

ADN, una ventana para admirar el código de la vida

Clave de registro: CIN2016A10096

Instituto Cultural Copán

Autores:

Camarena Camacho Mario Andrés

Cervantes Rodríguez Silvana

Pinto Gutiérrez Rubén

Velázquez Ceniceros Ximena

Asesores:

Ing. Química Martha Pérez Fera

Dra. María Elizabeth Alanís Maldonado

Área de conocimiento: Química y de la Salud

Disciplina: Biología

Tipo de investigación: Teórico-Experimental

Naucalpan de Juárez, Edo. de México

18 de febrero de 2016

Resumen

En este proyecto se logró como primer objetivo la extracción y la visualización del ADN de chícharos, el cual tenía un aspecto similar a una telaraña, sin embargo, por falta de equipo más sofisticado, no fue posible observar la estructura de doble hélice. En la segunda fase de experimentos, correspondientes a la visualización de las células de la raíz de cebolla, logramos observar el ADN condensado en forma de cromosomas, específicamente en metafase, haciendo uso de colchicina. Con el objetivo de observar el ADN en células animales, se propuso un nuevo protocolo, diseñado por los integrantes del presente proyecto, desafortunadamente la ruptura de las células no se concretó. Sin embargo, para no omitir la visualización del ADN en células animales, se llevó a cabo otro protocolo, con el cual se logró observar la presencia de ADN empaquetado en tejido epitelial bucal.

Este proyecto nos encaminó a seguir investigando, ya que fue una ventana para admirar el código de la vida.

Palabras clave: ADN, cromosomas, doble hélice, cromátide, célula.

Summary

This project is managed primarily to the extraction and visualization of DNA from peas, which had a similar appearance to a spider web, however, for lack of more sophisticated equipment, it was not possible to observe the double helix structure. In the second phase of experiments corresponding to the display cells of the root of onions, we observe the condensed DNA as chromosome metaphase specifically, using colchicine. In order to observe the DNA in animal cells, a new protocol designed by the members of this project, unfortunately the disruption of the cells did not materialize was proposed. However, not skip viewing the DNA in animal cells was carried out another protocol, with which it was possible to observe the presence of DNA packaged in oral epithelial tissue. This project directed us to investigate further, as it was a window to admire the code of life.

Keywords: DNA, chromosome, double helix, chromatide, cell.

Introducción:

Planteamiento del problema

¿Es posible extraer el ADN de una célula y poder observarlo?, de ser así ¿El producto de esta extracción adquirirá una forma semejante a una doble hélice?

Hipótesis o conjeturas

Si utilizamos materiales de fácil acceso en el laboratorio escolar para la extracción el ADN de una célula vegetal, entonces podremos observar su estructura de doble hélice.

Si se utilizan protocolos establecidos y uno propio, se podrá observar el ADN en forma de cromosomas en las células animales y vegetales.

Justificación y sustento teórico

La identificación de la estructura tridimensional del ADN está considerada el descubrimiento más importante del siglo XX, en el campo de la Biología. Históricamente el ADN fue aislado por primera vez por Friedrich Miescher en el año 1869, este científico, al estudiar la composición química de los leucocitos, descubrió una sustancia rica en fosfato, la cual no presentaba las características de un lípido, ni las de una proteína. A esta nueva molécula le dio el nombre de nucleína.

En los años 20 Phoebus Levene determinó la existencia del ADN y ARN, así como los componentes estructurales que los conforman: las 5 bases nitrogenadas, Timina, Citosina y Uracilo (pirimidinas), Guanina y Adenina (Purinas); un azúcar (ribosa o desoxirribosa) y un grupo fosfato. Además estableció el término nucleótido (unidad básica del ADN).

Posteriormente los aportes de Griffith en 1928, los hallazgos de Avery en 1944 y los experimentos de Hershey-Chase en 1952, fue que se logró determinar que el ADN es la molécula responsable de la herencia.

En el año de 1953, Rosalind Franklin y Maurice Wilkins, llevan a cabo los primeros estudios de difracción de rayos X con la finalidad de determinar la estructura del ADN, pero no fue sino hasta 1962 que es reconocido este trabajo, cuando el bioquímico

James Watson y el biólogo Francis Crick (premio nobel de Fisiología o Medicina), retoman los estudios de Rosalind Franklin y Maurice Wilkins y proponen el modelo de la doble hélice de ADN, presentándola como un polímero tridimensional.

Actualmente, la extracción del ADN a partir de los cromosomas contenido en el núcleo de las células, es el primer paso a tomar en cuenta al estudiar a los genes, considerados “las unidades” responsables de dar identidad a los seres vivos, es decir son los encargados de definir las características morfológicas y fisiológicas propias de cada especie. Las técnicas de la secuenciación de la información genética contenida en los genes han facilitado la identificación y diagnóstico de distintos padecimientos.

Objetivo general

Demostrar que mediante procedimientos básicos es posible extraer y observar el ADN y la forma en la que se encuentran en células vegetales y animales.

Objetivo específico

- Determinar si es posible extraer el ADN de una célula vegetal y animal.
- Demostrar que se puede observar el ADN en forma de cromosoma en células animales y vegetales.

Fundamentación teórica

¿Qué es el ADN?

El ácido desoxirribonucleico (ADN), desde un punto de vista químico, es un polinucleotido formado estructuralmente por tres componentes: un azúcar (desoxirribosa), una base nitrogenada (adenina, guanina, citosina, timina) y un grupo fosfato. Es el encargado de almacenar la información genética de los organismos y es responsable de la transmisión hereditaria.

¿Cómo se da el ensamblaje del ADN y qué forma tiene?

En su ensamblaje cada uno de los grupos fosfato une el carbono de la posición 3' de un azúcar, con el carbono 5' del azúcar siguiente a lo largo del esqueleto (Figura 1). Cada uno de los pares de bases se une de manera complementaria mediante puentes de

hidrógeno, es decir, adenina con timina y guanina con citosina, permitiendo la unión de las dos cadenas con una dirección antiparalela (5' a 3' y 3' a 5').

Cada uno de el ADN dentro del núcleo de una célula no se encuentra puro sino en un compuesto llamado "cromatina".

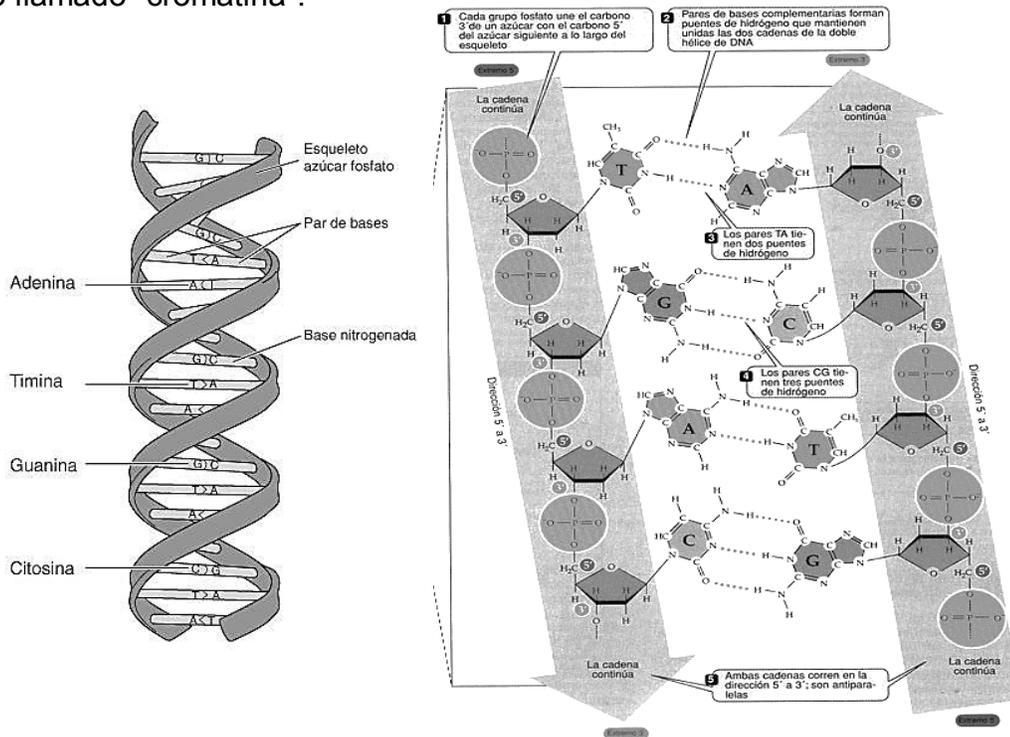


Figura 1. Estructura del ADN. Del lado izquierdo se muestra la complementariedad en que se unen cada una de las bases nitrogenadas. Del lado derecho se observa la dirección en la que se ensamblan los grupos fosfato con las azúcares (desoxirribosa) además, se esquematizan los puentes de hidrógeno mediante los cuales se unen cada una de las bases nitrogenadas.

¿En qué forma se encuentra el ADN dentro del núcleo de la célula?

El ADN se une entre sí mediante la interacción con proteínas llamadas histonas. De esta manera se van a formar octámeros de histonas, mismas que van a dar estructura a la unidad que forman la cromatina, esta unidad se conoce como "nucleosoma".

Durante su enrollamiento, las cadenas de ADN rodean al octámero de histonas dando 1 ¾ de vueltas y es sellado con la histona H1. Después la cadena de ADN acaba el ¼ de

vuelta para poder rodear al octámero de histonas 2 veces y se alarga hasta enrollarse en otro octámero de histonas formando otro nucleosoma. A un nucleosoma sellado con una histona H1 y que ha sido rodeado 2 veces por la cadena de ADN se le llama “cromatosoma” (Figura 2). La unión de cromatosomas se da por medio del ADN enlazador (*linker*) que hace una estructura semejante a unas cuentas en una cuerda “filamento”, mismas que tienen un diámetro de 10 nm (Figura 3). De la misma manera existe ADN que queda entre nucleosomas conocido como ADN enlazador, involucrado en funciones de empaquetamiento del ADN, regulación genética y muerte celular (apoptosis).

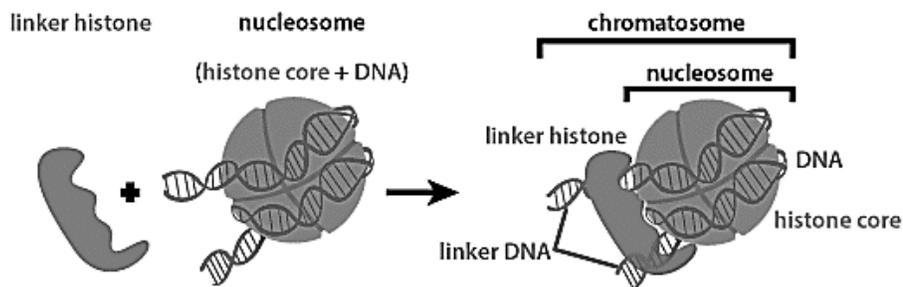


Figura 2. Esquema de la unión del ADN con las proteínas histonas y su ensamblaje en nucleosomas y posteriormente en cromatosomas. Un nucleosoma contiene 146 pares de bases

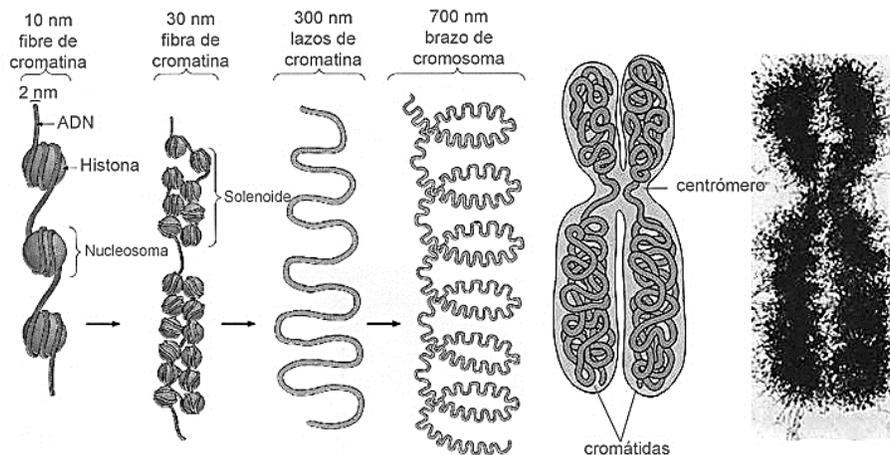


Figura 3. Representación esquemática del proceso de ensamblaje del ADN hasta formar a los cromosomas.

¿Qué es la cromatina?

La cromatina es precisamente lo que conocemos como “cromosoma” solo que no está organizado en la forma convencional con la que estamos familiarizados (forma de X), la cual únicamente se observa en la etapa de reproducción de la célula.

Existen dos tipos de cromatina:

- Eucromatina: Fracción de la cromatina que se condensa y descondensa a lo largo del ciclo de división celular y es genéticamente activa. Presenta tinción tenue con distintos colorantes.
- Heterocromatina: Fracción de la cromatina que presenta alta condensación durante el ciclo de división celular, la cual no es genéticamente activa. Presenta tinción elevada con distintos colorantes.

Porcentajes de compuestos de la cromatina:

Hablando en porcentajes de cómo está formada la cromatina, sólo un 30 % es ADN, otro 60% es un octámero de histonas, proteínas involucradas en el ensamblaje del ADN, el 10 % restante corresponde a ARN y otras proteínas de andamiaje.

Metodología de investigación

Material (Protocolo 1 – extracción de ADN)

- Licuadora
- Colador
- Vaso de precipitados 250 mL
- Probetas
- Pipetas de 10 mL
- Agitador
- Tubos de ensayo
- ½ taza de chícharos verdes



- Detergente líquido
- Enzima (ablandador de carne)
- Alcohol etílico
- Cloruro de sodio

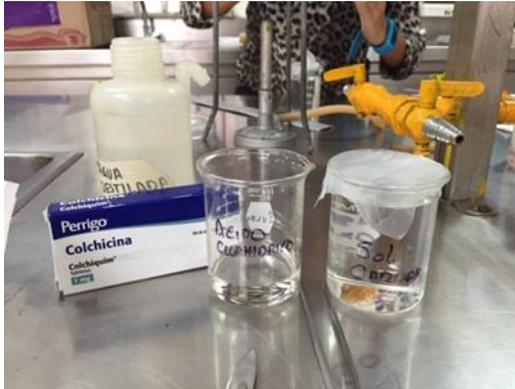
Procedimiento:

1. En la licuadora colocar la $\frac{1}{2}$ taza de chícharos, 1.5 gr. de NaCl y 200 mL de agua fría.
2. Licuar a velocidad alta por 15 seg, colarlo y colocarlo en una probeta.
3. Medir el volumen y agregar $\frac{1}{6}$ del volumen total de detergente.
4. Agitar suavemente para que se mezclen.
5. Dejar la mezcla reposar.
6. Vaciar en tubos de ensayo, llenándolos a $\frac{1}{3}$ de su capacidad.
7. Agregar 0.05 g de enzima (ablandador de carne) y agitar suavemente.
8. Tomar el etanol (alcohol etílico) y vaciarlo en los tubos de ensayo, procurando que escurra hacia el fondo por las paredes, para hacer una capa del mismo sobre la mezcla de chícharos.
9. Observar el ADN precipitado en los tubos.

Material (Protocolo 2 – Célula fijada en metafase)

- Cebolla con raíz
- Bisturí con hoja esterilizada
- Solución de carnoy (60% etanol puro, 30% cloroformo, 10% ácido acético glacial)
- 3 cajas de Petri
- 1 litro de agua destilada

- 3 Vasos de precipitados (100mL)
- HCl 50% (20mL)
- Cronómetro
- Microscopio óptico



Procedimiento

1. Colocar durante 7 días una cebolla en un recipiente con agua, permitiendo la hidratación de la raíz hasta que ésta crezca.
2. Hacer 10 cortes transversales a las raíces y sumergirlas en solución de Carnoy.
3. Enjuagar las raíces y transferirlas a otro recipiente que contenga una solución de HCl al 50% (20ml) y se deja reposar por 15 minutos.
4. Lavar las raíces con agua destilada, para eliminar completamente el HCl.
5. Sumergir las raíces en una solución de orceína, colocada en un vidrio de reloj.
6. Flamear las raíces con ayuda del vidrio de reloj y el mechero de Bunsen, sin dejar que la muestra alcance su punto de ebullición.
7. Remover el exceso de orceína con papel absorbente.
8. Tomar las raíces y hacer un corte de 2 mm en el ápice.
9. Colocar las muestras en el porta objetos y éstos, a su vez, en una caja de Petri esterilizada.

10. Observar al microscopio óptico a 40x y 100x.
11. Rotular una muestra como *control*, las demás muestras se fijan con colchicina, variando la concentración de dicha sustancia, desde 0.25 hasta 0.1%, para fijar las células en metafase.

Material: (Protocolo 3 – Células de sangre periférica)

- 20 Tubos heparinizados
- 1 Torniquete o compresor
- 25 Tubos Falcon de 15 mL para centrifuga
- Pipetas estériles o pipetor de 1000 μ L con puntas estériles
- Jeringas esterilizadas de 5 mL
- Gradilla para tubos Falcon de 15 mL
- 2 mecheros Fisher
- 200 mL de tampón de fosfato (DPBS)
- 50 mL de Ficoll
- 200 mL de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640)
- 100 mL de suero Fetal Bovino
- Fitoheماغlutinina (0.0001g/mL; RUTA 1) (1g/mL RUTA 2)
- Solución de Colchicina en DPBS
- 0.075M KCl
- Incubadora
- Centrifuga

Procedimiento

1. Esterilizar el material en la autoclave.
2. Realizar una venopunción, extraer 15 mL de sangre repartidos en 3 tubos heparinizados.
3. Diluir en DPBS la sangre.
4. Verter 4mL de ficoll en un tubo Falcon de 15mL.
5. Colocar 4 mL de sangre con DPBS en el tubo Falcon, de tal modo que no se mezcle con el ficoll.
6. Centrifugar a 400 g durante 20 min.
7. Extraer los PBMCs, los cuales se encuentra entre la capa de plasma sanguíneo y la de ficoll
8. Verter los PBMC's en un tubo Falcon de 15 mL, llenar con DPBS hasta que el tubo contenga 10 mL y homogeneizar.
9. Centrifugar el tubo con PBMCs a 100 g durante 10 min.
10. Descartar el sobrenadante y resuspender con DPBS.
11. Añadir al tubo 1ml de RPMI 1640, 100 μ L Suero Bovino Fetal y 100 μ L Fitohemaglutinina (Concentración 1×10^{-4} g/mL).
12. Cultivar a 37°C de 3 a 5 días.
13. Sacar los tubos de la incubadora y añadir 100 μ L solución de colchicina, se homogeneiza y se vuelve a incubar a 37° por 20 min.
14. Centrifugar a 1800 rpm durante 10 min y al finalizar, descartar el sobrenadante.
15. Incubar a 37°C por 20min.
16. Agregar 1mL de fijador y centrifugar a 1800 rmp durante 10 min.
17. Descartar el sobrenadante y resuspender en 5 mL de fijador ó 5 mL de DPBS.

18. Centrifugar a 1800 rpm por 10 min y descartar el sobrenadante.
19. Dejar caer con una jeringa o pipeta, desde 150 cm de altura, de 1 a 4 gotas del resuspendido de células en el porta objetos, observar al microscopio.
20. Colocar en un tubo Falcón de 15 mL, 7 mL de RPMI-1640, 1 mL de suero fetal bovino y 100 µL a 1g/ml de fitohemaglutinina.
21. Añadir 1 mL de sangre completa heparinizada al tubo y se homogeniza.
22. Incubar a 37°C de entre 3 a 5 días.
23. Añadir 300 µL de solución de colchicina y se homogeniza.
24. Incubar a 37°C por 20 min.
25. Centrifugar a 1800 rpm por 10 min y al finalizar, descartar el sobrenadante.
26. Incubar a 37°C por 20 min.
27. Agregar 1 mL de fijador y centrifugar a 1800 rmp por 10 min.
28. Descartar el sobrenadante y resuspender en 5 mL de fijador o 5 mL de DPBS.
29. Centrifugar a 1800 rpm por 10 min.
30. Dejar caer con una jeringa o pipeta, desde 150 cm de altura, de 1 a 4 gotas del resuspendido de células en el porta objetos y observar al microscopio.

Material (Protocolo 4: corpúsculo de Barr)

- Un abatelenguas
- 100 mL de Metanol 95%
- 100 mL de orceína acética 2%

Procedimiento

1. Raspar el interior de la mejilla en pacientes masculinos y femeninos con un abatelenguas.
2. Extender las células obtenidas en un porta objetos.

3. Fijar las células con metanol.
4. Teñir con orceína acética durante 5 min.
5. Lavar con agua.
6. Dejar secar.
7. Observar en el microscopio a 40x

Resultados generales:

Realizamos el protocolo de extracción de material genético del chícharo con éxito, lo cual nos permitió observar el ADN precipitado y condensado. Los resultados del ADN que extrajimos tenían apariencia de una sustancia blanquecina, misma que se asemeja a una telaraña (Figura 4).



Figura 4. Tubo de ensayo donde se realizó la extracción.

Al observar los cortes realizados de la raíz de la cebolla, se observaron de las diferentes etapas de la mitosis únicamente la metafase, con la ayuda del microscopio.

Por lo tanto, se cumplió con el objetivo de observar el ADN en su estado de empaquetamiento, en la metafase mitótica (Figura 5).

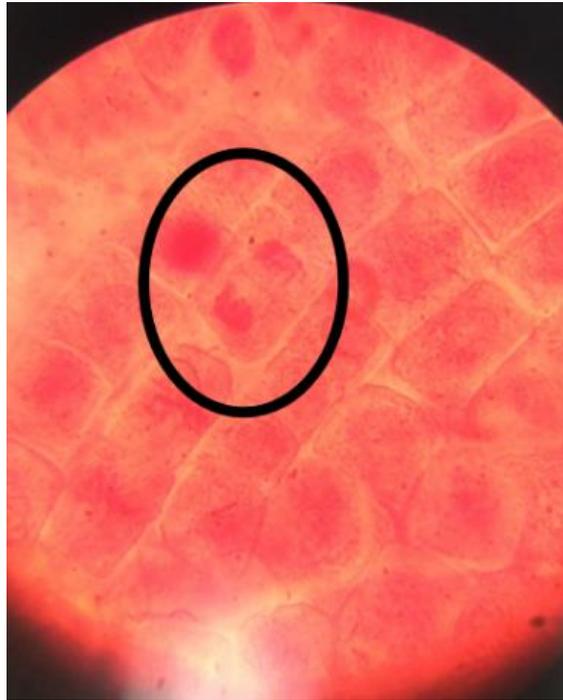


Figura 5. Célula vegetal fija en metafase. Se observa dentro del círculo una célula con sus cromatides separándose hacia los polos opuestos.

Los resultados anteriores nos llevaron a hacer una investigación a fondo del cómo ocurría el empaquetamiento del ADN, ahora en una célula animal, por lo que aplicamos un nuevo protocolo mediante acetilación, desacetilación y metilación de las lisinas en las histonas asociadas (Protocolo-PBMC) y pretendimos visualizar la forma en la que se empaqueta el ADN, mediante el siguiente proceso: (Figura 6)

- a) Obteniendo ADN en su forma de cromosoma (mediante la fijación de células en metafase).
- b) Acetilar las histonas.
- c) Observar al microscopio.

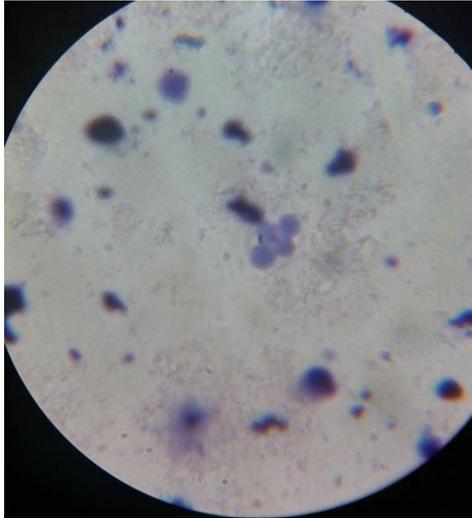


Figura 6. Células animal (sangre humana) teñidas de azul. No se rompió la membrana celular.

Debido a que los resultados obtenidos con el protocolo-PBMC, no fueron favorables para el cumplimiento al objetivo planteado con células animales, se llevó a cabo un nuevo protocolo para observar la presencia de ADN empaquetado en este tipo de células.

En las muestras de epitelio bucal de pacientes femeninas, se pudo observar el corpúsculo de Barr, el cual es un cromosoma X condensado, porque no está genéticamente activo. Las muestras de pacientes masculinos, no mostraron esta estructura, debido a que no está expresado.

Conclusión

La intención del proyecto fue visualizar con materiales de fácil acceso en el laboratorio escolar el ADN.

- Protocolo 1: Se logró extraer y visualizar el ADN del chícharo, sin embargo no se pudo observar la estructura de doble hélice, debido a que es necesario utilizar un equipo más sofisticado.

- Protocolo 2: Se logró fijar células vegetales en metafase mitótica. Lo cual permitió observar el ADN condensado en forma de cromatide.
- Protocolo 3: Logramos extraer monocitos de la sangre y reproducirlos satisfactoriamente, sin embargo, la forma en la que se intentó extraer el ADN de la célula no fue eficaz, por lo cual, propondríamos en próximas investigaciones, realizar la ruptura a través de procesos químicos y/o físicos. Por falta de tiempo, propusimos realizar el protocolo 4 y no continuar con el 3.
- Protocolo 4: Logramos observar el cromosoma en células animales, solo en caso de pacientes femeninas, debido a la presencia del cromosoma X genéticamente inactivo (compacto).
- Analizando los resultados obtenidos en los 4 protocolos, del ADN una ventana para admirar el código de la vida, concluimos que nos abrió una ventana al amor por la investigación.

Referencias

- Panda, S.K. & Ravindran, B. (2013) In vitro Culture of Human PBMCs. Bio-protocol 3(3): e322. Extraído el 20/01/2016 de: <http://www.bio-protocol.org/e322>
- Menck K. et. al. (2014) Isolation of human monocytes by double gradient centrifugation and their differentiation to macrophages in Teflon-coated cell culture bags. German Research Council. Extraído el 20/01/2016 de: www.jove.com/video/51554/aislamiento-de-monocitos-por-doble-centrifugacin-en-gradiente?language=Spanish
- What is DNA? (2015) Recopilado de: <http://www.bibme.org/citation-guide/apa/website/>
- Nelson, David L., Cox, Michael M. (2006). "Lehninger Principios de Bioquímica". Omega, Barcelona. Pp 273-287.
- Melo, Virginia. (2007). "Bioquímica de los procesos metabólicos". Reverté, México. Pp 103-105.
- Holum, John. (2000). "Química General Orgánica y Bioquímica para Ciencias de la Salud". Limusa wiley, México. Pp 588.

- Volkheimer Wolfgang (S.F) ADN. Breve Enciclopedia del ambiente.[WEB]
Recopilado de: <http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/ADN.htm>
- Oswald Nick.(2007) Ethanol Precipitation Of DNA and RNA: How it Works.
Bitesizebio. Recopilado de: <http://bitesizebio.com/253/the-basics-how-ethanol-precipitation-of-dna-and-rna-works/>