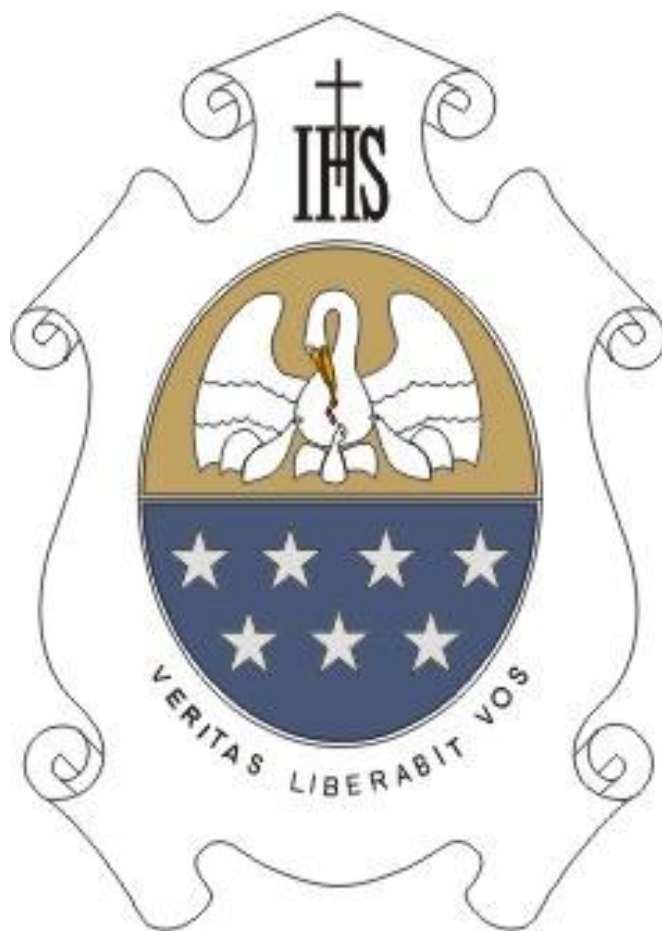


UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CÓRDOBA

FACULTAD DE MEDICINA

CÁTEDRA DE QUÍMICA I



**GUIA DE TRABAJOS PRACTICOS
2018**

TRABAJO PRÁCTICO N° 1

BIOSEGURIDAD

INTRODUCCION

En un laboratorio, hospital o en un lugar de asistencia sanitaria, existen determinados reactivos químicos, sustancias radioactivas y/o muestras biológicas que el operador debe conocer en que forma manipular para poder desarrollar su tarea eficazmente y sin riesgo.

No sólo existen riesgos de contagio de ciertas enfermedades por el contacto con muestras contaminadas, sino que el uso frecuente de ciertas sustancias químicas puede acarrear trastornos de salud si el operador no conoce la peligrosidad de las sustancias que está utilizando. Para ello existen un conjunto de medidas preventivas destinadas a proteger la salud y la seguridad de las personas frente a diferentes riesgos biológicos, químicos y físicos.

Es por ello que podría definirse a la BIOSEGURIDAD como “el conjunto de medidas o normas que se realizan para reducir al mínimo el peligro ante el cual el laboratorista está expuesto”.

Nuestro objetivo es que el alumno adquiera conocimientos básicos sobre estas normas de seguridad y tome conciencia del riesgo al que esta expuesto en los lugares donde trabajará. De esta manera creará una adecuada conciencia que es necesaria para la seguridad personal, comunitaria y del medio ambiente.

El conocimiento de la seguridad y los cuidados a tener en un laboratorio permitirá que los alumnos abandonen el temor y trabajen con mayor calidad y eficiencia.



NORMAS BASICAS DE SEGURIDAD

- **Debe cubrirse la ropa de calle con guardapolvo.** Este deberá ser de uso exclusivo dentro del laboratorio o lugar de trabajo. No se debe utilizar el guardapolvo en la calle, comedores u otros lugares fuera del ámbito de trabajo ya que de esta manera se puede diseminar sustancias u organismos en el medio ambiente.
- **Utilice guantes al trabajar.** De esta manera evitara el contacto de la piel con agentes tóxicos o infecciosos que puedan penetrar por la misma. No se tocan con ellos elementos como picaportes, teléfonos, teclados, carpetas, tapas de recipientes, etc. Si sus manos o labios están lastimados deberá extremar los cuidados.
- No encienda fósforos ni llama en las proximidades de recipientes que contengan sustancias inflamables y/o volátiles.
- No mezcle reactivos químicos si no lo indica la técnica.
- Use los reactivos en las proporciones indicadas.
- Cuando mezcle un ácido o un álcali con agua, vierta siempre el ácido o el álcali en el agua, nunca al revés, y en pequeñas cantidades a la vez. (“nunca dar de beber a un ácido” – “el pato al agua y no el agua al pato”)
- Los ácidos, álcalis y sustancias tóxicas no deben ser aspirados con pipetas comunes, para ello utilizar pro-pipetas o instrumentos que no requieran aspiración directa.
- Cuando caliente un líquido contenido en un tubo de ensayo, dirija la boca del mismo hacia un sitio donde no se encuentren personas ya que el líquido al entrar en ebullición puede proyectarse. Evitar salpicaduras.
- Las reacciones químicas que desprendan gases tóxicos o irritantes deben efectuarse bajo campana de gases.
- El material a utilizar debe estar limpio. Luego de usarlo debe lavarse con cuidado y finalmente enjuagarlo con agua destilada.
- Guarde los reactivos en envases rotulados y cerrados con sus tapas correspondientes.
- No fume, no coma, ni beba en el lugar de trabajo.
- Lea las advertencias indicadas en los rótulos de cada reactivo.
- No coloque sobre la mesada de trabajo material de lectura y escritura.
- Mantenga la limpieza y el orden en el lugar de trabajo.
- Es recomendable el lavado de manos antes y después del trato con pacientes y del trabajo en el laboratorio (con jabón o soluciones antisépticas).

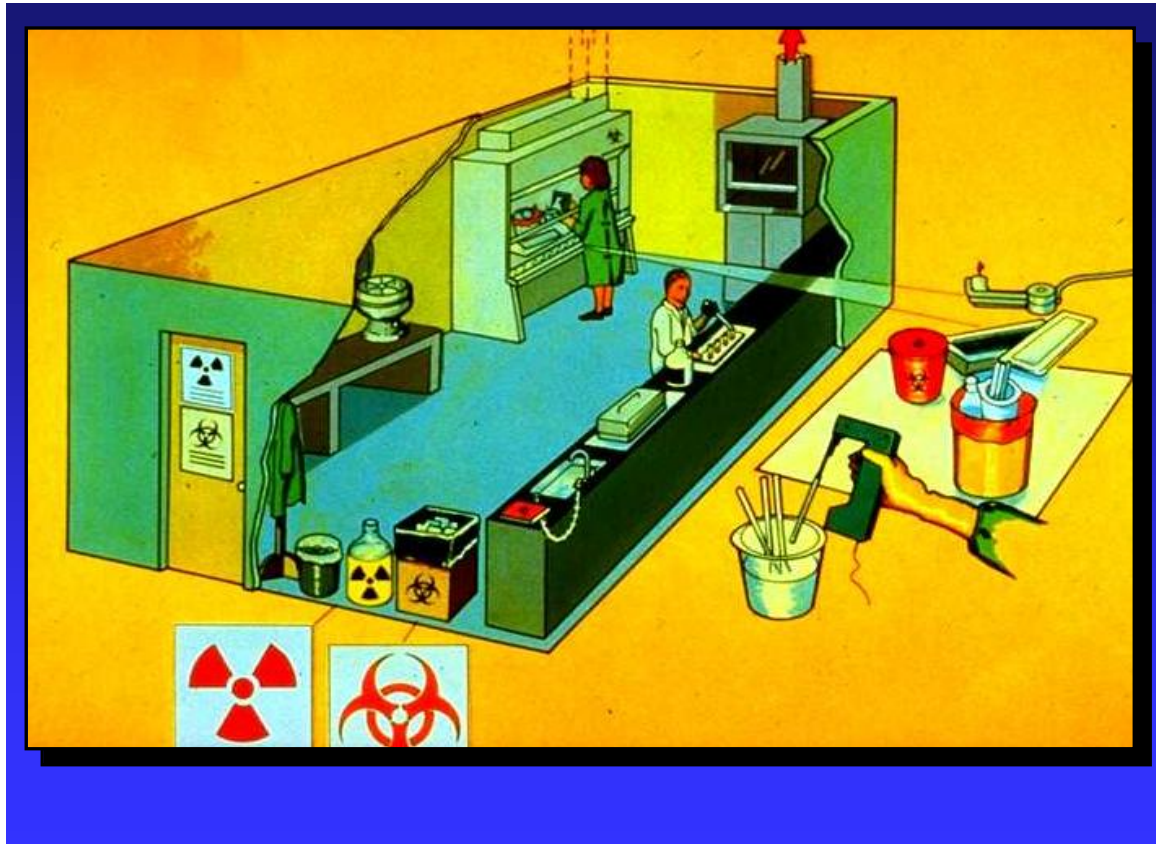
NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD PARA ATENCIÓN DE PACIENTES (GUARDIA, CONSULTORIO, ETC.)

- Mantener el lugar de trabajo en óptimas condiciones de higiene y aseo.
- No está permitido fumar en el sitio de trabajo.
- No guarde alimentos en las heladeras ni en el freezer junto con sustancias contaminantes, químicas o muestras biológicas.
- Las condiciones de temperatura, iluminación y ventilación de los sitios de trabajo deben ser confortables.
- Maneje todo paciente y muestra biológica como potencialmente infectado. Las normas universales deben aplicarse con todos los pacientes independientemente del diagnóstico.

- Se deben lavar las manos cuidadosamente antes y después de cada procedimiento o acto médico, e igualmente si se tiene contacto con material biológico.
- Utilice en forma sistemática guantes plásticos o de látex en procedimientos que involucren manipulación de elementos biológicos y cuando maneje instrumental o equipo contaminado en la atención de pacientes.
- Emplee mascarilla y protectores oculares durante las prácticas que puedan generar salpicaduras o aerosoles de sangre u otros líquidos corporales.
- Use delantal plástico en aquellos procedimientos en los que se usen aerosoles y en los que pueden producir salpicaduras o derrames importantes de sangre u otros líquidos orgánicos.
- Evite deambular con los elementos de protección personal (guardapolvo, guantes, etc.) fuera de su área de trabajo.
- Evite la atención directa de pacientes si usted presenta lesiones con exudados o dermatitis serosas hasta tanto estas hayan desaparecido.
- Si presenta alguna herida, cúbrala con gasa o apósito adhesivo.
- Mantenga actualizado su esquema de vacunación, en particular contra Hepatitis B.
- Trabajadores sometidos a tratamientos con inmunosupresores no deben trabajar en áreas de alto riesgo.
- Las mujeres embarazadas que trabajan en ambientes hospitalarios expuestas a factor de riesgo biológico deberán ser muy estrictas en el cumplimiento de las precauciones universales y, de ser necesario, se deben reubicar en áreas de menor riesgo.
- Maneje con estricta precaución los elementos corto-punzantes y deséchelos en los recipientes correspondientes ubicados en cada servicio. Evite separar manualmente la aguja de la jeringa.
- No cambie elementos corto-punzantes de un recipiente a otro. No intente doblar o partir manualmente la hoja de bisturí, cuchillas o agujas.
- Realice la desinfección y limpieza de las superficies, elementos, equipos de trabajo al final de cada procedimiento y al finalizar la jornada.
- En caso de derrame o contaminación accidental de sangre u otros líquidos biológicos sobre superficies de trabajo, cubra con papel u otro material absorbente, luego vierta hipoclorito de sodio con una concentración de 5000 partes por millón (ppm), equivalente a 0,5 % de cloro activo, sobre la superficie a tratar y área circundante, dejando actuar durante 30 min. Posteriormente limpie nuevamente la superficie con desinfectante en la misma concentración y realice limpieza con agua y jabón. El personal que realice dicho procedimiento debe usar guantes, guardapolvo y mascarilla si fuese necesario.
- En caso de ruptura de materiales de vidrio que contenían sangre u otros líquidos biológicos, los vidrios deberán recogerse con escoba, nunca con las manos. Al desecharlos envolverlos en forma tal que no lastime al personal de limpieza.
- Los recipientes para transporte de muestras deben ser de material irrompible y cierre hermético. Deben tener preferentemente tapón a rosca. Manipule, transporte y envíe las muestras disponiéndolas en recipientes seguros, con tapa y debidamente rotulados.
- Restrinja el ingreso a las áreas de alto riesgo biológico al personal no autorizado. Evite el ingreso a quienes no utilicen los elementos de protección personal necesaria y a los niños.
- Nunca se debe trabajar solo en el laboratorio, para poder recibir ayuda necesaria en caso de necesitarla.

Las normas enumeradas anteriormente no son las únicas a tener en cuenta, existen normas y procedimientos específicos para cada tarea y especialidad, y el conocimiento de las mismas permitirá aumentar la seguridad en el laboratorio y evitar accidentes.

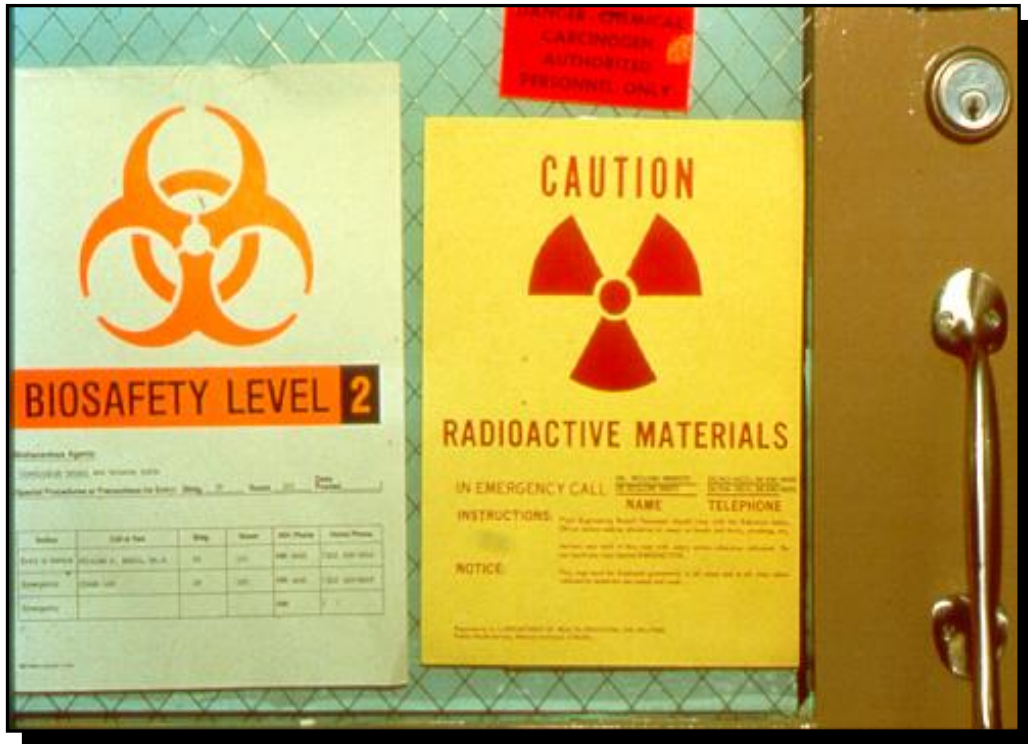
ORGANIZACIÓN Y DISEÑO DEL LABORATORIO



Todo laboratorio necesita una disposición especial del espacio que es necesario conocer, lugares específicos donde se guardaran reactivos e instrumental con el que vamos a trabajar.

Mencionaremos algunas áreas básicas:

- 1) **Puerta de ingreso:** En esta se deben indicar los nombres de las personas que trabajan en dicho laboratorio, el nombre del director responsable, como así también el símbolo que identifica con el material con que se trabaja. (Ej.: material radioactivo, biológico, etc.)



- 2) **Piletas de lavado:** Deben existir piletas para lavado del material utilizado y otra para el lavado de manos, esta última preferentemente cerca de la salida.
- 3) **Mesada de trabajo:** Deben ser de material lavable e impermeable para que sea fácil de descontaminar y limpiar. En esta mesada debemos colocar sólo material de trabajo, nunca material de lectura para evitar contaminaciones.
- 4) **Mesadas de estudio:** Deben situarse lejos de las áreas de trabajo de laboratorio y sobre esta no se deben colocar materiales ni reactivos.
- 5) **Campanas de trabajo:** serán usadas cuando manipulemos material volátil, tóxico o biológico sin descontaminar.
- 6) **Recipientes para descartar material de desecho:** según el material a descartar las bolsas serán de diferentes colores de tal manera que sean fáciles de identificar:

BOLSAS ROJAS: material patógeno

BOLSAS NEGRAS: material de escritorio y administrativo

BOLSAS AMARILLAS: material radioactivo, desechos de servicios de radioterapia y radiología.

MANIPULACIÓN DE SUSTANCIAS QUÍMICAS, PELIGROSAS Y TÓXICAS

En un laboratorio existen riesgos de contaminación con el uso frecuente de ciertas sustancias químicas puede acarrear accidentes y trastornos de salud, si el operador no conoce la peligrosidad de la sustancia. Estos trastornos pueden ir desde casos fatales inmediatos, como en la inhalación de vapores de Acido Cianhídrico, a problemas a largo plazo, como el contacto frecuente con Fenol (hepatotóxico), o-Toluidina (cancerígeno), o Bromuro de Etidio (cancerígeno).

Para la manipulación de estas sustancias existen normas básicas de seguridad. Aquí solamente mencionaremos como averiguar la peligrosidad de una sustancia química utilizando códigos universalmente reconocidos.

E: Sustancia Explosiva; **T:** Sustancia Tóxica; **O:** Sustancia Comburente; **C:** Sustancia Corrosiva; **F:** Sustancia Inflamable; **Xn:** Sustancia Nociva; **Xi:** Sustancia Irritante.

Estas letras están impresas en la etiquetas e indican el riesgo característico del producto. Además, las etiquetas llevan también las indicaciones específicas relativas a cada producto. De esta manera se respetan fielmente las normas nacionales e internacionales y hacen efectiva la prevención de los accidentes.

Si un frasco, que contenga una droga, no presenta las especificaciones indicadas, y usted desconoce la peligrosidad de la misma, consulte antes de usarla. Un lugar al que puede acudir es en los catálogos de sustancias químicas ALDRICH o al Index Merck, en los cuales se especifican el grado de peligrosidad de la droga, como así también las formas de uso de la misma.

A continuación le ofrecemos una listado de sustancias químicas de uso común en los laboratorios, indicando su grado de peligrosidad y otras consideraciones sobre las mismas (datos extraídos de los catálogos de sustancias químicas ALDRICH).

FENOL	Altamente tóxico y corrosivo.
ACIDO PICRICO	Como sólido es tóxico.
NITRATO DE PLATA	Altamente tóxico.
CLORURO DE CALCIO	Irritante - Higroscópico.
CLORURO DE POTASIO	Irritante - Higroscópico.
CLORURO DE SODIO	Irritante - Higroscópico.
HIPOCLORITO DE SODIO	Corrosivo.
SULFATO DE COBALTO	Irritante - Higroscópico.
DICROMATO DE POTASIO	Altamente tóxico- Cancerígeno.
FLUORURO DE SODIO	Tóxico.
ACIDO NITRICO	Altamente tóxico.
HIDROXIDO DE SODIO	Tóxico - Corrosivo.
ACIDO BORICO	Irritante - Higroscópico.
CLOROFORMO	Altamente tóxico - Cancerígeno.
ACIDO FORMICO	Corrosivo - Higroscópico.
ACETONA	Irritante - Líquido Inflamable.

MANIPULACIÓN DE SUSTANCIAS RADIOACTIVAS

La radiación es un fenómeno inestimable para la enseñanza, la investigación, la terapia y el diagnóstico y, correctamente usada, puede proporcionar grandes ventajas con poco o ningún riesgo. Sin embargo, el empleo inapropiado puede acarrear el riesgo de irradiación que puede resultar en enfermedades crónicas, heridas, o hasta la muerte. Debido a que nuestros sentidos son incapaces de percibir las radiaciones es necesario, adquirir la conciencia del riesgo al que el operador está expuesto. Es por ello que el trabajo con materiales radioactivos requiere ciertas precauciones y una reglamentación especial para su uso.

Aquí solo mencionaremos algunas de las reglas básicas para su utilización.

De las radiaciones emitidas por desintegración radioactiva, existen tres tipos:

- 1) Rayos Gamma: Son los más penetrantes y atraviesan fácilmente la mayoría de los materiales. Para detener este tipo de radiación se utilizan blindajes de plomo.
- 2) Rayos Beta: Tienen un considerable recorrido en el aire y son detenidas por plástico o acrílico.
- 3) Rayos Alfa: presentan muy poca penetración. Por lo general no atraviesan el recipiente que los contiene, una hoja de papel puede detener este tipo de radiación.

A continuación mencionaremos algunas reglas básicas generales para el trabajo seguro con material radioactivo.

- Es necesario conocer la naturaleza química de las emisiones radioactivas y formarse de manera permanente.
- Planear con anticipación el experimento para estar el menos tiempo posible expuesto a la radiación.
- Ubicarse a la distancia correcta de la fuente de radiación.
- Utilizar la protección apropiada para cada tipo de radiación (plomo, acrílico, papel)
- Colocar el material radioactivo sólo en las áreas de trabajo dedicadas a tal fin.
- Utilizar ropa y protección adecuada y dosímetros personales.
- Monitorear el área de trabajo constantemente para control de contaminación.
- Minimizar la acumulación de residuos radioactivos y desecharlos de acuerdo a las normas establecidas.

MANIPULACIÓN DE SUSTANCIAS BIOLÓGICAS

Las Normas de Bioseguridad dependen exclusivamente del tipo de muestras que maneje el laboratorio. Para ello, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos propone una clasificación compuesta por distintos niveles de Bioseguridad, desde el nivel 1 hasta el 4, acorde al orden creciente de peligrosidad y complejidad del material que se manipula en cada nivel.

Nivel de Bioseguridad 1 (NB1)

- Agentes: No se conocen como causa de enfermedad en humanos.
- Prácticas: Métodos microbiológicos estándares (normas básicas)
- Barrera primaria: No requieren.
- Barrera secundaria: Desagüe en cloacas

Nivel de Bioseguridad 2 (NB2)

- Agentes: Asociados a enfermedad humana. Ej.: *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Virus de Hepatitis B*, etc.
- Prácticas: Normas básicas y normas generales de bioseguridad en pacientes.
- Barrera primaria: Guardapolvos, guantes y protección ocular. Cabinas de Bioseguridad I o II (CBS I o II: Campanas de extracción de aire con filtros HEPA).
- Barrera secundaria: Desagüe en cloacas y autoclave

Nivel de Bioseguridad 3 (NB3)

- Agentes: Agentes nativos o exóticos con transmisión potencial por aerosoles. Ej.: *Mycobacterium tuberculosis*, *virus HTLV*, *virus HIV*, etc. Pueden realizarse en laboratorio de nivel 2 pero cuidando que las prácticas sean de acuerdo al nivel 3.
- Prácticas: Las del NB2 y acceso controlado, descontaminación de todo desecho previo descarte, descontaminación de la ropa de laboratorio antes de la lavandería.
- Barrera primaria: CBS I o II y ropa de laboratorio de protección, guantes y protección respiratoria si es necesaria.
- Barrera secundaria: NB2 y separación física de los pasillos de acceso, cerrado automático, doble puerta, extracción de aire viciado y presión negativa dentro del laboratorio.

Nivel de Bioseguridad 4 (NB4)

- Agentes: Agentes peligrosos o exóticos que poseen un alto riesgo de enfermedad mortal, infecciones transmitidas por aerosoles o agentes relacionados con un riesgo desconocido de transmisión. Ej.: *virus Ébola*, *virus Junín*, etc.
- Prácticas: NB3 y cambio de ropa antes de entrar, ducha al salir, todo el material es descontaminado al salir.
- Barrera primaria: CBS III o clase I y II en combinación con traje personal de cuerpo entero, con provisión de aire y presión positiva incluida.
- Barrera secundaria: NB3 y edificio separado o zona aislada, sistema de aire, vacío y descontaminación propia.

PROCEDIMIENTOS A SEGUIR EN CASO DE ACCIDENTES

Lo más importante frente a situaciones de emergencia es estar preparado. Por ello se deben tener confeccionadas guías para las diferentes situaciones que se puedan plantear en un laboratorio, guardia, consultorio, etc. y ubicarlas en un lugar visible y de rápido acceso.

Si bien es importante la velocidad con la que se actúa en estas situaciones, es más importante aun la **tranquilidad**, necesaria para poder pensar con claridad, por eso es útil conocer qué elementos son necesarios para situaciones relacionadas con cualquier tipo de accidente.

En caso de derrame de fluidos biológicos, siempre contar con:

- Guantes.
- Descartadores.
- Cuando se deba recoger todo tipo de material derramado **nunca** hacerlo directamente con las manos.
- Material absorbente.
- Batas descartables, barbijos, etc.
- Soluciones desinfectantes (Ej.: Hipoclorito de sodio 0,5%).
- Usar cubrecalzados.

En caso de derrame de sustancias ácidos, solventes orgánicos, siempre contar con:


- Indumentaria de protección e instrumental igual que con materiales biológicos.
- Protección respiratoria, en caso que se generen gases tóxicos. En estos casos se deberá ventilar inmediatamente el área de trabajo.
- Sustancias neutralizantes, conociendo las sustancias ácidas con las que se trabaja, tratar de tener sustancias neutralizantes para contrarrestar su efecto.
- Utilizar soluciones removedoras varias veces y descartar todo, tratando de no tocar nada con las manos.
- Desechar todo en bolsas plásticas, cerrarlas bien, sellarlas y rotularlas correctamente explicando su contenido.

Injurias personales:

- Si se derrama sobre la piel alguna sustancia química, inmediatamente que ocurre el accidente, lavarse y enjuagarse con abundante agua la zona afectada. Si es necesario ducharse.
- En el caso de una herida punzo-cortante, sacarse el guante, localizar la zona de la herida y apretarse repetidas veces por varios minutos bajo una corriente de agua, luego aplicarse una solución desinfectante como povidona yodada.
- Si hay salpicaduras en las conjuntivas, lavarse con agua corriente a presión moderada para limpiar bien la zona durante un periodo de varios minutos.
- Siempre luego de una exposición o contacto personal con agente biológicos será necesaria la evaluación de una profilaxis post-exposición.
- Siempre en todos los casos deben reportarse los accidentes a los superiores, quedando debidamente documentado el accidente.
- Dependiendo de la situación, la persona accidentada deberá realizarse un control médico periódico.

En caso de incendios:

- Tipos de extintores según los tipos de fuego:

TIPOS DE FUEGO	AGUA	DIÓXIDO DE CARBONO CO2	POLVO QUÍMICO	ESPUMA AFFF	AGENTES LIMPIOS
 SOLIDOS	SI	NO	SI	SI	SI
 INFLAMABLES	NO	SI	SI	SI	SI
 ELECTRICOS	NO	SI	SI	NO	SI

Agua a presión: Los extintores de agua bajo presión son diseñados para proteger áreas que contienen riesgos de fuego Clase A (combustibles sólidos). Aplicaciones típicas: Carpintería , industrias de muebles, aserraderos, depósitos, hospitales, etc.

Agua Pulverizada: Los extintores de agua pulverizada son diseñados para proteger todas las áreas que contienen riesgos de fuegos Clase A (combustibles sólidos) y Clase C (equipos eléctricos) en forma eficiente y segura. **Aplicaciones Típicas son:** servicios aéreos, edificios de departamentos, bancos, museos oficinas, hospitales, centro de cómputos, industrias electrónicas, centro de telecomunicaciones, escuelas, supermercados, etc. Agente limpio: No es tóxico, no produce problemas respiratorios y no deja residuos posteriores a la extinción. Eficiente desempeño: Manga diseñada para brindar al operador una mayor visibilidad y una fácil maniobrabilidad.

Agua y FFF (Espumógeno): Los extintores de agua con AFFF bajo presión son diseñados para proteger áreas que contienen riesgos de fuego Clase A (combustibles sólidos) y Clase B (combustibles líquidos y gaseosos). Aplicaciones típicas: Industrias químicas, petroleras, laboratorios, transportes, etc.

Dióxido de Carbono (CO2): Los extintores de dióxido de carbono son diseñados para proteger áreas que contienen riesgos de incendio Clase B (combustibles líquidos y gaseosos) y Clase C (equipos eléctricos energizados). Aplicaciones típicas: Industrias, equipos eléctricos, viviendas, transporte, comercios, escuelas, aviación, garajes, etc.

Polvo Químico Seco - ABCD: Los extintores de polvo químico seco (ABC) son diseñados para proteger áreas que contienen riesgos de fuego Clase A (combustibles sólidos), Clase B (combustibles líquidos y gaseosos), Clase C (equipos gaseosos) y Clase D (metales combustibles). Aplicaciones típicas: Industrias, oficinas, viviendas, transporte, comercios, escuelas, aviación, garajes, etc. Gran potencial extintor: De todos los agentes extintores **es el de mayor efectividad**, brindando una protección superior.

Polvo Químico Seco - BC: Los extintores de polvo químico son diseñados para proteger áreas que contienen riesgos de incendio Clase B y Clase C. Aplicaciones típicas: Industrias, equipos eléctricos, viviendas, transporte, comercios, escuelas, aviación, garajes, etc.

Polvo Químico Seco - D: Los extintores de polvo químico seco son diseñados para proteger áreas que contienen riesgos de fuego Clase D (metales combustibles) que incluye LITIO, SODIO, ALEACIONES SODIO-POTASIO, MAGNESIO Y COMPUESTOS METÁLICOS. Está cargado con polvo compuesto a base de borato de Sodio.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Manual de Bioseguridad. Facultad de Ciencias Químicas. UNC
<http://fcq.unc.edu.ar/site/todo.htm>
- 2) Manipulación sin riesgo de material radioactivo. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA (Universidad de Buenos Aires).
- 3) Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina. Departamento de Salud y Servicios Humanos. Servicio de Salud Pública. CDC (Centro de Control y Prevención de Enfermedades. NHI (Nacional Institute of Health) 4th Edition Mayo 1999.
- 4) Exposure to Blood. What healthcare personnel need to know. Information from the Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Infections Disease. The Public Health Foundation. Julio 2003. Department of Health & Human Services. CDC.

Conozca su extintor

Sólidos - Clase A Líquidos Inflamables - Clase B Instalaciones Eléctricas - Clase C



IDENTIFIQUE EL EXTINTOR



ATAQUE AL FUEGO HACIA DONDE SON IMPELIDAS LAS LLAMAS



TRASLADÉ EL EXTINTOR HASTA EL FUEGO SI ES POSIBLE CORTE ANTES LA ELECTRICIDAD



TRASLADÉ EL EXTINTOR HACIA EL FUEGO QUITÉ EL PRECINTO



COMIENCE LA EXTINCIÓN POR LA BASE Y DESDE EL BORDE



COLOQUESE EN FORMA LATERAL A LA INSTALACION



DIRIGA EL CHORRO HACIA LA BASE DEL FUEGO EN ZIG-ZAG



EN DERRAMES COMIENCE LA EXTINCIÓN DESDE LA BASE



SI EL EXTINTOR ES A BASE DE POLVO PROYECTE EL CHORRO Y BARRA EN ZIG-ZAG



INICE LA EXTINCIÓN DESDE LA BASE EN SENTIDO ASCENDENTE



UTILICE VARIOS EXTINTORES A LA VEZ SIN ENFRENTARSE



SI EL EXTINTOR ES A BASE DE UN GAS BARRA EL FUEGO CON MOVIMIENTOS ENERGICOS

MATERIALES E INSTRUMENTAL DE LABORATORIO

INTRODUCCIÓN

Si bien cada laboratorio dispone de diferente material atendiendo a su área de conocimiento, líneas de investigación y presupuesto, todos ellos disponen de materiales que son comunes.

El principal objetivo perseguido en el desarrollo del presente práctico es la adquisición del conocimiento conceptual del material utilizado y requerido de forma cotidiana en los laboratorios tanto de prácticas como de investigación y asistencia clínica y la habilidad para identificarlos, permitiendo con ello el correcto uso y manejo del mismo.

Material No Volumétrico

- **Vasos de precipitado:** Son recipientes no calibrados cilíndricos, de base ancha y paredes rectas con un pico en el borde, que se utilizan para contener soluciones y reactivos. El volumen de los más usados en el laboratorio oscila entre 25 a 1000 ml, aunque los hay hasta de 5000 ml. Soportan altas temperaturas.
- **Erlenmeyer:** Especie de vasos no calibrados de forma cónica, fondo plano y cuello angosto, usados también como contenedores. Sus volúmenes son como los anteriores. La parte alta del Erlenmeyer actúa como condensador de vapores y retarda la evaporación en un calentamiento prolongado.



Erlenmeyer



Vaso de precipitado (beaker)

- **Placas de Petri:** Son recipientes que se usan para el cultivo de microorganismos. En el mercado existen algunas ya preparadas con el medio de cultivo adecuado a cada caso. Son de plástico o vidrio y pueden ser desechables.



Placas de Petri

- **Tubos:** Son recipientes tubulares de gran variedad en longitud y diámetros. Pueden ser de plástico o de vidrio. Algunos están diseñados para resistir calentamiento y otros, como los cónicos, pueden soportar altas presiones.
- **Embudos:** Utensilio cónico, rematado por un tubo, para trasvasar líquidos de un recipiente a otro. Los llamados de **decantación** son vasijas de vidrio de cuerpo ancho y redondeado, cuello estrecho en cuyo extremo se encuentra una llave que permite abrir o cerrar el paso del fluido. Se utilizan para separar fracciones de mezclas bifásicas. Otros poseen algún tipo de material filtrante (papel de filtro, vidrio poroso, etc.)
- **Dispensadores:** Suelen ser frascos de mayor o menor volumen a los que se adapta un sistema que proporciona repetidamente un volumen seleccionado. Existen diferentes tipos con amplia gama de volúmenes, los más empleados dispensan entre 0,1 y 15 ml con una precisión del 1 %.
- **Balón:** recipiente en forma de bulbo con cuello fino, empleado para el calentamiento con evaporación controlada de soluciones. Suele utilizarse en el dispositivo de destilación.
- **Cristalizador:** recipiente similar al vaso de precipitado con paredes más cortas y boca ancha para favorecer la evaporación.
- **Mortero:** Material de porcelana o de vidrio, que se usa para moler o reducir el tamaño de una masa de sólidos a partículas mas pequeñas. Consta de dos partes: el mazo o pilón y el mortero propiamente dicho.
- **Cápsula de evaporación:** material que se utiliza para la separación de mezclas por evaporación del solvente y para someter al calor ciertas sustancias que requieren elevadas temperaturas.
- **Pizeta:** es un instrumento de vidrio o plástico que contiene líquidos y la dispensa donde el operador requiera.



Pizetas



Mortero



Embudos

Material Volumétrico

Este tipo de material se utiliza para la medición y transferencia de volúmenes. Están calibrados para medir volúmenes precisos a una temperatura determinada.

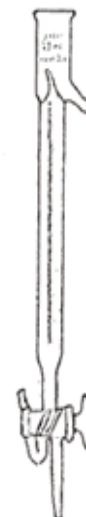
- **Matraces aforados:** Son recipientes de cuerpo redondeado o cónico con cuello largo y estrecho. Los llamados *aforados* están calibrados y contienen, a la temperatura indicada, el volumen señalado. Se utilizan para preparar volúmenes de soluciones con concentración conocida. Los volúmenes más frecuentes son: 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, y 2000 ml. Deben llenarse hasta la señal, quedando el menisco que produce el líquido tangente en la parte superior.



Matraz



Probeta



Bureta

- **Probetas:** Son recipientes cilíndricos alargados, graduados, con una base de apoyo y que se utilizan para medir volúmenes aunque por su inexactitud se emplea en medidas groseras. Los tamaños más usados oscilan entre 25 y 5000 ml.
- **Buretas:** Semejante a las pipetas. Más anchas y con un dispositivo en forma de llave (robinete) en el extremo inferior, que permite controlar el paso del líquido. Se utiliza para realizar titulaciones.
- **Pipetas:** Se usan para medir volúmenes pequeños, inferiores a 20 ml. Existen dos tipos, las *volumétricas* que dispensan un volumen fijo y las *graduadas* que suministran

volúmenes variables. Existen pipetas de doble enrase en las que el volumen se encuentra contenido entre dos marcas en el vidrio. Se llenan succionando con un dispositivo adecuado hasta el enrase conveniente (pro-pipeta). No se recomienda succionar el líquido con la boca por razones de seguridad. También existen las pipetas ***mecánicas o automáticas***, estas funcionan mediante un pistón que expulsa el aire o aspira el líquido. El líquido está contenido en una punta plástica descartable o tip. Están diseñadas para entregar volúmenes fijos o variables desde 1 μl hasta 5 ml.



Pro-pipeta



Pipetas graduada



Pipetas automáticas



Tips

Otros Materiales de Uso Común en el Laboratorio

- ***Gradillas:*** Soporte de material y tamaño diversos que se utiliza para colocar tubos.
- ***Trípode:*** Soporte de metal con tres patas que se emplea para apoyar balones, vasos de precipitación o cristalizadores para su calentamiento.

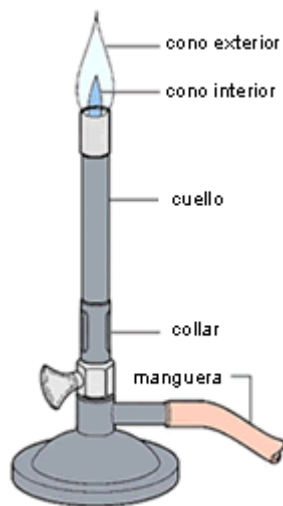


Trípode



Gradilla

- **Meberos:** Se los utiliza para proveer calor. Pueden utilizar alcohol o gas (Mechero de Bunsen y de Fisher, respectivamente) como fuente de energía.



Mechero de Bunsen



Mechero de Meker-Fisher

- **Soporte Universal:** Dispositivo metálico que sirve para sostener buretas, balones, embudos u otros materiales de laboratorio.
- **Pinza para tubos:** Instrumento de madera, que se emplea para tomar los tubos de ensayo para calentamiento, o de metal, que se emplea como soporte de material volumétrico.



- **Espátulas:** Son de diferentes materiales y se las utiliza para retirar pequeñas cantidades de sustancias sólidas y depositarlas en otro recipiente.
- **Balanzas:** Existe gran variedad. Las más utilizadas son las electrónicas. La precisión de estas balanzas suele ser de $\pm 0,1$ mg para pesos de hasta 160 g. Deben colocarse en lugar protegido de aire, sol, calor, vapores corrosivos. El soporte debe ser sólido evitando al máximo las vibraciones. Las de alta precisión deben

colocarse en una mesa específica cuya parte central está formada por un bloque de piedra o cemento. La balanza de dos platos o analítica se usa para medir la masa de los cuerpos, en ella se compara el peso de un cuerpo con el peso de objetos de masa conocida. Recordemos que el peso (P) de un cuerpo es el producto de la masa (m) del mismo por la aceleración de la gravedad ($P = m \cdot g$). Las balanzas electrónicas poseen un único plato colocado sobre un cilindro, el cual se encuentra rodeado por una bobina conectada con un imán. Una corriente eléctrica pasa sobre la bobina y crea un campo electromagnético. La balanza se calibra de tal forma que cuando este vacía un indicador marque cero. Cuando se coloca un cuerpo sobre el plato, un registrador fotoeléctrico detecta el cambio de peso y transmite una corriente que es proporcional al peso sobre el plato. Esta fuerza electromotriz producida es enviada a un indicador numérico por medio de un microprocesador. Las balanzas electrónicas son de fácil manejo. Las sustancias químicas deben ser pesadas sobre papel o sobre recipientes adecuados, nunca se deben pesar directamente sobre el plato de la balanza porque esto afecta el buen funcionamiento de la misma.

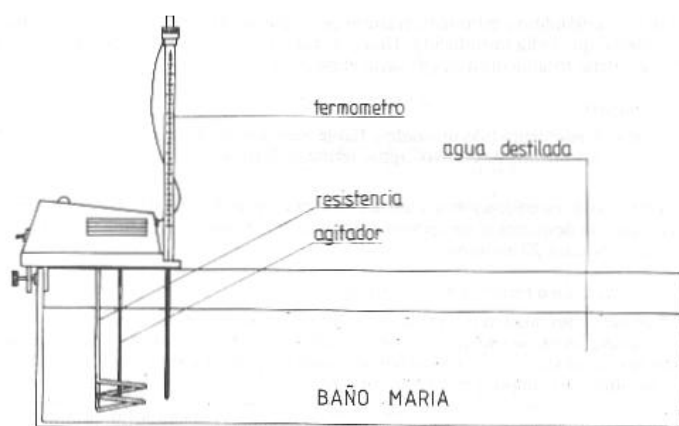


Balanza mecánica



Balanza digital

- **Baños:** Son recipientes que contienen un líquido (generalmente agua) cuya temperatura puede ajustarse. Por lo común, alcanzan hasta 100°C . Suelen tener un sistema de agitación para mantener la temperatura por igual en todo el recipiente. Dependiendo de la calidad, la variación de temperatura va desde $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$ hasta $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$.



TRABAJO PRÁCTICO N° 2

SOLUCIONES

DEFINICIÓN

Sistemas homogéneos fraccionables y de composición variable. También se las puede denominar mezclas homogéneas o disoluciones.

Las mezclas tienen propiedades físicas diferentes a las propiedades físicas de las sustancias que las constituyen y son totalmente dependientes de las cantidades relativas de cada componente.

Componentes de las soluciones:

Las soluciones están formadas como mínimo por dos componentes, el solvente y el soluto. Se denomina solvente al componente de la solución que se encuentra en mayor proporción y solutos a aquellos componentes que se encuentran en menor proporción.

Por regla general los solutos polares son disueltos por solventes polares y los solutos apolares son disueltos en solventes apolares. El solvente universal de los fluidos biológicos es el agua.

Tipos de Soluciones:

De acuerdo al estado físico de los componentes

Soluto	Solvente	Ejemplos
Sólido	Sólido	Aleaciones
Sólido	Líquido	Soluciones salinas
Líquidos	Líquidos	Etanol y agua
Líquido	Sólido	Amalgama Hg y Ag
Gas	Sólido	Roca
Gas	Líquido	CO ₂ en Agua
Gas	Gas	Aire

De acuerdo con las propiedades físico-químicas:

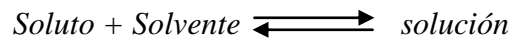
1. Soluciones Moleculares: Las partículas de soluto son moléculas. Las interacciones entre las moléculas de soluto y de agua son dipolo-dipolo o puentes de Hidrógeno. Ejemplo: glucosa en agua, etanol en agua, ácido acético en agua, etc.
2. Soluciones electrolíticas: Los solutos están constituidos por sustancias ionizables, que al ser disueltas en el solvente se descomponen en partículas pequeñas cargadas eléctricamente denominadas iones. Este proceso se denomina solvatación. Ejemplo: cloruro de sodio en agua, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, etc.

3. Soluciones atómicas: Comprenden las aleaciones de metales al estado elemental.
Ejemplo: Cu y Sn, Ag y Au, etc.

CONCEPTO DE SOLUBILIDAD

A medida que el soluto se disuelve en el solvente la cantidad de partículas dispersas en la solución aumentan, esto produce que se incremente el número de colisiones entre si y con las paredes del recipiente que las contiene generando la posibilidad que dos o más partículas se adhieran y formen cristales, proceso denominado cristalización. Cuando el proceso de cristalización y el de disolución ocurren con la misma velocidad el sistema se encuentra en equilibrio, entonces la solución se denomina solución saturada.

La solubilidad es la cantidad de soluto necesaria para formar una solución saturada en una determinada cantidad de solvente.



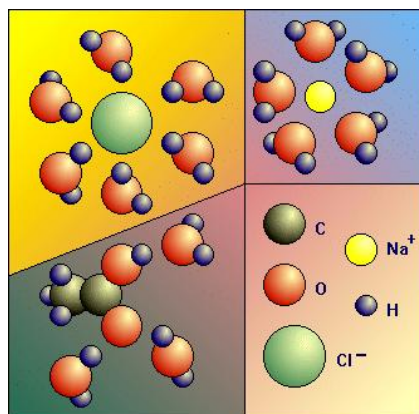
Solución Saturada: Cuando la cantidad de soluto se encuentra en el límite de la capacidad de disolución del solvente, sistema en equilibrio.

Solución Insaturada: Cuando la cantidad de soluto disuelto se encuentra por debajo de la capacidad de disolución del solvente.

Solución Sobresaturada: Cuando la cantidad de soluto excede la capacidad de disolución del solvente sin llegar a cristalizar. Generalmente las soluciones de este tipo se generan sometiendo al sistema a cambios en la temperatura y/o la presión (sistema inestable).

FACTORES QUE AFECTAN LA SOLUBILIDAD

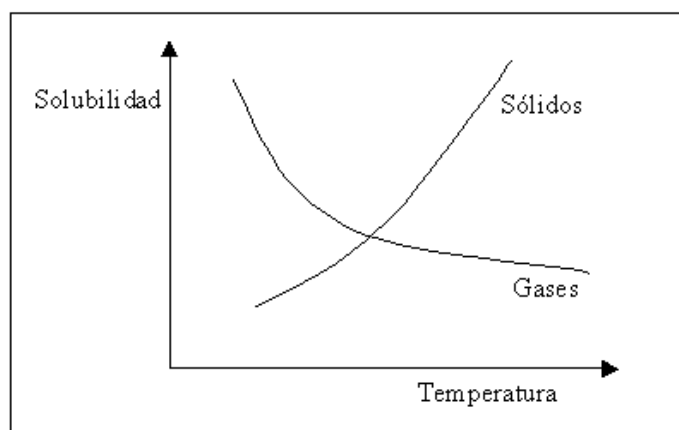
- *Naturaleza química del soluto y del solvente:* Los solutos polares son disueltos por solventes polares, los solutos apolares son disueltos por solventes apolares. Esto se debe al tipo de interacción existente entre el soluto y el solvente. Cuando se unen dos sustancias de distinta naturaleza se forma una mezcla inmiscible, en cambio cuando se unen dos sustancias que poseen la misma naturaleza química se forma una mezcla homogénea (miscible).



- *Presión:* El aumento de la presión del sistema produce el incremento de la solubilidad de los gases en el disolvente. La solubilidad de los sólidos y líquidos no se ve alterada notablemente por los cambios de presión.



- *Temperatura:* El aumento de la temperatura del sistema genera disminución de la solubilidad de los gases y aumento de la solubilidad de los sólidos.



PROPIEDADES COLIGATIVAS

Las propiedades físicas de las soluciones difieren con respecto a las propiedades físicas de los solventes puros. Esto genera características propias de las soluciones denominadas propiedades coligativas.

- **Descenso crioscópico:** El soluto disuelto en el solvente no permite que se genere el ordenamiento de las partículas necesario para producir la solidificación de la solución, por lo tanto las soluciones acuosas solidifican a temperaturas menores que el agua pura. Cuantitativamente por cada mol de partículas disueltas en solución se genera una disminución de 1.86°C del punto de congelación.
- **Ascenso ebulloscópico:** El soluto disuelto genera un aumento de las interacciones con las moléculas del solvente generando un estado de ordenamiento del sistema. Esto genera que las moléculas de solvente que quieren escapar de la superficie del líquido sean retenidas por las partículas disueltas en el mismo. Cuantitativamente

- por cada mol de partículas disueltas en solución se genera un aumento de 0.52°C del punto de ebullición.
- Disminución de la presión de vapor: Como se mencionó anteriormente las partículas del soluto retienen a las moléculas de solvente en la solución, por lo tanto la presión de vapor disminuye con respecto a la presión de vapor del solvente puro.
 - Aumento de la presión osmótica: Mientras mayor concentración de partículas se encuentren disueltas en solución mayor será la presión osmótica de la misma.

UNIDADES DE CONCENTRACIÓN

*La relación entre la cantidad de soluto y la cantidad de solución o solvente se designa como **concentración**.*

Molaridad: **M= moles soluto/volumen solución (moles/litro)**

Molalidad: **m= moles soluto/Kg solvente (moles/Kg)**

Normalidad: **N= equivalentes soluto/volumen solución (equivalentes/litro)**

Fracción molar: **X= moles soluto/moles totales**

Porcentaje peso en peso: **% P/P = (peso soluto gramos/peso solución gramos) x 100**

Porcentaje peso en volumen: **%P/V= (peso soluto gramos /volumen solución ml) x 100**

Partes por millón: **ppm = mg soluto/Kg solución**

Reglas importantes:

VOLUMEN SOLUTO + VOLUMEN SOLVENTE = VOLUMEN SOLUCIÓN

MASA SOLUTO + MASA SOLVENTE = MASA SOLUCIÓN

EJERCICIOS

- 1) Expresar en % P/V la concentración de una solución de NaCl 0,3M (PM 58,5 g/mol).
- 2) Calcular la concentración molar de una solución de NaOH (PM 40 g/mol) obtenida al disolver 0,35 g de soluto en un volumen final de solución de 1500 ml.
- 3) Calcular la concentración molar y el % P/V de una solución formada por 90 g de amoníaco en un volumen final de solución de 1900 ml. (NH₃ PM: 17 g/mol)
- 4) ¿Cual es el % P/P de una solución de NaCl formada por 50 g de soluto y 250 g de solvente? ¿Cual será su concentración expresada en ppm?

- 5) ¿Cuántos gramos de soluto hay en 200 g de una solución 15% P/P?
- 6) Calcular la concentración molal de una solución acuosa de NaCl (PM: 58,5 g/mol) formada por 5 g de soluto disueltos en 650 ml de agua ($\delta = 1 \text{ g/ml}$).
- 7) Calcular la concentración molar de partículas disueltas en una solución de KCl 1,5 M.
- 8) Se preparó una solución de Na_2CO_3 (PM: 106 g/mol) utilizando 2 ml de una solución madre de la misma droga de concentración 1,5 M que posteriormente fueron colocados en un matraz de 250 ml y se enrazó con agua destilada. ¿Cual es la concentración final de la solución expresada en Molaridad y % P/V?
- 9) Calcular cual será la temperatura de ebullición de una solución acuosa de NaCl 0,6 M.
- 10) Calcular la temperatura a la cual solidificaría una solución acuosa de CaCl_2 (PM: 111 g/mol) preparada diluyendo 8 g de soluto en un volumen final de solución de 400 ml.

ACTIVIDAD PRÁCTICA

Objetivos: Familiarizarse con la preparación y manejo de soluciones acuosas, remarcando los conceptos de dilución, concentración y propiedades coligativas. Se realizará la resolución de problemas para fijar y reforzar los conceptos aprendidos.

1) Preparación de una solución acuosa concentrada y su posterior dilución:

- Preparar una solución madre de KMnO_4 (PM 158,02 g/mol) de concentración 1M y con un volumen final de 100 ml.
- Tomar 2 ml de la solución madre y preparar una nueva solución de volumen final 100 ml.

¿Que materiales del laboratorio son necesarios para preparar estas soluciones?
¿Cual es la concentración de la segunda solución preparada? ¿Esta última es más o menos concentrada que la solución madre?
Expresa la concentración de la solución madre en % P/P.

2) Preparación de una solución acuosa sobresaturada de acetato de sodio:

- Preparar una solución de acetato de sodio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ PM 82 g/mol) pesando 16 g del mismo y llevando a volumen final de 25 ml.
- A esta última solución colocarla en un recipiente resistente al fuego y calentar hasta disolver completamente el sedimento.
- Posteriormente dejar enfriar cuidadosamente hasta que la solución se encuentre a temperatura ambiente.
- Luego colocamos un generador de cristales en el interior de la solución y dejamos reposar (solubilidad de acetato de sodio en agua 47 g/100 ml).

¿Cual es la concentración Molar?
¿Porque la solución sobresaturada contiene una cantidad de soluto disuelto mayor a la solubilidad del mismo en el solvente utilizado?

¿Una vez cristalizado el soluto el sistema sigue siendo una solución? Justificar.

3) Evaluación de la variación de pH en soluciones de NaOH.

- Preparar una solución 0.5 M de NaOH (PM 40 g/mol) de volumen final 100 ml.
- Realizar una dilución al 10% y 50% de la concentración inicial.
- Medir el pH de cada solución y anotar los resultados.

¿Según el valor obtenido las soluciones preparadas son ácidas, básicas o neutras? Justificar la respuesta. ¿Existe diferencia entre los valores de pH de las tres soluciones? ¿A que se debe esa variación?

4) Evaluación del ascenso ebulloscópico (propiedades coligativas).

- Colocar en un recipiente resistente al fuego 300 ml de agua y en otro recipiente igual volumen de una solución de NaCl 2M (PM 58,5 g/mol).
- Colocar uno de los recipientes sobre un mechero cronometrando el tiempo que tarde en llegar a ebullición el líquido contenido.
- Posteriormente sin alterar la intensidad de la llama colocar el otro recipiente y repetir el experimento. En ambos casos tomar la temperatura al comienzo de la ebullición.

¿Los tiempos cronometrados para cada muestra problema son iguales? ¿Como explica los valores obtenidos?

¿Porque es necesario mantener constantes las condiciones del experimento para ambas soluciones?

¿Se observa variación entre los valores de temperatura de las dos soluciones? ¿A que se debe?

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Química La ciencia central; Brown TL, Lemay HE y Bursten BE; Quinta Edición; Editorial Prentice-hall; 1993.
- 2) Química Biológica; Antonio Blanco; Octava Edición; Editorial El Ateneo; 2006.
- 3) Principles of Biochemistry, Lehninger A, Nelson DL, Cox M. Worth Publishers, 2º edition, 1997.
- 4) Química, R. Chang, 7ª Edición, McGraw-Hill, 2002.
- 5) Química: Curso universitario, B. H. Mahan, R. J. Myers, 4ª Edición, Addison-Wesley, 1990.

TRABAJO PRÁCTICO N° 3:

ESPECTROFOTOMETRÍA

INTRODUCCIÓN

El estudio a nivel bioquímico de cualquier biomolécula requiere la utilización de técnicas analíticas que permitan su determinación cualitativa y cuantitativa, así como su caracterización físico-química y biológica.

La espectrofotometría y la fotocolorimetría son técnicas analíticas que permiten determinar la concentración de un compuesto en solución, siendo de gran utilidad en el laboratorio clínico o bien de investigación.

El fundamento de la espectrometría se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas.

GENERALIDADES

Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna.

Cuando la luz (considerada como energía) es absorbida por una molécula se origina un salto desde un estado energético basal o fundamental, E_1 , a un estado de mayor energía (estado excitado), E_2 . Solo se absorberá la energía que permita el salto al estado excitado. Cada molécula tiene una serie de estados excitados (o bandas) que la distingue del resto de moléculas. Como consecuencia, la absorción que a distintas longitudes de onda presenta una molécula esto es, su espectro de absorción, constituye una señal de identidad de la misma. Por último, la molécula en forma excitada libera la energía absorbida hasta el estado energético fundamental.

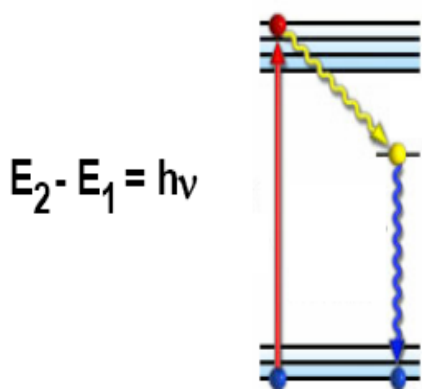
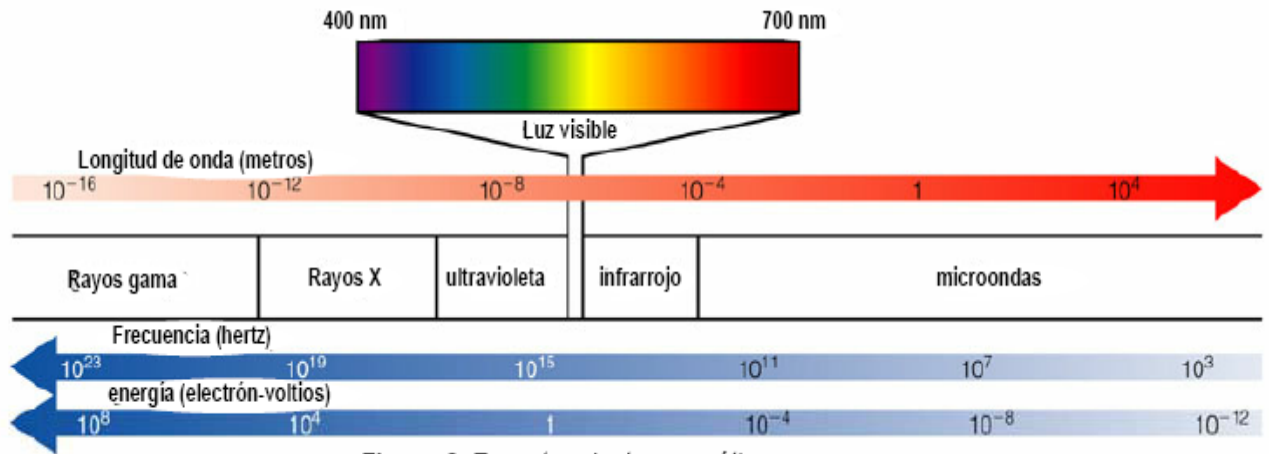


Figura 1. Diagrama de niveles de energía en una molécula. La absorción de energía luminosa hace que la molécula pase desde un estado fundamental (E_1) a otro excitado (E_2). Posteriormente la molécula relaja su energía mediante distintos mecanismos (vibración, rotación, etc.)

En espectroscopía el término luz no sólo se aplica a la forma visible de radiación electromagnética, sino también a las formas UV e IR, que son invisibles. En

espectrofotometría de absorbancia se utilizan las regiones del ultravioleta (UV cercano, de 195-400 nm) y el visible (400-780 nm).



La región UV se define como el rango de longitudes de onda de 195 a 400 nm. Es una región de energía muy alta. Provoca daño al ojo humano así como quemadura común.

Los compuestos con dobles enlaces aislados, triples enlaces, enlace peptídico, sistemas aromáticos, grupos carbonilos y otros heteroátomos tienen su máxima absorbancia en la región UV, por lo que ésta es muy importante para la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos. Diversos factores como pH, concentración de sal y el disolvente, que alteran la carga de las moléculas, provocan desplazamientos de los espectros UV.

La fuente de radiación ultravioleta es una lámpara de deuterio.

En la **región visible** apreciamos el color visible de una solución y que corresponde a las longitudes de onda de luz que transmite, no que absorbe. El color que absorbe es el complementario del color que transmite.

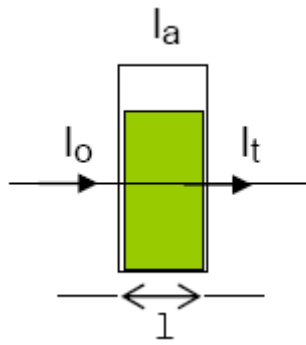
Por tanto, para realizar mediciones de absorción es necesario utilizar la longitud de onda en la que absorbe luz la solución coloreada.

La fuente de radiación visible suele ser una lámpara de tungsteno y no proporciona suficiente energía por debajo de 320 nm.

longitud de onda aproximada	color de luz que se absorbe	color de luz que se refleja o ve
390 - 435	Violeta	Amarillo verdoso
435 - 490	Azul	Amarillo
490 - 580	Verde	Rojo
580 - 595	Amarillo	Azul
595 - 650	Naranja	Azul verdoso
650 - 780	Rojo	Verde azulado

LEYES DE LA ABSORCIÓN

Transmitancia y Absorbancia: Cuando un rayo de luz de una determinada longitud de onda de intensidad I_0 incide perpendicularmente sobre una disolución de un compuesto químico que absorbe luz o **cromóforo**, el compuesto absorberá una parte de la radiación incidente (I_a) y dejará pasar el resto (I_t), de forma que se cumple: $I_0 = I_a + I_t$



La proporción de luz transmitida se denomina Transmitancia (T) y se calcula de la siguiente manera:

$$T = I_t / I_0$$

Donde I_t = la intensidad de luz transmitida por la muestra

I_0 = la intensidad de luz incidente

La transmitancia toma valores entre 0 – 1. También se expresa como porcentaje si se multiplica por 100 y sus valores están en el rango de 0-100%:

$$\%T = (I_t/I_0) \times 100$$

La relación (I_t/I_0) , también puede ser expresada como luz absorbida en vez de luz transmitida. En ese caso nos referimos a la Absorbancia (A) de una muestra.

La Absorbancia es adimensional, varía en el rango de 0 - ∞ y se define como:

$$A = \log 1/T = \log_{10} (I_0/I_t)$$

Por sustitución se comprueba que la absorbancia y el porcentaje de transmitancia están relacionados mediante la siguiente expresión:

$$A = \log (100 / \%T)$$

$$A = 2 - \log (\%T)$$

Ley de Lambert y Beer

“La cantidad de luz absorbida por una sustancia es proporcional a la intensidad de la luz incidente, a la longitud del trayecto óptico (recorrido del haz de luz) y a la concentración en que se encuentra la sustancia”

De esta ley se desprende la siguiente ecuación:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

A: absorbancia, es adimensional.

c: concentración de la sustancia, suele expresarse en moles por litro (M).

b: longitud del trayecto óptico (recorrido del haz de luz), se expresa comúnmente en centímetros.

Para colocar la sustancia coloreada en un instrumento se emplea una celda o tubo que tiene forma y tamaño invariable y en consecuencia el valor de **b** permanece constante.

ε: absorptividad molar (anteriormente, denominada coeficiente de extinción) y sus unidades son $M^{-1}.cm^{-1}$ (puesto que el producto $\epsilon \cdot b \cdot c$ debe ser adimensional). La absorptividad molar es una constante característica de cada sustancia que depende de:

1. *La longitud de onda de la luz incidente,*
2. *La identidad de la sustancia analizada*
3. *Del medio en que ésta se encuentre (pH, solvente e interacción con otras sustancias)*

También **A** depende de la longitud de onda de la luz. La cantidad de ϵ es un coeficiente de proporcionalidad entre absorbancia y el producto de $b \cdot c$, a mayor ϵ , mayor **A**.

Para conocer la longitud de onda más adecuada, en la cual una sustancia presenta la máxima absorbancia o mínima transmitancia, se puede construir una gráfica en la que se representa la absorbancia sobre el eje de ordenadas) en función de la longitud de onda de la luz empleada (sobre el eje de ordenadas). La curva obtenida se designa curva de absorción espectral y es característica para cada sustancia.

En base a lo dicho anteriormente se puede resumir la expresión de **A**:

$$A = K \cdot c$$

K es una constante igual a $\epsilon \cdot b$

En estas condiciones, la absorción de la luz por una solución dependerá directamente de la concentración de la solución; sin embargo, es necesario que se cumplan las siguientes condiciones:

- 1) Que se utilice luz monocromática.
- 2) Que el medio sea homogéneo.
- 3) Que no se produzca interacción entre el solvente y el soluto o entre las partículas del soluto.

Limitaciones de la ley de Lambert-Beer. Esta ley permite establecer una relación lineal entre absorbancia y concentraciones de una especie absorbente a una temperatura dada. La representación de absorbancia frente a concentración es una recta que pasa por el origen. Sin embargo, se encuentran frecuentes desviaciones con relación a la proporcionalidad

directa entre absorbancia y concentraciones que limitan la aplicación de la ley. Las principales causas son:

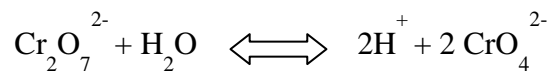
La **concentración**. Sólo es aplicable a disoluciones diluidas ($<10^{-2}$ M); en disoluciones concentradas la distancia entre partículas absorbentes es tan pequeña que se produce una modificación en la distribución de cargas de las mismas, lo que se traduce en una alteración en la capacidad de absorción a una longitud de onda determinada. Este efecto se puede eliminar mediante dilución.

La **interacción entre el soluto y la radiación** debida a mecanismos diferentes a la absorción pero que producen alteraciones en la intensidad de la luz, tales como la dispersión, reflexión, la fluorescencia, etc.

Utilización de radiación no monocromática, puesto que la ley está definida para radiaciones con una sola longitud de onda. Sin embargo, si la calidad del equipo no es buena, se obtienen bandas de radiaciones con un estrecho intervalo de longitudes de onda.

Falta de uniformidad de la muestra o especie absorbente, o presencia de impurezas.

Desviaciones químicas, debidas a reacciones del absorbente con el disolvente, como en el caso del dicromato en disoluciones no amortiguadas.



Para cualquier longitud de onda la absorptividad molar del ión dicromato y del cromato son diferentes.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SOLUTO EN UNA DISOLUCIÓN

Supongamos que se tiene una solución de una sustancia cuya concentración es desconocida (c_x) y que ella origina una absorbancia A_1 .

De acuerdo a lo anterior:

$$A_1 = K \cdot c_x$$

Si disponemos de una solución cuya concentración se conoce (c_2), denominada solución testigo, podemos determinar la absorbancia de la misma en iguales condiciones que para el problema. En este caso la absorbancia A_2 estará dada por la relación:

$$A_2 = K \cdot c_2$$

Dividiendo $A_1 = K \cdot c_x$ por $A_2 = K \cdot c_2$ se tiene:

$$A_1 / A_2 = c_x / c_2$$

Despejando el valor de c_x :

$$c_x = A_1 / A_2 \cdot c_2$$

Esto nos permite calcular la concentración de un problema si se dispone de un testigo o patrón de la sustancia y se determinan su absorbancia.

En el caso, de no poseer un testigo o patrón de referencia se debe realizar la curva de calibración en el cual se aplica la Ley de Lambert y Beer. La realización de esta curva se encuentra explicada en el punto 2 de la parte experimental.

INSTRUMENTACIÓN PARA LA MEDICIÓN DE ABSORBANCIAS DE LA LUZ VISIBLE Y ULTRAVIOLETA:

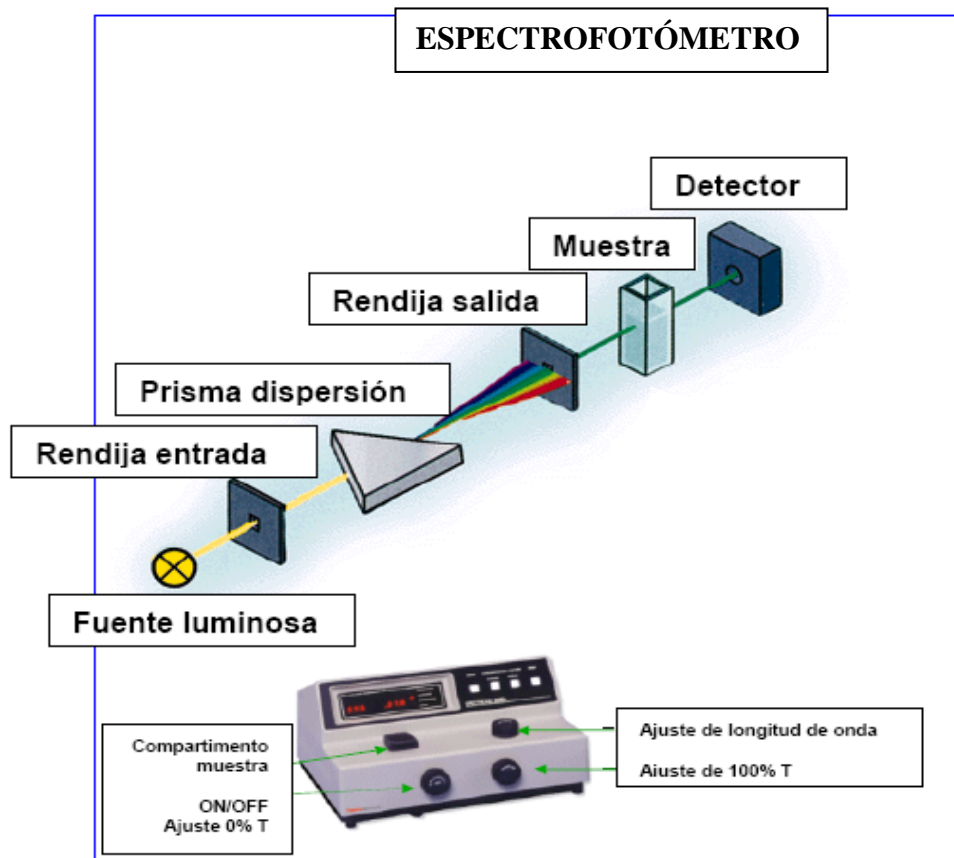
ESPECTROFOTÓMETRO UV-VISIBLE

La medición de absorbancia de la luz por las moléculas se realiza en unos aparatos llamados espectrofotómetros. Aunque pueden variar en diseño, en especial con la incorporación de ordenadores para el análisis de datos, todos los espectrofotómetros constan, según se indica en la figura, de:

1. Una fuente de energía radiante: lámpara de deuterio y tungsteno.
2. Un monocromador para la selección de radiaciones de una determinada longitud de onda: filtros, prismas, redes de difracción.
3. Un compartimento donde se aloja un recipiente transparente (cubetas o tubos) que contenga la muestra Pueden ser de vidrio, cuarzo o plástico transparente. Para medir en UV se deben usar las de cuarzo o sílice fundido, porque el vidrio no transmite la radiación UV.
4. Un detector de luz y un amplificador convertidor de las señales luminosas en señales eléctricas.
5. Un registrador o sistema de lectura de datos.

Desde el punto de vista operativo, el primer paso es seleccionar la fuente de luz y longitud de onda a la que se va a realizar la medida. Hay espectrofotómetros de un solo haz (con una sola celdilla para alojar la cubeta con la muestra) y de doble haz (con dos celdillas para dos cubetas); en nuestro caso se trabajará con los de un solo haz.

Se mide primero la absorbancia del disolvente (conocido como blanco) y al que se le asigna el valor de cero mediante el ajuste del mando, de forma que la intensidad incidente y transmitida sean iguales ($I_0=I_t$), y por tanto la absorbancia es cero. A continuación se pone en la celdilla la cubeta con la muestra y se lee la absorbancia de ésta.

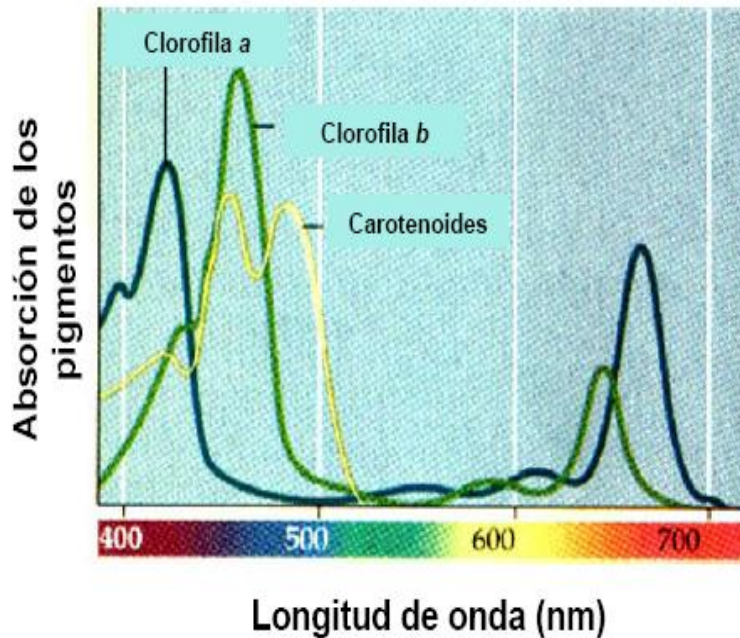


ESPECTRO DE ABSORCIÓN

El espectro de absorción es una representación gráfica que indica cantidad de luz absorbida (ϵ) a diferentes valores de λ .

A partir de una solución diluida de un compuesto, cuya absorbancia máxima entra dentro del rango de medida del espectrofotómetro, se verá el valor de absorbancia a diferentes longitudes de onda frente a un blanco que contenga el disolvente de la solución de la muestra a caracterizar. A partir del espectro de absorción se obtendrá el valor de λ al que el compuesto presenta la mayor absorbancia (λ_{\max}). Dicho λ se utilizará a la hora de hacer determinaciones cualitativas y cuantitativas del compuesto.

El espectro de absorción de un cromóforo depende, fundamentalmente, de la estructura química de la molécula.



Espectros de absorción de tres pigmentos fotosintéticos cloroplastídicos.

Observar que un compuesto puede tener más de un pico de absorción (λ_{\max}).

No obstante, hay una gran cantidad de factores que originan variaciones en los valores de λ_{\max} y ϵ_M , entre los que se incluye el pH, la polaridad del solvente o moléculas vecinas y la orientación de los cromóforos vecinos; y cada uno afecta de forma particular. Por ejemplo, variaciones originadas por cambios de pH son debidas al efecto de éste sobre la ionización del compuesto.

CURVAS DE CALIBRACIÓN

Para obtener una curva de calibración de un compuesto se preparan soluciones de diferentes concentraciones del mismo, determinándose para cada una de ellas el valor de absorbancia a λ_{\max} . Estos valores de absorbancia se representan en el eje de ordenadas (eje de y) y los de concentración en el eje de abscisas (eje de x). Se observará que, a bajas concentraciones, el aumento de concentración se corresponde con un incremento lineal en la absorbancia (zona de cumplimiento de la ley de Lambert-Beer). A concentraciones altas la linealidad se pierde y se observa que la línea se aplana, por lo que las medidas son poco fiables.

La representación de Lambert-Beer, $A = \epsilon \cdot b \cdot c$, nos permitirá calcular el valor del coeficiente de extinción molar, que corresponde a la pendiente de la recta.

APLICACIONES ANALÍTICAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

Caracterización de moléculas biológicas

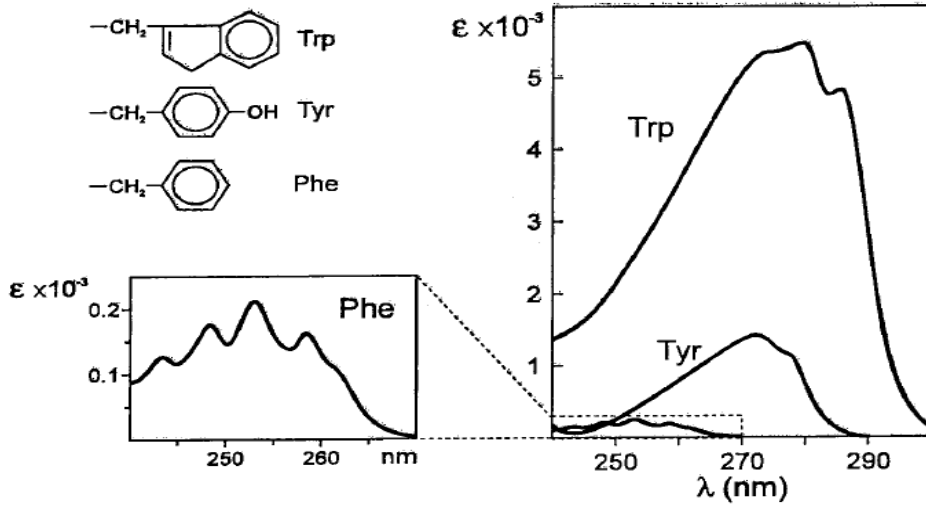
- En proteínas

Cromóforos:

- Enlaces peptídicos (~200 nm)

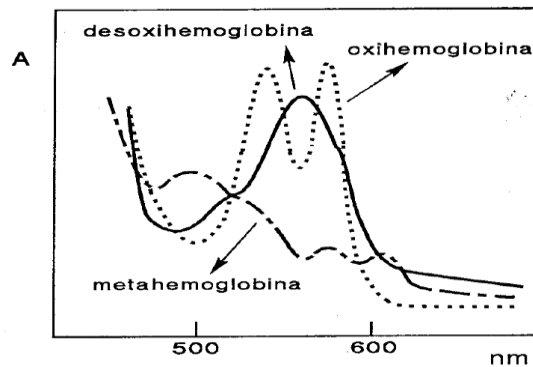
- Aminoácidos aromáticos (250-300nm)
- Grupos prostéticos: hemo, centros metálicos, (absorben en la región visible).
NAD+ / NADH (absorben en la región ultravioleta)

Aplicaciones: Determinación de concentraciones, estudios estructurales (desnaturalización, cambios conformacionales), unión de ligandos, reacciones enzimáticas.



Espectros de proteínas con grupos prostéticos:

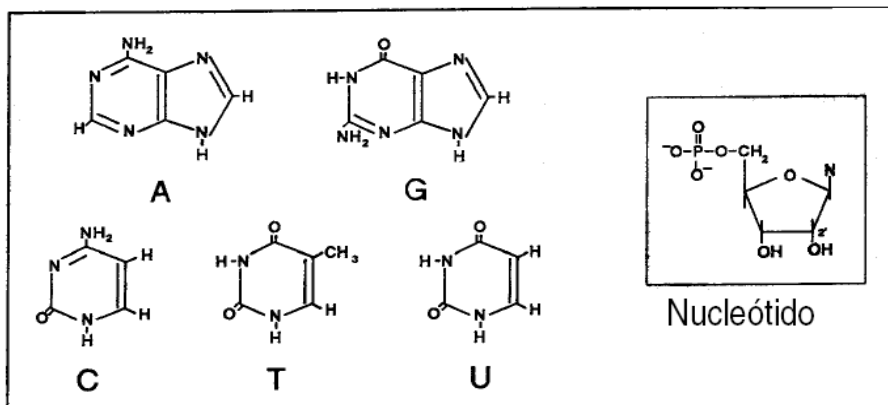
– Hemoproteínas

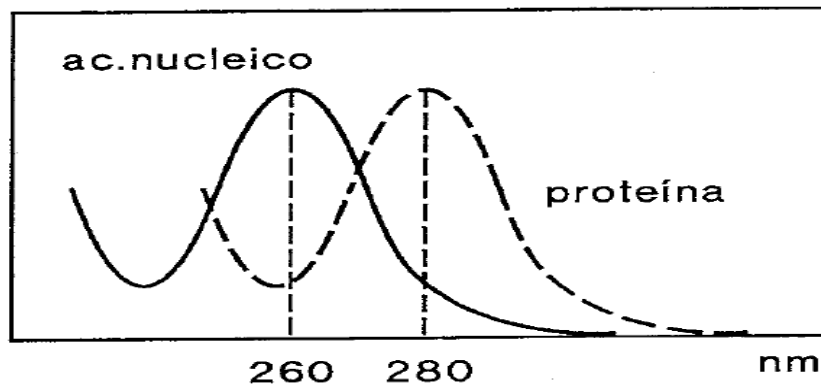


Espectros UV/Vis de ácidos nucleicos

Cromóforos:

- Bases nitrogenadas





ACTIVIDAD PRÁCTICA

En el siguiente práctico realizaremos las siguientes determinaciones:

1. Determinación de la curva espectral: Relación entre absorbancia y longitud de onda.
2. Determinación de la curva de calibración: Aplicación de la Ley de Lambert y Beer.
3. Determinación de la concentración de una solución problema.

Procedimiento

A partir de una solución de permanganato de potasio (KMnO_4) al 0.2g ‰ prepare disoluciones de acuerdo a la siguiente tabla:

Tubos	1	2	3	4	5	6
KMnO_4 0.2 ‰	4 ml	2 ml	1,5 ml	1 ml	0,5 ml	--
H_2O	--	2 ml	2,5 ml	3 ml	3,5ml	--
Solución Problema	--	--	--	--	--	4 ml
Concentración Final	0,2 g ‰	0,1 g ‰	0,075 g ‰	0,05 g ‰	0,025 g ‰	Calcular

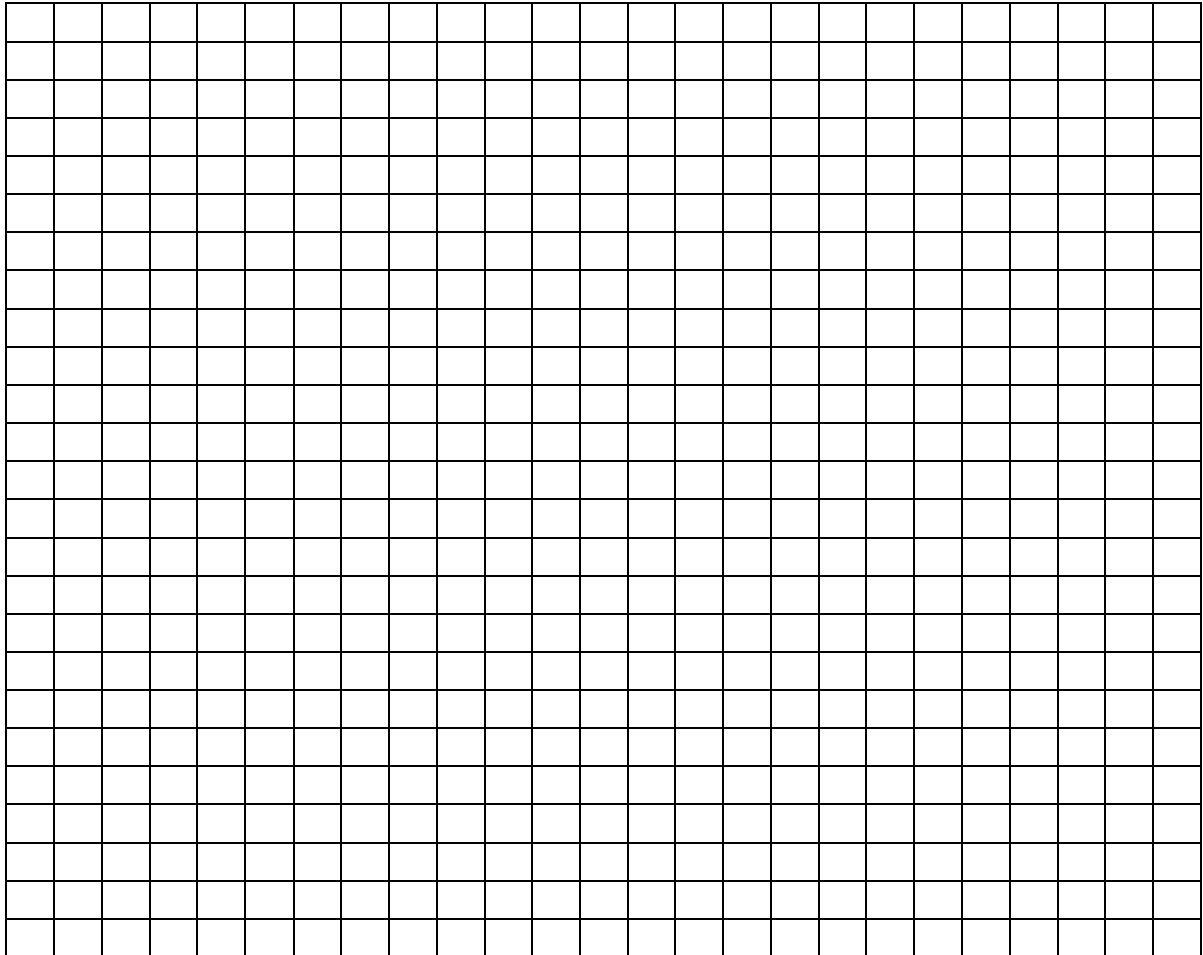
Estas disoluciones serán utilizadas para realizar los pasos siguientes:

1. Determinación de la curva espectral: Relación entre absorbancia y longitud de onda.

Este procedimiento permitirá seleccionar la longitud de onda a la cual la solución presenta mayor absorbancia. La misma será utilizada como longitud de onda de trabajo en los puntos 2 y 3.

Tome la disolución preparada en el tubo 4 y determine en el espectrofotómetro la absorbancia de la misma a distintas longitudes de onda en el rango de 400 a 700 nm, registrando los datos obtenidos.

Grafique los resultados en un sistema de coordenadas, representando los valores de absorbancia en el eje de las ordenadas y los de longitud de onda en el eje de las abscisas. Esta gráfica corresponde a la *curva de absorción espectral de la sustancia*. La longitud de onda a la que se registra la mayor absorbancia, *será la longitud de onda de trabajo*



2. Determinación de la curva de calibración: Aplicación de la Ley de Lambert y Beer.

Una vez seleccionada la longitud de onda de trabajo se leerán las absorbancias de las disoluciones de los tubos 1 al 5 y anote los datos obtenidos. Grafique.

Compruebe si se cumple la Ley de Lambert y Beer, de acuerdo a lo expuesto anteriormente.

Recordemos:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Puesto que ϵ y C son constantes, la expresión se reduce a:

$$A = K \cdot c$$

Donde,

4. ¿Cuántos ml de solución 1×10^{-5} M se puede preparar con 15 ml de solución contenida en el tubo 3?
5. Calcule los moles de soluto presentes en 200 ml de la solución del tubo 4.
6. Exprese la concentración del tubo 5 en ppm.

BIBLIOGRAFÍA

1. Química Biológica; Antonio Blanco; Octava. Edición; Editorial El Ateneo; 2006.
2. “Principles of Biochemistry”, Lehninger A, Nelson DL, Cox M. Worth Publishers, 2° edition, 1997.
3. Química, R. Chang, 7ª Edición, McGraw-Hill, 2002.
4. Guía de trabajos prácticos de la Facultad de Cs. Medicas de la UNC.

TRABAJO PRÁCTICO N° 4

PURIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

OBJETIVOS

- Comprender los fundamentos de la separación electroforética de proteínas plasmáticas.
- Determinar el corrimiento de proteínas plasmáticas en acetato de celulosa y relacionarlo con los conocimientos adquiridos acerca de proteínas con patologías asociadas a ellas.
- Realizar ensayos experimentales en los que se muestre el efecto de la temperatura sobre las proteínas.

INTRODUCCIÓN

De todas las moléculas de importancia biológica, las proteínas son las más estudiadas debido a su gran versatilidad y por ser las más abundantes de la materia viva. Muchas proteínas tienen actividad biológica, como por ejemplo las enzimas y las inmunoglobulinas. Otras actúan como hormonas (Ej.: insulina) y otras como parte estructural de las células (Ej.: microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto).

Las propiedades físico-químicas de las proteínas pueden diferir drásticamente, pero todas tienen en común su composición, basada en α -aminoácidos unidos por enlaces peptídicos dando lugar a cadenas lineales.

Para que las proteínas cumplan su función biológica tiene que adoptar una estructura espacial determinada, denominada *nativa*. La pérdida de esta estructura tridimensional conlleva a la pérdida de su actividad biológica, proceso denominado *desnaturalización*. Los agentes desnaturalizantes típicos son el calor, valores extremos de pH, disolventes orgánicos y agentes caotrópicos.

Las proteínas pueden ser estudiadas por diversos y muy diferentes métodos analíticos, algunos de los cuales se citan a continuación:

- Turbidimetría
- Nefelometría
- Electroforesis
- Electroforesis bidimensional
- Electroforesis capilar
- Cromatografía
- Enfoque isoeléctrico
- Inmuno-electroforesis
- SDS PAGE

La mayoría de las proteínas son solubles en agua o en soluciones acuosas. La solubilidad de las mismas depende de varios factores pudiendo variar con el pH, la temperatura y la presencia de sales inorgánicas o solventes no polares en el medio. El comportamiento frente a estos factores es distinto para las diferentes proteínas, lo cual se aprovecha cuando se quiere separar una proteína de una mezcla.

- Efecto del pH: el pH es un factor importante para la solubilidad de una dada proteína ya que de él depende la magnitud de la carga neta de la misma. En el punto isoeléctrico, la solubilidad de la proteína es mínima.
- Efecto de sales: A bajas concentraciones las sales favorecen la solubilidad de muchas proteínas ya que los iones inorgánicos interactúan con los grupos ionizados de las moléculas proteínicas.
- Efecto de solventes poco polares: el agregado de solventes poco polares (etanol, acetona, etc.) a soluciones de proteínas disminuye su solubilidad y produce la precipitación cuando la concentración del solvente alcanza ciertos valores según la proteína. La precipitación se acompaña de alteración de la proteína (desnaturalización) a menos que se trabaje a temperaturas muy bajas.

SIGNIFICACIÓN CLÍNICA

Las proteínas totales del suero se pueden separar en dos grandes grupos, la albúmina y las globulinas. La albúmina es la proteína de mayor concentración en la sangre (representa el 60% de las proteínas que contiene el suero); el resto son las globulinas (las cuales se dividen en α -1, α -2, β y γ globulinas). La albúmina transporta muchas moléculas pequeñas (bilirrubina, progesterona, y medicamentos) y tiene también la función de mantener la presión sanguínea, ya que favorece la presión osmótica coloidal para mantener líquidos en el torrente sanguíneo y que no pasen a los tejidos, manteniendo un equilibrio. La mayoría de las proteínas séricas son de síntesis hepática, con dos excepciones en el adulto: las gammaglobulinas y las hemoglobinas. En el recién nacido el hígado conserva la capacidad de sintetizar hemoglobina.

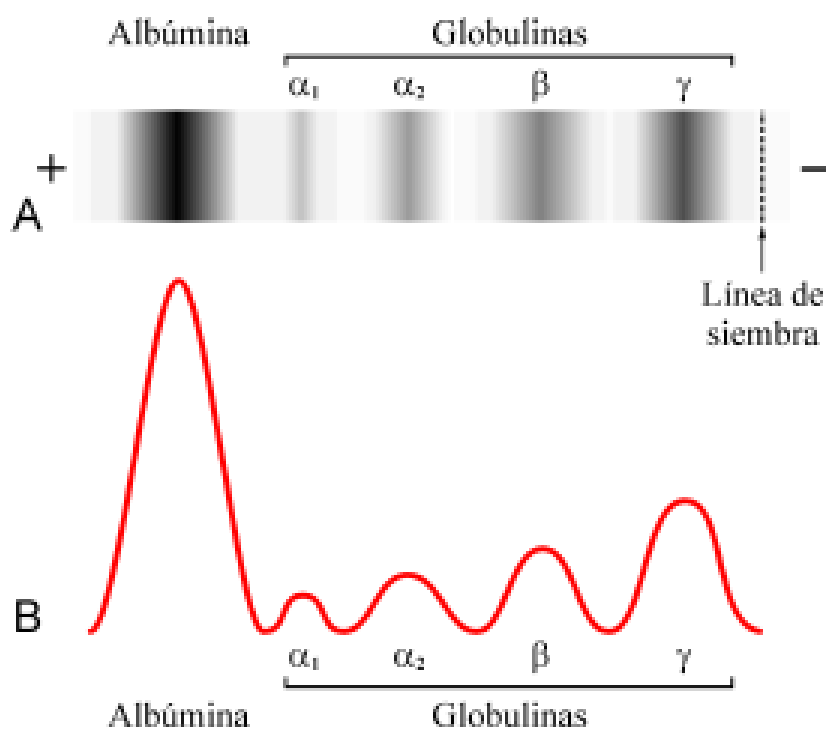
La determinación de proteínas totales se realiza para evaluar la posible presencia de enfermedades nutricionales, estado nutricional tras intervenciones de cirugía, enfermedades del riñón o del hígado, o bien que el cuerpo no absorba bien suficientes proteínas. Por ello, las concentraciones normales de las proteínas son muy variables y dependen de la dieta y, en gran parte, de la edad del individuo.

Si el valor de las proteínas totales está alterado se debe realizar un estudio pormenorizado de cada grupo, albúmina y α -1, α -2, β y γ globulinas, para saber cuál es el desequilibrio existente.

En algunos casos la albúmina está baja y el resto de proteínas está normal, debido a que la albúmina es más pequeña y al aumentar la capilaridad puede perderse del espacio sanguíneo a los tejidos y no hacerlo así las globulinas. Por ejemplo, ocurre así en las enfermedades reumáticas o colagenosis.

En las enfermedades del hígado puede encontrarse lo mismo (albúmina baja con proteínas totales normales), en este caso es porque las globulinas que se sintetizan en el retículo endotelial aumentan y la albúmina que se sintetiza en el hígado disminuye.

Por ello, el cociente de albúmina/globulina que debe de ser superior a 1 puede aportar información al médico para conocer el origen del problema.



Las proteínas de suero se pueden separar mediante electroforesis según sus puntos isoeléctricos, los cuales se encuentran entre 4,9 (albúmina) y 7,4 (γ globulinas). Al realizar la electroforesis con un tampón de pH = 8,6, todas las proteínas del suero tendrán carga negativa. La albúmina, al tener el punto isoeléctrico más alejado del pH, tiene más carga negativa y avanza más rápido, quedando más cerca del polo positivo que las γ globulinas, que migran muy poco por ser el pH próximo a su pI.

Las proteínas se miden en suero como parte de casi todos los análisis de química sanguínea. Su rango de referencia es de 6,4 a 8,2 g/dl. Su función es mantener la presión osmótica coloidal del plasma. Esta presión evita las pérdidas de líquidos hacia los tejidos. El contenido en proteínas totales del suero depende del estado nutricional, funcionamiento hepático, funcionamiento renal, errores metabólicos y afecciones como mieloma múltiple.

La deshidratación hace que todas las fracciones de proteínas aumente dando lugar a hiperproteinemia. La deshidratación puede ser resultado del descenso en el consumo o aumento de la pérdida de líquidos en enfermedades tales como el mal de Addison, la acidosis diabética, la diarrea grave o la deshidratación por exposición a altas temperaturas.

La hipoproteinemia se debe a un aumento de las pérdidas proteicas o a un bajo consumo de proteínas por inanición o malabsorción. Aumento de pérdidas se manifiesta en el síndrome nefrótico (pérdida de albúmina a través de los túmulos renales dañados), y en hemorragias por traumatismos o extensas quemaduras.

Proteínas plasmáticas representativas, características, funciones e interpretación de corridas electroforéticas normales y patológicas de cada una.

Albúmina:

- PM: 65.000 daltons.
- Concentración aproximada en suero: 3,5-5,6 mg%

- Movilidad electroforética: en buffer barbital (fuerza iónica 0.1) es anódico (es decir migra hacia el polo positivo). Es la banda mayoritaria.
- Aumenta: en casos de deshidratación.
- Disminuida: inanición, infección crónica, enfermedad renal, hemorragia, etc.

Región α -1:

- PM: 45.000 daltons.
- Concentración de 0.2 a 0.4 mg%.
- Movilidad electroforética: migran entre la albúmina y la región α -2. tiene migración más anódica que la banda α -2 y menos anódica que la albúmina.
- Aumenta: durante los procesos inflamatorios agudos, neoplasias, infartos y necrosis
- Disminuye: en enfermedad pulmonar entre otras.
- Subgrupos:
 - α_1 glicoproteína ácida
 - α_1 antitripsina
 - α_1 antiqumiotripsina
 - α_1 fetoproteína (<2 mg/100 ml)

Región α -2:

- PM: 820.000 daltons.
- Movilidad electroforética: se ubica entre las bandas α -1 y β .
- Aumenta en el síndrome nefrótico, ictericia obstructiva, tuberculosis, inflamación crónica
- Subgrupos:
 - α -2 macroglobulina (150-420 mg/100 ml; Síndrome nefrótico)
 - Ceruloplasmina (20-40 mg/100 ml; transporte Cu^{2+} ; Enf. de Wilson)
 - Haptoglobina (60-270 mg/100 ml), transporte Hemoglobina; aumenta en inflamación, neoplasias; disminuye hemólisis intravascular
 - Proteína C reactiva (<0.6 mg/100 ml). Inflamaciones e infecciones

Región β :

- Aumento moderado en síndrome nefrótico, ictericia obstructiva, cirrosis, tuberculosis, inflamación crónica
- Subgrupos:
 - Fibronectina (25-40 mg/100 ml; aumenta en síndrome nefrótico, colestasis, neoplasias. Disminuye en politraumatismos, quemaduras extensas, sepsis)
 - Transferrina (200-400 mg/100 ml; transporta Fe; aumenta en anemias)
 - Transcobalamina (900 pmol/l; transporte de B_{12}).
 - Complemento (C3, C4) (85-190; 12-36 mg/100 ml). Aumentan en procesos inflamatorios agudos. Disminuyen en reacciones autoinmunes
- Movilidad electroforética entre las fracciones α -2 y γ . En algunas migraciones electroforéticas de sueros normales suele diferenciarse la región β -1 de la β -2: la β -1 tiene movimiento más anódico que la β -2, pero también puede verse en la corrida

una sola banda; su movilidad es intermedia pero con tendencia general catódica (la fracción que casi no migra en la electroforesis de proteínas a un pH 8,6 es la γ , que prácticamente queda en el lugar de siembra, bien cerca del cátodo).

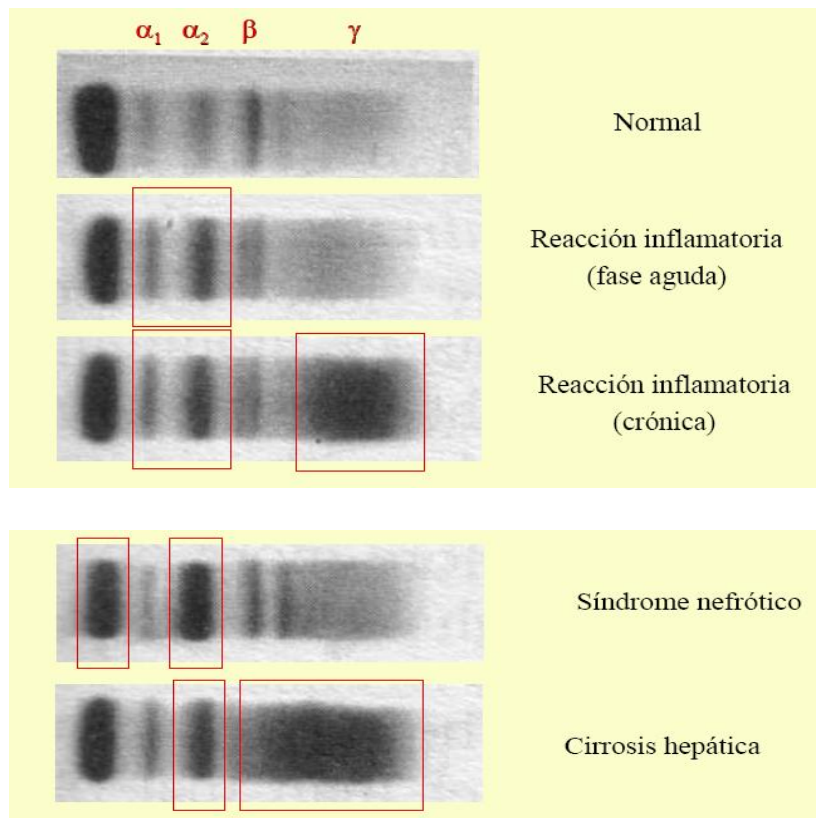
Región γ :

- Comprende la mayoría de las inmunoglobulinas. Es la que tiene escasa migración, tiende a quedarse cerca del punto de siembra.
- Aumenta: en hiperglucemia, enfermedad hepática, infecciones crónicas, etc.
- Disminuye: en edad avanzada, inducción por drogas, entre otras.
- Subgrupos:
 - Ig M aparece aumentada tras procesos agudos virales
 - Ig A aumenta en enfermedades intestinales autoinmunes (Crohn)
 - Ig G aumenta en enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso, hepatitis crónica activa, infecciones bacterianas crónicas)
 - Ig E está aumentada en enfermedades con un componente alérgico (Eczema, asma, infección parasitaria)

Las fracciones proteicas del suero que se separan por electroforesis en acetato de celulosa son la albúmina y las globulinas α -1, α -2, β y γ . En condiciones normales, los porcentajes de cada fracción que se obtiene con el análisis densitométrico de las tiras, son los siguientes:

PROTEÍNAS SÉRICAS	%
Albúmina	53-67
Globulinas α_1	2,5-5
Globulinas α_2	7-13
Globulinas β	9-14
Globulinas γ	10-21

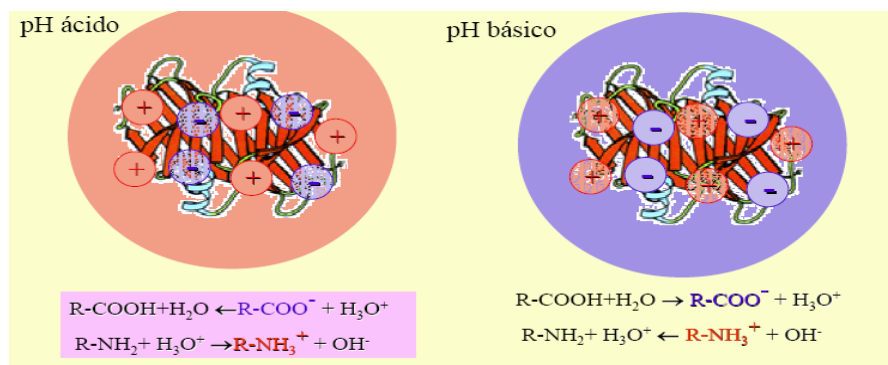
Ejemplos de corridas electroforéticas:



ELECTROFORESIS

Fundamento

La gran mayoría de las proteínas presentan carga eléctrica, derivada de aminoácidos con grupos laterales ionizables como pueden ser los residuos básicos de asparagina, lisina e histidina y los residuos ácidos del ácido glutámico y aspártico. No obstante, las cadenas laterales de tirosina también contribuyen a la carga total de la proteína. Debido a que estos grupos presentan diferentes grados de ionización la carga neta de las proteínas es muy dependiente del pH del medio.



Un parámetro importante a considerar en la electroforesis de aminoácidos y proteínas es su punto isoelectrico (pI: el pH en el cual la proteína no posee carga y permanece inmóvil), ya que conociendo el pI y el pH del medio, podemos conocer la carga de la molécula. Cuando el pH es mayor que el pI la molécula tendrá carga negativa; por el contrario, si el pH es menor que el pI la carga de la molécula será positiva. De esta manera, de acuerdo al pH del buffer de electroforesis utilizado, la muestra se sembrará en uno u otro polo: si la molécula tiene carga negativa se sembrará cerca del polo negativo (cátodo), con lo que migrará hacia el polo positivo (ánodo) y viceversa. Puede decirse que cuando una molécula cargada se coloca en un campo eléctrico se moverá hacia uno u otro electrodo dependiendo de: 1) su carga eléctrica, 2) su tamaño, 3) la intensidad del campo eléctrico y 4) la temperatura del medio.

La **electroforesis**, por lo tanto, se basa en el movimiento de partículas eléctricamente cargadas a través de un líquido como resultado de la acción de un campo eléctrico formado entre unos electrodos sumergidos en el medio. Se utiliza para separar mezclas de moléculas cargadas (proteínas, ácidos nucleicos), ya sea sobre un soporte (papel, cellogel) o dentro de un gel (agarosa, almidón o poliacrilamida) y la velocidad de migración depende de la carga, tamaño y forma de las partículas.

La fuerza iónica de la solución tampón tiene una importancia fundamental en la electroforesis, puesto que cuando es baja, permite velocidades de migración de los solutos más rápidas y con menor desprendimiento de calor. Cuando la fuerza iónica es alta, la migración se hace más lenta debido a la competencia por la corriente de los iones del buffer y las bandas migradas son más nítidas pero esta mas juntas.

El buffer ayuda a mantener el PH constante y asegura que la proteína tenga una carga constante durante toda la separación. La migración de las proteínas depende de la carga, un PH estable es necesario si quiere obtenerse patrones reproducibles. La elección del buffer depende de las propiedades de los compuestos a ser separados.

El buffer utilizado para el reservorio del electrodo es a menudo diferente del usado para preparar el gel.

Cuando se trabaja con proteína es importante evitar su desnaturalización y se debe agregar solución de sales neutras como $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ o liofilizantes (sacar agua a T bajas).

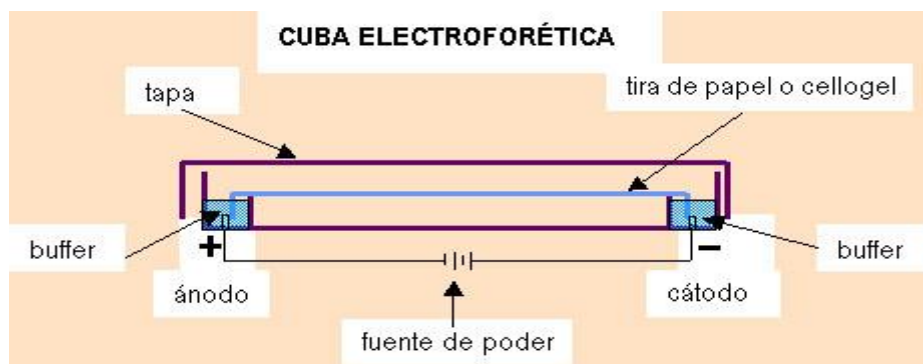


Fig 1: Esquema de una cuba electroforética horizontal y fuente de alimentación.

En el laboratorio clínico, la aplicación más importante de la electroforesis es la separación de proteínas presentes en el suero, orina y otros fluidos biológicos como el líquido cefalorraquídeo y el líquido sinovial.

Aplicaciones de la electroforesis de proteínas séricas:

- Análisis cuantitativo de clases específicas de proteínas séricas como globulinas y albúmina.
- Identificación y cuantificación de hemoglobina y sus subclases
- Análisis de isoenzimas. Separación y cuantificación de enzimas como CK y LDH y fosfatasa alcalina en sus respectivos subtipos moleculares.
- Identificación de proteínas monoclonales (proteína de Bence-Jones) en suero y orina.
- Cuantificar proteínas séricas como transferina y compuesto C3 del complemento.

Acetato de celulosa:

Se usa para la separación y caracterización de proteínas de bajo peso molecular y otras moléculas. El soporte consiste en tiras delgadas de acetato de celulosa con propiedades de adsorción mínima, por lo que se evita la formación de colas y los solutos pueden ser separados en bandas (10-13 bandas) bien definidas. Además poseen dos caras: una cara brillante y otra mate

Otras ventajas son:

- 1) La separación es muy rápida
- 2) Se pueden analizar cantidades de muestra pequeñas
- 3) Las tiras pueden hacerse transparentes
- 4) La tira se puede disolver, recuperando los componentes separados
- 5) Presentan un fondo bajo cuando se separan compuestos radiactivos

Entre sus desventajas figuran que captan poca agua y son más susceptibles a la evaporación que el papel. Son también más susceptibles al flujo electro-endosmótico.

ACTIVIDAD PRÁCTICA

En el presente Trabajo Práctico la electroforesis involucra la medición de las alteraciones de un patrón electroforético de suero respecto de un control normal, mediante la separación de las proteínas del suero en sus respectivas fracciones. También se llevara a cabo la cuantificación de proteínas totales de suero utilizando la técnica de espectrofotometría estudiada anteriormente.

MATERIALES

- Tiras de acetato de celulosa (“Cellogel”)
- Placa de vidrio
- Papel de filtro para secar las tiras de acetato
- Rodillo
- Cubeta de electroforesis
- Aplicador
- Fuente de poder

REACTIVOS

- Tampón barbital sódico 0.5 M, pH 8,6
- Solución de tinción: Solución de colorante negro de Amido (Amido Schwartz)
 - Amido Schwartz 0.5 g

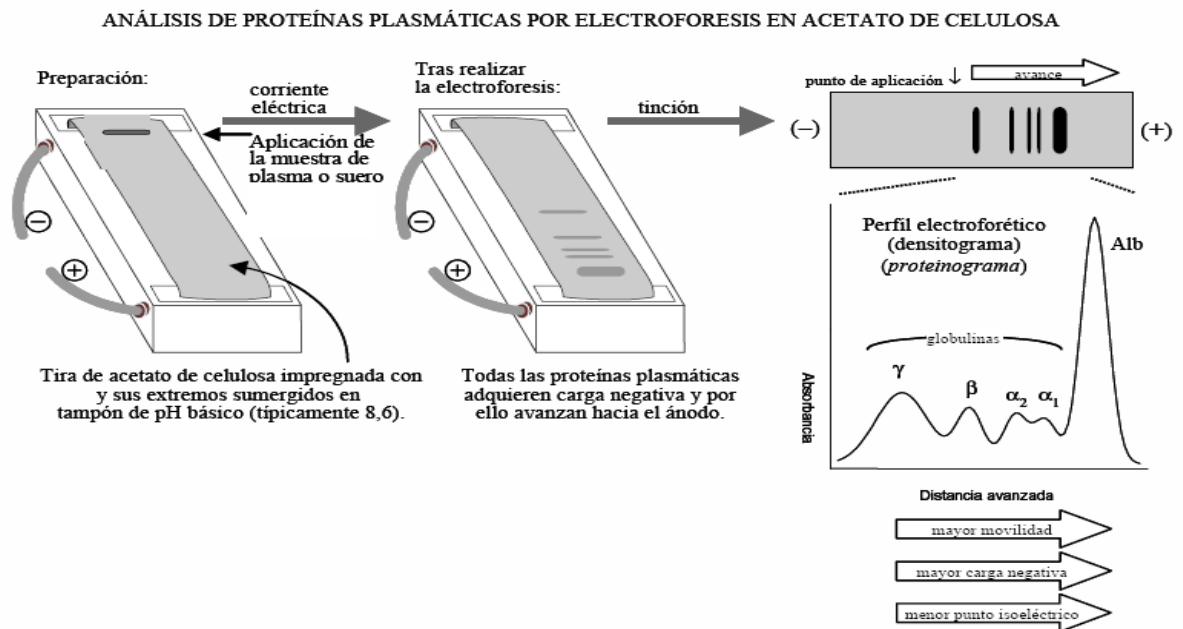
- Agua destilada 45.0 ml
 - Alcohol metílico 45.0 ml
 - Ácido acético 10.0 ml
- Solución decolorante: Metanol-agua-ácido acético (10:10:1,5)
- Sueros
- Ácido acético 80%

PROCEDIMIENTOS

A- ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

1. Electroforesis:

- Humedecer en tampón las tiras de acetato de celulosa 10 minutos antes de su uso para su equilibrado.
- Colocar la solución buffer a ambos lados del puente de la cubeta, sin cubrirlo.
- Eliminar el exceso de tampón poniendo las tiras entre dos hojas de papel de filtro, con cuidado de que no lleguen a secarse por completo.
- Extender las tiras sobre el puente de la cubeta de modo que la superficie penetrable quede hacia la parte superior. El lado penetrable es el que se ve cuando la tira se coloca en vertical delante de nosotros con el corte en la esquina inferior derecha
- Depositar con ayuda del aplicador las muestras de suero en cada tira, en el extremo próximo al cátodo (cara opaca)
- Conectar la corriente, aplicando una diferencia de potencial de 1,25 mA durante 30 minutos.



2. Revelado:

Debido a que las proteínas no se visualizan una vez concluida la migración, es necesario someter el medio soporte a una tinción específica.

- Transferir la tira de acetato de celulosa a la cubeta plástica y cubrirla con solución colorante durante 3 minutos. Al cabo de este tiempo verter la solución colorante de la cubeta al frasco de origen.
- Con ayuda de una pinza transferir la tira de acetato de celulosa en otra cubeta y agregar solución decolorante hasta cubrirla. Agitar suavemente para acelerar el proceso de decoloración durante 10 minutos. Repetir este paso hasta que se logre la decoloración completa.
- Dejar secar a temperatura ambiente.

3. Tratamiento y discusión de los resultados:

Dibujar el patrón de bandas que se ha obtenido tras la electroforesis de proteínas séricas, indicando la posición de ánodo y cátodo así como el punto de aplicación de la muestra. Identificar las proteínas que corresponden a cada banda y justificar el orden.



.....

.....

.....

.....

B- CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS:

Determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica es una técnica de rutina básica cuando se aborda un esquema de purificación de una proteína concreta, cuando se quiere conocer la actividad específica de una preparación enzimática, para el diagnóstico de enfermedades, así como para otros muchos propósitos.

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas. Muchos de estos métodos se basan en: (a) la propiedad intrínseca de las proteínas para absorber luz UV, (b) para la formación de derivados químicos, o (c) la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes. La cuantificación de proteínas presentes en los medios biológicos (sangre, orina, líquido cefalorraquídeo) es utilizada como prueba complementaria para ayuda en el diagnóstico. Esta cuantificación puede englobar al conjunto de proteínas, como es el caso de la proteinemia, proteinuria y proteinorraquia, o referirse a proteínas específicas, como albúmina, Bence-Jones, α -antitripsina, ceruloplasmin.

Determinación de Proteínas Totales

Fundamento de la reacción

Se hacen reaccionar a las proteínas con una solución que contiene el complejo EDTA/Cu 13 mmol/L en hidróxido de sodio 875 mmol/L y alquil aril poliéter. De esta manera los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el ión cúprico, en medio alcalino, para dar un complejo de color violeta con un máximo de absorción a 540 nm (longitud de onda óptima), cuya intensidad de color es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra.

Como en esta reacción el Cu se une específicamente a las proteínas, es un buen método de caracterización y cuantificación aunque no de identificación.

Dado que aún los materiales biológicos más sencillos poseen una composición química compleja, siempre se debe tener en cuenta la posibilidad de interferencias (positivas o negativas). También se debe tener en cuenta que no siempre son las mismas sustancias las que interfieren en los distintos métodos. En el caso de extractos vegetales es común encontrar sustancias como los fenoles que por lo general producen interferencias en muchos de los métodos de caracterización de proteínas.

Protocolo de la reacción

Rotular 3 tubos como B (blanco), T (testigo) y D (desconocido) y colocar en cada uno de ellos lo siguiente:

	B	T	D
Agua destilada	20 ul		
Testigo		20 ul	
Muestra desconocida			20 ul
Reactivo	2 ml	2 ml	2 ml

Mezclar, incubar 15 min. en baño maría a 37 °C. Leer en el espectrofotómetro a $\lambda = 540$ nm. Calcular la concentración de proteínas en la muestra desconocida.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andrews, A. Electrophoresis. Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications (2º edición). Editado por Clarendon Press, Oxford, 1986.
2. Blanco, A. Química Biológica. Editorial El Ateneo. 8 Edición, 2006.
3. Heer E, Margni R. Y cols. Electro e inmunolectroforesis. Manual de Laboratorio e interpretaciones fundamentales. Editorial Gumersindo Fernández. Buenos Aires, 2ª edición, 1973.
4. Enciclopedia Wikipedia (www.wikipedia.org)
5. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba, España. <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/practicasgenerales.htm>
6. Borque de Larrea L, González de Buitrago JM (1998): Proteínas del plasma sanguíneo. Bioquímica Clínica, 1ª Ed. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana (Madrid, España), pp. 191 – 20.

TRABAJO PRÁCTICO N° 5

CARACTERIZACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO

INTRODUCCIÓN

Los glúcidos o hidratos de carbono son uno de los nutrientes contenidos en los alimentos. También son las sustancias orgánicas más ampliamente distribuidas en la naturaleza. Son la principal fuente de energía de los seres vivos.

Los hidratos de carbono están compuestos de C, H, O, y éstos últimos van en la proporción del agua, de ahí que se llamen hidratos.

CLASIFICACIÓN

Las moléculas más elementales de los hidratos de carbono son los azúcares simples (monosacáridos), como la glucosa, fructosa y galactosa.

Cuando se combinan dos azúcares simples se forma un azúcar doble (disacárido), como por ejemplo la sacarosa, maltosa y lactosa. También podemos encontrar oligosacáridos, que están formados por 3 a 10 monosacáridos. Entre los polisacáridos los hay digeribles para el hombre (almidón y glucógeno) y no digeribles, que constituyen lo que llamamos fibra alimentaria o fibra dietética (celulosa, hemicelulosa, pectina, agar-agar, gomas y mucílagos), la lignina es también fibra aunque no pertenece al grupo de los carbohidratos.

Monosacáridos: glucosa, fructosa y galactosa.

Disacáridos: sacarosa, maltosa y lactosa.

Polisacáridos digeribles: almidón y glucógeno.

Polisacáridos no digeribles: celulosa, hemicelulosa, pectina, agar, gomas.

En general los azúcares simples son mono y disacáridos, con una absorción muy rápida. Los azúcares o hidratos de carbono complejos son los polisacáridos digeribles, con una absorción lenta y los no digeribles, que aunque no se absorben son beneficiosos para la salud.

MONOSACÁRIDOS

Todos los monosacáridos son solubles en agua, tienen sabor dulce, poseen color blanquecino y son cristalizables.

GLUCOSA

Es el azúcar de la uva, también está presente en la miel y en la sangre. La cantidad de azúcar en la sangre es lo que llamamos glucemia, lo normal es 0,8-1g/l sangre, cuando esta cifra está aumentada es lo que llamamos hiperglucemia, existe

hiperglucemia en la diabetes. Cuando baja de las cifras normales lo llamamos hipoglucemia, esto puede ser peligroso ya que la glucosa es el único combustible de las células cerebrales y medulares, las demás células de nuestro cuerpo pueden utilizar otros combustibles.

Casi todos los hidratos de carbono contenidos en los alimentos, se absorben como glucosa tras la digestión.

FRUCTOSA

Es el azúcar de las frutas ácidas, forma parte de la sacarosa y también se encuentra en la miel. Es soluble en agua y su poder edulcorante es muy alto. Se utiliza sobre todo en preparados para diabéticos, ya que se absorbe lentamente.

GALACTOSA

Es el monosacárido resultante del desdoblamiento de la lactosa o azúcar de la leche. No se encuentra libre en la naturaleza, pero forma parte de nuestro cerebro, de ahí su importancia.

DISACÁRIDOS

Resultan de la unión de dos monosacáridos. También poseen sabor dulce, son solubles en agua, son cristalizables y se pueden desdoblar en dos monosacáridos.

SACAROSA

Formada por la unión de una molécula de glucosa más una de fructosa. Se obtiene de la caña de azúcar y la remolacha azucarera. También la podemos encontrar en los frutos maduros. Es el azúcar común.

MALTOSA

Resulta de la unión de dos moléculas de glucosa y se encuentra en las harinas malteadas y granos germinados, también se encuentra en el hombre, ya que durante la digestión, el almidón se hidroliza dando moléculas de maltosa.

LACTOSA

La lactosa o azúcar de la leche se encuentra únicamente en este líquido en una proporción del 5%, desdoblándose por hidrólisis en glucosa y galactosa. La lactosa es la responsable de que haya personas que presenten intolerancia a la leche, y es porque no tienen en suficiente cantidad el enzima que rompe a la lactosa llamado *lactasa* y que está presente en la pared del intestino delgado. Esta enzima se pierde por procesos infecciosos gastrointestinales y por no tomar leche con frecuencia.

POLISACÁRIDOS

Son aquellos compuestos formados por más de 10 moléculas de monosacáridos. No tienen sabor dulce, son insolubles en agua y por hidrólisis se descomponen en monosacáridos.

Se dividen en:

Polisacáridos digeribles: almidón y glucógeno.

Polisacáridos no digeribles: fibra dietética o alimentaria.

POLISACÁRIDOS DIGERIBLES, COMPLEJOS O DE LENTA ABSORCIÓN

ALMIDÓN

Es un polímero de glucosa. Posee dos tipos de cadena una lineal llamada "amilosa" y otra ramificada llamada "amilopectina". Es el carbohidrato de las plantas. Se encuentra principalmente formando parte de los cereales (trigo, arroz, maíz, etc.) de los tubérculos (patatas, zanahorias) y de las legumbres (lentejas, garbanzos).

GLUCÓGENO

Es el llamado almidón animal, es el carbohidrato de reserva del músculo y el hígado de los mamíferos. Es también un polímero de glucosa. El glucógeno es sintetizado por el hígado a partir de moléculas de glucosa cuando estamos en estado de saciedad, cuando pasamos a un estado de ayuno este glucógeno se rompe dando unidades de glucosa, para que sean usadas como combustible. El glucógeno muscular es consumido directamente en el músculo, mientras que el hígado envía moléculas de glucosa a la sangre, a fin de mantener la glucemia constante. Si la glucemia baja - hipoglucemia - se produce una situación de alarma, ya que supone un peligro para el sistema nervioso central, pues depende de ella para su funcionamiento, en estas ocasiones se produce un apetito repentino, pérdida de fuerza, mareos, sudor frío, etc., se alivia comiendo algo, un terrón de azúcar, pan, galletas, etc.

FUNCIONES DE LOS CARBOHIDRATOS

Del 55-60% del total de energía ingerida, la deben aportar los glúcidos.

1 g de glúcidos produce 4 Kcal al quemarse. Cuando digerimos los glúcidos, los descomponemos en glucosa que es absorbida, circula por la sangre y penetra en las células donde se quema para producir energía.

Se almacena como glucógeno hepático o muscular y se utiliza cuando necesitamos energía. También se puede almacenar en forma de grasa, por esta razón se dice que los carbohidratos engordan.

Son la principal fuente de energía del organismo humano. Tiene un efecto ahorrador de otros nutrientes energéticos. Impiden que se quemen solo grasas pues esto conduce a la aparición de cuerpos cetónicos. Impiden la oxidación de proteínas musculares. Por estas razones nunca debemos tomar un régimen alimentario que no contengan hidratos de carbono.

Los glúcidos se deben tomar preferiblemente, en forma de polisacáridos, debido a que su absorción es más lenta; los mono y disacáridos ingeridos sin combinar, son absorbidos con gran rapidez, produciendo un aumento en la formación de grasas.

POLISACÁRIDOS NO DIGERIBLES: "LA FIBRA ALIMENTARIA"

La fibra alimentaria es la parte que no se digiere ni se absorbe de muchos alimentos de origen vegetal. Está formada por distintas sustancias, casi todas son polisacáridos. También se denomina fibra dietética, alimentaria o vegetal. A pesar de que se podría considerar un alimento poco útil en alimentación, ya que se elimina por las heces casi intacta, se han estudiado sus propiedades y descubierto que hay relación entre consumir poca fibra y la aparición de algunas enfermedades.

CELULOSA

Es un polímero de glucosa, pero la unión entre las glucosas es la opuesta que en el almidón y no puede ser digerida por las enzimas humanas. Insoluble en agua.

HEMICELULOSA

Es un polisacárido que acompaña a la celulosa en las partes más duras de los vegetales. Abundante en cereales e insoluble en agua.

PECTINA

Sustancia gelificante presente en las frutas, sobre todo manzana y cítricos. Soluble en agua y forma con el agua un gel, es muy utilizado en la industria de la alimentación como aditivo gelificante para mermeladas y en confitería.

GOMAS (GOMA ARÁBIGA, GOMA DE TRAGACANTO, GOMA GUAR)

Son polisacáridos que tienen propiedades gelificantes, emulsionantes y espesantes, por todo ello son utilizados en la industria alimentaria como aditivos.

MUCÍLAGOS (AGAR-AGAR, CARRAGENATOS Y ALGINATOS)

Son sustancias extraídas de vegetales marinos, es decir, de las algas marinas. Como los anteriores son utilizados por la industria como aditivos alimentarios, también son utilizados para la elaboración de alimentos bajos en calorías.

LIGNINA

Es un componente de la fibra alimentaria, aunque no pertenece a los carbohidratos lo incluimos aquí. Insoluble en agua.

NATURALEZA QUÍMICA

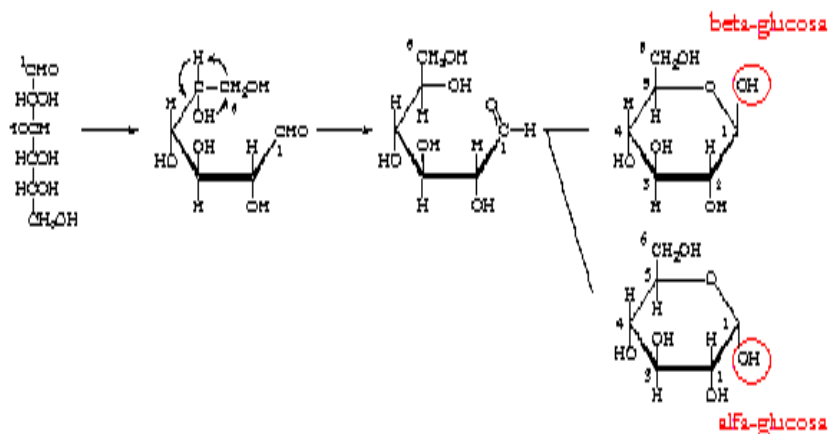
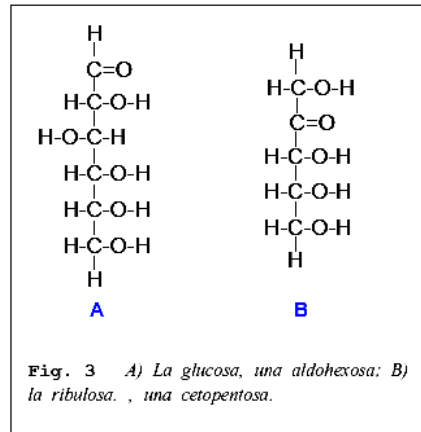
Químicamente son polihidroxialdehídos, polihidroxicetonas o sus derivados.

Se caracterizan por no ser hidrolizables.

Un polihidroxialdehído es un compuesto orgánico que tiene una función aldehído en el primer carbono y en los restantes carbonos una función alcohol. Las polihidroxicetonas en lugar de una función aldehído tienen una función cetona,

normalmente en el carbono 2. Los monosacáridos que tienen función aldehído se llaman **aldosas** y **cetosas** los que tienen una función cetona.

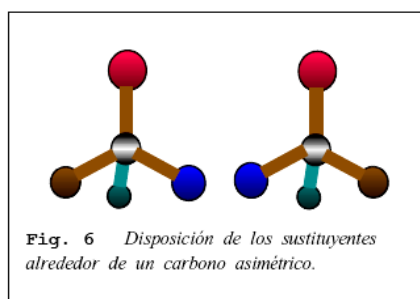
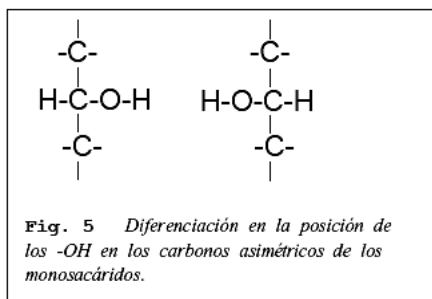
Los monosacáridos responden a la fórmula empírica $C_n(H_2O)_n$, de aquí proviene el nombre de hidratos de carbono. El valor de n normalmente está comprendido entre 3 y 7.



DIASTEREOISOMERÍA

Las fórmulas lineales de los monosacáridos se escriben con el carbono 1, el carbono que lleva la función aldehído o el carbono más próximo a la función cetona, en la parte superior y el resto de los carbonos en orden descendente.

Los monosacáridos tienen átomos de carbono asimétricos (carbonos que tienen 4 sustituyentes diferentes) por lo que presentan **diastereoisomería** (isómeros ópticos). Los diastereoisómeros se diferencian en su formulación en la colocación de los H y OH de cada carbono asimétrico a un lado u otro del esqueleto carbonado de la molécula. El número de isómeros ópticos, para un monosacárido dado, es de 2^n , siendo n el número de átomos de carbono asimétricos que tenga. La glucosa con cuatro átomos de carbono asimétricos tendrá $(2)^4=16$ isómeros ópticos. De los 2^n isómeros posibles de un monosacárido, la mitad pertenecen a la serie D, y la otra mitad son sus imágenes especulares y pertenecen a la serie L. Los monosacáridos que tienen el OH del último átomo de carbono asimétrico a la derecha pertenecen a la serie D, los de la serie L los tienen a la izquierda. En los seres vivos normalmente sólo aparece la forma D.



TRABAJO PRÁCTICO

OBJETIVOS

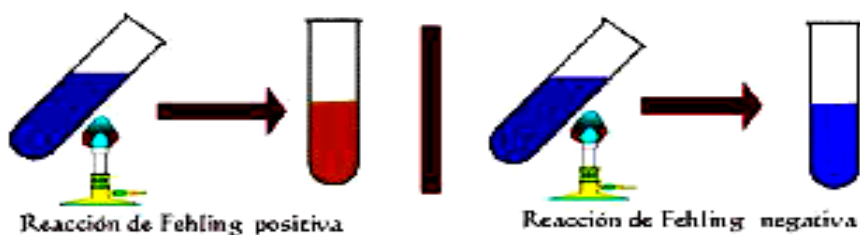
- Familiarizarse con la nomenclatura, estructura y funciones de los hidratos de carbono.
- Evaluar sus características físico-químicas, haciendo hincapié en el poder reductor de algunos de ellos. Se realizarán algunos de los tests específicos para la identificación de glúcidos de importancia biológica y médica.
- Finalmente se evaluarán los conceptos desarrollados durante la actividad práctica.

1. ESTUDIO DE AZÚCARES REDUCTORES

FUNDAMENTO

Los carbohidratos que presentan grupos aldehídicos libres o en forma hemiacetálica (grupos aldehídicos potenciales) no bloqueados (por ejemplo formando parte de un enlace glicosídico) pueden ser oxidados por diferentes reactivos, por lo que se les denomina **azúcares reductores**. Este carácter reductor puede ponerse de manifiesto por medio de una reacción redox llevada a cabo entre ellos y el sulfato de Cobre (II). Las soluciones de esta sal tienen color azul. Tras la reacción con el glúcido reductor se forma óxido de Cobre (I) de color rojo. De este modo, el cambio de color indica que se ha producido la citada reacción y que, por lo tanto, el glúcido presente es reductor.





TÉCNICA

Poner en los tubos de ensayo 3ml de la solución de glucosa, maltosa, lactosa, fructosa o sacarosa (según indique el profesor).

Añadir 1ml de solución de Fehling A (contiene CuSO_4) y 1ml de Fehling B (lleva NaOH para alcalinizar el medio y permitir la reacción)

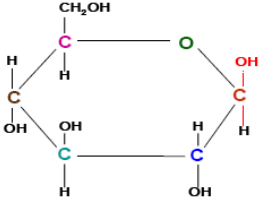
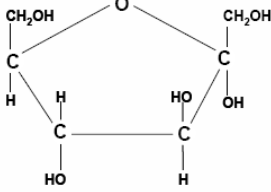
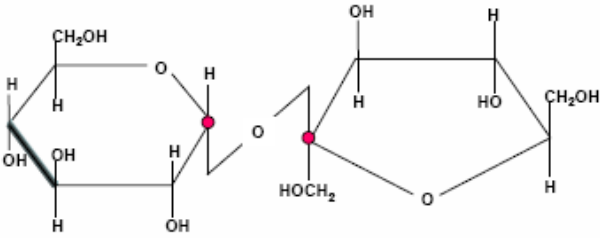
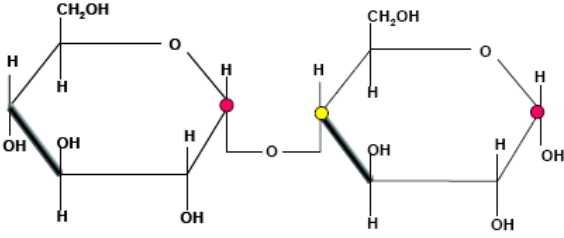
Calentar los tubos a la llama del mechero hasta que hiervan.

La reacción será positiva si la muestra se vuelve de color rojo y será negativa si queda azul o cambia a un tono azul-verdoso.

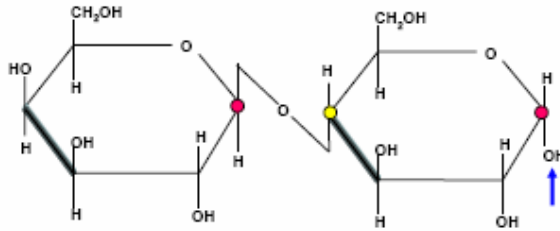
□ **Reactivo de Fehling:** Mezclar a partes iguales (el día de su uso) las soluciones A y B:

Solución A de Fehling: Sulfato de cobre 0.28 N (35 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 500 ml de agua destilada).

Solución B de Fehling: Tartrato sódico-potásico 1.5 N (158 g en 500 ml) en hidróxido potásico 4 N (112 g en 500 ml de agua destilada).

Hidratos de Carbono	Estructura	Resultado del test
Glucosa	 <p>Glucosa: Sustancia muy difundida tanto entre los vegetales (uvas) como entre los animales. Forma parte de muchos disacáridos y polisacáridos. Importante fuente de energía de las células. En la sangre hay un uno por mil de glucosa procedente de la digestión.</p>	
Fructosa	 <p>Fructosa: Cetohehexosa. Sustancia muy difundida entre las plantas, sobre todo en sus frutos, y en la miel. En el hígado se transforma en glucosa. Junto con la glucosa forma el disacárido sacarosa.</p>	
Sacarosa	 <p>Sacarosa: Formada por α-D-glucosa y β-D-fructosa (enlace $1\alpha-2\beta$), unidas por los OH de los carbonos anoméricos y por lo tanto no reductor. Es el azúcar de mesa. Se encuentra en la caña de azúcar y en la remolacha.</p>	
Maltosa	 <p>Maltosa: Formada por dos D-glucosas unidas por un enlace $1\alpha \rightarrow 4$. Reductor. Se obtiene por hidrólisis del almidón y del glucógeno. Aparece en la germinación de la cebada empleada en la fabricación de la cerveza. Tostada se emplea como sucedáneo del café (malta).</p>	

Lactosa



Lactosa: Formada por β -D-galactosa y D-glucosa, unidas $1\beta \rightarrow 4$. Reductor. Se encuentra en la leche de los mamíferos.

2. HIDRÓLISIS DE LA SACAROSA

FUNDAMENTO

La sacarosa es un disacárido que no posee carbonos anoméricos libres por lo que carece de poder reductor y la reacción con el licor de Fehling es negativa, tal y como ha quedado demostrado en el experimento 1. Sin embargo, en presencia de HCl y en caliente, la sacarosa se hidroliza, es decir, incorpora una molécula de agua y se descompone en los monosacáridos que la forman, glucosa y fructosa, que sí son reductores. La prueba de que se ha verificado la hidrólisis se realiza con el licor de Fehling y, si el resultado es positivo, aparecerá un precipitado rojo. Si el resultado es negativo, la hidrólisis no se ha realizado correctamente y si en el resultado final aparece una coloración verde en el tubo de ensayo se debe a una hidrólisis parcial de la sacarosa.

TÉCNICA

1. Tomar 3ml de solución de sacarosa y añadir 10 gotas de HCl diluido.
2. Calentar a la llama del mechero durante unos 5 minutos.
3. Dejar enfriar.
4. Neutralizar añadiendo 3ml de solución alcalina.
5. Realizar la prueba de Fehling como se indica en el experimento 1.
6. Observar y anotar los resultados.

3. INVESTIGACIÓN DE POLISACÁRIDOS (ALMIDÓN)

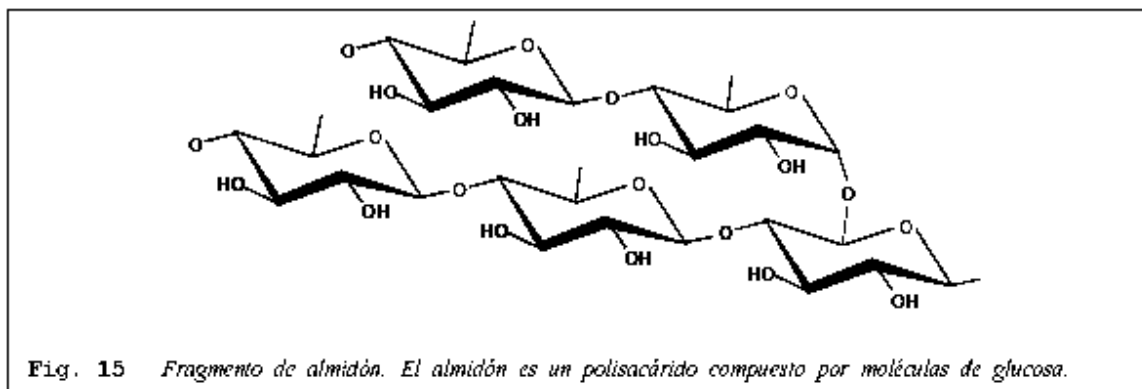
FUNDAMENTO

El almidón es un polisacárido vegetal formado por dos componentes: la amilosa y la amilopectina. La primera se colorea de azul en presencia de yodo debido no a una reacción química sino a la adsorción o fijación de yodo en la superficie de la molécula de amilosa, lo cual sólo ocurre en frío. Como reactivo se usa una solución denominada lugol que contiene yodo y yoduro potásico.

Como los polisacáridos no tienen poder reductor, la reacción de Fehling da negativa.

TÉCNICA

1. Colocar en un tubo de ensayo 3ml de la solución de almidón.
2. Añadir 3 gotas de la solución de lugol.
3. Observar y anotar los resultados.
4. Calentar suavemente, sin que llegue a hervir, hasta que pierda el color.
5. Enfriar el tubo de ensayo al grifo y observar cómo, a los 2-3 minutos, reaparece el color azul.



RESULTADOS

4. REACCIÓN DE TOLLENS. FORMACIÓN DEL ESPEJO DE PLATA.

FUNDAMENTO

El carácter reductor puede ponerse de manifiesto por medio de una reacción redox llevada a cabo entre los carbohidratos y el nitrato de plata. Los carbohidratos con grupos aldehído libre reducen la plata iónica a plata metálica.

TÉCNICA

En un tubo de ensayo se depositan 3 ml de la disolución de nitrato de plata 0,05 M, se añade hidróxido de amonio (trabajar bajo campana ya que es mismo es muy tóxico) en una proporción 1:1 gota a gota hasta la total redisolución del precipitado que se forma (agitando), por formación del complejo plata amoniacal.

Se calienta en mechero a ebullición y se le añaden 4 ml de disolución de glucosa al 20 % y se calienta de nuevo.

La reacción es positiva cuando se forma un espejo de plata en las paredes del tubo.

RESULTADO



Preguntas

- 1) ¿Qué tipo de reacción química ocurre durante el test de Fehling?
- 2) ¿Qué monosacárido es importante como fuente de energía en el organismo humano?
- 3) ¿Porque la sacarosa consumida en la dieta por una persona fisiológicamente normal termina generando metabolitos con alto poder reductor? Nómbrelos.
- 4) El glucógeno es un polisacárido formado por moléculas de amilopectina muy ramificadas, ¿como podría diferenciar entre un recipiente conteniendo glucógeno y otro recipiente conteniendo almidón si ambos no estuviesen correctamente rotulados? Justificar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Química Biológica; Antonio Blanco; Octava Edición; Editorial El Ateneo; 2006.
2. Química La ciencia central; Brown TL, Lemay HE y Bursten BE; Quinta Edición; Editorial Prentice-hall; 1993.
3. Fisiología Médica; Ganong WF; Decimosexta Edición; Editorial El Manual Moderno; 1998.
4. Química Orgánica; Wade LG; Quinta Edición; Editorial Prentice-hall; 2004.

TRABAJO PRACTICO N° 6:

CARACTERIZACIÓN DE LÍPIDOS

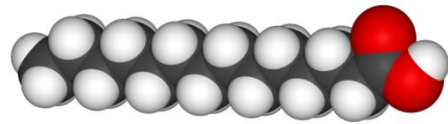
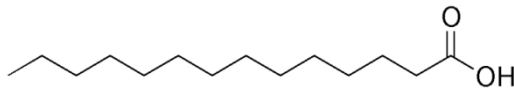
INTRODUCCIÓN

Los lípidos son moléculas altamente heterogéneas de composición y propiedades variables, cuya característica principal es la insolubilidad en solventes polares como el agua. Sus funciones a nivel biológico son variadas, como la de reserva energética, funciones estructurales (como lo son la formación de las membranas biológicas y la protección mecánica de ciertas áreas del cuerpo), la formación de vainas de mielina que permiten la transmisión de los impulsos nerviosos en el cerebro, la absorción de vitaminas, la síntesis de hormonas, etc.

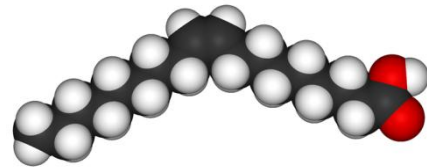
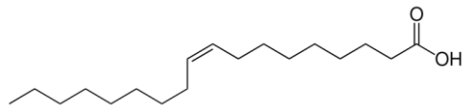
Ácidos Grasos

Los **ácidos grasos** son moléculas formadas por una larga cadena alifática, que tienen un grupo carboxilo en un extremo. Los ácidos grasos en los seres vivos son generalmente ácidos carboxílicos no ramificados, saturados (sin doble ligaduras en su cadena carbonada) o insaturados (con doble ligaduras en su cadena carbonada), con un número par de átomos de carbono entre 4 y 26.

Ácido mirístico
(14:0)



Ácido oléico
(18:1 Δ9)



PROPIEDADES FÍSICAS

El **punto de fusión** de los ácidos grasos aumenta proporcionalmente con el largo de la cadena carbonada, y disminuye notablemente con el número de dobles enlaces presentes en la cadena. Los ácidos grasos saturados con 10 o más átomos de carbono son sólidos a temperatura ambiente.

La **solubilidad** de los ácidos grasos en solventes polares como el agua varía de manera inversamente proporcional con el largo de su cadena carbonada.

PROPIEDADES QUÍMICAS

El **carácter ácido** está dado por el grupo carboxilo y su capacidad ácida varía de manera proporcional a su solubilidad y por lo tanto, de manera inversamente proporcional al largo de la cadena carbonada.



La **saponificación** es una reacción química entre un **lípid**o saponificable (o un **ácido graso**) y una base o **álcali**, en la que se obtiene como productos la sal de dicho ácido y la base.

Las sales resultantes de esta reacción en ácidos grasos son llamadas jabones. Estas sales contienen una cabeza altamente polar y soluble en agua, y una cadena carbonada altamente apolar, es decir que tienen la particularidad de ser anfipáticos (solubles tanto en solventes polares como apolares). Al solubilizarse en solventes polares como el agua forman micelas, que pueden atrapar en su interior sustancias hidrofóbicas como grasas o aceites, produciendo un efecto emulsionante, o aire, produciendo un efecto espumante.

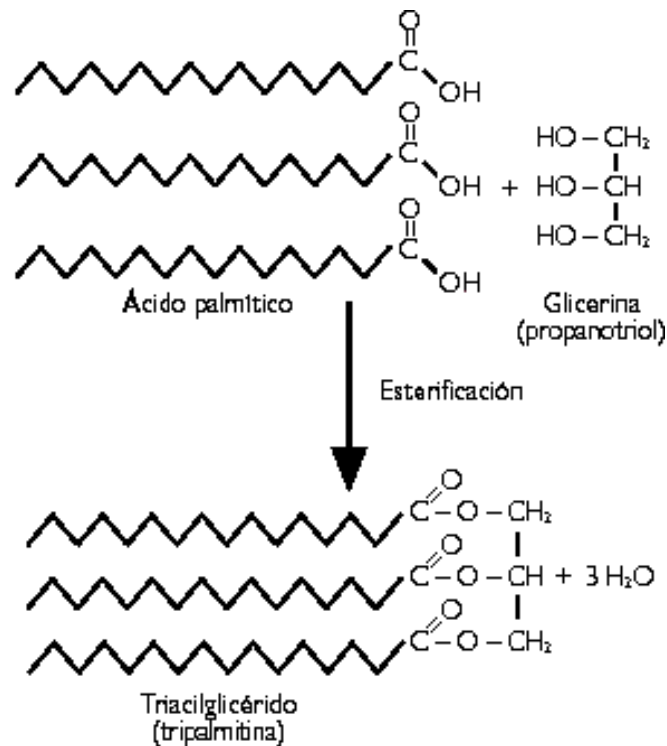


La **oxidación** es una reacción que ocurre de manera natural y es el proceso más común por el cual los ácidos grasos se degradan. Esta reacción consta de la oxidación (incorporación de oxígeno) y formación de peróxidos. Los ácidos grasos insaturados son más susceptibles a esta reacción.

La **hidrogenación** es la reacción por la cual las industrias alimenticias producen ácidos grasos saturados a partir de ácidos grasos insaturados. Es utilizada en la creación de margarinas.

La **halogenación** consta del reemplazo de un enlace doble por un par de átomos de halógenos (F, Cl, Br, I). Esta reacción es comúnmente usada para determinar el grado de insaturación de un ácido graso.

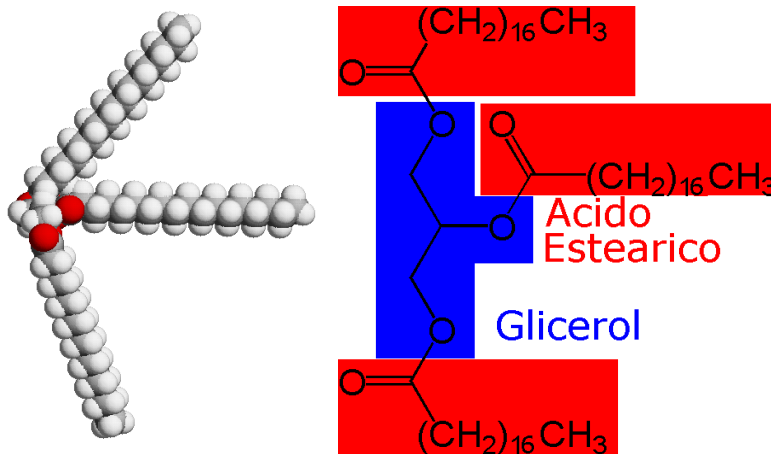
La **formación de ésteres** es el resultado de la reacción de alcoholes (generalmente glicerol/glicerina) con ácidos grasos. Los ésteres resultantes, llamados **acilglicéridos**, son la forma en la que más comúnmente se encuentra a los ácidos grasos en los seres vivos. Los acilglicéridos más comunes son los triacilglicéridos o triglicéridos.



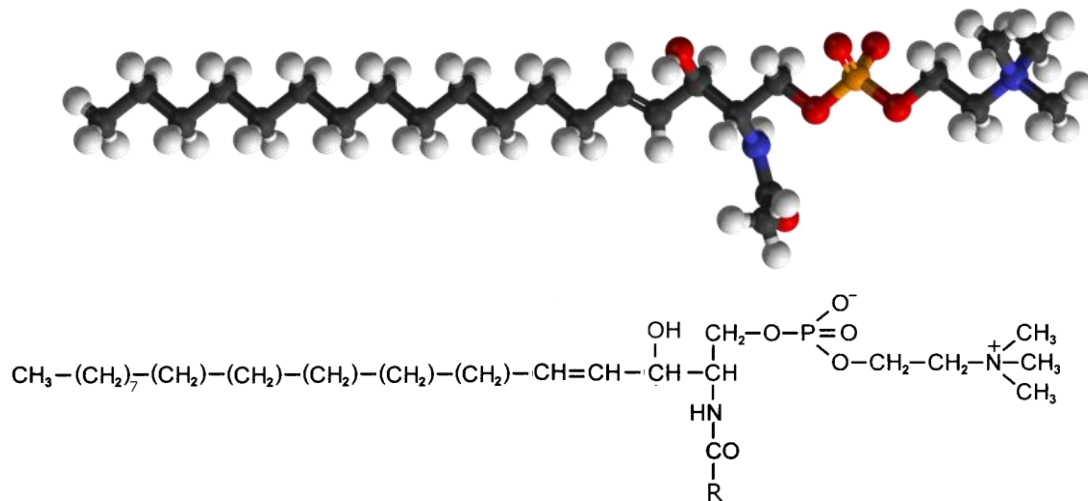
Clasificación de los lípidos

Los lípidos se pueden dividir en dos grandes categorías según su complejidad estructural: **lípidos simples** y **lípidos complejos**.

Los **lípidos simples** son aquellos cuyas moléculas tienen baja complejidad estructural. Entre ellos encontramos a los acilglicéridos y ceras. Un ejemplo de un lípido simple es el triglicérido "triestearina":



Los **lípidos complejos** son aquellos que en su estructura, además de hidrógeno, carbono y oxígeno, presentan nitrógeno, fósforo, azufre, o bien un glúcido. Forman bicapas lipídicas debido a su comportamiento anfipático. Los lípidos complejos son los fosfolípidos, glicolípidos y lipoproteínas. Un ejemplo es la “esfingomielina”:



Acilgliceroles

Los acilgliceroles son formados por esterificación de ácidos grasos con una molécula de glicerina. Los monoacilgliceroles contienen un solo ácido graso; el diacilglicerol, dos moléculas; y los triacilgliceroles, tres moléculas de ácidos grasos. En la naturaleza existen solamente pequeñas cantidades de monoacilgliceroles, y diacilgliceroles, mientras que los triacilgliceroles son la principal forma de reserva energética utilizada por la mayoría de los organismos del reino animal.

Los monoacilgliceroles y los diacilgliceroles son compuestos anfipáticos, ya que los grupos hidroxilo no esterificados de las moléculas confieren carácter polar a la misma.

Los triacilgliceroles tienen sus tres posiciones esterificadas, y de ahí un carácter mucho más hidrofóbico que los anteriores.

La mayoría de las propiedades de los acilgliceroles dependen de las cadenas de ácidos grasos que los componen.

PROPIEDADES FÍSICAS

El **punto de fusión** de los acilglicéridos depende directamente de las cadenas de ácidos grasos que lo componen. Así, si un triglicérido está compuesto por ácidos grasos de cadenas poli-insaturadas, será líquido a temperatura ambiente.

La **solubilidad** de los acilglicéridos varía enormemente entre los mono, di y triacilglicéridos. Los monoglicéridos son altamente anfipáticos, y los diacilglicéridos comparten esta propiedad. Los triacilglicéridos son solubles en solventes apolares, al igual que los ácidos grasos.

PROPIEDADES QUÍMICAS

Los acilglicéridos pueden separarse en sus componentes (ácidos grasos y glicerol) al sufrir una reacción de **hidrólisis**. Esta reacción ocurre fácilmente en medios ácidos o básicos con la presencia de calor. Al realizarse en medio básico, los productos son sales de ácidos grasos (jabón) y glicerol con el catión presente en la base utilizada en la reacción.

Los acilglicéridos también pueden sufrir reacciones de hidrogenación y oxidación en las cadenas de ácidos grasos que lo componen.

ACTIVIDAD PRÁCTICA

SAPONIFICACIÓN

En un balón de 100 ml se mezclan 20 ml de aceite de girasol, 16 ml de la solución de hidróxido de sodio al 30% (**Corrosivo!!!**) y 10 ml de alcohol etílico (**Inflamable!!!**). Se coloca sobre un calentador de manta o baño térmico y se utiliza un sistema de reflujo para que el calentamiento sea más rápido y efectivo. Se calienta suave y constantemente, sin elevar la temperatura para evitar ebullición del aceite durante aproximadamente una hora. En caso de evaporación se agregará a la mezcla un poco de alcohol etílico y agua manteniendo constante el volumen. El proceso termina cuando se encuentra una masa semi-sólida en el balón, sin observarse glóbulos y restos significativos de aceite. Se debe dejar enfriar la mezcla en el balón para después agregar 50 ml de solución saturada de cloruro de sodio (NaCl) y agitar fuertemente para que el jabón se acumule en la parte superior del balón. La solución se filtra y después se coloca en estufa y se deja enfriar.

MEZCLA DE AGUA - ACEITE (CON COLORANTE LÍPIDICO)

Trasvasar en un erlenmeyer el extracto lipídico aceite vegetal, y agregarle 5 gotas de Sudan Black. Luego agregar 50 ml de agua. Agitar. Dejar reposar. Observar.

FORMACIÓN DE EMULSIÓN

Agregar un poco de detergente a la mezcla de agua y aceite. Agitar. Observar y discutir en clase los resultados obtenidos.

PREGUNTAS

- 1- ¿Qué sucedería si en la reacción de saponificación en lugar de NaOH utilizáramos Ca(OH)_2 ?
- 2- ¿Qué sucedería si utilizáramos una grasa en lugar de un aceite en la reacción de saponificación?
- 3- ¿Qué sucedería si utilizáramos colesterol en lugar de un aceite en la reacción de saponificación?
- 4- ¿En la reacción de emulsión, usted considera que hay formación de bicapas lipídicas?

Bibliografía

1. Química Biológica; Antonio Blanco; Novena Edición; Editorial El Ateneo; 2010.
2. Química Orgánica; Wade LG; Quinta Edición; Editorial Prentice-hall; 2004.
3. Nelson D., Cox M. *Principles of Biochemistry* – 3ª Ed. Worth, 2000.
4. Murray, Granner, Mayes, Rodwell. *Harper, Bioquímica ilustrada* - 16ª Ed. Manual Moderno, 2004.
5. Chang, Raymond *Química* - 7ª Ed. McGraw-Hill / Interamericana de México, 2002.

TRABAJO PRÁCTICO N° 7:

MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS I

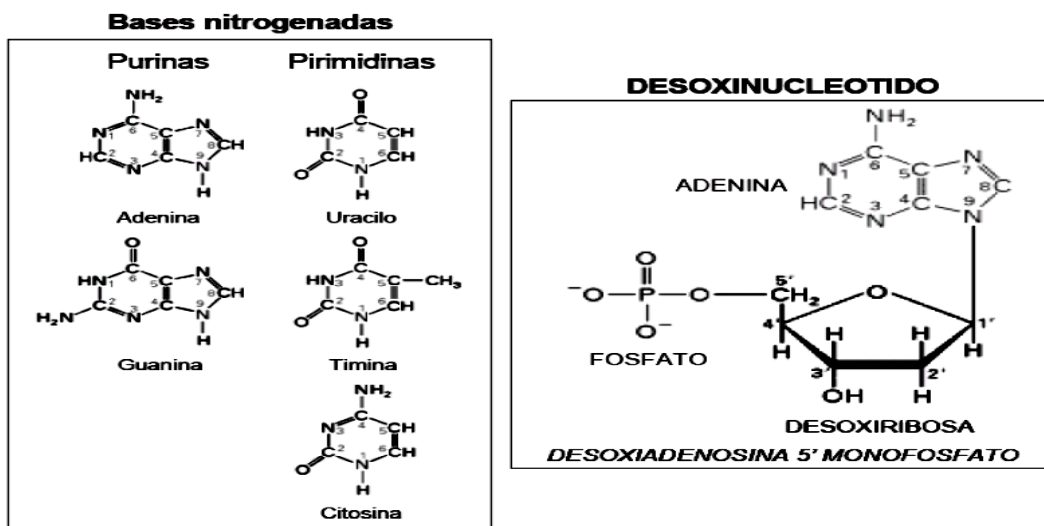
RESUMEN

En estos últimos trabajos prácticos del primer cuatrimestre comenzaremos con las técnicas básicas de manipulación de ácidos nucleicos. Realizaremos la extracción de ADN de distinta procedencia como ser a partir de páncreas o hígado de rata o bien plásmidos a partir de bacterias. Conoceremos los principios de extracción del ARN, elemento fundamental para el comienzo de los trabajos de biología molecular. Por último realizaremos la corrida de los distintos ácidos nucleicos en geles de agarosa y la medición de la concentración de los mismos por técnicas espectrofotométricas. Estos prácticos no finalizan con el presente cuatrimestre, sino que son el comienzo de lo que denominamos trabajo práctico central de biología molecular, continuando con técnicas específicas utilizadas en la investigación médica como así también en las futuras técnicas diagnósticas que se avencinan en los próximos años.

INTRODUCCION

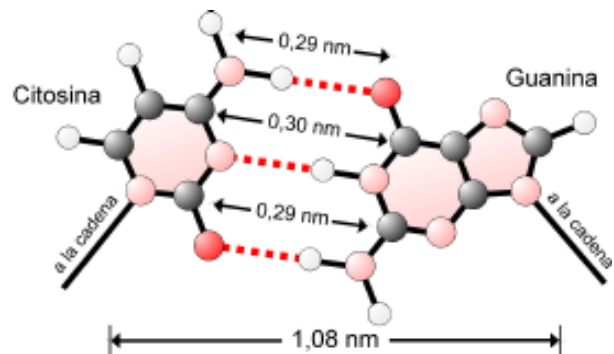
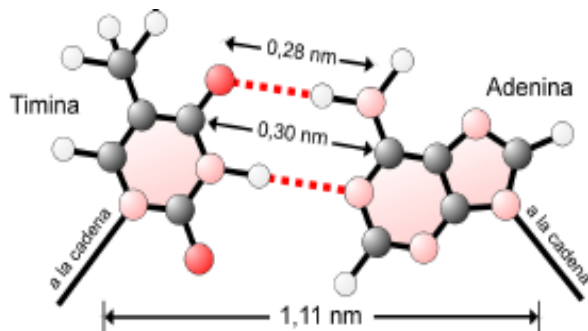
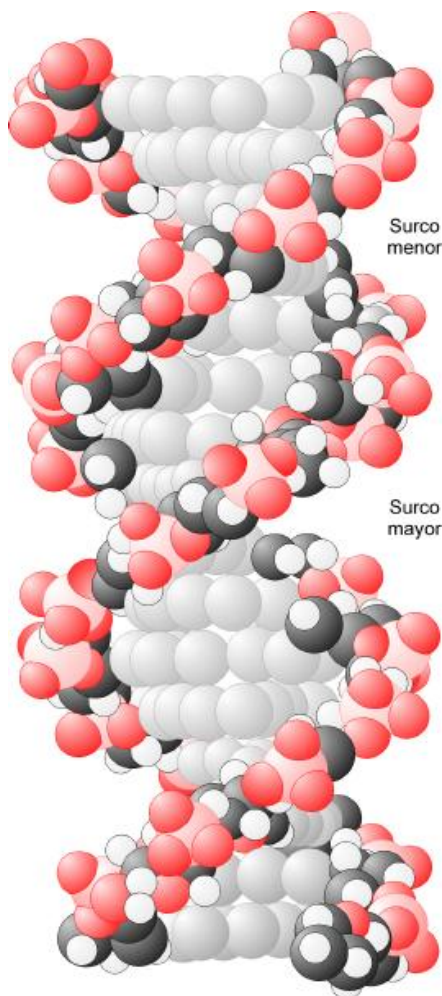
De acuerdo a la composición química, los ácidos nucleicos se clasifican en ácidos desoxiribonucleicos (ADN) que se encuentran residiendo en el núcleo celular y en algunas organelas como mitocondrias y cloroplastos, en el caso de plantas, y en ácidos ribonucleicos (ARN).

Los ácidos nucleicos son **polímeros lineales** en los que la unidad repetitiva, llamada **nucleótido**, está constituida por: (1) una pentosa (la ribosa o la desoxirribosa), (2) ácido fosfórico y (3) una base nitrogenada (purina o pirimidina) que puede ser adenina, citosina, guanina o timina, La unión de la pentosa con una base constituye un **nucleósido**. La unión mediante un enlace éster entre el nucleósido y el ácido fosfórico da lugar al **nucleótido**. Los nucleótidos forman polímeros a través de enlaces fosfodiéster entre el azúcar de un nucleótido y el grupo fosfato del siguiente dando lugar a la molécula de ADN o ARN.

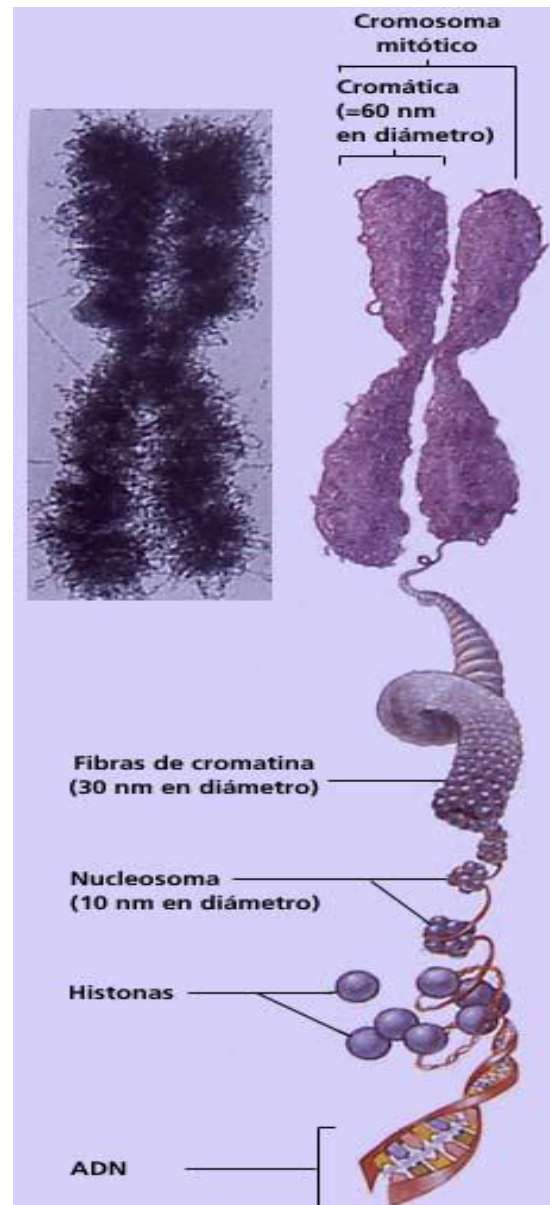
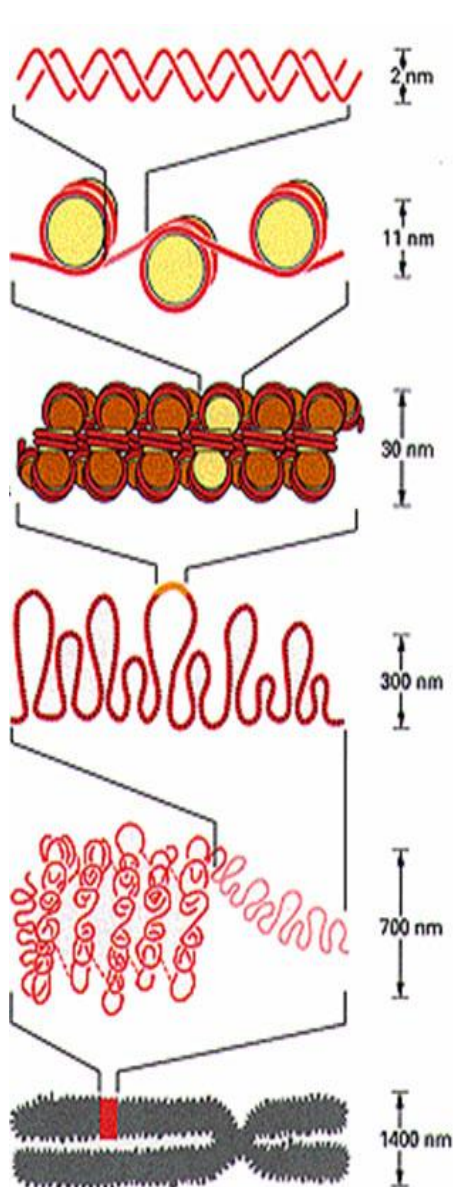


El ADN es una macromolécula compuesta por dos polímeros de desoxirribonucleótidos, denominados hebras, que forman una doble hélice.

La estructura final en forma de doble hélice se produce al establecerse puentes de hidrógeno entre las bases nitrogenadas de una de las cadenas con las bases nitrogenadas de la otra. Entre una adenina y una timina se establecen dos puentes de hidrógeno mientras que entre una guanina y una citosina se establecen tres puentes de hidrógeno. La disposición de las bases nitrogenadas a lo largo de la hebra de ADN es lo que se conoce como secuencia. De esta forma y sabiendo que la base complementaria a una adenina es una timina (y viceversa) y que a la base complementaria a una guanina es una citosina (y viceversa) es posible deducir la secuencia de la hebra complementaria a partir de una de las hebras.



En las células el ADN se encuentra interaccionando con proteínas que permiten empaquetarlo para que ocupe un menor espacio. La longitud del ADN humano completamente extendido es de dos metros pero al empaquetarse en los cromosomas se reduce a unas pocas micras, una millonésima parte de esos dos metros. Durante la extracción, es preciso separarlo de las proteínas para poder obtenerlo puro.



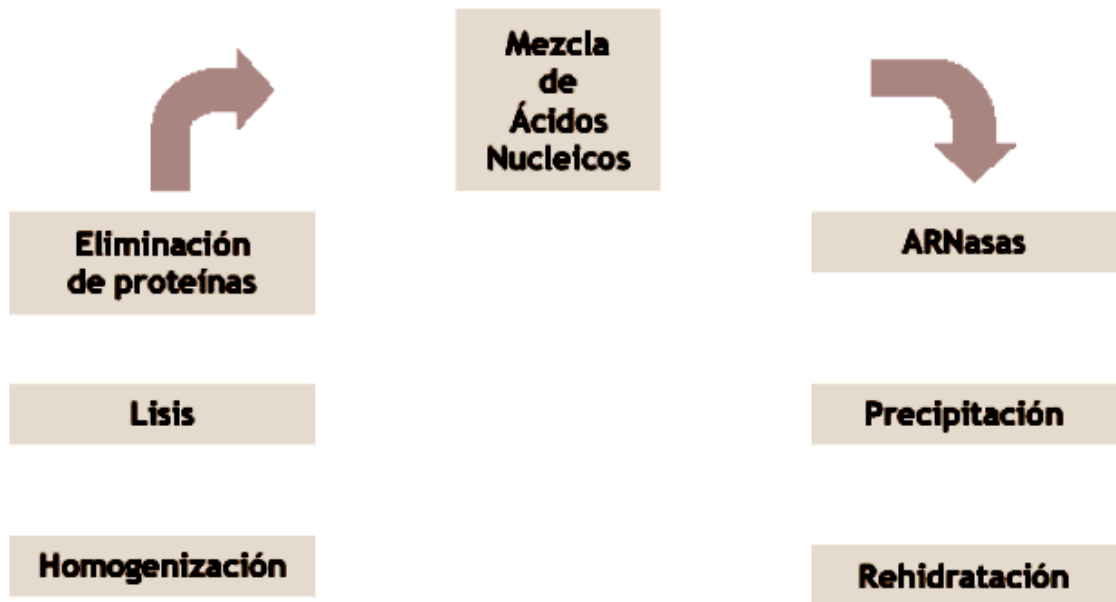
INTRODUCCIÓN A LA EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Debido a que el ADN es la molécula que almacena la información precisa para que un ser vivo pueda llevar a cabo todas sus funciones vitales, su aislamiento de células y tejidos es el primer paso en muchas investigaciones en biología. El aislamiento del ADN también es empleado en diversos campos como la medicina, la biotecnología o la criminología para obtener mejores terapias, mejorar cosechas o identificar individuos.

Aunque el objetivo de esta práctica es aislar ADN de un material biológico es importante aclarar que cuando hablamos del ADN debemos de diferenciar el ADN genómico, que se encuentra en el núcleo y contiene la mayoría de los genes, de los ADNs extranucleares, que se encuentran en la mitocondria y el cloroplasto y contienen la información de ciertas proteínas necesarias para el funcionamiento de esas organelas celulares.

El método que aquí se va a emplear es el utilizado para extraer ADN genómico y consta de varios pasos y variantes según los autores:

- Desintegración del tejido y solubilización de los componentes celulares (Homogenización de la muestra).
- Extracción parcial de proteínas y de lípidos.
- Precipitación de los ácidos nucleicos.



Homogeneización de la muestra

El método para desintegrar el tejido debe estar adaptado a las características de éste. Para grandes volúmenes de tejidos blandos, suelen usarse licuadoras esencialmente iguales a las licuadoras domésticas. Para volúmenes menores, en general es suficiente un homogeneizador, el cual consiste en un tubo de vidrio de paredes gruesas y un pistón (de vidrio o de teflón). La rotación del pistón dentro del tubo (propulsión manual o por un motor), disgrega la muestra.



Tejidos más resistentes, como hueso o diente, necesitan tratamientos mecánicos especiales. Aquellos tejidos con células cuya pared celular es resistente como por ejemplo vegetales, hongos o bacterias, requieren también condiciones drásticas. Uno de los métodos más utilizados consiste en congelar la muestra en nitrógeno líquido y, manteniéndola congelada, pulverizarla con un mortero. Así, además de desintegrar la muestra, se logra que ésta se mantenga a muy baja temperatura durante el tratamiento, con lo cual se evita la acción de enzimas endógenas que pudieran degradar el material de interés.

Para ayudar a la solubilización de los componentes celulares, a la ruptura de membranas y de complejos protéicos, la solución de lisis contendrá un detergente iónico (dodecilsulfato de sodio, SDS). Este detergente dispersa los componentes de las membranas y desnaturaliza las proteínas.

La solución de lisis contiene además el agente quelante de cationes divalentes EDTA. Esto impide la acción de las ADNasas (dependientes de Mg^{2+}), aunque no tiene efectos sobre la mayor parte de las ribonucleasas.

Extracción de proteínas y lípidos

Dada la fuerte hidrofiliidad que los grupos fosfato confieren a los ácidos nucleicos, estos son muy solubles en agua. Dentro de una mezcla de solventes no miscibles, uno acuoso y otro orgánico no polar, los ácidos nucleicos tenderán a permanecer en la fase acuosa, en tanto que los lípidos y gran parte de las proteínas desnaturalizadas se encontrarán en la fase orgánica.

En la preparación de ácidos nucleicos, los solventes que se usan más frecuentemente para la extracción de proteínas y lípidos son el fenol y el cloroformo. Las condiciones de trabajo en el salón de prácticos desaconsejan la utilización de fenol. Se utilizará una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). La inclusión de alcohol isoamílico en la mezcla ayuda a la dispersión de agregados y hace disminuir la formación de espuma.

Precipitación de ácidos nucleicos

La precipitación de los ácidos nucleicos permite su purificación y concentración. Se basa en la simultánea neutralización de las cargas negativas y deshidratación de la molécula, lo cual posibilita su agregación y precipitación.

La precipitación es un fenómeno reversible (mediante la resuspensión en soluciones acuosas) y no debe ser confundido ni con la desnaturalización (potencialmente reversible) ni con la degradación (irreversible) de los mismos.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

Se procederá a aislar los núcleos celulares de páncreas o hígado de ratón y posteriormente se les extraerá ADN con una solución concentrada de cloruro de sodio.

Se trabajará en condiciones de baja temperatura y con el material de vidrio previamente lavado con solución de citrato de sodio (*solución B*) para evitar la acción de las ADNasas.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y reactivos a utilizar:

Tubos tipo eppendorf de 1,5 ml

Pipetas automáticas y tips

Microcentrífuga

Homogeneizador

Hielo granizado

Solución A: Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 100 mM pH 8, dodecil sulfato de sodio (SDS) 0,5 %

Solución B: NaCl 2M

Solución C: cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v)

Etanol absoluto a -20 C

Procedimiento

A) Obtención de núcleos celulares

1. Homogenice el tejido con 6 volúmenes de solución A (lisis) y transfiera el homogeneizado a un tubo eppendorf
2. Centrifugue a 1000 g durante 10 minutos y descarte el sobrenadante por inversión
3. Resuspenda el precipitado con la solución A en un volumen igual al original
4. Repita la operación. De esta manera se eliminan mitocondrias y retículo endoplásmico que contaminan la preparación. El EDTA elimina cationes divalentes como Mg²⁺ y Mn²⁺, que son activadores de las ADNasas. Las células se lisan por acción del SDS (detergente iónico)

B) Extracción de ADN

1. Resuspenda el sedimento obtenido en el paso anterior en 0,5 ml de solución B (salina) y agite
2. Centrifugue a 1000 g durante 15 minutos, recupere el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf y resuspenda en precipitado nuevamente en la misma solución

C) Eliminación de proteínas contaminantes

1. Agregue a la mezcla de sobrenadantes un volumen (0,5 ml) de cloroformo:alcohol isoamílico y agite vigorosamente
2. Centrifugue a 1200 g por 5 minutos. Las proteínas desnaturalizadas forman un tapón en el medio del tubo
3. Tome la fase superior acuosa en la que se encuentra el ADN y transfiera a un tubo eppendorf limpio

D) Precipitación de ADN

1. Al extracto de ADN libre de proteínas obtenido en el paso anterior, agregue lentamente 2 volúmenes de etanol frío. El alcohol debe agregarse por las paredes del tubo con mucho cuidado
2. A medida que el ácido nucleico va precipitando se pueden ir visualizando sus hebras, mediante suaves movimientos rotatorios del tubo. Después de

- 10 minutos en hielo, centrifugar a 6000 g por 15 minutos a temperatura ambiente. Remover el etanol
3. Secar el ADN y resuspender en 100 ul de agua. El ADN puede tener apariencia gelatinosa por contaminantes como polisacáridos.

ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN GELES DE AGAROSA

La electroforesis en geles de agarosa se utiliza para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN.

La agarosa es un polímero lineal compuesto de residuos de D y L-galactosa unidas por uniones glicosídicas α 1-3 y β 1-4.

Para el armado del gel la agarosa se disuelve y funde por calor en buffer de corrida (usualmente TAE 1x). Luego se vierte en un armador de geles y se coloca un peine para generar pocillos (donde se sembrarán las muestras) (Figura 1). Cuando la agarosa se enfría a temperatura ambiente gelifica.

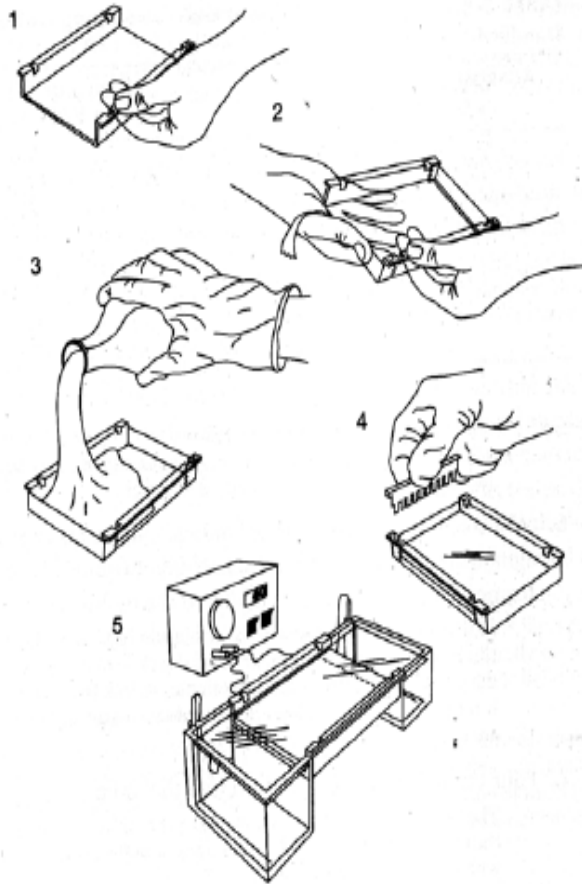
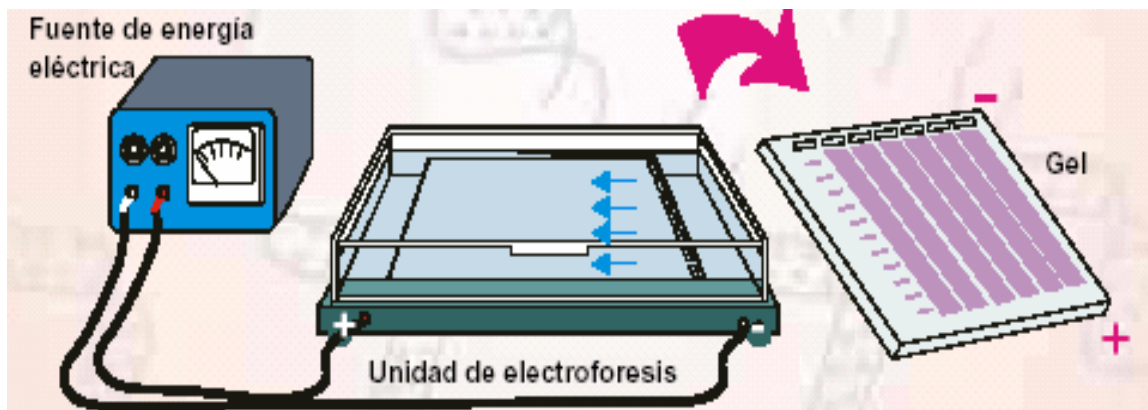


Figura 1. Esquema representativo del armado de geles de agarosa. Luego de la preparación del armador de geles (1 y 2), se vierte agarosa fundida en buffer (3) y se coloca un peine para generar pocillos (4). Se deja gelificar a temperatura ambiente, el gel se coloca en una cuba con buffer de corrida y se siembran las muestras. La cuba se conecta a una fuente de poder por electrodos (5).

Durante el proceso de gelificación las cadenas de agarosa forman fibras helicoidales y finalmente, una red tridimensional de poros por donde migra el ADN. Una vez armado el gel, se coloca en una cuba electroforética que contiene el mismo buffer con el que se preparó el gel y se siembran las muestras de ADN a separar en los pocillos. La cuba se conecta mediante un electrodo positivo (ánodo) y otro negativo (cátodo) a una fuente de poder y es sometida a un campo eléctrico.



La velocidad de migración está determinada por varios parámetros, algunos de los cuales son detallados a continuación.

(a) Tamaño del ADN:

Las moléculas de ADN lineal de doble hebra migran a través del gel a velocidades que son inversamente proporcionales al logaritmo del número de pares de bases.

Dado que la carga del ADN está dada por los grupos fosfato y que por cada par de bases hay dos grupos fosfato, la relación carga/masa es la misma para moléculas de ADN de diferente tamaño. Esto indicaría que la velocidad de migración sería la misma, independientemente del tamaño. Pero, debido a la fricción que impone la malla del gel de agarosa, las moléculas de mayor tamaño serán retardadas respecto a las de menor tamaño.

(b) Concentración de la agarosa:

Un fragmento de ADN lineal migra a diferentes velocidades dentro de geles con diferentes concentraciones de agarosa. La tabla siguiente muestra concentraciones de agarosa usadas para resolver fragmentos de ADN entre los rangos indicados.

Concentración del gel de agarosa (% w/v)	Rango de peso molecular (kpb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

(c) Conformación del ADN

El ADN circular cerrado de doble hebra superenrollado (forma I), el circular relajado con un corte en una de las hebras (forma II) y la forma lineal (forma III) que tengan idéntico peso molecular y secuencia van a migrar a distinta velocidad en los geles de agarosa. Las movibilidades relativas de las tres formas dependen primariamente de la concentración de agarosa, pero también están influidas por otros factores como la corriente eléctrica aplicada, la fuerza iónica del *buffer* y de la cantidad de BET (bromuro de etidio) presente (fundamentalmente en el caso de la forma I).

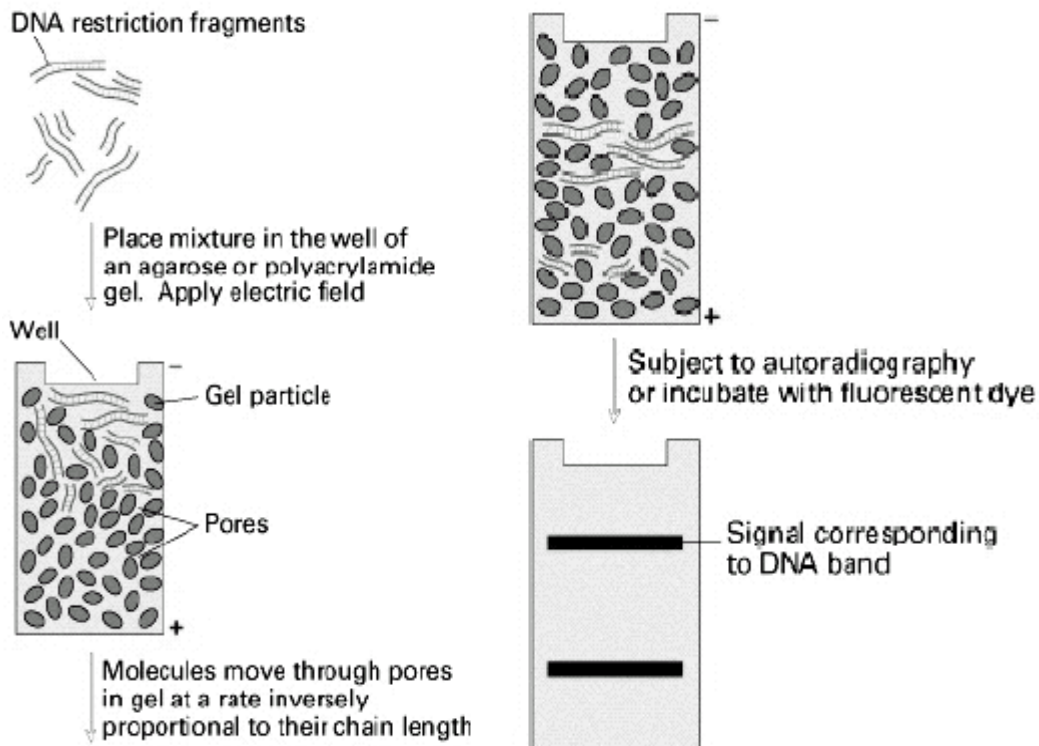
(d) Corriente aplicada

A bajo voltaje, la velocidad de migración de los fragmentos lineales es proporcional al voltaje aplicado. Sin embargo a medida que la fuerza del campo eléctrico es aumentada la movilidad de los fragmentos de ADN de alto peso molecular se incrementa menos. Por lo tanto el rango efectivo de separación en los geles de agarosa disminuye a medida que el voltaje es incrementado.

(e) Otros factores

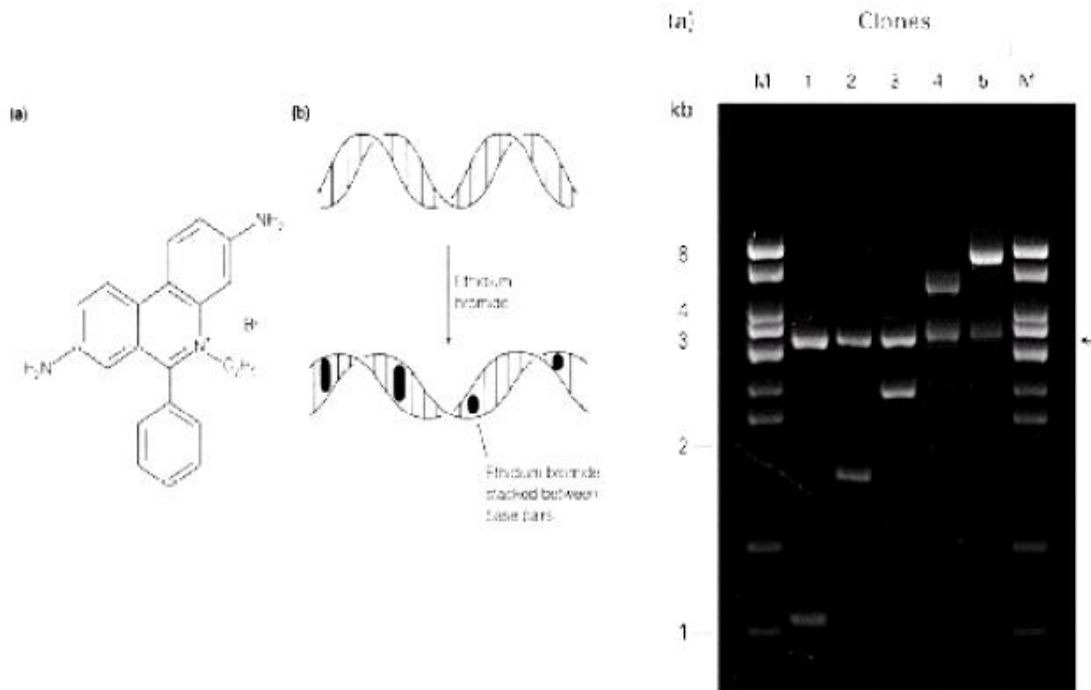
Otros factores que influyen (y que no se discutirán en este práctico) son: la dirección del campo eléctrico, la composición de bases de los fragmentos a analizar, la temperatura, la composición del *buffer* de electroforesis.

Electroforesis de ácidos nucleicos



Una vez separadas las moléculas de ADN pueden ser visualizadas por tinción del gel con Bromuro de Etidio. Este es un colorante cuya estructura le permite intercalarse entre las bases de ADN, y que fluoresce al ser excitado con radiación UV. Al exponer el gel a luz UV en un Transiluminador se pueden observar las bandas de ADN.

Cuantificación con bromuro de etidio



PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y reactivos a utilizar

- Cuba de electroforesis, electrodos y fuente de poder.
- Transiluminador.
- Buffer de corrida TAE 1x (40 mM Tris/acetato, 1mM EDTA pH 8).
- Buffer de siembra 5x (0,25% azul de Bromofenol, 0,25% xilencianol y 30% glicerol).
- Agarosa.
- Bromuro de Etidio (0,5 µg/ml en gel).
- Horno microondas.
- Marcador de peso molecular.

Procedimiento

A) Preparación del gel de agarosa al 1%. (El gel será provisto por el docente a cargo).

A continuación se detalla la manera en que fue armado el mismo:

1 - Se funden en horno microondas 0,5 g de agarosa en 50 ml de buffer de corrida TAE 1X.

2 - Una vez fundida se agrega bromuro de etidio (concentración final de 0,5 µg/ml) y se vierte en un molde de acrílico, se coloca el peine y se deja gelificar a temperatura ambiente.

3 - Se desmonta el gel del molde y se coloca en la cuba electroforética. Se agrega solución buffer de corrida TAE 1x hasta cubrirlo.

¡PRECAUCIÓN!

El bromuro de etidio es un potente cancerígeno. Por ello se debe manipular con guantes.

Cuando funde la agarosa, la alta temperatura puede producir ebullición y proyecciones de material.

B) Preparación de las muestras

1 - Tomar 10 µl de las distintas muestras a analizar: (1) ADN genómico de páncreas o hígado de rata. (2) producto de PCR. (3) control negativo de la PCR. Agregar a cada una de ellas 2 µl de buffer de siembra. *El buffer de siembra le da mayor densidad a la muestra permitiendo su depósito en el pocillo. Los colorantes (azul de bromofenol y xilenecianol) permiten ver el avance de la corrida electroforética*



2 - Coloque cada una de las muestras en los pocillos de siembra asignados y aplique un voltaje de 100- 130 V (1 a 5 V/cm), dependiendo de la cuba electroforética utilizada. En uno de los pocillos sembrar el marcador de tamaño molecular. *El marcador de tamaño molecular es una mezcla de fragmentos de ADN de tamaño conocido que sirve de referencia para estimar el tamaño de nuestra muestra.*

3 - Una vez finalizada la corrida, retire el gel de la cuba y examine en un Transiluminador con luz ultravioleta. *El bromuro de etidio se intercala entre las hebras de ADN y al ser irradiado con luz UV fluoresce, permitiendo la visualización del ADN.*

ESPECTROFOTOMETRÍA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Los dobles enlaces conjugados de las bases nitrogenadas causan que los ácidos nucleicos (ANs) absorban luz ultravioleta (UV). El espectro de absorción típico de los ANs presenta un máximo a $\lambda \approx 260$ nm.

Si bien el coeficiente de extinción de un AN en particular depende de la secuencia de nucleótidos, algunas reglas empíricas permiten estimar la concentración a partir del valor de A_{260} .

Análisis cuantitativo de ácidos nucleicos

- ✓ ADN, ARN, oligonucleótidos pueden medirse espectrofotométricamente en soluciones acuosas diluidas
 - Ácidos nucleicos 260 nm
 - Proteínas 280 nm

- ✓ Factor de conversión: 1 unidad de absorbancia (OD) es aproximadamente:
 - 50 $\mu\text{g/ml}$ ó $\text{ng}/\mu\text{l}$ de ADN de doble cadena
 - 40 $\mu\text{g/ml}$ ó $\text{ng}/\mu\text{l}$ de ARN
 - 33 $\mu\text{g/ml}$ ó $\text{ng}/\mu\text{l}$ de ADN de hebra sencilla
 - 30 $\mu\text{g/ml}$ ó $\text{ng}/\mu\text{l}$ de oligos

- ✓ La pureza se estima utilizando la relación A_{260}/A_{280} , y debe ser aproximadamente 1,8 para ADN y 2 para ARN

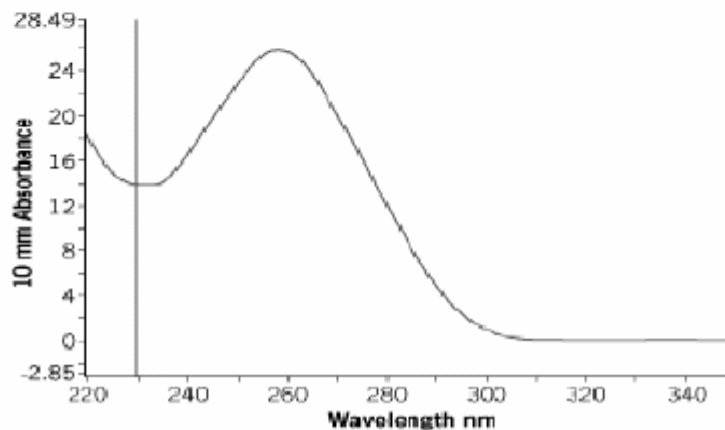
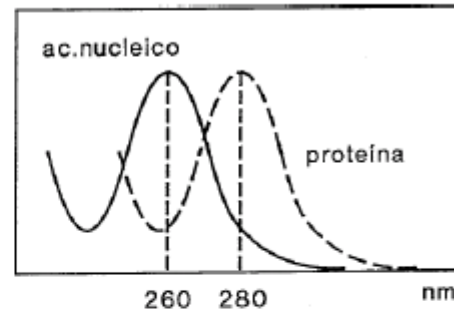
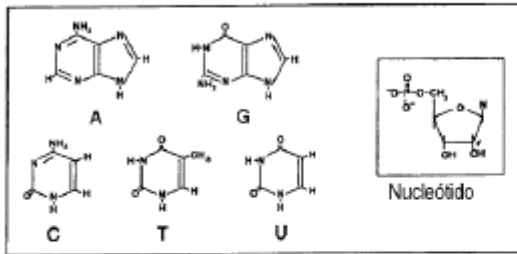
- ✓ La razón A_{260}/A_{230} de 2,2 puede utilizarse para observar la contaminación con carbohidratos, péptidos, fenoles o compuestos aromáticos.

En las preparaciones de ANs, son frecuentes las impurezas de naturaleza proteica. Dado que los aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp) absorben luz UV, la presencia de proteínas lleva a sobrestimaciones de la concentración de AN. Dado que el pico de

absorbancia de las proteínas está en $\lambda \approx 280$ nm, es posible estimar el grado de impurezas de origen proteico a partir del cociente A_{260}/A_{280} . Si hay proteínas en la muestra, la absorbancia a 280 nm debida a éstas provocará que este cociente sea menor que lo esperado para ácidos nucleicos puros. Para ADN puro doble hebra se espera $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$, y para ARN puro, $A_{260}/A_{280} \geq 2.0$.

– Espectros UV-Vis de ácidos nucleicos

– Cromóforos: Bases nitrogenadas



Procedimiento

Espectrofotometría

(1) Hacer 2 diluciones seriadas de 1 en 10 de los ácidos nucleicos obtenidos.

Poner 0.9 ml de agua en cada tubo.

Agregar 0.1 ml de la muestra de ácidos nucleicos en el tubo 1/10. Agitar.

Tomar 0.1 ml de esta solución y agregarlos en el tubo “1/100”. Agitar.

Para las medidas de absorbancia de estas diluciones, ¿qué soluciones utilizará como blanco en la cuba de referencia del espectrofotómetro? ¿Cómo ajustará el cero de absorbancia?

(2) Medir la Absorbancia de cada una de las diluciones, comenzando por la más diluida.

(3) Con la dilución cuyo valor de A₂₆₀ no sobrepase 1, hacer un barrido de longitudes de onda desde $\lambda = 220$ nm hasta $\lambda = 300$ nm. Tomar los valores de Absorbancia para incrementos de λ de 10 nm.

(4) Calcular la concentración en la preparación original y el rendimiento de la precipitación;

-suponiendo que todo fuera ADN

-suponiendo que todo fuera ARN

(5) Calcular el cociente. Discuta

(6) Graficar Absorbancia en función de la longitud de onda.

BIBLIOGRAFÍA

1. Química Biológica; Antonio Blanco; Octava Edición; Editorial El Ateneo; 2006.
2. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Sambrook, J., Rusell DW., (2001)
3. Nelson D., Cox M. *Principles of Biochemistry* – 3^a Ed. Worth, 2000.
4. Benjamin Lewin *Genes VIII* – Pearson Prentice Hall, 2003.
5. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. *Biología Molecular de la célula*- 4^a Ed Garland Science, 2002.
6. Pagina web de la Universidad de Cordoba España. www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/practicasgenerales.htm

TRABAJO PRÁCTICO N° 8, 9 y 10:

BIOLOGÍA CELULAR

INTRODUCCIÓN AL CULTIVO CELULAR

El cultivo de tejidos ha sido considerado durante mucho tiempo como una mezcla de ciencia y arte. Fue considerada inicialmente como una técnica particularmente difícil de aprender. Sin embargo, estos problemas originales están hoy en día prácticamente superados gracias a factores como la disponibilidad de antibióticos, los medios de composición definida, las instalaciones asépticas (salas de cultivo limpias, cabinas de flujo laminar, incubadores estériles, etc.), y dispositivos de cultivo (botellas con tapones filtrantes, placas de Petri ventiladas, entre otros). Los avances técnicos y la aparición de un buen número de compañías comerciales de suministro de medios, sueros, equipo y líneas celulares han hecho del cultivo celular una tecnología con buena reproducibilidad. Podemos dividir el cultivo de tejidos en dos grupos de técnicas: el cultivo de órganos y el cultivo de células. El cultivo de órganos se puede definir como el mantenimiento de pequeños fragmentos de tejido u órganos completos *in vitro*. El cultivo celular es la propagación de células dispersas tanto en suspensión como en monocapas sobre cristal o plástico.

CONCEPTOS ACTUALES DE CULTIVO CELULAR

Actualmente se entiende por cultivo celular al **conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células “*in vitro*”, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas**. Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido o del órgano de origen y de su duración hablaremos de diferentes tipos de cultivos: de órganos, explantes, primarios o secundarios, etc.

Aplicaciones del cultivo celular.

Los **estudios** que emplean cultivos celulares abarcan gran número de disciplinas y aproximaciones al estudio del fenómeno celular.

- a. Actividad intracelular. Mecanismos implicados en los diferentes procesos intracelulares, como por ejemplo: transcripción de DNA, síntesis de proteínas, metabolismo energético, etc.
- b. Flujo intracelular. Movimientos intracelulares de sustancias y señales asociadas a los diferentes procesos fisiológicos, como por ejemplo: ensamblaje y desensamblaje de los diferentes componentes intracelulares, movimientos del RNA: núcleo-citoplasma, movimiento de proteínas, etc.

c. Ecología celular. Estudio de las condiciones ambientales responsables del mantenimiento de la funcionalidad celular, de su diferenciación, etc., como por ejemplo el estudio de las necesidades nutricionales, infecciones, estudio de la transformación celular, cinética de la población celular, entre otras.

d. Interacciones celulares. Procesos de inducción embrionaria, cooperación metabólica, inhibición por contacto o por adhesión, interacciones célula-célula.

Como ejemplo de **áreas de investigación** fuertemente dependientes de las técnicas de cultivo celular son:

1. Virología: Establecimiento de condiciones de cultivo de virus animales y de plantas, producción de vacunas antivirales, etc.

2. Investigación del Cáncer: Búsqueda de células madre, determinación de receptores hormonales, etc.

3. Inmunología: Especialmente gracias a la introducción de las técnicas de fusión celular en la producción de anticuerpos monoclonales (generación de hibridomas), así como en el análisis de la genética de la célula somática.

4. Ingeniería de proteínas: Por la producción de proteínas en líneas celulares: interferón, insulina, hormona de crecimiento.

5. Estudios de interacción y señalización celular, en la diferenciación y en el desarrollo: Comprende el estudio de los receptores y de las vías de traducción de la señal.

6. Aplicaciones diagnósticas: Por ejemplo, en medicina y farmacología destacan el análisis cromosómico de células crecidas a partir de muestras de amniocentesis, detección de infecciones virales, ensayos de toxicidad, etc.

7. Aplicaciones médicas: mantenimiento y producción de tejidos para trasplante.

8. Aplicaciones industriales y agronómicas: producción por reproducción *in vitro* de clones de plantas de interés comercial.

Ventajas e inconvenientes de las técnicas de cultivo celular.

Estas técnicas poseen una serie de ventajas innegables, pero al mismo tiempo existen ciertas características no tan ventajosas a tener en consideración.

Dentro de las **ventajas** podemos citar

a. Permiten un control preciso y fino del medio ambiente.

En un cultivo se pueden controlar todos los factores del medio: físico-químicos (pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O₂, CO₂, tensión superficial, etc.), y fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular, etc.). Esto es completamente cierto sólo para algunas líneas celulares para las que se han diseñado los denominados **medios definidos**. Un medio definido es aquel en el que se conocen todos y cada uno de los componentes que lo forman, y la concentración exacta en que se encuentran. Establecer un medio definido supone conocer con precisión las necesidades nutritivas de las células en cuestión. Sin embargo en muchas líneas no se han llegado a

establecer medios definidos. En estos casos se trata de medios que se suplementan con soluciones complejas (suero, extractos de embrión, etc.) en los que se encuentran factores hormonales y nutritivos imprescindibles para el mantenimiento del cultivo, pero cuya naturaleza se desconoce. Estas soluciones complejas están sujetas a variación de lote a lote.

b. Caracterización y homogeneidad de la muestra.

Las células en cultivo de una línea celular (cultivo primario propagado), o de una línea continua son homogéneas, con morfología y composición uniformes. Se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas, con lo que se supera el grave problema de heterogeneidad de las muestras inherente asociado al uso de animales de experimentación.

c. Economía.

Suponen una economía en el uso de reactivos o drogas a estudiar pues al realizarse en volúmenes reducidos, y con un acceso directo de las células a la droga las concentraciones requeridas son mucho más bajas que en animal completo. Es diferente el coste de investigación de un nuevo fármaco para la empresa farmacéutica que está desarrollando moléculas si ha de sintetizar de cada una de las que ha de probar en cantidades del orden del gramo (para el estudio en animales) a que baste con pocos miligramos.

d. Motivaciones éticas.

La investigación biomédica supone el sacrificio cada año de muchos miles de animales de experimentación. El cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo “*in vivo*” pero es una alternativa válida en muchas situaciones. Incluso un cultivo celular primario permite realizar experimentos que suponen el sacrificio de uno o pocos animales, pero con ellos se pueden ensayar un número de condiciones experimentales que pueden suponer si el estudio se hace con animales de experimentación el sacrificio de decenas o cientos.

En cuanto a las **desventajas** del cultivo celular:

a. Técnica sensible.

El crecimiento de las células animales es mucho más lento que el de los contaminantes más habituales (hongos, levaduras, bacterias, micoplasmas, etc.) y además dado que proceden de organismos pluricelulares son incapaces de crecer en ausencia de una compleja mezcla de nutrientes que simula el plasma o el fluido intersticial. Esto supone la necesidad de mantener las condiciones de asepsia en todo momento, lo cual es limitante a nivel tanto del instrumental requerido como del personal cualificado para su manipulación.

b. Cantidad y costo.

El costo de producción de 1 g de tejido en cultivo es más de 10 veces superior al obtenido en el animal. Asimismo existe una limitación de producción, que es del orden de 10 g de células en un laboratorio normal, y que para ser superior a 100 g requiere instalaciones de tipo industrial.

c. Inestabilidad.

Muchas de las líneas celulares continuas son inestables, como consecuencia de la dotación cromosómica aneuploide. La población celular puede variar su composición si alguna de las subpoblaciones celulares es capaz de crecer con una tasa ligeramente superior, es decir podemos encontrar diferencias significativas en la línea celular de una generación a la siguiente. La única manera de evitarlo es emplear líneas estables que se resiembran a partir de un stock congelado cada determinado tiempo, o después de un determinado número de generaciones.

d. Validez del modelo *in vitro*.

Cuando nos referimos a un cultivo celular nos estamos refiriendo exactamente a un disgregado celular de un tejido de origen y que se diferencia de éste en que:

- Se ha perdido la organización espacial tridimensional propia del tejido.
- Se han perdido las interacciones heterotípicas, entre los distintos tipos celulares, y entre las células y la matriz extracelular. Es de destacar que los avances más excitantes en la función celular proceden del reconocimiento de la importancia de las interacciones específicas de las células con otras células o con el sustrato.
- Carece de los componentes sistémicos de regulación, implicados en la regulación de la homeostasis *in vivo*, especialmente los sistemas nervioso y endocrino.

Cuando se establece el cultivo, las células se des-diferencian, y entre otras cosas se hacen móviles e inician su proliferación. Esta des-diferenciación puede, en algunos casos ser revertida por procedimientos de diferenciación inducida por hormonas, confluencia, inductores químicos (ésteres de forbol, entre otros. Sin embargo, no está claro si el estado re-diferenciado es equivalente al estado de diferenciación *in vivo*.

Por todo lo anterior hemos de ser precavidos en cuanto a la validez de los resultados obtenidos *in vitro* respecto a lo que pueda observarse *in vivo*.

TIPOS DE CULTIVOS DE TEJIDOS

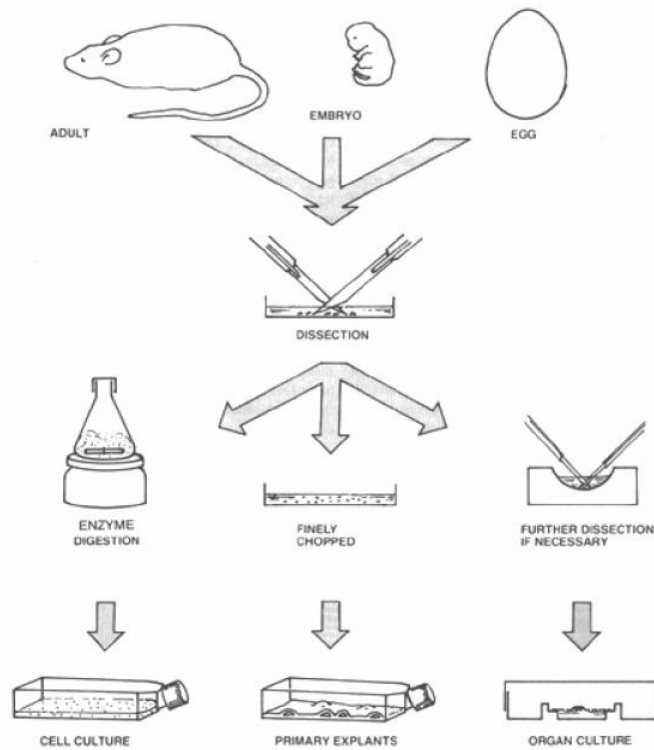
Se podría hablar de tres tipos de cultivos:

a. **Cultivo de órganos.** Implica que la arquitectura característica del tejido *in vivo* se mantiene al menos en parte. Para ello el órgano se mantiene en un medio del que obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos y en el que mantiene su estructura tridimensional, en general esférica. Este tipo de cultivo permite mantener los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena réplica del tejido de origen, pero por el contrario no permite su propagación pues el crecimiento, de producirse, se limita a la periferia y es debido fundamentalmente a los tipos celulares embrionarios. La imposibilidad de propagar obliga a partir en cada nuevo experimento de nuevo material animal lo que conlleva una elevada heterogeneidad.

b. **Explantos primarios.** Fragmentos de tejidos o de órganos que se adhieren a una superficie y en la que proliferan las células de la periferia del explante.

c. **Cultivo celular.** Supone una disgregación celular ya sea por medios enzimáticos o mecánicos. La suspensión celular se puede cultivar como una monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo. Este tipo de cultivo permite su propagación,

aumentando notablemente la masa celular del cultivo a lo largo de las generaciones. Como característica negativa se pierde la heterogeneidad celular de partida, la población se hace uniforme y homogénea al predominar en el cultivo aquellos tipos celulares que tienen superior tasa de crecimiento. En la actualidad los cultivos celulares son los más empleados fundamentalmente por la posibilidad de propagación, así como por las ventajas en la cuantificación, caracterización y reproducibilidad de las muestras. A fin de compensar la ausencia de interacciones heterotípicas se realizan desde hace unos años cultivos mixtos con importantes éxitos.



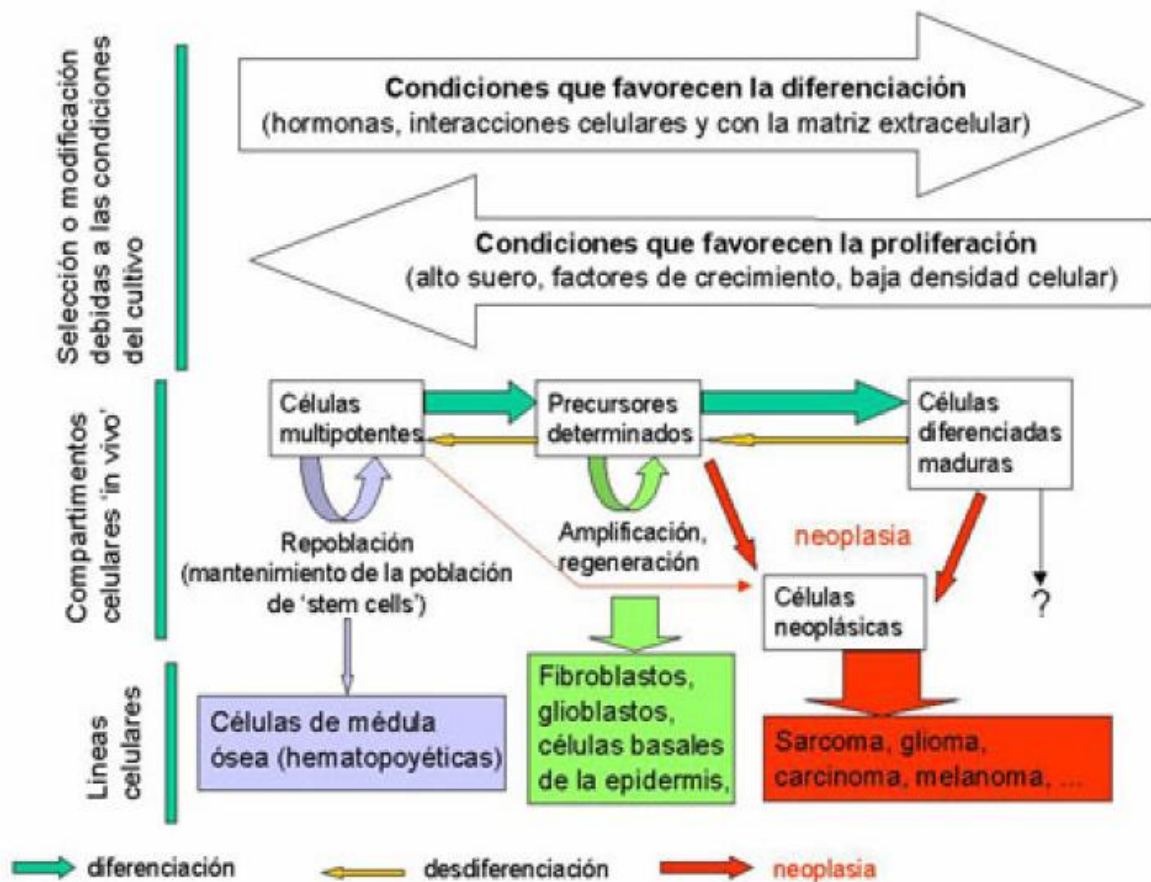
BIOLOGÍA DE LA CÉLULA EN CULTIVO

En el proceso de establecimiento de un cultivo celular se seleccionan las células que crecerán según numerosos criterios. Así solo formarán el cultivo aquellas células que sean por una parte capaces de superar el proceso de disgregación, y por otra capaces de adherirse al sustrato y proliferar en forma de monocapa o en suspensión.

El crecimiento en monocapa significa que las células se adherirán al sustrato y en esa forma inician la proliferación. Muchas líneas celulares son anclaje-dependientes, es decir no inician la proliferación hasta que se han adherido al sustrato. Este es el modo normal de proliferación de la mayor parte de las células, con excepción de las células hematopoyéticas maduras. El crecimiento en suspensión es propio de aquellas células capaces de proliferar sin necesidad de adherirse al sustrato, independientes de anclaje, y es propio de las células hematopoyéticas, algunas líneas celulares transformadas y de células procedentes de tumores.

Cuando se mantiene el cultivo se establece una nueva selección: aumentan en número aquellas células que tienen una mayor tasa de crecimiento. En el momento en que se alcanza la confluencia las células, en general, detienen su crecimiento, aunque pueden existir tipos celulares, neoplásicos, que sigan duplicándose y que desplacen a los otros del cultivo.

Una vez se alcanza la confluencia en el cultivo es cuando muchas líneas celulares expresan sus aspectos más característicos. Es en este estado cuando el parecido morfológico y fisiológico es mayor al modelo celular de origen. Es también el momento en el que se detiene el crecimiento y se hace necesario dividir, re-plaquear o propagar las células. En el momento en que las células comienzan a dividirse en la placa su número se incrementa, hasta ocupar todo el espacio. En ese momento es necesario tomar algunas y resembrar en una nueva placa.



BIBLIOGRAFÍA

- Holbrock, K. A. y Hennings, H. (1983). "Phenotypic expression of epidermal cells *in vitro*': a review". J. Invest. Dermatol. 81: 11s-24s.
- Hayflick y Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains". Exp. Cell Res. 25: 585-621.

EL LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR

1. Tipos de laboratorios de cultivo celular
2. La instrumentación del laboratorio de cultivo celular
 - 2.1 Las cabinas de flujo laminar
 - 2.2 Incubadores
 - 2.2.1 Incubador de CO₂
 - 2.2.2 Incubador "roller"
 - 2.3 Instrumentos ópticos de observación : microscopio de contraste de fases invertido
 - 2.4 Congeladores e instalación de criogenia (depósito de nitrógeno líquido)
 - 2.5 Equipo de esterilización : autoclave y equipo de filtración
 - 2.5.1 Equipos de filtración
 - 2.5.2 Autoclave
 - 2.6 Otros instrumentos: centrifugas, contadores de células electrónico, equipo de purificación de agua, balanzas, pH-metro, pipeteador
 - 2.6.1 Centrifugas
 - 2.6.2 Contador de células electrónico
 - 2.6.3. Equipo de purificación de agua
 - 2.6.4 Pipeteadores

La característica principal que define al laboratorio de Biología Celular en general y de cultivo de células y tejidos en particular es el mantenimiento de la asepsia. La tasa de crecimiento de las células en cultivo es muy inferior al de los contaminantes habituales: hongos, levaduras, bacterias y micoplasmas, y por ello para el mantenimiento del cultivo será vital evitar la aparición en éste de cualquier microorganismo indeseado. El área de trabajo para realizar cultivos debe instalarse en una parte del laboratorio tranquila, alejada de las vías de paso y a ser posible dedicada exclusivamente al cultivo de células. La solución ideal es disponer de una habitación aislada.

Las 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 del incubador donde se mantendrán.

1. TIPOS DE LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR

Las necesidades de asepsia dependen del tipo de material que se va a procesar en el laboratorio. Esto define dos tipos de contención y de área de trabajo diferentes:

A. El laboratorio de cultivo de tejidos general, para la manipulación de cultivos no patógenos, se instalará preferentemente en una sala aislada y a la cual se le suministrará aire filtrado. Esto produce un aumento de presión atmosférica en el interior del laboratorio impide la entrada de aire no filtrado al área limpia.

B. El laboratorio de cultivo con patógenos supone un nivel de contención superior. A fin de evitar la salida accidental de éstos agentes se filtra el aire que sale de la sala, generando un déficit de presión en el interior de ésta. El aire sale siempre estéril.

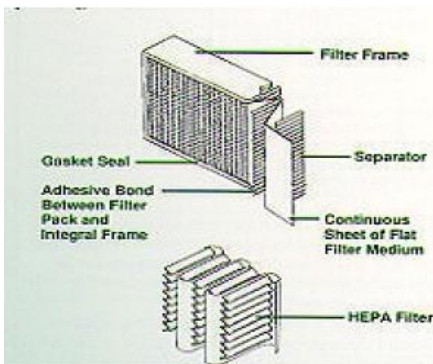
2. LA INSTRUMENTACIÓN DEL LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR

En el laboratorio de cultivo celular propiamente dicho se encuentran los siguientes tipos de instrumentos:

- A. Cabinas de flujo laminar (áreas de trabajo y de contención estéril).
- B. Incubadores: baños termostatzados, incubadores de CO₂, Incubadores 'roller', otros.
- C. Instrumentos ópticos de observación del cultivo: microscopio invertido de contraste de fases, de fluorescencia, etc.
- D. Instalación de criogenia (tanques de N₂ líquido) y congeladores.
- E. Equipo de esterilización: autoclave, equipos de filtración, etc.
- F. Otros instrumentos: centrífugas, contadores electrónicos de células, equipo de purificación de agua, balanzas, pH-metro, pipeteadores y dispensadores de líquidos, etc.

2.1 LAS CABINAS DE FLUJO LAMINAR

Su función es la de mantener un área libre de partículas, especialmente de posibles contaminantes (bacterias, levaduras, etc.) que puedan acceder al cultivo. Esto se consigue mediante un dispositivo mecánico que fuerza el paso del aire a través de un filtro de gran superficie (filtro HEPA) situado o bien en el techo (flujo vertical) o en la pared frontal (flujo horizontal) y que con una eficiencia del 99.999 % retiene las partículas por debajo de un cierto tamaño que es en general de 0.2 μm . En la figura siguiente se representa una sección de filtro HEPA. El flujo del aire es laminar, sin turbulencias en las que puedan quedar retenidas partículas contaminantes.



Tal como ya se ha indicado, las cabinas de flujo laminar pueden ser de dos tipos: flujo vertical y flujo horizontal, dependiendo de la posición del filtro HEPA y por ello de la dirección del flujo laminar.

Los diferentes tipos de cabinas de flujo laminar se diseñan con diferentes propósitos:

a. **Protección personal:** protección del personal de los posibles agentes dañinos del interior de la cabina.

b. **Protección del producto**, experimento o cultivo que se encuentra en el interior de la cabina de los contaminantes exteriores o de la contaminación cruzada con otros productos o cultivos situados en la misma cabina.

c. **Protección medioambiental**: evitar la salida al medio ambiente de productos o agentes contaminantes.



Las cabinas de flujo laminar horizontal son muy adecuadas para una buena protección del producto, pero no son adecuadas para el trabajo con materiales peligrosos o con algún tipo de riesgo pues el operador queda completamente expuesto. En las cabinas de flujo vertical, más sofisticadas, se asegura una buena protección del producto, y, dependiendo de su diseño se puede asegurar una protección total del operador. Son por ello más adecuadas para el trabajo con agentes peligrosos.

Dependiendo de la importancia que se le conceda a cada uno de estos factores en el diseño de la cabina se trata de cabinas de clase I, II o III.

1. Cabina de clase I.

Se trata de una unidad de contención parcial adecuada para la manipulación de agentes de bajo riesgo, donde existe una necesidad de protección del operario y del medio pero no del producto. Este es el tipo de cabinas normalmente denominadas "de gases", y no son de uso común en el laboratorio de cultivo de tejidos.

2. Cabina de clase II.

Este tipo de cabinas protegen el producto, al personal y al medio ambiente. En general las cabinas de clase II se describen como un equipo de protección con un panel frontal de acceso y que mantienen un flujo laminar estable en el interior, con una filtración HEPA para el aire recircularizado en cada ciclo y una filtración HEPA del aire exhausto (de salida al medio).

3. Cabina de clase III.

Se trata de una cabina de seguridad, estanca, para el trabajo con agentes biológicos de alto riesgo. Permite mantener al agente patógeno en un ambiente completamente estanco. Permiten controlar tanto los contaminantes particulados como aerosoles y contaminantes gaseosos mediante sistemas de filtración y disolución de éstos.

2.2 INCUBADORES

Se trata de equipos comunes a la mayor parte de los laboratorios de biología (estufas, baños termostatzados, etc.) con la excepción del incubador de CO₂, y del incubador con "roller".

Las células en cultivo son capaces de soportar sin daños importantes variaciones de temperatura, siempre que sean por debajo de la temperatura corporal del animal del que proceden. Así pues las células humanas soportan incubaciones a 4° C durante días y pueden ser congeladas a -196° C durante años (con sustancias preservantes). Sin embargo no sobreviven más de unas pocas horas a variaciones de 2° C por encima de 37° C.

En un incubador de células es por tanto más importante la consistencia de la temperatura (invariabilidad durante prolongados periodos de tiempo) que su precisión a fin de mantener a las células en condiciones en las que las tasas de crecimiento sean constantes. Por ello se deben usar incubadores con movimiento de aire forzado en el interior, y colocar los contenedores de células sobre estanterías agujereadas y nunca sobre el fondo o las paredes del incubador.

Las necesidades de asepsia en el incubador son considerablemente menores que en el área de trabajo pero sin embargo es muy recomendable mantener una estricta limpieza, desinfección periódica del incubador, y especialmente no introducir, cultivos contaminados en el incubador.

2.2.1 Incubador de CO₂

El mantenimiento de la temperatura en una atmósfera con una tensión controlada de CO₂ y adicionalmente de humedad elevada es el objetivo del incubador de CO₂.

Un incubador moderno dispone de:

1. Dispositivos de control de temperatura, con un termostato de seguridad que desconecta la función en caso de anomalía. La estabilidad de la temperatura es una característica esencial del incubador, y por ello suelen estar equipados con camisas de agua que incrementan notablemente la inercia térmica. Como consecuencia la estabilización de un incubador puede tardar varios días.

2. Dispositivo de inyección de una mezcla de aire y CO₂, en la proporción deseada, entre el 4 y el 7 %. El CO₂ de elevada pureza se suministra en botellas presurizadas, y se mezcla en el dispositivo de inyección. En incubadores modernos este dispositivo analiza constantemente el porcentaje de CO₂ presente en la cámara de incubación, y realiza las correcciones necesarias.



3. Dispositivo de control de la humedad ambiente. Para mantener el cultivo se requiere una humedad ambiente elevada, a fin de reducir la evaporación de agua del medio de cultivo. En los incubadores menos sofisticados esto se consigue mediante bandejas de agua en el fondo del incubador. Este recurso es peligroso pues son una fuente importante de contaminaciones. En los instrumentos más modernos se dispone de dispositivos que controlan la humedad atmosférica, inyectando agua estéril y filtrada.

4. Dispositivo de recircularización de aire. Es importante una recirculación del aire en el interior del incubador, a fin de homogeneizar la temperatura en su interior. Si además en el circuito de circulación de aire se intercala un filtro HEPA se consiguen eliminar las posibles partículas contaminantes, y se asegura la esterilidad del ambiente.



Las condiciones del cultivo: temperatura, humedad atmosférica y niveles de CO_2 son característicos de cada línea celular. El nivel de CO_2 se establece para mantener el equilibrio carbonato-bicarbonato en el medio de cultivo, habitualmente al 5%.

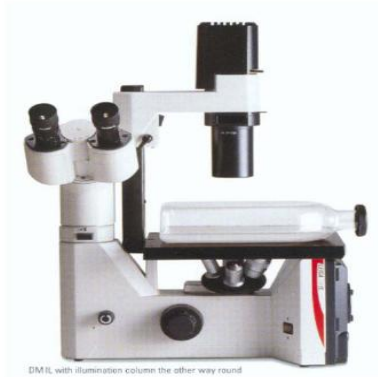
2.2.2 Incubador "roller".

Se trata de un incubador o estufa, en el interior del cual se ha instalado un "rotor" de baja velocidad. Se utiliza para mantener cultivos en botellas cerradas (no requieren CO_2). La finalidad es disponer de una gran superficie para la adhesión de las células. En estos instrumentos se incuban las células en el interior de 'roller bottles', botellas con una gran superficie de crecimiento.



2.3 INSTRUMENTOS ÓPTICOS DE OBSERVACIÓN: MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES INVERTIDO.

El control morfológico del cultivo se realiza mediante el uso de un microscopio. El hecho de que las muestras a observar se encuentren en recipientes de un cierto grosor hace que un microscopio convencional no sea adecuado, por lo que se han desarrollado microscopios de diseño original, en los cuales la fuente de iluminación y los objetivos se encuentran invertidos respecto a la platina de un microscopio óptico convencional (Ver figura).



La segunda característica que condiciona el instrumento óptico es su ausencia de color, es decir se trata de muestras vivas y con poco contraste. El microscopio se equipa con el dispositivo de contraste de fases (diafragmas anulares a nivel del condensador y placa de fases entre las lentes del objetivo). De esta forma el contraste de la imagen aumenta y la calidad obtenida es muy superior.

Es de gran utilidad disponer asimismo de un dispositivo de captación de imágenes, fotográfico o de video acoplado al microscopio a fin de documentar el estado de los cultivos.

2.4 CONGELADORES E INSTALACIÓN DE CRIOGENIA (DEPÓSITO DE N₂ LÍQUIDO)

Es recomendable que los congeladores y la instalación de criogenia estén en recintos separados a la unidad de cultivo propiamente dicha pues los ventiladores y compresores son una fuente importante de turbulencias y suciedad en el laboratorio.

Es preciso el almacenamiento de soluciones y células a diferentes temperaturas, para lo que se requiere:

1. Heladeras (4° C) para el almacenamiento de medios, PBS, y otras soluciones.
2. Congeladores de -20° C para el almacenamiento de suero, aditivos (glutamina, antibióticos) y soluciones enzimáticas (tripsina, colagenasa).
3. Congeladores de -80° C para el almacenamiento a largo plazo de los aditivos del medio (suero, glutamina, antibióticos, etc.) y de sustancias especialmente sensibles (factores de crecimiento, mitógenos, inductores, etc.).
4. Unidad de almacenamiento en nitrógeno líquido (-196° C), para el almacenamiento de las líneas celulares.



2.5 EQUIPO DE ESTERILIZACIÓN: AUTOCLAVE Y EQUIPO DE FILTRACIÓN

La necesidad de asepsia para el cultivo de tejidos se extiende no sólo al medio en que se realiza el trabajo sino muy especialmente a los recipientes en que se realiza el cultivo, a los medios líquidos o sólidos, y a los instrumentos que puedan entrar en contacto con éste en algún momento de su manipulación (pipetas, puntas de pipeta automática, pinzas, tubos, material variado de vidrio, etc.). Para esterilizar todo este material, de variada naturaleza se emplean una serie de métodos: irradiación con radiación gamma o rayos X, esterilización por gas, autoclavado, filtración. En el laboratorio general de cultivo de tejidos se suele disponer de: equipo de filtración y autoclave.

2.5.1 Equipos de filtración.

En la actualidad se dispone de unidades de filtración estéril, muy recomendables para el trabajo rutinario, pero su elevado costo hace que en muchos casos se usen unidades reutilizables.

Estos equipos de filtración constan o bien de una fuente de vacío conectada a un kitasato dotado de una unidad de filtración esterilizada por autoclavado, o bien de una bomba peristáltica que fuerza el flujo de solución a través de una unidad de filtración hermética. En ambos casos la esterilización se produce al atravesar la solución un filtro de poro 0.22 μm .



2.5.2 Autoclave.

Una autoclave es un instrumento que permite la esterilización por calor tanto de sólidos como de líquidos. La esterilización se realiza habitualmente a 121° C, 1 atmósfera de presión durante un tiempo superior a 20 min. Una autoclave de uso normal en el laboratorio de cultivo de tejidos suele disponer de temporizador y regulador de presión, y en algunos casos de un ciclo de secado para permitir secar el material sólido (material de vidrio, instrumentos quirúrgicos, tubos).



2.6 OTROS INSTRUMENTOS: CENTRÍFUGAS, CONTADOR DE CÉLULAS ELECTRÓNICO, EQUIPO DE PURIFICACIÓN DE AGUA, BALANZAS, PH-METRO, PIPETEADORES

Además del equipo antes citado el laboratorio de cultivo de tejidos deberá estar equipado con otros instrumentos que, o bien no son imprescindibles para un laboratorio de tamaño pequeño (por Ej. el contador electrónico de células), o bien son instrumentos que forman parte de un laboratorio de uso más general (centrífugas, equipo de purificación de agua, balanzas, pH-metro, pipeteadores).

2.6.1 Centrífugas.

En el laboratorio de cultivo de tejidos es necesario disponer de una centrífuga refrigerada, preferentemente con posibilidades de usar en ella desde tubos de pequeño volumen (1 a 2 ml) a botellas de gran capacidad (250 a 500 ml). Normalmente, para la mayor parte de las aplicaciones bastará con un instrumento que desarrolle hasta 2000 g.

La centrífuga se ha de instalar dentro de lo posible alejada de las cabinas de flujo laminar, para evitar las turbulencias de aire que genera.

2.6.2 Contador electrónico de células.

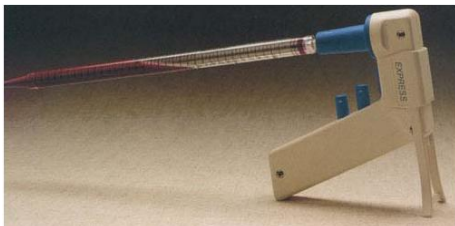
Un contador electrónico de células es un instrumento capaz de contar y medir partículas en suspensión.

2.6.3 Equipo de purificación de agua.

Es de gran importancia en la preparación de los medios, de los aditivos, o en cualquier solución que pueda estar en contacto con el cultivo, una absoluta esterilidad y ausencia de sustancias que puedan provocar alguna alteración al cultivo. Por ello se utiliza siempre agua de la máxima calidad obtenida mediante equipos de doble destilación o de intercambio iónico y filtración.

2.6.4 Pipeteadores

Se trata de dispositivos o instrumentos para el trasvase o medición de fluidos. Los de uso común en el laboratorio como las pipetas automáticas y las pipetas, pero con la salvedad del uso de bombas acopladas a la pipeta, manuales o eléctricas que permiten la aspiración mecánica del fluido. Importante para mantener la asepsia y al mismo tiempo para la protección del operador. El aire bombeado es filtrado previamente.



EL MEDIO DE CULTIVO

1. El sustrato de cultivo
 - 1.1 Materiales usados como sustrato
 - 1.2 Recipientes de cultivo
2. La fase gaseosa
 - 2.1 Oxígeno
 - 2.2 Dióxido de carbono
3. Propiedades físicas
 - 3.1 pH y capacidad buffer
 - 3.2 Osmolaridad
 - 3.3 Temperatura
 - 3.4 Viscosidad
 - 3.5 Tensión superficial
4. Condiciones fisiológicas
 - 4.1 Soluciones salinas equilibradas (BSS)
 - 4.2 Aminoácidos
 - 4.3 Vitaminas
 - 4.4 Otros suplementos orgánicos de bajo peso molecular
 - 4.5 Hormonas y factores de crecimiento (suero)
 - 4.6 Inhibidores del crecimiento de los contaminantes (antibióticos y antifúngicos)

El cultivo celular se realiza en medios artificiales preparados mediante la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas, en el interior de instrumentos que mantienen las condiciones físico-químicas adecuadas y sobre soportes o recipientes que los contienen y aíslan del medio exterior. Por ello consideraremos que el medio de cultivo estará formado por cuatro elementos:

1. La naturaleza del sustrato o fase en que crecen las células.
2. Las condiciones físico-químicas y fisiológicas del medio.
3. La naturaleza y composición de la fase gaseosa.
4. Las condiciones de incubación, especialmente la humedad y la temperatura.

1. EL SUSTRATO DE CULTIVO

La mayor parte de las líneas celulares crecen en forma de monocapa unidas a un soporte más o menos sólido. El crecimiento en suspensión está usualmente restringido a algunas líneas celulares especialmente de células hematopoyéticas y tumores ascíticos. Según si la línea celular precise o no unirse al sustrato para proliferar se dice que es dependiente o independiente de anclaje. Suspensión vs. Adhesión.

1.1. Materiales usados como sustrato

Los tipos de sustrato más empleados en la actualidad son los siguientes:

- a. **Vidrio.** Tiene como ventajas su escaso coste y su facilidad de limpieza y esterilización. Asimismo es útil para su posterior observación al microscopio por su calidad óptica.
- b. **Plástico desechable.** Muy empleado en la actualidad como material desechable estéril por irradiación. El plástico más empleado es el poliestireno, de buena calidad óptica.
- c. **Microsoportes** ("microcarriers"). Se trata de soportes plásticos (poliestireno), sephadex y poliacrilamida en forma de pequeñas perlas ("beads") a las que se unen las células dependientes de anclaje. Estas bolitas con las células adheridas se mantienen en suspensión.
- d. **Otros sustratos artificiales.** Se han desarrollado técnicas para crecer células de glia en sustratos metálicos, de paladio o en discos de acero.
- e. **Superficies tratadas.** La adherencia y crecimiento de las células en un frasco mejora en muchos casos si la superficie ha sido tratada con el medio de crecimiento de otro cultivo, debido a la presencia de colágeno o fibronectina liberada por las células, o bien sobre superficies recubiertas de proteínas de matriz extracelular (fibronectina, colágeno, vitronectina, etc). Otros tratamientos que se han usado han sido: gelatina (músculo), poli-D-lisina (algunos teratomas de ratón).
- f. **"Feeder layers".** Se ha descrito previamente que algunos tipos celulares para crecer en cultivo y expresar sus características diferenciadas precisan de suplementos específicos. Una manera de obtener estos suplementos es la de hacerlos crecer sobre los restos de monocapas de otros tipos celulares. Estas monocapas previas se esterilizan o se inhibe su crecimiento (normalmente por irradiación X o gamma).
- g. **Matrices tridimensionales.** Son sustratos en los que las células penetran, estableciendo una distribución tridimensional: geles de colágeno, esponja de celulosa sola, o recubierta de colágeno. En estas matrices muchos tipos celulares crecen y se establecen de una manera parecida a como lo hacen en el tejido de origen.
- h. **Sustratos no adherentes.** Son sustratos que no permiten la adhesión celular, por ejemplo agar, agarosa, o methocel (metilcelulosa de alta viscosidad). Son de utilidad en situaciones en las que no conviene que exista dispersión de las células derivadas de una originaria, por ejemplo en los procesos de aislamiento de colonias infectadas por virus.
- i. **Interfases líquido-gel o líquido-líquido.** Se han observado en algunas situaciones proliferación celular y adhesión a las interfases líquido-líquido o líquido-gel, a pesar de que se desconocen exactamente los mecanismos.

1.2 Recipientes de cultivo.

Tal como se ha descrito previamente, el material más utilizado como sustrato es el plástico desechable, en forma de diferentes tipos de recipientes. Los más comunes son:

- **Placas de Petri.** Disponibles en varios tamaños son las más empleadas cuando se trata de crecer las células para usar directamente en experimentos.

- **Multiplacas.** Es una variante de las placas de Petri. Placas de varios pocillos, desde 6 a 96 pocillos.

-**Frascos de Roux.** Disponibles en diferentes tamaños, son recomendables para el mantenimiento de las líneas y la producción de células, o bien para el crecimiento de células en suspensión.

-**"roller bottles"**. Se trata de tubos, con una cara plana sobre la que se fija el cultivo, y que se incuban en los incubadores dotados de "roller". Existen variantes con una gran superficie de adhesión y que se destinan a la producción de gran número de células.

2. LA FASE GASEOSA

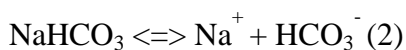
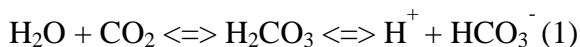
Los componentes más significativos de la fase gaseosa son el oxígeno y el dióxido de carbono.

2.1 Oxígeno

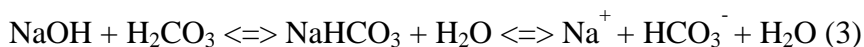
La necesidad de oxígeno para la mayor parte de los cultivos celulares es cubierta con la tensión atmosférica, aunque existen cultivos, especialmente los cultivos de órganos que requieren una tensión de oxígeno superior (del 95%) posiblemente debido a la geometría del órgano y a las dificultades de difusión del gas en su interior.

2.2 Dióxido de carbono

El dióxido de carbono juega un complejo papel en el medio debido a que influye la cantidad de CO₂ disuelto, el pH y la cantidad de iones HCO₃⁻. Las reacciones que tienen lugar en el medio son:



El incremento de la concentración de ión bicarbonato desplaza la ecuación (1) hacia la izquierda, de modo que el pH se establezca en 7.4. Se puede emplear asimismo otra base, por ejemplo NaOH, siendo la ecuación:



De modo que para establecer un pH determinado se debe tener en cuenta especialmente los niveles de bicarbonato sódico y la tensión de CO₂. Cada medio tiene una concentración recomendada de bicarbonato y tensión de CO₂ para alcanzar el pH correcto. Sin embargo, se emplean otras sustancias tamponadoras en la formulación de muchos medios en la actualidad, lo que permite una estabilidad superior del pH en el medio, así como una mayor capacidad buffer. Aunque aparentemente podría ser posible prescindir del bicarbonato en la formulación del medio, esto se ha revelado falso, debido probablemente a que la ausencia de bicarbonato sódico desplazaría la ecuación 1 hacia la derecha, de modo que tendería a desaparecer el CO₂ disuelto y eventualmente el ión

bicarbonato, ambos aparentemente necesarios para el crecimiento celular. En la tabla siguiente se lista la relación entre ión bicarbonato, CO₂ y HEPES.

Fase gaseosa		Fase líquida
Dióxido de carbono	ión bicarbonato	HEPES
atmosférico	4 mM	10 mM
2 %	8 mM	20 mM
5%	24 mM	50 mM

Una alternativa es la suplementación del medio con piruvato. Esto permite a muchos tipos celulares incrementar su producción de CO₂ endógeno, haciéndolas independientes de la aportación de CO₂ exógeno.

En resumen, los cultivos crecidos a baja densidad en un recipiente abierto precisan una atmósfera de CO₂, cuya concentración esté en equilibrio con el bicarbonato sódico en el medio. A concentraciones celulares muy reducidas es necesario añadir CO₂ en la fase gaseosa de los frascos cerrados. Cuando la concentración celular es más elevada puede no ser necesario añadir CO₂ a frascos cerrados, pero si en frascos abiertos. En los casos en los que la densidad celular sea elevada, con mucha producción de ácido es recomendable, por la elevada producción de CO₂ endógeno, mantener abierto el recipiente de modo que se pueda eliminar el exceso. En estos casos es especialmente recomendable suplementar el medio con HEPES para asegurar un correcto control del pH del medio.

3. PROPIEDADES FÍSICAS

Las características del medio son: pH, osmolaridad, temperatura, viscosidad y tensión superficial.

3.1 pH y capacidad buffer.

El pH óptimo de crecimiento para la mayoría de tipos celulares es de 7.4, aunque existen pequeñas variaciones: algunas líneas normales de fibroblasto crecen mejor entre pH 7.4 y 7.7, y células transformadas lo hacen en el margen de pH de 7.0 a 7.4, células epidérmicas pueden ser mantenidas a pH 5.5.

El indicador de pH que se suele emplear es rojo fenol, que presenta color rojo a pH 7.4, naranja a pH 7.0, amarillo a pH 6.5, azul-rojo a pH 7.6 y púrpura a pH 7.8.

El medio de cultivo debe estar tamponado, a fin de evitar los cambios bruscos de pH. La solución tamponadora más empleada sigue siendo el tampón bicarbonato, que equilibra el CO₂ atmosférico, a pesar de su escasa capacidad tamponadora, debido a: su bajo coste, baja toxicidad, y beneficios nutricionales para el cultivo. HEPES es la solución tamponadora de elección por su elevada capacidad tamponadora en el rango 7.2 a 7.6, y se emplea en concentraciones de 10 a 20 mM. Cuando se usa conjuntamente con CO₂

externo, debe estar a concentración doble del bicarbonato para un tamponamiento adecuado.

3.2 Osmolaridad

Muchas células en cultivo tienen una amplia tolerancia frente a la osmolaridad del medio, creciendo bien en el rango de 260 a 320 mOsm/Kg, con pequeñas variaciones dependiendo de la especie considerada. Es recomendable emplear medios ligeramente hipotónicos para compensar la evaporación durante el periodo de incubación, especialmente en incubadores sin control de la humedad ambiente.

La osmolaridad se controla mediante la determinación del punto de congelación o la elevación de la presión de vapor. Hay que tener en cuenta que la adición de HEPES, de drogas disueltas en ácidos fuertes y la neutralización posterior pueden afectar fuertemente a la osmolaridad del medio.

3.3 Temperatura

La temperatura tiene gran influencia en la tasa de crecimiento de las células, de ahí la importancia de un buen control de ésta en la incubación. Influye asimismo en el pH del medio, por lo que se recomienda o bien ajustar el pH del medio 0.2 unidades por debajo del óptimo, a temperatura ambiente, o bien preparar el medio completo, incluso suero, dejar equilibrar o/n en la estufa y después ajustar el pH, antes de añadirlo al cultivo.

3.4 Viscosidad

La viscosidad del medio viene determinada fundamentalmente por el contenido en suero y tiene poca influencia sobre el crecimiento. Sí es importante para evitar el daño celular en la agitación del cultivo (menor daño a más viscosidad) y en la tripsinización. Se puede incrementar la viscosidad, especialmente en medios libres de suero, añadiendo al medio carboxi-metil-celulosa o polivinilpirrolidona.

3.5 Tensión superficial

La tensión superficial se ha de mantener baja, y en general sólo se ve alterada por la aparición de espumas en los cultivos en suspensión donde se burbujea CO₂. En estos casos es recomendable emplear un agente antiespumante de silicona pues en éstos casos se produce un aumento de la desnaturalización de proteínas y se incrementa el riesgo de contaminación si la espuma alcanza el cuello del recipiente de cultivo.

4. CONDICIONES FISIOLÓGICAS

Hacen referencia a la composición del medio. Ya se indicó que la principal dificultad para el establecimiento de las líneas celulares es el de obtener medios nutritivos adecuados que sean capaces de reemplazar al medio "natural" como extractos embrionarios, hidrolizados de proteína o sueros. Un primer grupo de medios tales como el medio basal de Eagle (MEM) y el más complejo 199 de Morgan o CMRL 1066 eran medios definidos pero que precisaban de un suplemento de suero entre el 5 y el 20 %.

La aproximación recomendada para establecer un medio definido es empezar con un medio rico, suplementado con elevada concentración de suero (20 %) y probar suplementos que permitan reducir la cantidad de suero hasta poderla reducir o suprimir.

Después de años de investigación en la composición de los medios la elección de éstos sigue siendo empírica.

Algunos ejemplos de los principales medios empleados y sus aplicaciones son:

1. **Medio Basal de Eagle (BME)**. Medio elemental con sólo los aminoácidos esenciales. Se necesita siempre la suplementación con suero bovino fetal al 10 %. Crecimiento de fibroblastos de ratón y células HeLa.
2. **Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM)**. Es el medio de uso más corriente, contiene más aminoácidos y en mayor concentración que el BME. Se usa para cada casi todo tipo de cultivos y requiere la adición de suero (10 %).
3. **RPMI 1640**. Medio diseñado para el crecimiento de linfoblastos y líneas celulares leucémicas en suspensión.
4. **Medio MEM modificado por Dulbecco (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.
5. **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.
6. **Medio L-15 de Leibovitz**. Utilizado para el cultivo de virus.
7. **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.

Todo medio de cultivo está formado por los siguientes elementos:

1. Soluciones salinas equilibradas (BSS).
2. Aminoácidos.
3. Vitaminas.
4. Otros suplementos orgánicos de bajo peso molecular.
5. Hormonas y factores de crecimiento (suero).
6. Inhibidores del crecimiento de los contaminantes (antibióticos y antifúngicos).

4.1 Soluciones salinas equilibradas (BSS)

Una solución salina equilibrada es una mezcla de sales inorgánicas, incluyendo usualmente bicarbonato sódico, y suplementada con glucosa. Se usan para diluir medios más completos, como medio de disección o lavado, o para incubaciones cortas que requieren un medio isotónico no completo nutricionalmente.

4.2 Aminoácidos

Es necesario suplementar el medio basal con los aminoácidos esenciales. Asimismo se suplementa con otros aminoácidos, pues los requerimientos pueden variar de una célula a otra. Un suplemento común es el de glutamina, a 2 mM final, aunque hay algunas líneas

celulares pueden usar el glutamato. La glutamina es inestable en el medio, y se recomienda añadirla a partir de un stock concentrado (100x) que se mantiene congelado, no más de 1 semana antes de añadir el medio al cultivo (conservando a 4° C).

4.3 Vitaminas

El medio MEM sólo suplementa con vitaminas del grupo B, siendo los demás grupos aportado por el suplemento de suero. En medios más definidos se suplementan todas las vitaminas. La limitación de vitaminas se manifiesta en la supervivencia de las células y en la reducción de la tasa de crecimiento más que en la densidad celular.

4.4 Glucosa

Es la fuente de energía en muchos medios. Metabolizada preferentemente vía glucólisis hacia piruvato que puede ser convertido en lactato o acetoacetato que entra el ciclo de Krebs, y genera CO₂. La acumulación de ácido láctico en el medio propio de células embrionarias y transformadas parece indicar un funcionamiento diferente del ciclo de Krebs en estas células respecto al modelo *in vivo*. En estos casos la mayor parte del CO₂ parece proceder de un uso de la glutamina/glutamato.

4.5 Otros suplementos orgánicos de bajo peso molecular

Dependiendo del medio, éste incluye en su formulación nucleósidos, intermediarios del ciclo de Krebs, piruvato, lípidos, etc. La adición de piruvato en el medio permite al cultivo incrementar su producción endógena de CO₂ haciéndole independiente de la aportación exógena de éste. El medio de Leibovitz L15 contiene una concentración superior de piruvato y no contiene bicarbonato sódico, y no requiere aporte de CO₂ en la fase gas.

4.6 Hormonas y factores de crecimiento: suero.

En los medios no definidos suele aportarlos el suero. Los tipos de suero empleados son suero de ternero ("calf serum", CF), suero bovino fetal ("fetal calf serum", FCS), suero de caballo ("horse serum", HS) y suero humano ("human serum", HuS). El más usado es el suero de ternero, mientras que el suero bovino fetal es usado en líneas más exigentes, y el suero humano en líneas humanas.

La utilización de suero es problemática pues:

1. A pesar de que la composición del suero es conocida, existen gran cantidad de componentes presentes en cantidades variables en éste que pueden influir notablemente en el cultivo (hormonas, factores de crecimiento).
2. El suero varía de lote a lote, y cada uno se puede emplear como máximo 1 año, probablemente deteriorándose a lo largo de ese tiempo, a pesar del almacenamiento a baja temperatura.
3. Cada cambio de lote de suero requiere realizar una serie de controles tediosos y costosos.
4. Si se cultivan varios tipos celulares cada uno puede requerir un lote diferente, lo que complica el almacenamiento e incrementa los costos.
5. Crea una dependencia importante de un suministro que no siempre puede mantenerse con la periodicidad y calidad requerida.

6. Si se han de purificar productos del medio de cultivo la presencia de los componentes del suero dificulta notablemente estos procesos.

7. El suero está contaminado con demasiada frecuencia por virus y micoplasmas, lo que representa un grave peligro para el cultivo.

8. Algunos factores séricos como el factor de crecimiento plaquetario (PDGF) estimula la proliferación de fibroblastos, lo que puede ser un problema en el establecimiento de cultivos primarios especializados.

En conjunto supone un gran inconveniente para la estandarización de protocolos experimentales y de producción.

Por ello se realizan importantes esfuerzos para la definición de medios definidos para el crecimiento celular. Esto, además de la reproducibilidad buscada, permite establecer medios selectivos en los que crezca el tipo celular deseado. Tienen como desventaja la gran cantidad de esfuerzo necesario para su definición, así como que en muchos casos el crecimiento de las células en estos medios es menor, las líneas finitas permanecen viables menos generaciones, así como el hecho probable de que la adaptación del cultivo al medio libre de suero supone un tipo de selección *per se*.

Para conseguir reemplazar el suero completamente de un medio será necesario reemplazar:

1. Los factores de adhesión como la fibronectina. Células crecidas en medios libres de suero requieren el suplemento de fibronectina (25-50 ug/ml) o laminina (1-5 ug/ml) en el medio, o bien el tratamiento de las placas con poli-lisina (1 mg/ml) antes de la siembra.

2. Inhibidores de proteasas. Después de la tripsinización de un cultivo el exceso de actividad trípica se inhibe por la adición de suero al medio. En ausencia de éste deben usarse inhibidores de proteasas como el inhibidor de tripsina de soja.

3. Hormonas. El complemento hormonal dependerá especialmente del tipo celular, tales como hormona de crecimiento, T3, hidrocortisona, dexametasona, FSH, etc.

4. Factores de crecimiento peptídico. En la actualidad se han identificado algunos polipéptidos de actividad mitogénica: FGF ("Fibroblast Growth Factor"), EGF ("epidermal growth factor"), PDGF ("Platelet Derived Growth Factor") y MSA, y con un rango amplio de actividad. Asimismo se han aislado otros factores con mayor especificidad de acción

5. Nutrientes: Fe, Cu, Se y otros minerales, a pesar de que los fundamentos de su función son desconocidos en muchos casos.

6. Proteínas y poliaminas. La inclusión de albúmina bovina añade indefinición al medio, por ello se recomienda el uso de albúmina sérica bovina (BSA) libre de ácidos grasos (usualmente a 1-10 mg/ml). Transferrina (10 ng/ml) se requiere como portador de Fe, y se cree que puede tener actividad mitogénica. Putrescina se usa a alrededor de 100 nM.

4.7 Antibióticos y antifúngicos

A fin de evitar el crecimiento de contaminantes en el cultivo se suele suplementar éste con sustancias antibióticas de diferente espectro de acción. La adición de antibióticos ha de ser estrictamente controlada para evitar efectos nocivos sobre el cultivo.

Es importante tener especial cuidado cuando se combinan dos o más antibióticos. Las mezclas de uso más común son:

1. Penicilina (100 U/ml) / Streptomina (100 µg/ml). Combinación anti-microbiana.
2. Penicilina (100 U/ml) / Streptomina (100 µg/ml) / Fungizona (10 µg/ml). Combinación anti-microbiana y anti-fúngica.
3. Gentamicina (50 µg/ml). Anti-microbiana, conviene ir alternándola con la penicilina-Streptomina.
4. Anfotericina-B (2.5 µg/ml). Antifúngico y antilevaduras. Se han observado algunos efectos secundarios sobre el crecimiento de células de médula ósea humana en cultivo.

Bibliografía

- Barnes, D. y Sato, G. (1980). "Methods for growth of cultured cells in serum free-medium". *Anal. Biochem.* 102: 255-270.
 - Birch, J.R. y Pirch, S.J. (1971). "Improvements in a chemically defined medium for the growth of mouse cells (strain LS) in suspension". *J. Cell. Sci.* 7: 661-670.
 - Eagle, H. (1959). "Amino acid metabolism in mammalian cell cultures". *Science* 130 : 432.
 - Evans, V.J., Bryant, J.C., Fioramonti, M.C., McQuilkin, W.T., Sanford, K.K., y Earle, W.R. (1956), "Studies of nutrient media for tissue cells in vitro. I A protein-free chemically defined medium for cultivation of strain L cells". *Cancer Res.* 16: 77.
- C.V. Ramakrishnan (ed.). W. Junk. The Hague. pp. 145-167.
- Morgan, J.G., Morton, J.H. y Parker, R.C. (1950). "Nutrition of animal cells in tissue culture. I Initial studies on a synthetic medium". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73: 1.
 - Pelman, D. (1979). "Use of antibiotics in cell culture media". *Meth. Enzymol.* 58 : 110-116.

TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo práctico es el de familiarizar al alumno con el cultivo de bacterias en medios de cultivo, tanto sólidos como líquidos; además de incursionar en las técnicas de cultivo de células eucariotas. Tanto las bacterias como las células CHO (Chinese Hamster Ovary cell) a utilizar en este trabajo serán posteriormente utilizadas en técnicas de biología molecular para la expresión heteróloga de genes humanos. Se analizará la sensibilidad de la cepa bacteriana *Escherichia coli* al antibiótico ampicilina, herramienta necesaria para la selección de bacterias transformantes a obtenerse en los próximos prácticos.

CULTIVO DE CÉLULAS PROCARIOTAS

MATERIAL NECESARIO:

Ansa de siembra, pipeta graduada, tubos con medio LB líquido, placas de Petri con medio de cultivo sólido y cultivo de microorganismos.

Preparación de placas de Petri con medio LB-agar y LB-agar-Ampicilina: Cepas *E. coli* DH5 α .

TIPOS DE MEDIOS DE CULTIVO:

Existe una gran variedad de medios para el cultivo de microorganismos en el laboratorio, la mayoría de ellos pueden adquirirse ya elaborados, necesitando algunos de ellos sólo la adición de agua y/o la esterilización.

Los medios de cultivo pueden clasificarse por el **estado físico** en que se encuentran:

1.-**Medios líquidos o caldos:** Son aquellos que contienen, disueltos en agua, los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos.

2.-**Medios sólidos:** Contienen nutrientes disueltos en agua pero se les añade un agente solidificante. El agar es un polisacárido complejo que se obtiene de algas rodofíceas de origen marino cuyas propiedades son de gran utilidad en la preparación de medios de cultivo sólidos: No es degradado enzimáticamente por los microorganismos (a excepción de algunos microorganismos de ambientes marinos), funde aproximadamente a 100° C y permanece en estado líquido mientras la temperatura no descienda por debajo de 45-50° C. Generalmente, el agar se añade para solidificar un medio líquido, en una concentración del 1,5%. Los medios con agar se envasan en tubo o en placa de Petri. Estos medios son utilizados para la obtención de colonias aisladas, selección de microorganismos y preservación a 4° C.

3.-**Medios semisólidos:** Son similares a los medios sólidos, pero la concentración del agente solidificante es menor, generalmente del 0,4%. Con ello, una vez solidificados presentan una consistencia gelatinosa. Se utilizan, por ejemplo, para determinar la movilidad de los microorganismos.

PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

La preparación de medios de cultivo se ha simplificado en gran medida a medios deshidratados, en los que los diferentes nutrientes se encuentran ya mezclados en las debidas proporciones, siendo sólo necesario la adición de la cantidad correcta de agua destilada para disolver sus componentes (Figura 1).

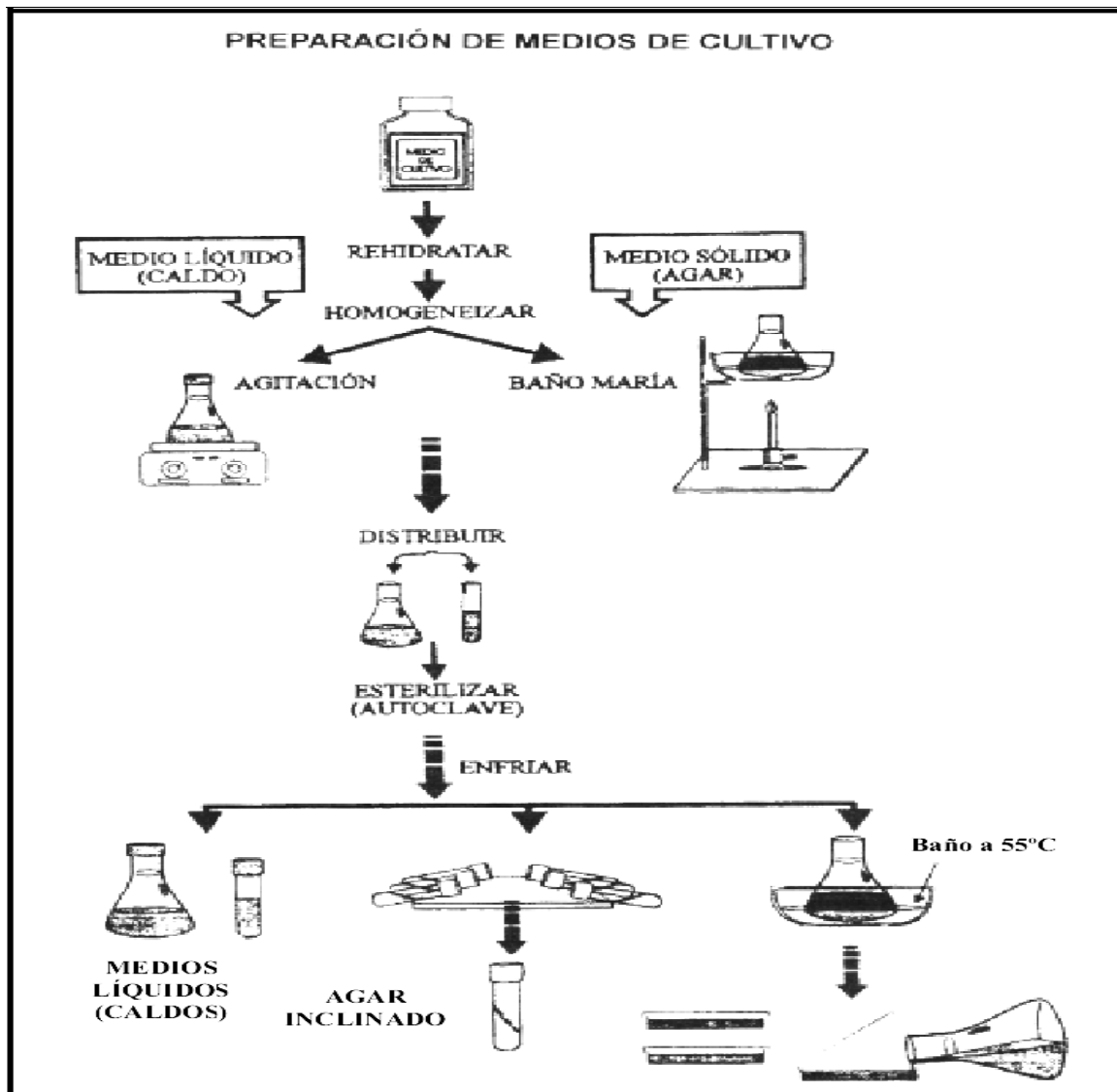


Figura 1: Preparación de medios de cultivo (Manual práctico de Microbiología, Díaz y col.)

Cuando se prepara un medio líquido se debe disolver totalmente todos sus componentes en agua destilada. A continuación el caldo se envasa en los recipientes adecuados (matraces o tubos), tapando los mismos y esterilizándolos.

La preparación de un medio sólido puede hacerse de dos maneras: Preparar el caldo y añadir agar al 1,5% o bien utilizar un medio sólido comercial el cual sólo debe ser fundido previo a su utilización. Independientemente de la forma elegida para hacerlo, la preparación de los medios de cultivo sólidos requiere procedimientos especiales, ya que el agar es insoluble en agua. Por ello, una vez añadida el agua, se debe calentar la mezcla hasta 100° C, para permitir que el agar se funda y que de incorporado al resto de los nutrientes disueltos.

El medio fundido se dispensa en tubos o matraces, que se tapan y se esterilizan. Los medios sólidos contenidos en tubos pueden dejarse enfriar en posición vertical, si van a ser inoculados en profundidad, o bien pueden inclinarse para que al solidificarse en esa posición adopte la forma inclinada que proporciona una mayor superficie de siembra (agar pico de flauta o agar inclinado).

Para preparar placas de Petri, se utilizará el medio de cultivo que ha sido esterilizado en un matraz y, una vez atemperado, se verterá en placas vacías en un ambiente aséptico, como el que proporciona la proximidad de la llama de un mechero o una campana de flujo laminar. En algunas ocasiones, el medio de cultivo destinado a placas puede conservarse estéril en tubos, que se fundirán al Baño María cuando se vayan a preparar las placas.

Si se han de incorporar al medio compuestos termolábiles, como vitaminas o antibióticos, se esterilizarán éstos por filtración y se añadirán al medio de cultivo previamente esterilizado en autoclave y una vez que este se haya atemperado.

La conservación de los medios ya preparados puede hacerse a temperatura ambiente, pero es preferible conservarlos a 4° C para retrasar su deshidratación.

• **Medio LB proporciones para la preparación de 1 litro:**

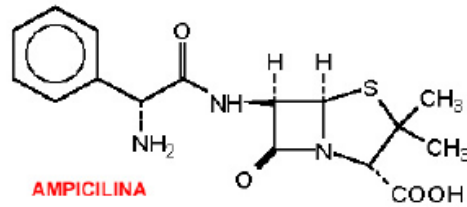
- Bactotripton 10 g
- Extracto de Levadura 5 g
- Cloruro de Sodio 5 g
- Agua Destilada completar hasta 1 litro. Ajustar pH a 7.
- Autoclavar

• **Medio LB agar proporciones para preparar de 1 litro:**

- LB 1 L
- Bactoagar 15 g
- Autoclavar.

Mecanismo de acción de Ampicilina: los antibióticos beta-lactámicos, como la Ampicilina, son bactericidas. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose a unas proteínas específicas llamadas PBS (*Penicillin-Binding Proteins*) localizadas en la pared celular. Al impedir que la pared celular se

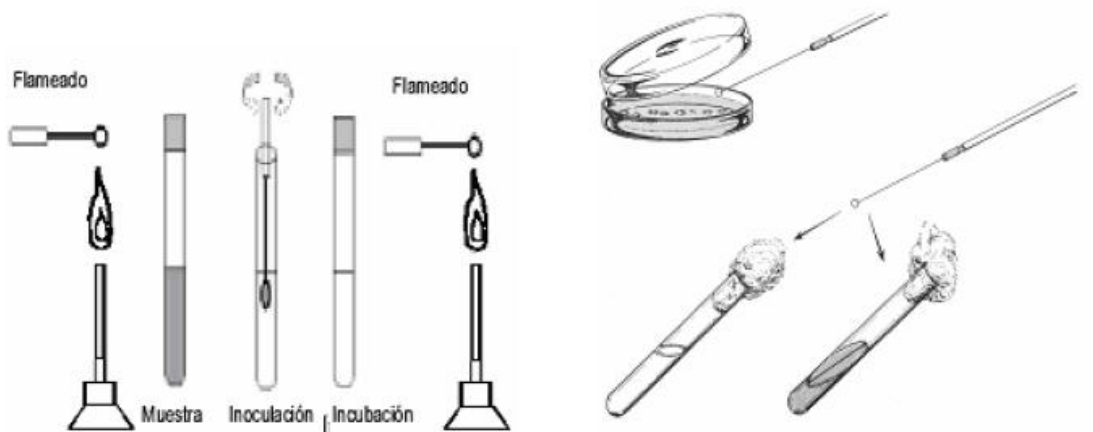
construya correctamente, la Ampicilina ocasiona, en último término, la lisis de la bacteria y su muerte. La fórmula de la Ampicilina se muestra a continuación:



TÉCNICA

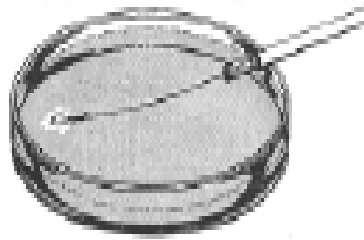
A) CULTIVO DE *E. coli* EN LB LÍQUIDO:

- 1- Previo a encender el mechero, desinfectar la zona utilizando alcohol etílico al 70%.
- 2- Llenar el tubo con 6 ml de caldo LB. Calentar el ansa hasta que se ponga roja. Enfriar el ansa en el medio.
- 3- Transferir asépticamente, con el asa de siembra, una pequeña muestra de los microorganismos, desde el tubo que contiene el material problema o tomando una colonia de una placa de Petri. Sumergir el asa en un tubo con LB líquido agitar para desprender y diluir la muestra. Observar cuidadosamente como se realiza el procedimiento antes de realizarlo.
- 4- Repetir desde el punto 1 para cultivo en LB-Ampicilina (50-100 $\mu\text{g/ml}$ de medio de cultivo)
- 5- Incubar el tubo recién sembrado en estufa preferiblemente en agitación, durante 24-48 horas a la temperatura óptima de crecimiento.



B) CULTIVO DE *E. coli* EN LB-AGAR:

- 1- Previo a encender el mechero, desinfectar la zona utilizando alcohol al 70%.
- 2- Calentar el ansa hasta que se ponga roja. Enfriar el ansa en el medio con agar.

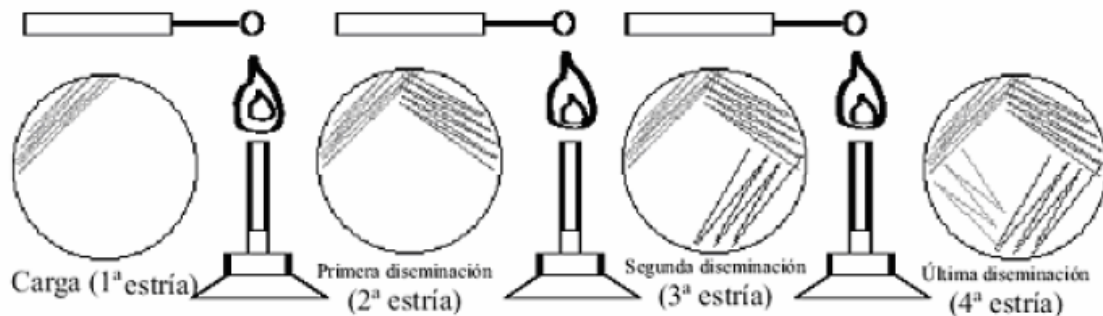


- 3- Tomar un inóculo de bacteria y sembrar en la placa por agotamiento de la siguiente manera:

Estría múltiple en superficie (técnica a utilizar en este práctico)

Extender en forma de estrías muy juntas, pero sin hacer presión para no dañar el agar. Se flamea el asa, se enfría y después de rozar la siembra realizada previamente, se extiende de nuevo por otra zona de la placa haciendo nuevas estrías. Este proceso se repite sucesivamente, flameando y enfriando el asa al comienzo de las sucesivas siembras en estría. Se lleva la placa a incubar, a la temperatura adecuada, siempre en posición invertida. La posición invertida evitará que el agua de condensación se deposite sobre la superficie del medio, dificultando la obtención de colonias aisladas. Mediante esta técnica se obtienen colonias aisladas a partir de una muestra que contenga un elevado número de bacterias.

Técnica de aislamiento por estría en superficie:



Dilución en masa

En una placa de Petri vacía se deposita un pequeño volumen conocido de muestra y a continuación se añade el medio de cultivo (agar nutritivo) fundido y atemperado aproximadamente a 45° C. Se mezclan ambos por rotación suave de la placa. De esta forma los microorganismos se distribuirán de forma homogénea en el medio de cultivo, permitiendo el desarrollo de colonias separadas por todo el agar. Otra variación de esta técnica consiste en inocular el medio de cultivo, fundido y atemperado, contenido en un tubo, con un determinado volumen de la muestra. La homogeneización de la muestra y el medio de cultivo se realizan por rotación del tubo entre las manos, antes de verterlo sobre la placa (Figura 2). En ambos casos, después de la homogeneización, se dejan enfriar las

placas hasta que se solidifique el medio y posteriormente se incuban a la temperatura adecuada (siempre en posición invertida).

Aunque con esta técnica se obtienen colonias aisladas, generalmente sólo se utiliza para determinar el número de microorganismos viables en una muestra, cuando éstos son anaerobios facultativos o microaerofílicos.

Figura 2: Siembra por dilución en masa o inclusión en agar.

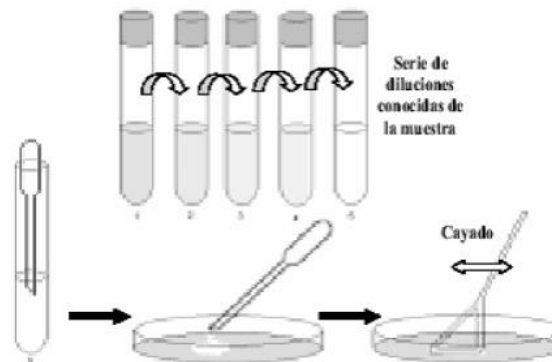


Extensión en superficie

Depositar sobre la superficie de una placa con agar nutritivo una gota ó 0,1 ml de una determinada dilución del cultivo de microorganismos problema y extenderlo con ayuda del cayado, previamente esterilizado, en todas las direcciones hasta que esté completamente seco. Incubar la placa, en posición invertida, a la temperatura deseada (durante 24, 48 ó 72 horas) según el tipo de microorganismo. La posición invertida evitará que el agua de condensación se deposite sobre la superficie del medio, dificultando la obtención de colonias aisladas (Figura 3).

Es una técnica usada para el aislamiento de colonias, que permite igualmente el recuento de bacterias viables en la muestra, si conocemos exactamente el volumen de muestra sembrado.

Figura 3: Siembra por extensión en superficie para recuento.



Colocar en estufa a 37 °C con la tapa hacia abajo.
Repetir desde el punto 2 para cultivo en LB-agar-Ampicilina.

RESULTADOS ESPERADOS:

a) **Extensión en superficie:** Tras el período de incubación (24 a 48 horas) se examinarán las placas. Las colonias aparecen sobre la superficie, distribuidas uniformemente si la siembra se ha realizado de forma correcta. Mediante esta técnica podrán diferenciarse las colonias de acuerdo a su tamaño, forma, color, textura, etc. Esta técnica de siembra, además de permitir que se distingan las colonias por su morfología, permite el recuento de microorganismos viables. La expresión de este recuento se hace en "unidades formadoras de colonias" (UFC) ya que cada una procede de un sólo microorganismo (o de un grupo de microorganismos, pues en algunos casos éstos tienden a formar agregados). A partir de las colonias aisladas, los microorganismos pueden transferirse a otros medios de cultivo para su estudio.

b) **Por estría múltiple en superficie:** Tras la incubación, se observarán las colonias aisladas en alguna región de la placa inoculada. Con esta técnica se logra la separación de los microorganismos que se encuentran en un cultivo mixto, o bien que proceden de muestras homogéneas, pero en las que existe un elevado número. En las zonas donde existen colonias aisladas se puede estudiar la morfología colonial (Figura 4).

c) **Dilución en masa:** Aparecen las colonias distribuidas por toda la masa del agar. Aquellas que están en la superficie tendrán distintas características, dependiendo del tipo microbiano, mientras que las colonias que se desarrollan en el interior, bajo la superficie del agar, tienen forma lenticular, aunque los microorganismos que formen las distintas colonias sean de distinto tipo. Por tanto, las colonias que aparecen en la profundidad del agar son siempre biconvexas y no se diferencian unas de otras por su morfología (Figura 5).

Figura 4: Aislamiento por estría en superficie

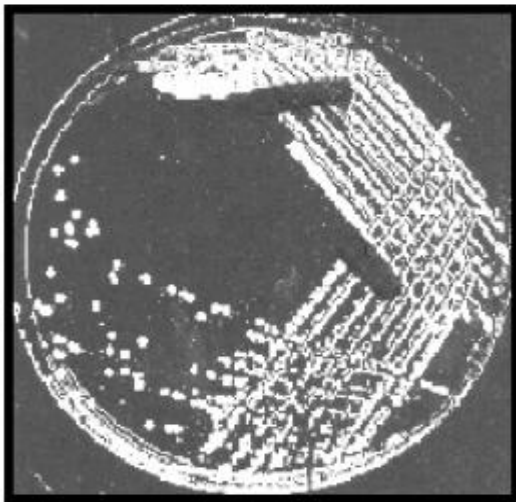
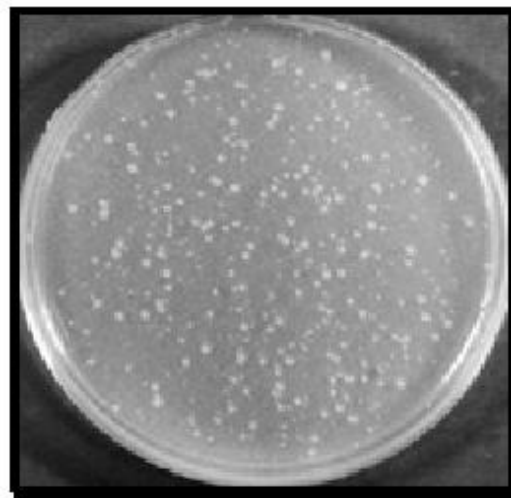
















Figura 5: Aislamiento por dilución en masa



El diagnóstico microbiológico se basa en gran medida de la capacidad del operador de reconocer las distintas especies bacterianas en función de la morfología colonial que estas presentan cuando son cultivadas sobre un medio sólido.

Aspectos más comunes de las diversas colonias microbianas aisladas sobre medio sólido

Forma	Borde	Elevación	Superficie
Puntiforme 	Entero 	Plana 	Lisa o rugosa
Circular 	Ondulado 	Elevada 	Mate o brillante
Rizoide 	Lobulado 	Convexa 	Seca o cremosa
Irregular 	Filamentoso 	Crateriforme 	Invasiva o superficial
Filamentosa 		Acuminada 	

CUESTIONARIO DE INTEGRACIÓN:

- Si usted recibe una muestra biológica perteneciente a un paciente con posible infección bacteriana. Se suponen dos posibles agentes causales morfológicamente diferentes, ¿Cual es la técnica que utilizaría para poder aislar ambas bacterias para su estudio individual?

- ¿Cómo demostraría en el laboratorio que una bacteria presenta movimiento propio?

- Discuta con sus compañeros las ventajas y desventajas que presentan el uso de medios líquidos y sólidos en el proceso de aislamiento de bacterias.

CULTIVO Y PRESERVACIÓN DE CÉLULAS EUCARIOTAS

CULTIVO CONTINUO DE CÉLULAS CHO

Al igual que las células procariotas, existen técnicas que permiten el cultivo de células eucariotas *in vitro*. Estas técnicas son de gran utilidad no solo a nivel terapéutico sino también en el ámbito de la investigación aplicada como así también en investigación básica. La mayoría de las líneas celulares animales crecen adheridas a un sustrato (plástico o vidrio) hasta formar una delgada monocapa. Una vez que esta capa esta formada (cultivo confluyente) el crecimiento de estas células disminuye hasta que cesa.

Con el objetivo de mantener las células saludables y en crecimiento continuo, estos cultivos deben ser subcultivados periódicamente.

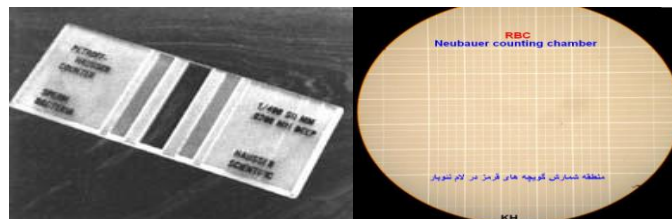
Debido a la extensa investigación realizada en el campo de biología celular, se cuenta con una gran cantidad de líneas celulares, las cuales presentan características únicas y formas de cultivar especiales; mas allá de las deferencias en las técnicas de cultivo, se puede clasificar a las células en cultivo según su forma de crecimiento:

- a- Crecimiento en suspensión: Ciertas líneas celulares crecen en suspensión, como es el caso, por ejemplo de líneas celulares derivadas de mielomas (NSO, SP2/0). Estas células nunca se adhieren al sustrato donde se las cultiva y pueden ser fácilmente subcultivadas.
- b- Crecimiento en monocapa: Otras líneas celulares crecen adheridas al sustrato donde se las cultiva. Este es el caso de líneas derivadas de fibroblastos, como así también las células CHO, las cuales son utilizadas en este trabajo práctico.

Básicamente, los protocolos de cultivo continuo involucran la ruptura enzimática de puentes de unión entre las células y entre ellas y el sustrato utilizando enzimas que degradan estas uniones, como son la tripsina o la colagenasa, entre otras. En algunas ocasiones, estas enzimas se combinan con agentes quelantes de cationes divalentes, como es el EDTA para iones calcio y magnesio.

Las células ya despegadas, son homogenizadas cuidadosamente con la ayuda de una pipeta estéril, son retiradas del recipiente donde están siendo cultivadas, cuantificadas (conteo en cámara de Neubauer), diluidas a concentraciones deseadas y puestas a crecer en nuevos recipientes estériles. Las células se adhieren nuevamente al sustrato y son capaces de continuar con su crecimiento hasta alcanzar nuevamente la confluencia.

Esta técnica básica puede ser utilizada para el mantenimiento de líneas celulares animales en crecimiento continuo y saludable.



Cámara de Neubauer

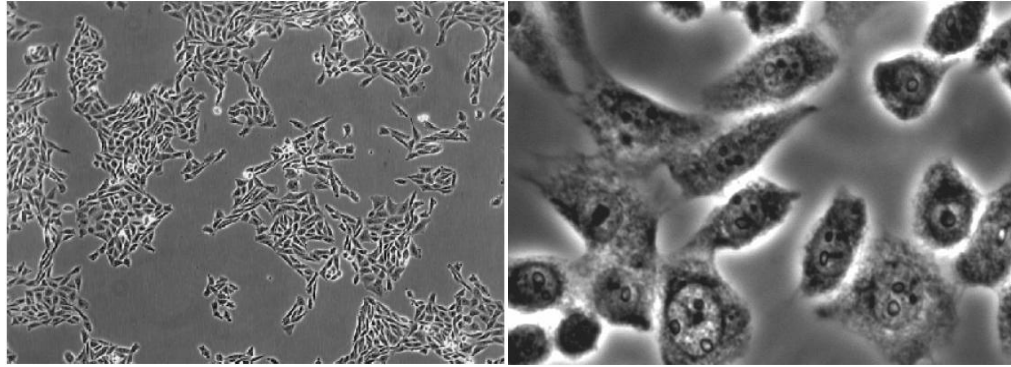
TÉCNICA

A. EXÁMEN DE CULTIVOS

Es muy importante, para el éxito de los cultivos examinarlos diariamente y siempre se debe de realizar previo a realizar un subcultivo. La morfología celular es un indicador directo del estado fisiológico de las células. Existen marcadores típicos (por ejemplo, la formación de burbujas bajo la membrana plasmática, como así también la pérdida de morfología típica) que son indicativos de que la célula no se encuentra saludable. Utilizando un microscopio invertido, debe chequear la apariencia general del cultivo (forma, células pegadas, células despegadas, porcentaje de confluencia), como así también, y muy importante, la ausencia total de contaminación microbiana. Muchas células que se encuentran en proceso de división celular pueden ser distinguidas debido a su forma más redonda y las células muertas, se encuentran generalmente en suspensión.

B. COSECHA DE CÉLULAS Y SUBCULTIVO

1. Utilizando una pipeta estéril, remover el medio de cultivo viejo. (Todo el material de descarte debe ser depositado en un recipiente debidamente rotulado y con sustancias desinfectantes)
2. Lavar la monocapa celular con un volumen de PBS estéril. Descartar. (Esto elimina los restos de medio de cultivo y proteínas en solución, las cuales interfieren con la acción enzimática)
3. Agregar un volumen de solución de Tripsina, incubar unos minutos a 37 ° C. Suavemente golpear el recipiente de cultivo, lo cual favorece a que las células se despeguen. Chequear mediante el microscopio invertido como las células se van despegando.
4. Agregar 5 ml de medio de cultivo completo y homogenizar las muestras con el uso de una pipeta estéril de 10 ml. (Esto ayuda a terminar de separar las células)
5. Obtener una muestra de la suspensión celular y realizar la cuantificación de las células mediante una cámara de Neubauer y realizar las diluciones necesarias.
6. Reposicionar las diluciones celulares necesarias en nuevos recipientes para cultivo e incubar a 37 ° C con 5% de CO₂.
7. Observar los cultivos para asegurar que las células se pegan nuevamente al sustrato (signo de vitalidad).



Fotografías de Microscopía de Contraste de Fases de Células CHO en cultivo a bajo aumento y a gran magnificación.

MATERIAL NECESARIO:

- Cultivo confluyente de células CHO.
- Medio de cultivo RPMI suplementado con 10% suero fetal bovino estéril y Gentamicina (50 µg/ml) como antibiótico de amplio espectro para evitar contaminaciones bacterianas.
- Pipetas de 2,5 y 10 ml estériles.
- Solución de tripsina estéril.
- PBS estéril.
- Frascos de cultivo estériles.
- Recipiente de descarte estéril con desinfectantes.
- Cámara de Neubauer.
- Microscopio invertido.

Referencias:

1. Freshney, R. I., (1994). **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**, (3rd edition); Wiley-Liss, New York, page 153-157.
2. McAteer, J.A. and Douglas, W.H. J. (1979). **Monolayer Cell Culture Techniques Techniques**. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 58: Cell Culture. W. B. Jakoby and I. H. Pastan, Eds. Academic Press, New York, page 132 - 140.

CUESTIONARIO DE INTEGRACIÓN:

- ¿Cuales son las condiciones básicas para lograr un cultivo celular continuo?
- ¿Por qué es tan importante la morfología celular a la hora de realizar subcultivos?
- ¿Porqué se necesitan enzimas como la tripsina para poder realizar un subcultivo?
- Si un medio de cultivo para eucariotas contiene Suero Fetal Bovino y vitaminas, como así también antibióticos, ¿Cuál es el método más conveniente para la esterilización del mismo?

ESTERILIZACIÓN EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR

INTRODUCCIÓN:

La técnica de cultivo artificial de células (tanto procariotas como eucariotas), requiere que las condiciones tanto ambientales como de los instrumentos a utilizar garanticen la asepsia necesaria para que solo se de lugar al crecimiento de la célula de interés.

El hecho de que existan distintos tipos de gérmenes en el medio ambiente, crea grandes dificultades en los estudios de biología celular, cuando es necesario obtener las especies microbianas en estado de pureza, ya que tanto el instrumental como los medios de cultivo son invadidos con suma facilidad por los microbios del medio ambiente.

Debido a este problema, se han desarrollado un grupo de procedimientos que tienen como objetivo la destrucción de todas las formas vivas que existan sobre los objetos o sustancias que se desean libres de ellas (asepsia), a este conjunto de técnicas y procedimientos se le denomina **esterilización**.

LA ESTERILIZACIÓN

El proceso de esterilización comprende todos los procedimientos físicos, químicos o mecánicos que se llevan a cabo para la destrucción, inactivación o retención de gérmenes en general o organismos patógenos en particular. Gracias a estos procedimientos, se obtienen materiales de laboratorio aptos para investigación o diagnóstico, como así también elementos quirúrgicos que alcanzan un estado de asepsia que evita la contaminación durante las intervenciones.

MÉTODOS FÍSICOS:

Calor

La utilización de este método y la eficacia del mismo depende de dos factores muy importantes: el tiempo de exposición del material y la temperatura empleada durante el proceso. Todos los microorganismos son susceptibles, en mayor o menor medida, a la acción del calor. El calor conduce a la desnaturalización de proteínas, fusión y desorganización de las membranas y/o procesos oxidantes que son irreversibles en los microorganismos.

a. Fuego Directo: Este procedimiento consiste en la eliminación de toda forma de vida por exposición directa del objeto que se desea esterilizar a la llama de un mechero de Bunsen. Cuando éste es de metal se expone el área a esterilizar hasta que se ponga al rojo vivo (asas de cultivo; algunas agujas, etc.). Si es de vidrio se deja un tiempo prudencial, procurando que la llama llegue a todos lados. Antes de utilizar el objeto esterilizado es necesario dejarlo enfriar en un sitio aséptico. Este procedimiento tiene limitaciones debido a que el mismo conlleva el deterioro de los objetos y si son de gran volumen, la esterilización nunca es totalmente perfecta.

b. Calor Seco: El calor seco produce deshidratación celular, lo cual es tóxico debido a los altos niveles de electrolitos que se encuentran en las células y fusión de membranas, residuos que quedan adheridos al objeto estéril. Estos efectos se deben a la transferencia de calor desde los materiales a los microorganismos que están en contacto con éstos.

Este procedimiento sigue siendo rutinario en los laboratorios donde se utiliza para la esterilización de placas de Petri de vidrio y pipeteros (tubos metálicos para la esterilización de pipetas de vidrio). La acción destructiva del calor sobre proteínas y lípidos componentes o nutrientes de los microorganismos, requiere mayor temperatura cuando el material está seco o la actividad de agua del medio es baja.

Estufas: Para esterilizar por intermedio del aire caliente es necesario colocar los objetos en ESTUFAS, donde se lleva el aire de su interior a una temperatura entre 150° y 190° C. En la actualidad la mayoría de las estufas de esterilización o de cultivo se termorregulan por medio de un termostato hidráulico que consiste en una ampolla metálica con gas en su interior, hermética, unida por medio de un capilar de metal a un tambor que varía su volumen cuando aumenta la temperatura. Este tambor está en contacto con una llave interruptora, de manera que si el gas interior del tambor se dilata por el calor, la llave a la que está unido interrumpe el fluido eléctrico a la resistencia, manteniendo así la temperatura de la cámara.

Ventajas del calor seco:

- No es corrosivo para metales e instrumentos.
- Permite la esterilización de sustancias en polvo y no acuosas, y de sustancias viscosas no volátiles.

Desventajas del calor seco:

- El tiempo requerido para el proceso de esterilización es mayor respecto al calor húmedo, debido a la baja penetración del calor.

c. Calor Húmedo:

El calor húmedo como agente esterilizador produce desnaturalización y coagulación de proteínas. Estos efectos se deben principalmente a dos razones:

- El agua es una especie química muy reactiva y muchas estructuras biológicas son producidas por reacciones que eliminan agua.
- El vapor de agua posee un coeficiente de transferencia de calor mucho más elevado que el aire. Por lo que el tiempo de exposición necesario para la eliminación de cualquier forma de vida es menor comparado con el necesario cuando se emplea calor seco

Autoclave

Se realiza la esterilización por el vapor de agua a presión (combina temperatura y presión). Esteriliza a 121° C a una atmósfera de presión (condiciones que pueden variar) y se deja el material durante 20 a 30 minutos.

Equipo:

Consta de una caldera de cobre, sostenida por una camisa externa metálica, que en la parte inferior recibe calor por combustión de gas o por una resistencia eléctrica. La caldera se cierra en la parte superior por una tapa de bronce sujeta firmemente por

bulones, mariposas o charnelas. Esta tapa posee tres orificios, uno para el manómetro, otro para el escape de vapor en forma de robinete (también se lo conoce como espita) y el tercero, para una válvula de seguridad que funciona por contrapeso o a resorte.

Tiempos de esterilización en autoclave:

El éxito del proceso de esterilización utilizando una autoclave dependerá del tiempo, temperatura y presión usados durante el mismo. Generalmente los datos presión y temperatura son fijados, y el único factor que se varía es el tiempo. Los materiales necesitan diferentes tiempos de esterilización dependiendo de su textura, porosidad, y otras características propias de cada material. Por ejemplo:

d- Tindalización:

Esta variante se basa en el principio de Tyndall donde se da lugar a la esterilización por acción discontinua del vapor de agua, Las bacterias que resisten una sesión de calefacción, hecha en determinadas condiciones, pueden ser destruidas cuando la misma operación se repite con intervalos separados y en varias sesiones. Se efectúa por medio de la autoclave de Chamberland, dejando abierta la válvula de escape, o sea funcionando a la presión normal. Puede también realizarse a temperaturas más bajas, 56° u 80° C para evitar la descomposición de las sustancias a esterilizar, por las temperaturas elevadas.

Ventajas del calor húmedo:

- Rápido calentamiento y penetración
- Destrucción de bacterias y esporas en corto tiempo
- No deja residuos tóxicos
- Hay un bajo deterioro del material expuesto

Desventajas:

- No permite esterilizar soluciones que formen emulsiones con el agua
- Es corrosivo sobre ciertos instrumentos metálicos.

Filtración:

Cuando se necesita esterilizar sustancias o soluciones que no resisten la acción del calor sin sufrir descomposición total o parcial debe de aplicarse la técnica de esterilización por filtración, la cual puede aplicarse por medio de presión o aspiración. Este procedimiento es aplicable a la esterilización de líquidos y gases, especialmente los primeros. Esta técnica se basa en el pasaje de líquidos a través de sustancias porosas que detienen a los microbios. En la actualidad se disponen de membranas filtrantes con poros de un tamaño determinado. El tamaño del poro dependerá del uso al que se va a someter la muestra. Los filtros que se utilizan no retienen virus ni micoplasmas, estos últimos están en el límite de separación según el diámetro de poro que se utilice. Existen tres tipos básicos de filtros:

-Filtros profundos o Filtros de profundidad: Consisten de un material fibroso o granular prensado, plegado, activado, o pegado dentro de los canales de flujo. En este tipo de filtros la retención de las partículas se produce por una combinación de absorción y de retención mecánica en la matriz.

-Membranas filtrantes: Tienen una estructura continua, y la retención se debe principalmente al tamaño de la partícula. Partículas más pequeñas al tamaño del poro quedan retenidas en la matriz del filtro debido a efectos electrostáticos.

-Filtros de huella de nucleación (Nucleoporo): Son películas muy delgadas de policarbonato que son perforadas por un tratamiento conjunto con radiación y sustancias químicas. Son filtros con orificios muy regulares que atraviesan la membrana verticalmente. Funcionan como tamices, evitando el paso de toda partícula con un tamaño mayor al del poro.

MÉTODOS QUÍMICOS

Estos métodos provocan la pérdida de viabilidad de los microorganismos.

AGENTES QUÍMICOS

La Iodopovidona (Pervinox), el Cloruro de Benzalconio (sal de amonio cuaternario o Cloruro de Zefirano) son ejemplos de antisépticos útiles para desinfectar manos y superficies. Cuando la superficie es resistente, el mejor agente biocida es el Hipoclorito de Sodio (agua lavandina).

ESTUFAS DE ESTERILIZACIÓN POR ÓXIDO DE ETILENO

Mediante este procedimiento se logra la destrucción de todos los organismos y microorganismos conocidos, incluso esporas y virus. Esteriliza sin deterioro artículos de goma, plástico, metal, madera, lana, piel, papel, productos farmacéuticos. Esterilización con embalajes: a este gas son permeables sustancias como polietileno, nylon, celofán, etc. Todos los artículos deberán airearse por 6 h después de una esterilización.

El Oxido de etileno es un agente alquilante que se une a compuestos con hidrógenos lábiles como los que tienen grupos carboxilos, amino, sulfhidrilos, hidroxilos, etc. Es utilizado en la esterilización gaseosa, generalmente en la industria farmacéutica. Sirve para esterilizar material termosensibles como el descartable (goma, plástico, papel, etc.), equipos electrónicos, bombas cardiorrespiratorias, metal, etc. Es muy peligroso por ser altamente inflamable y explosivo, y además **cancerígeno**.

Con aldehídos: Son agentes alquilantes que actúan sobre las proteínas, provocando una modificación irreversible en enzimas e inhiben la actividad enzimática. Estos compuestos aseguran la destrucción de esporas.

Glutaraldehído: Se prepara una solución alcalina al 2% y se sumerge el material a esterilizar durante un lapso de 20 a 30 min, y luego un enjuague de 10 min.

Este método tiene la ventaja de ser rápido y ser el único esterilizante efectivo frío. Puede esterilizar plástico, goma, vidrio, metal, etc.

Antisépticos	Alcoholes
	Iodo
	Agentes catiónicos, aniónicos y anfóteros
	Órgano-Mercuriales
	Colorantes
Desinfectantes y/o Esterilizantes	Cloro y Compuestos clorados
	Aldehídos
	Oxido de Etileno
	Compuestos Fenólicos
	Ácidos y Alcalis

Formaldehído: Se utilizan las pastillas de paraformaldehido, las cuales pueden disponerse en el fondo de una caja envueltas en gasa o algodón, que después pueden ser expuesta al calor para que se de lugar a una rápida esterilización (acción del gas formaldehído). Estas pastillas también pueden ser usadas en Estufas de Formol, llamadas también de formalina, las cuales son cajas de doble fondo, en cuya base se colocan las pastillas y se calienta hasta los 60° C y en ellas se pueden esterilizar materiales de látex, goma, plásticos, etc. Las pastillas de formalina a temperatura ambiente esterilizan en un periodo de 36 h, aproximadamente.

RADIACIÓN:

Su acción esterilizante depende de:

- El tipo de radiación
- El tiempo de exposición
- La dosis empleada

Radiaciones Ionizantes: Estas radiaciones dan lugar a la producción de iones y radicales libres que alteran las bases de los ácidos nucleicos, estructuras proteicas y lipídicas, y componentes esenciales para la viabilidad de los microorganismos. Se caracterizan por tener gran penetrabilidad y se las utiliza para esterilizar materiales termolábiles (termosensibles) como jeringas descartables, sondas, etc. Debido al bajo costo que estas demandan, son muy utilizadas a nivel industrial.

Rayos Ultravioleta: Afectan a las moléculas de DNA de los microorganismos. Son escasamente penetrantes y se utilizan para superficies, y en la esterilización de quirófanos.

Rayos Gamma: Su empleo esta basado en los conocimientos sobre la energía atómica. Este tipo de esterilización se aplica a productos o materiales termolábiles y de gran importancia en el campo industrial. Puede esterilizar antibióticos, vacunas, alimentos, etc.

CONTROL DE CALIDAD

Luego de realizarse la esterilización, los instrumentos, sustancias u objetos sometidos a ella pueden considerarse libre de microorganismos formas de resistencia de los mismos, aunque esto es cierto, deben llevarse a cabo controles de calidad del proceso realizado.

Indicadores: Cintas comerciales que se colocan en el paquete o caja a esterilizar, que viran de color, cuando se alcanzan las temperaturas adecuadas para la esterilización. Estos son llamados "testigos de esterilización" preparadas por sustancias químicas.

Bibliografía consultada:

-Carlos M. Barzizza – Microbiología – Tomo 1 y 2– Librería Hachette, Bs. As, 1960.

-Microbiología de ZINSSER. Revisada por Smith y Martín. UTHEA, 1970.

-Biología de los microorganismos. Brock, Madigan, Martinko, Parker.Ed. Pearson – Prentice Hall. 8° Edición.

TINCIONES Y MICROSCOPIA EN BIOLOGIA CELULAR

INTRODUCCIÓN:

En su mayor parte los microorganismos (bacterias, parásitos, hongos) y muchas otras células son demasiado pequeños para poder ser observados a simple vista. A veces el tamaño de algunas células (como las bacterias) es tal que resultan difíciles de ver con el microscopio óptico. La principal dificultad es la falta de contraste entre la célula y el medio que la rodea, y la manera más simple de aumentar el contraste es la utilización de colorantes. Estos resultan de gran utilidad ya que pueden emplearse para distinguir entre tipos diferentes de células o para revelar la presencia de determinados constituyentes celulares, tales como flagelos, vesículas, gránulos, paredes celulares, organelas, etc. La mayoría de los colorantes son compuestos orgánicos que tienen alguna afinidad específica por los materiales celulares.

La mayoría de los colorantes son compuestos orgánicos que tienen alguna afinidad específica por los materiales celulares. Muchos colorantes utilizados con frecuencia son moléculas cargadas positivamente (cationes) y se combinan con intensidad con los constituyentes celulares cargados negativamente, tales como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos. Ejemplos de colorantes catiónicos son el azul de metileno, el cristal violeta y la safranina. Otros colorantes son moléculas cargadas negativamente (aniones) y se combinan con los constituyentes celulares cargados positivamente, tales como muchas proteínas. Esos colorantes incluyen la eosina, la fucsina ácida y el rojo Congo. Otro grupo de colorantes son sustancias liposolubles; los colorantes de este grupo se combinan con los materiales lipídicos de la célula, usándose a menudo para revelar la localización de depósitos de grasa. Un ejemplo de colorante liposoluble es el negro Sudán.

ACTIVIDAD PRÁCTICA

-OBSERVACIÓN DE LAS CÉLULAS EPITELIALES DE LA BOCA

En ésta actividad prepararás una muestra de las células de epiteliales de tu mucosa bucal, usando Azul de Metileno, esto ayudará a visualizar el material nuclear a través del microscopio.

Coloque en un portaobjeto una pequeña gota de Azul de Metileno (aproximadamente 10 uL). Cuidadosamente con la ayuda de un escarbadiantes frote el tejido epitelial de la mejilla dentro de tu boca. Coloque el material extraído sobre la gota del colorante y cubra con un cubreobjeto. Observe al microscopio.

-COLORACION DE MAY GRÜNWARD-GIEMSA

La tinción de May Grünwald-Giemsa es una técnica de tinción que se utiliza principalmente para la coloración de muestra de frotis sanguíneos o muestras de médula ósea. Esta técnica es muy utilizada en los laboratorios clínicos de hematología ya que resulta especialmente útil para la demostración de alteraciones en el número, proporción y morfología de las células sanguíneas. También puede ser adaptada para su utilización como una técnica de tinción clásica para cortes histológicos.

Este colorante contiene dos soluciones:

- La solución de May-Grünwald, que contiene el colorante aniónico eosina y el colorante catiónico azul de metileno ambos disueltos en metanol
- La solución de Giemsa, que contiene eosina, azul de metileno y una serie de productos de la oxidación de este último tales como el azur A, el azur B, el violeta de metilo y el azul de metileno.

Los componentes celulares de naturaleza aniónica (ácida) se unen selectivamente a los tintes catiónicos tiñéndose en variados tonos de azul. Estos componentes se los denomina basófilos (ADN, ARN, Ribosomas, citoplasma). Los componentes celulares de naturaleza catiónica (básicos) se unen selectivamente al tinte ácido eosina, tiñéndose en variados tonos de naranja y rojo. A estos elementos se los denomina acidófilos. Este es el caso de la hemoglobina y de las proteínas contenidas en gránulos. Los componentes celulares que tienen afinidad por ambos tipos de colorantes se denominan neutrófilos y se tiñen en variados tonos de violeta.

Coloque sobre el frotis sanguíneos solución de May Grünwald dejar actuar 3 min. , luego agregar unas gotas de agua y dejar actuar 1 min. Lavar y colocar la solución del colorante Giemsa diluido 1/10, dejar actuar 5 min. Lavar, secar y observar al microscopio. Con ayuda del profesor identificar los diferentes componentes de la sangre.

-OBSERVACIÓN DE LA FAGOCITOSIS EN EL PROTOZOO TETRAHYMENA

Tetrahymena es un protozoario de vida libre, que se encuentra naturalmente en las aguas dulces. Su superficie aparece cubierta de cilios, con los que se mueven de forma activa y veloz. Se alimentan fagocitando partículas, lo que realizan casi siempre desde el fondo de una cavidad llamada citostoma o boca celular. También posee una o más vacuolas digestivas. En esta actividad podremos observar la acción de los cilios (los cilios también se encuentran en nuestro organismo en las vías respiratorias) y además como este protozoario captura partículas transportándolas a las diferentes vacuolas digestivas.

Ayudados por una pipeta pasteur, colocar en un tubo 1,5 cm³ de medio de cultivo conteniendo Tetrahymena. Agregar en el mismo tubo 1,5 cm³ de tinta al 1% y mezclar suavemente las dos soluciones. Tomar el tiempo. Colocar una gota de esta mezcla entre porta y cubre y observar al microscopio. Hacer lo mismo a los 15 min y a los 30 min.

TRABAJO PRÁCTICO N° 11:

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

OBJETIVOS

- Comprobar la influencia de factores tales como la concentración de enzima, temperatura y pH sobre la actividad de la enzima amilasa salival humana.
- Interpretar los resultados a partir de las gráficas construidas con los datos obtenidos.

INTRODUCCION

Los principios de la termodinámica nos permiten predecir la espontaneidad con la cual una reacción ocurre, pero no la velocidad con la que ellas transcurren.

Se ha demostrado la existencia de ciertos compuestos que tienen la propiedad de acelerar los procesos de transformación de reactivos en productos, dichas sustancias son denominadas *catalizadores*, estos actúan disminuyendo la energía de activación de la reacción. En los seres vivos las reacciones que constituyen el metabolismo celular están catalizadas por *enzimas*, sustancias que sin consumirse aumentan notablemente su velocidad.

En este tipo de catálisis, la enzima se asocia con la molécula sobre la que actúa (sustrato, S) formando un complejo enzima-sustrato(ES) a partir del cual se formara el producto P y se libera nuevamente enzima E sin modificaciones:

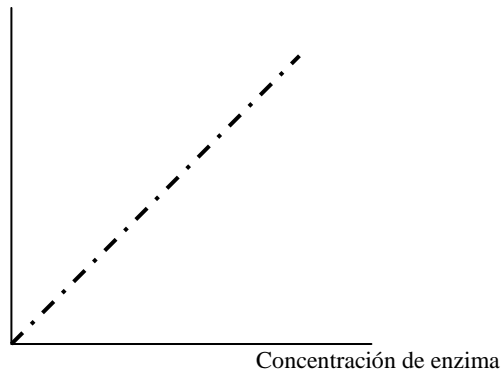


Por lo tanto, la actividad de una enzima puede determinarse midiendo la cantidad de producto formado, o de sustrato consumido a un tiempo dado. A su vez, la actividad de una enzima depende, entre otros factores, de la estructura molecular de la enzima.

Existen diferentes factores que pueden modificar la actividad de una enzima, por ello, es fundamental mantener constante la composición del medio, la temperatura y definir precisamente las condiciones en las que se realiza el ensayo enzimático.

A. Concentración de la enzima: Bajo ciertas condiciones experimentales la velocidad inicial de la reacción varía linealmente con la concentración de enzima y puede ser utilizada para cuantificar la enzima presente.

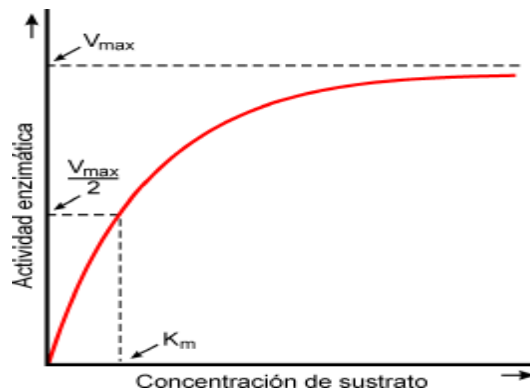
Actividad enzimática



Esta relación se mantendrá si la reacción no se prolonga más allá del tiempo necesario para consumir 5% del sustrato originalmente presente.

B. Concentración del sustrato: Cuando se quiere determinar la actividad enzimática manteniendo constante la concentración de enzima y las otras condiciones de reacción, excepto concentración del sustrato y se grafican los resultados en un sistema de coordenadas, se obtiene una hipérbola.

Al comienzo, la actividad aumenta rápidamente con el incremento de concentración de sustrato (S), pero a concentraciones más elevadas de la misma, la velocidad crece más lentamente, y tiende a alcanzar un máximo. Cuando la concentración de sustrato es baja (gran parte de las moléculas de enzima se encuentra libre), la actividad crece en forma lineal con la concentración de sustrato, manteniendo una cinética de primer orden. A medida que aumenta la concentración de sustrato, los incrementos de velocidad son cada vez menores y se llega a una situación donde la actividad no aumenta por más que se incremente la concentración de sustrato (momento en que prácticamente todas las moléculas de enzima están ocupadas por sustrato, es decir, la enzima se ha “saturado”). En este momento, la curva tiende a ser horizontal y corresponde a la velocidad máxima (Si el aumento de concentración de sustrato continúa y excede las concentraciones de enzima, se alcanza un *estado estacionario* en el cual la velocidad de reacción no varía) que se comporta con una cinética de orden cero.



En la Fig. se representa el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente. Aunque no con todas las enzimas se observa dicho comportamiento (sería el caso de enzimas alostéricas), es el caso más habitual y sencillo; las enzimas que se ajustan a dicho modelo se conocen con el nombre de enzimas michaelianas.

La velocidad máxima (V_{\max}): solo se alcanza a concentraciones infinitas de sustrato.

Determinación de la V_0 : La velocidad inicial de una reacción enzimática para una determinada cantidad de enzima, depende de la concentración inicial de sustrato y se calcula como la pendiente de la parte lineal de la curva [Producto]/tiempo (en el tiempo cero).

K_m : corresponde a la concentración de sustrato con la cual la velocidad de reacción alcanza un valor igual a la mitad de la máxima. En condiciones definidas de PH, temperatura, etc., K_m tiene un valor fijo para cada enzima y sirve para caracterizarla.

La hipérbola de saturación de una enzima por su sustrato puede expresarse con la ecuación deducida por Michaelis-Menten:

(1)

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

V: velocidad inicial con concentración de sustrato igual a [S]
 V_{\max} : velocidad máxima
 K_m : constante de Michaelis para el sustrato.

A partir de esta ecuación se deduce que cuando [S] está por debajo del valor de K_m , la velocidad de reacción depende de la concentración de sustrato (porción inicial de la curva en la cual la reacción es de primer orden respecto a [S]).

Cuando la [S] es muy superior al valor de K_m , la velocidad inicial es prácticamente máxima (porción final de la curva, reacción de orden cero).

Si [S] es igual al valor de K_m reemplazando en la ecuación (1):

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + [S]} = \frac{V_{\max} [S]}{2[S]} = \frac{V_{\max}}{2}$$

Es decir, cuando la concentración de sustrato es igual a K_m , la velocidad de reacción es igual a la mitad de la máxima.

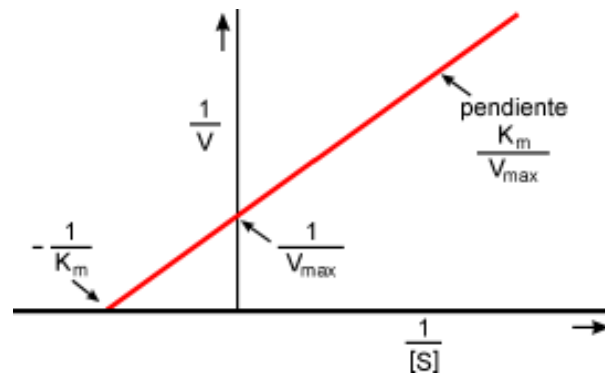
Si tomamos la inversa de la ecuación (1):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} [S]} =$$

(2)

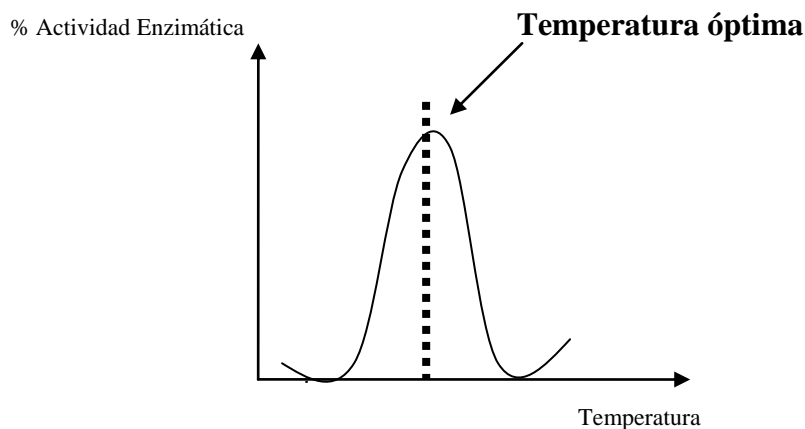
$$= \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Esta ecuación transformada se denomina Lineweaver-Burk y corresponde a la ecuación de una recta.



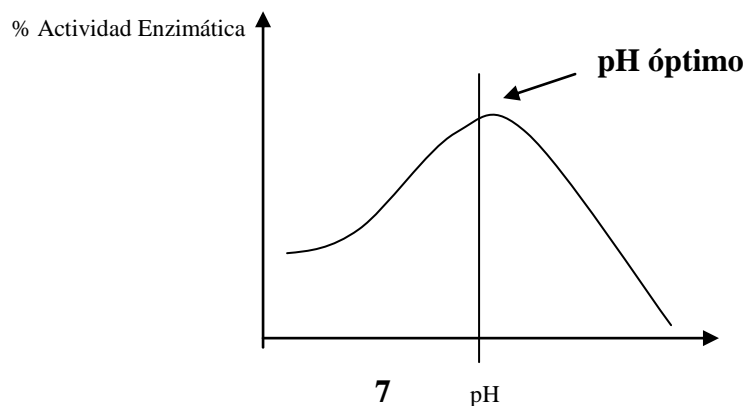
La representación de la inversa de la velocidad inicial ($1/v$) en función de la inversa de la concentración de sustrato $[S]$ da una recta. La pendiente de esta recta es iguala K_m/V_{max} , la intersección con el eje vertical corresponde a $1/v$.

C. Temperatura: Cuando la temperatura asciende, aumenta la velocidad de una reacción química como consecuencia del incremento en la energía cinética. Si se mantienen constantes las concentraciones de enzima, sustrato y otros factores del medio de reacción y se determina actividad a temperaturas crecientes y se grafica en un sistema de coordenadas, se obtiene la siguiente grafica:



Si bien la actividad enzimática aumenta con la temperatura, se llega aún valor máximo, correspondiente a la temperatura óptima. Por encima de este optimo, la actividad cae rápidamente, ya que la acción del calor sobre la estructura molecular produce la desnaturalización de la enzima.

D. pH: Si se mide actividad enzimática a diferentes pH, manteniendo constantes todos los otros factores, se puede demostrar el efecto de la concentración de hidrogeniones, como se observa en la siguiente figura:



Para la mayoría de las enzimas, la actividad óptima se encuentra entre pH 6 y 8, por debajo o por encima de esos valores, la velocidad de reacción cae más o menos rápidamente. Los cambios de pH del medio afectan el estado de ionización de grupos funcionales en la molécula de enzima y también en el sustrato. Para la formación del complejo enzima-sustrato es necesario mantener una adecuada distribución de cargas en ambas moléculas. El pH óptimo es aquel en el cual el estado de disociación de los grupos esenciales es el más apropiado para interactuar en el complejo ES. Por el contrario, pH extremos provocan desnaturalización de la molécula enzimática llevando a su inactivación.

SIGNIFICACIÓN CLÍNICA

En bioquímica tiene interés la medición de la concentración de enzimas en algunos líquidos biológicos como marcadores de alteraciones en la funcionalidad diversos órganos y tejidos.

La amilasa producida en el páncreas exócrino y en las glándulas salivales, escinde los enlaces α 1-4 glucosídicos de los polisacáridos almidón y glucógeno, pero no hidrolizan aquellos situados antes o dos subunidades después de su punto de ramificación.

Normalmente pequeñas cantidades de amilasa originadas principalmente en el páncreas y glándulas salivales están presentes en sangre (hasta 120 Unidades Amilolíticas / dl). Esta enzima se puede encontrar elevada en plasma (hiperamilasemia) y orina (amilasuria) de pacientes con pancreatitis. También es posible encontrar valores aumentados en cualquier caso de abdomen agudo, parotiditis bacterianas y paperas. Por lo tanto la determinación de la actividad de esta enzima en muestras biológicas constituye un valioso medio de diagnóstico en numerosas patologías.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Existen métodos que nos permiten medir tanto la concentración de sustrato consumido como de producto formado en las soluciones en las que se ha dejado actuar una enzima durante un tiempo determinado. En este caso podremos reconocer la acción de la amilasa salival sobre el almidón, estudiando el sustrato que no ha sido hidrolizado, lo cual se hace evidente por la disminución de la formación del complejo almidón-yodo.

DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

MATERIALES

Sustrato de la enzima: Solución de Almidón

Enzima: Amilasa salival

Tubos de ensayo

Gradillas

Pipetas

Baño termostatzado

Espectrofotómetro.

Papel indicador de pH

Lugol

PROCEDIMIENTOS

- Recolección de la saliva.

Un voluntario de cada grupo junta la saliva (2-3 ml) en un vaso de precipitado pequeño. Se mide el pH de la misma con papel indicador, anotar el valor.

- Dilución óptima y tiempo de referencia.

Enzima: Diluir la saliva 20 veces con agua destilada (0.5 ml de saliva + 9.5 ml de agua destilada) en un tubo de ensayo. Tapar el tubo con tapón de goma y mezclar por inversión varias veces (No agitar).

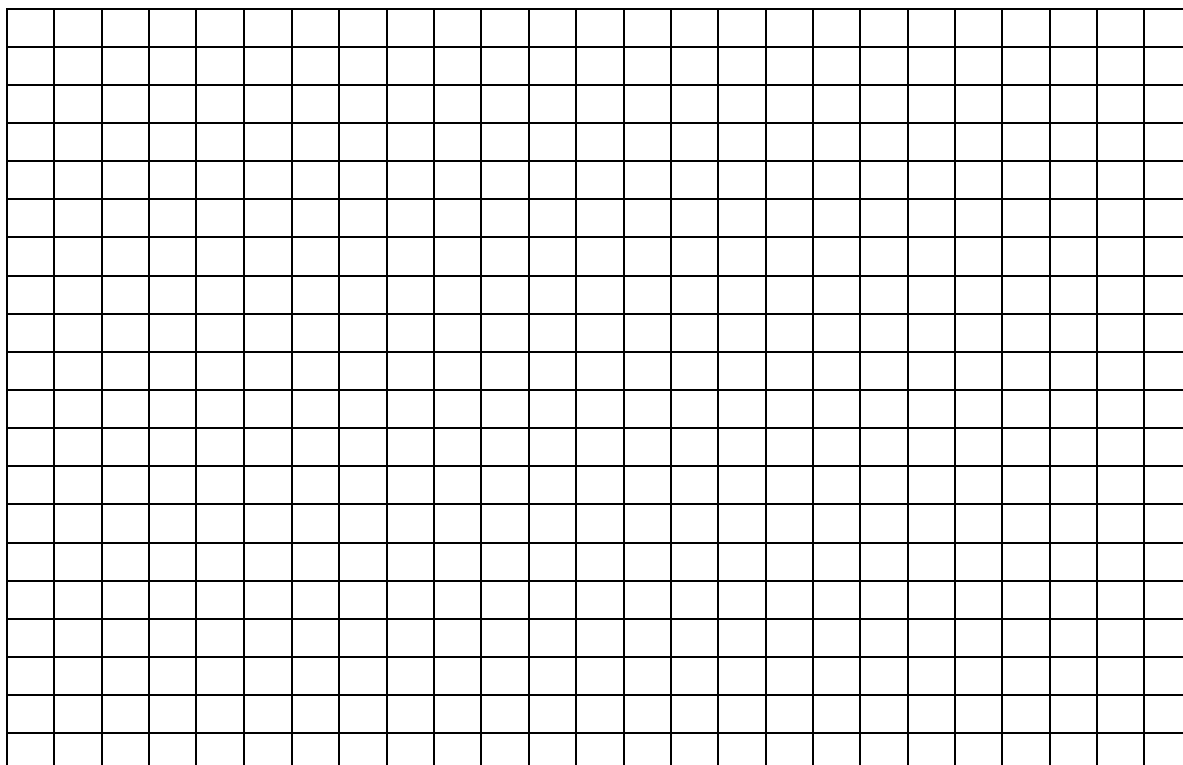
A) Determinación de la actividad enzimática en función de la temperatura.

- 1) Tomar cuatro tubos de ensayo y colocar 2 ml de solución de almidón al 1 %.
- 2) Tomar 3 tubos y colocar aproximadamente 2 ml de la saliva diluida.
- 3) Poner un tubo con la saliva y un tubo con almidón en hielo (0° C), otros a 37° C y los últimos a 70° C. Esperar 10 minutos a que tomen temperatura deseada.
- 4) Trasvasar 1ml de saliva diluida al tubo con el almidón. Mezclar. (utilizar la solución de saliva que estaba incubada a la misma temperatura)
- 5) Dejar transcurrir la reacción durante 5 minutos.
- 6) Interrumpir la reacción, agregar cinco gotas de la solución de yodo.
- 7) El tubo número cuatro se utilizara como blanco por lo cual no deberá agregarse saliva

Tubo	Color observado
1	
2	
3	
4	

- 8) Realice la representación grafica de la actividad enzimática en función de la temperatura. Marque la temperatura óptima de la amilasa.

Grafica de Actividad Enzimática vs Temperatura:



Comentarios:

.....
.....
.....
.....
.....

B) Determinación de la actividad enzimática en función del pH.

1) Colocar en los tubos los siguientes reactivos en el siguiente orden: agua y almidón. Ajustar el pH de acuerdo con la tabla y luego agregar la saliva.

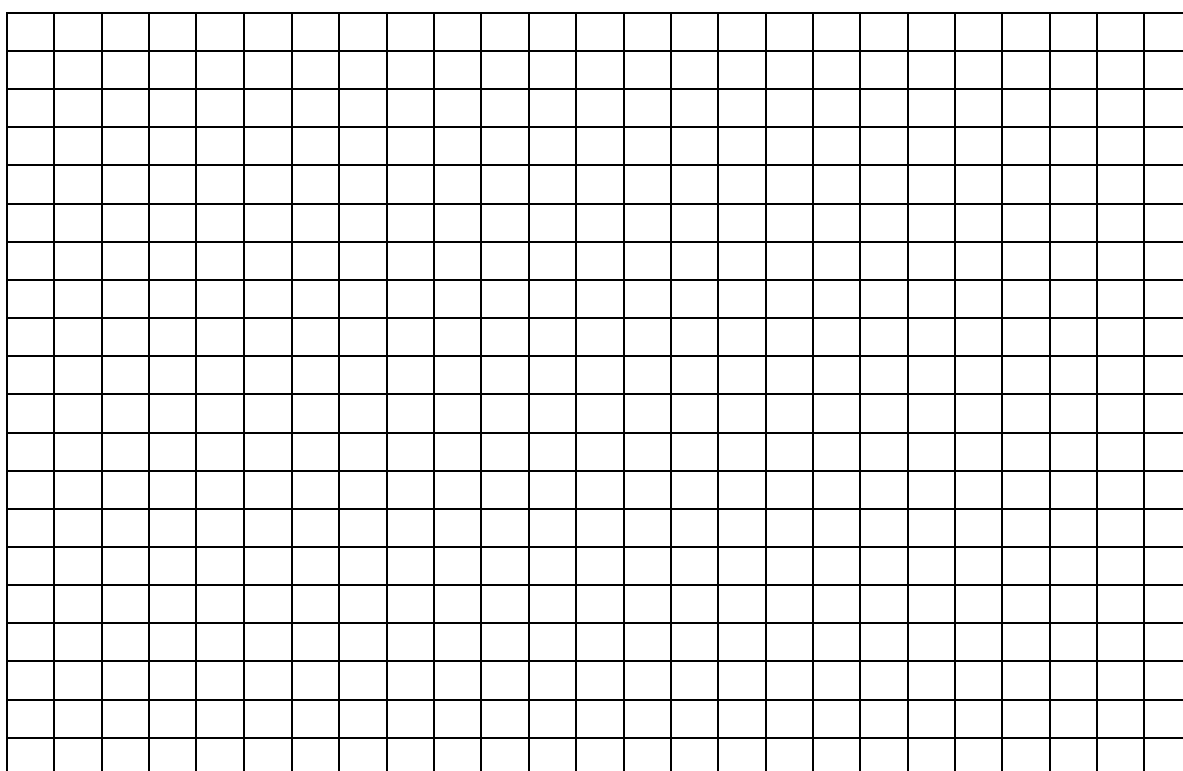
Tubos	Soluc. de almidón	Agua	Saliva
1	1 ml pH 6,8	0.5 ml	0.5 ml
2	1 ml pH 3	0.5 ml	0.5 ml
3	1 ml pH 8	0.5 ml	0.5 ml
4	1 ml pH 10	0.5 ml	0.5 ml

- 2) Dejar transcurrir la reacción durante 5 minutos.
- 3) Interrumpir la reacción, agregar cinco gotas de la solución de yodo.

Tubo	Color observado
1	
2	
3	
4	

5) Realice la representación grafica de la actividad enzimática en función del pH. Marque el pH óptimo de la enzima.

Grafica de Actividad Enzimática vs pH:



Comentarios:

.....

.....

.....

.....

C) Determinación de la actividad enzimática en función de la concentración de enzima.

- 1) Colocar en los tubos los siguientes reactivos:

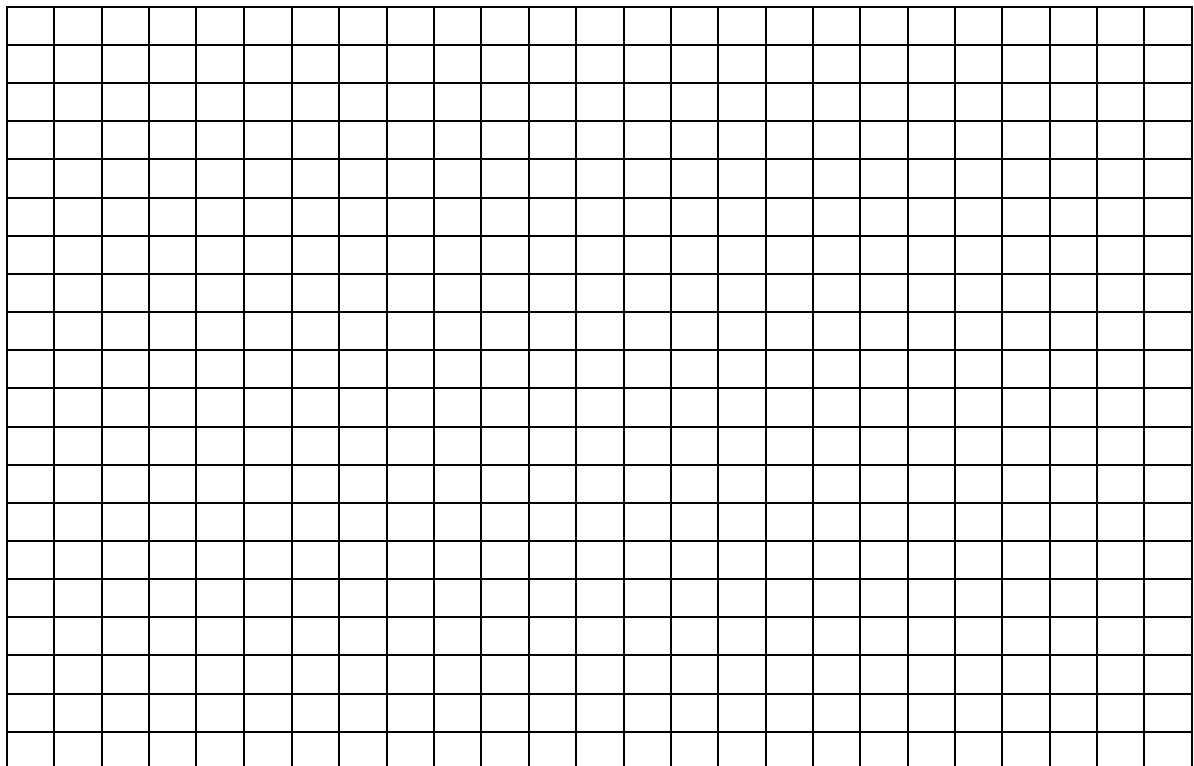
Tubo	1	2	3	4	5
Saliva	0 ml	10 ul	50 ul	250 ul	500 ul
Almidón	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Agua	4 ml	4 ml	4 ml	3,75 ml	3,5 ml

2) Incubar los tubos 5 minutos a 37° C y agregar a cada tubo cinco gotas de yodo.

Tubo	Color observado
1	
2	
3	
4	
5	

3) Realice la representación grafica de la actividad enzimática en función de la concentración de enzima.

Grafica de Actividad Enzimática vs concentración de enzima:



Comentarios:

.....

.....

.....

BIBLIOGRAFÍA

1. Química Biológica; Antonio Blanco; Octava Edición; Editorial El Ateneo; 2006.
2. DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Prácticas generales de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. España. Pagina web: <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/practicasgenerales.htm>
3. Nelson D., Cox M. *Principles of Biochemistry* – 3^a Ed. Worth, 2000.
4. Murray, Granner, Mayes, Rodwell. *Harper, Bioquímica ilustrada* - 16^a Ed. Manual Moderno, 2004.
5. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. *Biología Molecular de la célula*- 4^a Ed Garland Science,2002.