, con cuidado añadir el agua. A 25 °C, 1 mL de agua pura pesa 0,9970 g. Usted puede comprobar la temperatura del agua utilizando un termómetro y luego determinar la densidad exacta de esta en la temperatura que está utilizando en el siguiente enlace:

#### Water Density Calculator - Antoine



Enlace: <http://antoine.frostburg.edu/chem/senese/javascript/water-density.html>

### Verificación de la calibración de la pipeta

La micropipeta puede perder su calibración. Comprobar la calibración de la pipeta es un procedimiento simple que puede ahorrar tiempo considerable, energía, y reactivos. En esta práctica aprenderá a usar la micropipeta de tamaños diversos, medir su exactitud, precisión y calibración.

La masa se mide pesando en una balanza. En el laboratorio es precisa a +/- 0,001 g. El volumen tomado por la micropipeta puede ser examinado y se comprueba utilizando una balanza (por ejemplo, 0,1000 mL o 100 µL, debe pesar 0,0997 g a 25 °C). A partir de estas mediciones, se puede determinar la exactitud y precisión

de las pipetas. La exactitud es lo cerca que el valor medido está del valor real (incluso después de promediar). La precisión es lo cerca que los valores medidos están de los otros.

### Parte 1: Visualización de diferentes volúmenes

Pipetear 2  $\mu\text{L}$  de agua destilada en un tubo de centrifuga 1.5 mL. Observe el volumen y anote en su libreta de laboratorio, tal vez, incluso haga un dibujo a escala. Luego, adicionar 18  $\mu\text{L}$  de agua destilada y hacer otra observación. Ahora agregue 80  $\mu\text{L}$  de agua y observe. Por último, añadir 900  $\mu\text{L}$  de agua y observar. Asegúrese de que está utilizando la pipeta correctamente, revise las instrucciones de la página anterior y consulte a su docente o auxiliar de laboratorio si tiene alguna pregunta.

### Parte 2: Pruebas que podrían indicar la necesidad de calibración o un error en las micropipetas.

Cada integrante del grupo de laboratorio debe probar una o dos micropipetas pesando la cantidad de agua destilada suministrada. Será verificado el volumen en la micropipeta tanto el máximo como el 10% de este. Por ejemplo, para la micropipeta de 100 debe ser revisado el volumen de 100  $\mu\text{L}$  y el de 10  $\mu\text{L}$ , así mismo revisar la micropipeta de 1000 (1000  $\mu\text{L}$  y 100  $\mu\text{L}$ ). Esta es la misma gama de volúmenes para los que usted debe utilizar la pipeta. Cada persona debe medir al menos 3 veces cada volumen. A continuación se explica cómo deben utilizar los datos obtenidos para realizar los siguientes cálculos:

1. Encontrar el promedio (media aritmética) de las réplicas.
2. Para medir la exactitud de las micropipetas, calcule el **porcentaje del error relativo (E%)**: la diferencia entre el volumen promedio medido ( $V_{\text{observado}}$ ) y el volumen de la micropipeta ( $V_{\text{micropipeta}}$ ), dividido entre el valor del volumen de la micropipeta ( $V_{\text{micropipeta}}$ ).

$$E\% = \frac{V_{\text{observado}} - V_{\text{micropipeta}}}{V_{\text{micropipeta}}} \times 100$$

3. La precisión o repetitividad de la micropipeta puede ser medida usando la **desviación estándar**. Cuanto menor sea la desviación estándar, las mediciones son más precisas.

$$\text{Desviación estándar, } S = \sqrt{\frac{\sum (x-\bar{x})^2}{n-1}}$$

S= desviación estándar,  $\Sigma$ = sumatoria, x= valor de un dato,  $\bar{x}$ = valor de la media.

Para encontrar la desviación estándar de un conjunto de mediciones:

1. Calcule la media de sus datos
2. Reste la media a cada a cada valor individual para tener una lista de desviaciones de la forma  $(x-\bar{x})$ .
3. Eleve al cuadrado cada una de las diferencias obtenidas en el paso anterior para obtener números de la forma:  $(x-\bar{x})^2$ .
4. Sume todos los cuadrados obtenidos en el paso anterior para obtener la  $\Sigma(x-\bar{x})^2$ .
5. Divida el total del paso 4 entre  $(n-1)$ , es decir uno menos que el total de valores presentes.
6. Calcule la raíz cuadrada del resultado del paso anterior.

### Ejemplo

Calcule la desviación estándar de los siguientes datos: 5, 4, 7, 9 y 5.

**Paso 1.** Cálculo de la media de los datos

$$\bar{x} = \frac{5+4+7+9+5}{5} \longrightarrow \bar{x} = \frac{30}{5} = 6$$

**Paso 2.** Reste la media a cada dato y eleve al cuadrado  $(x-\bar{x})^2$ .

x	$(x-\bar{x})^2$	
5	$(5-6)^2$	1
4	$(4-6)^2$	4
7	$(7-6)^2$	1
9	$(9-6)^2$	9
5	$(5-6)^2$	1

**Paso 3, 4 y 5**

$$S = \sqrt{\frac{\sum x-x^2}{n-1}}$$

$$S = \sqrt{\frac{1+4+1+9+1}{5-1}}$$

$s = \sqrt{\frac{16}{4}}$ , suma de todos los cuadrados obtenidos en el paso 2 (paso 3).

$s = \sqrt{4}$ , se divide entre el número de datos (paso 4).

$s = 2$ , raíz cuadrada (paso 5).

**Este cálculo puede ser realizado en una hoja de cálculo Excel, colocando la siguiente función: = DESVEST(A1:A3), suponiendo que la letra A es la columna donde están los resultados y que empiece en A1 y finalice en A3.**

### 1.7.5. Referencias

Bonham, A.J., Ragan, E., Drotar, A., Elkins, K.M. (2014). Biochemistry laboratory manual CHE 4350. Spring 2014.

Martin Biosca, Y. (2011). Uso de la micropipeta.

Ortega, C., Marcela, D. (2014). Manual de procedimientos para la verificación/calibración de instrumentos y equipos del laboratorio clínico.

Salas, R., Loría, A., Rocha, C. (1995). Evaluación de sistemas de pipeteo. III. La precisión de una micropipeta en el trabajo rutinario. Revista de Investigación Clínica. 47, 461-465.

### 1.7.6. Videos sugeridos

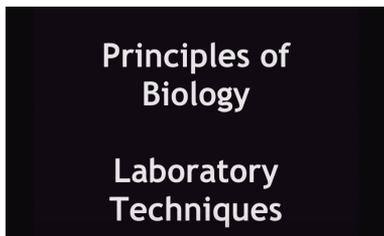
Manejo de micropipetas



Enlace: <https://www.youtube.com/watch?v=PORQPn0bOoE&spfreload=10>

Publicado por: Sergio Albarrán. Junio 4 de 2012

Micropipettes



Enlace: <https://www.youtube.com/watch?v=4AZHoi3hdWM&spfreload=10>

Publicado por: Libby Tsytsikova. Abril 27 de 2009.

### 1.7.7. Actividades

#### Registre los siguientes datos para las micropipetas

1. La temperatura del agua que utilizó y la densidad del agua a esa temperatura.
2. Tablas de datos para el peso del agua suministrada para cada pipeta y cada volumen examinado
3. Para cada volumen medido por cada persona, el cálculo de:
  - a) Promedio (media)
  - b) Error relativo %
  - c) Desviación estándar

#### Responda las siguientes preguntas de acuerdo con las micropipetas utilizadas por su grupo en la práctica de laboratorio:

1. ¿Encontró una diferencia en la exactitud entre sus medidas y las de su compañero de laboratorio? ¿Ha observado alguna diferencia en la precisión entre sus medidas y las de su compañero de laboratorio? Explique.
2. ¿Utilizó dos micropipetas diferentes para medir el mismo volumen? Por ejemplo, 100  $\mu\text{L}$  con una micropipeta de 1000  $\mu\text{L}$  y una micropipeta de 100  $\mu\text{L}$ ? Si es así, cual fue más exacto? Explique.
3. ¿Cuál pipeta y el volumen fue el más preciso? Explique.
4. ¿La precisión y exactitud variaron para la micropipeta de 1000  $\mu\text{L}$ , dependiendo del volumen tomado? Explique.
5. Liste al menos tres errores que los analistas pueden hacer al usar las micropipetas.

## 1.8. GUÍA No. 2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES EN ppm, ppb Y ppt

### 1.8.1. Objetivo

- Preparar soluciones a microescala en ppm, ppb y ppt.

### 1.8.2. Introducción

Una solución es una mezcla homogénea de por lo menos dos componentes: una fase dispersa, que es el *soluto* (sustancia que se disuelve), y una dispersora que constituye el *solvente* o disolvente (la sustancia que disuelve al soluto) y que, generalmente, se encuentra en mayor proporción. Las soluciones más utilizadas en bioquímica son las que tienen agua como solvente.

***Solución diluida:*** Es aquella que contiene solamente una pequeña cantidad de soluto en relación a la cantidad de disolventes.

***Solución concentrada:*** Es aquella que contiene una cantidad menor de soluto que la solución saturada pero con valores próximos a ella.

***Solución saturada:*** Es aquella que a una determinada temperatura, no admite más soluto.

***Solución sobresaturada:*** Es aquella que contiene mayor proporción de soluto que la saturada a la misma temperatura.

### 1.8.3. Materiales, reactivos y equipos

- Materiales

Puntas para micropipetas

Tubos de centrifuga de 1.5 mL

Gradillas para tubos de centrifuga

- Reactivos

Agua destilada

Cloruro de sodio (NaCl)

Glucosa

- Equipos  
Micropipetas de 0.5-10 mL, 100-1000  $\mu\text{L}$   
Balanza analítica

#### 1.8.4. Procedimiento

Preparación de soluciones en ppm, ppb y ppt de sólidos.

$$1 \mu\text{L}/\text{mL} = 1 \text{ mL}/\text{L}.$$

$$5 \mu\text{g}/\text{mL} = 5 \text{ mg}/\text{L} = 5 \text{ ppm. (Preparar con glucosa).}$$

$$13 \mu\text{g}/\text{mL} = 13 \text{ mg}/\text{L} = 13 \text{ ppm. (Preparar con cloruro de sodio).}$$

**Repaso de concentraciones en ppm, ppb y ppt.**

**Cambio de unidades solo con dividir entre 1000.**

Se divide entre 1000 cada una de estas unidades, se baja a una escala menor:

**g/1000 mg**  
**mg/1000  $\mu\text{g}$**   
 **$\mu\text{g}/1000 \text{ ng}$**   
**ng/1000 pg**

**Ahora revisar las siguientes concentraciones en ppm, ppb y ppt:**

$$1 \text{ mg se lleva a } 1 \text{ L} = 1 \text{ ppm} = 1 \text{ mg}/\text{L} = 1 \mu\text{g}/\text{mL} = 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

$$1 \mu\text{g se lleva a } 1 \text{ L} = 1 \text{ ppb} = 1 \mu\text{g}/\text{L} = 1 \text{ ng}/\text{mL}$$

$$1 \text{ ng se lleva a } 1 \text{ L} = 1 \text{ ppt} = 1 \text{ ng}/\text{L} = 1 \text{ pg}/\text{mL}$$

$$\text{Ejemplo: } 10 \text{ mg}/\text{L} = 10 \mu\text{g}/\text{mL} = 10 \text{ ng}/\mu\text{L} = 10 \text{ ppm}$$

Lo anterior quiere decir que al tomar 1  $\mu\text{L}$  de la solución se toma 10 ng de soluto.

Con base en lo anterior, realicemos el siguiente ejercicio:

Preparar  $13 \mu\text{g}/\text{mL} = 13 \text{ mg}/\text{L} = 13 \text{ ppm}$ , utilizando como soluto cloruro de sodio.

### Procedimiento:

Pesar en un tubo de centrífuga 13 mg de cloruro de sodio y llevarlo a 1 mL. De esta forma obtendrá una solución de  $13 \text{ mg/mL} = 13000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 13 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Solución A).

**Nota:** Pero se necesita  $13 \text{ } \mu\text{g/mL}$ . A partir de aquí (Solución A) se hace una dilución 1/1000. (Recuerde que  $1 \text{ mg} = 1000 \text{ } \mu\text{g}$ ). En este caso, tomar  $1 \text{ } \mu\text{L}$  de la solución de  $13 \text{ mg/mL}$  (estará tomando  $13 \text{ } \mu\text{g}$ ) y le agrega  $999 \text{ } \mu\text{L}$  de agua, lo cual dará  $13 \text{ } \mu\text{g/mL}$ .

Con la ecuación de dilución, verifique que obtuvo la concentración de  $13 \text{ } \mu\text{g/mL}$ :

$$V_i C_i = V_f C_f$$

Dónde:  $C_i = 13 \text{ mg/mL}$ ,  $V_i = 1 \text{ } \mu\text{L}$ ,  $V_f = 1000 \text{ } \mu\text{L}$ ,  $C_f = ?$

Calcular la concentración. Reemplace los valores.

$$V_i = [(13 \text{ mg/mL} * 1 \text{ } \mu\text{L}) / 1000 \text{ } \mu\text{L}] = 0.013 \text{ mg/mL.}$$

Pero como se necesita en  $13 \text{ } \mu\text{g/mL}$ , se hace la conversión.

$0,013 \text{ mg/mL} * 1000 \text{ } \mu\text{g}/1\text{mg}$ . Nos queda en  $13 \text{ } \mu\text{g/mL}$  que son 13 ppm.

Si queremos preparar ahora  $13 \text{ ng/mL}$  (ppb), hacemos el mismo procedimiento tomo  $1 \text{ } \mu\text{L}$  de la solución de  $13 \text{ } \mu\text{g/mL}$  y le agrego  $999 \text{ } \mu\text{L}$  de agua, lo cual me dará  $13 \text{ ng/mL}$ .

Nuevamente con la ecuación de dilución, verificamos que obtuvimos la concentración de  $13 \text{ ng/mL}$ :

$$V_i C_i = V_f C_f \text{ Donde, } C_i = 13 \text{ } \mu\text{g/mL}, V_i = 1 \text{ } \mu\text{L}, V_f = 1000 \text{ } \mu\text{L}, C_f = ?$$

Vamos a calcular la concentración. Reemplazamos y nos queda.

$$V_i = [(13 \text{ } \mu\text{g/mL} * 1 \text{ } \mu\text{L}) / 1000 \text{ } \mu\text{L}] = 0.013 \text{ } \mu\text{g/mL.}$$

Pero como se necesita en 13 ng/mL, hacemos la conversión.

$0,013 \mu\text{g/mL} * 1000 \text{ ng}/1\mu\text{g}$  Nos queda en 13 ng/mL que son 13 ppb.

De igual forma para preparar 5 ppm a partir de glucosa.

### **1.8.5. Referencias**

Douglas A. Skoog and Donald M. West. (1971). *Principles of instrumental analysis*. Holt, Rinehart and Winston, Inc.

Robert, JF., and White B.J. (1990). *Biochemical techniques theory and practice*. 1st edition. Waveland Press, Inc. USA.

Rodney F. Boyer. (1986). *Modern experimental biochemistry*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

Wilson, K., Walker, J. (2000). *Principles and techniques of practical biochemistry*. Fifth edition. Cambridge University Press.

### **1.8.6. Actividades**

1. Prepare una solución a 15 ppm, 15 ppb y 15 ppt de sacarosa y muestre los cálculos realizados.
2. Presente un informe relacionando lo que se hizo en la práctica de laboratorio.

# CAPÍTULO 2

## ÁCIDOS NUCLEICOS

*Karina Caballero Gallardo*

### CONTENIDO

<b>2.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>48</b>
<b>2.2. REFERENCIAS</b>	<b>52</b>
<b>2.3. GUÍA No. 3. OBTENCIÓN DE ARN A PARTIR DEL GORGOJO CASTAÑO DE LA HARINA (<i>Tribolium castaneum</i>)</b>	<b>53</b>
2.3.1. Objetivo	53
2.3.2. Introducción	53
2.3.3. Materiales, reactivos y equipos	54
2.3.4. Procedimiento	55
2.3.5. Referencias	57
2.3.6. Videos sugeridos	57
2.3.7. Actividades	57
<b>2.4. GUÍA No. 4. OBTENCIÓN DE ARN A PARTIR DE TEJIDO HEPÁTICO DE RATÓN (<i>Mus musculus</i>)</b>	<b>58</b>
2.4.1. Objetivo	58
2.4.2. Introducción	58
2.4.3. Materiales, reactivos y equipos	58
2.4.4. Procedimiento	59
2.4.5. Referencias	61
2.4.6. Videos sugeridos	61
2.4.7. Actividades	62

<b>2.5. GUÍA No. 5. EXTRACCIÓN DE ADN</b>	<b>63</b>
2.5.1. Objetivo	63
2.5.2. Introducción	63
2.5.3. Materiales, reactivos y equipos	63
2.5.4. Procedimiento	64
2.5.5. Referencias	65
2.5.6. Actividades	66
<b>2.6. GUÍA No. 6. CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO NUCLEICO (ADN Y ARN)</b>	<b>67</b>
2.6.1. Objetivo	67
2.6.2. Introducción	67
2.6.3. Materiales, reactivos y equipos	67
2.6.4. Procedimiento	68
2.6.5. Referencias	70
2.6.6. Videos sugeridos	70
2.6.7. Actividades	71
<b>2.7. GUÍA No. 7. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1%</b>	<b>72</b>
2.7.1. Objetivos	72
2.7.2. Introducción	72
2.7.3. Materiales, reactivos y equipos	72
2.7.4. Procedimiento	73
2.7.5. Referencias	75
2.7.6. Videos sugeridos	76
2.7.7. Actividades	77

## **FIGURAS**

Figura 2.1. Adenosina trifosfato (ATP)	48
Figura 2.2. Bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos	49
Figura 2.3. Azúcares constitutivos del ARN y del ADN	50
Figura 2.4. Nucleósidos	50
Figura 2.5. Parte de una molécula de ARN	51
Figura 2.6. Abreviación de secuencia de bases de un ácido nucleico	51
Figura 2.7. Apareamiento de bases a través de enlaces de hidrógeno como ocurre en el ADN	51
Figura 2.8. Comparación de lecturas de ácidos nucleicos en un espectrofotómetro UV-VIS en comparación con contaminantes comunes por el uso de columnas de extracción	69

## **TABLAS**

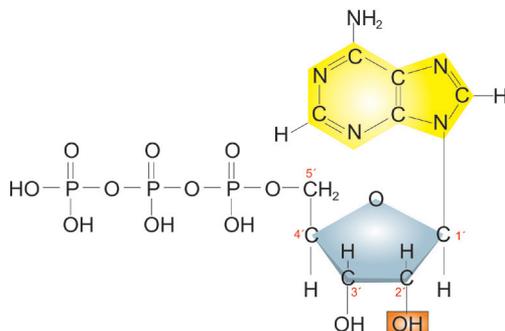
Tabla 2.1. Denominación de las bases nitrogenadas	51
Tabla 2.2. Concentración del gel requerida para separación de ADN	73
Tabla 2.3. Volúmenes requeridos para el gel	74

## 2.1. INTRODUCCIÓN

Los ácidos nucleicos son macromoléculas construidas con series largas (cadenas) de monómeros llamados nucleótidos. Ellos funcionan en el almacenamiento y transmisión de información genética, aunque también algunas moléculas de ARN tienen propiedades catalizadoras en complejos supramoleculares.

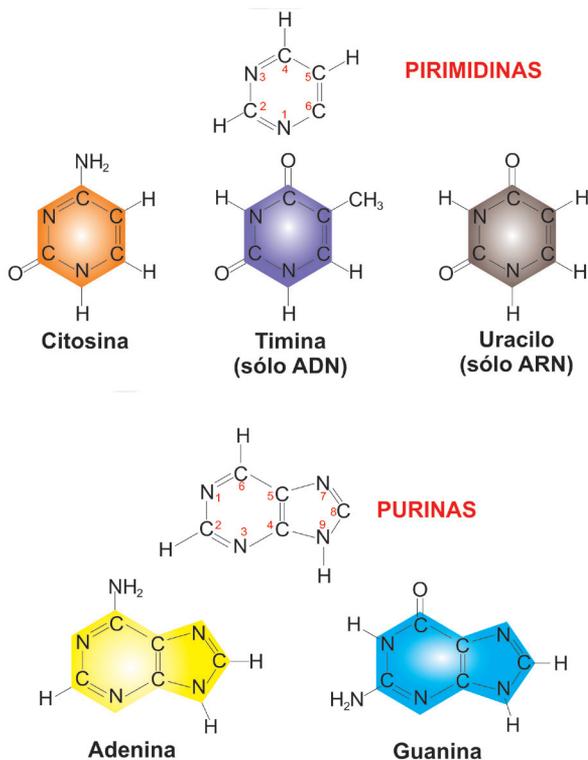
En los organismos vivos pueden ser encontrados dos tipos de ácidos nucleicos, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). La hidrólisis controlada de estos produce nucleótidos, que son las unidades básicas de los ácidos nucleicos, en la misma forma que los aminoácidos para las proteínas. Si la hidrólisis continúa, los nucleótidos dan lugar a nucleósidos y finalmente fosfatos, azúcares y bases purínicas y piridínicas. El ARN tiene una composición similar, excepto que contiene azúcar ribosa en lugar de desoxirribosa y uracilo en lugar de timina.

Los nucleótidos no solo son importantes como bloques de construcción de ácidos nucleicos, también tienen funciones importantes por sí mismos. La mayor parte de la energía que utiliza un organismo vivo en cualquier momento determinado proviene del nucleótido Adenosina trifosfato, también llamada adenosín-5'-trifosfato o trifosfato de adenosina (ATP) (**Figura 2.1**). El trifosfato de guanosina (GTP) es otro nucleótido de enorme importancia en las actividades celulares. El GTP se une con diversas proteínas (llamadas proteínas G) y actúa como interruptor para iniciar sus actividades.



**Figura 2.1.** Adenosina trifosfato (ATP) (Karp, 2011).

Las fórmulas de las principales bases nitrogenadas presentes en el ADN y ARN son mostradas en la **Figura 2.2**. Las pirimidinas son moléculas, más pequeñas, consistentes en un solo anillo; las purinas son más grandes y tienen dos anillos. El ARN contiene dos purinas distintas: adenina y guanina, y dos pirimidinas, citosina y uracilo. En el ADN, el uracilo se sustituye por timina, una pirimidina con el grupo metilo adicional unido al anillo.

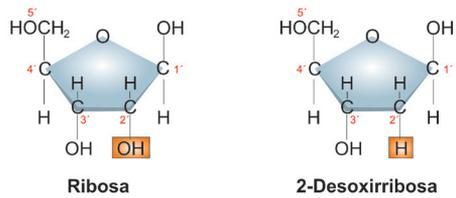


**Figura 2.2.** Bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos.

## Pentosas

Los dos grupos principales de ácidos nucleicos derivan su nombre del azúcar que poseen, el cual puede ser ribosa o desoxirribosa (**Figura 2.3**).

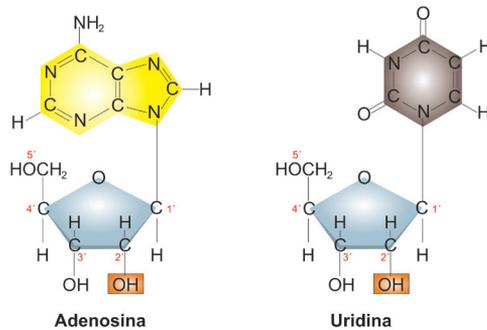
Los átomos de carbono de los azúcares se designan como 1', 2' entre otros, para diferenciarlos de las demás bases.



**Figura 2.3.** Azúcares constitutivos del ARN y del ADN (Karp, 2011).

## Nucleósidos

El C<sub>1</sub> de los azúcares se une al nitrógeno en la posición 9 de las purinas o en la posición 1 de las pirimidinas para formar el nucleósido (**Figura 2.4**). La mayoría de los enlaces entre azúcar y la base se hacen de esta forma. Sin embargo, el ARN de transferencia contiene un nucleósido poco usual, la pseudouridina, en la que el C<sub>1</sub> de la ribosa está unido a la posición 5 del uracilo.



**Figura 2.4.** Nucleósidos (Karp, 2011).

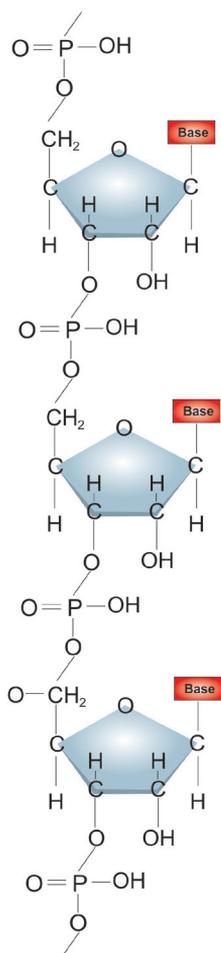
## Nucleótidos

Los grupos hidroxilo en posición 2', 3' y 5' de la ribosa pueden esterificarse con ácido fosfórico dando una variedad conocida de ésteres. De forma similar la desoxirribosa puede esterificarse en las posiciones 3' y 5', dando también ésteres que se encuentran en la naturaleza.

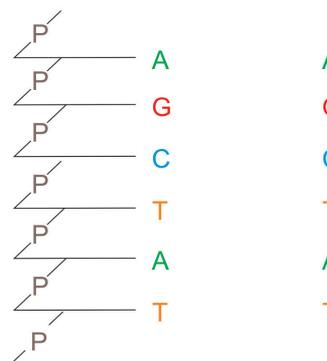
Los nucleótidos se nombran de acuerdo con las bases que se encuentran presentes en su estructura, como es presentado en la **Tabla 2.1**.

**Tabla 2.1.** Denominación de las bases nitrogenadas.

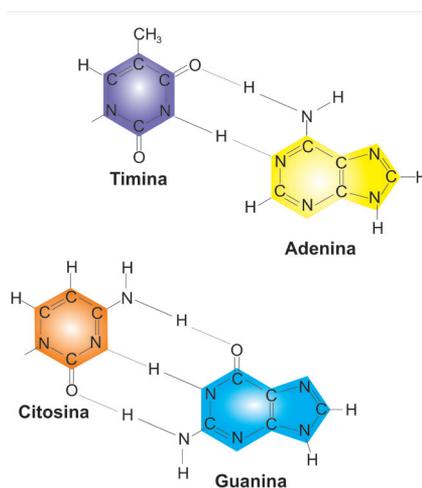
Base	Nucleósido	Nucleótido
Adenina	Adenosina	Ácido adenílico
Guanina	Guanosina	Ácido guanílico
Uracilo	Uridina	Ácido uridílico
Citosina	Citidina	Ácido citidílico
Timina	Timidina	Ácido timidílico



**Figura 2.5.** Parte de una molécula de ARN (Karp, 2011).



**Figura 2.6.** Abreviación de secuencia de bases de un ácido nucleico (Karp, 2011).



**Figura 2.7.** Apareamiento de bases a través de enlaces de hidrógeno como ocurre en el ADN (Karp, 2011).

Los ácidos nucleicos son macromoléculas en las que los nucleótidos están unidos por enlaces fosfodiéster entre las posiciones 3' y 5' de los azúcares. Una posición de la molécula de ARN tendrá, por lo tanto, la estructura que aparece en la **Figura 2.5**, en la cual la base puede ser una purina o una pirimidina.

La mayoría de los ácidos nucleicos son moléculas muy grandes, por lo que representar la fórmula completa sería complejo. Sin embargo, una forma de hacerlo es abreviando la estructura de las bases presentes usando la primera letra de su nombre. La secuencia de las bases es supremamente importante, de modo que un ácido puede representarse indicando en su orden la primera letra de las bases que lo forman (**Figura 2.6**).

Por su parte, el ADN está constituido por dos cadenas de polinucleótidos entrelazadas en forma de espiral y estabilizadas mediante enlaces de hidrógeno entre determinadas pares de bases. La estereoquímica de las bases es tal que la adenina se aparea con la timina y la guanina con la citosina (**Figura 2.7**). Este aspecto de la estructura del ADN fue propuesto por Watson y Crick en 1953 basados en los datos de la cristalografía de Rayos X obtenidos por Wilkins.

## 2.2. REFERENCIAS

- Wade, L.G., Pedrero, Á.M. (2012). *Química orgánica* (No. QD251. 2. W32 2004.). Pearson Educación.
- Karp, G. (2011). *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos (6a.* McGraw Hill Mexico.
- Stryer, L., Tymoczko, J.L., Berg, J.M., Gatto, G.J. (2013). *Bioquímica con aplicaciones clínicas*. Reverté.
- Egli, M., Saenger, W. (2013). *Principles of nucleic acid structure*. Springer Science and Business Media.
- Chargaff, E. (Ed.). (2012). *The nucleic acids*. Elsevier.
- Ts'o, P.O. (Ed.). (2012). *Basic principles in nucleic acid chemistry* (Vol. 2). Elsevier.

## GUÍAS DE LABORATORIO

### CAPÍTULO 2

#### 2.3. GUÍA No. 3. OBTENCIÓN DE ARN A PARTIR DEL GORGOJO CASTAÑO DE LA HARINA (*Tribolium castaneum*)

##### 2.3.1. Objetivo

- Extraer ARN a partir de adultos de *T. castaneum*.
- Aprender la forma de conservación y almacenamiento del ARN extraído.

##### 2.3.2. Introducción

Encontrar el método más apropiado de disrupción de células o tejidos dependiendo de donde haya sido aislada la muestra es importante para maximizar el rendimiento y la calidad de la preparación del ARN. Durante la disrupción de la muestra para el aislamiento del ARN, es crucial que el agente lítico o desnaturalizante esté en contacto con el contenido celular en el momento en que las células son lisadas. Esto puede ser problemático cuando los tejidos o células son duros (por ejemplo, hueso, raíces), cuando contienen cápsulas o paredes (por ejemplo, levadura, bacterias grampositivas, esporas), cuando los flujos de trabajo evitan el procesamiento inmediatamente después de la recolección. Una solución común a estos problemas es congelar el tejido/células en nitrógeno líquido o en hielo seco. Las muestras congeladas son a menudo preprocesadas para seleccionar una masa deseada o para pulverizar parcialmente la muestra antes de la exposición al desnaturalizante. Mientras que esta congelación y preprocesamiento permite al investigador más control sobre las condiciones de purificación.

Las soluciones de estabilización de ARN proporcionan más flexibilidad y tiempo para permitir al investigador posponer el aislamiento de ARN durante días, semanas o incluso meses después de la recolección de tejidos, sin sacrificar la integridad del ARN. El tejido disecado, los fluidos corporales o las células recogidas se introducen simplemente en la solución de estabilización a temperatura ambiente por 30 minutos o se pueden dejar toda la noche. Las muestras se almacenan a -80 °C.

Existen varias tecnologías de preparación de ARN que pueden clasificarse en cuatro técnicas generales: métodos de extracción orgánica, métodos por centrifugación en

columnas, métodos de partículas magnéticas y métodos de lisis directa. Mientras que todos pueden ser utilizados para preparar ARN de alta calidad adecuado para una amplia variedad de técnicas de análisis, hay varios factores a considerar en la selección de la tecnología de purificación correcta. Esta guía ha sido realizada con base en el método de extracción por columnas. Estos utilizan membranas (usualmente fibra de vidrio, sílice derivada o membranas de intercambio iónico) que se colocan en el fondo de la columna de plástico. Las muestras se lisan en un tampón que contiene inhibidores de RNasa (usualmente sales de guanidina) y los ácidos nucleicos se unen a la membrana pasando el lisado a través de la membrana usando la fuerza centrífuga. Las soluciones de lavado se pasan a continuación a través de la membrana y se descartan. Se aplica una solución de elución apropiada y la muestra se recoge en un tubo por centrifugación.

### **2.3.3. Materiales, reactivos y equipos**

- **Materiales**

Puntas libre de RNasas

Tubos de centrifuga de 1.5 mL libre de RNasas

- **Reactivos**

Buffer RLT (buffer de lavado que contiene tiocianato de guanidina)

Buffer RW1 (buffer de lavado que contiene etanol)

Buffer RPE (buffer de lavado concentrado, debe ser adicionado etanol de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial)

Agua libre de RNasas

- **Equipos**

Micropipeta

Disruptor de tejido

Cronómetro

Centrífuga refrigerada

Vórtex

Minicentrífuga

### 2.3.4. Procedimiento

Cuando se trabaja con ARN es muy importante hacerlo en un ambiente que esté libre de RNasas. Algunas recomendaciones para tener en cuenta es que se deben usar micropipetas reservadas sólo para procedimientos de ARN y limpiar el área de trabajo antes de comenzar la extracción de ARN.

Nota: Todos los pasos de centrifugación para la extracción de ARN deben ser realizados en una centrífuga refrigerada y las muestras deben estar sobre geles refrigerantes.

**Paso 1.** Colocar en un tubo de centrífuga de 1.5 mL una muestra de insectos adultos de *T. castaneum* (4-10 insectos).

**Paso 2.** Adicionar inmediatamente 600 µL del buffer de lisis al tubo de centrífuga que contiene los insectos. El buffer contiene tiocianato de guanidina que inactiva las RNasas, lo que evita la degradación del ARN.

**Paso 3.** Lisar y homogeneizar los insectos con un disruptor de tejidos durante 4 minutos.

**Paso 4.** Cuando las células estén suficientemente homogeneizadas, centrifugar a 13.000 rpm por 3 minutos.

**Paso 5.** Retirar el sobrenadante con una micropipeta (aproximadamente 500 µL) sin tomar el pellet y colocar este en un tubo de centrífuga libre de RNasas.

**Paso 6.** Adicionar 500 µL de etanol al 70% (este debe estar almacenado previamente a -20 °C) y mezcle por inversión. El etanol proporciona a la solución unas condiciones físico-químicas que favorecen la unión del ARN a la membrana de extracción, mientras que el resto de los componentes celulares permanecen en disolución.

**Paso 7.** Trasferir 700 µL del lisado (sobrenadante + etanol) a través de una columna de extracción mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 30 segundos. Descartar el filtrado y reutilice el tubo colector de la columna de extracción. Con este proceso, el ARN permanecerá unido a la columna, y el resto de componentes celulares se eliminarán en el filtrado.

**Paso 8.** Adicionar 500 µL de buffer de lavado (RW1), centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos. Descartar el sobrenadante y reutilice el tubo colector de la columna de extracción.

**Paso 9.** Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado (RPE), centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos. Descartar el filtrado y reutilice el tubo colector de la columna de extracción.

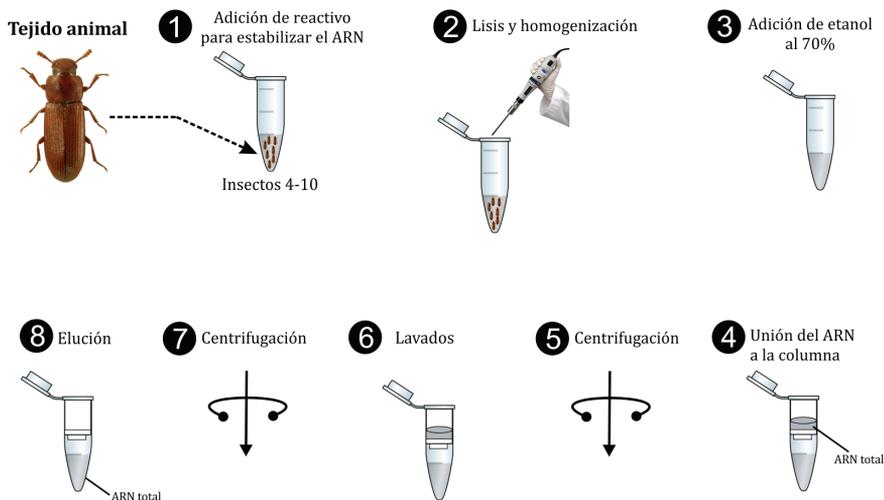
**Paso 10.** Nuevamente, adicionar 500  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado (RPE), centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos. Descartar el filtrado y reutilice el tubo colector de la columna de extracción.

**Paso 11.** Colocar la columna en un tubo colector limpio y centrifugar a 13.000 rpm por 1 minutos. Esto con el fin de eliminar restos de los buffers de lavado.

**Paso 12.** Finalmente, el ARN es eluido de la columna utilizando agua libre de RNasas. Para esto la columna se coloca en un tubo de centrifuga limpio y libre de RNasas. Luego se adicionan 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasa, se espera 1 minuto y se centrifuga a 13.000 rpm durante 1 minuto. En presencia de agua, el ARN se desprende de la membrana de sílice y pasa a solución acuosa, que será recuperada en el tubo de centrifuga tras una centrifugación.

**Paso 13.** En caso que se requiera una concentración mayor de ARN pase nuevamente el ARN eluido por la columna y centrifugue a 13.000 rpm durante 1 minuto.

A continuación se muestra un resumen del procedimiento detallado para la extracción de ARN a partir de insectos adultos de *T. castaneum*.

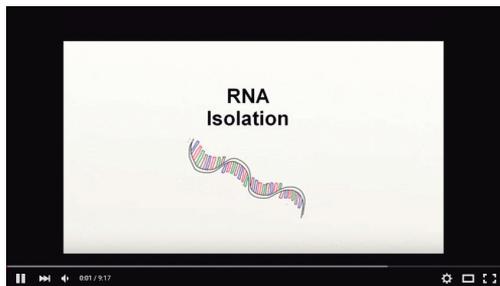


### 2.3.5. Referencias

QIAGEN. <http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Sample-Technologies/ARN-Sample-Technologies/Total-ARN/RNeasy-Mini-Kit#resources>

### 2.3.6. Videos sugeridos

RNA Extraction Tutorial



Enlace: <https://www.youtube.com/watch?v=MgNicWbANkA&spfreload=10>

Publicado por: Chang Benson. Enero 3 de 2015.

### 2.3.7. Actividades

Presentar informe de laboratorio y responder las siguientes preguntas:

1. ¿Qué precauciones tomaría para evitar contaminaciones o degradación del ARN?
2. ¿Cuales buffer de lisis pueden ser utilizados para extraer ARN de tejidos?
3. ¿Por que debe ser realizada una electroforesis en agarosa a las muestras de ARN extraídas?

## 2.4. GUÍA No. 4. OBTENCIÓN DE ARN A PARTIR DE TEJIDO HEPÁTICO DE RATÓN (*Mus musculus*)

### 2.4.1. Objetivo

- Extraer ARN de alta calidad a partir de una muestra de hígado de ratón (*Mus musculus*).
- Conocer como debe ser almacenado el ARN extraído.

### 2.4.2. Introducción

En varios procedimientos de biología molecular se requiere ARN de alta calidad. Una muestra degradada o con la presencia de impurezas puede conducir resultados erróneos. Por lo tanto, es de suma importancia el uso de técnicas sólidas con controles de calidad para asegurar una muestra óptima. En esta guía es detallado un protocolo para aislar el ARN total a partir de hígado de ratón usando un producto comercial para aislamiento de ARN para eliminar trazas de ADN e impurezas. Dado que el ARN es relativamente inestable y fácilmente predisposto a la escisión por ribonucleasas (RNasas), la mayoría de los protocolos de expresión génica utilizan un producto más estable (ácido desoxirribonucleico copia, ADNc), el cual se sintetiza directamente a partir de una plantilla de ARN. Cuando se trabaja con ARN es muy importante que se realice en un ambiente libre de RNasas. Precauciones sencillas tales como haber reservado pipetas para usar sólo con procedimientos de ARN y limpiar el área de trabajo con un reactivo descontaminante antes de comenzar el procedimiento son muy útiles para garantizar la obtención de ARN.

### 2.4.3. Materiales, reactivos y equipos

- Materiales

Puntas libre de ARNsas

Tubos de centrifuga libre de ARNsas

- Reactivos

Buffer RLT (buffer de lavado que contiene tiocianato de guanidina)

Buffer RW1 (buffer de lavado que contiene etanol)

Buffer RPE (buffer de lavado concentrado, debe ser adicionado etanol de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial)

Agua libre de RNasas

- Equipos
- Micropipeta  
Disruptor de tejido  
Cronómetro  
Centrífuga refrigerada  
Vórtex  
Minicentrífuga

#### 2.4.4. Procedimiento

Cuando se trabaja con ARN es muy importante hacerlo en un ambiente que esté libre de RNAsas. Algunas recomendaciones para tener en cuenta es que se deben usar micropipetas reservadas para usar sólo con procedimientos de ARN y limpiar el área de trabajo antes de comenzar la extracción de ARN.

Nota: Todos los pasos de centrifugación para la extracción de ARN deben ser realizados en una centrífuga refrigerada y las muestras deben estar sobre geles refrigerantes.

**Paso 1.** Colocar en un tubo de centrífuga de 1.5 mL una muestra de tejido hepático de *Mus musculus* (30 mg).

**Paso 2.** Adicionar inmediatamente 600  $\mu$ L del buffer de lisis al tubo de centrífuga que contiene la muestra de tejido hepático. El buffer contiene tiocianato de guanidina que inactiva inmediatamente las RNAsas, lo que evita la degradación del ARN.

**Paso 3.** Lisar y homogeneizar el tejido hepático con un disruptor de tejidos durante 3 minutos.

**Paso 4.** Cuando las células estén suficientemente homogeneizadas, centrifugar a 13.000 rpm por 3 minutos.

**Paso 5.** Retirar el sobrenadante con una micropipeta (aproximadamente 500  $\mu$ L) sin tomar el pellet y colocar este en un tubo de centrífuga libre de RNAsas.

**Paso 6.** Adicionar 500  $\mu$ L de etanol al 70% (este debe estar almacenado previamente a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) y mezcle por inversión. El etanol proporciona a la solución

unas condiciones físico-químicas que favorecen la unión del ARN a la membrana de extracción, mientras que el resto de los componentes celulares permanecen en disolución.

**Paso 7.** Trasferir 700  $\mu\text{L}$  del lisado (sobrenadante + etanol) a través de una columna de extracción mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 30 segundos. Descartar el sobrenadante y reutilice el tubo colector de la columna de extracción. Con este proceso, el ARN permanecerá unido a la columna, y el resto de componentes celulares se eliminarán en el filtrado.

**Paso 8.** Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado (RW1), centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos. Descartar el filtrado y reutilice el tubo colector de la columna de extracción.

**Paso 9.** Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado (RPE), centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos. Descartar el filtrado y reutilice el tubo colector de la columna de extracción.

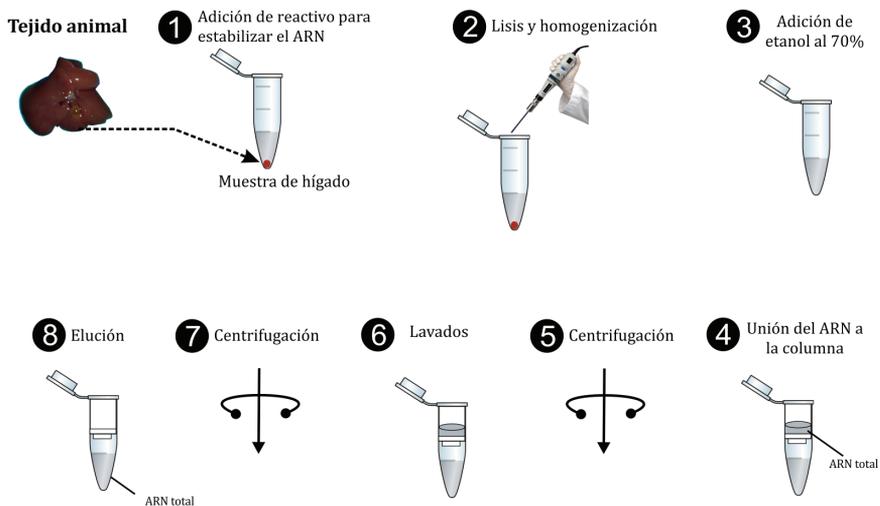
**Paso 10.** Nuevamente, adicionar 500  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado (RPE), centrifugar a 10.000 rpm durante 30 segundos. Descartar el filtrado y reutilice el tubo colector de la columna de extracción.

**Paso 11.** Colocar la columna en un tubo colector limpio y centrifugar a 13.000 rpm por 1 minutos. Esto con el fin de eliminar restos de buffer de lavado.

**Paso 12.** Finalmente, el ARN es eluido de la columna utilizando agua libre de RNasas. Para esto la columna se coloca en un tubo de centrífuga limpio y libre de RNasas. Luego se adicionan 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasa, se espera 1 minuto y se centrifuga a 13.000 rpm durante 1 minuto. En presencia de agua, el ARN se desprende de la membrana de sílice y pasa a solución acuosa, que será recuperada en el tubo de centrífuga tras una centrifugación.

**Paso 13.** En caso que se requiera una concentración mayor de ARN pase nuevamente el ARN eluido por la columna y centrifugue a 13.000 rpm durante 1 minuto.

A continuación se muestra un resumen del procedimiento detallado para la extracción de ARN a partir de tejido hepático de *Mus musculus*.

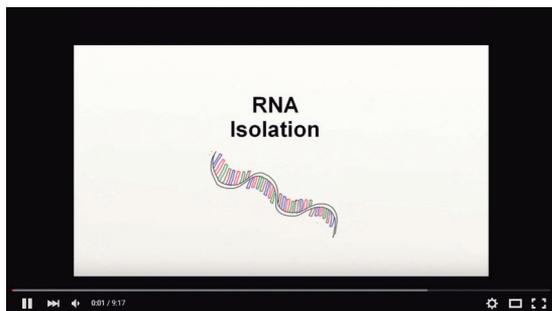


### 2.4.5. Referencias

QIAGEN. <http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Sample-Technologies/ARN-Sample-Technologies/Total-ARN/RNeasy-Mini-Kit#resources>

### 2.4.6. Videos sugeridos

RNA Extraction Tutorial



Enlace: <https://www.youtube.com/watch?v=MgNicWbANkA&spfreload=10>

Publicado por: Chang Benson. Enero 3 de 2015

### **2.4.7. Actividades**

Presentar informe de laboratorio y responder las siguientes preguntas:

1. ¿Qué precauciones tomaría para evitar contaminaciones o degradación del ARN?
2. ¿Cuales buffer de lisis pueden ser utilizados para extraer ARN de tejidos?
3. ¿Por que debe ser realizada una electroforesis en agarosa a las muestras de ARN extraídas?

## 2.5. GUÍA No. 5. EXTRACCIÓN DE ADN

### 2.5.1. Objetivo

- Extraer ADN de bacterias a partir de cultivo en cajas de Petri.

### 2.5.2. Introducción

Todos los seres vivos están formados de células. Estas son la unidad básica de la vida, sus tres partes principales son el núcleo (contiene el ADN), la membrana celular (rodea y protege la célula) y el citoplasma. El ADN se encuentra en casi todos los organismos vivos. Estos pueden ser tan simples como una bacteria unicelular o tan complejo como un ser humano multicelular.

El proceso de extracción de ADN es un procedimiento bioquímico bastante simple que se puede dividir en tres etapas principales: romper la célula (lisis), destruir las membranas dentro de la célula y precipitar el ADN.

### 2.5.3. Materiales, reactivos y equipos

- Materiales

Puntas para micropipetas  
Tubos de centrífuga

- Reactivos

BBuffer AL (buffer de lisis que contiene hidrocloreuro de guanidina)  
Buffer ATL  
Buffer AW1 (buffer de lavado concentrado). Adicionar etanol (96-100%) de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial  
Buffer AW2 (buffer de lavado concentrado). Adicionar etanol (96-100%) de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial  
Buffer AE (buffer de elución)  
Solución de Proteinasa K.

- Equipos

Baño serológico o termociclador  
Vórtex  
Minicentrífuga  
Centrífuga

### *Recomendaciones*

- Todos los pasos de centrifugación se llevan a cabo a temperatura ambiente (15-25 °C).
- Disponer de placas o baños de agua caliente: a 56 °C y a 70 °C.

#### **2.5.4. Procedimiento**

**Paso 1.** Remover las bacterias del cultivo en caja de Petri con un asa de siembra y suspender en 180 µL de buffer ATL mezclar mediante vórtex vigoroso.

**Paso 2.** Adicionar 20 µL proteinasa K, mezclar en vórtex e incubar a 56 °C, durante 3 horas hasta completar la lisis. Realizar un vórtex ocasionalmente cada 30 minutos durante el periodo de incubación para dispersar la muestra o colocar en un baño termostático con agitación.

**Paso 3.** Centrifugar durante 30 segundos a 13.000 rpm.

**Paso 4.** Adicionar 200 µL de buffer AL a la muestra, mezclar por vórtex durante 15 segundos e incubar a 70 °C por 10 min. centrifugar por 30 segundos a 13.000 rpm para remover las gotas del interior de la tapa del tubo de centrifuga.

**Paso 5.** Adicionar 200 µL de etanol (96-100%) a la muestra, mezclar por inversión durante 15 segundos. Después de mezclar, centrifugar durante 30 segundos a 13.000 rpm para remover las gotas del interior de la tapa del tubo de centrifuga.

**Paso 6.** Transferir cuidadosamente la mezcla del paso 5 (incluyendo el precipitado) a una columna de extracción con tubo colector. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto. Descartar el tubo que contiene el líquido filtrado y colocar la columna a un nuevo tubo colector.

**Paso 7.** Adicionar 500 µL del buffer AW1 y centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto. Transferir la columna a un nuevo tubo de centrifuga (descarte el filtrado y reutilice el tubo colector).

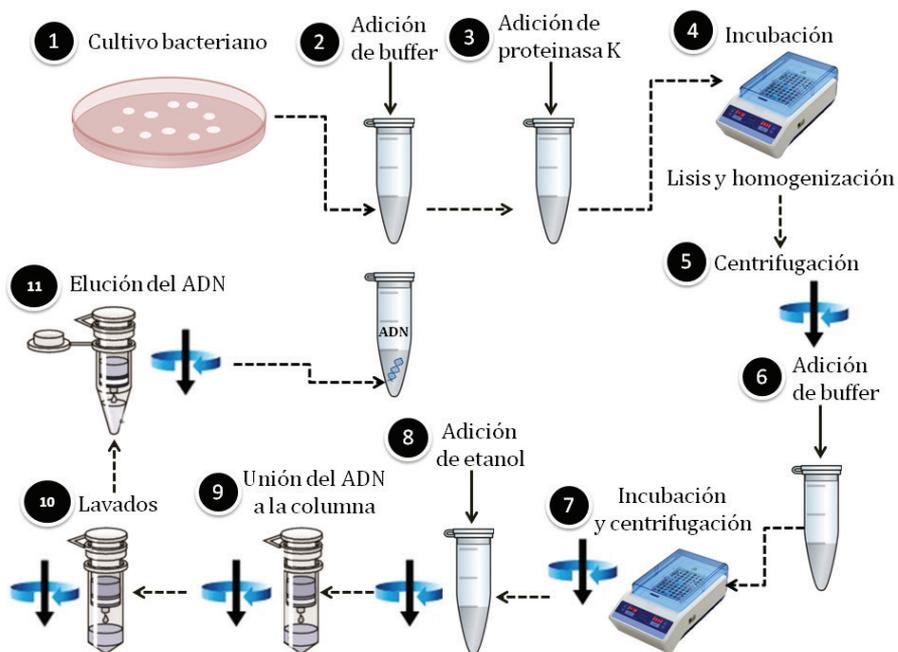
**Paso 8.** Adicionar 500 µL buffer AW2 a la columna de extracción y centrifugar a 14.000 rpm por 3 minutos.

**Paso 9.** Colocar la columna en un nuevo tubo colector. Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto con el objeto de eliminar los posibles restos de buffer AW2. Descartar el tubo colector que contiene el líquido filtrado.

**Paso 10.** Transferir la columna a un tubo de centrifuga estéril y adicionar 50  $\mu$ L de buffer AE. Incubar a temperatura ambiente durante un minuto y centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.

**Paso 11.** Descartar la columna y almacenar el ADN extraído a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización en otros ensayos.

A continuación es presentado un resumen del procedimiento para la extracción de ADN a partir de bacterias cultivadas en cajas de Petri.



### 2.5.5. Referencias

Protocolo Qiagen: [http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/QIAGEN\\_protocol.pdf](http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/QIAGEN_protocol.pdf)

### 2.5.6. Actividades

Presentar informe de laboratorio y responder las siguientes preguntas:

1. La separación del ADN de los componentes celulares puede ser dividida en cuatro etapas principales. ¿Diga cuáles son?
2. Enumere y explique los diferentes métodos de extracción de ADN detallando el fundamento de tres de estas.
3. Haga una lista de las diferentes muestras o tejidos de donde se puede aislar ADN.
4. Detalle cuál debe ser el correcto manejo del ADN una vez extraído.

## 2.6. GUÍA No. 6. CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO NUCLEICO (ADN Y ARN)

### 2.6.1 Objetivo

- Determinar la concentración de ADN o ARN extraído mediante espectrofotometría UV-VIS.

### 2.6.2. Introducción

El método tradicional para evaluar la concentración de ARN y la pureza es la espectroscopia UV. Las soluciones de ácidos nucleicos absorben fuertemente la luz ultravioleta a una longitud de onda de 260 nm. La absorción intensa se debe principalmente a la presencia de anillos aromáticos en las bases de purina y pirimidina. El ADN puro con poca o ninguna proteína presente tiene una relación de absorbancia de aproximadamente 1,8. Al evaluar la calidad y la cantidad de ARN, hay algunos puntos claves para centrarse y es asegúrese de que la relación A260/A280 este entre 1,8 y 2,0. Una proporción por debajo de 1,8 puede indicar contaminación por proteínas, lo que puede disminuir la eficiencia de la reacción en los ensayos posteriores. La concentración de ácido nucleico se calcula utilizando la ley de Beer-Lambert, que predice un cambio lineal en la absorbancia con la concentración.

### 2.6.3. Materiales, reactivos y equipos

- Materiales  
Puntas para micropipetas  
Guantes  
Gorros  
Tapabocas
- Reactivos  
Muestra de ARN o ADN
- Equipos  
Micropipetas  
Espectrofotómetro UV-VIS  
Vórtex  
Minicentrífuga

#### 2.6.4. Procedimiento

**Paso 1.** Limpiar las superficies ópticas superiores e inferiores del sistema de espectrofotómetro con agua libre de RNAsas en la superficie óptica inferior.

**Paso 2.** Cierre el brazo de palanca, asegurando que el pedestal superior entra en contacto con el agua libre de RNAsas. Levante el brazo de palanca y limpie las superficies ópticas con un paño limpio, seco y sin pelusa (pañó de laboratorio), puede ser usado papel de arroz.

**Paso 3.** Abra el software del espectrofotómetro y seleccione la aplicación de ácidos nucleicos. Utilice un pequeño volumen de agua libre de RNAsas con una pipeta calibrada para realizar una medición de blanco sobre la superficie óptica inferior. Baje el brazo de palanca y seleccione "blanco" en la aplicación de ácido nucleico.

**Paso 4.** Una vez que la medición del blanco ha sido completada, limpie las superficies ópticas con un paño de laboratorio.

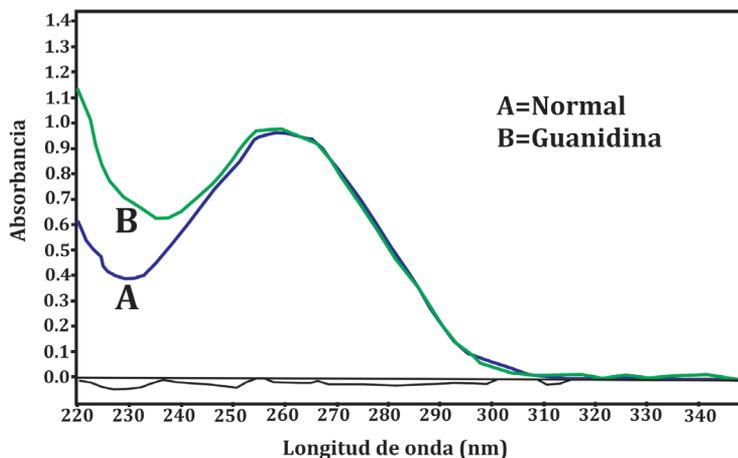
**Paso 5.** Elegir la constante apropiada para la muestra que se va a medir como se muestra en la siguiente Tabla.

Tipo de muestra	Seleccione la opción	Constante que se utiliza para calcular la concentración
ARN	ARN	40
ADN	ADN	50

**Paso 6.** Colocar 1  $\mu\text{L}$  con una pipeta calibrada de una muestra de ácido nucleico (ARN y ADN) en el pedestal óptico inferior y estrechar el brazo de palanca.

**Paso 7.** Seleccione "medida" en el software de aplicación. El software calcula automáticamente el ácido nucleico coeficientes de concentración y la pureza. Después de la medición de la muestra, revisar el espectro de salida para evaluar la calidad de la muestra.

**Paso 8.** Un ejemplo típico de ácidos nucleicos tendrá un perfil muy característico. Las fuentes comunes de contaminantes asociados a las técnicas específicas de aislamiento de ácidos nucleicos, en este caso extracción en columna. La guanidina residual de la extracción de la columna puede contribuir a un pico cercano a 230 nm y un cambio de 230 nm a 240 nm aproximadamente (**Figura 2.8**).



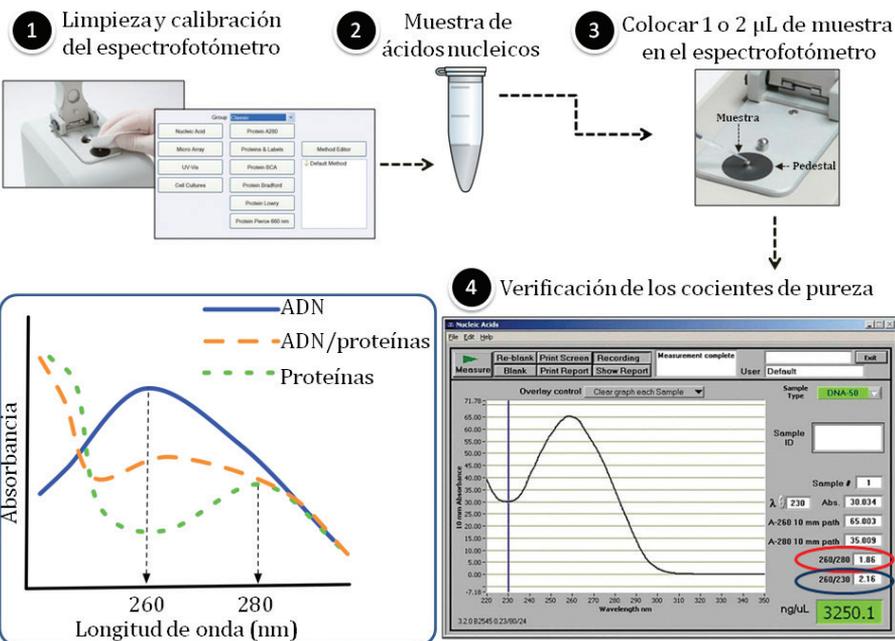
**Figura 2.8.** Comparación de lecturas de ácidos nucleicos en un espectrofotómetro UV-VIS en comparación con contaminantes comunes por el uso de columnas de extracción.

**Paso 9.** Las relaciones  $A_{260}/A_{280}$  o  $A_{260}/A_{230}$  deben ser tenidas en cuenta para evaluar la pureza de la muestra. Los ácidos nucleicos generalmente tienen una proporción  $A_{260}/A_{280}$  de  $\sim 1.8$  y  $\sim 2.0$  para el ADN y ARN, respectivamente. La relación  $A_{260}/A_{230}$  es una segunda medida de la pureza del ADN y ARN con un rango de 2.0-2.2. Una disminución en estas relaciones puede ser indicativo de contaminación.

**Paso 10.** Realizar las mediciones de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) por duplicados y sacar el promedio de estas.

**Paso 11.** Una vez extraído y cuantificado el ácido nucleico (ADN y ARN) almacenar a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El ARN es poco estable por lo que se recomienda su uso para otros ensayos de manera inmediata (ejemplo: síntesis de ADNc, el cual puede almacenarse por más tiempo hasta la realización de otros ensayos como PCR en tiempo real).

A continuación es presentado un resumen del procedimiento para la cuantificación de ácidos nucleicos.

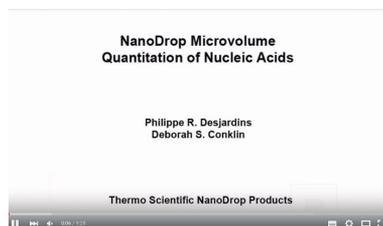


## 2.6.5. Referencias

[http://memphys.dk/sites/default/files/files/basic\\_page/%3Cem%3Eedit%20Basic%20page%3Cem%3E%20UV-Vis%20spectroscopy/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf](http://memphys.dk/sites/default/files/files/basic_page/%3Cem%3Eedit%20Basic%20page%3Cem%3E%20UV-Vis%20spectroscopy/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf)

## 2.6.6. Videos sugeridos

NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids



Enlace: <https://www.youtube.com/watch?v=FiGZnNs2xXY&spfreload=10>

Publicado por: Nanodrop Products. Junio 15 de 2012.

### **2.6.7. Actividades**

Presentar informe de laboratorio y responder el siguiente cuestionario.

1. ¿Cómo determina si una muestra de ADN y ARN esta pura?
2. ¿De qué manera usted puede determinar si una muestra de ADN y ARN está contaminada?

## 2.7. GUÍA No. 7. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1%

### 2.7.1. Objetivos

- Separar y visualizar el tamaño del ARN o ADN en un gel de agarosa empleando electroforesis horizontal.
- Verificar la integridad del ARN o ADN extraídos en un gel de agarosa empleando electroforesis.

### 2.7.2. Introducción

La agarosa es un polisacárido aislado de algas marinas. Se utiliza en el laboratorio como soporte de matriz para geles en electroforesis. Se puede verter en un molde y endurecerá a un gel la consistencia de una gelatina suave o dura dependiendo de la cantidad de agarosa utilizada. El ADN se carga negativamente debido a los enlaces de fosfato. Las moléculas con carga negativa migran hacia un polo positivo. Debido a que el ADN tiene que migrar a través de la sustancia gel, el ADN más corto, de menor peso molecular migrará más que el ADN más largo, de mayor peso molecular en un tiempo dado. La distancia que el ADN migrará del pozo está relacionada con el tamaño y la estructura (monocatenario, bicatenario, superenrollado) y el grado de complejidad de la matriz de agarosa (concentración). El tamaño del ADN se puede calcular usando patrones de nucleótidos de peso molecular conocido dirigidos junto al ADN de peso molecular desconocido. La distancia que el ADN desconocido ha migrado puede usarse para estimar su peso molecular gráficamente en comparación con la distancia migrada por los oligonucleótidos estándar conocidos. El gel de agarosa no es tóxico y sólo requiere agarosa embebida en tampón (por ejemplo, TBE). El gel es fácil de adicionar y se solidifica al enfriar en 10-15 minutos.

### 2.7.3. Materiales, reactivos y equipos

- Materiales  
Puntas  
Probeta 100 mL  
Erlenmeyer 250 mL
- Reactivos  
Buffer de electroforesis TBE 5X.

Muestras

Agarosa

Marcador de peso molecular

Bromuro de etidio (muy peligroso, tener precaución debido a que es mutagénico.

Nocivo si se ingiere o se inhala. Irritante para la piel, ojos y vías respiratorias, existen otros tintes que pueden ser utilizados como reemplazo de este. Sin embargo, en esta guía será detallado el procedimiento empleando bromuro de etidio).

Tampón de carga de las muestras

- Micropipetas

Cámaras de electroforesis

Fuente de poder

Balanza

Fotodocumentador

Horno microondas

#### 2.7.4. Procedimiento

**Paso 1.** Determine la cantidad de agarosa (gramos) para obtener la concentración del gel requerido, así como el volumen. Para esto use la **Tabla 2.2** y **2.3**.

Ejemplo: para un gel de agarosa al 1%, adicione 1 gramo de agarosa a 100 mL de buffer de electroforesis 1X.

**Tabla 2.2.** Concentración del gel requerida para separación de ADN.

Concentración del gel (%)	Tamaño del ADN
0.50	1 - 30 kb
0.75	800 pb – 10 kb
1.00	500 pb – 10 kb
1.25	400 pb – 7 kb
1.50	200 pb – 3 kb
2.00	100 pb – 2.5 kb
3.00	40 pb – 2 kb
4.00	10 – 400 pb

**Tabla 2.3.** Volúmenes requeridos para el gel.

Tamaño del gel (espesor en cm)	0.25 cm (mL)	0.5 cm (mL)	0.75 cm (mL)	1.0 cm (mL)
7x7	10	20	30	40
7x10	15	30	45	60
15x7	20	40	60	80
15x10	30	60	90	120
15x15	50	100	150	200
15x20	70	140	210	280
15x25	90	180	270	360

**Paso 2.** Adicionar la agarosa en un Erlenmeyer de 250 mL (1 g) y colocar la cantidad apropiada de buffer TBE 1X (100 mL).

**Paso 3.** Colocar el Erlenmeyer en un horno microondas durante 2.5 minutos y cada 30 segundos revise y agite la mezcla, esto ayudará a disolver la agarosa.

**Paso 4.** Agregar 3.3  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio (1%) al Erlenmeyer después de haber sido llevada al horno microondas. Mezcle bien, agitando el recipiente en forma circular, evitando así la formación de burbujas.

**Precauciones:** el bromuro de etidio es cancerígeno y debe ser manejado con extremo cuidado. Siempre usar guantes, gafas de seguridad y bata de laboratorio. Disponer las soluciones de bromuro de etidio y geles apropiadamente.

**Paso 6.** Adicionar cuidadosamente en la cubeta de la cámara, retire las burbujas que hayan sido formadas. Deje solidificar el gel de agarosa durante 20 minutos.

**Paso 7.** Retirar el peine del gel.

**Paso 8.** Colocar la cubeta en la cámara de electroforesis y adicione el buffer TBE 1X hasta el nivel de la cámara.

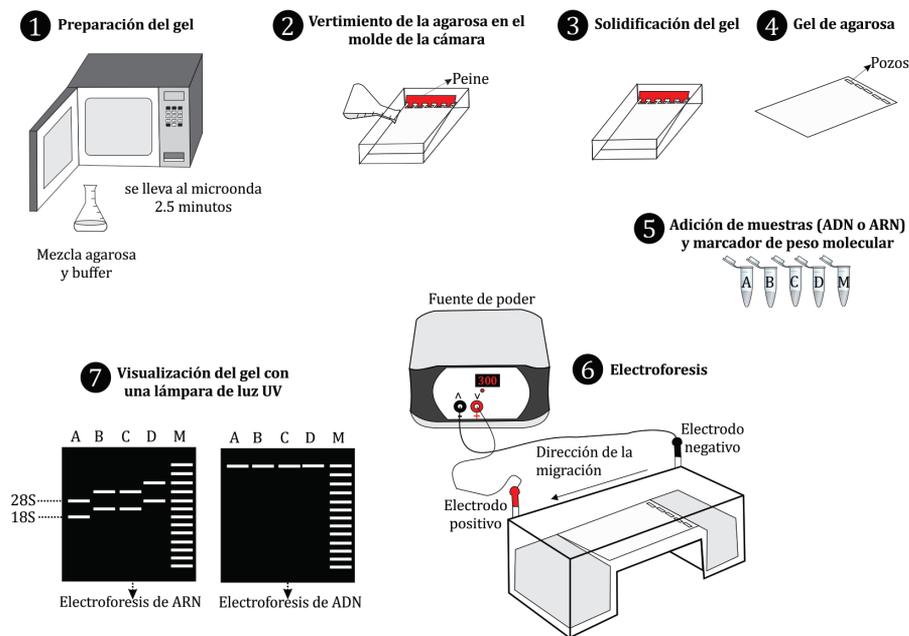
**Paso 9.** Tomar 5  $\mu\text{L}$  de la muestra de ADN o ARN y mezclar con 1  $\mu\text{L}$  de buffer de carga.

**Paso 10.** Pipetear 6  $\mu\text{L}$  (muestra de ADN o ARN + buffer de carga) en el pozo del gel. Finalmente coloque 6  $\mu\text{L}$  del marcador de peso molecular en uno de los pozos.

**Paso 11.** Realizar la electroforesis a 100 V y 300 Amp por 45 minutos. Nota: El tiempo puede variar dependiendo la separación del tamaño de las bandas y la resolución.

**Paso 12.** Sacar el gel y tomar la fotografía empleando un sistema de documentación en gel.

A continuación es presentado un resumen del procedimiento para la realización de la electroforesis en gel de agarosa al 1%.



### 2.7.5. Referencias

Luque, J., Herráez A. (2001). *Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. Primera Edición. Editorial Harcourt S.A. Madrid. España.

Puerta, C., Ureña, C. (2005). *Prácticas de biología molecular*. Primera Edición. Editorial Colección Biblioteca del Profesional. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 2005.

Sambrook, J.F., Rusell, D.W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Tercera Edición. Cold Spring harbor Laboratory Press. New York. USA.

Operating and maintenance manual for the Thermo Scientific™ Owl B1A, B1, B2 and B3 Horizontal Electrophoresis Systems.7007309 Rev.0

### 2.7.6. Videos sugeridos

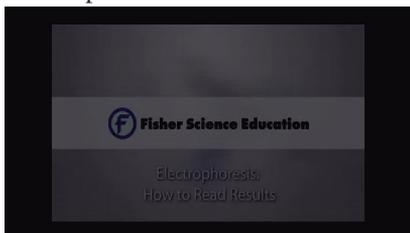
Electroforesis de DNA en gel de agarosa



Enlace: <https://www.youtube.com/watch?v=SWicw3NyI68>

Publicado por: María Belén Salazar Piedrahíta. Octubre 18 de 2012

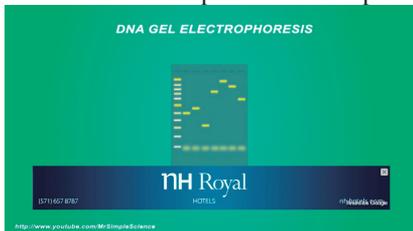
Electrophoresis: How to Read Results



Enlace: <https://www.youtube.com/watch?v=6QYgN-toA1A>

Publicado por: Fisher Science Ed. Diciembre 30 de 2010

DNA Gel electrophoresis - Simple Animated Tutorial



Enlace: <https://www.youtube.com/watch?v=XSO4ZBzu4jA>

Publicado por: Mr Simple Science. Junio 6 de 2012

### 2.7.7. Actividades

1. Explique detalladamente cuales son los buffers utilizados en el corrido electroforético y sus componentes.
2. Explique el fundamento del corrido de los ácidos nucleicos en el gel de agarosa.
3. ¿Qué es el buffer de carga y que propósitos cumple en la electroforesis?.
5. ¿Cuál es el patrón electroforético para ADN y ARN? Explique sus diferencias.

### 2.8. ANEXO

Preparación de reactivos para electroforesis

#### **Stock Tris-Borato-EDTA (TBE) (10X)**

10X Stock (1 litro)-disuelto en 600 mL de agua destilada:

108 g de tris base

55 g de ácido bórico

40 mL 0.5 M de EDTA (pH 8.0)

Completar el volumen final a 1 litro con agua destilada.



# CAPÍTULO 3

## EXPRESIÓN GÉNICA

*Karina Caballero Gallardo*

### CONTENIDO

<b>3.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>81</b>
<b>3.2. REFERENCIAS</b>	<b>82</b>
<b>3.3. GUÍA No. 8. SÍNTESIS DE ADNc</b>	<b>83</b>
3.3.1. Objetivo	83
3.3.2. Introducción	83
3.3.3. Materiales, reactivos y equipos	83
3.3.4. Procedimiento	84
3.3.5. Referencias	86
3.3.6. Videos sugeridos	86
3.3.7. Actividades	86
<b>3.4. GUÍA No. 9. PCR EN TIEMPO REAL</b>	<b>88</b>
3.4.1. Objetivo	88
3.4.2. Introducción	88
3.4.3. Materiales, reactivos y equipos	89
3.4.4. Procedimiento	89
3.4.5. Referencias	92
3.4.6. Videos sugeridos	92
3.4.7. Actividades	92

<b>3.5. GUÍA No. 10. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)</b>	<b>93</b>
3.5.1. Objetivo	93
3.5.2. Introducción	93
3.5.3. Materiales, reactivos y equipos	94
3.5.4. Procedimiento	94
3.5.5. Referencias	96
3.5.6. Videos sugeridos	97
3.5.7. Actividades	97

---

## **TABLAS**

Tabla 3.1. Preparación del buffer ADNg	84
Tabla 3.2. Preparación de la mezcla de reacción	84
Tabla 3.3. Preparación de la mezcla de reacción	90
Tabla 3.4. Programa de amplificación	91
Tabla 3.5. Preparación de la mezcla de reacción	94
Tabla 3.6. Programa de amplificación	95

### 3.1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR, polymerase chain reaction, por sus siglas en inglés) en la década de 1980 anunció una nueva era para las ciencias biológicas y médicas, fortaleciendo el uso de técnicas moleculares para la detección de genes de importancia. Esta técnica *in vitro* tiene la habilidad natural de la célula para duplicar el ácido desoxirribonucleico, generando múltiples copias de una secuencia específica de nucleótidos o amplificando selectiva y exponencialmente el ADN de un organismo. Por lo tanto, es un procedimiento muy sensible que en teoría, permite detectar específicamente una sola molécula del ADN en solución, lo que ha generado el desarrollo de muchos métodos de diagnóstico basados en este principio. Una de las ventajas que plantea esta técnica es la adaptación del método general para determinar la presencia de una secuencia específica en cualquier agente patógeno, incluyendo bacterias, protozoarios, virus y helmintos, ya que, todos los organismos invasores poseen ADN o ARN, como material genético. De esta manera, puede proveer resultados en varias horas para organismos en los que normalmente se tomarían varias semanas utilizando tecnologías convencionales.

La innovación de la PCR ha sido ampliamente reportada en la literatura. Este método utiliza una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria termófila que habita naturalmente en aguas termales *Thermus aquaticus*, de ahí su nombre comercial más conocido: Taq polimerasa. El descubrimiento de polimerasas termoestables ha permitido el termociclado eficaz de la acción de la polimerasa después de cada ciclo de calentamiento. Actualmente, es la matriz universal de las tecnologías de termociclación y ofrece los medios de amplificar exponencialmente genes diana a niveles detectables totalmente automatizado, con detección que se puede lograr a través de los rayos UV, empleando en algunos casos el bromuro de etidio, en un gel de electroforesis. Tras su innovación inicial, pocos podrían haber predicho la amplia aplicación de la PCR para el descubrimiento futuro, la investigación aplicada y el diagnóstico clínico.

Notablemente, la PCR se ha utilizado para detectar o identificar secuencias de genes seleccionados a través de la totalidad de organismos biológicos, de los virus a los seres humanos, proporcionando con ello una muy potente herramienta para aplicaciones que requieren la detección específica de secuencia.

Mientras PCR tradicional sigue siendo ampliamente aplicada y es compatible con una extensa gama de aplicaciones de diagnóstico y de investigación, una deficiencia primaria de esta técnica es su incapacidad para proporcionar información cuantitativa del material genético diana en una muestra de interés.

Con la PCR se puede amplificar en minutos grandes cantidades de ADN diana en forma exponencial, así como obtener resultados en cantidades de productos finales que no son fácilmente diferenciables con técnicas de detección tradicional. La PCR en tiempo real representa un avance muy significativo, que, si bien radicada en los principios básicos de la PCR de amplificación de nucleótidos, utiliza mucho más complejo análisis cinéticos y tecnologías de detección para cuantificar y mostrar cantidades relativas o absolutas de ADN diana, y comúnmente, ARNm, como en el caso de métodos cuantitativos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real utilizando transcriptasa inversa (RT-qPCR).

### 3.2. REFERENCIAS

- Brock, T.D., Freeze, H. (1969). *Thermus aquaticus*, a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriology*, 98, 289-297.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.). (2012). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic press.
- Meuer, S., Wittwer, C., Nakagawara, K.I. (Eds.). (2012). *Rapid cycle real-time PCR: methods and applications*. Springer Science & Business Media.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA In vitro via a polymerase-catalyzed chainreaction. *Methods in Enzymology*. 155, 335-350.

# GUÍA DE LABORATORIO

## CAPÍTULO 3

### 3.3. GUÍA No. 8. SÍNTESIS DE ADNc

#### 3.3.1. Objetivo

- Obtener ADN complementario a partir de una muestra de ARN.

#### 3.3.2. Introducción

Las transcriptasas reversa se derivan de retrovirus tales como el virus de la mieloblastosis aviar (AMV) o el virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV), que los utilizan para hacer copias de ADN de sus genomas de ARN. Las transcriptasas reversas de AMV y MMLV son enzimas multifuncionales, pero se usan principalmente como ADN polimerasas dirigidas por ARN. Específicamente, se usan desoxioligonucleótidos como cebadores para la extensión en plantillas de RNA (generalmente ARN mensajero). El ADN sintetizado a partir de la plantilla de ARN se denomina ADN complementario (ADNc).

#### 3.3.3. Materiales, reactivos y equipos

- Materiales

Guantes

Tapabocas

Gradillas para tubos de centrifuga de 1.5 mL

Gorros

Geles o recipientes con hielo

- Reactivos

Agua libre de RNasas

Transcriptasa reversa

gDNA buffer

RT buffer. Contiene  $Mg^{2+}$  y dNTPs.

RT Primer Mix

- Equipos
- Micropipetas
- Centrífuga refrigerada
- Vórtex
- Baño serológico o termociclador

### 3.3.4. Procedimiento

**Nota:** Este protocolo ha sido realizado para trabajar a partir de una concentración inicial de ARN de 1 µg.

**Paso 1.** Descongelar todos los reactivos y centrifugar suavemente con el objeto de recolectar el líquido que se encuentra en las paredes. Posteriormente, colocar sobre hielo cada uno de los reactivos.

**Paso 2.** A partir de la concentración de ARN determinada por espectrofotometría, calcule el volumen de ARN que debe ser tomado como molde, para llevarlo a una concentración final de 1 µg. (Anexo 1).

**Paso 3.** Preparar el buffer ADNg (**Tabla 3.1**).

**Tabla 3.1.** Preparación del buffer ADNg.

Componentes	Volumen
gDNA 7X	2 µL
Muestra de ARN	Variable
Agua libre de RNasas	Variable
<b>Volumen total</b>	<b>14 µL</b>

**Paso 4.** Incubar por 2 minutos a 42 °C en un baño serológico o en un termociclador y colocar inmediatamente sobre hielo.

**Paso 5.** Preparar la solución de reacción de transcriptasa reversa. (**Tabla 3.2**).

**Tabla 3.2.** Preparación de la mezcla de reacción

Componentes	Volumen
Quantiscript reverse transcriptase	1 µL
Quantiscript RT buffer, 5X	4 µL
RT primer mix	1 µL
Template ADNc	14 µL
<b>Volumen total</b>	<b>20 µL</b>

**Nota:** La mezcla de reacción de transcriptasa reversa debe ser preparada dependiendo del número de muestras a evaluar.

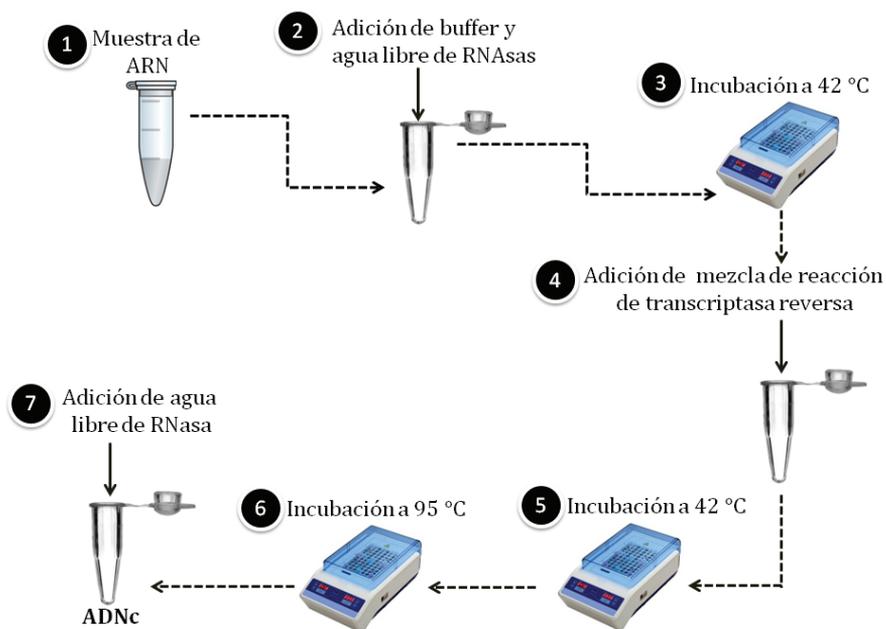
**Paso 6.** Adicionar 6  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción de transcriptasa reversa e incubar a  $42^\circ\text{C}$  durante 15 minutos en un baño serológico o termociclador.

**Paso 7.** Incubar por 3 minutos a  $95^\circ\text{C}$  para inactivar la transcriptasa reversa.

**Paso 8.** Adicionar 80  $\mu\text{L}$  de agua libre RNasa.

**Paso 9.** Almacenar el ADNc a  $-80^\circ\text{C}$ , para su posterior uso.

A continuación es presentado un resumen del procedimiento para la síntesis de ADNc.



### 3.3.5. Referencias

QIAGEN. <http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Sample-Technologies/RNA-Sample-Technologies/Total-RNA/RNeasy-Mini-Kit#resources>

### 3.3.6. Videos sugeridos

cDNA Complementary DNA



Enlace: <https://www.youtube.com/watch?v=OVYWiqt1088>

Publicado por: Rafa-el. Mayo 17 de 2014

### 3.3.7. Actividades

Presentar informe de laboratorio y responder las siguientes preguntas:

1. ¿Cuál es la diferencia entre ADN complementario y ADN genómico?
2. Actualmente en el mercado existen transcriptasas reversas. Mencione algunas de ellas y diga cual es la diferencia entre cada una.
3. ¿El ADNc obtenido en qué procedimientos puede ser utilizado?
4. ¿Cómo se activa o funciona la transcriptasa reversa?

## ANEXO

Cálculos para la determinación del volumen de ARN  
para una cantidad de 1 µg (1000 ng).

PARÁMETROS DE LA FÓRMULA	VALOR	UNIDAD	<b>Volumen final:</b> 20 µL con 1000 ng <b>Concentración final:</b> 50 ng/µL.	
Cantidad de ARN	1	µg		
Volumen buffer	2	µL		
Volumen final muestra de ARN	14	µL		
Concentración ARN (ng/mL)	Volumen de ARN (µL) <sup>a</sup>	Volumen de agua (µL) <sup>b</sup>	Volumen final muestra de ARN <sup>c</sup>	Muestras
1433,20	0,70	11,30	14,00	M1
1351,70	0,74	11,26	14,00	M2
1406,30	0,71	11,29	14,00	M3
1369,60	0,73	11,27	14,00	M4
792,25	1,26	10,74	14,00	M5
1047,70	0,95	11,05	14,00	M6
1340,50	0,75	11,25	14,00	M7
1687,20	0,59	11,41	14,00	M8
807,50	1,24	10,76	14,00	M9
1007,25	0,99	11,01	14,00	M10
1557,05	0,64	11,36	14,00	M11
1717,45	0,58	11,42	14,00	M12
2336,2	0,43	11,57	14,00	M13
1444,15	0,69	11,31	14,00	M14
2100,35	0,48	11,52	14,00	M15
1228,3	0,81	11,19	14,00	M16
1567,5	0,64	11,36	14,00	M17
1544,8	0,65	11,35	14,00	M18
1431,15	0,70	11,30	14,00	M19
1779,6	0,56	11,44	14,00	M20
1074,25	0,93	11,07	14,00	M21
718,85	1,39	10,61	14,00	M22

**Ejemplo:**

$${}^a\text{Volumen de ARN } (\mu\text{L}) = \begin{matrix} x \text{ ng} & 1 \mu\text{L} \\ y \text{ ng} & z \mu\text{L} \end{matrix}$$

Donde x= Concentración inicial de ARN (1433,20 ng/µL), y= Cantidad de ARN escogidos 1 µg (1000 ng).

$$\frac{1433,20 \text{ ng}}{1000 \text{ ng}} = \frac{1 \mu\text{L}}{z}, \text{ entonces } z = 0.70 \mu\text{L}$$

**{}^b\text{Volumen de agua } (\mu\text{L}) =** Volumen final muestra de ARN- Volumen buffer- Volumen de ARN  
 Volumen de agua (µL)=(14 µL-2 µL- 0,70 µL), esto es igual a 11,30 µL.

**{}^c\text{Volumen final muestra de ARN} =** Volumen de ARN+ Volumen de agua+ Volumen buffer  
 Volumen final muestra de ARN=(0,70 µL+11,30 µL+ 2 µL), esto es igual a 14 µL.

## 3.4. GUÍA No. 9. RT-PCR EN TIEMPO REAL

### 3.4.1. Objetivo

- Generar una gran cantidad de copias de ADN.

### 3.4.2. Introducción

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, también conocida como RT-PCR (RT-PCR del inglés real time polymerase chain reaction) muestra la capacidad de monitorear el progreso de la reacción de PCR a medida que esta avanza. Los datos son colectados a lo largo del proceso de PCR y no al final como se realiza con la PCR convencional. La tecnología del RT-PCR está basada en la detección de una señal fluorescente producida proporcionalmente durante la amplificación del ADN de interés. La RT-PCR permite una cuantificación absoluta o relativa de los niveles de ARN mensajero (ARNm) de una determinada muestra de ARN. El material de partida puede ser tanto RNA total, como de mensajero. En ambos casos, el RNA se retrotranscribe a ADN complementario (ADNc). La análisis consiste en diseñar unos cebadores específicos que amplifiquen mediante PCR el fragmento del cual se desea conocer el nivel de expresión. La expresión del fragmento es detectado por fluorescencia con intercalantes (como el SYBR-Green) o con sondas específicas (como las sondas Taqman). A cada ciclo de PCR se mide la fluorescencia emitida y se obtiene una curva cuando se completan todos los ciclos (por lo general 40). Esta curva tiene un valor característico que es el Ct (cycle threshold), en el que los valores bajos corresponden a expresión elevada. Los reactivos químicos en la RT-PCR, son los mismos que se utilizan en la PCR convencional, sólo que generalmente la enzima, Desoxirribonucleótidos trifosfato, o dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP),  $Mg^{+}$ , el buffer y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados son comercializados juntos en una solución conocida como “Master mix o mezcla de reacción”, el agua es proporcionada por separado y debe ser libre de nucleasas. Los cebadores deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad y para que generen amplicones de un tamaño que oscile entre 100-150 pb; si éstos son más grandes, la eficiencia de la reacción disminuye considerablemente. Para evitar estos problemas, una alternativa es diseñar los cebadores, utilizando programas informáticos disponibles, o comprarlos ya validados en compañías de biología molecular, quienes garantizan resultados altamente eficientes y satisfactorios para los usuarios.

La PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de secuencia de interés, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia.

### 3.4.3. Materiales, reactivos y equipos

- Materiales

Microplacas

Puntas para micropipetas

Guantes

Tapabocas

Gorros

- Reactivos

Cebador hacia adelante (en inglés Primer Forward) 10  $\mu\text{M}$

Cebador reverso (en inglés Primer Reverse) 10  $\mu\text{M}$

Mezcla de reacción (SYBR Green PCR)

Agua libre de RNasa

- Equipos

Micropipetas

Centrífuga refrigerada para microplacas

Minicentrífuga

Vórtex

Equipo de PCR en tiempo real

### Recomendaciones:

Mantener el SYBR protegido de la luz, así como cuando la mezcla de reacción sea preparada.

### 3.4.4. Procedimiento

**Paso 1.** Descongelar todos los reactivos (cebadores, SYBR Green y agua libre de RNasa) y centrifugar los tubos y mantener sobre hielo.

**Paso 2.** Preparar la mezcla de reacción de acuerdo con lo descrito en la **Tabla 3.3**, en un tubo de centrífuga dependiendo de la cantidad de muestras que van a ser amplificadas.

**Tabla 3.3.** Preparación de la mezcla de reacción

<b>Componentes</b>	<b>Volumen (μL)</b>
Cebador hacia adelante	1
Cebador reverso	1
SYBR Green	10
Agua libre de RNasa	3
<b>Volumen total</b>	<b>15</b>

**Paso 3.** Mezclar los componentes de la mezcla de reacción en vórtex. Colocar papel aluminio al tubo de centrifuga que contiene la mezcla de reacción para protegerla de la luz y mantener sobre hielo, hasta su uso.

**Paso 4.** Adicionar 15 μL de la mezcla de reacción con una punta de pipeta libre de RNAasa y pirógenos (preferiblemente con filtro) en cada uno de los pozos de la microplaca o tubos de reacción para PCR.

**Paso 5.** Adicionar 5 μL de ADNc (10 ng) a cada uno de los pozos de la microplaca o tubos de reacción para PCR, con una punta de pipeta libre de RNAasa y pirógenos (preferiblemente con filtro) que contienen los 15 μL de la mezcla de reacción y mezcle por pipeteo una a dos veces.

**Paso 6.** Tomar una película adhesiva óptica y colocar sobre la microplaca para sellar esta, o si utilizó tubos de reacción colocar las tapas, asegurándose que quede bien cerrado el tubo.

**Paso 7.** Centrifugar la microplaca o tubos de reacción para quitar las burbujas de aire.

**Paso 8.** Mantener la microplaca o tubos de reacción de reacción bajo refrigeración y en un sitio oscuro hasta que esta sea llevada al equipo de PCR en tiempo real.

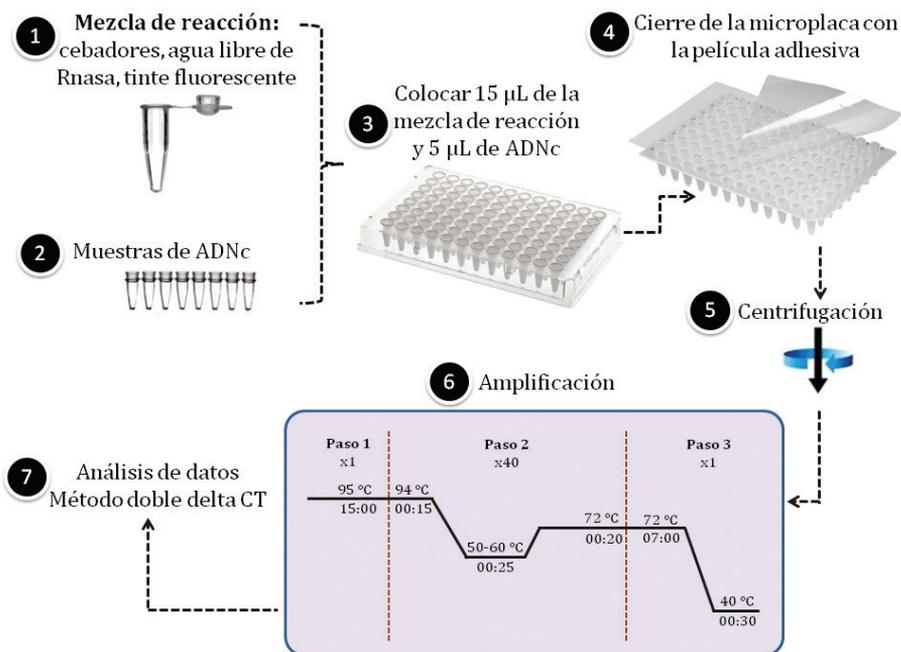
**Paso 9.** Programar las condiciones de amplificación en el equipo de PCR en tiempo real, teniendo en cuenta los siguientes parámetros (**Tabla 3.4**).

**Tabla 3.4.** Programa de amplificación.

Parámetro	Modo de análisis	Tiempo	Temperatura
<b>Etapa de activación inicial PCR-Incubación</b>	Ninguno	15 minutos	95 °C
CICLOS PCR		<b>Número de ciclos: 40</b>	
<b>Desnaturalización</b>	Cuantificación	15 segundos	94 °C
<b>Alineamiento</b>	Cuantificación	25 segundos	5 °C por debajo de la Tm* más baja del primer (Forward o Reverse)
<b>Extensión</b>	Cuantificación	20 segundos	72°C
ENFRIAMIENTO			
<b>Enfriamiento</b>	Ninguno	30 segundos	40°C

\***Tm**: Temperatura melting

A continuación es presentado un resumen del procedimiento para la realización de una RT-PCR.



### 3.4.5. Referencias

QuantiTect SYBR Green PCR Handbook. 2011. QIAGEN- Alemania.

### 3.4.6. Videos sugeridos

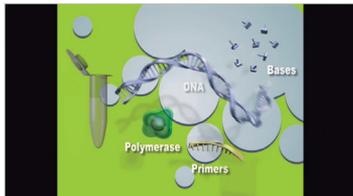
PCR en tiempo real



Enlace: <https://www.youtube.com/watch?v=kvQWKcMdyS4&spfreload=10>

Publicado por: Open Michigan. Diciembre 23 de 2010

Real time PCR



Enlace: <https://www.youtube.com/watch?v=FIgGKkcLLuo&spfreload=10>

Publicado por: Emilija Miltenyť. Julio 30 de 2013

### 3.4.7. Actividades

Presentar informe de laboratorio.

1. Dibuje una curva de amplificación característica de RT-PCR
2. ¿Cuál es el orden en que deben ser adicionados los componentes de la mezcla de reacción?
3. Si en una RT-PCR usted constantemente obtiene resultados de muestras positivas, que solo contienen mezcla de reacción y agua ¿porqué sucede esto? justifique su respuesta.

## 3.5. GUÍA No. 10. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

### 3.5.1. Objetivo

- Obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN en particular.

### 3.5.2. Introducción

La Reacción en Cadena de la Polimerasa también conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular en la que un fragmento de ADN se duplica varias veces para obtener múltiples copias a través de ciclos. Cada ciclo de PCR consta de tres fases: 1. Desnaturalización (el ADN blanco de doble cadena se somete a una temperatura de 90 a 95 °C durante 30 segundos para que esta se separe en dos cadenas), 2. Hibridización [la temperatura se disminuye hasta alcanzar la adecuada para favorecer el apareamiento de los cebadores con la secuencia blanco, dependiendo de la temperatura de fusión o  $T_m$  [(temperatura a la cual el 50% de un oligonucleótido con una secuencia específica se encuentra unido y la otra mitad se encuentra desnaturalizado)] de los cebadores durante 20 a 30 segundos, esta temperatura es 5 °C por debajo de la  $T_m$  del cebador y 3. Extensión [la temperatura se eleva hasta 72 °C para que la Taq polimerasa (DNA polimerasa) comience el proceso de polimerización en dirección 5' a 3' colocando los nucleótidos correspondientes, obteniéndose la hebra complementaria de DNA o amplicón]. En cada ciclo de PCR se duplica todo el ADN presente en la reacción, de manera que en unas pocas horas se obtienen millones de copias de un solo fragmento. Estas tres fases tienen lugar en el mismo tubo de reacción y constituyen un ciclo completo de PCR, que se realiza en menos de dos minutos. Teóricamente, el ciclo de PCR se puede repetir muchas veces, pero la polimerasa, los nucleótidos y los cebadores suelen renovarse al cabo de unos 30 ciclos. Estos 30 ciclos, que duran menos de tres horas, bastan para producir mil millones de copias de ADN. La temperatura de fusión o  $T_m$  a la cual se realiza el paso de hibridización, representa la temperatura a la cual 50% de un oligonucleótido con una secuencia específica se encuentra unido y la otra mitad se encuentra desnaturalizado.

Esta técnica fue ideada por el bioquímico estadounidense Kary B. Mullis en 1983. Aunque su utilidad no se reconoció inmediatamente, en 1991 su uso ya se había generalizado. En 1993 Mullis obtuvo el Premio Nobel de Química por este

trabajo. Dentro de las principales aplicaciones de la PCR se encuentran: estudios arqueológicos, medicina forense, genética, pruebas de paternidad, investigaciones biomédicas, ambientales, industriales y de diagnóstico clínico.

### 3.5.3. Materiales, reactivos y equipos

- Materiales

Guantes

Tapabocas

Gorros

Puntas para micropipetas

Gradillas

- Reactivos

Cebador hacia adelante (10  $\mu$ M)

Cebador reverso (10  $\mu$ M)

Mezcla de reacción

Agua libre de RNasa

- Equipos

Vórtex

Centrífuga refrigerada

Equipo de PCR

### 3.5.4. Procedimiento

**Paso 1.** Descongelar todos los reactivos (cebadores, mezcla de reacción y agua libre de RNasa) y centrifugar. Mantener los reactivos sobre hielo o geles refrigerantes.

**Paso 2.** Preparar la mezcla de reacción de acuerdo con lo descrito en la **Tabla 3.5.**

**Tabla 3.5.** Preparación de la mezcla de reacción.

Componentes	Volumen $\mu$ L
Cebador hacia adelante	1
Cebador reverso	1
Mezcla de reacción	12.5
360 GC Enhancer	1
Agua libre de RNasa	4.5
Volumen total	<b>20</b>

**Paso 3.** Mezclar los componentes de la mezcla de reacción en un vórtex y mantener sobre hielo, hasta su uso.

**Paso 4.** Adicionar 20  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción con una punta de pipeta libre de RNAasa y pirógenos (preferiblemente con filtro) en cada uno de los pozos de la microplaca o tubos de reacción para PCR.

**Paso 5.** Adicionar 5  $\mu\text{L}$  de ADN (20 ng) a cada uno de los pozos de la microplaca o tubos de reacción para PCR, con una punta de pipeta libre de RNAasa y pirógenos (preferiblemente con filtro) que contienen los 20  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción y mezcle por pipeteo una a dos veces.

**Paso 6.** Tomar una película adhesiva óptica y colocar sobre la microplaca para sellar esta, o si utilizó tubos de reacción colocar las tapas, asegurándose que quede bien tapado el tubo.

**Paso 7.** Centrifugar la microplaca o tubos de reacción para quitar las burbujas de aire.

**Paso 8.** Mantener la microplaca o tubos de reacción de reacción bajo refrigeración y en un sitio oscuro hasta que esta sea llevada al equipo de PCR.

**Paso 9.** Programar las condiciones de amplificación en el equipo de PCR (**Tabla 3.6**).

**Tabla 3.6.** Programa de amplificación.

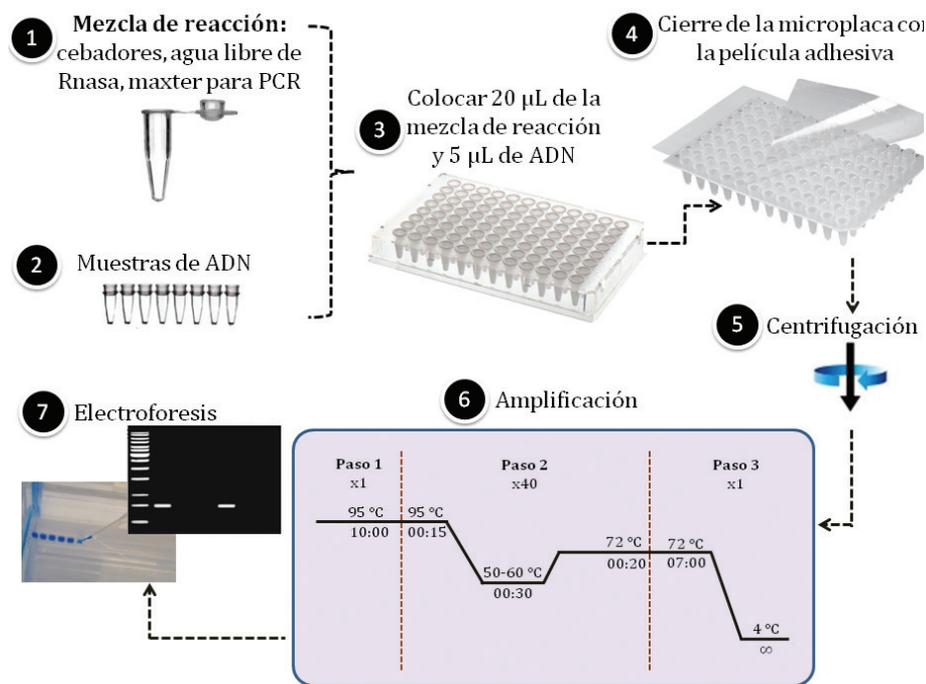
Parámetro	Tiempo	Temperatura
<b>Etapas de activación inicial PCR-INCUBACIÓN</b>	10 min	95 °C
<b>CICLOS PCR</b>	<b>Número de ciclos: 25-40</b>	
<b>Desnaturalización</b>	15 -30 seg	95 °C
<b>Alineamiento</b>	30 seg	5 °C por debajo de la $T_m^*$ más baja del primer (cebador hacia adelante o reverso)
<b>Extensión</b>	60 seg	72°C
<b>Extensión final</b>	<b>7 min</b>	72°C
<b>Enfriamiento</b>	$\infty$	4°C

\*.  $T_m$ : Temperatura melting.

**Paso 10.** Guardar la placa a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su almacenamiento a largo plazo hasta su análisis.

**Paso 11.** Realizar una electroforesis en gel de agarosa para verificar la amplificación del gen de interés.

A continuación es mostrado un resumen del procedimiento descrito para la realización de una PCR de punto final.



### 3.5.5. Referencias

AmpliAq Gold<sup>®</sup> 360 Master Mix Protocol. 2010. Applied Biosystems.

### 3.5.6. Videos sugeridos

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)



Enlace: <https://www.youtube.com/watch?v=TalHTjA5gKU&spfreload=10>

Publicado por: Guillermo Corrales. Enero 2 de 2014

### 3.5.7. Actividades

Presentar informe de laboratorio y resolver las siguientes preguntas:

1. ¿Qué tipos de ADN polimerasa se pueden emplear para PCR y que utilidad tienen?
2. ¿Cuál es la utilidad del cloruro de magnesio en la PCR?
3. ¿Porqué son empleados dos cebadores para la PCR y qué características deben tener estos?
4. ¿Cuáles son las características del buffer empleado para PCR?



# CAPÍTULO 4

## BIOINFORMÁTICA APLICADA A LA PREDICCIÓN DE PROTEÍNAS

*Karina Caballero Gallardo*

### CONTENIDO

<b>4.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>100</b>
4.1.1. Análisis de secuencias de proteínas	100
4.1.2. Análisis bioinformático estructural	100
<b>4.2. REFERENCIAS</b>	<b>102</b>
<b>4.3. GUÍA No. 11. PREDICCIÓN DE PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS MEDIANTE HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS</b>	<b>103</b>
4.3.1. Objetivos	103
4.3.2. Introducción	103
4.3.3. Materiales, reactivos y equipos	104
4.3.4. Procedimiento	104
4.3.5. Referencias	110
4.3.6. Videos sugeridos	111
4.3.7. Actividades	111

---

### FIGURAS

Figura 4.1. Formación de un dipéptido	105
---------------------------------------	-----

## 4.1. INTRODUCCIÓN

La bioinformática es una disciplina científica que involucra aspectos tales como adquisición, procesamiento, almacenamiento, distribución, análisis e interpretación de información biológica. Existen tres objetivos fundamentales dentro de estos; el primero consiste en organizar datos en una forma que permita a los investigadores acceder a la información existente y de la misma forma introducir nueva mientras sea producida. La validación de esta información es una tarea esencial, sin embargo, no será útil hasta ser analizada. Así, el propósito de la bioinformática se extiende aún más. El segundo objetivo es desarrollar herramientas y recursos que faciliten el análisis de datos. El desarrollo de tales recursos necesita tanto de una amplia experiencia en teoría computacional como un alto conocimiento de biología. El tercer objetivo es usar estas herramientas para analizar los datos e interpretar los resultados de una forma biológicamente significativa. Tradicionalmente, los estudios biológicos eran realizados sobre sistemas individuales y estos luego eran comparados con otros pocos sistemas relacionados con este; en bioinformática, es ahora posible realizar análisis globales de todos los datos disponibles con el objetivo de descubrir principios comunes que aplican a muchos sistemas y destacar nuevas características.

### 4.1.1. Análisis de secuencias de proteínas

Uno de los primeros pasos para un análisis bioinformático es obtener información sobre la molécula de estudio; una forma de hacerlo es iniciar con el análisis de la secuencia de aminoácidos. Existen muchas herramientas informáticas que permiten predecir propiedades de proteínas, tales como ProtParam y ProtScale, las cuales hacen parte del servidor ExpASy. Entre las propiedades que pueden ser calculadas para una secuencia de aminoácidos se encuentran el número de aminoácidos, peso molecular, punto isoeléctrico, fórmula molecular, vida media estimada, entre otros. Además es posible identificar a qué organismo y localización celular se encuentra el péptido a partir del servidor Psortb 2.0 (<http://www.psort.org/psortb/>).

### 4.1.2. Análisis bioinformático estructural

La bioinformática estructural es la subdisciplina de la bioinformática que está enfocada en la representación, almacenamiento, análisis y exposición de información estructural a las escalas atómica y subcelular. Está caracterizada

por dos objetivos: la creación de métodos para manipular información acerca de macromoléculas biológicas, y la aplicación de estos métodos para resolver problemas en biología y generar nuevos conocimientos. La importancia de la bioinformática estructural es múltiple, y consiste en crear una infraestructura que permita construir modelos a partir de las partes que los componen y promover el desarrollo de modelos de simulación que permitan un mayor entendimiento de la función de una determinada molécula, a través de la información de su estructura. La correcta función de las proteínas depende de la forma única y especial como son encontradas en formas plegadas, lo que es reflejado en sus estructuras tridimensionales formadas por las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria. Las ventajas de las estructuras tridimensionales sobre la secuencia son encontradas en dos áreas: Primero, la información de la estructura 3D puede lograr nuevos conocimientos biológicos a través de la elucidación de relación entre proteínas de función biológica conocida que no puede ser encontrada solamente por el análisis de sus secuencias; la estructura de una proteína es conservada a través del tiempo de su evolución y esto provee la posibilidad de reconocer homología que no puede ser detectada de otra forma. Segundo, la información estructural es utilizada para identificar motivos de unión y sitios catalíticos incluso para proteínas con actividad biológica desconocida. Las técnicas experimentales que permiten la resolución de estructuras 3D moleculares son:

- Cristalografía de rayos X.
- Resonancia magnética nuclear.
- Microscopía electrónica.

Cuando la estructura tridimensional de la proteína no es conocida, aún es posible obtener una 3D de la misma, a través de técnicas de modelado molecular. Con estas se busca la obtención de un modelo teórico de la estructura de la proteína, que aunque no será una representación exacta de la misma, puede permitir explorar las zonas de interés de la proteína con cierta confianza.

## 4.2. REFERENCIAS

- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernández, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., Xenarios, I., Stockinger, H. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal, *Nucleic Acids Res.* 40:W597-W603.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic acids research.* 31: 3784-3788.
- Gardy, J.L., Laird, M.R., Chen, F., Rey, S., Walsh, C.J., Ester, M., Brinkman, F.S. (2005). PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics.* 21: 617-623.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press. 571-607 p.
- Gutiérrez, H. (2004). *Modelización molecular de los receptores de adenosina y sus ligandos en el marco de diseño de fármacos asistido por ordenador.* Barcelona:UPF.
- Lubec, G., Afjehi-Sadat, L. (2005). Searching for hypothetical proteins: Theory and practice based upon original data and literature. *Progress in Neurobiology).* 77: 90-127.

# GUÍA DE LABORATORIO

## CAPÍTULO 4

### 4.3. GUÍA No. 11. PREDICCIÓN DE PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS MEDIANTE HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

#### 4.3.1. Objetivos

- Predecir estructuras de proteínas utilizando herramientas bioinformáticas.
- Determinar algunas propiedades de las proteínas mediante servidores.

#### 4.3.2. Introducción

Las células están compuestas por multitud de moléculas e iones que regulan todas las funciones. Entre los componentes más importantes de las células están las macromoléculas tales como las proteínas, el ARN y el ADN. El funcionamiento celular, de hecho está supeditado a una maquinaria que involucra estos tres componentes, siendo la información primaria de la misma almacenada en el ADN. Cuando la célula recibe un estímulo, el cual puede ser parte de su normal funcionamiento, activa el proceso de transcripción, en el cual un grupo de proteínas llamadas factores de transcripción se une al ADN para iniciar dicho proceso, es decir, la síntesis de ARN. Este ARNm es transportado al citosol y usado como plantilla para la síntesis de proteínas en los ribosomas, en un proceso denominado traducción. Esta proteína sintetizada constituye por tanto la respuesta al estímulo celular y por tanto es responsable de alguna función en particular. Resulta evidente entonces que las proteínas son macromoléculas fundamentales en el desarrollo de la bioquímica de la vida, por lo que su estudio ayuda a la comprensión del funcionamiento celular.

Las proteínas están compuestas por aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos, los cuales a su vez adquieren arreglos denominados estructuras secundarias, estos luego adoptan conformaciones tridimensionales denominados estructuras terciarias. Estos arreglos son precisamente los que permiten la función de las proteínas, la cual está dictada específicamente por la secuencia de aminoácidos.

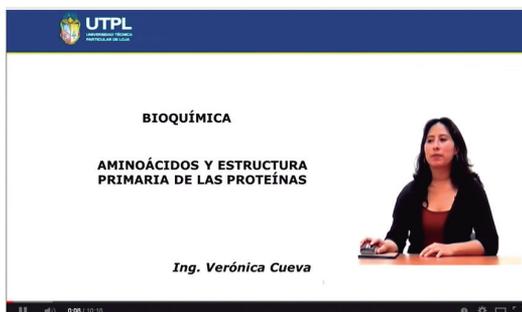
### 4.3.3. Materiales, reactivos y equipos

- Materiales  
Plastilina y palillos de dientes
- Equipos  
Computador o tablet

### 4.3.4. Procedimiento

**Primero revisaremos la estructura de las proteínas:**

Aminoácidos y estructura primaria de las proteínas

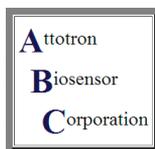


Enlace: <http://www.youtube.com/watch?v=WPAAkfWUFYc>

Publicado por: Verónica Cueva. Mayo 16 de 2012

Utilizando plastilina y los palillos, en grupos. Los estudiantes realizarán un dipéptido (**Figura 4.1**). Ver estructuras aminoácidos al final de la guía.

Cada estudiante recibirá una secuencia de ADN, la cual deberá pasar a mRNA, y a proteína (la misma será obtenida de su canción favorita). Para este proceso utilizará el servidor **Transcription and Translation Tool**.



**Servidor Cybertory™ Virtual Molecular Biology Laboratory**

**URL:** [www.attotron.com/cybertory/analysis/trans.htm](http://www.attotron.com/cybertory/analysis/trans.htm).

Es una plataforma basada en la web para la enseñanza de la biología molecular.

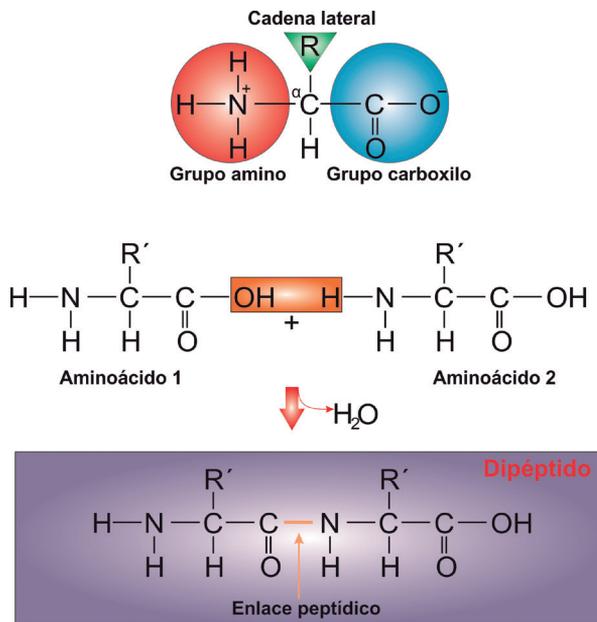


Figura 4.1. Formación de un dipéptido.

## ADN

cctcctgctcatcttgcttcggaagctgtagctgctatggtggcggcgcgaggccttgcccgtcacggtc  
 gcaatgctgctaatacctgctcgctgtctgggagccctggggagcgcctaccctgccaaccagaggctccc  
 ggccaagacgcctccccggaggagctgagccgctactacgctccctgcgccaactcaacctggtcaccgg  
 gcagcggatggaaaaagagatgtccccgcagctctgttctccaaactgctcttcacagacgacgcagcag  
 cgagaacctc

## PROTEÍNA

PPAHLASEAVAAMVAVRRPWVPTVAMLLILLACL GALV DAYPAKPEA  
 PGEDASPEELSRYYASLRHYLNLVTRQRYGKRDPAAALFSKLLFTDDSD  
 SENL

Una vez obtenida la secuencia de aminoácidos, usar estos servidores para generar la estructura secundaria de la proteína.

### Servidor APSSP2: Advanced Protein Secondary Structure Prediction Server

URL: <http://www.imtech.res.in/raghava/apssp2/>

Este servidor permite predecir la estructura secundaria de la proteína de su secuencia de aminoácidos.

### **PORTER**

Protein Secondary Structure Prediction at University College Dublin

**URL:** <http://distill.ucd.ie/porter/>

En este servidor debe suministrarse un e-mail.



SWISS-MODEL

**Servidor SWISS-model**

**URL:** <http://swissmodel.expasy.org>

SWISS-MODEL es un sistema automatizado para el modelamiento de la estructura 3D de una proteína a partir de su secuencia de aminoácidos empleando técnicas de modelado de homología. Este fue establecido hace veinte años como el primer servidor para tal fin, y ha sido desarrollado de forma continua y mejorado desde entonces.

**¿Existe alguna diferencia entre los dos resultados?** Para el resultado de cada servidor, el estudiante deberá realizar una tabla, asignando la estructura secundaria respectiva a cada sección de la secuencia, determinando al final un consenso, es decir la estructura secundaria más probable asociada con cada fragmento de la proteína.

Los estudiantes también deberán someter la secuencia a servidores que predicen la estructura terciaria: Por ejemplo I-Tasser:



**Servidor I-TASSER**

**URL:** <http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>

Es una plataforma on-line para la predicción de la estructura y función de las proteínas.

**También se puede usar ESyPred:**



**Servidor ESyPred3D Web Server 1.0**

**URL:** <http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>

Es un nuevo programa de modelado de homología automatizado. El método obtiene el beneficio de bajar las presentaciones de alineación de una nueva estrategia de alineamiento usando redes neuronales. Alineaciones se obtienen mediante la combinación de ponderación y cribado de los resultados de varios programas de alineaciones múltiples. La estructura tridimensional final se construye a partir del paquete de modelado llamado MODELLER.

Una vez el servidor haya finalizado la predicción, el grupo deberá presentar sus resultados gráficos en el informe de laboratorio, el cual deberá incluir además información general sobre la proteína y su arquitectura.

Es posible usar servidores para evaluar diferentes propiedades de las proteínas, como por ejemplo:

### **Modificaciones post-traduccionales.**

Con el eminente desarrollo de la proteómica, los principios del conocimiento biológico recopilados en bases de datos, en particular sobre modificaciones post-traduccionales (MPTD) en proteínas, han jugado un papel crucial en la investigación de la regulación celular. Los sitios de MPTD son de extrema importancia en el control de transducción de señales dada su influencia sobre las propiedades físicas y químicas, plegamiento, conformación, distribución, estabilidad, actividad y función de las proteínas. Entre las MPTD más frecuentes están las siguientes: fosforilación, N-glicosilación, acetilación, hidroxilación, miristilación, isoprenilación, y sulfatación, carbonización, entre otros.

Para detectar los sitios de MPTD en secuencias de aminoácidos o proteínas son empleados diferentes servidores, entre los cuales podemos resaltar:



#### **Servidor NetPhos 2.0**

**URL:** <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

Servidor que utiliza una red neuronal para la determinación de sitios de fosforilación a serinas, treoninas y tirosinas en proteínas eucarióticas.

### **Parámetros fisicoquímicos:**



#### **Servidor ProtParam**

**URL:** <http://web.expasy.org/protparam/>

Es una herramienta que permite el cálculo de los diferentes parámetros físicoquímicos para una determinada proteína almacenada en Swiss-Prot o TrEMBL o para una secuencia introducida por el usuario. Los parámetros calculados incluyen el peso molecular, pI teórico, composición de aminoácidos, composición atómica, coeficiente de extinción, la vida media estimada, índice de inestabilidad, índice alifático, entre otros.

### **Blast.**



#### **Servidor Blastp**

**URL:** <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Herramienta poderosa para reconocer el origen y el tipo de familias de las proteínas.

**Nota:** en el menú seleccionar “Human” y el siguiente cuadro “blastp”, específico para proteínas. Probar igualmente con la secuencia de ADN.

### **Localización subcelular**



#### **Servidor TargetP 1.1**

**URL:** <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>

Servidor que predice la localización subcelular de las proteínas eucariotas. La asignación de ubicación se basa en la presencia predicha de cualquiera de las presecuencias N-terminales: el péptido de tránsito al cloroplasto (CTP), péptido orientación mitocondrial (MTP) o el péptido señal de vía secretora (SP).

### **Servidor para colorear las proteínas**



#### **Servidor Protein Colourer**

**URL:** <http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/proteincol/ProteinColourer.pl>

Es una herramienta para colorear las secuencias de aminoácidos. La configuración predeterminada para colorear la secuencia por la hidrofobicidad de los aminoácidos. Puede establecer el esquema de colores cambiando las listas asociados con cada color. Otro esquema podría ser utilizado para dar color a los aminoácidos por tamaño.

## Servidor para dibujar los péptidos



### Servidor PepDraw

URL: <http://www.tulane.edu/~biochem/WWW/PepDraw/index.html>

Es una herramienta que fue desarrollada para facilitar el estudio de la estructura química y propiedades de los péptidos. Permite a los usuarios dibujar la estructura química principal de una secuencia de aminoácidos y predecir algunas propiedades químicas tales como punto isoelectrico, carga neta, hidrofobicidad, masa, entre otros. PepDraw fue diseñado para ser una herramienta potente y fácil de usar para el análisis de péptidos. Es especialmente útil para enseñar a los estudiantes sobre la estructura y propiedades de los aminoácidos.

## Sitios de corte de enzimas



### Servidor PeptideCutter

URL: [http://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](http://web.expasy.org/peptide_cutter/)

Servidor que predice los sitios de escisión potenciales por proteasas o productos químicos en una determinada secuencia de proteína. PeptideCutter devuelve la secuencia de consulta con los posibles sitios de escisión mapeadas sobre el mismo y/o una tabla de posiciones de sitios de escisión.

### ¿Cuál es el peso molecular de los péptidos siguientes?

ADFGTHYREDF SACVGFDAEWTYHGFADSDALMNVCASD

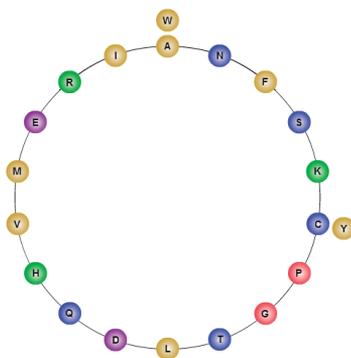
GGFFRTSYHSSKILILJHGFSFSFFFSDERWVCCSDGHGDFDA

## Crear figuras de las hélices

Helical wheel drawing program

Your helical sequence  
ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY

( draw )



John K. Everett

[http://www-nmr.cabm.rutgers.edu/bioinformatics/Proteomic\\_tools/Helical\\_wheel/](http://www-nmr.cabm.rutgers.edu/bioinformatics/Proteomic_tools/Helical_wheel/)

### 4.3.5. Referencias

Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Gallo Cassarino, T., Bertoni, M., Bordoli, L., Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*.

Bordoli L., Kiefer F., Arnold K., Benkert P., Battey J., Schwede T. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat. Protoc.* 2009;4:1-13.

Chivian D. et al. (2003). *AB initio methods en structural bioinformatics*. Bourne P. E., Weissig H. (editores). Wiley-Liss. USA. Pp:525-546.

Claverie J.M., Notredame C. (2003). *Bioinformatics for dummies*. For Dummies Series, Wiley Publishing New York. USA.

Clote P., Backofen R. (2000). *Computational molecular biology. An introduction*. Wiley. New York. USA.

Guex N., Peitsch M.C., Schwede T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. *Electrophoresis*. 30(Suppl. 1):S162-S173.

Kiefer F., Arnold K., Kunzli M., Bordoli L., Schwede T. The SWISS-MODEL repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:D387-D392.

Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M.C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31:3381-3385.

Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics*, 9(1), 40.

#### 4.3.6. Videos sugeridos

Curso virtual de bioinformática



Enlace: <https://www.youtube.com/watch?v=-WnPeJclUao&list=PLUrnkT4JJHt1LLrXd0I5ZcthYwW4xv0VL&spfreload=10>

Publicado por: Marco Regalía. Febrero 12 de 2015

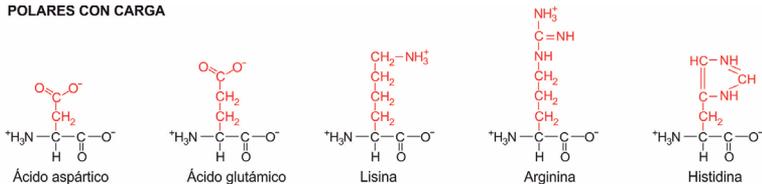
#### 4.3.7. Actividades

1. Describa la importancia de conocer la estructura terciaria de una proteína.
2. Seleccione una estrofa de su canción favorita y con base en la misma elimine las letras que no correspondan a un aminoácido, de esta forma obtendrá la proteína para utilizar las herramientas bioinformáticas vistas durante la práctica.
3. Realice cada una de las actividades propuestas en la guía.

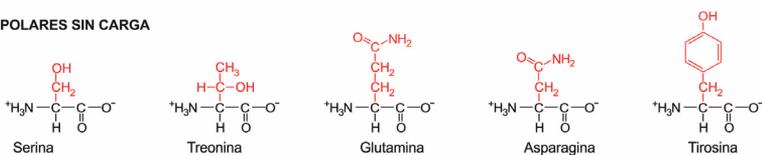
# ANEXO

## Listado de aminoácidos

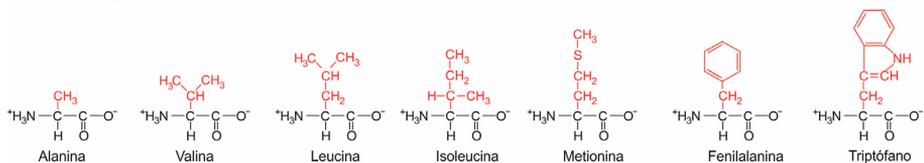
### POLARES CON CARGA



### POLARES SIN CARGA



### NO POLARES



### CADENAS LATERALES CON PROPIEDADES ÚNICAS



# CAPÍTULO 5

## MARCADORES BIOQUÍMICOS DE LA FUNCIÓN HEPÁTICA

*Neda Álvarez Ortega*

### CONTENIDO

<b>5.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>116</b>
<b>5.2. REFERENCIAS</b>	<b>119</b>
<b>5.3. GUÍA No. 12. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ALANINA AMINOTRANSFERASA (ALT) EN PLASMA/SUERO SANGUÍNEO.</b>	<b>120</b>
5.3.1. Objetivos	120
5.3.2. Introducción	120
5.3.3. Materiales, reactivos y equipos	121
5.3.4. Procedimiento	122
5.3.5. Referencias	125
5.3.6. Actividades	126
<b>5.4. GUÍA No. 13. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASA (AST) EN PLASMA/SUERO SANGUÍNEO</b>	<b>127</b>
5.4.1. Objetivos	127
5.4.2. Introducción	127
5.4.3. Materiales reactivos y equipos	127
5.4.4. Procedimiento	128
5.4.5. Referencias	128
5.4.6. Actividades	129

<b>5.5. GUÍA No. 14. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA (FAL) EN PLASMA SANGUÍNEO</b>	<b>130</b>
5.5.1. Objetivos	130
5.5.2. Introducción	130
5.5.3. Materiales reactivos y equipos	131
5.5.4. Procedimiento	132
5.5.5. Referencias	134
5.5.6. Actividades	134

<b>5.6. GUÍA No.15. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GAMMA GLUTAMIL TRANSFERASA (<math>\gamma</math>-GT) EN PLASMA SANGUÍNEO</b>	<b>135</b>
5.6.1. Objetivos	135
5.6.2. Introducción	135
5.6.3. Materiales reactivos y equipos	135
5.6.4. Procedimiento	136
5.6.5. Referencias	138
5.6.6. Actividades	138

## FIGURAS

Figura 5.1. A. Estructura cristalina de A: Alanina aminotransferasa humano en complejo con fosfato de piridoxal PLP; B: Estructura cristalina de aspartato aminotransferasa humano; C: Estructura cristalina de la fosfatasa alcalina humana en complejo con estroncio; D: Estructura cristalina de $\gamma$ - glutamil transferasa	118
Figura 5.2. Fundamento de la determinación de la actividad de ALT	121
Figura 5.3. Procedimiento general para la determinación de AST y ALT	124
Figura 5.4. Fundamento de la determinación de la actividad de AST	128
Figura 5.5. Procedimiento gráfico de la determinación de FAL	133
Figura 5.6. Procedimiento gráfico de la determinación de $\gamma$ - glutamil transferasa	137

## TABLAS

Tabla 5.1. Resumen de biomarcadores clínicos de toxicidad hepática	117
Tabla 5.2. Condiciones instrumentales de los equipos	123
Tabla 5.3. Preparación de preparación de muestras y controles para el ensayo	123
Tabla 5.4. Valores para hallar la concentración final a partir de la fórmula general	125
Tabla 5.5. Factores para hallar la concentración	125
Tabla 5.6. Condiciones instrumentales de los equipos	132
Tabla 5.7. Preparación de preparación de muestras y controles para el ensayo	132
Tabla 5.8. Preparación de preparación de muestras y controles para el ensayo	137

## 5.1. INTRODUCCIÓN

El hígado es el órgano interno más grande del cuerpo, con un peso aproximado de 1.2-1.5 kg. Constituye el sitio principal para el metabolismo y desintoxicación de drogas y sustancias químicas ambientales. Además es el principal lugar del proceso de síntesis de las proteínas circulantes (excepto  $\gamma$ -globulinas), así como también la desaminación y transaminación de aminoácidos.

Desde la década de los 70, se han empleado biomarcadores para la evaluación de la función hepática, los cuales consisten en la determinación en suero o plasma de las actividades de diversas enzimas incluyendo alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (FAL), y  $\gamma$ -glutamyltransferasa (GGT; también conocido como  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa) (**Tabla 5.1**).

La ALT es una enzima citosólica, considerada un marcador específico para la evaluación de la integridad hepática. Por su parte la AST es menos específica ya que también es encontrada en corazón, músculo, riñón y cerebro (**Tabla 5.1**). Además la ALT tiene una vida media más larga que AST. Por otra parte, a la FAL esta se localiza en la membrana canalicular y sinusoidal de los hepatocitos y es indicadora de obstrucción en vías biliares.

Por último la GGT es una glicoproteína encontrada en la membrana de la superficie celular de la mayoría de tipos de células, incluyendo los hepatocitos. Niveles elevados de esta enzima se han encontrados en personas que consumen alcohol en exceso. De otro modo actividades de las enzimas hepáticas también se ven afectadas por muchos factores, incluyendo el hábito de fumar (**Tabla 5.1**). En la población en general todos estos marcadores tienen unas concentraciones normales en el suero o plasma sanguíneo, sin embargo cada laboratorio debe establecer sus valores de referencia según la técnica y equipo empleado (**Tabla 5.1**).

En este capítulo se abordan las características generales de estos biomarcadores así como también los fundamentos y técnicas empleadas para su determinación en suero o plasma sanguíneo.

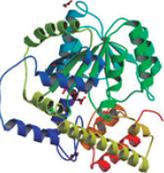
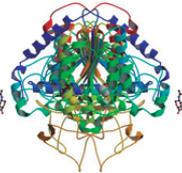
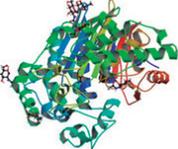
**Tabla 5.1.** Resumen de biomarcadores clínicos de toxicidad hepática.

Nombre	Otros nombres	Abreviatura	Localización de tejido	Principal asociación	Marcador	Comentarios	V.R* U/L
Alanina aminotransferasa	Transaminasa glutámico-pirúvica	ALT/GPT	Hepatocitos principalmente	Elevado en sangre debido a daño en el hígado y lesión del músculo esquelético.	Necrosis Hepatocelular. Hígado graso no alcohólico	Comúnmente utilizado para evaluar lesión hepatocelular	hasta 42
Aspartato aminotransferasa	Transaminasa glutámico-oxalacética	AST/GOT	Localizada en el corazón, el cerebro, músculo esquelético y el hígado	Elevado en la sangre debido a lesión en el hígado, infarto agudo al miocardio	Necrosis hepatocelular	Menos específica que la ALT	hasta 42
Fosfatasa alcalina	Fosfomonoesterasa alcalina	FAL	Localización de tejido amplia, canalículos biliares, tejido óseo	Lesión hepatobiliar	La colestasis	Lesión biliar; asociado con colestasis	45-115
$\gamma$ -Glutamil transferasa	Gamma glutamil transpeptidasa	GGT	Riñón, hígado, páncreas	Lesión hepatobiliar	La colestasis, biliar	Lesión biliar; la elevación puede ser causada por Enfermedad hepática alcohólica	9-48

\*V.R: Valor de Referencia

## Nomenclatura según la comisión enzimática (CE) de los biomarcadores hepáticos

El esquema de la Comisión de Enzimas (CE) es una clasificación funcional jerárquica de cuatro niveles donde a cada enzima le asignan cuatro números, y cada uno representa un nivel. El primer número representa una de las seis clases principales de las reacciones químicas que las enzimas catalizan (oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas, ligasas). Los dos números siguientes describen la subclase y sub subclase de la reacción global, mientras que el último número por lo general refleja la especificidad de sustrato de una reacción. En la **Figura 5.1** es presentada la clasificación enzimática para los biomarcadores bioquímicos hepáticos clínicos.

	<p><i>EC.2. Transferasa</i>  <i>EC.2.6. Transferencia de grupos nitrogenados</i>  <i>EC.2.6.1 Transaminasas (aminotransferasas)</i>  <i>EC 2.6.1.2. Alanina transaminasa.</i></p>	<p><b>A</b></p>
	<p><i>EC.2. Transferasa</i>  <i>EC.2.6. Transferencia de grupos nitrogenados</i>  <i>EC.2.6.1 Transaminasas (aminotransferasas)</i>  <i>EC 2.6.1.1. Aspartato transaminasa.</i></p>	<p><b>B</b></p>
	<p><i>EC. 3. Hidrolasa</i>  <i>EC.3.1. Actúa sobre enlaces éster</i>  <i>EC.3.1.3. Hidrolasa de monoesterfosfórico</i>  <i>EC 3.1.3.1. Fosfatasa alcalina.</i></p>	<p><b>C</b></p>
	<p><i>EC.2. Transferasa</i>  <i>EC.2.3. Aciltransferasa</i>  <i>EC.2.3.2 Aminoaciltransferasa</i>  <i>EC 2.3.2.2. Gamma glutamil.</i></p>	<p><b>D</b></p>

**Figura 5.1.** **A:** Estructura cristalina de Alanina aminotransferasa humano en complejo con fosfato de piridoxal PLP; **B:** Estructura cristalina de aspartato aminotransferasa humano; **C:** Estructura cristalina de la fosfatasa alcalina humana en complejo con estroncio; **D:** Estructura cristalina de  $\gamma$ - glutamil transferasa.

Fuente: [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)

## 5.2. REFERENCIAS

Agrawal, S., Flora, G., Bhatnagar, P., Flora, S., 2014, Comparative oxidative stress, metallothionein induction and organ toxicity following chronic exposure to arsenic, lead and mercury in rats. *Cellular and molecular biology* (Noisy-le-Grand, France) 60, 13.

Dasgupta, A., 2015, Chapter 5 - Liver enzymes as alcohol biomarkers, in: Dasgupta, A. (Ed.) *Alcohol and its biomarkers*. Elsevier, San Diego, pp. 121-137.

Hutson, S., 2001, Structure and function of branched chain aminotransferases, In: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Academic Press, pp. 175-206.

Izrailev, S., Farnum, M.A., 2004, Enzyme classification by ligand binding. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 57, 711-724.

Jaeschke, H., Bajt, M.L., 2010, 9.21 - Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity, In: McQueen, C.A. (Ed.) *Comprehensive Toxicology* (Second Edition). Elsevier, Oxford, pp. 457-473.

Watkins, P.B., 2013, Chapter 17 - Biomarkers for drug-induced liver injury, in: DeLeve, N.K.D. (Ed.) *Drug-induced Liver Disease* (Third Edition). Academic Press, Boston, pp. 275-286.

Yang, X., Schnackenberg, L.K., Shi, Q., Salminen, W.F., 2014, Chapter 13 - Hepatic toxicity biomarkers, In: Gupta, R.C. (Ed.) *Biomarkers in toxicology*. Academic Press, Boston, pp. 241-259.

<http://www.uniprot.org>

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/3ihj>

# GUÍAS DE LABORATORIO

## CAPÍTULO 5

### 5.3. GUÍA No. 12. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ALANINA AMINOTRANSFERASA (ALT) EN PLASMA/SUERO SANGUÍNEO.

#### 5.3.1. Objetivos

- Conocer los fundamentos teóricos de la determinación de la actividad de ALT.
- Cuantificar la actividad enzimática.
- Adquirir destrezas en la aplicación de la técnica.
- Interpretar adecuadamente los resultados obtenidos.

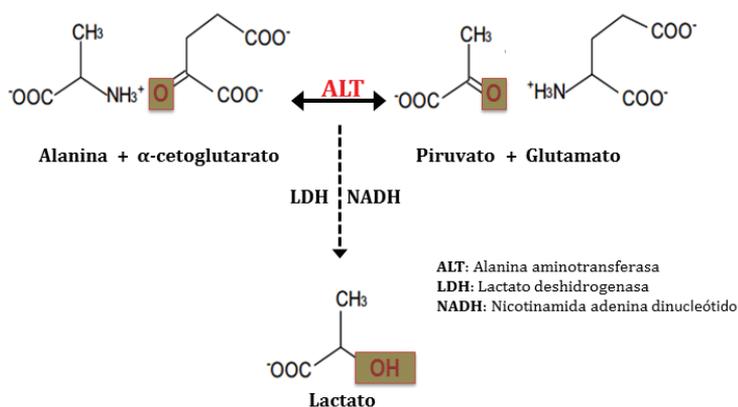
#### 5.3.2. Introducción

La ALT (EC 2.6.1.2) y AST (EC 2.6.1.1) (Figura 5.1) son dos enzimas hepáticas dependientes del fosfato de piridoxal (PLP) que intervienen en la gluconeogénesis y el metabolismo de aminoácido, catalizando las reacciones intermedias del metabolismo de la glucosa y de las proteínas. Los niveles elevados de la actividad enzimática de ALT y AST se han observado en una variedad de condiciones como síndrome metabólico del hígado, aterogénesis y diabetes tipo I y II. Los datos de química clínica de la ALT se utilizan habitualmente para el seguimiento no invasivo de la enfermedad hepática, convirtiéndose en el biomarcador clínico más empleado. La ALT tiene una especificidad de sustrato relativamente amplia y está involucrada en la síntesis de aminoácidos, además es responsable del metabolismo (transaminación) de la alanina.

Las concentraciones de esta enzima en el hígado son mucho más altas en comparación con otros órganos, en los hepatocitos está localizada principalmente en el citosol, no obstante cuando ocurre una lesión hepatocelular, la misma escapa al espacio extracelular y entra en la sangre, con una vida media de aproximadamente 42 horas. La elevación de la actividad ALT sérica es a menudo reflectante de daño celular hepático, así mismo mecanismos de hepatotoxicidad por acetaminofén han sido correlacionados con la pronta liberación de ALT. Cabe destacar que lesiones extrahepáticas, tales como la lesión en el músculo y la ventana terapéutica también pueden conducir a elevaciones de la misma. Así mismo las concentraciones de

ALT no discriminan entre diferentes etiologías de lesión hepática. Otra debilidad es que los niveles de ALT no proporcionan pronóstico de la enfermedad. A pesar que actualmente no hay biomarcadores que pueden distinguir elevaciones de ALT benignas de los que auguran lesión hepática progresiva, el aumento de ALT sérica sigue siendo ampliamente utilizado y aceptado universalmente.

Bioquímicamente la ALT cataliza la transaminación de los reactantes L-alanina y  $\alpha$ -cetoglutarato, formando piruvato y L-glutamato. El piruvato formado se reduce a lactato gracias a la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), y en este proceso se reduce el NADH a NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) (**Figura 5.2**). El cambio en absorción a 340 nm es proporcional a la actividad de la enzima, que se expresa en unidades internacionales por litro (U/L).



**Figura 5.2.** Fundamento de la determinación de la actividad de ALT.

### 5.3.3. Materiales, reactivos y equipos

- Materiales
- Micropipetas de 10-20  $\mu\text{L}$  y 1000  $\mu\text{L}$
- Gradilla
- Guantes
- Puntas para micropipetas
- Papel kraft
- Tubos de centrifuga de 15 mL
- Tubos de centrifuga
- Tubos de heparina de litio

- Reactivos

Reactivo A:

Tris 150 mmol/L

L-alanina 750 mmol/L

Lactato deshidrogenasa > 1350 U/L, pH 7.3

Reactivo B:

NADH 1,3 mmol/L

2-oxoglutarato 75 mmol/L

Hidróxido sódico 148 mmol/L

Azida de sodio 9.5 g/L

Suero control de calidad I

Suero control de calidad II

Agua destilada

- Preparación de Reactivos

Mezclar en una proporción: 4 mL de reactivo A y 1 mL de reactivo B

- Equipos

Baño serológico

Espectrofotómetro

Centrífuga

## Notas

- La presencia de partículas, turbidez y la absorbancia del blanco inferior a 1.2 a 340 indica deterioro del reactivo.
- El rango de control de los niveles están dados por la casa comercial dependiendo de cada lote.

### 5.3.4. Procedimiento

#### Recomendaciones

Las muestras pueden ser provenientes de humano o de animales. Estas deben colectarse antes del inicio de la práctica.

La lipemia, la bilirrubina, y la hemólisis pueden afectar los resultados. Se recomienda un ayuno de 12 horas.

El plasma o suero obtenido debe almacenarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  en caso de que no sea usado inmediatamente. El almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  prolonga su estabilidad (**Figura 5.3**).

Antes de comenzar se deben preparar los equipos como se describe en la **Tabla 5.3**.

**Tabla 5.2.** Condiciones instrumentales de los equipos.

Baño serológico	Espectrofotómetro
Temperatura $37^{\circ}\text{C}$	Temperatura: $37^{\circ}\text{C}$
	Incubación por 1 min seguido de una lectura inicial y tres lecturas cada minuto
	Filtro: $340\text{ nm}$ .

**Paso 1.** Obtener una muestra de sangre total por punción venosa usando como anticoagulante la heparina, o un tubo libre de anticoagulante para la obtención de plasma o suero respectivamente.

**Paso 2.** Centrifugar la sangre total a  $4500\text{ rpm}$  durante  $5\text{ min}$  (**Figura 5.2**).

**Paso 3.** Tomar el plasma/suero resultante de la parte superior del tubo y realizar alícuotas de aproximadamente  $500\text{ }\mu\text{L}$  en tubos de centrifuga de  $1.5\text{ mL}$ .

**Paso 4.** Marque los tubos de centrifuga como muestras y controles.

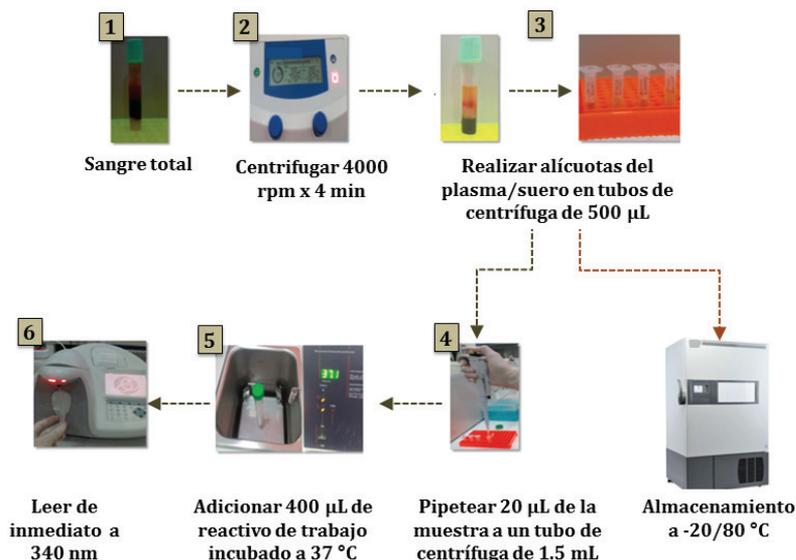
**Paso 5.** Pipetear  $20\text{ }\mu\text{L}$  de la muestra en tubos de centrifuga de  $1.5\text{ mL}$  (**Tabla 5.3**).

**Paso 6.** Adicionar  $400\text{ }\mu\text{L}$  del reactivo de trabajo precalentado ( $37^{\circ}\text{C}$ ) al tubo de centrifuga donde fue adicionada la muestra. (**Tabla 5.3**).

**Tabla 5.3.** Preparación de preparación de muestras y controles para el ensayo.

Reactivos y muestras	Control I	Control II	Muestra
Muestras y controles ( $\mu\text{L}$ )	20		
		20	
			20
Reactivo de trabajo ( $\mu\text{L}$ )	400	400	400

**Nota:** La lectura debe realizarse inmediatamente el reactivo de trabajo haya sido mezclado con la muestra. Por lo tanto si ha servido más de una muestra, estas deben esperar que la lectura de la anterior haya sido realizada para la adición del reactivo de trabajo, a menos que sea empleado un equipo de múltiples lecturas.



**Figura 5.3.** Procedimiento general para la determinación de AST y ALT.

**Paso 7.** Leer de inmediato en el espectrofotómetro a 340 nm. El equipo luego de un minuto de incubación, realizará diferentes lecturas. En total serán cuatro lecturas. El procedimiento general es descrito en la **Figura 5.3**.

**Paso 8.** Calcular el incremento de las absorbancias por minuto ( $\Delta A/\text{min}$ ) de las tres mediciones que arroja el equipo.

**Paso 9.** Calcular la actividad enzimática mediante la fórmula general mostrada a continuación. Los valores para reemplazar dicha fórmula se muestran en la **Tabla 5.4** y los factores que se deducen son presentados en la **Tabla 5.5**.

$$\Delta \text{Absorbancia} / \text{min} = \frac{V_t \times 10^6}{\epsilon \times l \times V_s}$$

**Nota:** Para determinar la concentración de las muestras, calibre el equipo empleando sueros calibradores certificados, seguido del monitoreo diario de sueros control de calidad nivel I y nivel II.

**Tabla 5.4.** Valores para hallar la concentración final a partir de la fórmula general.

$\epsilon$	Coefficiente de absorción molar del NADH a 340 nm	6300
$l$	Paso de la luz	1 cm
$V_t$	Volumen total de reacción	0.420
$V_s$	Volumen de muestra	0.02

**Tabla 5.5.** Factores para hallar la concentración.

Unidades	Temperatura 37 °C
U/L	3333
$\mu\text{kat/L}$	55.55

**Nota:** El uso de controles de calidad es fundamental para validar los resultados de las muestras. Se debe realizar la gráfica de levey-jenning y aplicar las reglas de westgard para cada nivel de control de calidad.

### 5.3.5. Referencias

- Dasgupta, A., 2015, Chapter 5 - Liver Enzymes as Alcohol Biomarkers, In: Dasgupta, A. (Ed.) Alcohol and its Biomarkers. Elsevier, San Diego, pp. 121-137.
- Hutson, S., 2001, Structure and function of branched chain aminotransferases, In: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. Academic Press, pp. 175-206.
- Izrailev, S., Farnum, M.A., 2004, Enzyme classification by ligand binding. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 57, 711-724.
- Jaeschke, H., Bajt, M.L., 2010, 9.21 - Mechanisms of Acetaminophen Hepatotoxicity, In: McQueen, C.A. (Ed.) Comprehensive Toxicology (Second Edition). Elsevier, Oxford, pp. 457-473.

Voges, M., Schmidt, F., Wolff, D., Sadowski, G., Held, C., 2016, Thermodynamics of the alanine aminotransferase reaction. *Fluid Phase Equilibria*. 422, 87-98.

Watkins, P.B., 2013, Chapter 17 - Biomarkers for Drug-Induced Liver Injury, In: DeLeve, N.K.D. (Ed.) *Drug-induced Liver Disease (Third Edition)*. Academic Press, Boston, pp. 275-286.

Yang, X., Schnackenberg, L.K., Shi, Q., Salminen, W.F., 2014, Chapter 13 - Hepatic toxicity biomarkers, In: Gupta, R.C. (Ed.) *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press, Boston, pp. 241-259.

<http://www.uniprot.org>

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/3ihj>

### **5.3.6. Actividades**

1. En una hoja milimetrada graficar las absorbancias obtenidas con respecto al tiempo para todas las muestras analizadas.
2. Determinar la concentración de cada muestra.
3. Interpretar los resultados obtenidos.
4. Explique en un cuadro comparativo las ventajas y desventajas de este biomarcador respecto a otros análisis utilizados para la evaluación de la función hepática.

## 5.4. GUÍA No. 13. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASA (AST) EN PLASMA/SUERO SANGUÍNEO.

### 5.4.1. Objetivos

- Conocer los fundamentos teóricos de la determinación de AST.
- Adquirir destrezas en la aplicación de la técnica.

### 5.4.2. Introducción

Bioquímicamente la AST cataliza la transaminación de L-aspartato y 2-oxoglutarato a L-glutamato y oxalacetato. La concentración catalítica se determina, empleando la reacción acoplada de la malato deshidrogenasa (MDH), a partir de la velocidad de desaparición del NADH, medido a 340 nm (**Figura 5.4**).

### 5.4.3. Materiales reactivos y equipos

- Materiales

Micropipetas de 10-20  $\mu\text{L}$  y 100-1000  $\mu\text{L}$

Puntas

Gradilla

Tubos de centrífuga de 15 mL

Tubos de centrífuga de 1.5 mL

Guantes

Bolsas rojas

- Reactivos

Reactivo A:

Tris 121 mmol/L

L-aspartato 362 mmol/L

Malato deshidrogenasa > 460 U/L

Lactato deshidrogenasa > 660 U/L

Hidróxido sódico 255 mmol/L, pH 7.8

Reactivo B:

NADH 1.3 mmol/L

2-oxoglutarato 75 mmol/L

Hidróxido sódico 148 mmol/L

Azida de sodio 9.5 g/L

Suero control de calidad

- Equipos
- Baño serológico
- Espectrofotómetro

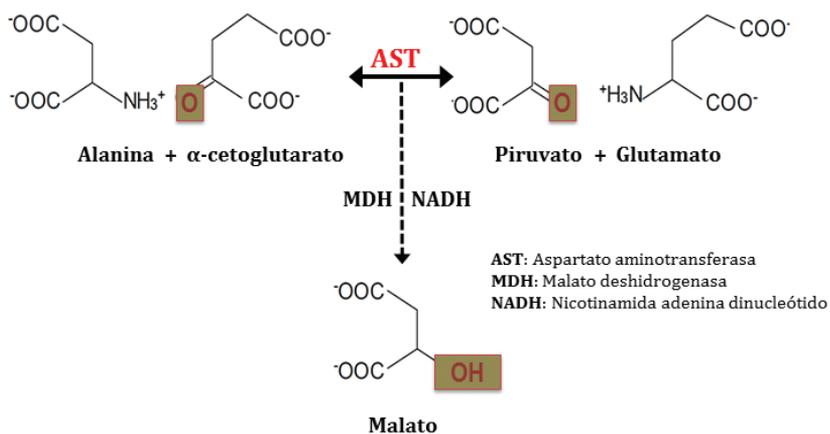


Figura 5.4. Fundamento de la determinación de la actividad de AST.

#### 5.4.4. Procedimiento

Para la determinación de AST, seguir los pasos descritos en la Guía No. 12, para el análisis de ALT.

#### 5.4.5. Referencias

Dasgupta, A., 2015, Chapter 5 - Liver Enzymes as Alcohol Biomarkers, In: Dasgupta, A. (Ed.) Alcohol and its Biomarkers. Elsevier, San Diego, pp. 121-137.

Hutson, S., 2001, Structure and function of branched chain aminotransferases, In: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. Academic Press, pp. 175-206.

Izrailev, S., Farnum, M.A., 2004, Enzyme classification by ligand binding. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 57, 711-724.

#### **5.4.6. Actividades**

1. Determinar la concentración de cada muestra.
2. Interprete los resultados obtenidos.
3. Explique la relación diagnóstica ALT/AST.

## 5.5. GUÍA No. 14. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA ALCALINA (FAL) EN PLASMA SANGUÍNEO

### 5.5.1. Objetivos

- Conocer los fundamentos teóricos de la determinación de FAL.
- Adquirir destrezas en la realización de la técnica.

### 5.5.2. Introducción

Las fosfatasas alcalinas constituyen un gran número de enzimas encontradas en casi todas las especies de plantas, animales y en seres humanos, cuatro isoenzimas de FAL son codificadas por diferentes genes. Tres de las isoenzimas se expresan en una distribución específica de tejido (intestinal, la placenta y las células germinales) (cromosoma 2). La cuarta isoenzima FAL es ubicua, pero es especialmente abundante en tejido hepático, esquelético, y el tejido renal (hígado/hueso/riñón FAL) (cromosoma1), el producto de este gen es una enzima unida a la membrana glicosilada que no se expresa en cualquier tejido particular y está, por lo tanto, referido como la forma no específica de tejido de la enzima. Estas enzimas catalizan la ruptura hidrolítica de muchos compuestos de fosfato orgánicos.

La función fisiológica exacta de las fosfatasas alcalinas no se conoce. Una función propuesta de esta forma de la enzima es la mineralización de la matriz, sin embargo, los ratones que carecen de una forma funcional de la misma muestran el desarrollo esquelético normal. Esta enzima ha sido vinculada directamente a la hipofosfatasa.

La aplicación de esta como un nuevo método para el diagnóstico de la enfermedad se inició en 1930 con la observación por Morrell Roberts en pacientes con enfermedad hepática obstructiva. La localización de la FAL en el canal de Hering, que confluye en los ductos biliares del espacio portal, la convierten en un indicador de la colestasis, distinguiendo de otro tipo de lesión hepatocelular.

## Fundamento del método

La determinación es realizada por medio de un ensayo cinético, empleando el 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) para medir la actividad de la FAL en suero o plasma.

En la reacción, la FAL cataliza la hidrólisis sustrato éster de fosfato, p-nitrofenilfosfato a p-nitrofenol y fosfato. Esta reacción se produce a un pH alcalino. El cambio en la absorbancia es directamente proporcional a la actividad de la FAL a una longitud de onda de 410 nm durante un intervalo de tiempo fijo.

### 5.5.3. Materiales reactivos y equipos

- Materiales

Micropipetas de 10-20  $\mu\text{L}$  y 1000  $\mu\text{L}$

Puntas

Gradilla

Tubos de centrifuga de 15 mL

Guantes

- Reactivos

Reactivo A:

2-Amino-2-metil-1-propanol 0,4 mol/L

Sulfato de zinc 1,2 mmol/L

Ácido N-hidroxietil-etilenodiaminotriacético 2,5 mmol/L

Acetato de magnesio 2,5 mmol/L, pH 10,4

Reactivo B:

4-Nitrofenilfosfato 60 mmol/L

Sueros control de calidad

- Preparación de reactivos

Mezclar en una proporción: 4 mL de reactivo A y 1 mL de reactivo B

- Equipos

Baño serológico

Espectrofotómetro

#### 5.5.4. Procedimiento

##### Recomendaciones

Ver las recomendaciones para la determinación de ALT (Guía No 12).

**Paso 1:** La sangre total debe centrifugarse a 4000 rpm durante cinco minutos para la obtención de suero o plasma (**Figura 5.5**).

**Paso 2:** Prepare los equipos según las condiciones descritas en la **Tabla 5.6**.

**Tabla 5.6.** Condiciones instrumentales de los equipos.

Baño serológico	Espectrómetro
Temperatura 37 °C.	Temperatura: 37 °C.
	Incubación por 10 segundos, seguido de una lectura inicial y tres lecturas cada minuto
	Filtro: 410 nm.

**Paso 3.** Pipetear 8  $\mu\text{L}$  las muestras o los controles de calidad en tubos de centrifuga de 1.5 mL empleando una micropiteta de 10  $\mu\text{L}$  (**Tabla 5.7**).

**Tabla 5.7.** Preparación de preparación de muestras y controles para el ensayo.

Reactivos y muestras	Control I ( $\mu\text{L}$ )	Control II ( $\mu\text{L}$ )	Muestra ( $\mu\text{L}$ )
Muestras y controles	8		
		8	
			8
Reactivo de trabajo	400	400	400

**Paso 4.** Incubar a 37 °C el reactivo de trabajo de FAL.

**Paso 5.** Solo cuando el equipo espectrofotómetro esté listo según las indicaciones descritas anteriormente se procederá a adicionar el reactivo de trabajo de FAL. La lectura debe realizarse una vez el reactivo haya sido mezclado con la muestra (**Figura 5.5**).

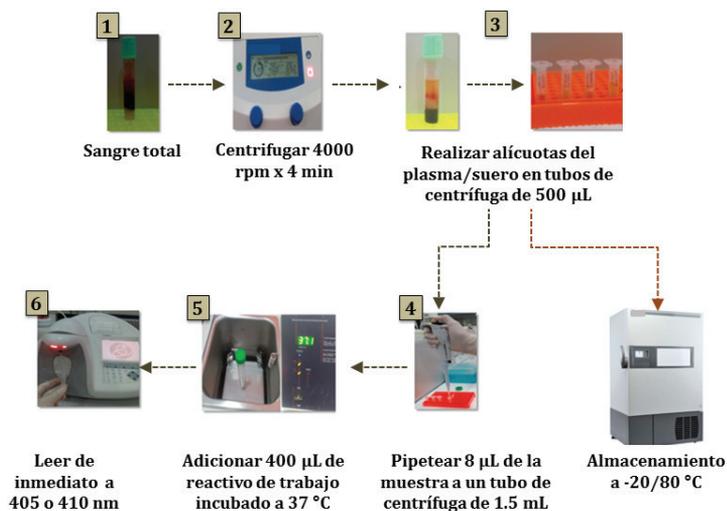


Figura 5.5. Procedimiento gráfico de la determinación de FAL.

**Paso 6.** Luego de un minuto de incubación, el equipo realizará una lectura cada minuto, en total serán cuatro lecturas. Con las absorbancias obtenidas el estudiante deberá calcular el incremento de las absorbancias por minuto ( $\Delta A/\text{min}$ ). La concentración de la muestra será determinada mediante la siguiente formula.

$$\Delta \text{Absorbancia} / \text{min} = \frac{V_t \times 10^6}{\epsilon \times l \times V_s}$$

El coeficiente de absorción molar ( $\epsilon$ ) del 4-nitrofenol a 405 nm es 18.450, el paso de luz ( $l$ ) es 1 cm, el volumen total de reacción ( $V_t$ ) es 1,02, el volumen de muestra ( $V_s$ ) es 0,02, y 1 U/L equivale a 0,0166  $\mu\text{kat/L}$ . los factores que se deducen de la formula son 2764 U/L o 46.08  $\mu\text{kat/L}$ .

**Nota.** Para determinar la concentración de las muestras, también puede calibrar el equipo empleando sueros calibradores certificados, seguido del monitoreo diario de sueros control de calidad nivel I y nivel II.

### 5.5.5. Referencias

Yang, X., Schnackenberg, L.K., Shi, Q., Salminen, W.F. /2014). Chapter 13 - Hepatic toxicity biomarkers. In: Gupta, R.C. (Ed.) Biomarkers in Toxicology. Academic Press, Boston, pp. 241-259.

Macarulla J; Goñi J. Bioquímica humana. 2 Edición. Editorial Reverte S.A.(1994);  
Protocols for the preparation of blood plasma and serum. Buffet, C., 2014. Elevación de las transaminasas en hepatología. EMC-Tratado de Medicina 18, 1-7.

### 5.5.6. Actividades

1. Determinar la concentración de cada muestra.
2. Interprete los resultados obtenidos.
3. Realice un esquema con las estructuras químicas donde explique el fundamento del método.
4. Realizar un cuadro donde explique las ventajas y desventajas de la utilización de este biomarcador.

## 5.6. GUÍA No.15. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GAMMA GLUTAMIL TRANSFERASA ( $\gamma$ -GT) EN PLASMA SANGUÍNEO.

### 5.6.1. Objetivos

- Conocer los fundamentos teóricos de la determinación de  $\gamma$ -GT.
- Adquirir destrezas en la aplicación de la técnica.

### 5.6.2. Introducción

La  $\gamma$ -GT se encuentra en hepatocitos y células epiteliales biliares. La medición de suero o plasma de  $\gamma$ -glutamyl transferasa proporciona un indicador muy sensible de la presencia o ausencia de enfermedad hepatobiliar alcohólica. Pero la utilidad de esta prueba está limitada por su falta de especificidad. De igual forma estas han sido reportadas en una amplia variedad de condiciones clínicas, incluyendo la enfermedad pancreática, infarto de miocardio, insuficiencia renal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes y alcoholismo.

La  $\gamma$ -GT cataliza la transferencia del resto glutamilo desde el sustrato hasta glicilglicina, de ese modo la liberación de 5 -amino-2- nitrobenzoato de metilo, que también absorbe a 405 nm. La actividad de  $\gamma$ -GT se expresa como Unidades Internacionales por Litros (U/L).

### 5.6.3. Materiales reactivos y equipos

- Materiales

Micropipetas de 10-20  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L

Puntas

Gradilla

Tubos de centrifuga de 15 mL

Guantes

Bolsas rojas

- Reactivos

Reactivo A:

Glicilglicina 206,25 mmol/L

Hidróxido sódico 130 mmol/L, pH 7,9.

Reactivo B:

$\gamma$ -Glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida 32,5 mmol/L.

Reactivo de trabajo: Adicionar el contenido del frasco B en el frasco A. Agitar suavemente. Si se desea preparar otros volúmenes, mezclar en la proporción: 4 mL de Reactivo A + 1 mL de Reactivo B. Estable dos meses a 2-8 °C.

- Equipos  
Baño serológico  
Espectrofotómetro

#### **5.6.4. Procedimiento**

##### ***Recomendaciones***

La presencia de partículas, turbidez, absorbancia del blanco superior a 1000 a 410 nm o 1450 a 405 nm indican deterioro del reactivo.

En caso de contacto con los ojos, lávense de inmediato con abundantemente agua y acuda a un médico en caso de ser necesario.

Una vez realizada la toma de muestra la enzima es estable por cinco días a temperaturas de 2-8 °C, su tiempo de vida se prolonga a -80 °C.

**Paso 1.** La sangre total debe centrifugarse a 4000 rpm por cinco minutos, una vez transcurrido el tiempo separe en sobrenadante a tubos de centrifuga de 1.5 mL con el cuidado de no mezclar con los eritrocitos (**Figura 5.6**).

**Paso 2.** Preparar los equipos de la siguiente forma.

- Baño serológico:  
Temperatura: 37 °C.
- Espectrofotómetro:  
Temperatura: 37 °C.  
Incubación: 10 segundos.  
Tres lecturas a intervalos de 60 segundos.  
Filtro: 410 nm.

El equipo está diseñado para leer la concentración de modo directo, no obstante los estudiantes leerán en el modo de absorbancia para luego por medio de cálculos matemáticos obtener la concentración.

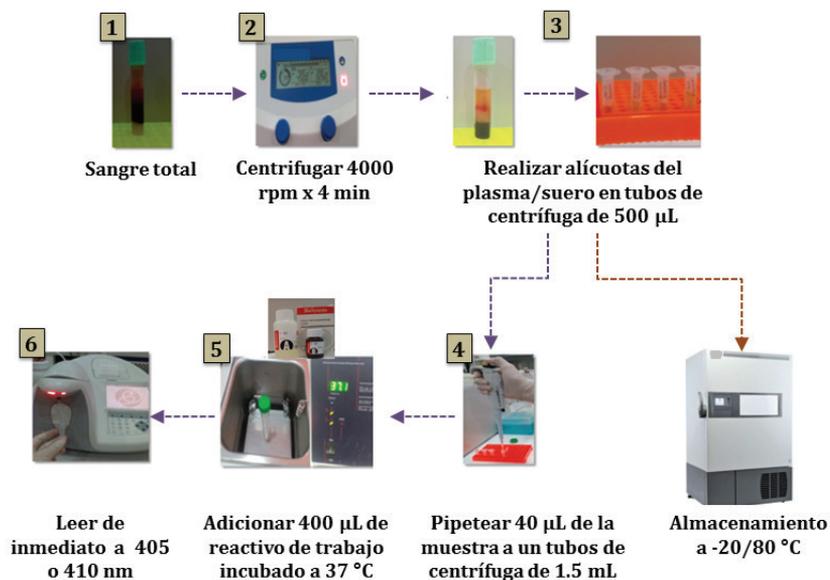
**Paso 3.** Pipetear 40  $\mu\text{L}$  de la muestra en tubos de centrifuga de 1.5 mL.

**Paso 4.** Incubar a 37  $^{\circ}\text{C}$  el reactivo de trabajo en el ba $\tilde{n}$ o serol $\acute{o}$ gico.

**Paso 5.** Solo cuando el equipo est $\acute{e}$  listo seg $\acute{u}$ n las indicaciones descritas anteriormente se proceder $\acute{a}$  a adicionar el 400  $\mu\text{L}$  de reactivo. La lectura debe realizarse una vez el reactivo haya sido mezclado con la muestra (**Tabla 5.8**).

**Tabla 5.8.** Preparaci $\acute{o}$ n de preparaci $\acute{o}$ n de muestras y controles para el ensayo.

Reactivos y muestras	Control I ( $\mu\text{L}$ )	Control II ( $\mu\text{L}$ )	Muestra ( $\mu\text{L}$ )
Muestras y controles	40		
		40	
			40
Reactivo de trabajo	400	400	400



**Figura 5.6.** Procedimiento gr $\acute{a}$ fico de la determinaci3n de  $\gamma$ - glutamil transferasa.

**Paso 6.** Luego de un minuto de incubaci3n, el equipo realizar $\acute{a}$  una lectura cada minuto, en total ser $\acute{a}$ n cuatro lecturas. Con las absorbancias obtenidas calcule el incremento de las absorbancias por minutos ( $\Delta A/\text{min}$ ). La concentraci3n ser $\acute{a}$  obtenida multiplicando por el factor (2764 U/L) o empleando sueros calibradores certificados.

**Nota.** Para determinar la concentración de las muestras, calibre el equipo empleando sueros calibradores certificados, seguido del monitoreo diario de sueros control de calidad nivel I y nivel II.

El coeficiente de absorción molar de la 3-carboxi-4-nitroanilina es 7.908 a 410 nm y 9.900 a 405 nm, el paso de luz (l) es 1 cm, el volumen total de reacción (Vt) es 1,1, el volumen de muestra (Vs) es 0,1, y 1 U/L equivale a 16,67 nkat/L. Se deducen los siguientes factores para calcular la concentración catalítica: 1111 U/L o 18520  $\mu$ kat/L a 405 nm y 1391 o 23188  $\mu$ kat/L.

### 5.6.5. Referencias

Dasgupta, A. (2015). Chapter 5 - Liver enzymes as alcohol biomarkers, In: Dasgupta, A. (Ed.) Alcohol and its Biomarkers. Elsevier, San Diego, pp. 121-137.

Biolinke Guía de laboratorio disponible de gamma glutamil transferasa. Disponible en [http://www.biolinker.com.ar/productos/PDF\\_BIO/11533-11568%20GPT%20\(ALT\).pdf](http://www.biolinker.com.ar/productos/PDF_BIO/11533-11568%20GPT%20(ALT).pdf)

### 5.6.6. Actividades

1. Interprete los resultados obtenidos.
2. Realice un esquema donde explique el fundamento del método de la gama glutamil transferasa con las estructuras químicas.
3. Realice un cuadro donde explique las ventajas y desventajas de la utilización de este biomarcador.
4. Elabore un cuadro de investigaciones que resalten la utilidad de este marcador bioquímico.

# CAPÍTULO 6

## ENZIMAS ANTIOXIDANTES

*Maricela Viola Rhenals*

### CONTENIDO

<b>6.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>141</b>
6.1.1. Superóxido dismutasa (SOD)	143
6.1.2. Manganeso superóxido dismutasa (MnSOD)	143
6.1.3. Cobre-Zinc superóxido dismutasa (Cu/ZnSOD)	143
6.1.4. Catalasa (CAT)	144
6.1.5. Glutación peroxidasa	144
<b>6.2. REFERENCIAS</b>	<b>145</b>
<b>6.3. GUÍA No. 16. ENZIMAS ANTIOXIDANTES</b>	<b>147</b>
6.3.1. Objetivo	147
6.3.2. Introducción	147
6.3.3. Materiales, reactivos y equipos	147
6.3.4. Procedimiento	148
6.3.5. Referencias	152
6.3.6. Actividades	152

## **FIGURAS**

Figura 6.1. Secuencia de reacciones para la formación de especies reactivas de oxígeno en la célula	142
Figura 6.2. Interrelación del mecanismo de defensa antioxidante enzimático y no enzimático en la remoción de ERO	143

## **TABLAS**

Tabla 6.1. Preparación de gel de separación	149
Tabla 6.2. Preparación de gel de apilamiento	149

## 6.1. INTRODUCCIÓN

El balance entre mecanismos prooxidantes y antioxidantes es esencial para la vida en sistemas aeróbicos. El estrés oxidativo ocurre como consecuencia de un desbalance entre antioxidantes y prooxidantes. Si los mecanismos de defensa antioxidante se inhabilitan, la sobreproducción descontrolada de prooxidantes resulta en daños ocasionados por radicales libres, sobre estructuras celulares como proteínas, lípidos, ácido desoxirribonucleico (ADN) y carbohidratos, produciéndose una posible alteración en las funciones celulares.

Bajo condiciones normales, la célula reacciona rápidamente frente a un desbalance redox, mediante arresto del crecimiento específicamente en el ciclo celular, aumentando o disminuyendo la trascrición de genes, iniciando señalización intracelular, o induciendo el mecanismo de defensa antioxidante. Es así como actúan de manera concertada para detoxificar estas especies, pero cuando ocurre un desbalance y el estrés oxidativo persiste, ocurre daño a biomoléculas e incluso al genoma.

El número de posibles fuentes de estrés oxidativo es grande e incluye eventos como:

- a. Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) por la fosforilación oxidativa mitocondrial.
- b. Exposición a radiación ionizante.
- c. Metabolismo de compuestos exógenos, algunos de los cuales son empleados en terapia anticancerígena como adriamicina, cis-platino, entre otros.
- d. Procesos metabólicos patológicos como envejecimiento, alzheimer y cáncer.

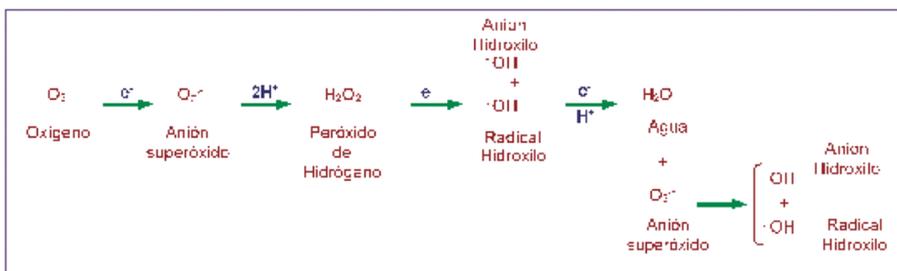
Entre los mecanismos prooxidantes está la generación de ERO que son un grupo de moléculas que pueden ser agentes oxidantes o fácilmente convertidos a radicales; son intermediarios de la reducción univalente del oxígeno, cuya fuente principal es la cadena respiratoria en la mitocondria. En las células aeróbicas, las fuentes más importantes de producción de  $O_2^{\cdot-}$  son la cadena de transporte de electrones en la mitocondria y el retículo endoplasmático.

Las ERO pueden ser divididas en dos categorías: Radicales libres capaces de existir independientemente, contienen uno o más electrones desapareados como el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), anión hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y anión radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )

y especies no radicales que son moléculas con una fuerte capacidad oxidante. Algunos de estos compuestos son el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), ozono ( $O_3$ ), oxígeno singlete ( $^1O_2$ ).

Cuando los radicales libres reaccionan con los no radicales, el resultado es un nuevo radical que inicia una reacción en cadena de formación de radicales libres.

Debido a los efectos dañinos de las especies reactivas de oxígeno, los organismos aeróbicos han desarrollado un amplio arreglo de diferentes mecanismos de defensa antioxidantes para mantener la estabilidad celular. Químicamente, los antioxidantes son compuestos capaces de neutralizar a las especies reactivas. Los compuestos antioxidantes tienen un amplio rango de actividades biológicas que incluyen la inhibición de la generación de especies reactivas de oxígeno directa o indirectamente por captación de radicales libres y por ende alteran el potencial redox celular o la capacidad de modular la apoptosis mediada por estrés oxidativo.



**Figura 6.1.** Secuencia de reacciones para la formación de especies reactivas de oxígeno en la célula.

Los mecanismos de defensa antioxidante pueden clasificarse en enzimáticos y no enzimáticos; estos se interrelacionan para proteger a la célula de la toxicidad por oxígeno, como se observa en el gráfico de la página siguiente.

Las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa son el esqueleto de los sistemas de defensa antioxidante celular. La superóxido dismutasa cataliza la dismutación del anión radical superóxido a peróxido de hidrógeno, que es detoxificado por catalasa en una reacción redox que produce agua y oxígeno. La enzima Glutatión peroxidasa reduce tanto peróxido como hidroperóxidos orgánicos usando glutatión reducido (GSH) como donante de electrones. En ausencia de estrés oxidativo, las especies reactivas de oxígeno son mantenidas a bajas concentraciones a través de la acción coordinada de estas tres enzimas.

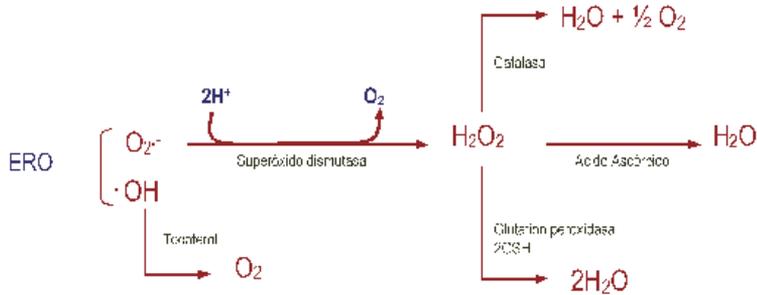


Figura 6.2 Interrelación del mecanismo de defensa antioxidante enzimático y no enzimático en la remoción de ERO.

### 6.1.1. Superóxido dismutasa (SOD)

Esta enzima destruye los radicales superóxido produciendo peróxido de hidrógeno, que es menos reactivo, mediante la dismutación del radical por oxidación y reducción sucesiva del metal de transición en el sitio activo por un mecanismo tipo ping pong, a alta velocidad.



En los humanos existen tres enzimas en la célula que son MnSOD, Cu/ZnSOD y EcSOD (Superóxido dismutasa extracelular), las cuales poseen iones metálicos como cofactores.

### 6.1.2. Manganeso superóxido dismutasa (MnSOD)

Es un homotetrámero de 99 KDa que contiene un átomo de manganeso por subunidad se reduce de Mn(III) a Mn(II) y regresa a Mn(III) durante los dos pasos de dismutación de superóxido. La cadena respiratoria en la mitocondria es la principal fuente de radicales de oxígeno y MnSOD es una enzima localizada en este organelo. La expresión de MnSOD es esencial para la supervivencia de organismos aeróbicos y el desarrollo de resistencia celular a toxicidad mediada por radicales de oxígeno.

### 6.1.3. Cobre-Zinc superóxido dismutasa (Cu/ZnSOD)

Es una enzima conservada a través de la evolución, la cual usualmente tiene dos subunidades idénticas de 32 KDa, cada una de ellas con un grupo de metales en

el sitio activo, que contiene un átomo de cobre y uno de zinc puenteados por un ligando común Histidina 61. Esta enzima se encuentra principalmente en el citosol (McCord y Fridovich, 1969).

#### 6.1.4. Catalasa (CAT)

Es una enzima tetramérica, que consiste en subunidades idénticas de 60 KDa, arregladas tetraédricamente, con cuatro grupos de ferriprotoporfirinas por molécula, y peso molecular cercano a 240 KDa (Peeters-Joris, 1975). Esta es una de las enzimas más eficientes que se conoce, tanto así que no puede ser saturada por peróxido de hidrógeno a cualquier concentración (Lledias, 1998). La CAT reacciona con peróxido de hidrógeno para formar agua y oxígeno molecular, como se observa en la siguiente ecuación;



El peróxido de hidrógeno es enzimáticamente catabolizado en organismos aeróbicos por CAT y varias peroxidasas como glutatión peroxidasa (GPx). La CAT protege a las células del peróxido generado dentro de ellas y aunque no es esencial para algunos tipos celulares, bajo condiciones normales es importante en la adquisición de tolerancia a estrés oxidativo (Hunt, 1998; Speranza, 1993).

#### 6.1.5. Glutatión peroxidasa (GPx)

Esta enzima cataliza la reducción de una variedad de hidroperóxidos y peróxido usando glutatión reducido como cofactor, como se observa en la ecuación.



Existen por lo menos cinco isoenzimas de GPx encontradas en mamíferos; su expresión está ampliamente distribuida en la célula y el nivel depende del tipo de tejido. La enzima tiene un peso aproximado de 80 KDa y contiene un residuo de selenocisteína en cada una de las cuatro subunidades idénticas que la forman, que es esencial para la actividad de la enzima. Aunque GPx comparte el sustrato peróxido con CAT, esta solamente puede reaccionar efectivamente con lípidos e hidroperóxidos orgánicos. El ciclo redox de glutatión es la principal fuente de protección contra bajos niveles de estrés oxidativo mientras que CAT es importante en protección contra estrés oxidativo severo.

El estudio de la expresión y la actividad de estas enzimas han ido creciendo con el paso de los años ya que se han convertido en importantes marcadores de enfermedades que involucran estrés oxidativo como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, entre otros.

## 6.2. REFERENCIAS

- Dreher, D., Junod, A. 1996. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur. J. Cancer*. 32A(1):30-38.
- Halliwell, B. 1996. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 24:1023-1027.
- Hunt, C., Sim, E., Sullivan, S., Featherstone, T., Golden, C., Kapp-Herr, C., Hock, R., Gomez, R., Parsian, A., Spitz, D. 1998. Genomic stability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. *Cancer Res.* 58:889-896.
- Lledias, F., Rangel, P., Hansberg, W. 1998. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* 273:10630-10637.
- Liu, M., Pelling, J., Ju, J., Chu, E., Brash, D. 1998. Antioxidant action via p53-mediated apoptosis. *Cancer Res.* 58:1723-1729.
- McCord, J., Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055.
- Mates, J., Sánchez-Jiménez, F. 2000. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 32:157-170.
- Mates, J., Sánchez-Jiménez, F. 1999. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Frontier. Biosci.* 4:339-345.
- Sagrasta, M.L., García, A., África de Madariaga, M., Mora, M. 2002. Antioxidant and pro-oxidant effect of thiolic compounds N-acetyl-L-cysteine and glutathione against free radical-induced lipid peroxidation. *Free Rad. Res.* 36(3):329-340.

- Shackerford. R., Kaufmann. W., Paules. R. 2000. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free. Rad. Biol. Med.* 28(9):1387-1404.
- Speranza. M., Bagley. A., Lynch. R. 1993. Cells enriched for catalase are sensitized to the toxicities of bleomycin, adriamycin and paraquat. *J. Biol. Chem.* 268:19039-19043.
- Weisiger. R. Fridovich. I. 1973. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial location. *J. Biol. Chem.* 248:4793-4796.

## GUÍA DE LABORATORIO

### CAPÍTULO 6

#### 6.3. GUÍA No. 16. ENZIMAS ANTIOXIDANTES

##### 6.3.1. Objetivo

- Determinar la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa en geles nativos de poliacrilamida.

##### 6.3.2. Introducción

Las enzimas antioxidantes constituyen la principal línea de defensa enzimática contra el exceso de radicales para que estos no ocasionen daño a las macromoléculas como proteínas, lípidos o ADN.

La determinación de la cantidad de estas enzimas a nivel celular es importante pero mucho más importante es determinar si estas están activas o no, debido a que mutaciones o cambios conformacionales pueden ocasionar que estas existan pero que sean incapaces de llevar a cabo sus reacciones catalíticas.

Mediante el empleo de la electroforesis en geles nativos de poliacrilamida, se puede determinar la actividad de la enzima permitiendo tener certeza de que los procesos de neutralización de especies reactivas radicales y no radicales son adecuados.

##### 6.3.3. Materiales, reactivos y equipos

- Materiales:  
Beakers de 50 mL, 100 mL  
Pipetas graduadas de 5 y 10 mL  
Micropipetas de 1000, 200 y 20  $\mu$ L  
Balones aforados de 500 y 1000 mL  
Cilindros graduados de 2000, 500 y 50 mL  
Frascos lavadores

- Reactivos:

Agua destilada  
Dodecil sulfato de sodio (SDS)  
N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED)  
Tris base  
Persulfato de sodio  
EDTA disódico  
Acido clorhídrico  
Sacarosa  
Riboflavina  
Glicerol  
Azul de bromofenol  
Glicina  
Azul de nitrotetrazolio (NBT)  
Cloruro férrico  
Ferricianuro de potasio  
Peróxido de hidrógeno  
Glutati3n oxidado  
NADPH  
Dicloroindolfenol-indofenol  
3-(4,5-dimetiltiazolil-2-)-2,5-difenil tetrazolio  
Acrilamida  
Bis-acrilamida  
Dodecil sulfato de sodio (SDS)

- Equipos:

Lámpara de luz blanca  
Cámara de electroforesis vertical  
Fuente de poder para electroforesis

#### **6.3.4. Procedimiento**

Para la determinación de la actividad de enzimas antioxidantes, una alícuota de más de 50 µg de proteína (previamente cuantificada por métodos como Bradford o Biuret) se trata en condiciones naturalizantes y se separan en un gel de poliacrilamida bajo condiciones nativas (sin SDS ni β-mercaptoetanol).

Preparar el gel de separación (30% acrilamida:8% bisacrilamida, solución tampón de separación Tris pH 8.8, agua destilada, N, N, N', N'-tetrametilendiamina (TEMED), 10% persulfato de amonio (AP) a la concentración deseada dependiendo de la actividad a realizar.

Para la actividad SOD se utiliza un gel 12%, para la actividad CAT se emplea un gel 8%, para la de GPx y Glutación reductasa se usa un gel 10%.

Después de gelificar, se somete a una preelectroforesis por 1 hora a 4°C y 20 mA en solución tampón de pre-electroforesis (0.1 M Tris pH 8.8, 1 mM EDTA). Después de la preelectroforesis el gel debe mantenerse a 4°C por lo menos por una hora, pero para mejores resultados de resolución, se incuba toda la noche.

### 6.3.4.1. Gel de separación

**Tabla 6.1.** Preparación de gel de separación.

Reactivos	8%	10%	12%
30% Acrilamida-Bisacrilamida	3.2 mL	4.05 mL	4.85 mL
Buffer de separación tris pH 8.8	1.5 mL	1.5 mL	1.875 mL
Agua destilada	7.3 mL	8.45 mL	5.65 mL
TEMED	6 µL	6 µL	6 µL
AP 10%	45 µL	45 µL	45 µL

Al día siguiente, se prepara el gel de apilamiento (30% acrilamida-8% bisacrilamida, solución tampón de apilamiento Tris pH 6.8, sacarosa 40%, riboflavina 0.004%, TEMED), se coloca bajo la iluminación de una luz fluorescente por 20 min aproximadamente para ayudar a la gelificación.

**Tabla 6.2.** Preparación de gel de apilamiento.

Reactivos	Gel de apilamiento
30% Acrilamida-Bisacrilamida	1.0 mL
Buffer de apilamiento Tris pH 6.8	1.6 mL
Sacarosa 40%	3.2 mL
Riboflavina 0.004%	800 µL
TEMED	4 µL

Las muestras se preparan diluyéndolas 1:1 con buffer de carga (Tris pH 6.8, Glicerol, azul de bromofenol 5%), luego son cargadas cada una en un pozo del gel y se procede a la corrida electroforética a 20 mA usando solución tampón de corrida (0.05 M Tris pH 6.8, 2 mM EDTA, 0.3 M glicina), el gel se deja

corriendo hasta que el colorante del solución tampón de carga llegue al final del gel de corrida.

#### **6.3.4.2. Actividad Superóxido Dismutasa (SOD)**

Para visualizar la actividad SOD:

- Incubar en oscuridad en una solución 2.43 mM azul nitrotetrazolio (NBT) por 20 min.
- Adicionar solución 0.14 M riboflavina, 0.28  $\mu$ M TEMED en 50 mM solución tampón fosfato pH 7.8 por 15 minutos.
- Descarta la solución anterior
- Adicionar agua destilada
- Inmediatamente, exponer a una luz fluorescente para que se desarrollen bandas acromáticas de actividad SOD, bajo un fondo azul oscuro.

Si se desean separar las dos enzimas (Cu/ZnSOD y MnSOD), se deja correr el gel por una hora más antes de la detección de proteínas por fluorescencia y la tinción.

#### **6.3.4.3. Actividad catalasa**

Para observar la actividad CAT:

- Incuba tres veces por 15 min cada uno con agua destilada.
- Incubar por 10 min en solución 0.003% peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )
- Realizar dos lavados con agua destilada
- Teñir con solución 2% cloruro férrico: 2% ferricianuro de potasio hasta la aparición de bandas acromáticas como consecuencia de la actividad CAT.
- Descartar la solución de tinción y se lava con agua destilada.

#### **6.3.4.4. Actividad Glutación peroxidasa**

Para observar la actividad GPx:

- Incubar tres veces por 15 min cada uno con agua destilada.
- Incubar por 10 min en solución 0.003% peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y 1mM Glutación.
- Realizar dos lavados con agua destilada.

- Teñir con solución 2% cloruro férrico: 2% ferricianuro de potasio hasta la aparición de bandas acromáticas como consecuencia de la actividad GPx.
- Descartar la solución de tinción y se lava con agua destilada.

#### 6.3.4.5. Actividad Glutati6n reductasa

Para observar la actividad:

- Incubar en 50 mL de una soluci6n que contiene GSSG 3.4mM, NADPH 0.36 mM, Diclorofenol-indofenol 0.052 mM, 22.8 mg de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2-)-2,5-difenil tetrazolium y Tris 250 mM pH 8.0, hasta la aparici6n de un fondo azul.
- Descartar la soluci6n de tinci6n.
- Lavar exhaustivamente con agua destilada.

#### 6.3.4.6. Preparaci6n de reactivos

##### *Acrilamida 30%-Bis-acrilamida 8%*

Acrilamida	60 g	
Bis-acrilamida	1.6 g	Vf: 200 mL
Diluir la acrilamida y la bisacrilamida por separado, luego adicionar lentamente la bisacrilamida a la acrilamida hasta que se disuelva totalmente, filtrar.		

##### *Buffer de separaci6n Tris pH 8.8*

Tris 1.5 M	90.85 g
EDTA dis6dico 8 mM	1.49 g
Agua destilada	c.s.p. 500 mL; ajustar el pH a 6.8

##### *Buffer de apilamiento Tris pH 6.8*

Tris 0.5 M	30.28 g
EDTA dis6dico 8 mM	1.49 g
Agua destilada	c.s.p. 500 mL, ajustar el pH a 6.8

##### *Buffer de corrida (PRE-ELECTROFORESIS)*

Tris	22.76 g
EDTA dis6dico	0.36 g
Agua destilada	c.s.p. 1L; ajustar pH a 8.8

### *Buffer de corrida (ELECTROFORESIS)*

Tris	6.06 g
Glicina	22.5 g
EDTA disódico	0.68 g
Agua destilada	c.s.p. 1 L; ajustar pH a 8.3

### *Buffer de carga:*

Buffer de apilamiento pH 6.8	10 mL
Glicerol	10 mL
Azul de bromofenol 5%	3-5 gotas

### **6.3.5. Referencias**

Beauchamp. C., Fridovich. I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44:276–287.

Speranza. M., Bagley. A., Lynch. R. 1993. Cells enriched for catalase are sensitized to the toxicities of bleomycin, adriamycin and paraquat. *J. Biol. Chem.* 268:19039-19043.

Sun Y, Elwell JH, Oberley LW. A simultaneous visualization of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase and catalase on polyacrylamide gels. *Free Rad Res Commun.* 1988; 5: 67–75.

### **6.3.6. Actividades**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, determine la presencia o ausencia de las diferentes enzimas en los geles colocando especial atención a las diferentes superóxido dismutasa presentes.

Responda las siguientes preguntas

1. ¿Qué es una enzima antioxidante?
2. ¿Investigue qué metodologías existen para la cuantificación de enzimas antioxidantes?
3. ¿Qué ventajas tiene la electroforesis nativa frente a la espectrofotometría en la cuantificación de la actividad enzimática?

4. ¿Cuáles enfermedades pueden estar asociadas a la alteración del estrés oxidativo?
5. ¿Porqué es importante conocer la actividad de estas enzimas?
6. ¿Qué alteraciones macromoleculares pueden ser ocasionadas por disminución de estas enzimas y por ende aumento en las especies reactivas en la células?
7. Explique el fundamento de la polimerización basada en sacarosa, riboflavina y luz para el gel de apilamiento en condiciones nativas.



# CAPÍTULO 7

## PROTEÍNAS

*Maricela Viola Rhenals*

### CONTENIDO

<b>7.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>157</b>
<b>7.2. REFERENCIAS</b>	<b>159</b>
<b>7.3. GUÍA No. 17. MÉTODO DE BIURET</b>	<b>160</b>
7.3.1. Objetivo	160
7.3.2. Introducción	160
7.2.3. Materiales, reactivos y equipos	161
7.3.4. Procedimiento	161
7.3.5. Referencias	162
7.3.6. Actividades	162
<b>7.4. GUÍA No. 18. MÉTODO DE BRADFORD</b>	<b>164</b>
7.4.1. Objetivo	164
7.4.2. Introducción	164
7.4.3. Materiales, reactivos y equipos	165
7.4.4. Procedimiento	165
7.4.5. Referencias	166
7.4.6. Actividades	166
<b>7.5. GUÍA No. 19. MÉTODO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO</b>	<b>168</b>
7.5.1. Objetivo	168
7.5.2. Introducción	168
7.5.3. Materiales, reactivos y equipos	169
7.5.4. Procedimiento	169
7.5.5. Referencias	170
7.5.6. Actividades	170

## FIGURAS

Figura 7.1. Estructura química del ácido bicinconínico (2-(4-carboxyquinolin-2-yl) quinoline-4-carboxylic acid)	168
---	-----

## TABLAS

Tabla 7.1. Métodos de cuantificación de proteínas	158
Tabla 7.2. Concentraciones a utilizar en la siembra del blanco, patrón y muestra en la placa de 96 pozos por duplicado, para la cuantificación de proteínas	162
Tabla 7.3. Realización de curva estándar de BSA Reactivo de Bradford	166
Tabla 7.4. Curva estándar de BSA con reactivo ácido bicinconínico	169

## 7.1. INTRODUCCIÓN

Las proteínas son macromoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos enlazados uno a otro por enlaces peptídicos; estas son determinadas genéticamente, es decir, los genes determinan que proteínas tendrá cada individuo.

En la naturaleza son moléculas abundantes con múltiples funciones dentro de las que se destacan: función enzimática, función hormonal, reconocimiento de señales, transporte, estructural, defensa, movimiento, reserva y de regulación.

La naturaleza y función de una proteína está determinada por la secuencia de aminoácidos que está en el ADN. Existen en la naturaleza veinte aminoácidos que hacen parte de las proteínas, los cuales difieren en la cadena lateral.

Esta cadena lateral, es también importante para la cuantificación de proteínas por algunas metodologías, de las cuales la más importante es la espectrofotométrica en la que se determina cuanta proteína, hay en una muestra por su absorción a 280 nm, que es debido a los aminoácidos aromáticos los cuales pueden deslocalizar electrones y absorber energía.

Dentro de las características que poseen las proteínas están, que son moléculas solubles, específicas y poseen efecto tampón. Todas estas características son debido a los grupos funcionales que hacen parte de los aminoácidos que la conforman.

Además de los enlaces peptídicos, las proteínas son estabilizadas por otras interacciones como los puentes de hidrógeno, las fuerzas de Van der Waals.

Debido a su gran importancia para los seres vivos, la determinación proteica es uno de las más comunes determinaciones que se realizan no solo en investigación bioquímica sino en muchas otras áreas relacionadas como alimentos, biotecnología, farmacia, entre otros.

Existen muchos métodos para cuantificar proteínas en muestras biológicas; siendo uno de los más antiguos el método Kjeldahl que se basa en la determinación del nitrógeno total en una muestra, luego de una digestión ácida. En la actualidad hay métodos más sencillos basados en la capacidad de formar complejos coloreados los cuales pueden ser cuantificados con la ayuda de un espectrofotómetro, como los siguientes:

1. Método de Bradford.
2. Método de Biuret.
3. Método del ácido bicinconínico.

La elección de un método adecuado depende de factores como:

1. La cantidad total de proteína presente en la muestra.
2. La concentración de la proteína.
3. La especificidad del método.
4. La presencia de sustancias que pueden interferir generalmente detergentes u otras macromoléculas.
5. La facilidad y reproducibilidad del método.

En la cuantificación de proteínas de muestras biológicas es importante tener en cuenta que durante los proceso de extracción proteica se emplean detergentes los cuales podrían ocasionar interferencias con algunas de las metodologías más empleadas. Algunos de los compuestos que interfieren son: EDTA 1 M, Tritón X-100, SDS 20%, por lo que es necesario incluirlos en la curva estándar, lo que usualmente se realiza adicionando la solución de extracción de proteínas. Una comparación de los métodos empleados se muestra en la tabla 7.1:

**Tabla 7.1.** Métodos de cuantificación de proteínas

Método	Tipo de ensayo (nm para su detección)	Sensibilidad	Fundamento	Ventajas y/o desventajas
Bradford – Azul de Coomassie	595	1 µg/mL – 1.5 mg/mL	Reacción de aminoácidos con el colorante cambiando de color café a azul	No compatible con detergentes, ensayo rápido, estable en el tiempo
Nano Orange	Exc 485 Em 590	10 ng/mL – 10 mg/mL	Reactivo fluorescente en presencia de proteínas	Ensayo rápido y preciso, compatible con agentes reductores
Ácido bicinconínico	562	0.5 µg/mL – 1.2 µg/mL	El cobre es reducido en medio alcalino formando un complejo púrpura	Compatible con detergentes, solventes orgánicos, y agentes reductores, no estable en el tiempo

Lowry	750	1 µg/mL – 1.5 mg/mL	El cobre es reducido en medio alcalino formando un complejo azul	Lento, no compatible con detergentes o agentes reductores
Biuret		1 µg/mL – 1.5 mg/mL	El cobre es reducido en medio alcalino formando un complejo púrpura	Sensible, estable en el tiempo
Absorción UV	280	1 µg/mL – 2 mg/mL	Absorción del enlace peptídico dependiendo de aminoácidos aromáticos	Sensibilidad depende de los aminoácidos aromáticos, no es destructivo, bajo costo

## 7.2. REFERENCIAS

- Bradford. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-251.
- Brenner AJ and Harris ED. A quantitative test for Copper using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1995; 226(1):80-84.
- Blank. AB. Determination of microquantities of thiosulfate by kinetic method. *Talanta.* 1998; 47(1):213-221.
- Itzhaki. R; Gill. D. A micro-biuret method for estimating proteins. *Anal Biochem.* 1964. 9(4):401-410.
- Nelson. D., Cox. M. Lehninger: Principios de bioquímica. 2000. Sarvier Editora, Porto Alegre, RS.
- STRYER, L. 2004. Bioquímica. 5ª Edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW. 2000. Fundamentos de bioquímica. ARTMED Editora. Porto Alegre, RS.

# GUÍAS DE LABORATORIO

## CAPÍTULO 7

### 7.3. GUÍA No. 17. MÉTODO DE BIURET

#### 7.3.1. Objetivo

- Cuantificar proteínas en muestras biológicas como plasma, suero, saliva y/o tejido empleando el método de Biuret.

#### 7.3.2. Introducción

El método de Biuret es el análisis utilizado para determinar proteínas séricas totales; se basa en que todas las proteínas contienen un gran número de enlaces peptídicos; estos enlaces reaccionan con los iones cobre en un medio moderadamente alcalino formando un complejo coloreado. El enlace coordinado de esta reacción se da entre el ión cobre y los pares libres del nitrógeno del enlace peptídico. El reactivo de Biuret (color azul) se obtiene por reacción entre hidróxido de sodio (NaOH) o potasio (KOH) con sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) junto con tartrato de sodio y potasio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ). En presencia de proteínas este reactivo pasa del color azul a violeta o azul violáceo. La intensidad del color dependerá de la cantidad de proteína presente. Reacción entre reactivo y los enlaces peptídicos de las proteínas.

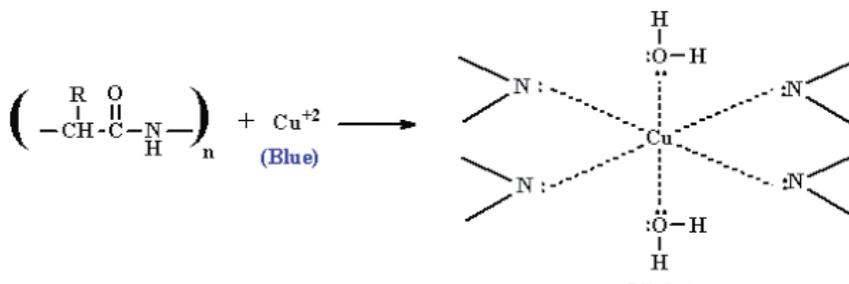


Figura tomada de: <http://people.uwplatt.edu/~sundin/351/351h-pro.htm>

El método de Biuret es un análisis general para las proteínas. Cuando una proteína reacciona con sulfato de cobre (II) (azul), como resultado, se forma un complejo de color violeta.

Este es un método sensible, que no presenta interferencias debidas a detergentes; el complejo coloreado formado es estable durante varias horas.

### 7.3.3. Materiales, reactivos y equipos

- Materiales

Micropipetas de 1000, 200, 20 y 2  $\mu$ L.

Tubos de ensayo.

Tubos eppendorf de 0.5 y 1.5 mL.

Gradillas para tubos de ensayo.

Gradillas para tubos eppendorf.

Placas de 96 pozos fondo plano transparente.

Beaker de 50 mL.

Frasco lavador.

Guantes plásticos.

- Reactivos

Reactivo de Biuret.

Albúmina de suero bovino (BSA).

Agua destilada.

Muestras biológicas: plasma, suero, saliva y tejido.

- Equipos

Espectrofotómetro UV-Vis.

### 7.3.4. Procedimiento

Para el desarrollo de este ensayo se seguirán los siguientes condiciones:

- Mantener las muestras a una temperatura de 4 °C, durante todo el ensayo.
- Tomar una placa de 96 pozos y sembrar por duplicado el blanco, patrón (estándar de BSA a una concentración conocida) y la muestra (suero, plasma, saliva y tejido). La siembra de estos se hará según lo indicado en la siguiente tabla:

**Tabla 7.2.** Concentraciones a utilizar en la siembra del blanco, patrón y muestra en la placa de 96 pozos por duplicado, para la cuantificación de proteínas.

	Blanco $\mu\text{L}$	Patrón $\mu\text{L}$	Muestra $\mu\text{L}$
Agua destilada	5		
Patrón proteína BSA 20 mg/mL		5	
Muestra			5
Reactivo de Biuret	250	250	250

- Una vez terminada la siembra, dejar en reposo por diez minutos a temperatura ambiente. El color es estable durante al menos dos horas.
- Leer la placa a 545 nm.
- Para la realización de los cálculos se utilizará la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Abs Muestra}}{\text{Abs Patrón}} \times C \text{ Patrón} = C \text{ Muestra}$$

Dónde: Abs muestra es la absorbancia de la muestra a 545 nm  
 Abs patrón es la absorbancia del patrón a 545 nm  
 C patrón es la concentración del patrón  
 C muestra es la concentración de la muestra

### 7.3.5. Referencias

Itzhaki. R; Gill. D. A micro-biuret method for estimating proteins. *Anal Biochem.* 1964. 9(4):401-410.

### 7.3.6. Actividades

A partir de los datos de absorbancia o densidad óptica arrojados después de la lectura para cada metodología realizar el cálculo de la cantidad de proteínas presente en la muestra.

Responda las siguientes preguntas

1. ¿Cuáles son las principales proteínas que se encuentran en la sangre?
2. ¿Qué proteínas pueden encontrarse en saliva y explique su importancia?
3. ¿Cuáles son los valores de referencia para la concentración de proteínas en suero sanguíneo?

4. ¿Qué es la hipoproteinemia y cuáles enfermedades están asociadas con esta?
5. ¿Indica en qué casos se puede evidenciar proteínas alteradas en orina?
6. ¿Porqué es importante cuantificar proteínas en un tejido?
7. ¿Qué métodos se pueden emplear para el trabajo en el laboratorio de bioquímica que necesiten previamente la cuantificación de proteína en la muestra?

## 7.4. GUÍA No. 18. MÉTODO DE BRADFORD

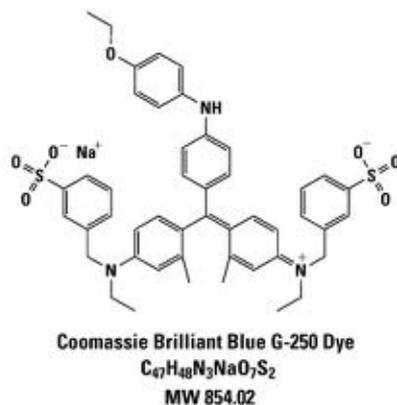
### 7.4.1. Objetivo

- Cuantificar proteínas en muestras biológicas como plasma, suero, saliva y/o tejido empleando el método de Bradford.

### 7.4.2. Introducción

El ensayo de Bradford es un método de determinación de proteínas que involucra la unión del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 (CCB G-250) a proteínas. Este colorante existe en tres formas: catiónica (rojo), neutro (verde) y aniónico (azul). Bajo condiciones ácidas, el colorante está en la forma catiónica roja, doblemente protonado (Abs max = 470 nm). Sin embargo, cuando el colorante se une a la proteína, este es convertido a la forma azul no protonada estable (Abs max = 595 nm).

Estudios realizados han evidenciado que este compuesto interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos.



Estructura química del colorante Coomassie brilliant blue G-250 (CCB-250).

Durante la formación de este complejo, dos tipos de interacción se llevan a cabo: la forma roja de colorante dona sus electrones libres a los grupos ionizables en la proteína, lo que provoca una interrupción del estado nativo de la proteína, por consiguiente, la exposición de sus bolsillos hidrófobos. Estos bolsillos en

la estructura terciaria de la proteína se unen de forma no covalente a la región no polar del colorante a través de fuerzas de Van der Waals. Dicha unión se ve reforzada por la interacción iónica entre los dos.

Este es un método sensible, que presenta interferencias debidas a detergentes; el complejo coloreado formado es estable durante varias semanas.

### 7.4.3. Materiales, reactivos y equipos

- Materiales

Micropipetas de 1000, 200, 20 y 2  $\mu\text{L}$ .

Tubos de ensayo.

Tubos eppendorf de 0,5 y 1,5 mL.

Gradillas para tubos de ensayo.

Gradillas para tubos eppendorf.

Placas de 96 pozos fondo plano transparente.

Beaker de 50 mL.

Frasco lavador.

Guantes plásticos.

- Reactivos

Reactivo de Bradford.

Albúmina de suero bovino (BSA).

Agua destilada.

Muestras biológicas: Plasma, suero, saliva, tejido.

- Equipos

Espectrofotómetro UV-Vis

### 7.4.4. Procedimiento

Para el desarrollo de este ensayo se seguirá los siguientes pasos:

- Tomar nueve tubos de ensayo y rotularlos como: blanco, 2, 8, 12 y 16  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (estándares de BSA) y muestras (plasma, suero, saliva y tejido). Los estándares de BSA se preparan a partir de una solución patrón de 2 mg/mL de BSA.
- A cada tubo de ensayo se le adicionará según lo estipulado en la siguiente tabla:

**Tabla 7.3.** Realización de curva estándar de BSA Reactivo de Bradford.

	Agua destilada ( $\mu\text{L}$ )	BSA 2 mg/mL ( $\mu\text{L}$ )	Muestra ( $\mu\text{L}$ )	Reactivo de Bradford (mL)
<b>Blanco</b>	99			1
<b>Curva standard BSA</b>				
4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	97	2		1
8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	95	4		1
12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	93	6		1
16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	91	8		1
<b>Muestra</b>	99		1	1

- Sembrar por duplicado en una placa de 96 pozos el blanco, los estándares y las muestras.
- Leer absorbancia a 595 nm
- Los cálculos se realizarán con la ecuación obtenida de la curva de los estándares de BSA.

**Nota:** El reactivo de Bradford se obtiene de la mezcla de CCB-G250,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  etanol puro y agua destilada.

#### 7.4.5. Referencias

Bradford. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-251.

#### 7.4.6. Actividades

A partir de los datos de absorbancia o densidad óptica arrojados después de la lectura para cada metodología realizar el cálculo de la cantidad de proteínas presente en la muestra.

Tener en cuenta que para esta metodología, debe realizarse una curva de calibración (concentración *vs* absorbancia) y a partir de esta obtener el valor de las proteínas en la muestra.

Responda las siguientes preguntas

1. ¿Cuáles son las principales proteínas que se encuentran en la sangre?
2. ¿Qué proteínas pueden encontrarse en saliva y explique su importancia?
3. ¿Cuáles son los valores de referencia para la concentración de proteínas en suero sanguíneo?
4. ¿Qué es la hipoproteinemia y cuáles enfermedades están asociadas con esta?
5. ¿Indica en qué casos se puede evidenciar proteínas alteradas en orina.
6. ¿Porqué es importante cuantificar proteínas en un tejido?
7. ¿Qué métodos se pueden emplear para el trabajo en el laboratorio de bioquímica que necesiten previamente la cuantificación de proteína en la muestra?

## 7.5. GUÍA No. 19. MÉTODO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO

### 7.5.1. Objetivo

- Cuantificar proteínas en muestras biológicas como plasma, suero, saliva y/o tejido empleando el método del ácido bicinconínico (BCA).

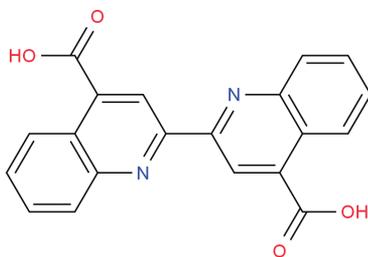
### 7.5.2. Introducción

El ensayo empleando el ácido bicinconínico se basa al igual que el de Biuret en la formación de un complejo morado oscuro cuando este reacciona con la proteínas en la muestras; esta metodología es generalmente denominada como una modificación del método de Biuret. Permite cuantificar proteínas en el rango de 0,0005 a 2 mg/mL. La formación del complejo  $\text{Cu}^{+2}$ - proteína, se da bajo condiciones alcalinas, seguida por la reducción del  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$ . La cantidad de iones reducidos es proporcional a la cantidad de proteína presente, generalmente dependiente de los aminoácidos cisteína, triptófano y tirosina.

El ion cúprico coordina a cuatro enlaces peptídicos, reduciéndolo a un ion cuproso el cual forma un complejo con BCA que absorbe alrededor de 540 nm, produciendo el color violeta firma. Este ensayo es alrededor de 100 veces más sensible que el de Biuret, permitiendo ser utilizado bajo concentraciones de hasta 5% de tensioactivos.

Las ventajas de este método incluyen: estabilidad del complejo coloreado, menos sensibilidad a detergentes, aplicable a un amplio rango de concentraciones de proteínas.

Este es el método más sensible, que no presenta interferencias debidas a detergentes; el complejo coloreado formado no es muy estable.



**Figura 7.1.** Estructura química del ácido bicinconínico (2-(4-carboxyquinolin-2-yl)quinoline-4-carboxylic acid).

### 7.5.3. Materiales, reactivos y equipos

- Materiales

Micropipetas de 1000, 200, 20 y 2 $\mu$ L

Tubos de ensayo

Tubos eppendorf de 0.5 y 1.5 mL

Gradillas para tubos de ensayo

Gradillas para tubos eppendorf

Placas de 96 pozos fondo plano transparente

Beaker de 50 mL

Frasco lavador

Guantes plásticos

- Reactivos

Reactivo de ácido bicinconónico

Albúmina de suero bovino (BSA)

Agua destilada

Muestras biológicas: Plasma, suero, saliva, tejido, entre otros.

- Equipos

Espectrofotómetro UV-VIs

### 7.5.4. Procedimiento

Para el desarrollo de este ensayo se seguirá los siguientes pasos:

- Tomar tubos de ensayos y rotularlos, adicionar los reactivos según se indica en el cuadro siguiente. El estándar de BSA se prepara a partir de una solución patrón de 0.1 mg/mL de BSA.
- A cada tubo de ensayo se le adicionara según lo estipulado en la siguiente tabla:

**Tabla 7.4.** Curva estándar de BSA con reactivo ácido bicinconónico.

Tubos	Reactivos		
	Estándar BSA $\mu$ L	Agua destilada $\mu$ L	Reactivo ácido bicinconónico mL
Blanco	0	100	1
1	25	75	1
2	50	50	1
3	75	25	1
4	100	0	1
Muestras	100	0	1

- Sembrar por duplicado en una placa de 96 pozos el blanco, los estándares y las muestras.
- Incubar 10 min a 60 °C.
- Leer absorbancia a 562 nm
- Los cálculos se realizaran con la ecuación obtenida de la curva de los estándares de BSA.

### 7.5.5. Referencias

Brenner AJ and Harris ED. A quantitative test for Copper using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1995; 226(1):80-84.

Fujimoto. EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985; 150:76-85.

### 7.5.6. Actividades

A partir de los datos de absorbancia o densidad óptica arrojados después de la lectura para cada metodología realizar el cálculo de la cantidad de proteínas presente en la muestra.

Responda las siguientes preguntas

1. ¿Cuáles son las principales proteínas que se encuentran en la sangre?
2. ¿Qué proteínas pueden encontrarse en saliva y explique su importancia?
3. ¿Cuáles son los valores de referencia para la concentración de proteínas en suero sanguíneo?
4. ¿Qué es la hipoproteïnemia y cuáles enfermedades están asociadas con esta?
5. ¿Indica en qué casos se puede evidenciar proteínas alteradas en orina?
6. ¿Por qué es importante cuantificar proteínas en un tejido?
7. ¿Qué métodos se pueden emplear para el trabajo en el laboratorio de bioquímica que necesiten previamente la cuantificación de proteína en la muestra?

# CAPÍTULO 8

## CULTIVO CELULAR

*Maricela Viola Rhenals*

### CONTENIDO

<b>8.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>172</b>
<b>8.2. REFERENCIAS</b>	<b>175</b>
<b>8.3. GUÍA No. 20. MANTENIMIENTOS DE CULTIVOS CELULARES</b>	<b>176</b>
8.3.1. Objetivo	176
8.3.2. Introducción	176
8.3.3. Materiales, reactivos y equipos	177
8.3.4. Procedimiento	178
8.3.5. Referencias	182
8.3.6. Actividades	182

## 8.1. INTRODUCCIÓN

El cultivo celular o cultivo de tejidos, tiene 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 durante su normal homeostasis y bajo el estrés de un experimento.

Es considerada como una técnica particularmente difícil de aprender. Sin embargo, estas dificultades pueden ser superadas teniendo en cuenta factores como la disponibilidad de antibióticos, los medios de composición definida, las instalaciones asépticas, botellas con tapones filtrantes, placas de Petri ventiladas, entre otros.

Hoy en día el cultivo celular es bastante simple y engloba a todo un conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas

El cultivo celular es empleado en muchas áreas como por ejemplo el estudio de la actividad intracelular, flujo intracelular, movimientos de sustancias y señalización celular, movimiento de proteínas, ecología celular, estudio de las necesidades nutricionales, estudio de la transformación celular, cinética, interacciones célula-célula entre otros.

Las dos principales ventajas de los cultivos celulares son: el control del medio fisicoquímico (pH, temperatura, presión osmótica, tensión de oxígeno y gas carbónico) de las células cultivadas y el control de las condiciones fisiológicas. Esto permite obtener una muestra homogénea con resultados reproducibles y que pueden extrapolarse a sistemas un poco más complejos.

En cuanto a las desventajas del cultivo celular se puede mencionar que lo más crítico es el mantenimiento de las estrictas condiciones de asepsia ya que las células animales crecen menos rápido que la mayoría de los contaminantes comunes como las bacterias, los hongos y las levaduras.

El mantenimiento de los mismos necesita de condiciones especiales y por lo tanto de un laboratorio con ciertas características donde lo principal es el mantenimiento de la asepsia.

El área de trabajo para realizar cultivos debe instalarse en una área del laboratorio tranquila, alejada de las vías de paso y de ser posible dedicada exclusivamente al cultivo de células. La aparición de cabinas de flujo laminar redujo las necesidades de aislamiento del área de trabajo pero aún así es recomendable mantener un gradiente de esterilidad, desde el medio exterior o laboratorio general al interior de las cabinas de flujo donde se manipularán los cultivos y de la incubadora donde se mantendrán.

En el laboratorio de cultivo celular propiamente dicho se encuentran los siguientes tipos de instrumentos:

1. Cabinas de flujo laminar.
2. Incubadora de CO<sub>2</sub>.
3. Baños de temperatura controlada.
4. Microscopios.
5. Tanques de nitrógeno líquido.
6. Autoclave.
7. Centrífugas
8. Pipeteadores.
9. Equipos de purificación de aguas.

Para el crecimiento celular es necesario un medio artificial suplementado con sustancias que permiten el mantenimiento de las células bajo condiciones físico-químicas adecuadas y sobre recipientes que los contienen y aíslan del medio exterior. Esta solución es denominada medio de cultivo; y depende de la naturaleza del sustrato o fase en que crecen las células, las condiciones físico-químicas y fisiológicas del medio, la naturaleza y composición de la fase gaseosa, y las condiciones de incubación, especialmente la humedad y la temperatura

Los principales medios empleados y sus aplicaciones son:

<b>Medio</b>	<b>Aplicación</b>
Medio basal de Eagle (BME)	Medio elemental con solo los aminoácidos esenciales. Se necesita siempre la suplementación con suero bovino fetal al 10 %. Crecimiento de fibroblastos de ratón y células HeLa

<b>Medio</b>	<b>Aplicación</b>
Medio mínimo esencial de Eagle (MEM)	Es el medio de uso más corriente, contiene más aminoácidos y tiene mayor concentración que el BME. Se usa para cada casi todo tipo de cultivos y requiere la adición de suero (10 %).
R.P.M.I. 1640	Medio diseñado para el crecimiento de linfoblastos y líneas celulares leucémicas en suspensión. Tiene un amplio rango de aplicaciones con suplementos adecuados.
Medio MEM modificado por Dulbeco (DMEM)	Contiene cuatro veces la concentración de aminoácidos y vitaminas que el B.M.E. Se usa para la selección de hibridomas suplementado con HAT o HT.
Modificación de Iscove del medio DMEM (IMDM)	Es un medio muy completo que incluye en su formulación albúmina bovina, transferrina, selenito, etc. Es muy útil para el cultivo de linfocitos en medio libre de suero. También sirve para otros tipos celulares, pero en ese caso requiere suero a bajas concentraciones.
McCoy 5A	Medio diseñado para el crecimiento de líneas celulares diploides tanto de rata como humanas.
Medio F-10 de Ham	Para el crecimiento de líneas celulares humanas, debe ser suplementado con proteínas y hormonas. Contiene metales como Fe, Cu, Zn. Es útil para el cultivo de células amnióticas.
Medio F-12 de Ham	Útil para el crecimiento de líneas celulares, son suplementos proteínicos. Combinado con IMDM es un medio que se usa como libre de suero.
Medio 199	Muy usado para el cultivo de células no diferenciadas y estudio de cromosomatías.

Los medios de cultivo generalmente contienen soluciones equilibradas o buffers, aminoácidos, vitaminas, hormonas y factores de crecimiento.

Uno de los problemas más frecuentes en el cultivo de tejidos en general es el de las contaminaciones. Las células eucariotas en cultivo crecen lentamente, con tiempos de duplicación superiores en muchos casos a las 24 h. Sin embargo, tanto las bacterias como las levaduras tienen una tasa de crecimiento superior. Si se da el caso de una contaminación por estos organismos pueden provocar la muerte del cultivo en poco tiempo. Para evitarlo se utilizan una serie de técnicas de trabajo que suponen la máxima asepsia, así como la esterilización del material y el trabajo en ambientes estériles. Así mismo se utilizan cócteles de sustancias antimicrobianas y antifúngicas en el medio aunque en multitud de ocasiones no es posible usarlas

o bien no son suficientes para prevenir la aparición de microorganismos. Los tipos de contaminaciones más frecuentes son: bacterias, hongos y levaduras, micoplasmas, y virus.

## 8.2. REFERENCIAS

- Cell and Tissue Culture: Laboratory procedures. John Wiley and Sons Ltd, UK.
- Celis JE (1998). Cell biology. A laboratory Handbook. Harcourt Publishers Ltd. UK.
- Freshney RI (2000). Culture of animal cells. A manual of basic technique. Fourth Edition. Wiley-Liss Corp, New York.
- Gillies RJ, Didier N, Denton M (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* 159:109-113.
- Jakoby WB, Pastan I (1979). Methods in enzymology. Vol. LVIII. Cell Culture.
- Kaufman PB and Wu W (1995). Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Mather, JP, Barnes D (1998). Methods in cell biology. Vol. 57. Animal Cell Culture Methods. Academic Press.
- Freshney. RI. 2002. Culture of animal cells. A manual of basic technique. Wiley-Liss Inc. Fourth Edition. United States of America.
- Viola-Rhenals, M., Strasberg, M., Rieber. M. 2006. Suppression of survival in human SKBR3 breast carcinoma in response to metal-chelator complexes is preferential for copper-dithiocarbamate. *Biochem. Pharmacol.* 71:722-734.
- Strasberg. MR., Viola-Rhenals. M., Rieber. M. 2007. Attenuation of genotoxicity under adhesion-restrictive conditions through modulation of p53, gamma H2AX and nuclear DNA organization. *Apoptosis.* 12(2):449-458.
- Strasberg. MR., Viola-Rhenals. M., Rieber. M. 2007. Role of peroxidases, thiols and Bak/Bax in tumor cell susceptibility to Cu(DEDTC)<sub>2</sub>. *Biochem. Pharmacol.* 74:841-850

# GUÍA DE LABORATORIO

## CAPÍTULO CULTIVO DE CÉLULAS ADHERENTES

### 8.3. GUÍA No. 20. MANTENIMIENTOS DE CULTIVOS CELULARES

#### 8.3.1. Objetivo

- Describir el procedimiento para el mantenimiento de cultivos celulares adherentes.

#### 8.3.2. Introducción

La técnica del cultivo celular ha venido ganando importancia con el paso del tiempo ya que constituye una de las metodologías que permite la obtención de resultados reproducibles y exactos.

El cultivo de tejidos ha sido considerado durante mucho tiempo como una mezcla de ciencia y arte. Inicialmente fue considerada inicialmente como una técnica particularmente difícil de aprender. Sin embargo, hoy en día estas dificultades están superadas gracias a factores como los medios de composición definida, la disponibilidad de antibióticos, las instalaciones asépticas (salas de cultivo limpias, cabinas de flujo laminar, incubadoras estériles, entre otros)

Los cultivos de células y tejidos pueden ser altamente sensibles a las sustancias químicas y permitir a los investigadores estudiar partes del cuerpo específicamente identificadas. Se han utilizado cultivos de células en investigaciones para el cáncer, el Parkinson, SIDA, desarrollo de medicamentos, toxicidad y Alzheimer.

Son el producto de la colección de células vegetales o animales de diferentes órganos, colocadas en condiciones especiales propicias para su sobrevivencia y multiplicación, manteniendo para esto todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenía en el huésped.

Los cultivos de células animales se han clasificado de acuerdo a su capacidad de anclaje (adherencia), y así han sido aisladas recientemente de un órgano determinado o si provienen de células que han sufrido modificación.

Las dos principales ventajas cuando se utilizan los cultivos celulares son: el control del medio fisicoquímico, a saber, pH, temperatura, presión osmótica, tensión de oxígeno (O<sub>2</sub>) y gas carbónico (CO<sub>2</sub>) de las células cultivadas y, las condiciones fisiológicas que deben ser constantes. La mayoría de las líneas celulares requieren para su buen desarrollo de suplementos en el medio en que se cultivan, ejemplo de esto es el suero, el cual provee infinidad de elementos como hormonas y otras sustancias reguladoras.

Las técnicas de cultivo celular necesitan unas estrictas condiciones de asepsia porque las células animales crecen menos rápido que la mayoría de los contaminantes comunes como las bacterias, los mohos y las levaduras. Además las células precedentes de animales no pueden desarrollarse en medios de cultivo, por lo que es necesario agregar a los medios suplementos como suero, plasma y fluidos intersticiales, entre otros para de una manera u otra proveer a las células cultivadas un medio semejante al *in vivo*.

En la siguiente guía de laboratorio se explica la forma en la cual se puede cultivar células en monocapa.

Esta metodología puede ser empleada tanto para células eucariotas como procariotas pudiendo ser mantenidas como monocapa, como cultivo tridimensional o en suspensión, lo que le confiere versatilidad.

### **8.3.3. Materiales, reactivos y equipos**

- Materiales

Placas para cultivo estériles para células de 96, 24, 12 y 6 pozos

Placas para cultivo estériles para células de 9, 6 y 3 cm

Frascos para cultivo celular de 25 y 75 cm

Pipetas pasteur

Tubos cónicos estériles de 15 y 50 mL

Tubos de centrifuga de 1.5 mL

Pipetas graduadas estériles de 5 y 10 mL

Cámara de Newbauer

- Reactivos

Medios de cultivo

Antibióticos

EDTA disódico  
Tripsina  
Suero fetal bovino  
Dimetilsulfoxido (DMSO)  
Trypan blue  
Tampón fosfato salino (PBS)

- Equipos  
Microscopio invertido  
Incubadora de CO<sub>2</sub>  
Cabina de flujo laminar  
Centrífugas  
Pipeteador

#### **8.3.4. Procedimiento**

Las líneas celulares generalmente son mantenidas por largos periodos de tiempo a bajas temperaturas, cuando es necesario se reactivan mediante el siguiente procedimiento:

**Paso 1.** Un tubo de centrifuga de 1.5 mL que contiene las células congeladas almacenadas en nitrógeno líquido es descongelado.

**Paso 2.** Transferir las células con ayuda de una pipeta pasteur a una placa de 9 cm con medio de cultivo suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS), y antibióticos (generalmente penicilina (50 mg/L), estreptomycin (50 mg/L) y neomicina (100 mg/L) y antibiótico específico dependiendo de la línea celular a cultivar.

**Paso 3.** Observar con la ayuda de un microscopio la morfología y densidad de las células.

**Paso 4.** Colocar en la incubadora bajo condiciones (atmósfera con 5% en CO<sub>2</sub> y 37 °C de temperatura).

- Dejar incubando por lo menos 24 horas para permitir la adherencia.

Mantenimiento de los cultivos celulares

Las células activadas después de 24 horas deben estar adheridas, por lo que se monitorean al microscopio para observar que alcancen alrededor de un 80% de confluencia para pasajes posteriores.

Para amplificar y/o realizar un pasaje de células se procede así:

**Paso 1.** Remover el medio de cultivo de la placa de cultivo de tejidos.

**Paso 2.** Lavar las células con solución tampón fosfato salino (PBS).

**Paso 3.** Descartar el PBS y adicionar solución de despegue de células por cinco minutos o hasta observar el desprendimiento de la monocapa celular. La solución puede ser 0.125% tripsina: 0.5 mM EDTA, 2 mM EDTA o 0.25% tripsina dependiendo del tipo celular.

**Paso 4.** Adicionar suero fetal bovino para inactivar la tripsina.

**Paso 5.** Transferir toda la suspensión celular a un tubo de centrifuga cónico estéril de 25 o 50 mL.

**Paso 6.** Centrifugar por diez minutos a 500 g, obteniendo un precipitado celular.

**Paso 7.** Descartar el sobrenadante.

**Paso 8.** Resuspender el precipitado celular obtenido en un volumen conocido de medio de cultivo para determinar la densidad celular por conteo empleando la cámara de Neubauer.

### **Contaje de células**

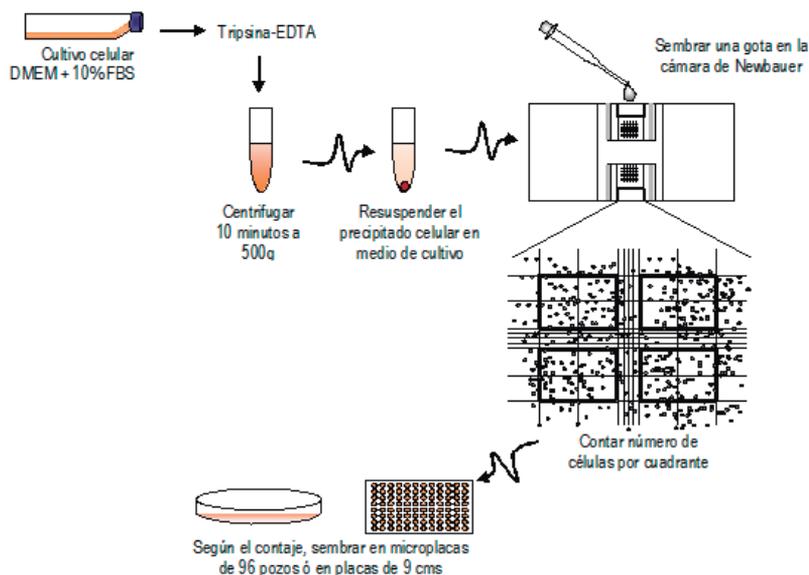
Para el conteo de células:

**Paso 1.** Colocar una gota de la suspensión celular en un hemocitómetro de Neubauer

**Paso 2.** Contar las células en cada cuadrante con la ayuda de un microscopio y un contador el número de células.

**Paso 3.** En caso de necesitar el número de células viables adicionar una gota de solución de azul de tripano y contar células que no estén teñidas lo cual indica células vivas.

Un esquema del conteo celular empleando cámara de Neubauer es mostrado a continuación:



**Paso 4.** Realizar los cálculos de densidad celular en la suspensión obtenida, teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

$$\text{Número de células} / \text{mL} = \frac{\sum \text{número de células por cuadrante}}{\text{número de cuadrantes contados}} \times 10000$$

**Paso 5.** A partir de estos datos se procede a realizar la siembra de cantidades definidas de células según los ensayos a realizar.

**Paso 6.** Para estudios de análisis bioquímicos de proteínas, actividad enzimática generalmente se siembra a gran escala es decir en placas de cultivo 10 cm, y en algunos casos se siembra a menor escala en placas de cultivo de 96 pozos.

Para un cultivo celular con tamaño de células promedio se puede sugerir la siguiente densidad celular para cada recipiente:

<b>Frasco de cultivo</b>	<b>Densidad celular</b>
Frascos grandes (25 cm)	1.500.000 células/15 mL
Frascos pequeños (75 cm)	500.000 células/5 mL
Placas de Petri de 9 cm	1.500.000 células/10 mL
Placas de Petri de 5 cm	500.000 células/5 mL
Placas de Petri de 3 cm	150.000 células/3 mL
Placas de 96 pozos	10.000 células/200 µL/pozo
Placas de 24 pozos	100.000 células/2 mL/pozo
Placas de 6 pozos	300.000 células/5 mL/pozo

**Paso 7.** Incubar por 24 horas para permitir la adherencia y la formación de la monocapa subconfluente nuevamente antes de adicionar los diferentes tratamientos

### ***Criopreservación de cultivos celulares:***

Después de recolectar las células, realizar el conteo y pasaje necesario, las células pueden ser congeladas si no van a utilizarse en un largo tiempo a fin de preservar las líneas celulares. Para esto proceder así:

**Paso 1.** Volver a centrifugar las células que no van a ser empleadas en pasaje o en tratamiento a 500 g por diez minutos.

**Paso 2.** Descartar el medio de cultivo

**Paso 3.** Resuspender en buffer de congelación (DMEM + 20% FBS + 7.5% DMSO).

**Paso 4.** Alicuotar en tubos de congelación en un volumen no superior a 1 mL por tubo y con densidad alrededor de 3.000.000 de células /mL.

**Paso 5.** Congelar a -70 °C por un periodo corto (no más de una semana) y luego pasar a nitrógeno líquido por más largos (años).

### 8.3.5. Referencias

Freshney. RI. 2002. Culture of animal cells. A manual of basic technique. Wiley-Liss Inc. Fourth Edition. United States of America.

Viola-Rhenals, M., Strasberg, M., Rieber. M. 2006. Suppression of survival in human SKBR3 breast carcinoma in response to metal-chelator complexes is preferential for copper-dithiocarbamate. *Biochem. Pharmacol.* 71:722-734.

Strasberg. MR., Viola-Rhenals. M., Rieber. M. 2007. Attenuation of genotoxicity under adhesion-restrictive conditions through modulation of p53, gamma H2AX and nuclear DNA organization. *Apoptosis.* 12(2):449-458.

Strasberg. MR., Viola-Rhenals. M., Rieber. M. 2007. Role of peroxidases, thiols and Bak/Bax in tumor cell susceptibility to Cu(DEDTC)<sub>2</sub>. *Biochem. Pharmacol.* 74:841-850.

### 8.3.6. Actividades

Investiga en la página web [www.atcc.org](http://www.atcc.org) diferentes líneas celulares y compara cada una de las características para su cultivo.

Responda las siguientes preguntas

1. Diferencia entre cultivo primario y secundario
2. Compara las características y las ventajas de cultivos en monocapa, en suspensión y tridimensionales.
3. Investiga los posibles usos de los cultivos celulares en tu área del conocimiento.
4. Investiga cómo se puede establecer un cultivo primario.
5. Compara los métodos para cuantificar viabilidad y/o muerte celular como Resazurim, MTT, azul de tripano, entre otros.

# CAPÍTULO 9

## DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LA DIABETES

*Neda Álvarez Ortega*  
*Karina Caballero Gallardo*

### CONTENIDO

<b>9.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>185</b>
9.1.1. Epidemiología de la diabetes mellitus	185
9.1.2. Pruebas diagnósticas para la diabetes mellitus	186
9.1.3. Cómo reducir la carga de la diabetes	187
<b>9.2. REFERENCIAS</b>	<b>187</b>
<b>9.3. GUÍA No. 21. CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA EN SANGRE</b>	<b>189</b>
9.3.1. Objetivo	189
9.3.2. Introducción	189
9.3.3. Materiales, reactivos y equipos	190
9.3.4. Procedimiento	190
9.3.5. Referencias	192
9.3.6. Actividades	193
<b>9.4. GUÍA No. 22. PRUEBA DE TOLERANCIA ORAL A LA GLICEMIA (PTOG)</b>	<b>194</b>
9.4.1. Objetivo	194
9.4.2. Introducción	194
9.4.3. Materiales, reactivos y equipos	194
9.4.4. Procedimiento	195
9.4.5. Referencias	196
9.4.6. Videos sugeridos	196
9.4.7. Actividades	197

## **FIGURAS**

Figura 9.1. Determinación de glicemia a partir de plasma o suero sanguíneo	191
--	-----

## **TABLAS**

Tabla 9.1. Interpretación de las pruebas de glicemia	186
Tabla 9.2. Detección de diagnóstico y de Diabetes Mellitus Gestacional	187
Tabla 9.3. Preparación de preparación de muestras y controles para el ensayo	190

## 9.1. INTRODUCCIÓN

La diabetes es una de las principales causas de muerte en el mundo. Existen diferentes formas de diabetes, las más comunes son la diabetes tipo 1 (DM1) y la tipo 2 (DT2). La DM1 se caracteriza por la destrucción autoinmune de las células beta del páncreas, lo que lleva a una deficiencia absoluta de insulina. Por su parte la DT2 es un trastorno común cuya prevalencia se eleva notablemente con el aumento de grados de obesidad. La resistencia y la deficiencia de insulina pueden surgir a través de influencias genéticas o ambientales en este tipo de diabetes.

Otra forma de diabetes es la monogénica la cual es resultante de mutaciones de genes como el de la glucoquinasa (GCK). La mayoría de las mutaciones en esta diabetes afectan la capacidad del cuerpo para producir insulina por su cuenta. Los dos tipos principales de diabetes monogénica son la diabetes mellitus neonatal (NDM) y la diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes, la cual se define como un trastorno heterogéneo desarrollado debido a mutaciones monogénicas heterocigotos en uno de al menos seis genes diferentes.

De otro modo, durante el periodo de gestación también es posible una complicación llamada diabetes gestacional (GDM). Los criterios para el diagnóstico de GDM fueron elegidos para identificar mujeres para las que había un mayor riesgo postparto de persistencia de la hiperglucemia. La disglucemia durante el embarazo se asocia con complicaciones, tanto para madre y feto.

### 9.1.1. Epidemiología de la diabetes mellitus

La diabetes es uno de los trastornos metabólicos más comunes en el mundo y la prevalencia de la diabetes ha ido en aumento en las últimas décadas. Según la Organización Mundial de Salud (OMS) en 2014, el 9% de los adultos (18 años o mayores) tenía diabetes y en 2012 fallecieron 1,5 millones de personas como consecuencia directa de la diabetes donde más del 80% de las muertes por esta patología se registra en países de ingresos bajos y medio; según las proyecciones de la OMS, la diabetes será la séptima causa de mortalidad en 2030. Además es una de las 10 causas más comunes a nivel mundial de AVAD (años de vida ajustados a discapacidad) para 188 países, incluido Colombia, e impone un problema de salud pública debido a la carga de una serie de complicaciones asociadas a esta patología.

### 9.1.2. Pruebas diagnósticas para la diabetes mellitus

Las pruebas más comunes que se utilizan para la detección de la DT2 son la medición de la glucosa plasmática en ayunas, la glucosa plasmática de dos horas durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG). Además en el 2009 un Comité Internacional de Expertos recomienda que un nivel de hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>) de  $\geq 6.5\%$  es útil para diagnosticar la diabetes. Posteriormente la Asociación Americana de Diabetes (ADA) identificó el rango de 5.7 a 6.4%, con una medición repetida HbA<sub>1c</sub>, como un mayor riesgo de desarrollar diabetes.

Con base a los resultados de las concentraciones de glucosa en plasma en ayunas, HbA<sub>1c</sub>, o de dos horas PTOG (75 g carga de glucosa), el Comité de Expertos sobre el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes Mellitus definió tres categorías las cuales son: normal, aumento de riesgo para la diabetes y diabetes mellitus (**Tabla 9.1**).

**Tabla 9.1.** Interpretación de las pruebas de glicemia.

<b>Normal</b>	<b>Alteración de la glucosa en ayunas</b>	<b>Prueba de tolerancia oral a la glucosa</b>
Glicemia en ayuna <100 mg/dL 5,6 mmol/L)	100 a 125 mg/dL	Glucosa en plasma de dos horas de 140 a 199 mg/dL

El diagnóstico de la diabetes mellitus es fácil de establecer cuando un paciente se presenta con síntomas clásicos de hiperglucemia (sed, poliuria, pérdida de peso, visión borrosa) y tiene un valor de glucosa en plasma al azar de 200 mg/dL (11.1 mmol/L) o superior. Sin embargo en individuos asintomáticos el diagnóstico de la diabetes debe ser confirmado en un día posterior mediante la repetición de las pruebas con los siguientes resultados.

- Glicemia en ayunas:  $\geq 126$  mg/dL (7.0 mmol/L).
- Hemoglobina glicosilada:  $\geq 6.5$  %.
- Prueba de tolerancia oral a la glucosa: Dos horas de glucosa plasmática  $\geq 200$  mg/dL (11.1 mmol/L).

Por otra parte, en las mujeres no diagnosticadas previamente con diabetes, se debe realizar la PTOG (con medición de la glucosa plasmática en ayunas y en una y dos horas después de la carga de glucosa 75 g) a las 24 a 28 semanas de gestación. El diagnóstico de la diabetes mellitus gestacional se hace cuando cualquier de los parámetros presentados en la **Tabla 9.2** exceden los valores de glucosa.

**Tabla 9.2.** Detección de diagnóstico y de Diabetes Mellitus Gestacional.

Glicemia en ayunas	≥ 92 mg/dL (5.1 mmol/L)
Una hora post-75-g de glucosa oral	≥ 180 mg/dL (10.0 mmol/L)
Dos horas post-75-g de glucosa por vía oral	≥ 153 mg/dL (8.5 mmol/L)

### 9.1.3. Cómo reducir la carga de la diabetes

Se ha demostrado que medidas simples relacionadas con el estilo de vida son eficaces para prevenir la diabetes de tipo 2 o retrasar su aparición. Para ayudar a prevenir la diabetes de tipo 2 y sus complicaciones la OMS recomienda:

- Alcanzar y mantener un peso corporal saludable.
- Mantenerse activo físicamente: al menos 30 minutos de actividad regular de intensidad moderada la mayoría de los días de la semana; para controlar el peso puede ser necesaria una actividad más intensa.
- Consumir una dieta saludable que contenga entre tres y cinco raciones diarias de frutas y hortalizas y una cantidad reducida de azúcar y grasas saturadas.
- Evitar el consumo de tabaco, puesto que aumenta el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares.

## 9.2. REFERENCIAS

Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2014;103(2):137-49.

Scully T. Diabetes in numbers. *Nature*. [10.1038/485S2a]. 2012;485(7398):S2-S3.

OMS. Diabetes. Organización Mundial de la Salud. 2015.

Murray CJ, Barber RM, Foreman KJ, Ozgoren AA, Abd-Allah F, Abera SF, et al. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306

- diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990–2013: quantifying the epidemiological transition. *The Lancet*. 2015;386(10009):2145-91.
- Flannick J, Johansson S, Njølstad PR. Common and rare forms of diabetes mellitus: towards a continuum of diabetes subtypes. *Nature Reviews Endocrinology*. 2016.
- Xu Y, Wang L, He J, Bi Y, Li M, Wang T, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults. *Jama*. 2013;310(9):948-59.
- Bellanné-Chantelot, C., Coste, J., Ciangura, C., Fonfrède, M., Saint-Martin, C., Bouché, C., Sonnet, E., Valéro, R., Lévy, D.J., Dubois-Laforgue, D., Timsit, J. (2015). High-sensitivity C-reactive protein does not improve the differential diagnosis of HNF1A–MODY and familial young-onset type 2 diabetes: A grey zone analysis. *Diabetes AND Metabolism*.
- Delli, A.J., Lernmark, Å. (2016). Chapter 39 - Type 1 (Insulin-Dependent) Diabetes Mellitus: Etiology, pathogenesis, prediction, and prevention, In: Weir, J.L.J.J.D.G.M.d.K.C.G.B.G.M.T.P.C. (Ed.) *Endocrinology: Adult and Pediatric* (Seventh Edition). W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 672-690.e675.
- Dennedy, M.C., Rizza, R.A., Dinneen, S.F. (2016). Chapter 38 - Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus, In: Weir, J.L.J.J.D.G.M.d.K.C.G.B.G.M.T.P.C. (Ed.) *Endocrinology: Adult and Pediatric* (Seventh Edition). W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 662-671.e662.
- Siddiqui, K., Musambil, M., Nazir, N. (2015). Maturity onset diabetes of the young (MODY)—History, first case reports and recent advances. *Gene* 555, 66-71.

# GUÍA DE LABORATORIO

## CAPÍTULO 9

### 9.3. GUÍA No. 21. CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA EN SANGRE

#### 9.3.1. Objetivo

- Interpretar los diferentes criterios para el diagnóstico diferencial de la diabetes
- Explicar el fundamento de la técnica de cuantificación de glucosa en el plasma sanguíneo.

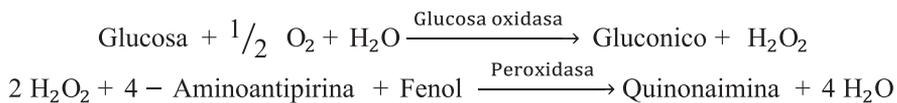
#### 9.3.2. Introducción

La cuantificación de glucosa en sangre se usa como principal punto de referencia al momento de hacer diagnóstico de diabetes, la cual se reconoce por presentar una elevación crónica de la glicemia, llamada hiperglicemia. Este aumento en los niveles de la glucosa en sangre se debe a un déficit total o parcial de insulina, que implica una disminución de la metabolización de la glucosa en la célula y un aumento de esta en la sangre. Según sea el déficit de insulina, un incremento en la acidez corporal que puede llegar a ser incompatible con la vida.

#### *Fundamento*

En la prueba, la glucosa presente en la muestra es convertida por acción de la glucosa oxidasa (GOD) en ácido gluconico y peróxido de hidrógeno; este último en presencia de peroxidasa (POD), oxida al cromógeno llamado 4-aminofenazona, convirtiéndolo en un compuesto de color rojo. La intensidad de este color depende de la cantidad de glucosa que existía originalmente en la muestra; por tanto si se determina la intensidad del color, se puede conocer la concentración de glucosa en la muestra por comparación del color frente a un estándar de referencia (solución de glucosa con concentración conocida).

La intensidad del color se determina con el espectrofotómetro o colorímetro, a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 500 nm.



### 9.3.3. Materiales, reactivos y equipos

- Materiales

Microplacas

Micropipetas

Puntas para micropipetas

Tubos de centrifuga de 1.5 mL

Guantes

- Reactivos:

Reactivo: 10 x 50 mL. Fosfatos 100 mmol/L, fenol 5 mmol/L, glucosa oxidasa > 10 U/mL, peroxidasa > 1 U/mL, 4-aminoantipirina 0.4 mmol/L, pH 7.5

Sueros control de calidad

- Equipos

Espectrofotómetro

Baño serológico

### 9.3.4. Procedimiento

**Paso 1.** Incubar el reactivo a 37 °C.

**Paso 2.** Pipetear en tubos de centrifuga de 1.5 mL según lo descrito en la **Tabla 9.3.**

**Tabla 9.3.** Preparación de preparación de muestras y controles para el ensayo.

Reactivos y muestras	Control I (µL)	Control II (µL)	Patrón (µL)	Muestra (µL)
Muestras, controles y patrón	5			
		5		
			5	5
Reactivo de glucosa	500	500	500	500

**Paso 3.** Incubar por cinco minutos a 37 °C o 10 min a temperatura ambiente, observando cuidadosamente los cambios en la coloración.

Nota. El color es estable por lo menos dos horas.

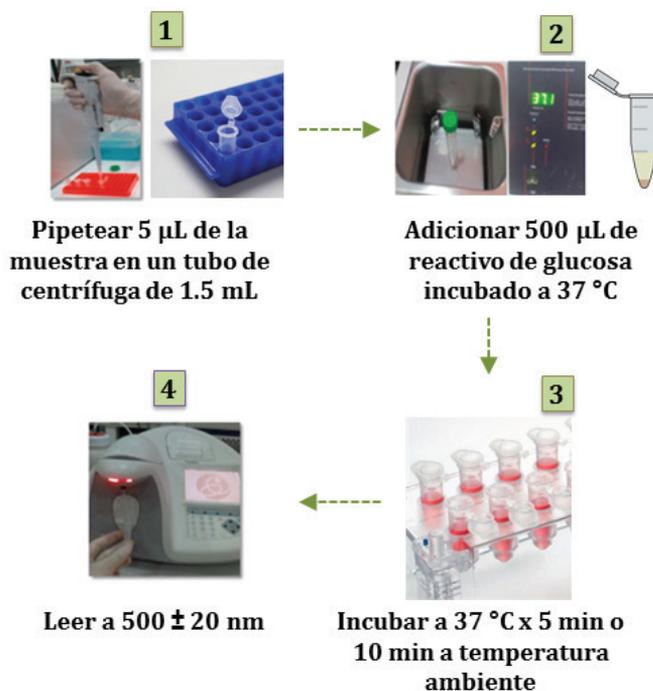
**Paso 4.** Realizar las mediciones de absorbancia para cada una de las muestras.

**Paso 5.** Para calcular la concentración de las muestras aplique la siguiente fórmula

$$\frac{Abs\ Muestra}{Abs\ Patrón} \times C\ Patrón = C\ Muestra$$

**Nota:** Se debe restar la absorbancia del blanco tanto a la muestra como al patrón.

El procedimiento general para la determinación de glicemia se resume en la **Figura 9.1**



**Figura 9.1.** Determinación de glicemia a partir de plasma o suero sanguíneo

**Nota:** El empleo de controles de calidad es fundamental. Consultar gráfica Levey-Jennings.

### 9.3.5. Referencias

- Rümenapf G, Geiger S, Schneider B, Amendt K, Wilhelm N, Morbach S, et al. Readmissions of patients with diabetes mellitus and foot ulcers after infra-popliteal bypass surgery—attacking the problem by an integrated case management model. *Vasa*. 2013;42(1):56-67.
- Smith-Strøm H, Iversen MM, Graue M, Skeie S, Kirkevold M. An integrated wound-care pathway, supported by telemedicine, and competent wound management—Essential in follow-up care of adults with diabetic foot ulcers. *International Journal of Medical Informatics*. 2016;94:59-66.
- Bellanné-Chantelot, C., Coste, J., Ciangura, C., Fonfrède, M., Saint-Martin, C., Bouché, C., Sonnet, E., Valéro, R., Lévy, D.J., Dubois-Laforgue, D., Timsit, J., 2015. High-sensitivity C-reactive protein does not improve the differential diagnosis of HNF1A–MODY and familial young-onset type 2 diabetes: A grey zone analysis. *Diabetes and Metabolism*.
- Delli, A.J., Lernmark, Å. (2016). Chapter 39 - Type 1 (Insulin-Dependent) Diabetes Mellitus: Etiology, pathogenesis, prediction, and prevention, In: Weir, J.L.J.J.D.G.M.d.K.C.G.B.G.M.T.P.C. (Ed.) *Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition)*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 672-690.e675.
- Dennedy, M.C., Rizza, R.A., Dinneen, S.F. (2016). Chapter 38 - Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus, In: Weir, J.L.J.J.D.G.M.d.K.C.G.B.G.M.T.P.C. (Ed.) *Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition)*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 662-671.e662.
- Siddiqui, K., Musambil, M., Nazir, N. (2015). Maturity onset diabetes of the young (MODY)—History, first case reports and recent advances. *Gene* 555, 66-71.
- Macarulla J; Goñi J. *Bioquímica humana*. Segunda Edición. Editorial Reverté S.A.(1994); Protocols for the preparation of blood plasma and serum.
- <http://www.biosimex.com.mx/pdf/insertos/QUIMICA%20CLINICA/11503%2011504%2011538.pdf>

### 9.3.6. Actividades

1. Obtener las concentraciones de las muestras aplicando la fórmula.
2. Establezca la secuencia ordenada de reacciones indicando la enzima que cataliza cada reacción y los productos obtenidos en las mismas con sus respectivas estructuras químicas.
3. ¿Qué otros ensayos existen para la determinación de glucosa y a que diagnóstico conllevan?
4. ¿Qué es un límite de detección y que es límite de linealidad?
5. Realizar una comparación en las diferentes pruebas que se aplican para el diagnóstico de diabetes.
6. ¿Cuáles son las complicaciones de la diabetes?
7. Establezca la secuencia ordenada de reacciones indicando la enzima que cataliza cada reacción y los productos obtenidos en las mismas.

## **9.4. GUÍA No. 22. PRUEBA DE TOLERANCIA ORAL A LA GLUCOSA (PTOG)**

### **9.4.1. Objetivo**

- Reconocer el fundamento teórico de la PTOG
- Correlacionar clínicamente los resultados obtenidos

### **9.4.2. Introducción**

La glicemia en ayunas es la prueba más sencilla para el tamizaje de DM en personas asintomáticas que por algún motivo acuden a un servicio de salud. Sin embargo, la prueba de oro para el tamizaje de diabetes en estudios poblacionales sigue siendo la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG), la cual consiste en la medición de la glucemia dos horas después de dar una carga oral de 75 gramos de glucosa. Las mediciones intermedias durante la PTOG no se recomiendan en forma rutinaria. Por este motivo se eliminó el término “curva de tolerancia a la glucosa”. La PTOG es una forma de medir la capacidad del cuerpo para usar la glucosa. Si el páncreas no produce suficiente insulina o si es incapaz de utilizar la insulina que produce, entonces probablemente el resultado será un alto nivel de glucosa en la sangre.

### **9.4.3. Materiales, reactivos y equipos**

- Materiales

Vaso capacidad 300 mL  
Tubos Vacutainer EDTA  
Jeringas  
Algodón

- Reactivos

Alcohol  
Agua  
Glucotest (75 g de glucosa)

- Equipos

Espectrofotómetro  
Baño serológico

#### 9.4.4. Procedimiento

##### Recomendaciones

Ayuno de ocho a catorce horas (se puede tomar agua).

Evitar restricciones en la dieta durante los tres días precedentes (consumo mínimo de 150 gramos de hidratos de carbono al día). La evidencia reciente sugiere que es conveniente consumir la noche anterior una comida con un contenido razonable de carbohidratos (30-50 g).

Evitar cambios en la actividad física habitual durante los tres días precedentes.

Durante la prueba debe mantenerse en reposo y sin fumar.

Es preferible que no tenga una infección u otra enfermedad intercurrente. De lo contrario, debe quedar consignada en el informe de la prueba.

Debe interrumpir el consumo de medicamentos que pudieran alterar los valores de la glucemia mínimo doce horas previas a la realización de la prueba. De lo contrario, deben quedar consignados en el informe de la prueba.

La PTOG no se debe practicar en pacientes con VIH positivo que estén recibiendo inhibidores de proteasas por el alto número de resultados de glucemia falsamente positivos.

**Paso 1.** Inicialmente se tomará una muestra para chequear la glicemia en ayuna

**Paso 2.** Para la realización de la PTOG la persona debe ingerir 75 gramos de glucosa diluidos en 300 ml de agua con o sin sabor, a temperatura ambiente, en un período no mayor de cinco minutos.

**Paso 3.** Luego de la carga el paciente de guardar reposo durante dos horas y cumplido este tiempo será tomada una nueva muestra de sangre para determinar la glicemia postcarga.

**Notas:** En niños la PTOG rara vez se utiliza, pero cuando se requiere la carga de glucosa se calcula con base en 1.75 g por kg de peso sin exceder 75 g en total.

Las determinaciones de glicemia de la PTOG, se realizan del mismo modo que la glicemia en ayunas (Guía No. 21).

#### 9.4.5. Referencias

Bellanné-Chantelot, C., Coste, J., Ciangura, C., Fonfrède, M., Saint-Martin, C., Bouché, C., Sonnet, E., Valéro, R., Lévy, D.J., Dubois-Laforgue, D., Timsit, J., 2015. High-sensitivity C-reactive protein does not improve the differential diagnosis of HNF1A–MODY and familial young-onset type 2 diabetes: A grey zone analysis. *Diabetes and Metabolism*.

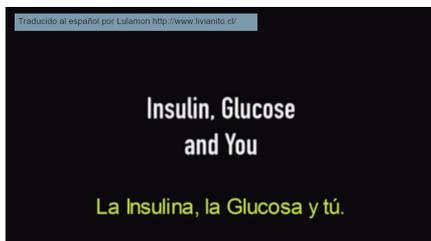
Delli, A.J., Lernmark, Å., 2016. Chapter 39 - Type 1 (Insulin-Dependent) Diabetes Mellitus: Etiology, Pathogenesis, Prediction, and Prevention, In: Weir, J.L.J.J.D.G.M.d.K.C.G.B.G.M.T.P.C. (Ed.) *Endocrinology: Adult and Pediatric* (Seventh Edition). W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 672-690.e675.

Dennedy, M.C., Rizza, R.A., Dinneen, S.F., 2016. Chapter 38 - Classification and diagnosis of Diabetes Mellitus, In: Weir, J.L.J.J.D.G.M.d.K.C.G.B.G.M.T.P.C. (Ed.) *Endocrinology: Adult and pediatric* (Seventh Edition). W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 662-671.e662.

Siddiqui, K., Musambil, M., Nazir, N., 2015. Maturity onset diabetes of the young (MODY)—History, first case reports and recent advances. *Gene* 555, 66-71.

#### 9.4.6. Videos sugeridos

Insulina, la glucosa y tú



Enlace: <https://www.youtube.com/watch?v=Mtw9gLmPlbQ&spfreload=10>

Publicado por: Goinsulin.com. Junio 30 de 2009

## Y350 - Color - Bio Systems



Enlace: [https://www.youtube.com/watch?v=3\\_v7gxMs3fQ](https://www.youtube.com/watch?v=3_v7gxMs3fQ)

Publicado por: Marketing BioSystems. Jun 14 de 2016

### 9.4.7. Actividades

1. Interprete los resultados obtenidos.
2. Realice un esquema donde se indique lo que sucede cuando con la insulina se suministra la carga de glucosa.
3. Realice un esquema donde clasifique los posibles resultados en una PTOG para diferentes grupos de edades, así como también el estado de embarazo.
4. ¿Por qué razón fue eliminada la curva de tolerancia a la glucosa para las embarazadas?
5. ¿Cuál es el tratamiento para la diabetes tipo 1 y 2?



# CAPÍTULO 10

## PERFIL LIPÍDICO

*Neda Álvarez Ortega*  
*Karina Caballero Gallardo*

### CONTENIDO

<b>10.1. GUÍA No. 23. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL Y TRIGLICERIDOS EN SUERO HUMANO</b>	200
10.1.1. Objetivo	200
10.1.2. Introducción	200
10.1.3. Materiales, reactivos y equipos	200
10.1.4. Procedimiento	201
10.1.5. Referencias	203
10.1.6. Actividades	203

---

### TABLAS

Tabla 10.1. Preparación de preparación de muestras y controles para el ensayo	202
---	-----

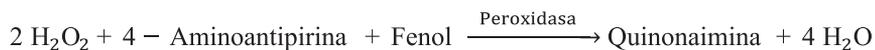
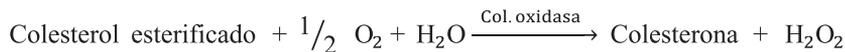
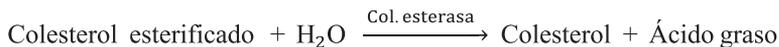
## 10.1. GUÍA No. 23. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL Y TRIGLICERIDOS EN SUERO HUMANO

### 10.1.1. Objetivo

- Determinar los niveles de triglicéridos y colesterol total en suero humano.
- Interpretar correctamente el resultado de la determinación

### 10.1.2. Introducción

Esta prueba es una reacción enzimática y colorimétrica que requiere como muestra suero. Este método utiliza en la primera etapa el colesterol esterasa para hidrolizar los ésteres de colesterol presentes en el suero, produciendo colesterol libre y ácidos grasos. En una segunda etapa se utiliza la enzima colesterol oxidasa en presencia de oxígeno, para oxidar el colesterol libre a 4-colestenona y peróxido de hidrógeno, este último producto en presencia de peroxidasa oxida el cromógeno a un compuesto coloreado que se puede medir espectrofotométricamente. A continuación se describen las reacciones acopladas que fundamentan la cuantificación de colesterol en suero:



### 10.1.3. Materiales, reactivos y equipos

- Materiales
  - Micropipetas: 10-20, 1000  $\mu\text{L}$
  - Gradilla
  - Guantes
  - Puntas para micropipetas
  - Papel kraft
  - Tubos de centrifuga de 15 mL
  - Tubos de centrifuga
  - Tubos de heparina de litio

- Reactivo colesterol  
 Colesterol esterasa > 0,2 U/mL  
 Colesterol oxidasa > 0,1 U/mL  
 Peroxidasa > 0,8 U/mL  
 4-aminoantipirina.
  
- Patrón de colesterol  
 Colesterol 200 mg/dL (5,18 mmol/L)  
 Patrón primario acuoso.
  
- Reactivo triglicéridos  
 4 - clorofenol 6 mmol/L  
 Lipasa > 100 U/mL  
 Glicerol quinasa > 1,5 U/mL  
 Glicerol-3-fosfato oxidasa > 4 U/mL  
 Peroxidasa > 0,8 U/mL  
 4-aminoantipirina 0,75 mmol/L  
 ATP 0,9 mmol/L, pH 7,0
  
- Patrón de triglicéridos  
 Glicerol equivalente a trioleina 200 mg/dL (2,26 mmol/L)  
 Patrón primario acuoso.
  
- Sueros control de calidad
  
- Equipos  
 Baño serológico  
 Espectrofotómetro  
 Centrífuga

#### 10.1.4. Procedimiento

**Paso 1.** Se obtienen muestras de suero por centrifugación de la sangre recogida en un tubo tapa roja.

**Paso 2.** Rotular dos series de tres tubos de ensayo como “muestra”, “patrón” y “blanco reactivo”.

**Paso 3.** Marcar tres tubos de centrífuga de 1.5 mL como M (muestra), P (patrón), B (blanco) y pipetear en ellos de la siguiente manera para la cuantificación de colesterol total, del mismo modo marcar para la determinación de triglicéridos, **Tabla 10.1**.

**Tabla 10.1.** Preparación de preparación de muestras y controles para el ensayo.

Reactivos y muestras	Control I (µL)	Control II (µL)	Patrón (µL)	Muestra (µL)
Muestras, controles y patrón	5			
		5		
			5	5
Reactivo de colesterol	500	500	500	500

Mezclar y dejar durante diez min a temperatura ambiente o cinco minutos a 37 °C, luego en el espectrofotómetro leer la absorbancia de la muestra y del patrón contra el blanco a una longitud de onda de 500 nm.

$$\frac{Abs\ Muestra}{Abs\ Patrón} \times C\ Patrón = C\ Muestra$$

Importante, deben restarle el valor del blanco a cada una de las absorbancias para luego calcular la concentración.

### Valores de referencia para colesterol total

Los valores discriminantes universales han sido establecidos por el National Cholesterol Education Program y también aceptados en otros países para la evaluación del riesgo de enfermedad de las arterias coronarias.

Intervalos	Estimación
Hasta 200 mg/dL = 5.2 mmol/L	Óptimo
200-239 mg/dL = 5.2 – 6.21 mmol/L	Moderado
> 240 mg/dL = >6.24 mmol/L	Elevado

**Valores de referencia para triglicéridos total.** Los siguientes valores discriminantes universales han sido establecidos por el US National of Health y también aceptados en otros países para la evaluación del riesgo.

<b>Intervalos</b>	<b>Estimación</b>
Hasta 150 mg/dL = 1.7 mmol/L	Bajo
150-199 mg/dL = 1.70 – 2.25 mmol/L	Dudoso
200-499 mg/dL = 2.26-5.64 mmol/L	Alto
> 500 mg/dL = > 5.65 mmol/L	Muy alto

### 10.1.5. Referencias

González de Buitrago JM, Medina Jiménez JM. Bioquímica clínica. McGrawHill/ Interamericana. España. 2001.

Anderson, S.C. & Cockayne, S. 1995. Química clínica. Ed. McGrawHill/ Interamericana. 1990.

Kaplan-Pesce. Química clínica: Técnicas de laboratorio –Fisiopatología– Métodos de análisis. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, 1986.

National Cholesterol Education Program Expert Panel. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (ATP III). NIH Publication. Bethesda: National Heart, Lung, and Blood Institute; 2001.

### 10.1.6. Actividades

1. Realizar los cálculos de la concentración de colesterol total en la muestra. Compare el resultado obtenido con los valores normales correspondientes o de referencia.
2. Realizar los cálculos de la concentración de triglicéridos en la muestra. Compare el resultado obtenido con los valores normales correspondientes o de referencia.
3. Describa además las funciones biológicas de estos compuestos en el organismo humano
4. Realice un cuadro con las enfermedades asociadas a los lípidos.



# CAPÍTULO 11

## EXTENDIDO DE SANGRE PERIFÉRICA

*Neda Álvarez Ortega*  
*Karina Caballero Gallardo*

### CONTENIDO

<b>11.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>206</b>
<b>11.2. GUÍA No. 24. EXTENDIDO DE SANGRE PERIFÉRICA</b>	<b>208</b>
11.2.1. Objetivo	208
11.2.2. Introducción	208
11.2.3. Materiales, reactivos y equipos	208
11.2.4. Procedimiento	208
11.2.5. Referencias	210
11.2.6. Actividades	210

---

### FIGURAS

Figura 11.1. A: Monocitos; B: Neutrófilos (1) y monocitos (2); C: Eosinófilos; D: Basófilos; E: Linfocitos; F: Plaquetas; G: Eritrocitos normales; H: Hipocromía y microcitos; I: Macroцитos	207
Figura 11.2. Procedimiento para realizar el extendido de sangre periférica	209

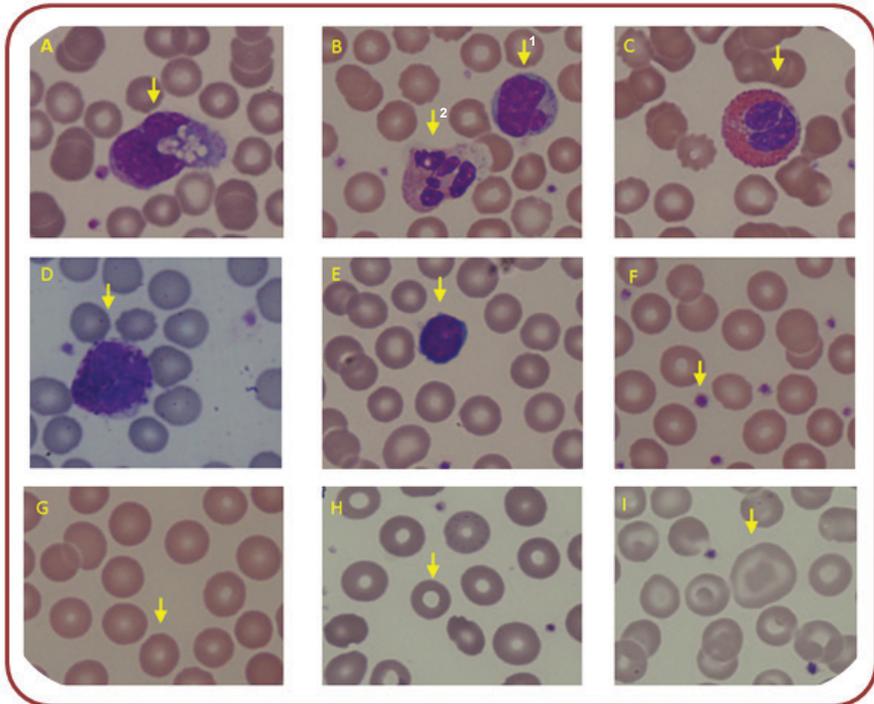
## 11.1. INTRODUCCIÓN

Los linajes celulares sanguíneos surgen del proceso denominado hematopoyesis a partir de células madre pluripotente hematopoyéticas en la médula ósea, las cuales generan los progenitores de las diferentes líneas (eritrocitaria, leucocitarias y megacariocítica), cabe resaltar que durante la gestación existen otros sitios de producción tales como el saco vitelino, y el hígado fetal.

El proceso de diferenciación progresiva para la maduración de los eritrocitos es conocido como eritropoyesis. El proceso consiste en un compartimento proliferativo-madurativo, que implica la maduración de proeritroblastos a policromatófilo eritroblastos través de la etapa basófilo, y un compartimento no proliferativa madurativo que implica la maduración de los eritroblastos policromatófilo para madurar eritrocitos de la sangre a través de la etapa de reticulocitos. Los eritrocitos, son discos uniformes bicóncavos que carecen de un núcleo y orgánulos, en su lugar su componente principal es la hemoglobina.

La eritropoyesis en médula ósea responde necesidades fisiológicas de demanda de oxígeno. El estímulo de hipoxia constituye la señalización que induce la síntesis de eritropoyetina (Epo), la citoquina principal implicado en el control de la producción eritroide. Los eritrocitos de sangre periférica tienen un periodo de vida de aproximadamente 120 días. La línea de leucocitos es una población heterogénea de células. Estas células tienen tres categorías principales: linfocitos, monocitos y granulocitos (polimorfonucleares), siendo estos últimos divididos a su vez en neutrófilos, eosinófilos y basófilo.

El extendido de sangre periférica es un elemento útil para identificar los elementos formes de la sangre y sus alteraciones. Para su realización es empleada la coloración de Wright, la cual es una modificación de la tinción de Romanowsky. Al realizar la coloración las estructuras basófilas se tiñen de color azul mientras que las acidófilas toman un color rosado. Teniendo en cuenta el colorante que toman ciertas granulaciones citoplasmáticas ha permitido clasificar a los leucocitos polimorfonucleares en la Figura 11.1 mostrando algunas estructuras que se observan en un extendido de sangre periférica.



**Figura 11.1.** A: Monocitos; B: Neutrófilos (1) y monocitos (2); C: Eosinófilos; D: Basófilos; E: Linfocitos; F: Plaquetas; G: Eritrocitos normales; H: Hipocromía y microcitos; I: Macroцитos

## 11.2. GUÍA No. 24. EXTENDIDO DE SANGRE PERIFÉRICA

### 11.2.1. Objetivo

- Reconocer las diferentes estructuras celulares encontradas en extendidos de sangre periférica y su posible utilización en la identificación de patologías.
- Adquirir destreza en la realización del extendido de sangre periférica.

### 11.2.2. Introducción

Esta coloración es conocida como policromática debido a que produce varios colores. Es una solución de alcohol metílico de un colorante ácido (eosina) y otro básico (azul de metileno). El alcohol sirve como un fijador del frotis sanguíneo al portaobjetos. El amortiguador, que consiste en una solución tamponada, mantiene el pH del colorante y favorece la mejor absorción por los diferentes componentes celulares.

### 11.2.3. Materiales, reactivos y equipos

- Materiales  
Portaobjetos  
Cubreobjetos  
Frascos lavadores  
Tubos Vacutainer EDTA  
Jeringas  
Algodón
- Reactivos  
Colorante Wright  
Aceite de inmersión
- Equipos  
Microscopio óptico

### 11.2.4. Procedimiento

**Paso 1.** Marcar la lámina portaobjeto con marcador permanente y colocar una gota de sangre (20  $\mu$ L de muestra) en un extremo del portaobjetos. El tamaño de

la gota es importante, si es demasiado grande crea un extendido muy grueso y si es demasiado pequeña a menudo forma un extendido corto o delgado.

**Paso 2.** Sostener el portaobjeto extensor con firmeza a un ángulo de 30-45° y llevar hacia delante de la gota de sangre, dejando que esta se esparza en todo el ancho del portaobjeto y empujar hacia delante hasta el final del portaobjeto para crear el extendido. Es importante que toda la gota se incluya en el extendido.

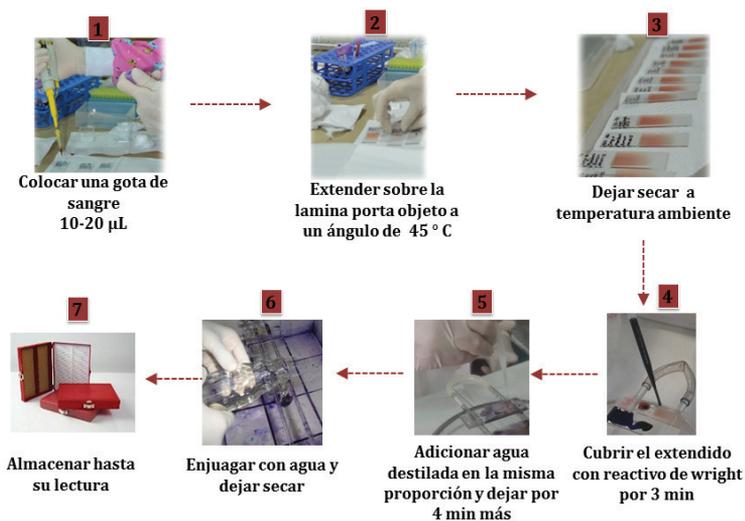
**Paso 3.** Colocar el extendido a secar a temperatura ambiente. Para conseguir los mejores resultados hay que colorear las extensiones en cuanto se hayan secado al aire.

**Paso 4.** El frotis secado al aire se coloca sobre una gradilla de tinción y se cubre el portaobjeto con el colorante de Wright (aproximadamente 3-5 gotas) por 3 minutos.

**Paso 5.** Agregar agua destilada en la misma cantidad que añadió el colorante de Wright por tres minutos.

**Paso 6.** Retirar con agua la coloración y dejar secar hasta su lectura.

**Paso 7.** Almacenar las placas en cajas para portaobjetos o realizar la lectura de la placa en el microscopio óptico en el objetivo de 100X colocando una gota de aceite de inmersión



**Figura 11.2.** Procedimiento para realizar el extendido de sangre periférica.

### **11.2.5. Referencias**

Campuzano Maya, G. (2008). ¿Cómo obtener un extendido de sangre periférica de óptima calidad?. Med. lab, 14(3/4), 125-152.

Campuzano Maya, G. (2008). Utilidad del extendido de sangre periférica: los leucocitos. Med. lab, 14(9/10), 411-455.

### **11.2.6. Actividades**

1. Realizar un esquema del extendido de sangre periférica donde se identifiquen las partes del mismo.
2. Realizar un mapa conceptual con las diferentes líneas celulares sanguíneas.
3. Dibuje las células de la línea blanca y explique sus características morfológicas y sus funciones.
4. Investigar la utilidad del extendido de sangre periférica, posibles patologías que pueden diagnosticarse.
5. Cuáles son las dificultades al momento de realizar el extendido y en su lectura.
6. Realizar un esquema que ilustre lo realizado en la práctica de extendido de sangre periférica.
7. Consultar la forma correcta de reportar un extendido de sangre periférica.

## GLOSARIO

**Acetilación:** Adición de una molécula de acetato a otra molécula.

**Ácido:** Es una molécula capaz de liberar un ión hidrógeno.

**Ácido nucleico:** Polímeros compuestos por nucleótidos, que en los organismos vivos se basan en uno de azúcares, ribosa o desoxirribosa, lo que da origen a los términos Ácido ribonucleico (ARN) y Ácido desoxirribonucleico (ADN).

**Ácido desoxirribonucleico (ADN):** Ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas de la mayoría de organismos y está compuesto por desoxirribonucleótidos de cuatro tipos según su base nitrogenada (guanina, citosina, adenina y timina), dispuestos formando generalmente dos largas cadenas antiparalelas enrolladas en doble hélice.

**Ácido ribonucleico (ARN):** Ácido nucleico formado por una sola cadena polimérica de nucleótidos que contiene ribosa.

**Adenina:** Base nitrogenada purínica.

**Adenosina trifosfato (ATP):** Nucleótido formado la base nitrogenada adenina, es el principal nucleótido en el organismo, fuente de energía para los organismos vivos.

**Alícuota:** Es una parte que se toma de un volumen o de una masa inicial, para ser usada en una prueba de laboratorio, cuyas propiedades físicas y químicas, así como su composición, representan las de la sustancia original.

**Aminoácido:** Unidades monoméricas de proteínas; cada uno está formado por cuatro grupos funcionales unidos a un carbón  $\alpha$  central: un grupo amino, un grupo carboxílico, un hidrógeno y una cadena lateral que los diferencia.

**Amplificación:** En términos genéticos se emplea para explicar el aumento en el número de copias de un fragmento de ADN particular.

**ADNc:** Secuencia de ADN complementaria a otra secuencia de ácido nucleico. El término ADNc se utiliza habitualmente para referirse al ADN generado por la transcripción reversa de un ARNm. Los ADNc representan ADN genómico transcrito activamente pero no contienen intrones.

**ARNm (ARN mensajero):** Es un ARN monocatenario que contiene una secuencia codificadora de proteínas y regiones no traducidas 5' y 3' que contienen elementos de control.

**Autoclavado:** Procedimiento por medio del cual se esterilizan materiales a emplear en el laboratorio utilizando alta presión y vapor de agua.

**Bases nitrogenadas:** Moléculas orgánicas cíclicas con dos o más átomos de nitrógeno como heteroátomos que hacen parte estructural de los nucleótidos.

**Bases purínicas:** Compuestos cíclicos con nitrógenos como heteroátomos derivados de la estructura de la purina (dos anillos), que forman parte de los ácidos nucleicos y son adenina y guanina.

**Bases pirimidínicas:** Compuestos cíclicos con nitrógenos como heteroátomos derivados de la estructura de la pirimidina (un anillo), que forman parte de los ácidos nucleicos y son timina, citosina y uracilo.

**Cadena lateral o grupo R:** Grupo funcional que permite diferenciar aminoácidos y les confiere características químicas y por ende funcionalidad bioquímica diferente a cada uno.

**Calibración:** Conjunto de operaciones que establecen, en condiciones especificadas, la relación entre los valores de una magnitud indicados por un instrumento de medida o un sistema de medida, o los valores representados por una medida materializada o por un material de referencia (estándar), y los valores correspondientes de esa magnitud realizados por patrones.

**Catálisis:** Proceso mediante el cual se aumenta la velocidad de una reacción debido a la presencia de un catalizador.

**Catalizador:** Es una sustancia que puede acelerar o inhibir una reacción química.

**Carbohidrato:** Moléculas orgánicas formadas por hidrógeno, carbono y oxígeno; también denominados azúcares y pueden ser simples (monosacáridos) o complejos (polisacáridos); poseen actividad estructural y energética.

**Cebador:** Secuencia de oligonucleótidos corta complementaria a una secuencia de interés. La mayoría de las ADN polimerasas no pueden comenzar a sintetizar ácidos nucleicos sin una plantilla y al menos una región corta de ácido nucleico de doble cadena para actuar como un punto de partida. Los cebadores actúan como el punto de partida necesario para la síntesis de ácidos nucleicos para una variedad de técnicas de biología molecular, incluyendo PCR y secuenciación de ADN.

**Ciclo celular:** Conjunto ordenado y secuencial de etapas que determinan el crecimiento y división celular.

**Cristalografía:** Disciplina que se encarga de estudiar las características y/o propiedades de los compuestos en forma de cristales.

**Citosina:** Base nitrogenada purínica

**Citosol:** Parte fluida de una célula, sin las organelas.

**Citoplasma:** Parte fluida de una célula con las organelas.

**Cofactores:** Moléculas de bajo peso molecular y naturaleza no proteica, necesaria para que la enzima posea actividad catalítica

**Corrosiva:** Sustancia que puede destruir irreversiblemente la superficie u otra sustancia con la cual tenga contacto.

**Desoxirribosa:** Azúcar de cinco carbonos que carece del OH en el carbono 2.

**Disrupción:** Proceso mediante el cual hay ruptura brusca, produciendo una estructura diferente a la inicial.

**Dipéptido:** Molécula formada por dos aminoácidos unidos por un enlace peptídico.

**Electroforesis:** Técnica empleada para la separación de macromoléculas en virtud de su capacidad móvil bajo un campo eléctrico.

**Elucidación:** Se refiere al estudio del origen y estructura de una molécula. Conjunto de procedimientos tendientes a definir una molécula o estructura.

**Elución:** proceso mediante el cual la proteína se disocia de una resina de columna.

**Escisión:** Acción de romper, fragmentar o dividir.

**Espectrofotometría:** Técnica que permite medir la cantidad de energía que absorbe o transmite una molécula a una determinada longitud de onda

**Esterеоquímica:** Parte de la química que estudia la distribución espacial de los átomos en una molécula, dando origen a isómeros o moléculas con misma fórmula molecular pero diferente fórmula estructural.

**Exactitud:** Capacidad para acercarse al valor de la magnitud real que se está midiendo, depende de los errores sistemáticos de medición, permitiendo conocer la validez de la medida.

**Extracción:** Proceso mediante el cual se separa o aísla una sustancia a partir de una matriz compleja.

**Fosfato:** Sales o ésteres del ácido fosfórico, grupo funcional formado por un átomo de fósforo y cuatro de oxígeno unidos covalentemente, cuya ruptura provee gran cantidad de energía.

**Fosfodiéster:** Enlace covalente que se produce entre un grupo hidroxilo (OH<sup>-</sup>) en el carbono 3' y un grupo fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) en el carbono 5' del nucleótido entrante, formándose así un doble enlace éster en los ácidos nucleicos.

**Fosforilación:** Reacción mediante la cual se adiciona un grupo fosfato a una molécula. En las proteínas generalmente se da en los aminoácidos con grupos OH en su cadena lateral.

**Guardianes:** Recipientes para desechos de materiales cortopunzantes usados en muestras biológicas.

**Hidrólisis:** Reacción química en la que una molécula de agua se disocia donando cada uno de sus iones a otra molécula.

**Hidroxilación:** Adición de un grupo hidroxilo (OH) a otra molécula.

**Hidrofobicidad:** Propiedad de las moléculas a ser hidrofóbicas, es decir insolubles, poco afines o repelidas por el agua.

**Homogenización:** Proceso que consiste en conseguir una mezcla homogénea o aquella formada por elementos de la misma clase o naturaleza

**Isoprenilación:** Adición de moléculas hidrofóbicas a otras moléculas generalmente proteína.

**Lavaojos:** Equipo de seguridad que hace parte de los laboratorios que permite proteger mediante lavados los ojos después que han penetrado sustancias químicas o material extraño.

**Lisis:** Ruptura

**Longitud de onda:** Distancia real que recorre una perturbación o una onda en un determinado intervalo de tiempo, en términos de espectrofotometría la unidad es nanómetros.

**Nucleósido:** Molécula formada por una base nitrogenada y un azúcar generalmente ribosa o desoxirribosa.

**Nucleótido:** Molécula formada por una base nitrogenada, un azúcar que es ribosa o desoxirribosa y uno o varios grupos fosfatos.

**N-glicosilación:** Adición de una o varias moléculas glicosídicas a otra molécula cuyo enlace glicosídico implica un átomo de nitrógeno.

**Modificaciones post-traduccionales (MPTD):** Conjunto de cambios químicos que se suceden a una proteína después de su síntesis, son de extrema importancia en el control de transducción de señales.

**Miristilación:** Codificación lipídica donde el grupo miristoil se une a una proteína.

**O-glicosilación:** Adición de una o varias moléculas glicosídicas a otra molécula cuyo enlace glicosídico implica un átomo de oxígeno.

**Plasma:** Fracción líquida y acelular (sin glóbulos rojos ni blancos) de la sangre obtenida al Centrifugar después de dejar coagular o sedimentar la sangre sin ningún otro procedimiento

**Plaquetas:** Fragmentos citoplasmáticos pequeños, irregulares y carentes de núcleo.

**Polinucleótidos:** Polímero de nucleótidos, generalmente engloba a los ácidos nucleicos desoxiribonucleico (ADN) y ribonucleico (ARN).

**Proteasas:** Enzimas cuya función catalítica es degradar proteínas.

**Pipetear:** Tomar alícuotas de una solución con ayuda de una pipeta.

**Precipitado:** Porción sólida o sedimentada obtenida después de una Centrifugación o sedimentación.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Técnica para producir grandes cantidades de un fragmento específico de ADN a partir de una pequeña cantidad de secuencias de ADN.

**Reproducibilidad:** Capacidad de un ensayo para ser duplicado.

**Ribosa:** Azúcar de cinco carbonos.

**Serina:** Aminoácido proteico no esencial cuya cadena lateral contiene un grupo hidroxilo, lo que confiere la capacidad para unir otras moléculas y formar puentes de hidrógeno.

**Soluto:** Compuesto en menor proporción en una solución, generalmente se refiere a aquellos en estado sólido.

**Solvente:** Compuesto en mayor proporción en una solución, generalmente se refiere al que se encuentra en estado líquido.

**Sobrenadante:** Porción líquida superior que queda después de una Centrifugación o sedimentación.

**Sulfatación:** Adición de un grupo sulfato ( $\text{SO}_4$ ) a una molécula.

**Subcelular:** Cada uno de los compartimentos celulares en los que se puede dividir una célula.

**Traducción:** Proceso biológico por medio del cual se da la síntesis de proteínas en la célula.

**Transcriptasa reversa:** Es una ADN polimerasa especializada, usualmente derivada de un retrovirus, capaz de usar ARN como molde para la síntesis de ADN.

**Treonina:** Aminoácido proteico esencial cuya cadena lateral contiene un grupo hidroxilo, lo que confiere la capacidad para unir otras moléculas y formar puentes de hidrógeno.

**Trifosfato de guanosina (GTP):** Nucleótido formado por la base nitrogenada guanina, es un segundo mensajero y fuente de energía.

**Timina:** Base nitrogenada pirimidínica.

**Uracilo:** Base nitrogenada pirimidínica.

**Validación:** Comprobación del conjunto de acciones que permiten determinar la confiabilidad de los datos o de la técnica.

**3'(extremo tres prima):** El carbono 3 del segundo anillo en una estructura. En biología molecular, el anillo de ribosa del nucleótido se considera el segundo anillo. El extremo 3' de una cadena de ADN es el sitio de nueva síntesis por ADN polimerasas.

**5'(extremo cinco prime):** el carbono 5 del segundo anillo en una estructura. En biología molecular, el anillo de ribosa del nucleótido se considera el segundo anillo. Debido a que la síntesis de ADN y la traducción de proteínas ocurren de 5' a 3', el extremo 5' se considera usualmente como la posición inicial.

La impresión de este libro se realizó en papel bond blanco 90 grs. para páginas interiores y propalcote de 280 grs para la portada con plastificado mate. Con un tiraje de 200 ejemplares. El libro *Ensayos de bioquímica aplicados a programas del área de la salud* de las autoras Karina Caballero Gallardo. Ph.D., Maricela Viola Rhenals. Ph.D., Neda Álvarez Ortega. M.Sc, hace parte de la tercera convocatoria para la publicación de libros de la colección de investigación Gabriel García Márquez. El diseño y diagramación se realizó en Alpha Editores y se terminó de imprimir en el año 2017, en la empresa Alpha Editores, en la ciudad de Cartagena de Indias, Colombia.



Este texto fue ideado como un texto guía para la academia, el cual brinda al estudiante la oportunidad de conocer y aplicar algunos de los ensayos mas utilizados en bioquímica, como el análisis de macromoléculas tales como carbohidratos, lípidos y proteínas, de igual forma el aislamiento y manipulación de los ácidos nucleicos en cadena de la polimerasa, cinética enzimática, entre otros. Además el estudiante se familiarizará con algunos de los equipos frecuentemente empleados en las prácticas de bioquímica.

Es pertinente destacar que algunos de los ensayos de laboratorio son resultado de investigaciones realizadas en los dos grupos de investigación de las cuales las autoras hacen parte activa, y algunas han sido desarrolladas con base en la literatura.



**Universidad  
de Cartagena**

Fundada en 1827



ISBN: 978-958-5439-00-9

