



UNIDAD: PRÁCTICAS DE CIENCIAS E INGENIERÍA

¿CÓMO PODEMOS INNOVAR EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL CÁNCER?
ACTIVIDAD STEM CON ENFOQUE EN INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y APLICADA

10mo – 12mo grados



Diana Rodríguez Pérez

CROEM

junio, 2023



GUIA DE LA MAESTRA

MATERIA: BIOLOGIA

NIVEL/GRADO: Superior / 10mo-12mo

CONCEPTOS PRINCIPALES: cáncer / investigación traslacional / investigación aplicada / señalización celular como herramienta de diagnóstico y/o tratamiento médico

CONCEPTOS SECUNDARIOS: concentración de soluciones / espectrofotometría / largo de onda / curva de calibración / Ley de Beer-Lambert

CONOCIMIENTO PREVIO: ciclo celular / proteínas / estructura celular / construcción de gráficas lineales

OBJETIVOS ESPECIFICOS DE APRENDIZAJE

Durante la lección el estudiante:

1. explica la importancia de regulación en el ciclo celular y que alteraciones pueden dar paso a enfermedades como el cáncer.
2. describe cómo la señalización celular es el mecanismo de comunicación entre las células dentro de los organismos impulsado por diferentes estímulos (entre ellas proteínas específicas) que se transmiten a través de un proceso en cascada para producir la respuesta y se pueden utilizar como herramienta de diagnóstico o tratamiento médico.
3. construye una curva de calibración de albúmina por medio de espectrofotometría o colorimetría visual como método alternativo, utilizando el reactivo Biuret para determinar la concentración de la proteína de interés para el diagnóstico de cáncer.
4. determina la sensibilidad de la herramienta de diagnóstico de cáncer por medio de ensayo de prueba Biuret con muestras de pacientes simuladas con proteína de huevo, leche, gelatina sin sabor, control positivo con albúmina y control negativo con agua destilada.
5. presenta hallazgos de su investigación en el Foro de Innovación Biomédica que se celebrará en clase.

ESTÁNDARES, EXPECTATIVAS E INDICADORES DEL GRADO

- **Biología:** Estudia la organización, características, clasificación y procesos relacionados a los organismos vivos, así como su interacción con el medio ambiente.
 - ES. B1 Desarrolla modelos e investigaciones sobre la estructura y los procesos que ocurren en la célula, los cuales contribuyen a desempeñar las funciones esenciales para la vida, proveer energía y mediar en la reproducción de los organismos.
 - ES. B1.1 Reconoce y describe las características que tienen en común todos los organismos: formados por células, requieren de una fuente de energía para realizar los procesos de vida, reaccionan a su ambiente para sobrevivir, y poseen la capacidad de desarrollo y reproducción.
 - ES. B4 Diseña diagramas, organizadores gráficos y modelos matemáticos que integran afirmaciones, basadas en evidencia, sobre la función de la molécula del ADN -que contiene la información genética de la célula- en la continuidad de la vida y en las variaciones genéticas y hereditarias de una población.
 - ES. B4.1 Explica, utilizando evidencia científica, cómo la estructura del ADN determina -a su vez- la estructura de las proteínas que llevan a cabo las funciones esenciales de la vida por medio de sistemas de células especializadas.
 - ES. B4.17 Explica las contribuciones de la biotecnología y la ingeniería genética en el estudio del ADN, y sus aplicaciones en las ciencias forenses, en la medicina y en la agricultura (en la identificación de evidencia forense, y en la producción de nuevos productos biomédicos y agrícolas).

- **Ingeniería y Tecnología:** Estudia y aplica las prácticas de ciencias e ingeniería en el diseño y la construcción de prototipos, para solucionar problemas basado en evidencia científica.
 - ES.B.IT1 Aplica prácticas de las ciencias e ingeniería en el desarrollo de investigaciones relacionadas con la Biología, y en la búsqueda de soluciones a problemas de investigación.

- ES.B.IT1.3 Utiliza instrumentos, unidades de medida y tecnología adecuada para la recopilación y la interpretación de datos relevantes en una investigación científica.
- ES.B.IT2 Diseña soluciones óptimas para problemas de la vida real, tomando en cuenta los requerimientos y las necesidades de la sociedad.
 - ES.B.IT2.1 Analiza un problema o reto global de mayor impacto sobre la salud, el ambiente, la ingeniería genética, la biodiversidad y la biotecnología, para especificar las limitaciones y los criterios cuantitativos de las soluciones que toman en cuenta las necesidades de la sociedad; así como los beneficios y perjuicios que pueden representar estos retos.
 - ES.B.IT2.4 Usa la tecnología para presentar una simulación en la solución de un problema real y complejo relacionado con la salud, el ambiente, la ingeniería genética, la biodiversidad o la biotecnología.

TRASFONDO

El cáncer es una de las principales patologías que afectan a la población a nivel mundial y se han logrado grandes avances gracias a la investigación en el campo de la biomédica trabajada de forma interdisciplinaria. La investigación traslacional incluye dos áreas de traducción. Uno es el proceso de aplicar los descubrimientos generados durante la investigación en el laboratorio y en los estudios preclínicos, al desarrollo de ensayos y estudios en humanos. La segunda área de traducción se refiere a la investigación destinada a mejorar la adopción de las mejores prácticas en la comunidad. La rentabilidad de las estrategias de prevención y tratamiento también es una parte importante de la ciencia traslacional. En otras palabras, conocer en mayor detalle los procesos biológicos que caracterizan esta enfermedad permite acelerar la introducción de nuevas técnicas moleculares a la práctica clínica habitual, mejorando las estrategias de prevención y manejo de los pacientes.

La señalización celular se refiere al mecanismo de comunicación entre las células dentro de los organismos impulsado por señales mecánicas, como el tacto, o señales químicas, como hormonas, factores de crecimiento y neurotransmisores. En las vías de señalización, los estímulos se transmiten a través de un proceso en cascada para producir la respuesta correcta

y adecuada. Los ejemplos de vías de señalización celular incluyen la señalización de lípidos, insulina, estrés, crecimiento, de TOR (red proteica de regulación para una amplia gama de procesos involucrados en el crecimiento y la diferenciación celular) y la señalización de puntos de control.

Para esta actividad se simulará una proteína de interés en la señalización que estimula la proliferación de tumores malignos y una técnica de detección preferiblemente cualitativa que pueda ser utilizada para el diagnóstico y medición de progreso de la enfermedad. Es una forma de visualizar el impacto que puede tener la investigación traslacional y el desarrollo de la tecnología para presentar una simulación en la solución de un problema real y complejo relacionado con la salud; además de considerar el aspecto económico potencial que puede generar la investigación aplicada.

GLOSARIO

Término	Definición
absorbancia	también conocida como densidad óptica (DO), es la cantidad de luz absorbida por una solución y se relaciona con la concentración de la muestra
cáncer	conjunto de enfermedades que se pueden originar en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo cuando células anormales crecen de forma descontrolada, sobrepasan sus límites habituales e invaden partes adyacentes del cuerpo y/o se propagan a otros órganos
ciclo celular	Proceso por el que pasa una célula cada vez que se divide.
concentración	Determina la proporción de soluto y disolvente en una solución química.
curva de calibración	Método general para determinar la concentración de una sustancia en una muestra desconocida comparando la desconocida con un conjunto de muestras estándar de concentración conocida.
diagnóstico clínico	Identifica una enfermedad, afección o lesión en función de los signos y síntomas, historial de salud, examen físico y resultados de pruebas médicas del paciente.
disolvente	Componente de una solución que está presente en la mayor cantidad. Es la sustancia en la que se disuelve el soluto.

Término	Definición
enlace peptídico	Enlace covalente formado entre dos aminoácidos. Los organismos vivos usan enlaces peptídicos para formar largas cadenas de aminoácidos, conocidas como proteínas.
espectrofotometría	Técnica de laboratorio que mide nivel de luz transmitido o absorbido a una cierta longitud de onda resulta proporcional a la concentración del material en la muestra.
gráfica de regresión lineal	Intenta modelar la relación entre dos variables ajustando una ecuación lineal a los datos observados. La regresión lineal consiste en encontrar la línea recta que mejor se ajusta a través de los puntos.
investigación aplicada	Aquellos procesos que buscan convertir el conocimiento científico puro, en un conocimiento práctico y útil para la sociedad.
investigación traslacional	Está relacionada con la aplicación de ideas, conocimientos y descubrimientos generados por las investigaciones de diferentes disciplinas, para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades.
longitud de onda	La distancia física entre dos puntos a partir de los cuales la onda se repite.
proteína	Macromoléculas formadas por cadenas de aminoácidos que están unidos por enlaces peptídicos. Son esenciales para el funcionamiento de los seres vivos.
señalización celular	Mecanismo de comunicación entre las células dentro de los organismos impulsado por señales mecánicas, químicas, factores de crecimiento y neurotransmisores. En las vías de señalización, los estímulos se transmiten a través de un proceso en cascada para producir la respuesta correcta y apropiada.
solución	Mezcla homogénea de dos o más sustancias. La sustancia disuelta se denomina soluto y la sustancia donde se disuelve se denomina disolvente.
solución stock (solución madre)	Solución de alta concentración que se diluirá para su uso de acuerdo a la necesidad de los experimentos.
soluto	Sustancia disuelta en un determinado disolvente, cuya proporción en él forma la concentración.

MATERIALES

(Detallado en descripción de actividad)

BIBLIOGRAFIA

- Abdullah, S., Serpelloni, M., Tonello, S., Sardini, E., Abate, G., & Uberti, D. (2018). Spectrophotometer measurements to characterize conformational state of the proteins: p53 analysis. *2018 IEEE International Symposium on Medical Measurements and Applications (MeMeA)*. <https://doi.org/10.1109/memea.2018.8438807>
- Ruiz-Bañobre, J., Rodriguez-Casanova, A., Costa-Fraga, N., Bao-Caamano, A., Alvarez-Castro, A., Carreras-Presas, M., Brozos-Vazquez, E., Vidal-Insua, Y., Vazquez-Rivera, F., Candamio-Folgar, S., Mosquera-Preledo, M., Lago-Lestón, R. M., Muínelo-Romay, L., Vázquez-Bueno, J. Á., Sanz-Pamplona, R., Moreno, V., Goel, A., Castillo, L., Martin, A. C., & Arroyo, R. (2022). Noninvasive early detection of colorectal cancer by hypermethylation of the LINC00473 promoter in plasma cell-free DNA. *Clinical Epigenetics*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/s13148-022-01302-x>
- Ocronos, R. (2021, December 12). ▷ *Test colorimétrico de Biuret*. Ocronos - Editorial Científico-Técnica. <https://revistamedica.com/test-colorimetrico-biuret/>
- Sundarraaj, S., Rajagopal, G., Sundaramahalingam, B., Sundar, M., & Thangam, R. (2022). Methods of Protein Detection in Cancer for Diagnosis, Prognosis and Therapy. *Protein Detection*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.101050>

PROCESO EDUCATIVO (INICIO, DESARROLLO Y CIERRE)

Assessment continuo

Durante toda la actividad el/la maestro/a estará haciendo observaciones mientras se mueve entre los grupos de trabajo, cuando los/as estudiantes discuten y cuando presentan sus respuestas a las preguntas. Esto le permite hacer evaluaciones del aprendizaje de estos/as.

INICIO

Durante esta parte se explora el conocimiento previo de los/as estudiantes acerca de los conceptos a desarrollar. Esto permite al/a la maestro/a reconocer concepciones alternas (*misconceptions*) que puedan tener los/as estudiantes y asegurarse que pueda corregir las mismos durante el proceso educativo.

Se utilizará la estrategia SQA: *¿Qué sé, qué quiero saber y qué aprendí?*

Pasos:

- Se inicia la actividad dando a conocer el nombre del tema a desarrollar, los objetivos que se pretenden alcanzar. Se da comienzo al primer tiempo el de la "S" se pregunta a los alumnos que conocen sobre el tema en discusión.
- El segundo tiempo es la "Q" lo que es estudiante quiere aprender sobre el tema de discusión, así como el tiempo anterior se preguntará a los estudiantes cuáles son sus inquietudes sobre el tema, cuáles son los conocimientos.

Tercer Tiempo "A" lo que el estudiante a aprendido, puede realizarse durante o después de la lección, siguiendo las mismas indicaciones que se efectuaron con los tiempos "S" y "Q".

Tema: Cáncer: ¿Qué es? Diagnóstico, tratamiento, investigación traslacional y aplicada		
¿Qué sé del tema?	¿Qué quiero saber?	¿Qué aprendí?

Tabla 1. * Ejemplo de SQA. Adjunto hay una hoja suelta para obtener las respuestas de los estudiantes.

DESARROLLO

Luego de asegurarse el maestro que se aclararon los conceptos previos, se realizará/n una/s actividad/es que promuevan entendimiento profundo.

ACTIVIDAD: ¿Cómo podemos innovar en el diagnóstico y tratamiento del cáncer?

Actividad STEM con enfoque investigación traslacional y aplicada

Parte 1. Experimento/simulación para determinar la presencia de proteína de interés relacionada al diagnóstico o tratamiento de “cáncer”

Materiales: (por estación de trabajo)

- 4 mL de solución stock de albúmina de clara de huevo: 10mg/ml
- 20 mL de reactivo Biuret
- 20 mL de SDS al 0.5 %
- 0.4g de clara de huevo
- 0.4g de gelatina sin sabor
- 15.0 mL de H₂O destilada
- 10 tubos de ensayo
- 1 gradilla
- 2 tubos cónicos con tapa de 50 mL
- 1 micropipeta de 1000 μ L con puntas
- 1 micropipeta de 200 μ L con puntas
- 1 contenedor para descartar puntas de micropipeta
- 11 cubetas de espectrofotometría
- 1 paquete de “Kimwipes”
- 1 marcador indeleble
- 1 papel cuadriculado
- 1 regla

Equipo:

- 1 balanza (con capacidad de medir 0.4g)

1 espectrofotómetro / método alternativo por colorimetría visual directa (si no hay espectrofotómetro disponible)

1 probeta de 10 mL

1 calculadora

1 computadora con programa Excel

Preparación antes de la actividad:

- Para esta actividad si va a hacer la versión con micropipetas es necesario repasar y practicar el uso correcto de las mismas. Si va a realizar el experimento utilizando probetas, se recomienda repasar también el manejo correcto y el fenómeno del menisco. El siguiente enlace le puede servir de ayuda para uso de micropipeta:
<https://www.youtube.com/watch?v=3KGZNzJUuPg>
- También es conveniente que se tenga un conocimiento general de cómo funciona un espectrofotómetro para determinar la concentración de proteína en nuestras muestras. En los recursos adicionales se incluye una hoja suelta con el nombre de *Notas sobre espectrofotometría*. Adicional a eso, incluyo el enlace a una simulación de la página PhET creada por la Universidad de Colorado donde puede manipular de forma interactiva y ver la relación entre concentración de la solución y la absorbancia que registra el espectrofotómetro.
- Si lo que utilizará es el método por colorimetría visual directa (cualitativo), de todos modos, es bueno que sepan cómo funciona un espectrofotómetro.

Simulación PhET : https://phet.colorado.edu/sims/html/beers-law-lab/latest/beers-law-lab_en.html

Trasfondo

El ensayo de proteínas Biuret es un método colorimétrico que permite determinar la concentración de proteínas de una muestra mediante espectroscopía ultravioleta-visible a una longitud de onda de 540 nm (para detectar el ión Cu^{2+}). El reactivo Biuret se coordina con los enlaces peptídicos de las proteínas y en el centro de la molécula se atraen iones de cobre bajo condiciones de pH básico o alcalino. Ese complejo

coordinado que forma el cobre es de un color violeta el cual su intensidad depende de la cantidad de proteína y que se puede medir cuantitativa con un espectrofotómetro presentando un máximo de absorción a un largo de onda de 540 nm o por método alternativo de forma cualitativa por medio de colorimetría visual directa.

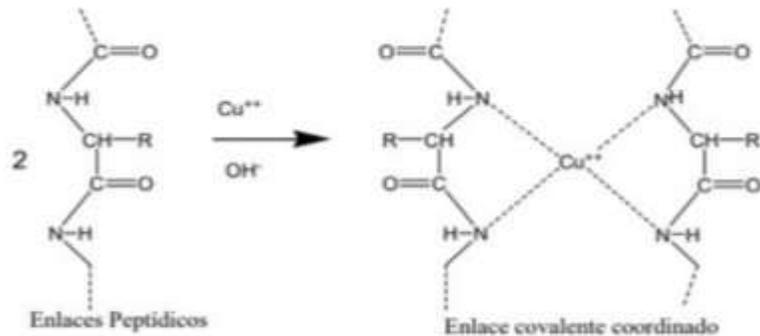


Fig. 1 Reacción Biuret que produce el cambio en color en presencia de enlaces peptídicos, pH alcalino e iones de Ca^{2+}

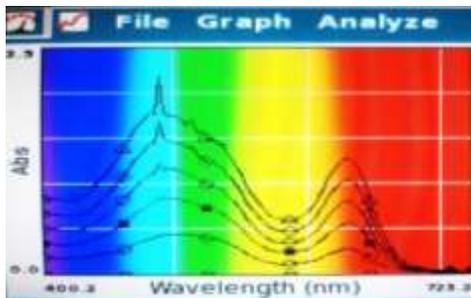


Fig. 2 Espectrofotometría (Método Cuantitativo)



Fig. 3 Colometría visual directa

Procedimiento:

Parte A. Preparar muestras de “pacientes”, controles positivo y negativo

1. Rotule con las letras o símbolo correspondiente cuatro tubos de ensayo asignando un nombre a cada uno:
 - “Paciente **A**” (**PA**)
 - “Paciente **B**” (**PB**)

- Control Positivo (C+)
 - Control Negativo (C-)
2. Pese 0.4 g de gelatina sin sabor en polvo y transfíralo a un tubo cónico de 50 mL al que rotulará como **muestra PA**.
 3. Pese 0.4 g de clara de huevo y transfíralo en el otro tubo cónico de 50 mL al que rotulará como **muestra PB**.
 4. Añada 10 mL de SDS al 0.5% a cada tubo cónico que tienen las “muestras de pacientes”. SDS es un detergente que ayudará a liberar las proteínas en solución. Agite las muestras durante 10 segundos, luego deje reposar las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos.
 5. Eche 500 μ L de solución stock de albúmina 10mg/mL al tubo de ensayo **C+**.
 6. Añada 500 μ L de H₂O_d al tubo de ensayo **C+** y agite la solución.
 7. Eche 1000 μ L de H₂O_d al tubo de ensayo **C-**.
 8. Una vez pasen los 10 min del paso #4, transfiera 1000 μ L de las solución **muestra PA** al tubo de ensayo rotulado **PA** y descarte la punta de la micropipeta.
 9. Luego, transfiera 1000 μ L de las solución **muestra B** al tubo de ensayo rotulado **PB** y descarte la punta de la micropipeta.

Parte B. Preparar soluciones estándar para curva de calibración

1. Rotule los de tubos de ensayo con los números del 1 al 6.
 2. Pipetear la cantidad de agua en cada tubo según indica la Tabla 2.
 3. Añada la cantidad de solución stock de albúmina (concentración 10 mg/mL) de acuerdo a lo que corresponde a cada tubo según Tabla 2.
- *Equivalencia 1000 μ L=1mL (Si no tiene micropipetas disponibles puede ajustar el volumen total a 10 mL y aumenta proporcionalmente la cantidad que indica la tabla para que pueda hacer el ejercicio utilizando una probeta)

Tubo	Volumen en μL de H_2O_d	Volumen en μL de Solución Stock Albúmina 10mg/mL	Concentración en mg/mL	Absorbancia $\lambda=540\text{nm}$
#1	1000	0	0.0	
#2	900	100	1.0	
#3	800	200	2.0	
#4	700	300	3.0	
#5	600	400	4.0	
#6	500	500	5.0	

Tabla 2. Volumen de agua destilada y solución stock de albúmina a añadir por tubo para la preparación de estándar de calibración.

Parte C. Espectrofotometría:

1. Añada 2 mL de reactivo Biuret a cada tubo de ensayo de la Parte A y B.
2. Tapar los tubos y agitar brevemente.
3. Deje reposar todos los tubos a temperatura ambiente durante 15 minutos.
4. Mientras espera, encienda el espectrofotómetro. La mayoría de los espectrofotómetros necesitan calentarse antes de que puedan dar una lectura precisa.
5. Si utiliza cubetas reutilizables, asegúrese de limpiarlas correctamente antes de usarlos. Enjuague bien cada cubeta con agua destilada.
6. Al manipular la cubeta, evite tocar los lados por los que pasará la luz (generalmente, los lados transparentes del recipiente). Si toca accidentalmente estos lados, limpie la cubeta con un "kimwipe" (que están formulados para evitar rayaduras).
7. Cargue el volumen adecuado de la muestra en la cubeta. Siempre que la luz del equipo atraviese el líquido y no una parte vacía del recipiente, obtendrá una lectura precisa. Asegúrese de colocar las cubetas en orden para que la lectura λ corresponda a la muestra correcta.

***Si usa una pipeta para cargar sus muestras, use una punta nueva para cada muestra para evitar la contaminación cruzada.**

8. Prepare una cubeta conocida como blanco, es la solución de control que solo tiene el solvente químico en el que se disuelve las muestras a analizar. En nuestro caso utilizaremos el reactivo Biuret.
9. Limpie el exterior de la cubeta. Antes de colocar la cubeta en el espectrofotómetro, debe asegurarse de que esté lo más limpia posible para evitar la interferencia de suciedad o partículas de polvo. Con un paño sin pelusa, elimine las gotas de agua o el polvo que pueda haber en el exterior de la cubeta.
10. Calibre la máquina con el blanco. Coloque el blanco en el portacubetas. **Va a realizar la lectura de absorbancia en la longitud de onda a 540 nm.** Establezca valor del blanco en 0. Cuando retire el blanco, la calibración aún estará en su lugar. Al medir el resto de sus muestras, la absorbancia del blanco se restará automáticamente.
11. Retire el blanco y pruebe la calibración. Vuelva a colocar el blanco en la máquina y asegúrese de que la lectura debería quedar en 0.
12. Retire el blanco y coloque cada una de las muestras en la máquina. **Va a realizar la lectura de absorbancia en la longitud de onda a 540 nm.** Espere unos 10 segundos hasta que los números digitales dejen de cambiar. Registrar los valores de absorbancia en la tabla de datos que corresponda. Los datos de absorbancia de la Parte A van en la Tabla 3 y los de la Parte C se registran en la Tabla 2; pero para facilitar el registro, se les provee a los estudiantes la Hoja de trabajo Actividad #1.



Fig 4. Ejemplo de resultados obtenidos. De izquierda a derecha tenemos blanco solo con Biuret, luego leche que cambia de color (no es recomendado porque se precipita y hay

turbidez en muestra - lo puede considerar solo de demostración al inicio de actividad), luego gelatina sin sabor y al final clara de huevo.

Tubo	Volumen en mL de muestra	Absorbancia $\lambda=540\text{nm}$	Concentración en mg/mL
PA	1		
PB	1		
C+	1		
C-	1		

Tabla 3. Registro de datos experimentales de “muestras de pacientes”

Para determinar la concentración real de proteína en las muestras desconocidas es necesario graficar la curva estándar (concentración en el eje x y en el eje y de absorbancia) e interpolar los valores de absorbancia de las “muestras de pacientes”. Un método más exacto es realizar un análisis de regresión lineal en la curva estándar que producirá la ecuación para una línea recta: $y = mx+b$. Con esta ecuación se puede calcular la concentración ingresando el valor de absorbancia de cada muestra de concentración desconocida (las “muestras de pacientes”) en la ecuación como el valor de y y luego resolver para x.

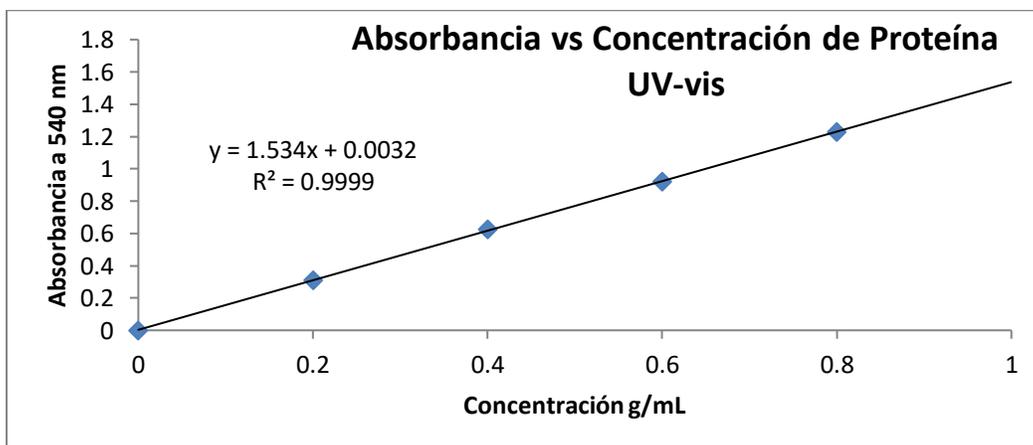


Fig 5. Ejemplo de gráfica de regresión lineal correspondiente a la curva de calibración estándar.

Hoja/s de Trabajo: los/as estudiantes anotarán sus datos y contestarán preguntas. (Está en blanco en manual del estudiante)

Actividad: ¿Cómo podemos innovar en el diagnóstico y tratamiento del cáncer?

Actividad STEM con enfoque investigación traslacional y aplicada

Experimento/simulación para determinar la presencia de proteína de interés relacionada al diagnóstico o tratamiento de cáncer.

En esta hoja tiene disponible las preguntas con las posibles respuestas que se contestarán luego de realizar el experimento.

Preguntas:

¿Qué importancia tiene para un médico poder cuantificar proteínas en una muestra biológica?

¿Qué importancia tiene para un médico poder cuantificar proteínas en una muestra biológica?

1. ¿Cuál fue el resultado de las “muestras de pacientes”?

Ambas pruebas resultaron positivas.

2. ¿Cómo se validó que el resultado es confiable?

Se incluyó un control negativo solo con reactivo Biuret y un control positivo con albúmina.

3. ¿Qué importancia en el campo de la medicina puede tener la identificación de una proteína relacionada al cáncer?

La concentración de la proteína en una muestra de paciente puede reflejar la presencia de la enfermedad, corroborar la efectividad de un tratamiento contra el cáncer o si el estado de salud es adecuado relacionado a la condición.

4. ¿Qué reconoce o detecta el Reactivo Biuret?

El Reactivo Biuret detecta la presencia de proteínas, péptidos cortos y otros compuestos con dos o más enlaces peptídicos.

5. ¿Cuándo es positivo el ensayo de proteínas de Biuret?

La positividad se manifiesta por el cambio de color de azul a una coloración violeta, debido a la formación de un complejo de coordinación entre los cationes de cobre en medio alcalino con los enlaces peptídicos entre aminoácidos.

6. ¿A qué longitud de onda se mide la absorbancia en el ensayo de proteínas de Biuret?

La absorbancia máxima se mide a un largo de onda de 540nm.

7. ¿Cuál es la diferencia en utilizar el ensayo de proteínas de Biuret por colorimetría visual directa vs espectrofotometría?

En ambos se prepara una curva de calibración o carta de colores con concentración conocida de proteína donde se pueda distinguir un cambio gradual en la intensidad de color violeta y será la escala de referencia con que vamos a comparar las muestras de concentración desconocida.

La colorimetría visual directa es un ensayo cualitativo ya que la coloración varía con el número de enlaces peptídicos presentes en la molécula y el indicador es la intensidad del color que se pueda apreciar a simple vista. La espectrofotometría es un método cuantitativo porque la absorbancia es un valor numérico proporcional a la concentración de proteína y se utiliza la ecuación de la gráfica de regresión lineal construida con los datos de la curva de calibración donde se le otorga a la variable y el valor de la absorbancia de las muestras y se despeja para el valor de x para determinar la concentración de las mismas.

Análisis de resultados:

El maestro, junto a los estudiantes discutirán los resultados de la actividad utilizando como guía las preguntas que están en la Hoja de trabajo Actividad #1.

CIERRE

Se resume lo dado en clase, se asigna tarea y se ausculta el aprendizaje logrado por los/as estudiantes.

Parte II. “Foro de Innovación Biomédica”

Para el cierre se realizará el “Foro de Innovación Biomédica” donde cada grupo de estudiantes presenta hallazgos de su investigación explicando a la comunidad científica la relevancia de su logro en el diseño de herramienta de diagnóstico o tratamiento de un tipo específico de cáncer. Deben prepararse haciendo revisión literaria de al menos cinco artículos científicos recientes y de fuentes confiables. Es fundamental explicar el principio científico de su producto y destacar el impacto a nivel social y económico. El tiempo de presentación será de quince minutos y se le suministrará una rúbrica con los criterios de evaluación.

1. Se le devolverá la hoja SQA que trabajaron al inicio de la lección para que completen la columna de *¿Qué aprendió?* a modo de reflexión y autoevaluación.
2. Contestarán cuestionario de evaluación de la actividad donde podrán expresar si la experiencia de aprender conceptos y técnicas a modo de simulación de resolver un problema real e incluyendo experimentación le resultó efectiva y si generó un cambio en su actitud hacia la forma de ver la investigación científica.

GUIA DEL/DE LA ESTUDIANTE



Tema: ¿Cómo podemos innovar en el diagnóstico y tratamiento del cáncer?

Actividad STEM con enfoque investigación traslacional y aplicada

ACTIVIDAD 1: Experimento simulación para determinar la presencia de proteína de interés relacionada al diagnóstico o tratamiento de cáncer

Introducción

El cáncer es una de las principales patologías que afectan a la población a nivel mundial y se han logrado grandes avances gracias a la investigación en el campo de la biomédica trabajado de forma interdisciplinaria. La investigación traslacional incluye dos áreas de traducción. Uno es el proceso de aplicar los descubrimientos generados durante la investigación en el laboratorio y en los estudios preclínicos, al desarrollo de ensayos y estudios en humanos. La segunda área de traducción se refiere a la investigación destinada a mejorar la adopción de las mejores prácticas en la comunidad. La rentabilidad de las estrategias de prevención y tratamiento también es una parte importante de la ciencia traslacional. En otras palabras, conocer en mayor detalle los procesos biológicos que caracterizan esta enfermedad permite acelerar la introducción de nuevas técnicas moleculares a la práctica clínica habitual, mejorando las estrategias de prevención y manejo de los pacientes.

La señalización celular se refiere al mecanismo de comunicación entre las células dentro de los organismos impulsado por señales mecánicas, como el tacto, o señales químicas, como hormonas, factores de crecimiento y neurotransmisores. En las vías de señalización, los estímulos se transmiten a través de un proceso en cascada para producir la respuesta correcta y adecuada. Los ejemplos de vías de señalización celular incluyen la señalización de lípidos, insulina, estrés, crecimiento, de TOR (red proteica de regulación para una amplia gama de procesos involucrados en el crecimiento y la diferenciación celular) y la señalización de puntos de control.

Para esta actividad se simulará una proteína de interés en la señalización que estimula la proliferación de tumores malignos y una técnica de detección preferiblemente cualitativa que pueda ser utilizada para el diagnóstico y medición de progreso de la enfermedad. Es una

forma de visualizar el impacto que puede tener la investigación traslacional y el desarrollo tecnología para presentar una simulación en la solución de un problema real y complejo relacionado con la salud; además de considerar el aspecto económico potencial que puede generar la investigación aplicada.

GLOSARIO

Término	Definición
absorbancia	también conocida como densidad óptica (DO), es la cantidad de luz absorbida por una solución y se relaciona con la concentración de la muestra
cáncer	conjunto de enfermedades que se pueden originar en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo cuando células anormales crecen de forma descontrolada, sobrepasan sus límites habituales e invaden partes adyacentes del cuerpo y/o se propagan a otros órganos
ciclo celular	Proceso por el que pasa una célula cada vez que se divide.
concentración	Determina la proporción de soluto y disolvente en una solución química.
curva de calibración	Método general para determinar la concentración de una sustancia en una muestra desconocida comparando la desconocida con un conjunto de muestras estándar de concentración conocida.
diagnóstico clínico	Identifica una enfermedad, afección o lesión en función de los signos y síntomas, historial de salud, examen físico y resultados de pruebas médicas del paciente.
disolvente	Componente de una solución que está presente en la mayor cantidad. Es la sustancia en la que se disuelve el soluto.
enlace peptídico	Enlace covalente formado entre dos aminoácidos. Los organismos vivos usan enlaces peptídicos para formar largas cadenas de aminoácidos, conocidas como proteínas.
espectrofotometría	Técnica de laboratorio que mide nivel de luz transmitido o absorbido a una cierta longitud de onda resulta proporcional a la concentración del material en la muestra.

Término	Definición
gráfica de regresión lineal	Intenta modelar la relación entre dos variables ajustando una ecuación lineal a los datos observados. La regresión lineal consiste en encontrar la línea recta que mejor se ajusta a través de los puntos.
investigación aplicada	Aquellos procesos que buscan convertir el conocimiento científico puro, en un conocimiento práctico y útil para la sociedad.
investigación traslacional	Está relacionada con la aplicación de ideas, conocimientos y descubrimientos generados por las investigaciones de diferentes disciplinas, para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades.
longitud de onda	La distancia física entre dos puntos a partir de los cuales la onda se repite.
proteína	Macromoléculas formadas por cadenas de aminoácidos que están unidos por enlaces peptídicos. Son esenciales para el funcionamiento de los seres vivos.
señalización celular	Mecanismo de comunicación entre las células dentro de los organismos impulsado por señales mecánicas, químicas, factores de crecimiento y neurotransmisores. En las vías de señalización, los estímulos se transmiten a través de un proceso en cascada para producir la respuesta correcta y apropiada.
solución	Mezcla homogénea de dos o más sustancias. La sustancia disuelta se denomina soluto y la sustancia donde se disuelve se denomina disolvente.
solución stock (solución madre)	Solución de alta concentración que se diluirá para su uso de acuerdo a la necesidad de los experimentos.
soluto	Sustancia disuelta en un determinado disolvente, cuya proporción en él forma la concentración.

Objetivos:

Durante la lección el estudiante:

1. explica la importancia de regulación en el ciclo celular y que alteraciones pueden dar paso a enfermedades como el cáncer.
2. describe cómo la señalización celular es el mecanismo de comunicación entre las células dentro de los organismos impulsado por diferentes estímulos (entre ellas proteínas específicas) que se transmiten a través de un proceso en cascada para producir la respuesta y se pueden utilizar como herramienta de diagnóstico o tratamiento médico.
3. construye una curva de calibración de albúmina por medio de espectrofotometría o colorimetría visual como método alternativo, utilizando el reactivo biuret para determinar la concentración de la proteína de interés para el diagnóstico de cáncer.
4. determina la sensibilidad de la herramienta de diagnóstico de cáncer por medio de ensayo de prueba Biuret con muestras de pacientes simuladas con proteína de huevo, leche, gelatina sin sabor, control positivo con albúmina y control negativo con agua destilada.
5. presenta hallazgos de su investigación en el Foro de Innovación Biomédica que se celebrará en clase.

Materiales: (por estación de trabajo)

- 4 mL de solución stock de albúmina de clara de huevo: 10mg/ml
- 20 mL de reactivo Biuret
- 20 mL de SDS al 0.5 %
- 0.4g de clara de huevo
- 0.4g de gelatina sin sabor
- 15 mL de H₂O destilada
- 10 tubos de ensayo
- 1 gradilla
- 2 tubos cónicos con tapa de 50 mL
- 1 micropipeta de 1000µL con puntas
- 1 micropipeta de 200µL con puntas
- 1 contenedor para descartar puntas de micropipeta

- 11 cubetas de espectrofotometría
- 1 paquete de “Kimwipes”
- 1 marcador indeleble
- 1 papel cuadriculado
- 1 regla

Equipo:

- 1 balanza (con capacidad de medir 0.4g)
- 1 espectrofotómetro / método alternativo por colorimetría visual directa (si no hay un espectrofotómetro disponible)
- 1 probeta de 10 mL
- 1 calculadora
- 1 computadora con programa Excel

Trasfondo de ensayo Biuret:

El ensayo de proteínas Biuret es un método colorimétrico que permite determinar la concentración de proteínas de una muestra mediante espectroscopía ultravioleta-visible a una longitud de onda de 540 nm (para detectar el ión Cu^{2+}). El reactivo Biuret se coordina con los enlaces peptídicos de las proteínas y en el centro de la molécula se atraen iones de cobre bajo condiciones de pH básico o alcalino. Ese complejo coordinado que forma el cobre es de un color violeta el cual su intensidad depende de la cantidad de proteína y que se puede medir cuantitativa con un espectrofotómetro presentando un máximo de absorción a un largo de onda de 540 nm o por método alternativo de forma cualitativa por medio de colorimetría visual directa.

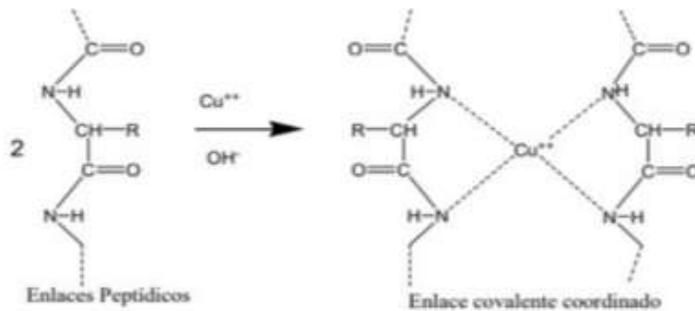


Fig. 1 Reacción Biuret que produce el cambio en color en presencia de enlaces peptídicos, pH alcalino e iones de Ca^{2+}

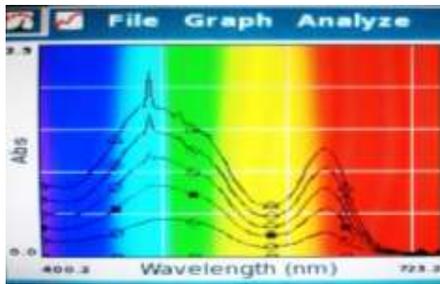


Fig. 2 Espectrofotometría (Método Cuantitativo)
(Método Cualitativo)

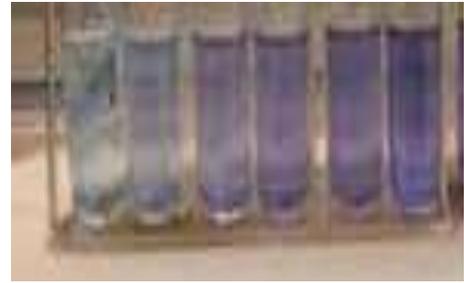


Fig. 3 Colimetría visual directa
(Método Cualitativo)

Procedimiento:

Parte A. Preparar muestras de “pacientes”, controles positivo y negativo

10. Rotule con las letras o símbolo correspondiente cuatro tubos de ensayo asignando un nombre a cada uno:

- “Paciente **A**” (**PA**)
- “Paciente **B**” (**PB**)
- Control Positivo (**C+**)
- Control Negativo (**C-**)

11. Pese 0.4 g de gelatina sin sabor en polvo y transféralo a un tubo cónico de 50 mL al que rotulará como **muestra PA**.

12. Pese 0.4 g de clara de huevo y transféralo en el otro tubo cónico de 50 mL al que rotulará como **muestra PB**.

13. Añada 10 mL de SDS al 0.5% a cada tubo cónico que tienen las “muestras de pacientes”. SDS es un detergente que ayudará a liberar las proteínas en solución. Agite las muestras durante 10 segundos, luego deje reposar las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos.

14. Eche 500 μ L de solución stock de albúmina 10mg/mL al tubo de ensayo **C+**.

15. Añada 500 μ L de H₂O_d al tubo de ensayo **C+** y agite la solución.

16. Eche 1000 μ L de H₂O_d al tubo de ensayo **C-**.

17. Una vez pasen los 10 min del paso #4, transfiera 1000 μ L de las solución **muestra PA** al tubo de ensayo rotulado **PA** y descarte la punta de la micropipeta.

18. Luego, transfiera 1000 μ L de la solución **muestra B** al tubo de ensayo rotulado **PB** y descarte la punta de la micropipeta.

Parte B. Preparar soluciones estándar para curva de calibración:

4. Rotule los de tubos de ensayo con los números del 1 al 6.
5. Pipetear la cantidad de agua en cada tubo según indica la Tabla 1.
6. Añada la cantidad de solución stock de albúmina (concentración 10 mg/mL) de acuerdo a lo que corresponde a cada tubo según Tabla 1.

*Equivalencia 1000 μ L=1mL (Si no tiene micropipetas disponibles puede ajustar el volumen total a 10 mL y aumenta proporcionalmente la cantidad que indica la tabla para que pueda hacer el ejercicio utilizando una probeta)

Tubo	Volumen en μ L de H ₂ O _d	Volumen en μ L de Solución Stock Albúmina 10mg/mL	Concentración en mg/mL	Absorbancia $\lambda=540$ nm
#1	1000	0	0.0	
#2	900	100	1.0	
#3	800	200	2.0	
#4	700	300	3.0	
#5	600	400	4.0	
#6	500	500	5.0	

Tabla 1. Volumen de agua destilada y solución stock de albúmina a añadir por tubo para la preparación de estándar de calibración.

Parte C. Espectrofotometría:

13. Añada 2 mL de reactivo Biuret a cada tubo de ensayo de la Parte A y B.
14. Tapar los tubos y agitar brevemente.
15. Deje reposar todos los tubos a temperatura ambiente durante 15 minutos.
16. Mientras espera, encienda el espectrofotómetro. La mayoría de los espectrofotómetros necesitan calentarse antes de que puedan dar una lectura precisa.

17. Si utiliza cubetas reutilizables, asegúrese de limpiarlas correctamente antes de usarlos. Enjuague bien cada cubeta con agua destilada.
18. Al manipular la cubeta, evite tocar los lados por los que pasará la luz (generalmente, los lados transparentes del recipiente). Si toca accidentalmente estos lados, limpie la cubeta con un "kimwipe" (que están formulados para evitar rayaduras).
19. Cargue el volumen adecuado de la muestra en la cubeta. Siempre que la luz del equipo atraviese el líquido y no una parte vacía del recipiente, obtendrá una lectura precisa. Asegúrese de colocar las cubetas en orden para que la lectura corresponda a la muestra correcta.

***Si usa una pipeta para cargar sus muestras, use una punta nueva para cada muestra para evitar la contaminación cruzada.**

20. Prepare una cubeta conocida como blanco, es la solución de control que solo tiene el solvente químico en el que se disuelve las muestras a analizar. En nuestro caso utilizaremos el reactivo Biuret.
21. Limpie el exterior de la cubeta. Antes de colocar la cubeta en el espectrofotómetro, debe asegurarse de que esté lo más limpia posible para evitar la interferencia de suciedad o partículas de polvo. Con un paño sin pelusa, elimine las gotas de agua o el polvo que pueda haber en el exterior de la cubeta.
22. Calibre la máquina con el blanco. Coloque el blanco en el portacubetas. **Va a realizar la lectura de absorbancia en la longitud de onda a 540 nm.** Establezca valor del blanco en 0. Cuando retire el blanco, la calibración aún estará en su lugar. Al medir el resto de sus muestras, la absorbancia del blanco se restará automáticamente.
23. Retire el blanco y pruebe la calibración. Vuelva a colocar el blanco en la máquina y asegúrese de que la lectura debería quedar en 0.
Retire el blanco y coloque cada una de las muestras en la máquina. **Va a realizar la lectura de absorbancia en la longitud de onda a 540 nm.** Espere unos 10 segundos hasta que los números digitales dejen de cambiar. Para facilitar el registro los valores de absorbancia, debe anotarlos en la tabla de datos que corresponda y que se encuentran en la Hoja de trabajo Actividad #1.



Fig 4. Ejemplo de resultados obtenidos. De izquierda a derecha tenemos blanco solo con Biuret, luego leche que cambia de color (no es recomendado porque se precipita y hay turbidez en muestra - lo puede considerar solo de demostración al inicio de actividad), luego gelatina sin sabor y al final clara de huevo.

Parte C. Preparar gráfica de regresión lineal para curva de calibración estándar

Para determinar la concentración real de proteína en las muestras desconocidas

es necesario graficar la curva estándar (concentración en el eje x y en el

eje y de absorbancia) e interpolar los valores de absorbancia de las “muestras de pacientes”.

Un método más exacto es realizar un análisis de regresión lineal en la curva estándar que

producirá la ecuación para una línea recta: $y = mx + b$. Con esta ecuación se puede calcular la

concentración ingresando el valor de absorbancia de cada muestra de concentración

desconocida (las “muestras de pacientes”) en la ecuación como el valor de y y luego resolver

para x.

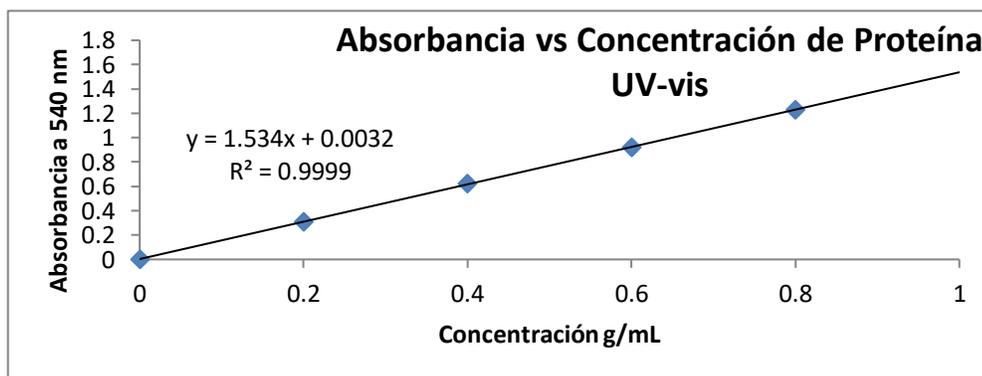


Figura 5. Ejemplo de gráfica de regresión lineal correspondiente a la curva de calibración estándar.

HOJA DE TRABAJO ACTIVIDAD #1

¿Cómo podemos innovar en el diagnóstico y tratamiento del cáncer?

1/2

Actividad STEM con enfoque investigación traslacional y aplicada

Actividad I: Experimento simulación para determinar la presencia de proteína de interés relacionada al diagnóstico o tratamiento de “cáncer”

En esta hoja tienes disponible la tabla de datos y preguntas que debes contestar luego de realizar el experimento.

Parte B. Curva de calibración de soluciones estándar de albúmina

Tubo	Volumen en μL de H_2O_d	Volumen en μL de Solución Stock Albúmina 10mg/mL	Concentración en mg/mL	Absorbancia $\lambda=540\text{nm}$
#1	1000	0	0.0	
#2	900	100	1.0	
#3	800	200	2.0	
#4	700	300	3.0	
#5	600	400	4.0	
#6	500	500	5.0	

Observaciones:

Parte C. Espectrofotometría de “muestras de pacientes”

Tubo	Absorbancia $\lambda=540\text{nm}$	MÉTODO ALTERNO Resultado por Colorimetría (Positivo o Negativo)	Concentración en mg/mL
PA			
PB			
C+			
C-			

Observaciones:

Para determinar la concentración real de proteína en las muestras desconocidas es necesario graficar la curva estándar (concentración en el eje x y en el eje y de absorbancia) e interpolar los valores de absorbancia de las “muestras de pacientes”. El método exacto es realizar un análisis de regresión lineal en la curva estándar que producirá la ecuación para una línea recta: $y = mx+b$. Con esta ecuación se puede calcular la concentración ingresando el valor de absorbancia de cada muestra de concentración desconocida (las “muestras de pacientes”) en la ecuación como el valor de y y luego resolver para x.

Preguntas:

¿Qué importancia tiene para un médico poder cuantificar proteínas en una muestra biológica?

¿Qué importancia tiene para un médico poder cuantificar proteínas en una muestra biológica?

1. ¿Cuál fue el resultado de las “muestras de pacientes”?

2. ¿Cómo se validó que el resultado es confiable?

3. ¿Qué importancia en el campo de la medicina puede tener la identificación de una proteína relacionada al cáncer?

4. ¿Qué reconoce o detecta el reactivo Biuret?

5. ¿Cuándo es positivo el ensayo de proteínas de Biuret?

6. ¿A qué longitud de onda se mide la absorbancia en el ensayo de proteínas de Biuret?

7. ¿Cuál es la diferencia en utilizar el ensayo de proteínas de Biuret por colorimetría visual directa vs espectrofotometría?

ACTIVIDAD 2: Foro de Innovación Biomédica

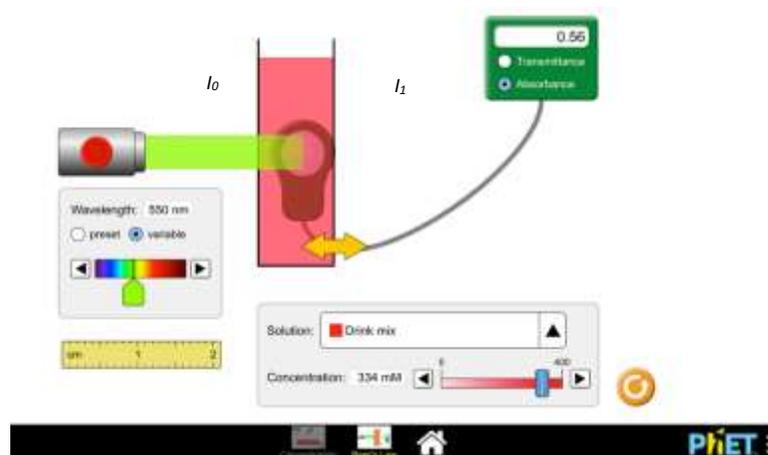
Para el cierre de la lección se realizará un Foro de Innovación Biomédica donde cada grupo de 2/2 de estudiantes presenta hallazgos de su investigación explicando a la comunidad científica la relevancia de su logro en el diseño de herramienta de diagnóstico o tratamiento de un tipo específico de cáncer. Deben prepararse haciendo revisión literaria de al menos cinco artículos científicos recientes y de fuentes confiables. Es fundamental explicar el principio científico de su producto y destacar el impacto a nivel social y económico. El tiempo de presentación será de quince minutos y se le suministrará una rúbrica con los criterios de evaluación. (Ver Anejo B)

Notas sobre espectrofotometría

La espectrofotometría es la medida de la absorción de la luz por una sustancia en solución. La cantidad de luz absorbida es proporcional a la concentración de la sustancia en solución. La absorción varía con la longitud de onda de la luz, debiendo efectuarse la medida usando luz de longitud de onda de máxima absorción (λ_{\max}), que es característica de cada sustancia. Las sustancias coloreadas tienen una λ_{\max} en la región visible del espectro. Otras sustancias absorben luz de otras regiones del espectro y no son detectadas por el ojo humano. Para conocer la concentración de una sustancia coloreada en solución se podría comparar visualmente la intensidad de color de dicha solución frente a una o varias soluciones de concentración conocida. Sin embargo, resulta más preciso utilizar un aparato como el espectrofotómetro, que mide la cantidad de luz que atraviesa una solución.

La ley de Beer-Lambert es una regla que define la relación entre las características de una sustancia y la cantidad de luz absorbida por una sustancia cuando le atraviesa un haz de luz. La relación anterior de forma simplificada se puede ser expresada de la siguiente manera:

$$A = \varepsilon \cdot \ell \cdot c$$



Donde,

A es la absorbancia, esto es, la cantidad de luz absorbida.

I_1 es la intensidad luminosa saliente.

I_0 es la intensidad luminosa entrante.

ε es el coeficiente de extinción molar, que es una constante de proporcionalidad.

ℓ es la longitud atravesada por la luz en el medio.

c es la concentración de la sustancia

From: <https://phet.colorado.edu/sims/html/beers-law-lab>

Nombre del equipo: _____ ANEJO B

RÚBRICA DE EVALUACIÓN PRESENTACIÓN EN “FORO CIENTÍFICO”

ASPECTOS	4 puntos	3 puntos	2 puntos	1 punto
Descripción del producto de innovación científica aplicada	La descripción es breve y clara. Destacan los aspectos más relevantes del producto.	La descripción es breve y clara. Destacan algunos de los aspectos más relevantes del producto.	La descripción es correcta. No destacan los aspectos más relevantes del producto. Se da una idea muy general del mismo.	La descripción es confusa. No destacan los aspectos más relevantes del producto. Éste se entiende con dificultad, dando una idea incompleta del mismo.
Habilidades comunicativas	Utilizan un vocabulario científico, formal y variado. Destaca el uso de metáforas y de figuras retóricas que captan la atención. El lenguaje verbal acompaña y aporta dinamismo y ritmo al discurso.	Utilizan un vocabulario formal y variado. El lenguaje verbal acompaña y aporta dinamismo y ritmo al discurso.	Utilizan un vocabulario limitado. El lenguaje verbal acompaña y aporta dinamismo y ritmo al discurso.	Utilizan un vocabulario limitado. El lenguaje verbal no aporta dinamismo, se les nota tensos y la postura es estática.

ASPECTOS	4 puntos	3 puntos	2 puntos	1 punto
Información previa	El equipo se ha asesorado, ha investigado exhaustivamente y dispone de una información completa y detallada del tema objeto de estudio y la forma de realizar su diseño experimental simulado.	El equipo se ha asesorado, ha investigado y dispone de bastante información del tema objeto de estudio y la forma de realizar el experimento	El equipo dispone de cierta información acerca del tema objeto de estudio y la forma de realizar el experimento	El equipo carece o tiene muy poca información del tema objeto de estudio y la forma de realizar el experimento
Participación y colaboración	Todos los miembros del equipo han participado activamente en las tareas propuestas y han colaborado ayudando a los demás.	La mayor parte de los miembros del equipo han participado activamente en las tareas propuestas y han colaborado ayudando a los demás.	La mitad de los miembros del equipo ha participado activamente en las tareas propuestas y han colaborado ayudándose entre sí.	Solo un miembro del equipo (o ninguno) ha participado de forma activa en las tareas propuestas y no ha habido colaboración ni ayuda entre ellos.
Planteamiento del problema	-Contextualiza claramente el problema y su justificación.	-Hay buena contextualización del problema y su	-Hay una contextualización adecuada del problema y su	-Hay poca contextualización del problema y su justificación.

ASPECTOS	4 puntos	3 puntos	2 puntos	1 punto
	-Las preguntas, objetivos e hipótesis de la investigación son claros y bien delimitados.	justificación. -Las preguntas, objetivos e hipótesis de la Inv. son claros y suficientemente delimitados.	justificación. -Las preguntas, objetivos e hipótesis de la Inv. son adecuados y bien delimitados.	-Las preguntas, objetivos e hipótesis no están suficientemente delimitados.
Asume los límites del trabajo presentado y las posibilidades de futuro, y propone maneras de continuarlo y nuevas preguntas	-Valora la fiabilidad de los resultados obtenidos y reconoce los límites del trabajo y posibles datos o pruebas que habría que repetir. -Expresa posibles maneras de continuar la investigación y se plantea nuevas preguntas investigables o dudas que le han surgido.	-Reconoce si hubiese o no que hacer más pruebas para validar los resultados, pero no sabe decidir qué. -Expresa posibles maneras de continuar la investigación y se plantea nuevas preguntas pero que son difícilmente investigables.	-Precisa ayuda para reconocer si necesita más pruebas o datos para validar los resultados. - Expresa alguna manera de continuar la investigación, pero no se plantea nuevas preguntas.	No se plantea si los resultados del trabajo hecho son o no fiables y las propuestas que hace de continuar la investigación son inadecuadas.
Total ___ / 24				