

Del campo
al laboratorio:

Integración de procedimientos para el estudio **de moscas**

Luz M. Gómez P.
Giovan F. Gómez G.
Editores

Facultad de Derecho y Ciencias Forenses - Tecnológico de Antioquia



Tecnológico
de Antioquia
Institución Universitaria
VIGILADA MINEDUCACIÓN



Grupo de Investigación
Ciencias Forenses y Salud



Del campo al laboratorio:

Integración de procedimientos para el estudio de moscas

Facultad de Derecho y Ciencias Forenses
Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria



**Tecnológico
de Antioquia**
Institución Universitaria

VIGILADA MINEDUCACIÓN



Grupo de Investigación
Ciencias Forenses y Salud



Gómez, L., Gómez, G., Editores. (2018).

Del campo al laboratorio:

Integración de procedimientos para el estudio de moscas

p. - 17 x 24 cm.

ISBN: 978-958-59925-9-7

Del campo al laboratorio:

Integración de procedimientos para el estudio de moscas

Primera edición: Noviembre 2018

Tiraje: 350

Edición física y virtual

Derechos reservados de la presente edición

© Grupo de Investigación Ciencias Forenses y Salud

© Facultad de Derecho y Ciencias Forenses, Tecnológico de Antioquia

Corrección de estilo: Divegráficas S.A.S.

Carátula: Divegráficas S.A.S.

Diagramación e impresión: Divegráficas S.A.S.

© Sello Editorial Publicar-T

Tecnológico de Antioquia

Calle 78b # 72A - 220

(+57 4) 444 3700

Medellín – Colombia

Queda rigurosamente prohibida, sin la autorización escrita de los titulares del copyright, bajo las sanciones establecidas en las leyes, la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento, comprendidas las lecturas universitarias, la reprografía y el tratamiento informático y la distribución de ejemplares de ella mediante alquiler público.

Hecho en Colombia.

Tabla de contenido

Presentación	5
Método para la recolección de moscas necrófagas (Diptera, Calyptratae) en ambientes tropicales	9
Manejo del estereomicroscopio	19
El microscopio: fundamentos para su uso	25
Identificación y montaje de adultos de moscas de importancia forense	33
Disección, aclarado mediante el uso de ácido láctico y almacenamiento de genitales de moscas (Diptera: Calyptratae)	43
Fotografía de especímenes en el estereomicroscopio	53
Montaje de alas de moscas para análisis morfométricos basados en puntos de referencia	63
Gestión de información de colecciones de investigación biológica mediante el programa Specify 6: Importación de datos desde Excel	69
Extracción de ADN a partir de insectos con buffer de macerado	87



Preparación de solución de lisis para extracción de ADN descrito por Collins et al. (1987)	93
Extracción de ADN con DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN), modificado para insectos	99
Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa clásica	105
Uso del termociclador piko 96 Thermo Scientific	117
Protocolo de preparación de muestras para envío a secuenciación (Caso MacroGen)	127
Protocolo para el préstamo de material de la Colección Entomológica, Tecnológico de Antioquia (CETdeA)	135
Gestión de información de colecciones de investigación biológica mediante el programa Specify 6	141
Protocolo de lavado y esterilización de material en autoclave semiautomatizado	159
Electroforesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) en gel de agarosa	163
Protocolo para la limpieza y funcionamiento de la cámara de condiciones ambientales controlada	171
Anexos	189



Presentación

Una de las aplicaciones principales de la entomología forense en el área médico-legal es la identificación de los insectos asociados a cadáveres, información utilizada como paso inicial para estimar el intervalo post mortem (IPM) y obtener información adicional relevante en la investigación criminalística. El estudio de los insectos, y en especial de las moscas, provee información que permite reconstruir la cronología del suceso. Aunque la entomología forense ha sido utilizada hace más de dos siglos, su evolución ha sido lenta y se requiere que un número mayor de investigadores se dediquen a su estudio.

Este manual de laboratorio se ha concebido como un referente metodológico que aborda desde la colección de especímenes hasta su identificación morfológica y molecular, y pretende ser de ayuda tanto a investigadores que inician en este campo, como a investigadores expertos. Su elaboración ha sido posible gracias a la contribución de miembros del Grupo de Investigación en Ciencias Forenses y de la Salud (GICFS) del Tecnológico de Antioquia, quienes durante los últimos 10 años han realizado diversas investigaciones en el área. Aunque el manual se encuentra enfocado en los equipos y procedimientos técnicos del Laboratorio del GICFS, en cada capítulo se ha referenciado información clave que provee el punto de partida para adaptar los métodos señalados a condiciones particulares de cualquier laboratorio.



En la elaboración de este manual han participado varios miembros del GICFS y del semillero INSECTA:

 Eduardo C. Amat G.

Biólogo, MSc, PhD . Docente-Investigador, Facultad de Derecho y Ciencias Forenses, Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria. ecamat@gmail.com

 Manuel A. Ramírez M.

Licenciado en Biología, MSc. Docente-Investigador, Facultad de Derecho y Ciencias Forenses, Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria. mramirez1@tdea.edu.co

 Adriana M. Pérez H.

Técnica en histocitotecnología, estudiante de Biología. Auxiliar de Investigación, Facultad de Derecho y Ciencias Forenses, Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria. adriperezo6@gmail.com

 Isabel C. Cadavid S.

Ingeniera Biológica, MSc, estudiante de doctorado. Investigadora, Facultad de Derecho y Ciencias Forenses, Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria. isacadavidg@hotmail.com

 Juliana Pérez P.

Ingeniera Biológica, MSc. Investigadora, Facultad de Derecho y Ciencias Forenses, Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria. jperezp1017@gmail.com

 Ana M. Varela P.

Tecnóloga en agroambiental. Microbióloga Industrial y Ambiental. Auxiliar de Investigación, Facultad de Derecho y Ciencias Forenses, Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria. analilith8827@gmail.com





Alejandra Pérez.

Pasante de investigación, Facultad de Derecho y Ciencias Forenses, Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria. perezcaleja@gmail.com



Yésica Durango M.

Tecnóloga en Investigación Judicial. Profesional en Criminalística. jrmdo22o@gmail.com



Andrés L. Rubio.

Biólogo. Candidato a PhD. Docente-Investigador. Facultad de Derecho y Ciencias Forenses, Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria. alopezru@tdea.edu.co



Giovan F. Gómez G.

Microbiólogo. Doctor en Ciencias Básicas Biomédicas. Docente-Investigador, Facultad de Derecho y Ciencias Forenses, Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria. giovan.gomez@tdea.edu.co



Luz M. Gómez P.

Bacterióloga y laboratorista clínica, MSc en Entomología, PhD. Docente-Investigadora, Facultad de Derecho y Ciencias Forenses, Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria. lgomez@tdea.edu.co



Método para la recolección de moscas necrófagas (Diptera, Calyptratae) en ambientes tropicales

Eduardo Amat

A. Fundamento teórico

El interés de los entomólogos en estudiar los dípteros (zancudos, moscos y moscas) en particular las moscas calípteras (Diptera, Calyptratae) para diferentes fines ecológicos, médicos, y legales, ha motivado el desarrollo metodológico de su trapeo. Lo que ha generado el uso de trampas novedosas que interceptan físicamente al insecto usando atrayentes naturales o químicos para su captura (Young, 2005). En el caso particular de las moscas necrófagas se documenta el uso de necrotrampas y coprotrampas, que ofrecen al insecto una fuente de alimentación y ovoposición. Algunos estudios ecológicos han demostrado que la composición de especies y el número de especímenes recolectados en un área pueden variar dependiendo de la trampa o el atrayente utilizados, razón por la cual la selección cuidadosa de la(s) trampa(s) es relevante al momento de iniciar cualquier estudio (Vessby, 2001). Es recomendable delinear y limitar claramente los objetivos del estudio o investigación, con el objeto de elegir la metodología de captura más adecuada, teniendo en cuenta el esfuerzo de muestreo en ambientes altamente diversos como los ambientes tropicales. Proponemos un método de colecta de fácil operación, altamente replicable y considerablemente eficiente en la recolección de moscas necrófagas habitantes de ambientes tropicales.



B. Objetivo

Describir la metodología de recolección de moscas carroñeras o descomponedoras, de las familias Calliphoridae, Sarcophagidae, Muscidae y Fanniidae, colonizadoras de carcasas en descomposición.

C. Requerimientos

Materiales

- Bisturí
- Bolsas para basura (varios tamaños) (x24)
- Bolsa plástica o costal (Fig. 1a)
- Bolsas de cierre hermético (varios tamaños) (mínimo 1 x trampa) (Fig. 1b)
- Botella con atomizador pequeña (Fig. 1c)
- Cuerda (8 metros x trampa) (Fig. 1d)
- Frasco de plástico tapa rosca (2-3 x trampa) (Fig. 1e)
- Pinzas entomológicas (Fig. 1f)
- Platos plásticos o desechables (Fig. 1g)
- Nevera de poliestireno (Icopor) pequeña (Fig. 1h)
- Lapicero de tinta indeleble (Fig. 1i)
- Libreta de campo (Fig. 1i)
- Trampas Van Someren Rydon modificadas (Fig. 2d)
- Cebo (se recomienda 250 g de vísceras de pollo y cabeza de pescado en descomposición por trampa) (Fig. 3)
- Cintas de colores vistosos (para marcar el punto de muestreo)
- Guantes quirúrgicos
- Marcador indeleble punta fina
- Navaja o bisturí
- Pincel
- Tijeras

Reactivos

- Alcohol 70 %
- Antibacterial

Equipos

- Cámara fotográfica
- GPS (geoposicionador)
- Microestación climática portátil



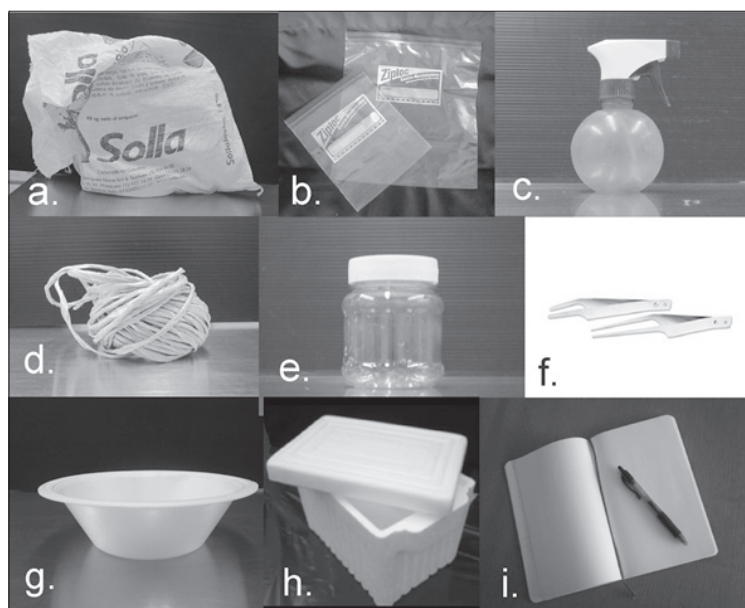


Figura 1. Materiales utilizados en campo durante la captura de moscas con Van Someren-Rydon modificada para moscas. a) Saco plástico para el transporte de las trampas. b) Bolsas plásticas tipo ziploc para embalar los frascos y muestras. c) Botella con atomizador para almacenar alcohol con el objeto de higienizar manos o muestras. d) Cuerda o cordel para colgar y amarrar las trampas. e) Frascos plásticos de 200 ml para almacenar muestras en alcohol. f) Pinzas suaves entomológicas para manipular insectos. g) Platos de poliestireno para colocar el atrayente. h) Nevera de poliestireno para el transporte de los atrayentes. i) Libreta para los apuntes en campo.

Fuente: Imágenes originales del autor.



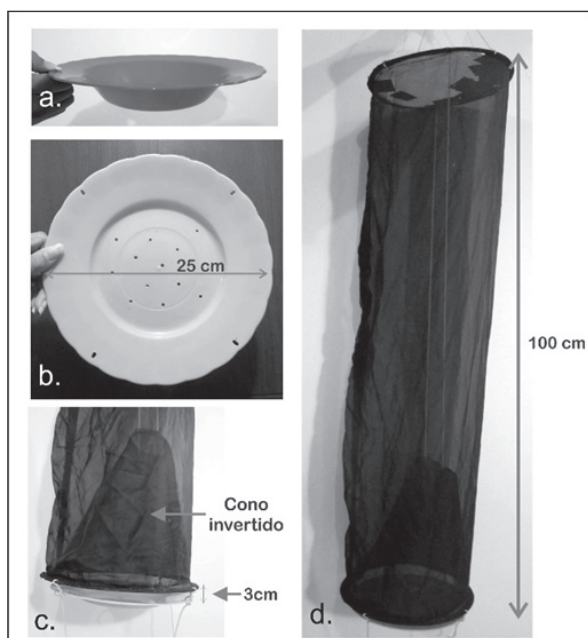


Figura 2. Modo de ensamble e instalación de la trampa Van Someren-Rydon modificada para moscas. a) Detalle de la profundidad del plato de plástico utilizado en la base. b) Detalle del diámetro del plato con orificios de drenaje. c) Detalle del cono invertido en la base de la trampa y distancia del plato. d) Trampa tipo Van Someren-Rydon modificada para moscas ensamblada.

Fuente: Imágenes originales del autor.

D. Procedimiento

1. Rotulación

Para facilitar el correcto procedimiento en la toma y rotulación de la información de la recolección y el trampeo, se recomienda asignar un código a cada evento de captura, p. ej. SMBT₀₁, donde SM corresponde a las iniciales de la localidad de recolección, para este caso Santa Marta; seguida de B, que indicaría el hábitat que se evaluará: Bosque, y T₀₁ corresponde al número de la trampa. El número de la trampa siempre será un número consecutivo, para evitar confusión al momento del análisis y tabulación de los resultados. Ej. SMPT₀₁



Siempre anote en su libreta de campo el significado del código al momento de asignarlo. Se recomienda tener listas varias etiquetas con estos códigos y preparar una bolsa de cierre hermético con 2-3 frascos plásticos con alcohol (3/4 de lleno) y la etiqueta lista en su interior, este procedimiento le ahorrará tiempo en campo y evitará la confusión en la rotulación de las muestras. Es importante que la rotulación se realice con lapiceros de tinta indeleble o lápiz.

2. Trampa y atrayente

La trampa Van Someren-Rydon modificada para moscas guarda similitud con la original diseñada para mariposas. Consiste en un cilindro de tul con bases circulares y una apertura lateral diseñada para recolectar los especímenes. Sus dimensiones son: base circular con un diámetro de 25 cm x 100 cm de alto (Fig. 2d); sin embargo, se proponen dos modificaciones con el objetivo de asegurar la efectiva entrada de insectos y evitar el escape de las moscas atraídas, las cuales consisten en la ubicación de un embudo invertido en la base inferior de la trampa y la disminución del espacio entre la base inferior y el plato o recipiente donde se coloca el atrayente (Fig. 2c).

El cebo o atrayente dispuesto puede estar constituido por 250 gramos de vísceras de pollo y cabezas de pescado (en proporciones iguales). Previo al muestreo, para cada trampa el cebo mencionado se mezcla y almacena, preferiblemente en bolsas plásticas pequeñas. Estas bolsas bien cerradas se dejarán como mínimo 4 días a una temperatura ambiente de aproximadamente 25 °C (dependiendo de la temperatura promedio del lugar ± 2 días), con el fin de que inicie su proceso normal de descomposición. Este tipo de preparación es para recolectar moscas que sean atraídas por el estado fresco y activo de descomposición.

Es importante dejarlas en un espacio abierto, alejado del alcance de aves y mamíferos carroñeros, colgarlas en un árbol puede ser una buena alternativa. En el momento de llevarlas a campo se recomienda transportarlas en una nevera de poliestireno pequeña (Fig. 1h).

3. Disposición de las trampas

La disposición y el número de las trampas dependerá del tipo de estudio que se pretenda llevar a cabo, por ejemplo, si se requiere evaluar la diversidad de moscas según el tipo de hábitat se puede realizar el siguiente tipo de muestreo: cuatro trampas por cada unidad de paisaje o



ambiente a evaluar, separadas por una distancia mínima de 500 metros, esta distancia puede variar según el tamaño del área disponible. Cada trampa operará un periodo mínimo de 48 horas antes de ser recogida. En caso de que se requiera muestrear un periodo de tiempo mayor, se puede hacer un recambio de atrayente.

4. Instalación de la trampa

El primer día de muestreo asegúrese de llevar todos los materiales y equipos para la toma de datos biológicos, climáticos y geográficos. Las trampas que va a utilizar puede transportarlas en bolsa plástica resistente (Fig. 1A), al empacarlas asegúrese de que cada trampa en el extremo superior posea una cuerda de mínimo 8 metros (Fig. 1d). Es importante tener en cuenta que, si el muestreo se hace durante una época lluviosa o existe alta posibilidad de precipitación, es recomendable que proteja la trampa de la lluvia cubriéndola con un plástico (bolsa para basura) (Fig. 3A), si la lluvia es muy fuerte la probabilidad de éxito en la recolección será muy baja, además el atrayente pierde su efectividad por el exceso de humedad y retrasa el proceso normal de descomposición.

Cuando halla decidido el lugar del muestreo seleccione el punto donde colgar la trampa e instalela a una distancia mínima del suelo de 2 a 3 metros, de preferencia una rama de un árbol, ubicada separada del tronco principal con el fin de que ni las hormigas ni los eventuales animales vertebrados carroñeros, como roedores o gallinazos, puedan alcanzar el atrayente.

Seleccionado el lugar, retire la trampa de la bolsa plástica, proceda a amarrar una piedra de aproximadamente 12 cm de diámetro al extremo opuesto de la cuerda que está atada al extremo superior de la trampa. Con la cuerda bien amarrada y asegurada a la piedra proceda a lanzarla por encima de la rama o el lugar donde quedará colgada la trampa. Una vez la trampa quede suspendida (Fig. 3A) tome el extremo de la cuerda amarrado a la piedra, que generalmente queda suspendido, y hale para templar la cuerda. Luego proceda a colocar el atrayente; para esto colóquese los guantes, retírelo de la bolsa y dispóngalo en el plato (Fig. 3b). Después hale la cuerda hasta subir la trampa a la altura indicada. Desate la piedra y amarre este extremo de la cuerda a una rama con un nudo ciego, conserve la piedra para utilizarla en la instalación de la próxima trampa.



Una vez instalada la trampa, tire de la cuerda con el fin de probar su resistencia frente a un posible intento de desmonte por parte de algún animal vertebrado carroñero. Luego quítese los guantes quirúrgicos y descártelos en una de las bolsas para la basura, esta última servirá para descartar todos los guantes utilizados en la instalación de las trampas. Lave sus manos con el alcohol contenido en el atomizador (Fig. 1c) y enseguida use el antibacterial.



Figura 3. A) trampa Van Someren-Rydon suspendida a una rama de árbol. B) Cebo o atrayente utilizado en la trampa para moscas necrófagas.

Instalada la trampa utilice la libreta de campo (Fig. 1i) para anotar los datos sobre el posicionamiento geográfico (coordenadas geográficas) con la ayuda del GPS y los datos climáticos con la microestación climática portátil. Lleve relación de la hora de colecta, temperatura, humedad relativa, precipitación y velocidad del viento en los casos posibles. Amarre una cinta de color llamativo en algún lugar visible para dejar marca del punto de muestreo. Por último, haga un registro gráfico del ambiente o hábitat que circunda la trampa mediante varias fotografías de preferencia panorámicas. El mismo procedimiento se ha de repetir según el número de trampas a instalar.



5. Recolección de especímenes

Transcurridas las 48 horas de operación regrese al punto donde instaló la trampa, y evite perturbar el ambiente con el fin de no intervenir con el efecto del atrayente. Localice el extremo de la cuerda que quedó amarrada al árbol y desátela despacio, y con cuidado baje la trampa hasta llegar aproximadamente a un metro de altura del piso o a una altura en la que sea fácil recolectar las moscas atrapadas.

El sacrificio y montaje de los especímenes idealmente deberá ser en seco con cámara letal y se montaran inmediatamente posterior a su colecta, dada la cantidad de individuos recolectados mediante este tipo de trampas, se hace necesario implementar la preservación temporal en líquido (alcohol al 70 %). Para esto se emplea el frasco de plástico de tapa rosca con alcohol al 70 %, introduzca su mano (utilizando guantes) por el cierre lateral de la trampa y se procede a recolectar las moscas manualmente (Fig. 4); pase la boca del frasco tocando el interior de la trampa con movimientos repetitivos de abajo hacia arriba, una vez las moscas tocan la superficie del alcohol quedan inmersas. Al recolectar todos los especímenes atrapados se deposita una etiqueta en el interior y se cierra el frasco, se rotula y se almacena en la nevera de poliestireno.

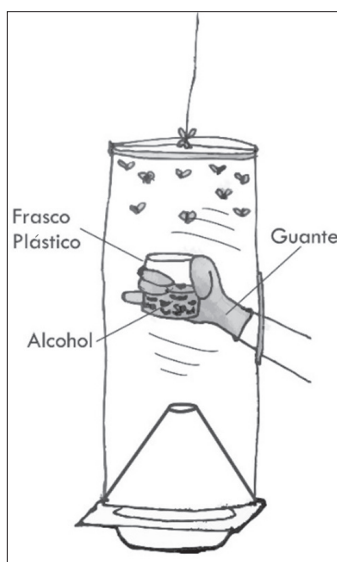


Figura 4. Modo de recolección en líquido de los especímenes atrapados.



Posteriormente retire el plato: con ayuda de las pinzas entomológicas o con un pincel se retiran los especímenes que quedaron atrapados en el cebo o en el plato, y se almacenan igualmente en el frasco plástico. El atrayente debe enterrarse en un sitio alejado del punto de muestreo o desecharse en una bolsa roja, para luego disponerlo en un sitio de desecho de basuras. Algunos resultados preliminares sobre la efectividad esta metodología de trampeo y muestreo pueden consultarse en Amat et al. (2013).

E. Referencias bibliográficas

- Amat, E., Ramírez-Mora, M., Buenaventura, E. R., y Gómez-Piñérez, L. M. (2013). Variación temporal de la abundancia en familias de moscas carroñeras (Diptera, Calyptratae) en un valle andino antropizado de Colombia. *Acta Zoológica Mexicana*, 29(3).
- Vessby, K. (2001). Habitat and weather affect reproduction and size of the dung beetle *Aphodius fossor*. *Ecological Entomology*, 26, 430-435. Recuperado de <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2001.00331.x>
- Young, M. (2005). Insects in flight. In S. R. Leather (Ed.), *Insect Sampling in Forest Ecosystems* (pp. 116–145). UK: Blackwell Publishing. Recuperado de <https://doi.org/10.1002/9780470750513>



Manejo del estereomicroscopio

Adriana Pérez

A. Fundamento teórico

La invención del estereomicroscopio se atribuye al diseñador estadounidense Horatio S. Greenough en el siglo XIX (Goeggel, 2007). También conocido como microscopio de disección, este es utilizado cotidianamente en entomología para lograr la visualización de caracteres morfológicos necesarios para la identificación taxonómica a nivel de familia, género o especie. En estos casos, la percepción de la profundidad y el contraste es crítica para la interpretación de la morfología de la estructura de interés del espécimen.

El estereomicroscopio usa dos trayectorias ópticas separadas para producir una imagen diferente en cada ojo, lo que permite una visión tridimensional del objeto de interés, con acercamientos de 10 a 40 veces la distancia real y sin necesitar de algún tipo de medio especial. Los lentes objetivos, generalmente dos, se encuentran en el interior de un revólver tubular y se caracterizan por tener un bajo poder de aumento (2X o 4X), mientras que el de los lentes oculares oscila de 5X a 10X.



Los estereomicroscopios no poseen condensador ni diafragma, están estructurados por una base de 4 o 5 cm de altura que les sirve al mismo tiempo de platina. Su característica más relevante es la capacidad directa de aumento, por lo que la imagen ampliada se observará en el mismo plano que el objeto real, no invertida como sucede con el microscopio convencional.

Algunos modelos poseen doble iluminación, en la base del equipo contienen un sistema de espejos y prismas que iluminan el espécimen desde abajo y una lámpara localizada en su brazo que ilumina desde arriba (Fig. 1), otros solo tienen una lámpara en su base, y necesitan una lámpara de neón con cuello flexible o de cisne para su uso (Fig. 2). En la Tabla 1 se puede ver la descripción de cada una de las partes del estereomicroscopio.

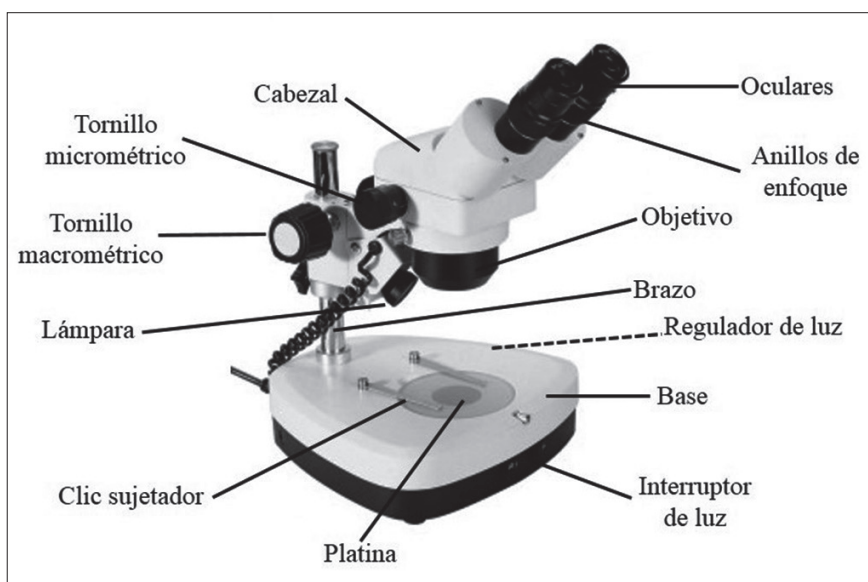


Figura 1. Estereomicroscopio binocular Schönfeld Optik® modelo ZTX-E-C2 con doble iluminación con sus partes indicadas. Imagen modificada tomada de <http://es.made-in-china.com/> [Fecha de consulta: 10 de mayo 2016].



Tabla 1. Descripción de las partes de un estereomicroscopio.

Estructura	Descripción
Lentes objetivos y oculares	Lentes que permiten la magnificación del objeto.
Anillo de enfoque o dioptría	Anillo que se encuentra en el ocular izquierdo y que ayuda a enfocar y a corregir las dioptrías.
Tornillo macrométrico o manilla de enfoque	Permite enfocar el objeto.
Tornillo micrométrico o revólver	Dispositivo que permite intercambiar los objetivos de aumento.
Brazo	Estructura rígida que proporciona soporte a las otras estructuras del equipo.
Lámpara	Fuente de luz situada en el brazo (Fig. 1). Algunos estereomicroscopios no cuentan con lámpara integrada, y la fuente de luz debe ser proporcionada por una fuente externa (Fig. 2).
Platina y Base	Dispositivo de soporte de la muestra.
Clic sujetador	Se encuentra en la base y ayuda a sujetar las muestras.
Interruptor de luz	Botón situado en la base que permite el encendido o apagado del equipo.
Regulador de luz	Perilla o botón que permite regular la intensidad de luz de la lámpara que se encuentra situada en el brazo.





Figura 2. Estereoscópico Leica LED5000 SLI, lámparas LED con cuello de cisne. Imagen tomada de <http://www.leica-microsystems.com> [Fecha de consulta: 10 de mayo 2016].

B. Objetivo

Describir el procedimiento para el uso del estereomicroscopio

C. Requerimientos

Materiales

- Muestra macroscópica (planta, insecto, etc.)
- Pinzas entomológicas
- Soporte móvil
- Caja de Petri

Reactivos

- Alcohol

Equipos

- Estereomicroscopio



D. Procedimiento

Uso del estereomicroscopio

1. Conecte el cordón eléctrico a la fuente de energía.
2. Verifique que el equipo haya sido bien guardado (con su protector, apagado, el nivel de luz ajustado al mínimo), de lo contrario repórtelo en la planilla de uso de equipos.
3. Coloque la muestra en la platina y asegúrela con los clics sujetadores.
4. Encienda el equipo del interruptor.
5. Regule la intensidad y dirección de la luz a su preferencia. Disminuya el uso de la lámpara del estereomicroscopio bajando al mínimo la luz cuando requiera interrumpir por un periodo corto la sesión de trabajo.
6. Ubique la muestra de interés sobre la platina, ayudado de un soporte móvil si el espécimen se encuentra montado en alfiler; en caso contrario, con ayuda de unas pinzas posicione el espécimen de tal manera que facilite la observación del punto de interés.
7. Enfoque la muestra con ayuda del tornillo macrométrico hasta tener una imagen clara.
8. Gire el tornillo micrométrico para definir mucho mejor la imagen y enfocar estructuras de interés.
9. Una vez termine la jornada de trabajo, recuerde limpiar la base del estereomicroscopio con ayuda de una servilleta y alcohol, bajar la luz al mínimo y apagar el interruptor.
10. Desconecte el equipo y cúbralo con el protector para evitar que caiga polvo sobre él, y complete el registro de uso del equipo para considerar la vida útil de la lámpara.

Recomendaciones

- Evite arrastrar el equipo por el mesón de trabajo, la vibración puede ocasionar daños en la óptica. Si requiere mover el equipo tómelo por la base y el brazo y desplácelo.
- Tenga listas las muestras y los implementos que necesite para esta actividad, esto evitará que esté movilizándose de un lado al otro y optimizará el uso del equipo.
- Mantenga siempre el espacio de trabajo limpio.



E. Referencias bibliográficas

Goeggel, D. (2007). The history of stereo microscopy. Part I. [Internet]. Tutorial. Recuperado de: <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-history-of-stereo-microscopy-part-i/> [Consultado el 22 de febrero de 2017].



El microscopio: fundamentos para su uso

Giovan F. Gómez

A. Fundamento teórico

El microscopio fue inventado por el holandés Zaccharias Janssen en el siglo XVI. Años más tarde, en 1655, el inglés Robert Hooke creó el primer microscopio compuesto, que utilizaba dos sistemas de lentes: oculares y objetivos. Por su parte, el holandés Antoni Van Leeuwenhoek, un comerciante y científico neerlandés, fabricó sus propios microscopios monoculares de buen poder de resolución, que lo llevaron al descubrimiento de los glóbulos rojos en 1673, como también al descubrimiento de algunas bacterias y espermatozoides humanos. Por lo anterior, Leeuwenhoek es reconocido como la primera persona en interesarse en observar la naturaleza a través del microscopio (Wollman et al., 2015). Durante los siglos XVIII y XIX se realizaron avances para su mejoramiento, principalmente en Inglaterra. Durante la segunda mitad del siglo XIX, las empresas alemanas Leitz y Zeiss popularizaron el uso del microscopio de luz.



En la actualidad, el campo de la microscopía ha avanzado enormemente y se han desarrollado diferentes tipos de microscopios, entre los cuales podemos encontrar el microscopio simple, el compuesto (invertido, de fluorescencia, de luz ultra violeta, luz polarizada, de contraste de bases de campo oscuro), el electrónico (transmisión y de barrido), entre otros. El microscopio es un equipo que puede ser monocular o binocular y combina dos sistemas de lentes (el lente ocular y los objetivos) que le permiten aumentar la imagen de un objeto. El lente más cercano a la muestra, el objetivo, posee una distancia focal muy corta, por lo cual la luz lo atraviesa y la imagen formada se invierte en cada ocular; la imagen de cada ocular finalmente se integra en el cerebro convirtiéndose en una imagen bidimensional (Epelbaum, 2010). Otra característica del microscopio es su poder de resolución, cuanto mayor sea el poder de resolución de un equipo, mayor será la definición de la muestra. Esta resolución depende de la longitud de onda que se utiliza y la apertura numérica (Montalvo, 2010).

El sistema de iluminación cumple un papel importante, la luz se debe enfocar sobre la muestra y para ello se utiliza otro sistema de lentes llamado condensador, el cual focaliza la luz, y con ayuda del diafragma que posee controla el diámetro de luz que será dirigido hacia la muestra. Este equipo se utiliza principalmente para examinar muestras en montajes frescos o con tinciones.

Las partes y funciones del microscopio de luz se detallan en la Figura 1 y la Tabla 1.



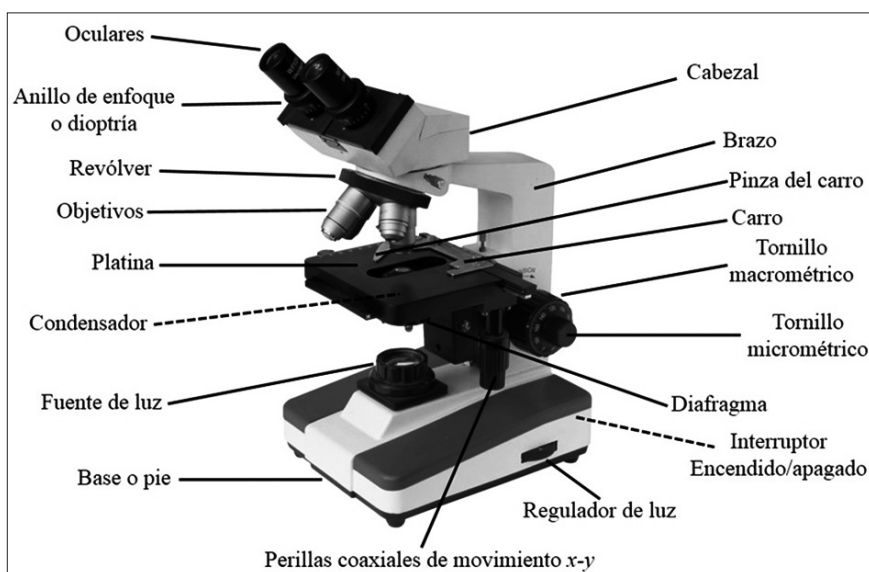


Figura 1. Partes de un microscopio compuesto. Imagen modificada tomada de: [http:// www.ibdciencia.com](http://www.ibdciencia.com) [Fecha de consulta: 10 de mayo de 2016].

Tabla 1. Descripción de las estructuras que conforman un microscopio de luz.

Estructura	Descripción
Anillo de enfoque o dioptría	Anillo que se encuentra en el ocular izquierdo y que ayuda a enfocar y a corregir las dioptrías.
Base o pie	Contiene la base sobre la que se apoya el microscopio y la fuente de luz.
Brazo	Es una pieza en forma de C que se encuentra unida a la base, sostiene el tubo en la parte superior y se adapta al pie en la parte inferior.
Cabezal	Transmite la imagen desde el objetivo hasta el ocular.
Carro	Es un dispositivo que se encuentra sobre la platina y que permite deslizar la lámina de adelante hacia atrás y de derecha a izquierda.



Estructura	Descripción
Condensador	Contiene un sistema de lentes que concentran los rayos luminosos sobre el plano de la muestra, y forman un cono de luz con el mismo ángulo que el del campo del objetivo.
Diafragma	También conocido como iris, permite ajustar la apertura o el paso de la luz con el fin de proporcionar una iluminación adecuada a la muestra. Puede emplearse para aumentar el contraste.
Fuente de luz	Localizada en la base del microscopio, constituye una lámpara que provee la luz para iluminar la preparación.
Interruptor encendido/apagado	Botón situado en la base que permite el encendido o apagado del equipo.
Objetivos	Existen dos tipos, los secos y los de inmersión. Los secos no requieren ningún medio líquido entre ellos para poder observar la muestra, tal es el caso de los objetivos de 4X, 10X, 20X, 40X y 60X. Por el contrario, el objetivo de 100X requiere aceite de inmersión para su uso.
Oculares	Sus poderes de aumento van desde 5X hasta 20X. En algunos casos tienen una escala micrométrica que permite la medición de objetos.
Perillas coaxiales de movimiento x-y	Mueven la pinza sobre la platina en el eje x y y para ayudar a encontrar el área de interés en la placa.
Pinza del carro	Ubicada en la platina, ayuda a sujetar el portaobjetos.
Platina	Pieza metálica plana en la que se coloca la muestra en el portaobjetos. Tiene un orificio en el eje óptico del tubo, que permite el paso de los rayos luminosos hacia la muestra.
Regulador de luz	Perilla o botón que permite regular la intensidad de luz de la lámpara que se encuentra situada en el brazo.
Revólver	Dispositivo giratorio que permite intercambiar los objetivos.
Tornillo macrométrico	Permite el enfoque rápido de la muestra.
Tornillo micrométrico	Permite enfocar con precisión la estructura de interés.



B. Objetivo

Describir el procedimiento para el uso del microscopio de luz.

C. Requerimientos

Materiales

- Muestra microscópica (en fresco o fijada con colorante)
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Tijeras
- Papel de arroz

Reactivos

- Alcohol
- Aceite de inmersión

Equipos

- Microscopio de luz

D. Procedimiento

Uso del microscopio

1. Verifique que el equipo haya sido bien guardado (con su funda protectora, apagado, el nivel de luz ajustado al mínimo, ubicado en el objetivo de menor aumento, platina al tope mínimo hacia abajo y diafragma cerrado), de lo contrario repórtelo en la planilla de uso de equipos.
2. Enchufe el cordón eléctrico al tomacorriente y encienda el equipo del interruptor.
3. Coloque la muestra en la platina y asegúrela con las pinzas de agarre.
4. Gire la perilla para subir el condensador.
5. Regule la intensidad de la luz a su preferencia.
6. Abra el diafragma y ajústelo.
7. Enfoque la muestra girando lentamente el tornillo macrométrico y mirando a través de los oculares con el objetivo de menor aumento hasta obtener una imagen clara. Recorra la muestra y localice el área de interés.



8. Gire el tornillo micrométrico para definir mucho mejor la imagen.
9. Para utilizar el objetivo de 10X o 40X, simplemente gire el revólver desde su rosca estriada, teniendo precaución de no quebrar la lámina con el objetivo, y ajuste la imagen con el tornillo micrométrico.
10. Para observar con el objetivo de 100X, gire el revólver hacia el objetivo de 100X dejándolo a medio camino y deposite una gota de aceite de inmersión sobre la placa. Posteriormente, termine de girar el revólver hasta que el objetivo de 100X se posicione sobre la lámina. Enfoque cuidadosamente con el tornillo micrométrico. Nunca se debe utilizar el tornillo macrométrico con el objetivo de mayor aumento, porque existe un alto riesgo de quebrar la lámina por la cercanía entre el objetivo y ésta.
11. Al finalizar la observación baje la platina y limpie el objetivo de 100X con papel de arroz.
12. Cuando haya terminado la actividad, guarde el equipo con el objetivo de menor aumento, la platina limpia y abajo, el condensador abajo y el diafragma cerrado, la luz en su más baja intensidad y el interruptor apagado. Ponga la funda protectora y desconecte el cable eléctrico. Enrolle este cable alrededor del microscopio, sin apretarlo.

Recomendaciones

- Evite tocar, rayar o dejar caer las lentes u otros componentes ópticos.
- Mantenga siempre limpio el espacio de trabajo.
- No fuerce los controles de foco.
- Economice la vida de la lámpara, asegurándose de ejecutar la iluminación correcta. Registre el uso del equipo en el formato correspondiente.
- Nunca deje el objetivo de inmersión lleno de aceite, límpielo con papel de arroz con movimientos suaves y circulares, asegúrese de que quede sin residuos de aceite, utilice varios papeles de arroz si es necesario.
- Procure dejar el microscopio en el mismo sitio, en un lugar seguro, no al borde de la mesa.
- Para transportar el microscopio de un lugar a otro, tómelo del brazo con una mano y sosténgalo de la base con la palma de la otra mano, y llévelo siempre en posición vertical.



E. Referencias bibliográficas

- Epelbaum, S. (2010). Historia de la estereoscopia y sus aplicaciones. *Archivos de Oftamologia*, 81(2), 62-67.
- Montalvo, C. (2010). Microscopia. Recuperado de http://histologiaunam.mx/descargas/ensenanza/portal_recursos_linea/apuntes/2_microscopia.pdf [Consultado el 7 de enero de 2016].
- Wollman, A. J. M., Nudd, R., Hedlund, E. G., & Leake, M. C. (2015). From Animaculum to single molecules: 300 years of the light microscope. *Open Biology*, 5(4), 150019. Doi: <https://doi.org/10.1098/rsob.150019>



Identificación y montaje de adultos de moscas de importancia forense

Yésica Durango
Manuel A. Ramírez M.

A. Fundamento teórico

La entomología forense es el estudio de los artrópodos con el objetivo de extraer información para precisar el tiempo, el lugar y el modo en los que ha tenido lugar un suceso como parte de las evidencias físicas en un proceso legal (Gil, Saloña y Martínez, 2015)

Para obtener esta información, es necesario identificar correctamente los especímenes recolectados en la escena. La identificación en cuanto al género o la especie permite al entomólogo forense relacionar aspectos sobre el ciclo de vida, los rangos de distribución y otros aspectos biológicos de estos organismos para contribuir a la solución del caso (Byrd & Castner, 2010).

Uno de los grupos más frecuentes en casos forenses cuando hay presencia de un cadáver son las moscas (Diptera), de las cuales generalmente se encuentran sus estados inmaduros (huevos, larvas y pupas) o fragmentos de ellos. En general, los especímenes en estos



estados se deben llevar al laboratorio y criarlos hasta que alcancen su adultez, debido a que la mayoría de claves taxonómicas están diseñadas para identificar el estado adulto del ciclo de vida del insecto.

Los especímenes adultos de las familias de moscas de importancia forense se identifican principalmente a partir de sus características externas, como la quetotaxia y la venación alar (Byrd & Castner, 2010). Las características más importantes para identificar las especies son las estructuras genitales, para este tipo de estructuras se debe seguir el protocolo "Disección, aclarado mediante el uso de ácido láctico ($C_3H_6O_3$) y almacenamiento de genitales en moscas (Diptera: Calyptratae)" contenido en este manual

B. Objetivo

Describir los procesos de montaje, preservación, almacenamiento e identificación de moscas de importancia forense.

C. Requerimientos

Materiales

- Alfileres entomológicos de diferentes calibres, preferiblemente # 1 o # 2
- Bandeja plástica
- Bloque o escalera de montaje de insectos (Fig. 1a)
- Cajas de Petri
- Cajas Ward (Fig. 1b)
- Cartulina opalina
- Claves taxonómicas
- Etiquetas o rótulos en cartulina libre de ácido (opalina)
- Frascos con moscas recolectadas
- Frascos plásticos de diferentes tamaños
- Lápiz o estilógrafo micropunta de punta fina de tinta indeleble
- Pinzas entomológicas
- Tijeras
- Toallas de papel absorbente
- Troqueles para hacer los triángulos para montaje (Fig. 1c)
- Triángulos para montaje en cartulina libre de ácido (opalina) (Fig. 1d)
- Tubos Eppendorf y/o Vacutainer
- Soporte móvil (Fig. 1e)
- Pincel delgado con cerdas finas



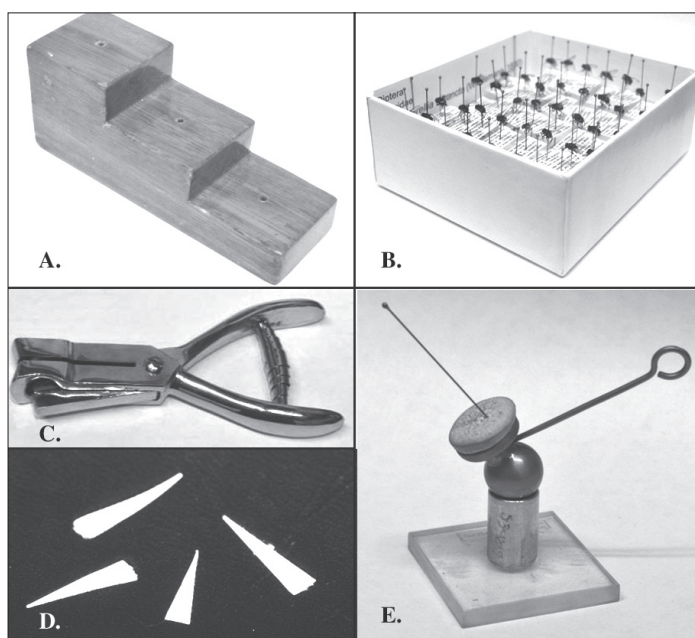


Figura 1. Materiales utilizados en el montaje de insectos. a) Bloque de montaje. b) Caja Ward. c) Troquel para triángulos. d) Triángulos en papel libre de ácido. e) Soporte móvil para insectos.

Reactivos

- Alcohol etílico al 70 %
- Pegante para insectos

Equipos

- Estereomicroscopio
- Microscopio

A. Claves taxonómicas para la identificación

Las claves sugeridas a continuación corresponden a los trabajos recopilatorios más significativos en la región neotropical para las familias de dípteros de importancia forense (Calliphoridae, Fanniidae, Muscidae y Sarcophagidae). Es importante tener en cuenta que debido a la gran diversidad de insectos en el neotrópico y al desconocimiento de algunos de estos grupos, algunas de estas claves no permiten la identificación de todas las especies. Es necesario estar revisando las publicaciones recientes sobre la taxonomía de estos grupos en su región.



Para interpretar correctamente las claves se debe reconocer la nomenclatura usada por los autores (estas denominaciones pueden variar según el autor) y conocer los planos anatómicos del insecto.

Identificación de familias

Clave pictórica para la identificación de algunas familias de moscas en Colombia (Anexo 1).

Identificación de género y/o especie

Calliphoridae

1. Clave ilustrada para la identificación de los géneros y las especies de califóridos (Diptera: Calliphoridae) de Colombia (Amat, Vélez y Wolff, 2008).
2. Contribución al conocimiento de las Chrysomyinae y Toxotarsinae (Diptera: Calliphoridae) de Colombia (Amat, 2009).
3. Keys to the genera and species of blow flies (Diptera: Calliphoridae) of the West Indies and description of a new species of *Lucilia* Robineau-Desvoidy (Whitworth, 2010).
4. A revision of the Neotropical species of *Lucilia* Robineau-Desvoidy (Diptera: Calliphoridae) (Whitworth, 2014).

Sarcophagidae

1. Sarcophagidae (Diptera) de importancia forense en Colombia: claves taxonómicas, notas sobre su biología y distribución (Buenaventura, Camacho, García y Wolff, 2009).
2. Pictorial identification key for species of Sarcophagidae (Diptera) of potential forensic importance in southern Brazil (Vairo, De Mello-Patiu & de Carvalho, 2011).

Fanniidae

1. Neotropical Fanniidae (Insecta: Diptera): new species of *Euryomma* Stein from Colombia (Grisales, Wolff & de Carvalho, 2012a).
2. Neotropical Fanniidae (Insecta: Diptera): new species of *Fannia* from Colombia (Grisales, Wolff & de Carvalho, 2012b).
3. New species of *Fannia* Robineau-Desvoidy (Diptera: Fanniidae) from Colombia (Durango & Ramírez-Mora, 2013)

Muscidae

1. Revisão das espécies neotropicais de *Ophyra* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera, Muscidae, Azelinae) (Pamplona & Couri, 1989).



2. Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region: Taxonomy (de Carvalho, 2002).
3. Systematics and biogeography of Polietina Schnabl & Dziedzicki (Diptera, Muscidae): Neotropical area relationships and Amazonia as a composite area (Nihei & de Carvalho, 2007) 1911 (Diptera, Muscidae).
4. The Muscini flies of the world (Diptera, Muscidae): identification key and generic diagnoses (Nihei & de Carvalho, 2009).

D. Procedimiento

Identificación de familias, géneros y/o especies

1. Organizar y limpiar el espacio de trabajo con alcohol etílico al 70 %.
2. Tener a la mano el frasco lavador con alcohol etílico al 70 %.
3. En una bandeja plástica tener organizados los materiales y reactivos que se van a utilizar.
4. Utilizar cajas de Petri y/o papel absorbente para poner las muestras que se van a examinar bajo el estereomicroscopio.
5. Tener cerca cajas de Petri o recipientes con alcohol para ir depositando los especímenes de las familias identificadas. Cada caja de Petri o recipiente debe tener el rótulo de la muestra original (localidad, fecha y código del trabajo y/o muestra), y además debe contener el rótulo con el nombre de la familia identificada.
6. Comience por identificar el material utilizando la clave taxonómica para la identificación de la Familia.
7. Después de finalizar este procedimiento de identificación con la totalidad de las muestras, cada familia de moscas se almacena en frascos de tapa rosca y con suficiente alcohol al 80% o 90% donde queden inmersas. Cada uno de los frascos donde se almacenen los especímenes correspondientes a cada familia debe llevar el rótulo o la etiqueta que incluya el lugar de colecta y la fecha completa (dd/mm/aaaa), y el rótulo con el nombre de la familia.
8. Para el proceso de identificación del género o la especie utilice el material de su interés y utilice la/s clave/s que corresponda/n a su material siguiendo los pasos descritos anteriormente.



Montaje de insectos

Montaje directo en alfiler

Este tipo de montaje se utiliza principalmente para los especímenes adultos de cuerpo endurecido que tengan un tamaño superior a 7 mm de longitud. Sin embargo, si considera que el insecto se puede dañar, es mejor utilizar el Montaje en punto.

Si es la primera vez que utiliza este tipo de montaje o que manipula estos insectos, es conveniente solicitar asesoría y acompañamiento de alguien del grupo que ya tenga esta habilidad.

1. Tenga despejada y limpia su zona de trabajo, verifique que cuenta con un estereomicroscopio, caja de Petri con alcohol al 70 %, toallas de papel absorbente, bloque o escalera de montaje, pinzas entomológicas blandas, pinzas entomológicas de punta fina, alfileres entomológicos de distinto grosor (# 1 o # 2), rótulos y cajas Ward.
2. De acuerdo con sus intereses de investigación, seleccione los especímenes que va a montar, y que, en lo posible, estén en el mejor estado.
3. Lave los insectos con alcohol al 70 %. Tenga en cuenta que a causa del modo de recolección algunos especímenes pueden quedar impregnados con cebo, para limpiarlos, a veces es necesario frotar las partes del insecto con pinceles delgados y de cerdas finas.
4. Disponga los insectos sobre una toalla de papel absorbente con el fin de eliminar el exceso del alcohol. Evite la pérdida de estructuras del insecto.
5. Después de este proceso, tome el espécimen con las pinzas entomológicas blandas o con la mano si su habilidad es mayor y dispóngalo con el dorso hacia arriba. Al momento de manipularlo, evite la pérdida o caída de sus estructuras.
6. Introduzca el alfiler sobre el dorso del insecto teniendo en cuenta que lo debe atravesar perpendicularmente al eje longitudinal y transversal del insecto, en el centro de gravedad. Para dípteros, el alfiler se debe insertar entre las bases de las alas anteriores, a la derecha de la línea media (Fig. 2a). Después de haber introducido el alfiler en el espécimen, dispóngalo sobre el bloque superior de la escalerilla de montaje (Fig. 1a) y perforo el insecto en su totalidad (Fig. 2b).



7. Con ayuda de las pinzas entomológicas estire cuidadosamente cada una de las patas del espécimen, trate de dejar abiertas las alas y procure que todas sus partes puedan ser visibles fácilmente.
8. Ubique el rótulo de colecta utilizando el bloque medio de la escalerilla de montaje y para el rótulo de identificación utilice el bloque inferior. Si dispone de la etiqueta con el número de catálogo, ubíquela al final (Fig. 2c).
9. Deje secar los especímenes en cajas Ward e informe al curador de la colección para el registro en la colección.

Montaje en punto

Este montaje es recomendado para insectos adultos de cuerpo delicado o tamaño inferior a 10 mm de longitud. Si es la primera vez que utiliza este tipo de montaje o estos insectos, es conveniente que pida asesoría y acompañamiento de alguien del grupo que ya tenga esta habilidad.

1. Separe los especímenes que va a montar.
2. Lave los especímenes con alcohol al 70 % y póngalos a secar sobre la toalla de papel.
3. Tome un alfiler entomológico y atravesese un triángulo de papel libre de ácido (opalina) o acetato por su arista más ancha. Para determinar la altura a la que debe quedar el triángulo en el alfiler, utilice el bloque superior del bloque de montaje. La punta del triángulo puede ser doblada cuidadosamente hacia abajo.
4. Impregne la punta del triángulo con una pequeña cantidad de pegamento para insectos y deje secar por pocos segundos.
5. Acomode el insecto de tal manera que la punta del triángulo quede perpendicular a los lateroterguitos torácicos derechos y presiónela suavemente contra el espécimen para permitir su adhesión.
6. Con cuidado levante el alfiler y asegúrese de que el insecto haya quedado firme sobre la punta del triángulo. Si el insecto no se pega, déjelo secar nuevamente, agregue otra pequeña cantidad de pegamento de insectos sobre la punta del triángulo e inténtelo de nuevo.
7. Ubique el rótulo de colecta utilizando el bloque medio de la escalerilla de montaje, y para el rótulo de identificación utilice el bloque inferior. Si dispone de la etiqueta con el número de catálogo, ubíquela al final (Fig. 2b).
8. Deje secar los especímenes en cajas Ward e informe al curador de la colección para el registro en la colección.



Montaje con estructuras extraídas

Este tipo de montaje se utiliza cuando es necesario extraer estructuras, principalmente los genitales, para identificar los insectos. Para el procedimiento de la disección y el aclaramiento de las estructuras, se debe revisar el protocolo de "Disección, aclarado mediante el uso de ácido láctico ($C_3H_6O_3$) y almacenamiento de genitales en moscas (Diptera: Calyptratae)."

Recuerde ser muy cuidadoso y organizado para evitar confundir las estructuras genitales con especímenes que no correspondan. Todas las estructuras extraídas se deben almacenar en microviales con glicerina y que deben quedar correctamente cerrados con el tapón.

1. El microvial se debe poner en el mismo alfiler del espécimen del cual se extrajo la estructura. El microvial debe ser atravesado por el tapón y dispuesto horizontalmente, debajo del cuerpo del insecto (Fig. 2c).
2. Informar al curador de la colección para que éste ingrese los especímenes a la colección.

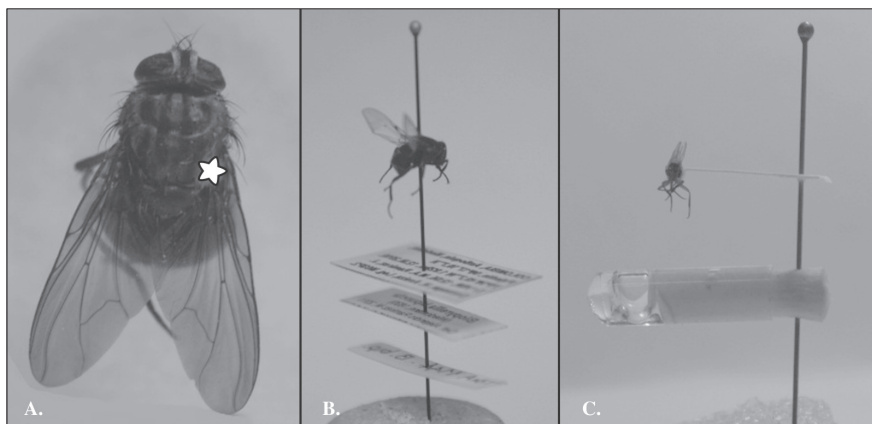


Figura 2. Montaje de insectos. a) Montaje de dípteros. La estrella señala el lugar en donde se debe introducir el alfiler entomológico. b) Orden de las etiquetas, en orden de arriba abajo: localidad, identificación, catálogo. c) Montaje de insectos de tamaño pequeño en triángulo, estructuras extraídas en microvial.



Figura 2. Montaje de insectos. a) Montaje de dípteros. La estrella señala el lugar en donde se debe introducir el alfiler entomológico. b) Orden de las etiquetas, en orden de arriba abajo: localidad, identificación, catálogo. c) Montaje de insectos de tamaño pequeño en triángulo, estructuras extraídas en microvial.

E. Referencias bibliográficas

- Amat, E. (2009). Contribución al conocimiento de las Chrysomyinae y Toxotarsinae (Diptera: Calliphoridae) de Colombia. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 80(1926), 693-708.
- Amat, E., Vélez, M.C., & Wolff, M. (2008). Clave ilustrada para la identificación de los géneros y las especies de califóridos (Diptera: Calliphoridae) de Colombia. *Caldasia*, 30(1), 231-244.
- Byrd, J.H. & Castner, J.L. (2010). Insects of forensic importance. In J. H. Byrd & J. L. Castner (Eds.), *Forensic Entomology: the utility of arthropods in legal investigations* (pp. 39-126). Boca Raton: CRC Press.
- Buenaventura, E.R., Camacho, G.C., García, A.G. y Wolff, M.E. (2009). Sarcophagidae (Diptera) de importancia forense en Colombia: Claves taxonómicas, notas sobre su biología y distribución. *Revista Colombiana de Entomología*, 35(2), 189-196.
- de Carvalho, C.J.B. (2002). Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region: taxonomy. Curitiba: Editora Universidade Federal do Paraná.
- Gil Arriortua, M., Saloña Bordas, M.I. y Martínez de P., M. (2015). Uso de vestigios moleculares en entomología forense. *Ciencia Forense*, (12), 35-78.
- Grisales, D., Wolff, M. & de Carvalho, C.J.B. (2012a). Neotropical Fanniidae (Insecta, Diptera): new species of Fannia from Colombia. *Zootaxa*, 3591, 1-46.
- Grisales, D., Wolff, M. & de Carvalho, C.J.B. (2012b). Neotropical Fanniidae (Insecta: Diptera): new species of Euryomma Stein from Colombia. *Journal of Natural History*, 46(13-14), 803-329. DOI: <https://doi.org/10.1080/00222933.2011.651644> PLEASE
- Nihei, S.S. & de Carvalho, C.J.B. (2007). Systematics and biogeography of Polietina Schnabl & Dziedzicki (Diptera, Muscidae): Neotropical area relationships and Amazonia as a composite area. *Systematic Entomology*, 32(3), 477-501. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2006.00376.x>
- Nihei, S. & de Carvalho, C.J.B. (2009). The Muscini flies of the world (Diptera, Muscidae): identification key and generic diagnoses. *Zootaxa*, 1976, 1-24.



- Pamplona, D. & Couri, M.S. (1989). Revisão das espécies neotropicais de *Ophyra* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera, Muscidae, Azelinae). *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 84(Supl. IV), 419-429.
- Vairo, K.P.E., De Mello-Patiu, C.A. & de Carvalho, C.J.B. (2011). Pictorial identification key for species of Sarcophagidae (Diptera) of potential forensic importance in southern Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 55(3), 333-347. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0085-56262011005000033>
- Whitworth, T. (2010). Keys to the genera and species of blow flies (Diptera: Calliphoridae) of the West Indies and description of a new species of *Lucilia* Robineau-Desvoidy. *Zootaxa*, 35(2663), 1-35.
- Whitworth, T. (2014). A revision of the Neotropical species of *Lucilia* Robineau-Desvoidy (Diptera: Calliphoridae). *Zootaxa*, 3810(1). DOI: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3810.1.1>



Disección, aclarado mediante el uso de ácido láctico y almacenamiento de genitales de moscas (Diptera: Calyptratae)

**Adriana Pérez
Eduardo Amat**

A. Fundamento teórico

En algunos grupos de insectos la morfología externa de los genitales, tanto de machos como hembras adultos, ha sido ampliamente utilizada como carácter válido para la determinación taxonómica de especies (Blahnik & Holzenthal, 2004). La alta diversidad de especies de moscas, así como su compleja morfología y taxonomía representan un constante reto para el avance de su conocimiento.

En los especímenes machos de la gran mayoría de moscas, la variación morfológica de las estructuras genitales como el epandrio, los cercos, los surestilos (Fig. 1a); el falo, ha sido útil como característica diagnóstica para la identificación de las especies. (Fig. 1b). A diferencia de los machos, los genitales de las hembras han sido poco explorados, y su estudio se ha limitado a la morfología de los últimos esternitos abdominales, cercos, epiprocto e hipoprocto (Fig. 1c).



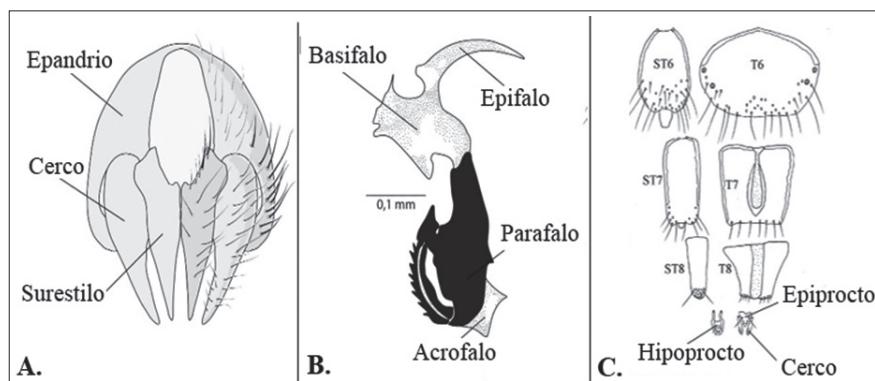


Figura 1. a) Morfología y algunos detalles de los genitales masculinos en vista posterior. b) Detalles de la estructura del falo en vista lateral. c) Morfología y detalles de los genitales femeninos. Morfología y terminología según Cumming y Wood (2009).

Para la correcta interpretación y el estudio morfológico de las estructuras anteriormente mencionadas se ha utilizado la técnica del aclaramiento, este proceso permite que los tejidos muscular, conectivo y graso que se encuentran dentro de la estructura de la mosca se ablanden y se diafanicen, lo cual facilita su extracción y estudio (Cumming, 1992); esta metodología asegura el aclaramiento incluso de estructuras muy esclerotizadas.

Aclarar estructuras diagnósticas mediante este proceso, en particular de algunos grupos como mosquitos y moscas, es una práctica común entre taxónomos. Esta estrategia de estudio adquiere relevancia porque consume poco tiempo y es fácil. En la literatura se encuentra una gran variedad de reactivos aclaradores que se ajustan a las exigencias y gustos de los especialistas, los más utilizados son los siguientes:

Lactofenol: es una mezcla entre ácido láctico y fenol al 1 %, con un efecto aclarador. La desventaja de este agente es que posee efectos cancerígenos (Yélamos, 1990).

Hidróxido de potasio (KOH): se utiliza generalmente al 10 % o 12 %, disuelto en agua; aunque algunos especialistas prefieren usarlo al 5 %. Tiene un elevado efecto corrosivo, y a mediano y largo plazo destruye estructuras de interés de estudio como membranas, tejido, etc. (Yélamos, 1990)



Ácido láctico ($C_3H_6O_3$): actúa como un agente macerador, elimina el tejido suave y aclara las estructuras esclerotizadas sin dañarlas, su efecto continúa hasta que todos los tejidos blandos se disuelven (Cumming, 1992). El ácido láctico es el reactivo más común y ampliamente usado por taxónomos dipterólogos, y es el agente que a continuación se trata en detalle.

B. Objetivo

Disecionar, aclarar con ácido láctico y almacenar genitales de moscas adultas con fines de identificación

C. Requerimientos

Materiales

- Pinzas entomológicas suaves con extremos finos: hechas de acero inoxidable, de agarre suave, apropiadas para la manipulación de insectos (Fig. 2a).
- Microtijeras (tijeras oftalmológicas): hechas de acero inoxidable de extremos rectos y punta fina, adecuadas para la disección de genitales de machos y hembras, pueden servir las de uso oftalmológico (Fig. 2b).
- Agujas de acero con extremo curvado: se pueden elaborar con un mango de madera y minuten entomológico, útiles para trabajar con estructuras pequeñas y delicadas en insectos (Fig. 2c).
- Portaobjetos excavados: láminas de vidrio con concavidades, ideales para el montaje, y facilitan la observación de estructuras anatómicas de insectos (Fig. 2d).
- Tubo de ensayo o beaker: recipiente de vidrio, ideal para calentar sustancias (Fig. 2e).
- Microvial de plástico o vidrio: se puede encontrar en el mercado en varios tamaños, de plástico o de vidrio, son ideales para almacenar genitales de insectos montados (Fig. 2f).
- Alfileres entomológicos: agujas de acero inoxidable indispensables para el montaje de insectos adultos (Fig. 2g).

Reactivos

- Ácido láctico al 85 %
- Glicerol o glicerina al 99 %
- Euparal, Entellan o bálsamo de Canadá
- Xilol (C_8H_{10}) 99 %



Equipos

- Microscopio estereoscópico
- Plancha de calentamiento o estufa

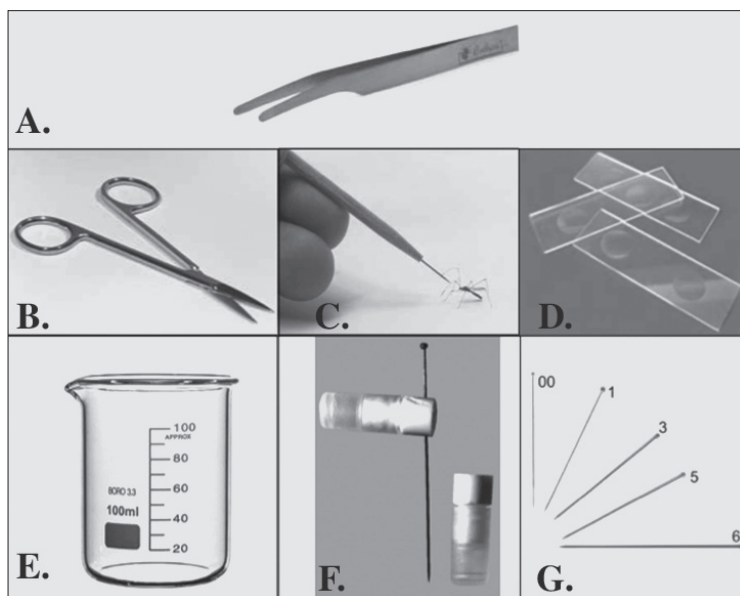


Figura 2. a) Pinzas entomológicas suaves con extremos finos. b) Bisturí o microtijeras (tijeras oftalmológicas). c) Agujas de acero con extremo curvado (se pueden elaborar con un mango de madera y minuten entomológico). d) Portaobjetos excavados. e) Tubo de ensayo o beaker. f) Microvial de plástico o vidrio. g) Alfileres entomológicos. Figuras tomadas de: <http://www.entomopraxis.com> y <http://www.enthos.com/>

D. Procedimiento

1. Separación de especímenes por sexo

Se separan los especímenes para diseccionar según su especie y/o morfotipo y a continuación se separan por sexo. Para este fin se observan los caracteres de la terminalia¹ (genitales), o en caso de que exista

¹ Complejo de segmentos genitales, los cuales incluyen aquellos modificados para la cópula y/u ovoposición.



dimorfismo sexual², el carácter indicado según la especie de mosca; ej. Condición holóptica³ o dicóptica⁴ (Blahnik and Holzenthal, 2004).

2. Extracción de los genitales

En ejemplares secos se recomienda hidratar la mosca, bien sea por medio de ebullición (se sumerge totalmente la mosca durante dos segundos) o agregando alcohol isopropílico al 70 %. Así se evita que el espécimen se deteriore en el proceso de extracción (Yèlamos, 1990).

Hembras. Para el estudio del ovopositor y la espermateca de la hembra, con ayuda de pinzas coloque la mosca con la parte ventral hacia arriba sobre la platina del estereoscopio, dentro del campo visual, y realice un corte horizontal a la altura de los esternitos 3 y 4 (Fig. 3)



Figura 3. Corte transversal a la altura del tercero y cuarto segmentos abdominales, fotografía de la terminalia de una mosca hembra en vista latero-ventral. Foto: Adriana Pérez.

² Diferencias perceptibles en forma, color u otros caracteres entre individuos de la misma especie, pero de diferente sexo.

³ Condición ocular en especímenes de moscas adultas en la que no existe separación entre sus ojos compuestos, el área adyacente entre ellos no se evidencia a manera de frente; más frecuente en machos.

⁴ Condición ocular en especímenes de moscas adultas en la cual la separación entre sus ojos compuestos es evidente, generalmente se reconoce el área frontal y es más frecuente en hembras.



Machos. Para el estudio de los genitales, con la ayuda de pinzas disponga el espécimen bajo el campo visual del microscopio estereoscópico, con la parte ventral hacia arriba, y con la aguja de extremo curvado en la otra mano empuje delicadamente hacia afuera dejando así expuestos los cercos y los surestilos, se realiza el mismo corte que para las hembras (Fig. 4).

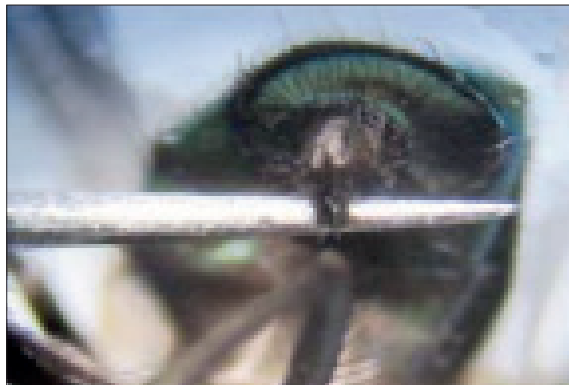


Figura 4. Exposición de los genitales masculinos en vista posterior.
Foto: Adriana Pérez.

3. Aclarado de genitales

En un recipiente de vidrio (tubo de ensayo, beaker, etc.) se sumergen los genitales en ácido láctico al 85 % hasta cubrir totalmente la estructura, se calientan a una temperatura de 90 a 100 °C (plancha de calentamiento o estufa eléctrica) durante 10-15 minutos, teniendo en cuenta que el ácido láctico no debe alcanzar la ebullición y el recipiente de vidrio debe permanecer tapado, porque los gases emanados del ácido láctico son tóxicos.

Al transcurrir los 10 a 15 minutos, con una pinza se retiran los genitales cuidadosamente y se colocan en una lámina excavada con una o varias gotas de glicerol ($C_3H_8O_3$), se extraen los tejidos macerados con ayuda de las pinzas entomológicas y la aguja de acero. Se procede a observar los caracteres morfológicos de interés en el microscopio estereoscópico (Fig. 5).



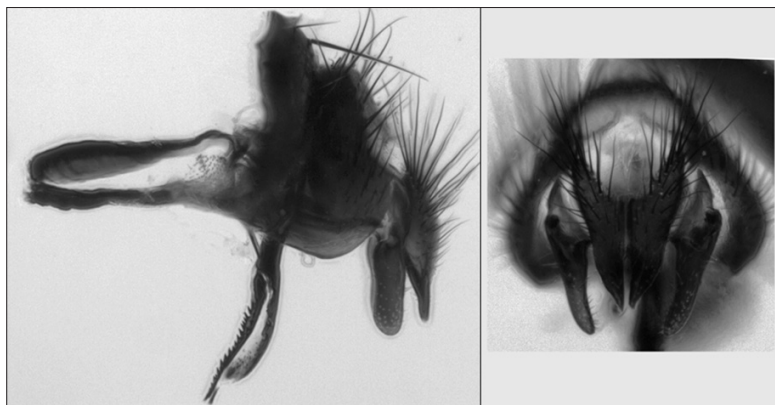


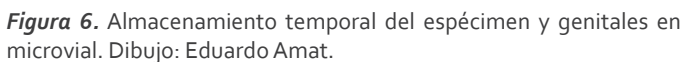
Figura 5. Detalle al estereoscopio de los genitales masculinos en observación ya aclarados. A) Vista posterior de los genitales de *Compsomyiops verena* (cercos, surestilos, epandrio). B) vista lateral *Compsomyiops verena* (epandrio, cercos, surestilos, edeago y falo). Foto: Eduardo Amat.

4. Almacenamiento de las estructuras

Según los objetivos del investigador, las estructuras se podrán almacenar de manera temporal o permanente.

Almacenamiento temporal. Luego de la observación, el espécimen puede almacenarse en una cápsula o microvial de plástico especial con glicerina para evitar la desecación de la estructura. El microvial con los genitales incluidos se pone debajo del ejemplar al que corresponde (Márquez, 2005) (Fig. 6).





COLLEMSIA, Mycetophila, Santa Marta
Granada, 17-28/04/79, 20-23/05/79
16/07/84, 20/01/85, Andes E. Flaco
15/07/2009, recently released, H. SMT702

Lucilia eximia
(Wiedemann, 1819)
(Diptera: Calliphoridae)

Det. A. Perez
2014

Del campo al laboratorio: Integración de procedimientos para el estudio de moscas

E. Referencias bibliográficas

- Aguilar Morales, M.B., Coutiño Bello, B. y Salinas Rosales, P. (1996). Manual general de técnicas histológicas y citoquímicas. México: Ediciones UNAM.
- Blahnik, R.J. & Holzenthal, R.W. (2004). Recolección y conservación de Trichoptera, con énfasis en el material montado. *Nectopsyche, Neotropical Trichoptera Newsletter*, 1, Supplement, 1-13.
- Cumming, J.M. (1992). El ácido láctico como un agente para la maceración de especímenes de Diptera. *Fly Times*, 8(7).
- Cumming, J.M. & Wood, D.M. (2009). Morphology and terminology. In: Brown, B.V. et al. (Eds.), *Manual of Central American Diptera* (pp. 9-50). Vol. 1. Ottawa: NRC Research Press.
- Márquez, L.J. (2005). Técnicas de colecta y preservación de insectos. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, 37(1), 399.
- Yélamos, T. (1990). Preparación de genitalias de insectos. *Bol. SEA*, (8), 35-36.



Fotografía de especímenes en el estereomicroscopio

Andrés López Rubio

A. Fundamento teórico

En las ciencias zoológicas, entre las cuales se encuentra la entomología, es de vital importancia la documentación adecuada de los soportes o evidencias sobre las que se realizan observaciones. Esta documentación puede tener como propósito: i) caracterizar la variación morfológica de espécimen; ii) identificar caracteres diagnósticos; iii) describir o identificar una nueva especie; iv) hacer seguimiento de especímenes de cría en laboratorio, o v) elaborar un catálogo ilustrado de especímenes asociados a una colección.

B. Objetivo

Instruir sobre el manejo del software Optika Vision Pro para la captura de imágenes a través de una cámara adaptada a un estereomicroscopio.



C. Requerimientos

Equipos

- Estereomicroscopio triocular
- Cámara OPTIKAM con cable USB
- Computador con software Optika Vision Pro, Optikam Tech Inc.
- Sistema de iluminación con luz blanca.

D. Procedimiento

Conecte la cámara al estereomicroscopio y conecte el cable USB de la cámara al computador. Verifique que la palanca en el tubo triocular del estereomicroscopio se encuentre hacia el lado derecho (Fig. 1)

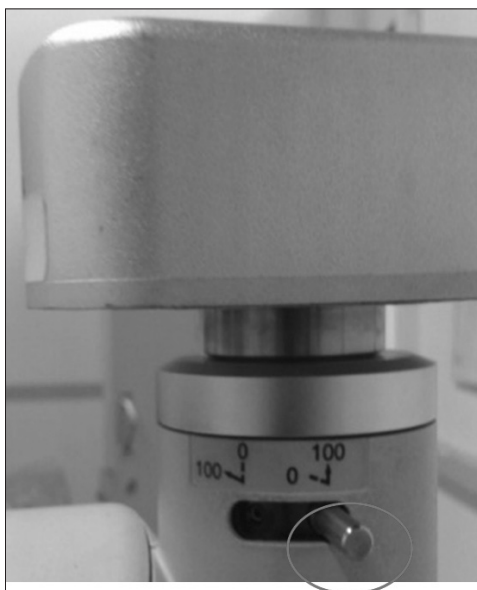


Figura 1. Detalle de ubicación de la palanca en el tubo triocular del estereomicroscopio.



En el escritorio del computador, haga doble clic en el ícono Optika Vision Pro (Fig. 2):

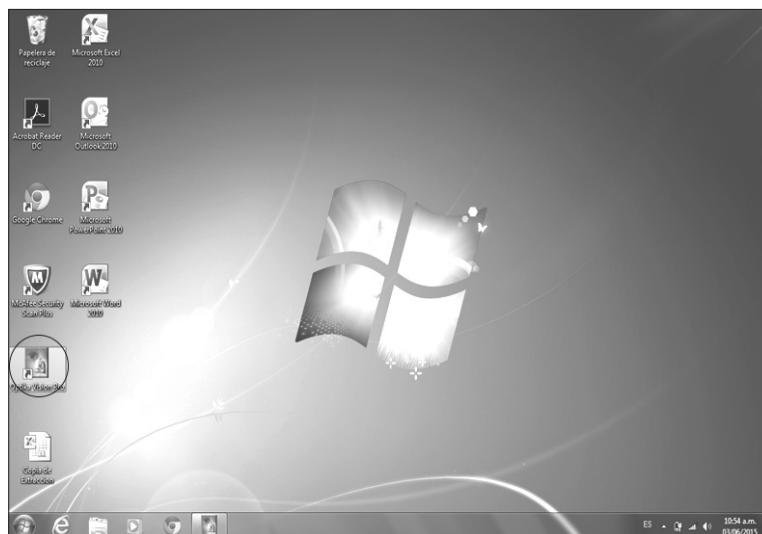


Figura 2. Ícono del software Optika Vision Pro

En la ventana principal del programa se encuentra un panel de control al lado izquierdo y la ventana de captura al lado derecho. En el panel de control existen pestañas para ajustar la calidad de la imagen que se va a capturar (Fig. 3).

En la pestaña Capture control se encuentran algunos perfiles predeterminados para la toma de fotografías:

- Fotografía: perfil usado para la toma general de fotografías.
- Fotografía : perfiles para la toma de fotografía con la fuente de luz disponible (luz fluorescente) y calibrados para realizar mediciones a diferentes aumentos, de acuerdo con el aumento seleccionado en el estereomicroscopio.



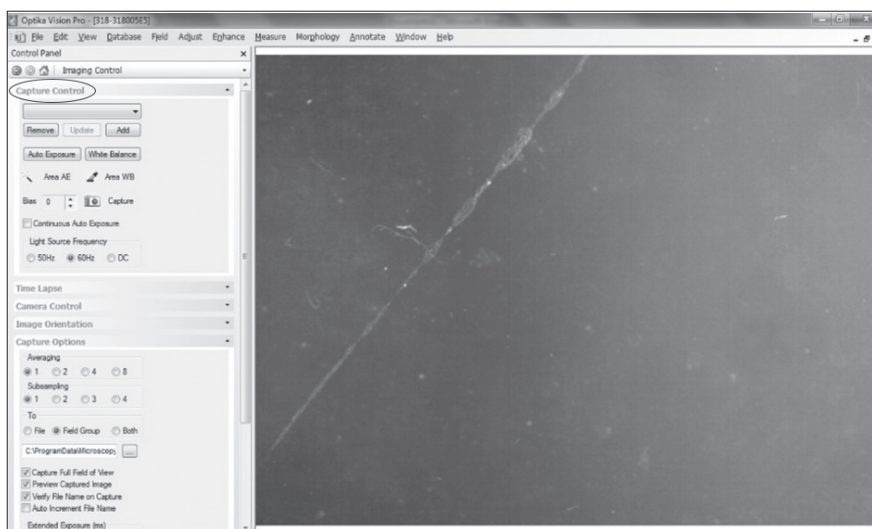


Figura 3. Detalle de la pestaña Capture control con la lista de perfiles de fotografía disponibles.

- Si no desea usar los perfiles predeterminados debe calibrar la calidad de la imagen con el espécimen de interés, en la pestaña *Capture control* active el balance de blancos: *White balance*.
- Colocar el espécimen sobre un papel de textura mate, opcionalmente de color blanco o de color que permita contraste, con el fin de resaltar el espécimen o la estructura de interés.

En caso de utilizar un sistema de iluminación cuello de cisne o dos fuentes del mismo tipo de luz tenga en cuenta:

- Ubique las luces a una distancia adecuada, asegurando que exista homogeneidad en la distribución de la luz alrededor del espécimen para evitar sombras.
- Si se fotografían especímenes que tienen colores metalizados pruebe la disposición de luces conservando al máximo la fidelidad con la observación directa.



Para tomar imágenes de especímenes que sean usados como soporte para el catálogo de la Colección o proyectos asociados a iniciativas del consorcio de código de barras de ADN la plataforma BOLD (Ratnasingham y Hebert, 2007)., se recomienda poner el espécimen de forma que quede dispuesto horizontalmente y que quede espacio en la zona inferior para ubicar la etiqueta de la colección y una escala de referencia (Fig. 4).

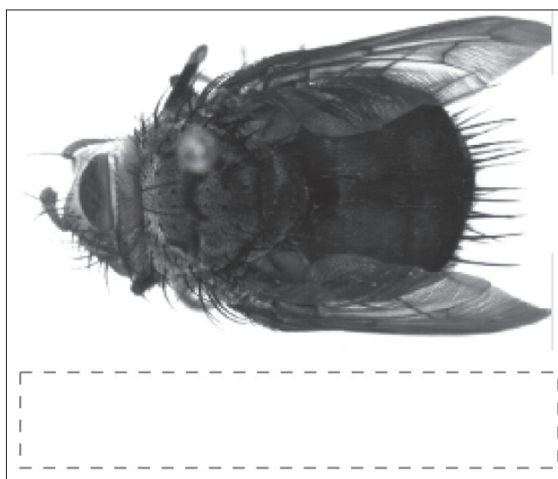


Figura 4. Esquema de la disposición del espécimen y etiqueta según protocolo Barcode. La línea discontinua indica el área reservada para la ubicación de la etiqueta y la escala de referencia.

En caso de que requiera ajustar la cantidad de luz, haga clic en la ficha Camera Control y ajuste el nivel de exposición. La ganancia de colores y gama afectan la tonalidad e intensidad de color (Fig. 5). Recuerde que para la toma de imágenes debe enfocar sobre la imagen visualizada en el programa, en vez de en la observada en el ocular del estereomicroscopio.



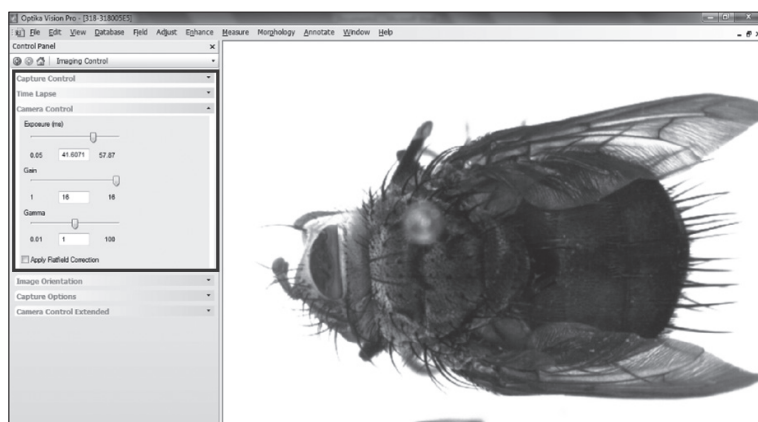


Figura 5. Detalle de la pestaña Camera control.

Si después de haber hecho los ajustes anteriores necesita adaptar la tonalidad del color para que se ajuste a la realidad de la tonalidad del espécimen, se pueden hacer ajustes a la saturación y ganancia de colores en la ficha *Camera Control Extended* (Fig. 6).

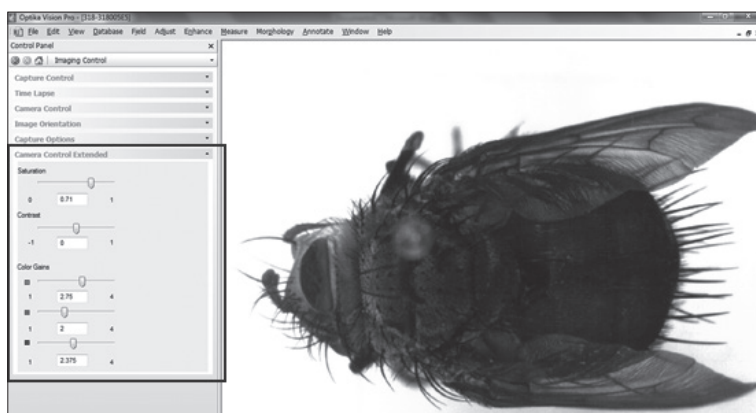


Figura 6. Detalle de la pestaña Camera Control Extended.



Para adquirir la imagen, haga doble clic en la ventana de imagen o en la opción *Capture* del menú *Archivo* (Fig. 7).

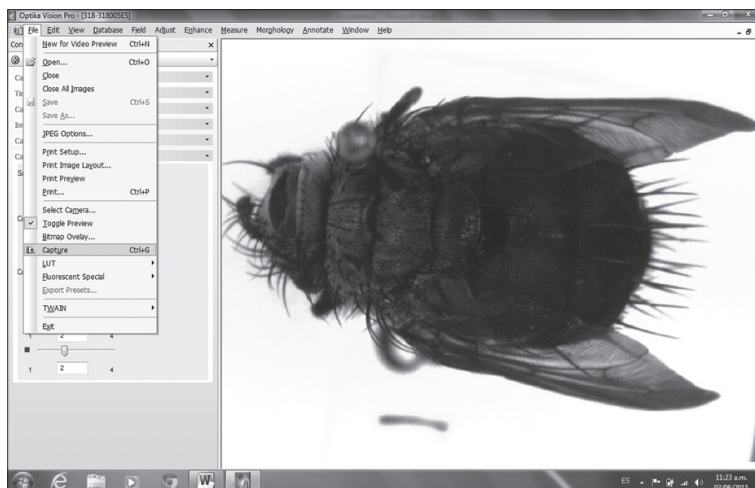


Figura 7. Detalle de comando para capturar imágenes en el menú Archivo.

Para realizar mediciones y colocar una escala de referencia sobre la imagen, recuerde que antes de obtener la imagen debe seleccionar el perfil de acuerdo con el aumento que esté seleccionado en el estereomicroscopio. Puede usar una rejilla o cuadrícula, para activarla sobre la imagen haga clic en el menú *Measure* y luego en la opción *Grid*. Para poner una escala de referencia use la opción *Caliper*. La barra de tareas de medidas puede activarse en el menú *View* y luego en la opción *Tool Bar and Auxiliary Windows* (Fig. 8).



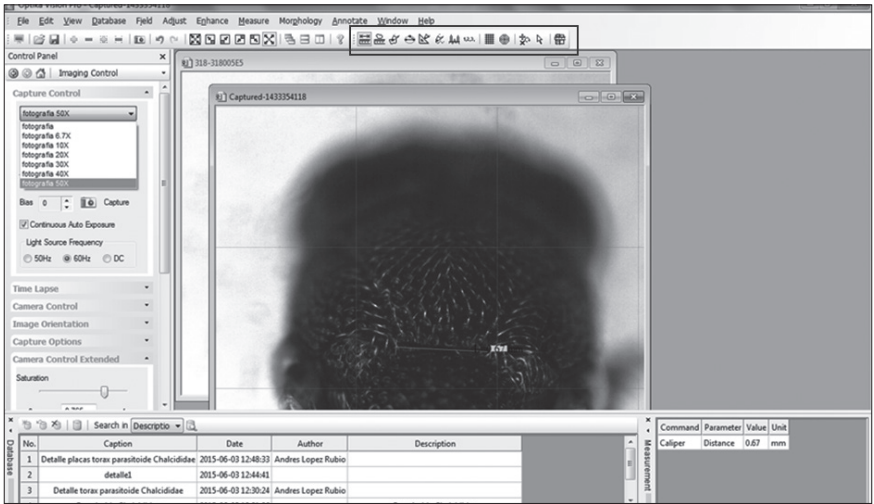


Figura 8. Detalle de la barra de herramientas para medición.

Si desea archivar la imagen adquirida en la base de datos de la aplicación, haga clic en el menú *View* y active la ventana en la opción *Toolbars and Auxiliary Windows*.

Para guardar la imagen haga clic en el menú *Database* y luego en la opción  para guardarla. Recuerde asignar el nombre de la imagen siguiendo la codificación establecida para el espécimen (Fig. 9).



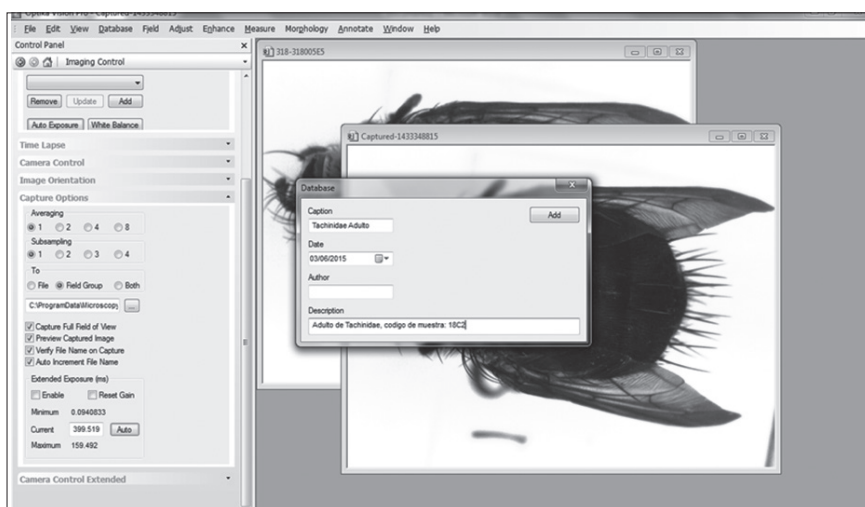


Figura 9. Detalle de la adición de imágenes a la base de datos de la aplicación.

E. Referencias bibliográficas

Optikam Tech Inc. Optika Vision Pro.

Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355–364. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.1111%2Fj.1471-8286.2007.01678.x>



Montaje de alas de moscas para análisis morfométricos basados en puntos de referencia

Giovan F. Gómez

A. Fundamento teórico

La morfometría geométrica surgió durante el siglo XIX, época en la que se dio un cambio en la cuantificación y análisis de los datos, con el propósito de obtener información de la geometría de estructuras (Rohlf & Marcus, 1993). A diferencia de la morfometría tradicional, que analiza variables como la longitud, el ancho, la altura o las relaciones entre medidas de estructuras (Adams, Rohlf & Slice, 2004; Rohlf & Bookstein, 1990), la morfometría geométrica analiza la forma (tamaño y conformación), lo cual se puede hacer por medio de estadística univariada y multivariada (Sarà, Favaloro & Mazzola, 1999) cultured in different conditions (lot A, monoculture tank; lot B, monoculture offshore cage; lot C, polyculture tank).

La morfometría geométrica es una herramienta rápida y económica y existe disponibilidad de programas informáticos libres para el análisis de la información. En un espacio bi o tridimensional permite evidenciar



cambios morfológicos de la estructura anatómica en estudio (Rohlf & Marcus, 1993). La morfometría se puede realizar con base en contornos (outline) o a partir de puntos de referencia (Landmarks) que pueden ser localizados de forma precisa en la estructura del organismo y que son homólogos, es decir que se pueden identificar en todos los especímenes (Klingenberg, 2010).

Esta herramienta se ha utilizado para análisis de estructuras como cráneos, huesos, cuerpos de peces e incluso flores (van der Niet, Zollikofer, De León, Johnson & Linder, 2010). En insectos, el ala ha sido una de las estructuras más empleadas para este tipo de análisis debido a su importancia evolutiva, por su relación con aspectos como la aerodinámica del vuelo, manifestaciones sexuales y territoriales, mecanismos de defensa y regulación térmica (Dudley, 2002). Adicionalmente, su estructura bidimensional y la venación alar facilitan la localización de puntos anatómicos o Landmarks (Garros & Dujardin, 2013).

B. Objetivo

Describir el procedimiento de montaje de alas de insectos para análisis morfométricos.

C. Requerimientos

Materiales

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Pinzas
- Tijeras para disección
- Pegante para placas (Entellan)
- Pegante transparente soluble en agua
- Pincel
- Agua
- Caja de Petri
- Papel milimetrado
- Cajas de almacenamiento de portaobjetos (Fig. 1)





Figura 1. Caja de almacenamiento de portaobjetos

Equipos

- Estereomicroscopio (Fig. 2)
- Cámara fotográfica con adaptación al estereomicroscopio



Figura 2. Estereomicroscopio triocular con cámara fotográfica adaptada



D. Procedimiento

Metodología

1. El espécimen se ubica en el soporte del estereomicroscopio con el fin de visualizar el ala y ubicar el punto de disección. Con la ayuda de unas pinzas de punta blanda se sujeta el ejemplar, y con las tijeras de disección o la ayuda de pinzas se corta el ala desde la base (Fig. 3), teniendo cuidado de no romperla. Para su disposición en el portaobjetos, tenga en cuenta si se trata del ala izquierda o el ala derecha.



Figura 3. Ala de *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae)

2. Antes de poner el ala en el portaobjetos se adiciona una capa fina de pegante transparente, evitando la formación de burbujas, y sobre ella se disponen las alas de la mosca. Se pueden requerir ambas alas o una sola, todo depende del objetivo del proyecto de investigación. Tenga en cuenta que dada la posible existencia de asimetría bilateral, es recomendable montar siempre un mismo lado, según los criterios de selección del investigador.
3. Con ayuda de un pincel humedecido con agua o de una pinza, se transfiere el ala al portaobjetos de modo que quede totalmente extendida (Fig. 4). Debe tenerse en cuenta que el número de especímenes sobre un portaobjetos puede variar de acuerdo con el tamaño de las alas de la especie analizada. Es importante asegurarse de que las alas queden centradas para cada uno de los montajes.



4. El pegamento con las alas se debe dejar secar toda la noche protegidos del polvo.
5. Use un cubreobjetos limpio sobre el cual debe agregar un poco de bálsamo de Canadá o sellante en sus cuatro esquinas o por todos los bordes. Disponga el cubreobjetos sobre las alas dejándolo caer suavemente sobre ellas, sin presionar.
6. Cada portaobjetos debe rotularse con los códigos de las muestras.

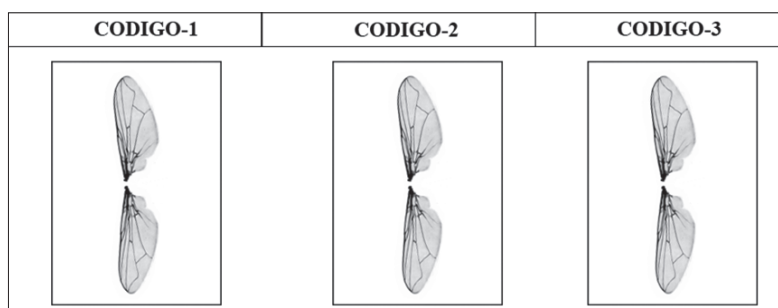


Figura 4. Montaje de alas de *Lucilia* sp. en lámina-laminilla

7. Terminado este proceso, cada ala se ubica en el centro del campo visual del estereomicroscopio, con papel milimetrado de fondo. Se realizan los registros fotográficos con una cámara fijada al estereomicroscopio, estos registros deben ser tomados con el mismo aumento y la misma distancia de foco.

El montaje del ala en el portaobjetos es permanente, se recomienda almacenar en cajas para portaobjetos con el fin de conservarlas en buen estado para análisis morfométricos subsecuentes.

Actualmente, se encuentran disponibles programas libres para realizar el análisis morfométrico que pueden ser consultados. Algunos son:

- MorphoJ (http://www.flywings.org.uk/MorphoJ_page.htm)
- La serie TPS (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>)
- Paquete CLIC (<http://mome-clic.com/>)



E. Referencias bibliográficas

- Adams, D. C., Rohlf, F. J., & Slice, D. E. (2004). Geometric morphometrics: Ten years of progress following the "revolution." *Italian Journal of Zoology*, 71(1), 5–16. <https://doi.org/10.1080/11250000409356545>
- Dudley, R. (2002). *The Biomechanics of Insect Flight: Form, Function, Evolution*. Princeton, N.J.: Princeton University Press.
- Garros, C. & Dujardin, J.P. (2013). Genetic and Phenetic Approaches to Anopheles Systematics. In S. Manguin (ed.), *Anopheles mosquitoes-New insights into malaria vectors* (First, pp. 81-106). Croatia: InTech.
- Klingenberg, C.P. (2010). Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nature Reviews. Genetics*, (11), 623-635. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg2829>
- Rohlf, F.J. & Bookstein, F.L. (1990). Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop. In *Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop* (pp. v-viii; 1-380).
- Rohlf, F. & Marcus, L. (1993). A revolution morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*, (8), 129-132. DOI: [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90024-J](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90024-J)
- Sarà, M., Favalaro, E. & Mazzola, A. (1999). Comparative morphometrics of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo* Cetti, 1777), reared in different conditions. *Aquacultural Engineering*, 19(3), 195-209. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(98\)00052-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(98)00052-1)
- van der Niet, T., Zollikofer, C.P.E., De León, M.S.P., Johnson, S.D. & Linder, H.P. (2010). Three-dimensional geometric morphometrics for studying floral shape variation. *Trends in Plant Science*, 15(8), 423-426. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.05.005>



Gestión de información de colecciones de investigación biológica mediante el programa Specify 6: Importación de datos desde Excel

Manuel A. Ramírez-M.

A. Fundamento teórico

Specify 6 permite la importación de datos sobre los especímenes desde hojas de cálculo de Microsoft Excel®. En esta sección se describe el paso a paso que permitirá realizar este procedimiento.

B. Objetivo

Describir paso a paso la importación de datos en Excel a Specify 6.

C. Requerimientos

Equipo

Computador con la aplicación Specify instalada. En caso de que los datos se almacenen en un servidor, el equipo debe contar con acceso a internet.



D. Procedimiento

La opción de importación de datos debe cumplir con algunos requisitos básicos:

- El programa sólo acepta bases de datos organizadas en columnas.
- La herramienta de Specify, WORKBENCH (por medio de la cual se hace la importación), solo acepta hojas de datos en Excel con hasta 4.000 filas de datos. De modo que, si su base de datos tiene una longitud superior, divídala en varios archivos para cumplir este propósito y repita el procedimiento que aquí se presenta para cada archivo que vaya a importar.

Antes de iniciar el proceso de importación de datos desde el archivo en Excel al programa Specify, es necesario que se haya ingresado previamente en el programa Specify la siguiente información (de no cumplir este requisito el programa le impedirá hacer la importación):

- “Agentes” (Agent): datos de las personas que recolectan las muestras, las preparan, las identifican (Fig. 1).
- “Localidad” (Locality): datos geográficos de los lugares de recolección, incluye información de latitud, longitud, altitud, etc. (Fig. 2).
- “Taxón” (Taxon): datos taxonómicos de los especímenes (Fig. 3).



The screenshot shows the 'Agent' data entry form. The left sidebar contains a 'Create/Update' menu with options: Collection Object, Taxon, Agent, Geography, Locality, and More Forms. The main form area is titled 'Agent' and includes the following sections:

- Agent Information:** Agent Type (Person), Title, Last Name, First Name, Middle Initial, Abbreviation, and Email.
- Addresses:** A section with a 'Is Primary' checkbox and fields for Address, Address2, City, State, Postal Code, Country, Room/Building, Phone1, Phone2, and Fax.
- Attachments:** A section for 'Agent Specialties' with a 'Specialty Name' field and a 'GUID' field (98e88af3-7f8e-43c4-9cf4-5e5aff7afef).

The bottom of the window shows a 'Welcome' button and a breadcrumb trail: 'Agent > Geography > Locality'. The status bar at the bottom right indicates 'Entomology | p | manuel'.

Figura 1. Menú para el ingreso de datos de los agentes.

The screenshot shows the 'Locality' data entry form. The left sidebar contains a 'Create/Update' menu with options: Collection Object, Taxon, Agent, Geography, Locality, and More Forms. The main form area is titled 'Locality' and includes the following sections:

- Locality Information:** Locality Name, Geography, and a 'Decimal Degrees' section with Latitude (N/S) and Longitude (W/E) fields.
- Datum:** A field for the datum and a 'Lat/Long Method' dropdown.
- Geo Coord Details:** Fields for 'Named Place Ext.', 'Max Uncertainty Est.', 'Max Uncertainty Est Unit', 'Geo Ref Det By', 'Geo Ref Det Date', and 'Geo Ref Det Ref'.
- Locality Details:** Fields for 'Township', 'Range', 'Section', and 'Section Part'.
- Elevation:** Fields for 'Min Elevation', 'Max Elevation', 'Elevation Method', and 'Elevation Accuracy'.
- Plugins:** A section with buttons for 'GEOLocate', 'Display in WorldWind', and 'Display in GoogleEarth'.
- Attachments:** A section for 'Attachments' with a 'GUID' field (b0afa901-d65c-42a8-be13-76f68e4a2885).

The bottom of the window shows a 'Welcome' button and a breadcrumb trail: 'Welcome > Locality'. The status bar at the bottom right indicates 'Entomology | p | manuel'.

Figura 2. Menú para el ingreso de datos de localidad.



Figura 3. Menú para el ingreso de los datos taxonómicos de los especímenes de la colección.

1. Organización de base de datos en formato Excel

- Para la importación de datos al programa Specify, la base de datos en Excel tiene que estar con extensión .xls (versión Excel 97-2004).
- En su base de datos en hoja de Excel deben estar signados previamente en Specify los números de catálogo (Catalog Number). Durante la importación, si se encuentran números de catálogo repetidos o que ya hacen parte de la base de datos de Specify, el programa se lo informará para que usted proceda a hacer la edición de los datos.
- Encabezados de columnas. Asegúrese de que cada uno de los encabezados de las columnas en su hoja de Excel coincida con los campos de datos de Specify (Fig. 4)

Catalog Number	Catalog/First Name	Catalog/Last Name	Catalog Date	Country	State	County	Locality Name	Latitude 1	Longitude 1	Start Date	End Date
----------------	--------------------	-------------------	--------------	---------	-------	--------	---------------	------------	-------------	------------	----------

Figura 4. Nombres de encabezados de las columnas en la hoja de Excel.



- Corrija errores tipográficos y ortográficos. Asegúrese de que los valores y datos comunes estén escritos correctamente. En algunos casos puede ser útil exportar desde Specify a Excel y ordenar las columnas para identificar el formato de los datos. Tenga en cuenta la escritura de los valores (letras mayúsculas y minúsculas, tildes, etc.) para que siempre sea uniforme. Por ejemplo, si en su hoja de cálculo Excel tiene una casilla con el país “Colombia” y en otra casilla de país tiene “colombia”, al momento de la importación el programa Specify lo reconocerá como dos países diferentes. Toda la escritura en su hoja de Excel de los nombres de los colectores, datos de localidad y nombres taxonómicos tiene que estar estandarizada con la información previamente ingresada en Specify (Fig. 5).

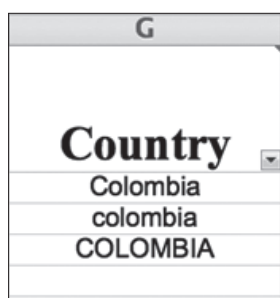


Figura 5. Uniformidad de datos. Al tener escrita la misma palabra en forma diferente, Specify asumirá que son lugares diferentes.

- Dividir campos de datos. Si la hoja de Excel tiene los nombres de las personas (agentes), tales como recolectores, catalogadores, identificadores, etc., en una sola casilla, sepárelos con el fin de hacer compatible la importación a Specify (Fig. 6).

	AE	AF	AG	AH	AI	AJ
1	Colectores		Collectors/First Name1	Collectors/Last Name1	Collectors/First Name2	Collectors/Last Name2
57	Gomez L, Perez A		L	Gomez	A	Perez
58						

Figura 6. División de campos de datos. Los nombres de todas las personas (agentes) deben escribirse en columnas independientes. La organización a la derecha de la flecha es la que reconoce Specify.



- Configuración de fechas. El formato de las fechas en Specify 6 se basa en la elección del formato establecido en el menú Preferencias del sistema Specify (Figs. 7-8). Este formato se debe mantener tanto en Specify como en la hoja de Excel.

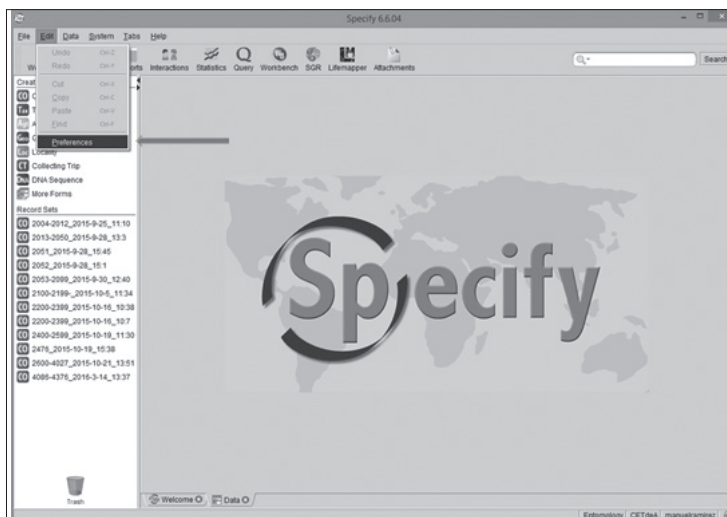


Figura 7. Menú Preferencias del sistema Specify.

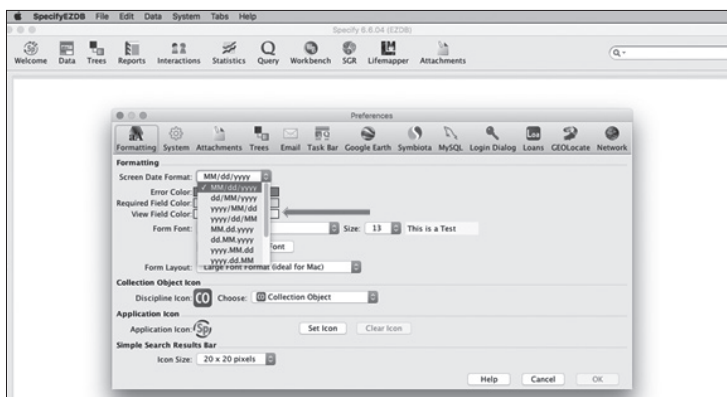


Figura 8. En el menú Preferencias se muestran los diferentes formatos para los datos de fecha.



- Valores de longitud y latitud. Estos valores pueden estar en uno de los siguientes formatos: grados, minutos y segundos; grados y minutos decimales; y grados decimales. El formato que usted seleccionó en Specify debe coincidir con el formato en su hoja de Excel. Los valores positivos indican Latitud N (norte) o Longitud E (este, oriente). Los valores negativos van anteceditos por el signo menos (–) e indican Latitud S (sur) o Longitud W (oeste, occidente).
- Listas de selección. Algunos campos que ofrece Specify se ofrecen en forma de “listas de selección” (pick lists), como, por ejemplo: método de recolección, tipo de preparación, sexo o estado de desarrollo del espécimen, entre otros. Debe asegurarse de que en su hoja de Excel estos datos coincidan completamente con los previamente configurados en Specify, tenga en cuenta las palabras escritas con mayúsculas.

2. Importación de datos desde Specify 6

Después de haber organizado la base de datos en su hoja de Excel siguiendo las recomendaciones anteriores, registre su usuario y contraseña e ingrese a Specify 6.

a. En la pantalla inicial del programa, ubique y seleccione en la cinta superior la pestaña Workbench (Fig. 9).

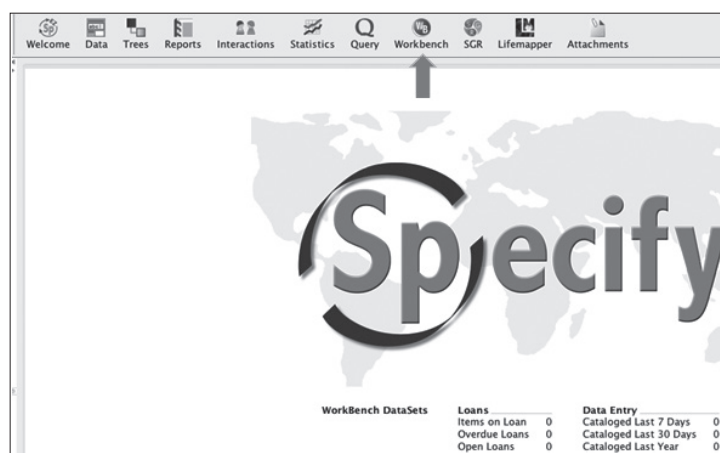


Figura 9. Pantalla inicial Specify, localización de pestaña Workbench.



b. Después de seleccionar Workbench se despliegan opciones en el lado izquierdo de la pantalla, seleccione la opción Import Data (importar datos) (Fig. 10).



Figura 10. Menú de opciones de Workbench.

A continuación, se abre una ventana para localizar la base de datos en formato Excel (Fig. 11), busque y seleccione el archivo que va a importar y haga clic en Abrir.

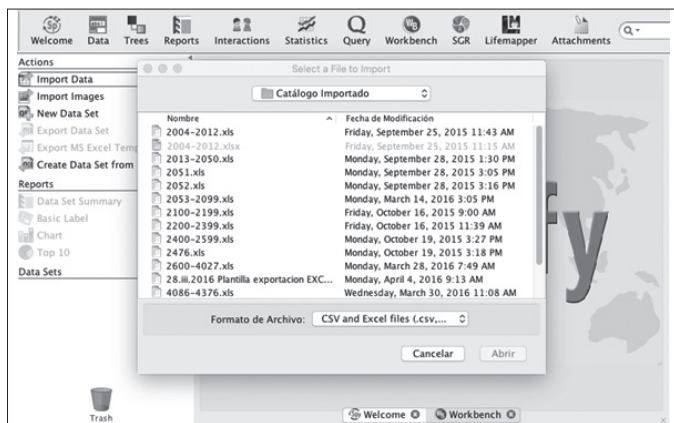


Figura 11. Selección del archivo que se va a importar.



d. Se abre una ventana en la que se ve la información de la hoja de Excel, asegúrese de que esté seleccionada la opción "First row contains column headers" (la primera fila contiene encabezados de columnas) (Fig. 12), y haga clic en OK.

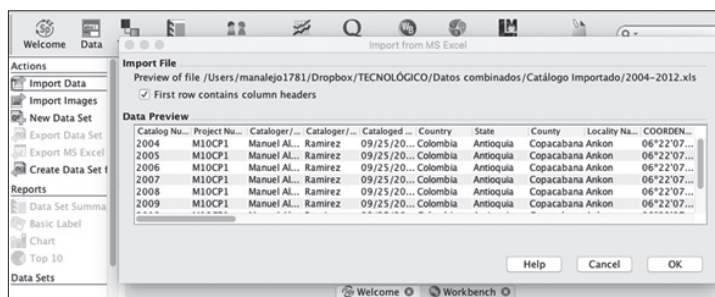


Figura 12. Selección de encabezados de columnas.

e. A continuación, se abre una de las ventanas más importantes en el proceso de importación Data Set Mapping Editor (editor de mapeo del conjunto de datos), este paso requiere la exploración total dependiendo de los datos de su interés. Es aquí donde usted relaciona cada columna de datos en su hoja de Excel con los campos de datos en el programa Specify (Fig. 13). En esta ventana se abren tres columnas de información: la primera Data Types (tipo de datos) muestra los tipos de datos de Specify; la segunda columna, Specify Fields (campos de Specify) muestra todos los campos relacionados con cada tipo de datos de Specify, y la tercera columna muestra la relación de cada una de las columnas del archivo en Excel con los campos de Specify. La información que en la columna Specify Fields aparece antecedida por un símbolo de visto bueno son los campos que están relacionados entre las columnas del archivo en Excel y los campos en Specify (ver Fig. 15).



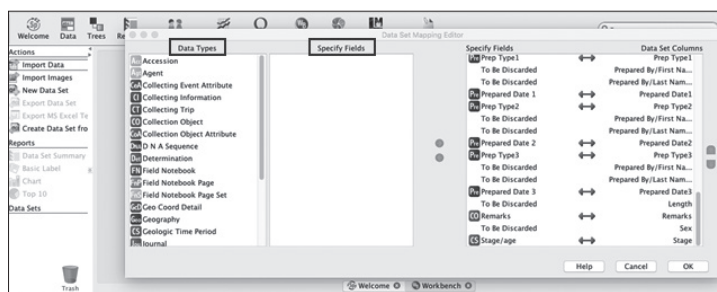


Figura 13. Editor de mapeo del conjunto de datos.

f. En la última columna es donde usted relaciona los datos de su hoja de Excel con los campos de Specify. Los datos que están relacionados están marcados con una flecha en doble sentido, y los que no lo están, están marcados con To Be Discarded (para descartar) y no serán importados por Specify (Fig. 14).

Specify Fields		Data Set Columns
☒ Catalog Number	↔	Catalog Number
☐ To Be Discarded		Project Number
☐ To Be Discarded		Cataloger/First Name
☐ To Be Discarded		Cataloger/Last Name
☒ Cataloged Date	↔	Cataloged Date

Figura 14. Relación de columnas de datos en el archivo Excel con los campos en Specify.

g. Edición de relación de columnas de Excel con campos en Specify. Para editar la relación de datos vamos a tomar como ejemplo la Fig. 14, en donde para la columna de la derecha Data Set Columns (columnas de conjuntos de datos), la columna Cataloger/First Name (catalogador/ primer nombre) no está relacionada con ningún campo de Specify (Specify Fields) y aparece To Be Discarded (para descartar).



- Se procede a seleccionar en la columna Data Types la opción CO, Collection Object (objeto de colección), porque la información que queremos relacionar pertenece a ese tipo de dato (Fig. 15).

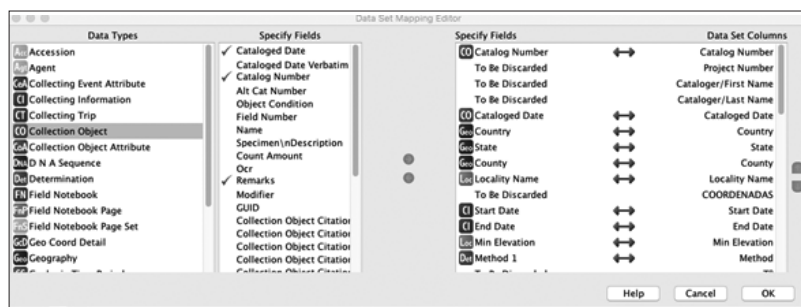


Figura 15. Búsqueda de campos en Specify (Specify Fields) relacionados con tipo de datos (Data Types).

- Después de hacer la selección, aparece en la columna Specify Fields todos los campos de información asociados al tipo de datos Collection Object, y moviendo la barra lateral seleccionamos la opción que necesitamos (Fig. 16).

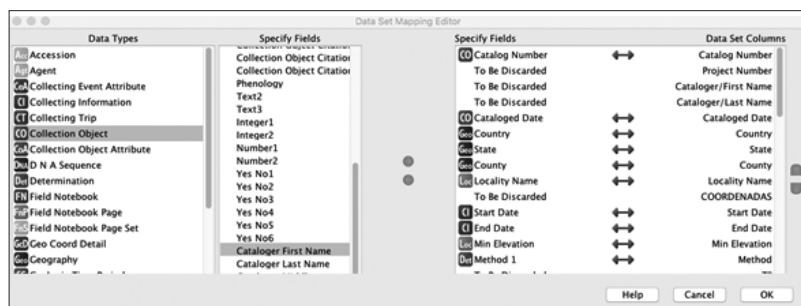


Figura 16. Cómo buscar campos en Specify para relacionarlos con los datos en Excel.



- Luego de haber seleccionado el campo en Specify que deseamos relacionar, en la última columna señalamos el campo para editar y se activa la flecha hacia la derecha que está en medio de las columnas 2 y 3 (Fig. 17).

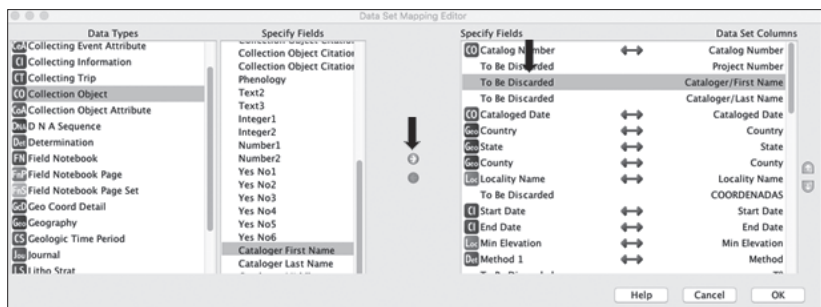


Figura 17. Asignar relación de campos en Specify con columnas de datos del archivo Excel.

- Hacemos clic sobre la flecha que se activa y vemos cómo se establece la relación de la columna Cataloger/First Name del archivo en Excel (Data Set Columns) con el campo en Specify Cataloger/First Name (Specify Fields) (Fig. 18).

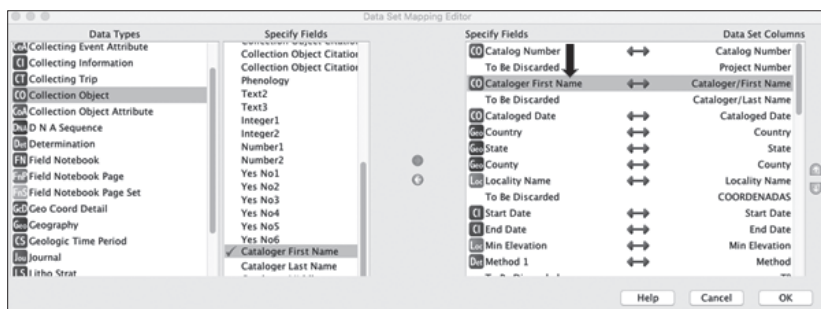


Figura 18. Asignación de relación entre datos del archivo que se va a importar con campos en Specify.



- Es importante que se dedique tiempo suficiente para la exploración de cada uno de los campos de Specify (Specify Fields) correspondientes a cada tipo de datos (Data Types) y asegurarse de que están bien relacionados con cada una de las columnas en su base de datos en Excel.

h. Cuando haya acabado de revisar las relaciones anteriores, haga clic en el botón OK.

i. A continuación aparece la ventana Data Set Properties la cual tiene la siguiente información: Name (nombre del archivo que usted va a importar); Remarks (observaciones), y Source File Path (ruta del archivo fuente). Usted puede editar los dos primeros campos o dejar la información tal cual aparece. Para finalizar, haga clic en OK (Fig. 19).

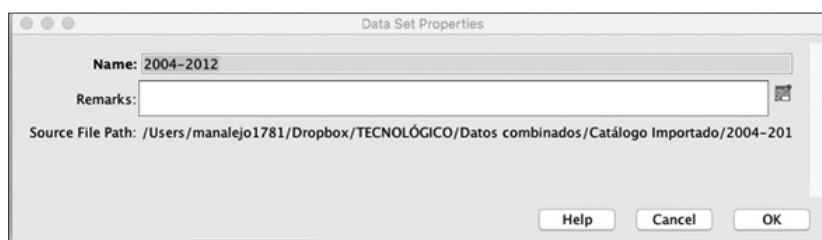


Figura 19. Data Set Properties (propiedades del juego de datos).

j. Al finalizar la operación anterior, se abre una ventana que nos muestra en el encabezado cada una de las columnas de los campos en Specify y los datos del archivo que se va a importar.

Si usted encuentra algún error en los datos, edítelos directamente mediante los botones para la edición ubicados en la parte inferior de la ventana; posicione el puntero sobre cada botón para saber la función.

Si alguno de los datos no se ajusta al formato en Specify, el programa le señalará con color rojo las casillas en las que se encuentran los errores, adicionalmente, en la esquina inferior izquierda le aparecerá la cantidad



de casillas con errores en Highlight Invalid Cells. Es necesario editar todos los datos señalados por el programa, de lo contrario, Specify le impide continuar la importación.

Cuando la información esté correcta seleccione el botón Save (guardar) ubicado en la parte inferior derecha de la ventana (Fig. 20).

	Catalog Number	Cataloged Date	Country	State	County	Locality Name	Start Date	End Date	Min Elevation
1	2013	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Copacabana	Ankon	12/06/2010	12/08/2010	1417.0
2	2014	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Copacabana	Ankon	12/06/2010	12/08/2010	1417.0
3	2015	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Copacabana	Ankon	12/06/2010	12/08/2010	1417.0
4	2016	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Copacabana	Ankon	12/06/2010	12/08/2010	1417.0
5	2017	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Caldas	La Clara	09/06/2010	09/08/2010	1840.0
6	2018	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Caldas	La Clara	10/04/2010	10/06/2010	1840.0
7	2019	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Copacabana	Ankon	03/10/2010	03/12/2010	1417.0
8	2020	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Copacabana	Ankon	03/10/2010	03/12/2010	1417.0
9	2021	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Copacabana	Ankon	06/04/2010	08/06/2010	1417.0
10	2022	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Medellin	Pajarito	11/10/2010	11/12/2010	1929.0
11	2023	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Caldas	La Clara	06/02/2010	06/04/2010	1840.0
12	2024	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Caldas	La Clara	06/02/2010	06/04/2010	1840.0
13	2025	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Caldas	La Clara	06/02/2010	06/04/2010	1840.0
14	2026	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Caldas	La Clara	06/02/2010	06/04/2010	1840.0
15	2027	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Caldas	La Clara	06/02/2010	06/04/2010	1840.0
16	2028	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Caldas	La Clara	06/02/2010	06/04/2010	1840.0
17	2029	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Caldas	La Clara	06/02/2010	06/04/2010	1840.0
18	2030	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Caldas	La Clara	06/02/2010	06/04/2010	1840.0
19	2031	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Caldas	La Clara	06/02/2010	06/04/2010	1840.0
20	2032	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Caldas	La Clara	06/02/2010	06/04/2010	1840.0
21	2033	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Medellin	Cola del Zorro	01/19/2011	01/21/2011	1943.0
22	2034	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Copacabana	Ankon	12/06/2010	12/08/2010	1417.0
23	2035	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Copacabana	Ankon	01/17/2011	01/19/2011	1417.0
24	2036	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Medellin	Cola del Zorro	01/19/2011	01/21/2011	1943.0
25	2037	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Medellin	Cola del Zorro	01/19/2011	01/21/2011	1943.0
26	2038	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Medellin	Cola del Zorro	01/19/2011	01/21/2011	1943.0
27	2039	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Copacabana	Ankon	12/06/2010	12/08/2010	1417.0
28	2040	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Copacabana	Ankon	10/06/2010	10/08/2010	1417.0
29	2041	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Medellin	Cola del Zorro	11/13/2010	11/16/2010	1943.0
30	2042	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Caldas	La Clara	01/17/2011	01/19/2011	1840.0
31	2043	09/28/2015	Colombia	Antioquia	Caldas	La Clara	01/17/2011	01/19/2011	1840.0

Figura 20. Plantilla de datos para importar relacionados con los campos en Specify.

k. Después de guardar la información, seleccione la opción Upload DataSet to Specify Database (subir el conjunto de datos en la base de datos de Specify) que se encuentra en el menú de la parte inferior de la ventana. Es la carpeta de color azul con una flecha naranja dirigida hacia arriba (Fig. 21). Esta opción se habilita después de que se ha guardado la información.





Figura 21. Opciones para la edición, subida y exportación de información. La carpeta con la flecha naranja que apunta hacia arriba es la Upload DataSet to Specify Database.

Al ejecutar esta acción se abre una ventana en la parte inferior de la pantalla. Aquí el sistema verifica en qué formato están los datos que se van a importar. De presentarse algún error, el sistema le arrojará el mensaje para señalarlo, de lo contrario, en la ventana inferior aparece el mensaje Ready to upload, los datos están listos para ser cargados. Para finalizar la acción, haga clic en el botón Upload (subir o cargar) ubicado al costado derecho de la ventana (Fig. 21). Es por medio de esta acción que los datos que se van a importar se organizan bajo el esquema del Specify.

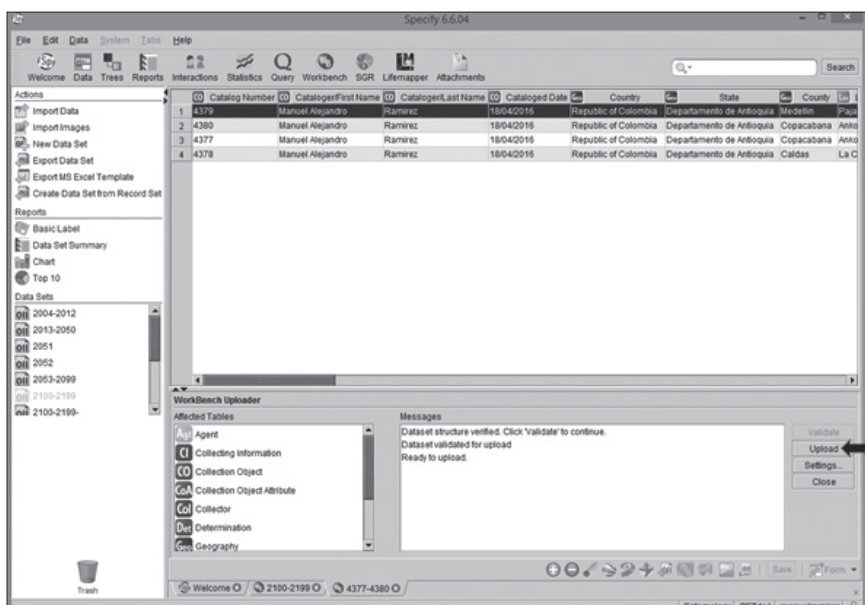


Figura 22. Ventana de verificación de datos con la herramienta Upload DataSet to Specify Database.



m. A continuación, haga clic en el botón Commit (Fig. 23). Después aparece una ventana de confirmación en la que se le pregunta si está seguro de cargar los datos para ser incluidos en la base de datos de Specify. Haga clic en YES para aceptar, NO para no aceptar, o CANCEL para cancelar (Fig. 23). Si su selección es Yes, se da por terminada la importación, y ahora su juego de datos entra a hacer parte de la base de datos en Specify.

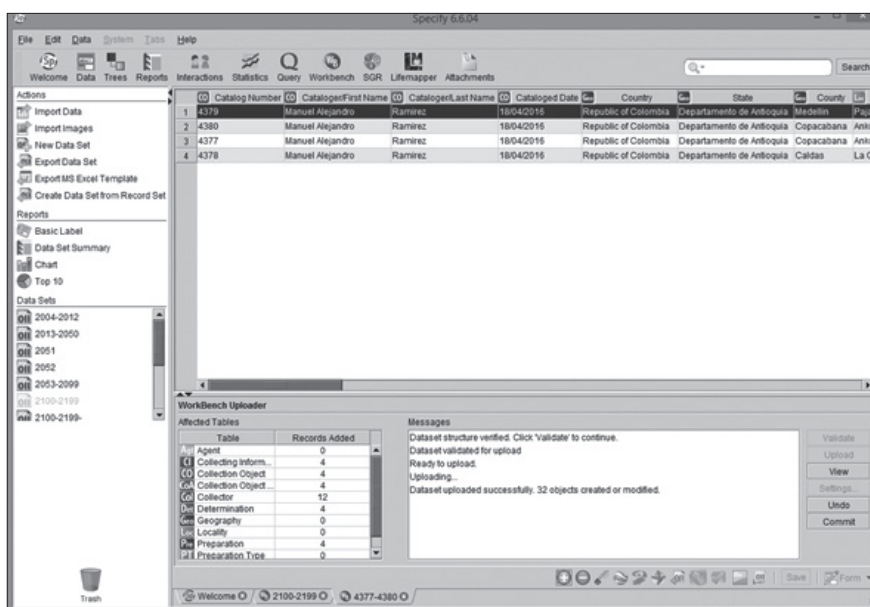


Figura 23. Selección del comando Commit para verificar carga de datos.



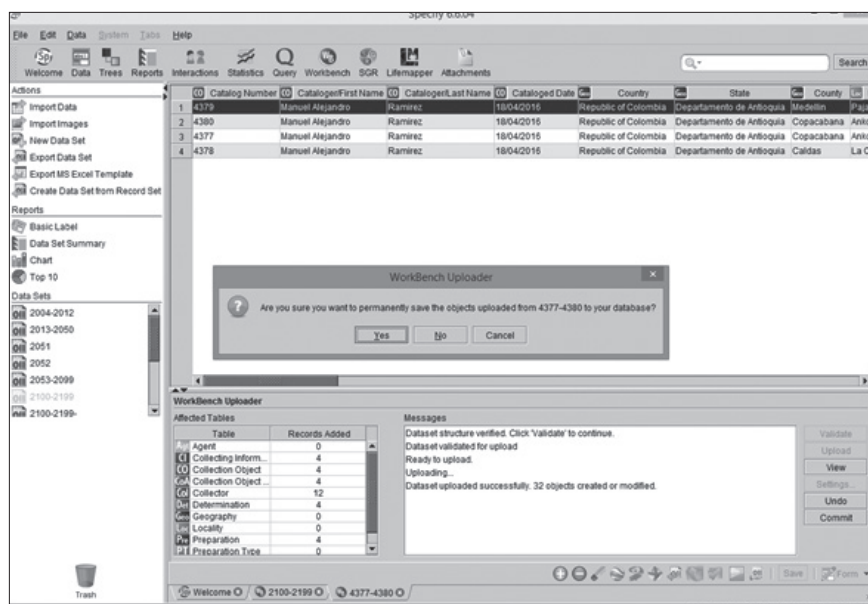


Figura 24. Ventana de verificación para incorporar los datos que se van a importar a la base de datos de Specify.

E. Referencias bibliográficas

Specify Software Project, Biodiversity Institute, University of Kansas, 1345 Jayhawk Boulevard, Lawrence, KS USA 66045. Website: www.specifysoftware.org



Extracción de ADN a partir de insectos con buffer de macerado

Isabel Cristina Cadavid

A. Fundamento teórico

Todo método de extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico) tiene cuatro fases fundamentales: fase de lisis celular, fase de separación de proteínas y lípidos, fase de precipitación y fase de resuspensión del ADN. Los métodos de extracción difieren uno del otro en función del tipo de tejido que se emplee. Algunos organismos que poseen pared celular, como plantas y hongos, requieren pasos previos que permitan romperla, por ejemplo, a través de maceración de las células con nitrógeno líquido (Al-Samarrai & Schmid, 2000). Por otro lado, hay células más sencillas de romper, porque no tienen pared celular, como las animales, sin embargo, los insectos poseen quitina en el exoesqueleto, por lo cual se requieren pasos adicionales de maceración que ayuden a romper el tejido (2) (Rosero et al., 2010).

Los métodos de extracción pueden diferir en la forma de precipitación de proteínas. Algunos usan solventes orgánicos como el fenol y el



cloroformo, los cuales, a pesar de ser eficientes para lograr una buena separación de ADN y proteínas, implican un riesgo para la salud y el medio ambiente (Niu et al., 2008; Valter De Oliveira, Da Luz & Silva, 2009). Otros métodos de precipitación de proteínas incluyen el uso de sales, que provocan que las proteínas pierdan solubilidad y formen un precipitado, y así el ADN queda en el sobrenadante (Collins et al., 1987; Miller, Dykes & Polesky, 1988).

Finalmente, en la fase de precipitación del ADN, los métodos incluyen el uso de alcoholes para eliminar los restos de sales y elementos de la solución de lisis, a través de la insolubilización del ADN y la formación de un precipitado, para obtener un ADN más puro (Collins et al., 1987).

El método de Collins et al. (1987) posee las cuatro fases mencionadas, en las cuales se hace una ruptura celular usando un buffer de lisis (NaCl 0,1 M; Sucrosa 0,1 M; Tris 0,1 M; EDTA 0,05 M, y SDS 0,5 %) y macerando la muestra. La precipitación de proteínas se logra con acetato de potasio (8M), y la purificación del ADN, a través de lavados con etanol a diferentes concentraciones.

Finalmente, se realiza una resuspensión del ADN con el fin de usarlo en aplicaciones moleculares subsecuentes, en agua ultrapura o buffer TE, dependiendo del tiempo de almacenamiento que se requiera para el procesamiento de la muestra. Mientras que el agua puede utilizarse para tiempos de almacenamiento cortos, el buffer TE se recomienda para almacenamientos más prolongados, debido a que el Tris amortigua el pH y el EDTA inactiva enzimas que puedan degradar el ADN.

B. Objetivo

Extraer ADN a partir de insectos mediante la adaptación del protocolo Collins et al. (1987)

C. Requerimientos

Equipos

- Baño seco
- Centrífuga
- Refrigerador a -20°C o racks refrigerantes



Materiales

- Viales de 1,5 ml
- Gradillas
- Guantes de látex
- Marcador indeleble
- Servilletas
- Puntas estériles de 20 μ l y 100 μ l
- Micropipetas de 20 μ l y 100 μ l
- Maceradores estériles

Reactivos

- Buffer de lisis (ver preparación en protocolo "Preparación de solución de lisis para extracción de ADN" descrito por Collins et al. (1987))
- Agua destilada
- Etanol refrigerado al 70 % y 100 %
- Etanol al 100 %
- Acetato de Potasio (8M)

Preparación del lugar de trabajo

Antes de comenzar se deben limpiar las superficies de trabajo con alcohol para evitar la presencia de polvo, microorganismos o ADN de extracciones previas. Se debe alistar la bata de laboratorio, los guantes y todos los materiales necesarios para el procedimiento. Se sugiere que la bata usada para el trabajo molecular sea exclusiva para esta labor con el fin de evitar posibles contaminaciones.

D. Procedimiento

1. Tomar dos viales de 1,5 ml por cada espécimen, marcarlos con los códigos respectivos y organizarlos en una gradilla en orden consecutivo.
2. Tomar muestra del tejido del espécimen y depositarla en un vial de 1,5 ml.
3. Agregar 50 μ l del buffer de lisis y macerar la muestra. Dispense sobre el macerador otros 50 μ l con el fin de desprender los residuos de tejido para que queden incluidos en la muestra y homogenizar.
4. Agregar 1 μ l de proteinasa K (20 mg/ml) para una concentración final de 0,2 mg/ml (se debe tener en cuenta que esta cantidad es para un volumen aproximado de 100 μ l de buffer de lisis).



5. Incubar la muestra en un baño seco, a una temperatura de 56 °C, durante 1 hora. Este paso permitirá desnaturalizar enzimas y otras proteínas presentes en el tejido.
6. Después de la hora de incubación, aumentar la temperatura a 95 °C durante 15 minutos, este paso se realiza con el fin de desnaturalizar la proteinasa K y evitar su actividad desnaturalizante en las reacciones de PCR (del inglés, Polymerase Chain Reaction).
7. Agregar acetato de potasio para una concentración final de 1M (de una solución 8M tomar 14,5 µl para obtener la concentración final de 1M). Este paso eliminará las proteínas de la muestra mediante precipitación salina.
8. Incubar a -20 °C durante 1 hora en racks refrigerantes, o toda la noche en un refrigerador. Este paso permite la precipitación de proteínas.
9. Centrifugar la muestra a 13.500 rpm, durante 15 min. Este paso permite remover todos los residuos sólidos.
10. Pasar el sobrenadante a un nuevo vial de 1,5 ml previamente marcado y descartar el vial que contiene el precipitado.
11. Agregar al sobrenadante 100 µl de etanol absoluto (100 %), mezclar por inversión y dejar a temperatura ambiente por 5 min.
12. Centrifugar la muestra a 13.500 rpm durante 15 min.
13. Descartar el sobrenadante por inversión, evitando el desprendimiento del precipitado y agregar 100 µl de etanol refrigerado al 70 %
14. Centrifugar la muestra a 13.500 rpm, durante 15 min.
15. Descartar el sobrenadante por inversión y conservar el precipitado.
16. Con el fin de eliminar el etanol remanente, invertir los viales sobre una servilleta como mínimo durante una hora. Este paso es crucial para garantizar que no queden remanentes de etanol, inhibidor potencial de la PCR.
17. Resuspender la muestra. Para esto, agregar 50 µl de agua ultrapura grado molecular o de buffer TE, de acuerdo con el tiempo que se requiera para la conservación y el almacenamiento de la muestra.
18. Para homogenizar, incubar la muestra en el baño seco a 37 °C por 10 min. Si se considera necesario tratar con RNAasa (25 mg/ml), agregar 1 µl de la enzima e incubar durante 30 minutos a 60 °C
19. Se sugiere dividir el ADN extraído en dos alícuotas, una para el trabajo cotidiano en el laboratorio y otra para el banco de ADN, que permanecerá congelada hasta que se requiera.



E. Referencias bibliográficas

- Al-Samarrai, T.H. & Schmid, J. (2000). A simple method for extraction of fungal genomic DNA. *Letters in Applied Microbiology*, 30(1), 53-56. doi: <https://doi.org/10728561>
- Collins, F.H., Mendez, M.A, Rasmussen, M.O., Mehaffey, P.C., Besansky, N.J. & Finnerty, V. (1987). A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37(1), 37-41.
- Miller, S.A., Dykes, D.D. & Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
- Niu, C., Kebede, H., Auld, D.L., Woodward, J.E., Burow, G. & Wright, J. (2008). A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment. *African Journal of Biotechnology*, 7(16), 2818-2822. doi: <https://doi.org/10.5897/AJBo8.504>
- Rosero, D.A., Gutiérrez, L.A., Cienfuegos, A.V, Jaramillo, L.M. & Correa, M.M. (2010). Optimización de un procedimiento de extracción de ADN para mosquitos anofelinos. *Revista Colombiana de Entomología*, 36, 260-263.
- Valter De Oliveira, L.F., Da Luz Wallau, G. & Silva Loreto, E.L. (2009). Isolation of high quality DNA: A protocol combining "rennet" and glass milk. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(2). doi: <https://doi.org/10.2225/vol12-issue2-fulltext-4>



Preparación de solución de lisis para extracción de ADN descrito por Collins et al. (1987)

Isabel Cristina Cadavid
Giovan F. Gómez

A. Fundamento teórico

Para preparar el buffer de lisis descrito por Collins et al. (1987), utilizado en la extracción de ADN, es necesario emplear los reactivos que se describen a continuación, los cuales cumplen papeles fundamentales en la lisis de la célula para obtención de ADN.

SDS (sodio dodecil sulfafo): Es un detergente aniónico que solubiliza los lípidos y proteínas, y desestabiliza la estructura de la membrana celular (Rocha, 2002).

Sucrosa: Esta provoca una desestabilización de la estructura celular a través del cambio de la presión osmótica (Rocha, 2002).

NaCl (cloruro de sodio): Los grupos fosfato tienen una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa, lo que permite disolver al ADN en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor



de la molécula. La capa hidratante se rompe en presencia de etanol y quedan expuestos los grupos fosfato. Bajo estas condiciones, se favorece la unión con cationes como Na^+ que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el ADN se precipite (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989).

Tris (hidroximetil amino metano): Es un tampón biológico usado para estabilizar el pH de la solución (entre 7,0 y 8,0) (Rocha, 2002).

EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético): Una vez el ADN es liberado del núcleo, queda expuesto a las enzimas DNAsas de la célula que degradan el ADN. Para evitar la degradación se usa el EDTA, agente quelante que atrapa los iones Mg^{2+} usados por las DNAsas como cofactores (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 2001). La inhibición de las enzimas también puede realizarse mediante métodos físicos, como la desnaturalización por calor (a temperaturas de 65 °C) (Rocha, 2002).

HCl (ácido clorhídrico): Sólo se usa si es necesario para ajustar el pH a 8,6. Teniendo en cuenta que el ADN puede ser destruido (depurinado) a pH ácido (menor de 4,0), es insoluble a pH 5,6 pero soluble a pH 8,0. Por lo tanto, los procesos de extracción, purificación y almacenamiento del ADN deben mantener el pH óptimo y brindar una alta concentración iónica (Rocha, 2002).

B. Objetivo

Preparar el buffer de lisis descrito por Collins et al. (1987) para la extracción de ADN.

C. Requerimientos

Materiales

- Espátula
- Tubos falcón de 15 ml y 50 ml
- Marcador indeleble
- Agitador magnético
- Erlenmeyer
- Probeta graduada



Reactivos (para preparación de 50 ml)

- 30 ml de H₂O destilada
- 2,5 ml de EDTA (1M)
- 2,5 ml de SDS (10 %)
- 5 ml de NaCl (1M)
- 5 ml de sucrosa (1M)
- 5 ml de Tris (1 M)
- HCl
- NaCl

Equipos

- Balanza analítica
- pH-metro

D. Procedimiento de preparación de buffer de lisis

Inicialmente se deben preparar las soluciones individuales de los reactivos, que luego serán mezclados. Las concentraciones finales a las que debe quedar cada uno de los reactivos después de mezclados son las siguientes:

NaCl 0,1 M; Sucrosa 0,1 M; Tris 0,1 M; EDTA 0,05 M, y SDS 0,5 %

Preparaciones de soluciones

Preparación de NaCl

Para preparar una solución de 40 ml de NaCl a una concentración de 1 M, se deben hacer los siguientes cálculos:

PM (peso Molecular) NaCl: 58,4 g/mol **1 M = 1 mol/1000 ml**

$$\begin{aligned}
 58,4 \text{ gr} &\rightarrow 1000 \text{ ml} \\
 x \text{ gr} &\rightarrow 40 \text{ ml} \\
 x &= (58,4 \times 40) \div 1000 \\
 x &= 2,34 \text{ g}
 \end{aligned}$$

Por tanto, se deben tomar 2,34 g de NaCl y completar con un volumen de 40 ml de agua destilada. Agitar hasta lograr una solución homogénea.



Preparación de sucrosa

Para preparar una solución de 40 ml de sucrosa a una concentración de 1 M, se deben hacer los siguientes cálculos:

$$\text{PM sucrosa: } 342,30 \text{ g/mol} \quad 1 \text{ M} = 1 \text{ mol/1000 ml}$$

$$\begin{aligned} 342,3 \text{ g} &\rightarrow 1000 \text{ ml} \\ x \text{ g} &\rightarrow 40 \text{ ml} \\ x &= (342,3 \times 40) \div 1000 \\ x &= 13,7 \text{ g} \end{aligned}$$

Por tanto, se deben tomar 13,7 g de sucrosa y completar con un volumen de 40 ml de agua destilada. Agitar hasta lograr una solución homogénea.

Preparación de TRIS

Para preparar una solución de 40 ml de Tris a una concentración de 1 M, se deben hacer los siguientes cálculos:

$$\text{PM TRIS: } 121,14 \text{ g/mol} \quad 1 \text{ M} = 1 \text{ mol/1000 ml}$$

$$\begin{aligned} 121,14 \text{ g} &\rightarrow 1000 \text{ ml} \\ x \text{ g} &\rightarrow 40 \text{ ml} \\ x &= (121,14 \times 40) \div 1000 \\ x &= 4,84 \text{ g} \end{aligned}$$

Por tanto, se deben tomar 4,84 g de Tris y completar con un volumen de 40 ml de agua destilada. Agitar hasta lograr una solución homogénea.

Preparación de EDTA

Para preparar una solución de 40 ml de EDTA a una concentración de 1 M, se deben hacer los siguientes cálculos:

$$\text{PM EDTA: } 292,24 \text{ g/mol} \quad 1 \text{ M: } 1 \text{ mol/1000 ml}$$

$$\begin{aligned} 292,24 \text{ g} &\rightarrow 1000 \text{ ml} \\ x \text{ g} &\rightarrow 40 \text{ ml} \\ x &= (292,24 \times 40) \div 1000 \\ x &= 11,68 \text{ g} \end{aligned}$$



Por lo tanto, se deben agregar 11,68 g de EDTA y llevar hasta alrededor de 20 ml. Ajuste el pH a 8 añadiendo gotas de HCl, mezclando y midiendo constantemente con el pH-metro. El EDTA se disolverá cuando alcance este pH. Para finalizar, afore con agua destilada hasta alcanzar un volumen de 40 ml. Agitar hasta lograr una solución homogénea.

Preparación de SDS

Para preparar una solución de 40 ml de SDS a una concentración de 10 %, se deben hacer los siguientes cálculos:

$$\begin{aligned}
 \text{PM SDS: } 288,38 \text{ gr/mol} \quad & 10 \%: 10 \text{ g}/100 \text{ ml} \times 100 \\
 & 10 \text{ g} \rightarrow 100 \text{ ml} \\
 & x \text{ g} \rightarrow 40 \text{ ml} \\
 & x = (10 \times 40) \div 100 \\
 & x = 4 \text{ g}
 \end{aligned}$$

Por tanto, se deben tomar 4 g de SDS, y completar con un volumen de 40 ml de agua destilada y homogenizar.

Mezcla de soluciones

Para 50 ml de buffer de lisis medir cada una de las cantidades de los reactivos mediante probetas así: 5 ml de NaCl (1 M), 5 ml de Sucrosa (1 M), 5 ml de Tris (1 M), 2,5 ml de EDTA (1 M) y 2,5 ml de SDS (10 %). Mezclarlos en un erlenmeyer, completar con 30 ml de agua destilada. Utilizar el agitador magnético para homogenizar. Medir el pH y ajustar con HCl o NaCl a 8,6. Finalmente, transferir a un tubo tipo Falcon, el cual se marca con el nombre del reactivo, la fecha de preparación y el nombre de quien prepara.

E. Referencias bibliográficas

- Collins, F.H., Mendez, M.A, Rasmussen, M.O., Mehaffey, P.C., Besansky, N.J. & Finnerty, V. (1987). A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37(1), 37-41.
- Rocha Salavarieta, P.J. (2002). Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. *Palmas*, 23(3), 9-17.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York (3rd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. doi: <https://doi.org/574.873224> 1/1989



Extracción de ADN con DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN), modificado para insectos

Juliana Pérez Pérez

A. Fundamento teórico

Los cambios más importantes que han ocurrido en las ciencias biológicas en los últimos veinte años, han surgido principalmente de la aplicación de técnicas moleculares que usan ADN para abordar problemas en áreas de estudio como la filogenética, ecología evolutiva, filogeografía, conservación, taxonomía molecular, etc. (Lanteri, Loíacono & Margaría, 2002). El uso de las herramientas moleculares presenta varias ventajas, que incluyen la posibilidad de trabajar con pequeñas cantidades de tejido, una característica importante para estudios con insectos (Hoy, 2003).

La extracción de ADN es un paso fundamental para estudios moleculares. Existen varias técnicas para obtener ADN que se basan en solventes orgánicos, en precipitación con sales o en membranas de sílica. Generalmente, los kits comerciales usan membranas de sílica en el proceso de extracción de ADN. Uno de los kits disponibles en el mercado es DNeasy de QIAGEN®, el cual usa una tecnología de membranas



de silicato para purificar rápidamente el ADN celular total, sin usar solventes orgánicos que generan un riesgo para la salud humana y el medio ambiente por las dificultades para su eliminación (Niu et al., 2008) chloroform.

Este método permite una lisis directa, la cual se logra con proteinasa K; el pH se ajusta con diferentes buffers para lograr la máxima fijación de ADN a la membrana, y los contaminantes e inhibidores enzimáticos son removidos por centrifugación.

B. Objetivo

Conocer el procedimiento para extracción de ADN usando el equipo DNeasy de QIAGEN® para insectos.

C. Requerimientos

Materiales

- Viales estériles de 2 ml (Fig. 1a)
- Viales estériles de 1,5 ml (Fig. 1b)
- Columnas DNeasy Mini Spin (Fig. 1c)
- Micropipetas: 20, 100, 200 y 1.000 µl
- Puntas estériles para pipetas de 20, 100, 200 y 1.000 µl
- Maceradores estériles (Fig. 1d)
- Gradilla para viales de 1,5 ml
- Guantes de látex o de nitrilo (exclusivos para cada sesión de trabajo)
- Cronómetro
- Frascos de descarte
- Papel absorbente

Reactivos

- Nitrógeno líquido (Opcional)
- Buffer ATL (buffer de lisis)
- Proteinasa K (15 mg/ml)
- Buffer AL (solución amortiguadora con sal caotrópica)
- Etanol 100 %
- Buffer AW1 (buffer de lavado)
- Buffer AW2 (buffer de lavado)
- Buffer AE (buffer de elución)



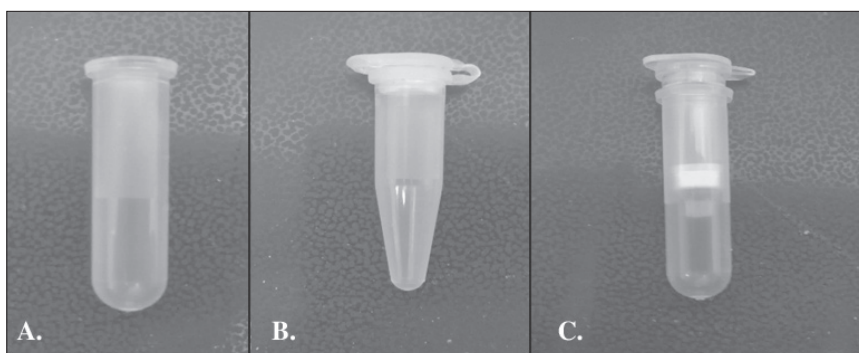


Figura 1. a) Vial 2 ml. b) Vial 1,5 ml. c) Columna DNeasy Mini Spin.

Equipos

- Baño seco (Fig. 2a)
- Agitador tipo vórtex (Fig. 2b)
- Centrífuga (Fig. 2c)

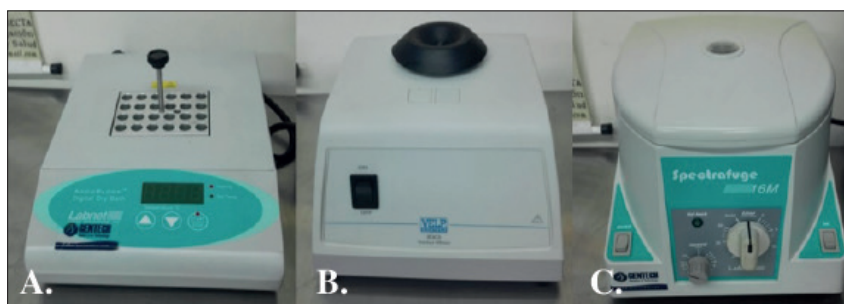


Figura 2. a). Baño seco. b) Agitador tipo vórtex. c) Centrífuga.



D. Procedimiento

Antes de comenzar el trabajo, asegúrese de tener todos los materiales y equipos listos para el procesamiento de las muestras.

Recuerde cumplir con todas las normas de bioseguridad para su protección personal. Para esto, tenga en cuenta las siguientes recomendaciones:

- En el laboratorio está prohibido fumar y comer.
- Utilizar bata y guantes (preferiblemente de nitrilo).
- Desinfectar con alcohol al 70 % la superficie donde va a realizar el trabajo.
- Utilizar los reactivos en las cantidades y concentraciones que se indiquen.
- Descartar las puntas de las micropipetas en los frascos de descarte de material.
- Disponer adecuadamente los residuos, según las normas de bioseguridad.
- Al terminar, dejar limpio y ordenado el sitio de trabajo y los materiales empleados.

Pasos

1. Seleccionar los especímenes para extracción.
2. Llenar las fichas de registro con los datos correspondientes (Anexo 5).
3. Por cada muestra, marcar 4 viales (tres de 1,5 ml y uno de 2 ml) y una columna de DNeasy Mini Spin con el código de la muestra; se debe marcar en el lateral y en la tapa del vial.
4. Disponer los viales en cuatro líneas paralelas en orden consecutivo de acuerdo con el código para evitar confusiones y optimizar el tiempo del proceso.
5. Colocar una de las patas del insecto en uno de los viales de 1,5 ml, adicionar nitrógeno líquido (opcional) y macerar inmediatamente. Tener precaución que al dispensar el nitrógeno líquido no se pierda la muestra.
6. Macerar con 80 µl de buffer ATL.
7. Terminada la maceración, adicionar 100 µl de buffer ATL.
8. Homogenizar en vórtex.



9. Adicionar 20 µl de proteinasa K (15 mg/ml), homogenizar en agitador tipo vórtex e incubar a 56 °C durante 1-3 horas, dependiendo del tipo de tejido (homogenizar manualmente durante la incubación).
10. Adicionar 200 µl de buffer AL a la muestra y homogenizar en vórtex.
11. Adicionar 200 µl de etanol al 100 % y homogenizar en vórtex.
12. Pasar todo el contenido a la columna DNeasy Mini Spin, y colocar esta columna en un vial de 2 ml (provisto en el kit).
13. Centrifugar a 8.000 rpm un minuto.
14. Elimine el líquido que pasó a través de la columna, sin descartar el vial. Disponga nuevamente la columna dentro de este vial
15. Agregar 500 µl de buffer AW1.
16. Centrifugar a 8.000 rpm durante un minuto.
17. Descartar el contenido que pasó a través de la columna.
18. Colocar la columna DNeasy Mini Spin en un nuevo vial de 2 ml (provisto en el kit).
19. Adicionar 500 µl de buffer AW2.
20. Centrifugar a 14.000 rpm tres minutos.
21. Descartar el contenido que pasó a través del tubo.
22. Remover la columna cuidadosamente para que no haga contacto con el fluido que pasó a través de la membrana.
23. Transferir la columna a un nuevo vial de 1,5 ml.
24. Adicionar 100 µl de buffer AE directamente en la membrana del DNeasy.
25. Incubar durante un minuto a temperatura ambiente.
26. Centrifugar a 8.000 rpm durante un minuto.
27. Adicionar nuevamente 100 µl de buffer AE.
28. Incubar durante un minuto a temperatura ambiente.
29. Centrifugar a 8.000 rpm durante un minuto.
30. Conservar el contenido que pasó a través de la membrana y transferir 100 µl de esta elución a otro vial de 1,5 ml, con el fin de tener dos alícuotas: una para ser utilizada como solución de trabajo (-20 °C), y la otra como muestra de respaldo (a -80°C). Dependiendo de la cantidad de tejido de partida o de la cantidad de ADN esperado, el volumen final de elución puede variar (ejemplo, si es a partir de una pata de mosca esta elución puede realizarse en 50 µl, con el fin de tener mayor concentración final de ADN).
31. Almacenar en tubos rotulados (código, fecha, persona que realizó la extracción) a -80 °C.



E. Referencias bibliográficas

- Hoy, M.A. (2003). Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Applications: Second Edition. Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Applications (2.nd ed.). Recuperado de <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84903092159&partnerID=40&md5=97ec2f985eedf82a8fa23doecodcbf36>
- Lanteri, A.A, Loiácono, M.S. & Margaría, C. (2002). Aportes de la biología molecular a la conservación de los insectos. Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática, 2, 207-220.
- Niu, C., Kebede, H., Auld, D. L., Woodward, J. E., Burow, G. & Wright, J. (2008). A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment. African Journal of Biotechnology, 7(16), 2818-2822. doi: <https://doi.org/10.5897/AJBo8.504>



Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa clásica

Ana Milena Varela
Isabel Cristina Cadavid Sánchez

A. Fundamento teórico

La Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR (Polymerase Chain Reaction) descrita inicialmente por Kary Mullis en 1986, es una técnica que permite la amplificación de fragmentos específicos de ADN. Es un método basado en la síntesis de ácidos nucleicos in vitro mediante pequeños fragmentos de ADN o ARN llamados cebadores (primers, en inglés). Los cebadores son oligonucleótidos con alrededor de 17 a 30 pares de bases, que se hibridan a una secuencia complementaria de ADN y determinan el tamaño y la especificidad del fragmento que se va a amplificar (Ausubel et al., 2003) the first in the Current Protocols family of laboratory manuals, is the international standard by which all other laboratory manuals are judged. Originally published in 1987, CPMB now boasts of three looseleaf volumes (soon to expand to four volumes).



Entre los componentes de la PCR también se incluye una enzima llamada ADN polimerasa, encargada de sintetizar la cadena complementaria, esta enzima debe ser estable a altas temperaturas para resistir la temperatura de desnaturalización del ADN (95 °C). Otros componentes son: los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), los cuales constituyen el sustrato para la polimerización, los iones de Mg^{2+} que actúan como cofactores de la enzima ADN polimerasa, el buffer de la polimerasa, el cual mantiene regulado el pH de la reacción, el ADN total proveniente de la extracción (ADN molde), y H_2O ultra pura estéril libre de nucleasas, para completar el volumen final de la reacción. En algunos casos se usan adyuvantes para mejorar la eficiencia de la reacción, como BSA (Bovine Serum Albumin), DMSO (Dimetil sulfóxido), glicerol, entre otros.

La PCR tiene tres fases fundamentales, cuya duración, usualmente, es entre 15 segundos y un minuto.

1. **Desnaturalización:** etapa en la cual las cadenas complementarias se separan al ser sometidas a altas temperaturas (típicamente a 95 °C)
2. **Alineamiento:** Los cebadores hibridan con la secuencia complementaria en el ADN molde. Generalmente la temperatura de alineamiento se encuentra entre 50 y 60 °C dependiendo de la T_m^1 de los cebadores.
3. **Elongación:** La enzima ADN polimerasa cataliza la incorporación de cada uno de los dNTP de acuerdo con la secuencia de la cadena molde. Este proceso se lleva a cabo a una temperatura de 72 °C aproximadamente.

Estas tres fases se repiten entre 20 y 35 ciclos normalmente, para lograr la amplificación exponencial del fragmento diana de ADN. Antes del primer ciclo se realiza una desnaturalización (hot start) de aproximadamente tres minutos de duración, para reducir la unión de los cebadores a sitios inespecíficos y la formación de dímeros del cebador. Adicionalmente, al terminar los ciclos se usa un paso de extensión final para asegurar que las nuevas cadenas queden completamente sintetizadas.

¹ Temperatura de fusión (también denominado valor T_m , del inglés melting temperature) es la temperatura a la cual la mitad de las moléculas complementarias se encuentran unidas.



Para la compra de los cebadores se requiere su nombre y su secuencia, los cuales se toman de los artículos publicados o se pueden diseñar a partir de análisis de secuencias; para la selección del fragmento de ADN, se debe tener en cuenta el organismo que se requiere estudiar y el tipo de pregunta de investigación que se quiere responder (variabilidad molecular, identificación molecular, genética poblacional, filogenética, etc.).

B. Objetivo

Describir el procedimiento para amplificar fragmentos de ADN a partir de insectos por medio de la PCR clásica.

C. Requerimientos

Materiales

- Formato de registro de PCR (Anexo 6)
- Micropipetas de 10, 100, 200 y 1000 μ l (Fig. 1a)
- Puntas estériles para micropipetas de 10, 100, 200 y 1000 μ l
- Tubos de PCR de 0,2 ml (Fig. 1c) o placas con su respectiva lámina adhesiva
- Guantes de nitrilo (preferiblemente)
- Marcadores indelebles de punta fina
- Frascos para el descarte de puntas y viales
- Papel absorbente
- Gradilla térmica (Fig. 1b)
- Película plástica adhesiva



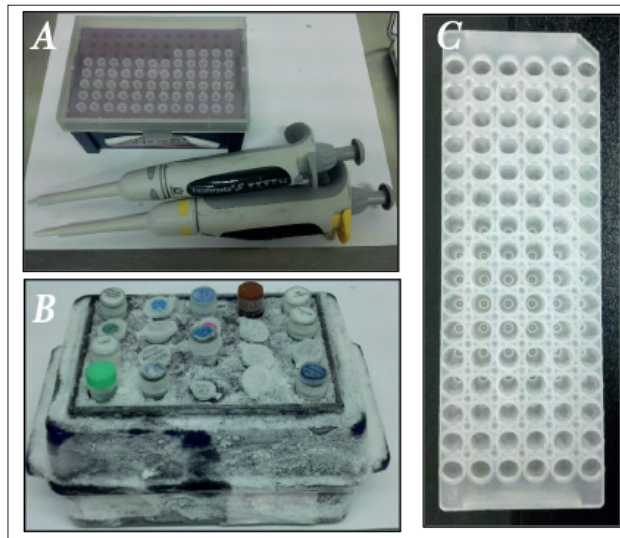


Figura 1. a) Puntas y micropipetas. b) Reactivos en gradilla térmica. c) Placa de PCR.

Reactivos

- Enzima ADN polimerasa (Ej. TaqPol, Pfu, Gold, etc.)
- Buffer de ADN polimerasa
- $MgCl_2$
- dNTP (ver el procedimiento de preparación en sección D)
- Cebadores forward y reverse² (ver la preparación en "Procedimiento")
- Agua ultrapura estéril
- ADN genómico

Equipos

- Termociclador
- Refrigerador
- Agitador tipo vórtex

² Se necesitan dos cebadores para la reacción de PCR, uno para cada hebra de la molécula de ADN.





Figura 2. Termociclador Piko, 96- pozos. Ref.: TCP0096

D. Procedimiento

1. Con ayuda del papel absorbente y alcohol al 70 %, limpiar adecuadamente la superficie del lugar donde se va a realizar el procedimiento.
2. Ubicar todos los materiales en la superficie, de modo que queden organizados y de fácil acceso. Los reactivos deben estar en cadena de frío y se deben descongelar y centrifugar antes de ser usados. Se recomienda que la polimerasa se retire del congelador solo al momento de usarla y sea devuelta al sitio de almacenamiento inmediatamente.
3. Llenar adecuadamente la ficha de registro de PCR con la fecha, los participantes y con la cantidad, la marca y la concentración inicial de cada uno de los reactivos (Anexo 6).



4. Ubicar con cuidado la placa que contiene los pozos, de manera que el lateral que tiene las letras quede localizado en el lado izquierdo (Fig. 3).
5. Encender el termociclador y programar o asignar el perfil térmico con las temperaturas y cantidad de ciclos adecuados para una correcta amplificación. Se recomienda que cada proyecto tenga su respectiva clave en la memoria del termociclador.
6. Preparar en un vial de 1,5 ml una mezcla de reactivos que incluyen: cebadores, buffer de la polimerasa, magnesio, dNTP, polimerasa en la cantidad necesaria, de acuerdo con el número de muestras que se van a procesar y el protocolo estandarizado (Tabla 1). Es de suma importancia llevar un orden para agregar los reactivos. La polimerasa debe dispensarse antes de completar el volumen final de la reacción con agua destilada estéril.
7. Agregar en cada pozo la cantidad de mezcla de reactivos de acuerdo con el volumen de trabajo para la reacción.
8. Dispensar en cada pozo el volumen de ADN de acuerdo con el protocolo estandarizado. Como el volumen para dispensar es muy pequeño, es importante revisar que sí haya sido depositado, para evitar falsos negativos.
9. Las muestras se deben depositar en orden consecutivo de acuerdo con el código asignado. La persona encargada de realizar la reacción debe emplear un método de chequeo para garantizar que las muestras se sirvan en orden correcto. El método de siembra más adecuado en la placa es llenar los 6 pozos de cada primera columna, antes de comenzar con la siguiente columna. (ejemplo: A1, A2, A3, A4, A5, A6; B1, B2... O6) (Fig. 3). Se debe evitar la contaminación cruzada y utilizar una punta por muestra.



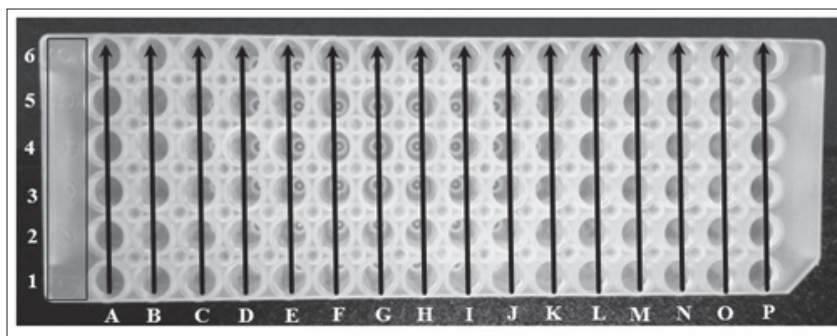


Figura 3. Posición correcta del plato en el Termociclador Piko 96. Las flechas indican el orden recomendado de sembrado de las muestras en el plato.

10. Al final del proceso de siembra de las muestras se debe sellar cuidadosamente la placa con la película plástica adhesiva. Luego, proceder a realizar una centrifugación rápida del plato para garantizar que las muestras queden en el fondo.
11. Al concluir este procedimiento, se ponen las muestras en el termociclador, que debe estar previamente encendido y con el perfil térmico asignado. Cerrarlo y dar inicio. (Para conocer detalles del manejo del termociclador ver protocolo de manejo del equipo.)
12. Finalizado el proceso de amplificación, hay que centrifugar nuevamente el plato para garantizar que las microgotas que quedan en la lámina se vayan al fondo de cada tubo.
13. En caso de que se realice la verificación de la amplificación de los productos de PCR, se debe proceder cuidadosamente a despegar la lámina del plato y disponerla evitando contaminación cruzada.
14. Verificar los productos de PCR por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, 1,5 % o 2 % de acuerdo con el tamaño del producto esperado.



15. Transferir las muestras con resultados positivos a tubos de 0,2 ml o placas, para almacenarlos a -20°C y enviarlos a secuenciar. En caso de almacenamiento prolongado, se sugiere almacenar a -80°C .
16. En caso de que queden pozos disponibles, se debe sellar nuevamente la porción de la placa que se usó y guardarla en un lugar donde no se contamine, dentro de una bolsa sellada a temperatura ambiente, para ser usada en otra ocasión.

Algunos reactivos usados en esta reacción, como los dNTP y cebadores, se deben usar a unas concentraciones específicas según la estandarización de la técnica, por lo tanto antes de ser usados se deben preparar bajo las siguientes indicaciones:

Preparación de los dNTP: Algunas casas comerciales los proveen individualmente para ser mezclados, o venden la mezcla lista para diluir a la concentración que se requiera.

Nucleótidos individuales

Cada dNTP se reconstituye a una concentración de 100 mM con agua ultrapura estéril. Para preparar una mezcla de dNTP a una concentración y volumen requeridos como solución de trabajo para la PCR, se puede seguir como modelo la Tabla 1.



Tabla 1. Preparación de diferentes concentraciones de una mezcla de dNTP.

Concentración de la mezcla que se va a preparar	Volúmenes de dNTP, μL				Agua libre de nucleasas, μL	Volumen total, μL
	100 mM dATP	100 mM dGTP	100 mM dCTP	100 mM dTTP		
2 mM de cada dNTP	10	10	10	10	460	500
	100	100	100	100	4600	5000
	250	250	250	250	11500	12500
10 mM de cada dNTP	10	10	10	10	60	100
	100	100	100	100	600	1000
	250	250	250	250	1500	2500
25 mM de cada dNTP	10	10	10	10	-	40
	100	100	100	100	-	400
	250	250	250	250	-	1000

En un vial de 1,5 ml se deposita el volumen requerido de cada dNTP y se mezcla con un vórtex para obtener una solución *stock* homogénea que debe ser guardada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se usará para preparar el *Master Mix*³ de la PCR.

Para preparar esta solución se deben realizar los siguientes cálculos aplicando la ecuación $V_1 C_1 = V_2 C_2$:

Ejemplo: Para obtener una concentración final de 0,2 mM (200 μM) de la mezcla de dNTP en un volumen final de reacción de PCR de 20 μL , partiendo de una mezcla de dNTP a 2 mM, se realiza el siguiente cálculo:

$$V_1 = (20\text{ }\mu\text{L} * 0,2\text{ mM}) / 2\text{ mM}$$

$$V_1 = 2\text{ }\mu\text{L}$$

Por lo anterior, se deben agregar 2 μL de la solución de trabajo de los dNTP a 2 mM por reacción al *Master Mix* para realizar la reacción de PCR en un volumen final de 20 μL , donde la concentración final de la mezcla de dNTP requerida sea de 200 μM .

³ Se denomina *Master Mix* de PCR a la solución que contiene todos los reactivos requeridos para la ejecución de una PCR.



Preparación de cebadores

Estos reactivos son sintetizados por empresas como IDT⁴, purificados generalmente mediante HPLC⁵ y enviados a los clientes de forma liofilizada⁶. Para preparar una solución de un cebador se llevan a cabo los siguientes pasos:

1. Se realiza una centrifugación rápida (quick spin) para garantizar que todo el liofilizado quede en el fondo del vial.
2. Se verifica la concentración en nanogramos del cebador descrita en el inserto y la cantidad de agua ultrapura requerida para preparar una solución a 100 µM. Se agrega el agua ultrapura y se homogeniza la mezcla mediante vórtex.
3. Para preservar la integridad de los cebadores, una vez preparada la solución stock es necesario realizar alícuotas de 50 µl en tubos de 1,5 ml que deben estar correctamente marcadas con la concentración, el nombre del cebador, la fecha y el responsable de la preparación. El marcaje se debe realizar tanto en la tapa como en el lateral del vial.
4. Los investigadores deben descongelar y usar solo una de las alícuotas para preparar la solución de trabajo. Recuerde: congelar y descongelar repetidamente disminuye la calidad de los reactivos y por lo tanto, afecta los resultados finales.

Preparación de un stock del cebador a 100 µM

Si el tubo original enviado por la empresa que sintetizó el cebador indica que su concentración es de 24 nmol:

$$\begin{aligned}
 24 \text{ nmol} \times 1 \mu\text{mol}/1000 \text{ nmole} &= 0,024 \mu\text{mol} \\
 0,024 \mu\text{mol}/100 \mu\text{mol}/\text{liter} &= 0,00024 \text{ L} \\
 0,00024 \text{ L} \times 1000 \text{ ml}/\text{L} &= 0,24 \text{ ml o } 240 \mu\text{l}
 \end{aligned}$$

Explicación: Se convirtieron los nmol a µmole y entonces se dividió por la concentración deseada en µmole/L. Los µmoles se cancelan dada la necesidad del volumen en litros. Entonces, se convierten los litros a mililitros. Por lo tanto, para obtener una concentración final de 100 µM se requiere que el liofilizado se resuspenda en 0,24 ml, que es igual a 240 µl de agua ultrapura.

⁴ Integrated DNA Technologies. <https://www.idtdna.com/pages/products/dna-rna/custom-dna-oligos>

⁵ Una purificación por HPLC (del inglés High-performance liquid chromatography), o cromatografía líquida de alta eficacia, ayuda a remover subproductos de la síntesis y origina cebadores con mayor especificidad.

⁶ La liofilización es un proceso en el que se congela una sustancia y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua y obtener un polvo. Este proceso permite la mejor conservación de productos a nivel industrial.



E. Referencias bibliográficas

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A, Struhl, K., Wiley, C.J., Allison, R.D., Bittner, M., Blackshaw, S. (2003). Current Protocols in Molecular Biology. Molecular Biology (Vol. 1). New York. doi: <https://doi.org/10.1002/mrd.1080010210>



Uso del termociclador piko 96 Thermo Scientific

Isabel Cristina Cadavid Sánchez

A. Fundamento teórico

Un termociclador es un equipo que se usa en biología molecular para realizar los ciclos de temperaturas necesarios para una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de amplificación de ADN.

El modelo más común consiste en un bloque de resistencia eléctrica que distribuye a través de una placa una temperatura homogénea durante tiempos que pueden ser programables, normalmente con rangos de temperatura de 4 °C a 96 °C. El termociclador piko 96 Thermo Scientific, por su nueva tecnología, reduce los tiempos de corrido y el tamaño del instrumento. Está disponible en bloques de 24 pozos y de 96 pozos, este último acepta solamente microplatos de 96 pozos con un volumen máximo de 20 µl (Fig. 1), y es el equipo con el que se cuenta en la actualidad en el laboratorio.



B. Objetivo

Conocer el manejo adecuado del termociclador piko g6 Thermo Scientific.

C. Requerimientos

Materiales

- Placa de PCR
- Película plástica

Reactivos

- Mix de PCR

Equipos

- Termociclador piko g6 Thermo Scientific (Fig. 1).



Figura 1. A) Termociclador piko g6 Thermo Scientific, Inc. B) Placa del termociclador g6 Thermo Scientific, Inc. para disponer el plato. C) Plato y lámina adhesiva.



D. Procedimiento

Asegurarse de que el equipo esté conectado a la UPS (del inglés, uninterruptible power supply, sistema de alimentación ininterrumpida). Si no está conectado, conéctelo y él se encenderá automáticamente y realizará un chequeo inicial. En caso de que ya esté conectado, presione el botón de encendido (Fig. 2).

Al lado izquierdo del botón de encendido hay dos LED (del inglés, light-emitting diode o diodo emisor de luz) dispuestos verticalmente, que se interpretan de la siguiente manera:

El LED ubicado en la parte superior puede mostrar dos indicaciones: si la luz es azul constante, indica que el sistema se encuentra encendido y no está en uso. Si es azul intermitente, indica que el sistema se encuentra encendido y en uso. Si la luz del LED ubicado en la parte inferior es constante y de color rojo, indica que el sistema ha experimentado un error recientemente.

En la pantalla podrá observar un menú principal, el cual tiene cuatro funciones clave:

RUN: Permite ejecutar los protocolos guardados.

NEW: Permite crear un nuevo protocolo.

STAT: Muestra el estado del PCR (cuando está corriendo).

TOOLS: Acceso a escenario global o rutinas de diagnóstico.



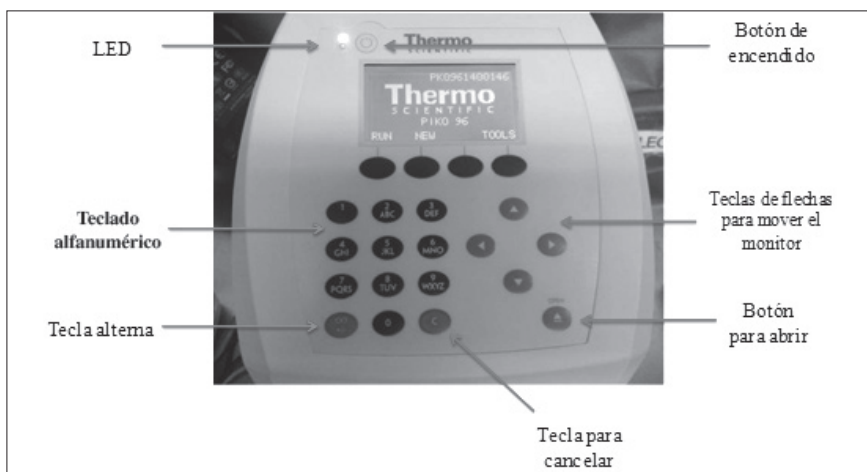


Figura 2. Teclado y monitor del Termociclador piko 96 Thermo Scientific.

Creación y almacenamiento de un perfil térmico

Una vez encendido el termociclador, en el menú principal presione el botón bajo la opción NEW (Fig. 2). Un protocolo predeterminado se muestra en el monitor. El programa puede ser editado en un modo gráfico o en modo de lista. El modo se puede cambiar presionando la tecla alterna ubicada en la esquina inferior izquierda del teclado (Figs. 3A y 3C).

Cada paso se representa por una línea, la cual tiene un número en la parte superior que indica la temperatura (la altura de la línea se relaciona con la temperatura configurada), mientras en la parte inferior se encuentra el tiempo que durará dicho paso en el formato horas: segundos. (Fig. 3A).

Para configurar el perfil térmico, ingrese los datos de temperatura y tiempo para cada paso mediante el teclado numérico. Para desplazarse entre paso y paso emplee las flechas (Fig. 3A). Para ingresar los ciclos, baje con la flecha hasta donde se indica el número de pasos que se van a repetir cíclicamente e indique el número de pasos que utilizará (Fig. 3B). El símbolo $\uparrow$ indica el primer paso del ciclo y el símbolo $\downarrow$, el último. Al finalizar, haga clic en SAVE para guardar el protocolo.



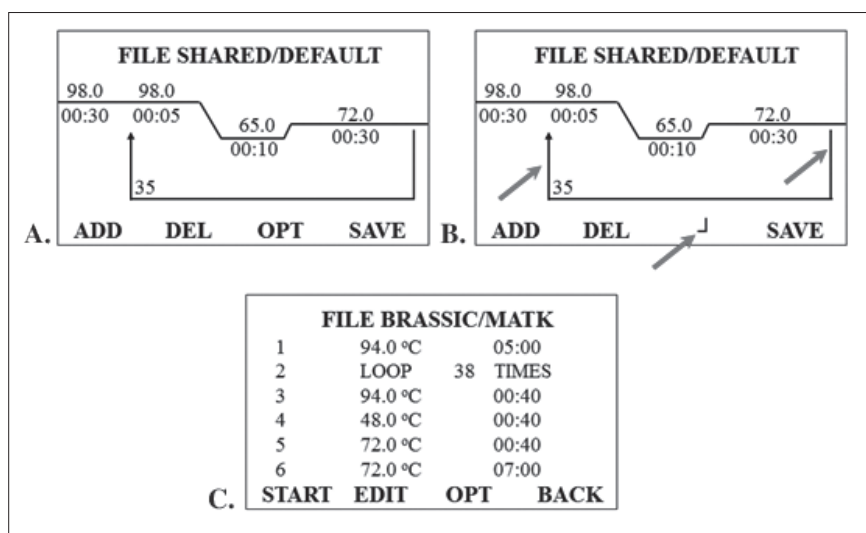


Figura 3. A) Modo gráfico en donde se ingresa temperatura, tiempo y número de ciclos de izquierda a derecha. B) La flecha indica los pasos que se repiten cíclicamente. Número 35 es la cantidad de ciclos. C) Modo de lista, los pasos están en un listado numérico.

Al seleccionar la opción **SAVE**, aparecerá un menú para elegir la carpeta de almacenamiento del protocolo creado. En caso de que sea el primer protocolo para un proyecto en específico, seleccione en el menú la tecla ubicada bajo la opción **NEW**, la cual permite crear una nueva carpeta de almacenamiento.

Para esta última se asigna un nombre relacionado con el proyecto (7 caracteres máximo) y la contraseña (4 caracteres máximo), ésta es opcional y protege de que usuarios no autorizados editen los protocolos dentro de la carpeta, o que se guarden nuevos protocolos. La contraseña no protege que otros usuarios revisen o ejecuten los protocolos de esta carpeta. Si este campo se deja vacío, la carpeta quedará sin protección. En caso de crear la contraseña repórtela al encargado del laboratorio. Una vez creada la carpeta, presiones **YES**.

Con las flechas del teclado seleccione la carpeta creada, y presione **OPEN** para abrirla, luego seleccione el botón sobre la opción **NEW** y escriba el nombre del protocolo, el cual generalmente corresponde



al nombre del gen que se está amplificando bajo este perfil térmico, y presione YES con el fin de que el protocolo quede almacenado.

NOTA: en caso de crear un nuevo perfil que corresponda a uno de los proyectos con carpeta ya asignada, el proceso se simplifica a seleccionar la carpeta, abrirla presionando la opción OPEN, nombrar y almacenar el perfil térmico.

Renombrar o borrar una carpeta existente: En el menú principal presione RUN, seleccione la carpeta y luego presione MOD. Si desea renombrar, seleccione RENAME y escriba el nuevo nombre. Si la carpeta tiene contraseña, la requiere para hacer este procedimiento. Si desea borrar la carpeta presione DEL, acepte los cambios y presione YES.

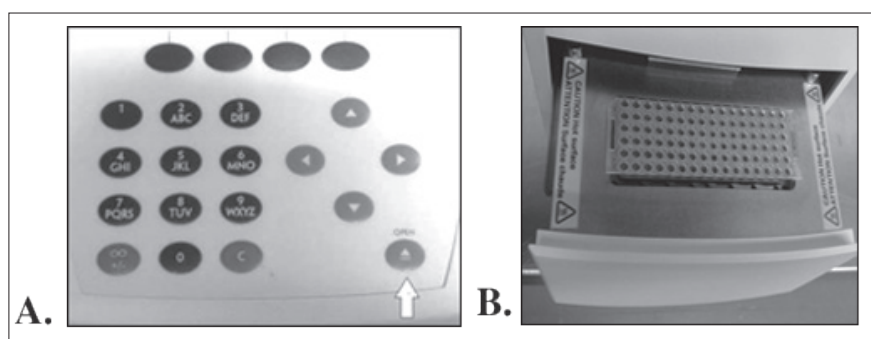


Figura 4. Teclado del termociclador, la flecha señala el botón “Open” para abrir el termociclador



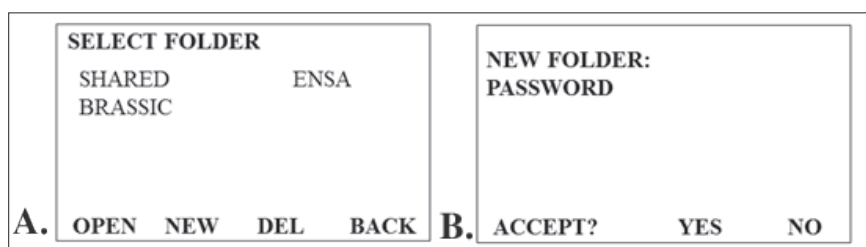


Figura 5. A. Pantalla del termociclador que indica las carpetas previamente guardadas en él. B. Pantalla del termociclador donde se agrega el nombre a una nueva carpeta.

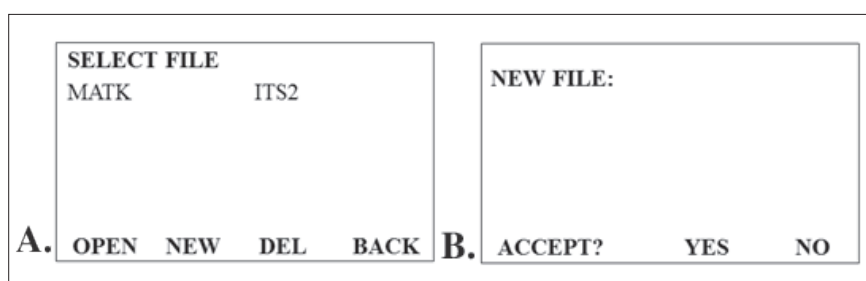


Figura 6. A) Pantalla del termociclador que indica los archivos dentro de una carpeta previamente guardados en el termociclador. B) Pantalla del termociclador donde se agrega el nombre a un nuevo archivo.

Ejecutar un perfil térmico

Encienda el equipo y abra el bloque para disponer la placa de PCR presionando el botón OPEN (Fig. 4A). Encontrará una placa de 96 pozos sin usar provista por el fabricante, que siempre se deberá mantener dentro del equipo mientras esté guardado (Fig. 4B). Esta placa se debe remover para poner la placa nueva que se va a usar para correr la reacción. Tome la placa de PCR debidamente sellada y dispóngala sobre el bloque. Proceda a cerrarlo con cuidado.

Presione el botón bajo la opción RUN del menú principal (Fig. 2). Luego seleccione con las flechas la carpeta de su proyecto que se encuentra en el listado. Para abrir la carpeta presione el botón debajo de la opción OPEN (Fig. 5A), luego escoja el perfil que desea ejecutar y para abrirlo presione



la opción OPEN (Fig. 6A). Esto mostrará el protocolo en el modo gráfico o listado. Finalmente, oprima la opción START para iniciar la reacción (Fig. 7A). Si usted quiere editar el protocolo puede presionar la opción EDIT, y si desea cambiar los ciclos debe ir al último paso del ciclo deseado y presionar ADD. Luego, presione LOOP y cambie el número de ciclos al valor deseado.

Después de seleccionar START, se le pedirá que indique el volumen de la reacción (Fig. 7B), la cual puede ser de un volumen máximo de 20 μ l. Para ver el tiempo de corrido puede oprimir la opción TIME (Figs. 7C y 7D). Deje correr la PCR el tiempo programado. Al finalizar, verifique que el proceso haya terminado normalmente y que no hay indicaciones de error en la pantalla.

Presione el botón que indica la opción STOP en la pantalla y luego el botón OPEN del teclado para extraer la placa del PCR.

Ingresa nuevamente la placa provista por el fabricante. Cierre el compartimento y apague el termociclador. Para ello, deje el botón de encendido (Fig. 2) presionado 2 segundos y aparecerá en la pantalla la opción de apagar (YES), o si no desea hacerlo presionar NO (Fig. 8).

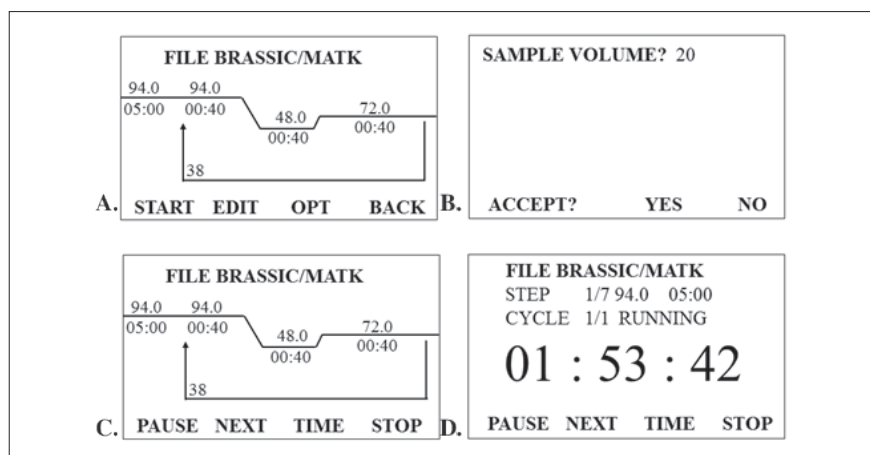


Figura 7. Monitor que indica el perfil del termociclador que será usado. A) Al dar clic a START, puede iniciar la reacción. B) El sistema le pide el volumen de la reacción. C) Al dar clic en TIME, puede ver el tiempo corrido. D) Monitor mostrando el tiempo corrido.



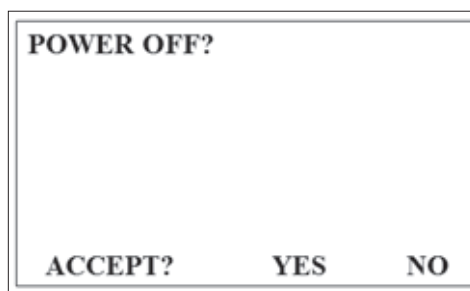


Figura 8. Pantalla después de presionar el botón de encendido más de un segundo.

E. Referencias bibliográficas

Piko Thermal Cycler User Manual. Disponible en: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/D01888~.pdf>



Protocolo de preparación de muestras para envío a secuenciación (Caso Macrogen)

Isabel Cristina Cadavid
Giovan F. Gómez

A. Fundamento teórico

Los métodos de secuenciación han avanzado progresivamente desde 1975, año en el cual surgió el primero de ellos, el método de Sanger (Sanger, Nicklen & Coulson, 1977). Paralelamente, Maxam y Gilbert desarrollaron otro método que lleva su nombre, el método de Maxam-Gilbert. Desde entonces y hasta la actualidad, se han desarrollado otros tipos de métodos que permiten secuenciar a gran velocidad, lo cual ha sido de gran importancia para lograr la secuenciación completa de ADN de muchos genomas de animales, plantas y microorganismos. Estos métodos se conocen como técnicas de secuenciación masiva, más conocidas en inglés como next-generation sequencing (NGS).

La tecnología de secuenciación utilizada en la actualidad en el Laboratorio del GICFS se basa en la electroforesis capilar ejecutada con el kit de secuenciación BigDye Ready Sequencing v3.1® en el equipo ABI3730XL (<http://www.macrogen.com/>).



Otras empresas: Además de Macrogen Inc., otras empresas que prestan el servicio de secuenciación a nivel internacional en países como Estados Unidos, España, son Illumina, Knome, Sequenom, 454 Life Sciences, Pacific Biosciences, Complete Genomics, Helicos Biosciences, GE Global Research (General Electric), Affymetrix, IBM, Intelligent Bio-Systems, Life Technologies y Oxford Nanopore Technologies, cuyos requisitos para el envío de las muestras pueden variar un poco y se deben verificar en su respectiva página web. En Colombia, la Universidad de los Andes, la Universidad de Antioquia y la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, prestan servicios de secuenciación a nivel nacional.

B. Objetivos

Dar a conocer el procedimiento para envío de muestras a secuenciación.

C. Requerimientos

Materiales

- Micropipetas de 20 µl, 100 µl
- Puntas de 20 µl, 100 µl
- Tubos de 1,5 ml o Platos de 96 pozos con tiras de tapas
- Marcador indeleble punta fina
- Formatos de envío de muestras (Anexos 7-9)

Reactivos

- Productos de PCR
- Cebadores

Equipo

- Concentrador de ADN

D. Procedimiento

Para enviar productos de PCR a secuenciar se debe tener en cuenta que exista una banda de fácil visualización, así como ausencia de productos inespecíficos (otras bandas) y de dímeros de cebadores.

En caso tal que en la estandarización de la técnica de PCR no se logren eliminar productos inespecíficos, se recomienda realizar



una purificación. Este paso se hace con la finalidad de que el ADN (ácido desoxirribonucleico) quede libre de contaminantes como oligonucleótidos, dNTP (deoxinucleótidos), enzimas y demás reactivos usados en la reacción de PCR, los cuales podrían interferir en el proceso de secuenciación.

Otro proceso para evaluar la pertinencia de llevar a cabo la purificación puede hacerse mediante el envío a secuenciar de unas pocas muestras que incluyan productos de PCR, y analizar el rendimiento en la secuenciación.

Los criterios para elegir realizar este proceso dependen del recurso financiero que tenga el laboratorio y de las características del marcador molecular. Existen fragmentos de ADN que aunque muestran un producto de buena calidad en el gel, al secuenciarse no rinden un buen resultado, entre otras razones, por la presencia de contaminantes, regiones ricas en microsatélites o GAs y GCs.

La purificación se puede hacer antes de enviar los productos de PCR a secuenciar, mediante kits comerciales, o por medio del servicio de purificación que ofrece la empresa de secuenciación.

En caso de que se realice la purificación utilizando el kit comercial, se debe verificar en un gel de agarosa la cantidad final del producto de PCR. Este paso es necesario, porque generalmente durante el proceso de purificación se pierde ADN.

Embalaje de muestras: Se debe enviar mínimo 20 µl por muestra a una concentración de 50 ng/µl de producto purificado y 100 µl no purificado. Si no se cuenta con un cuantificador de ADN, MacroGen establece que la visualización del producto de PCR en un gel de electroforesis es indicativo indirecto de que existe una concentración adecuada para proceder a secuenciar. Las muestras se pueden enviar en tubo o en plato, sin embargo, es preferible enviarlas en plato dado que disminuye los costos.

En tubo individual: Se depositan los 20 µl de la muestra de ADN en tubos de 1,5 ml. La muestra puede enviarse en forma seca, en solución TE (Tris-EDTAa) libre de nucleasa o agua destilada a temperatura ambiente. Para enviarlo en seco, el proceso de secado se puede hacer en un equipo concentrador de ADN, donde se somete la muestra a una temperatura de 45 °C por 30 minutos, a 1.400 rpm.



Para saber los costos de secuenciación de muestras en tubo, se debe consultar en la página de la empresa: <http://www.macrogen.com>

En platos de 96 pozos: Se depositan 20 μ l de la muestra en cada pozo. Para esto se debe tener en cuenta llenar por columnas, es decir, una vez se complete la columna 1, se continúa con la 2 y así hasta completar el plato. Tener en cuenta que las columnas van marcadas en orden numérico de 1 a 12 y las filas, en orden alfabético de la A a la H (Fig. 4a).

Una vez los pozos de una columna estén llenos, estos se deben sellar con tiras de tapas (Fig. 4b), asegurarse de que queden bien sellados y, finalmente, rotular en los laterales del plato (Fig. 4c).

Tener precaución de dejar alícuotas de los productos de PCR como respaldo, con el fin de que si ocurre alguna eventualidad y se haga necesario re-secuenciar, se pueda hacer de nuevo el envío.

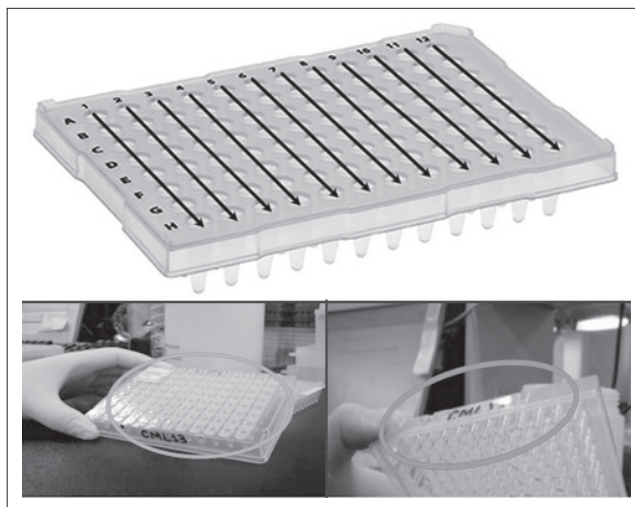


Figura 1. Plato de secuenciación de 96 pozos. A) Filas: A-H. Columnas: 1-12. B) Sellado de las muestras con cintas de 8 tapas. C) Rótulo en el lateral del plato.



Preparación de cebadores

Para algunos cebadores universales, Macrogen no requiere su envío, sin embargo, para los demás es necesario prepararlos y enviarlos con los tubos/platos que contienen los productos de PCR. La lista de los cebadores universales y gratuitos se encuentra en el siguiente enlace: <https://www.macrogenusa.com/support/seq/primer.jsp>

Los cebadores deben enviarse a una concentración de $10 \text{ pmole}/\mu\text{l} = 60 \text{ ng}/\mu\text{l}$, $1 \mu\text{l}$ por muestra. Es importante adicionar aproximadamente un 30 % más de volumen, por si es necesario re-secuenciar o para garantizar un volumen adecuado en caso de evaporación de la muestra durante el transporte. Hay que garantizar que el volumen mínimo de cada cebador sea de $20 \mu\text{l}$. Empacar la cantidad necesaria en tubos de $1,5 \text{ ml}$.

1. Orden de secuenciación

La empresa Macrogen posee una plataforma para realizar la orden de secuenciamiento. Tenga en cuenta que típicamente los laboratorios de biología molecular ya están registrados en esta plataforma, por lo que deberá preguntar a su jefe inmediato cómo debe realizar el proceso.

En este caso se ha establecido que la persona (investigador/ estudiante) que esté involucrada en un proyecto donde se requiera este servicio, diligencie un archivo en Excel que provee Macrogen, el cual puede importarse a la plataforma para que la orden de secuenciación quede registrada en el sistema, bajo la cuenta del laboratorio.

En la plantilla se debe indicar:

- Nombre de cada muestra
- Nombre del cebador que se usará para cada muestra
- Concentración de la muestra
- Tamaño aproximado del producto de PCR
- Secuencia del cebador ($5'$ a $3'$)
- Concentración del cebador (debe ser $10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ en las muestras estándar)



Para el correcto procesamiento automático de esta plantilla de Excel, es necesario que en las celdas correspondientes a concentraciones y tamaños sólo se escriban números. En la celda “secuencia de Oligonucleótido” sólo la secuencia en letras, sin añadir 5’-3’.

Tenga en cuenta que Macrogen puede modificar la plantilla, por tanto es importante consultar si existe una nueva versión antes de diligenciarla. Una vez diligenciado el formato en Excel, envíelo por correo electrónico al responsable de realizar las órdenes en la plataforma, quien se encargará de realizar la orden.

2. Envío por FedEx®

Macrogen tiene un convenio para el envío de muestras con la empresa FedEx®, por tanto, todos los envíos se deben realizar por medio de esta empresa. Tener en cuenta que si se realiza un envío superior a 20 muestras, éste es gratuito, de lo contrario, el costo del envío se le carga al remitente.

Antes de realizar el envío comuníquese con FedEx® con el fin de que le suministren los elementos para el embalaje y los formularios para el envío.

- **Llenar la guía internacional aérea de Fedex (Anexo 7)**

Macrogen ofrece el servicio de secuenciación en Corea, Europa, Estados Unidos y Japón (verifique la dirección para cada uno de estos lugares en la página web <http://www.macrogen.com>, antes de completar el formulario). Una vez elija el lugar de destinación, diligencie la guía con la dirección, el teléfono y el código postal del destinatario.

Verificar e indicar el número de la cuenta que Macrogen tiene inscrita en FedEx® (352 6870-1) para que ellos asuman el costo del envío (Anexo 7). Como las muestras carecen de valor comercial, el campo “Valor total para la aduana” se debe completar con uno, USD 1.

- **Llenar e imprimir la factura de Fedex (Anexo 8)**

Poner el número de la guía internacional aérea en el respectivo espacio. Indicar la fecha del envío. En exportador, poner los datos de la persona que envía y la dirección del Tecnológico de Antioquia. En país de exportación y manufactura, poner Colombia.



En país de último destino, el lugar de destino que haya elegido. En consignatario, poner la dirección de Macrogen, Finalmente, llenar los datos (peso, cantidad, valor) del paquete que se envía.

- **Escribir e imprimir una carta a Fedex** (Anexo 9)

Se indica que la muestra no implica ningún riesgo para el ser humano. Que no tiene ningún valor comercial y que solo es para fines científicos. Usar una carta modelo para ajustarla a la orden actual.

- **Imprimir copia de los detalles de la orden** (Formulario diligenciado en la plataforma de Macrogen). Imprimir copia de la orden llenada en la plataforma de Macrogen y luego ponerla dentro del sobre de FedEx.

3. Empacar muestras

Los tubos o platos se deben cubrir con parafilm para asegurar que no se destapen en el viaje. Además, en el paquete se deben incluir los cebadores, que también deben estar sellados con parafilm. Usar sobre de FedEx para empacar (Fig. 10). En caso de enviar platos, es opcional introducir el plato dentro de una caja de puntas vacía; lo anterior le brindará protección adicional durante el transporte.



Figura 2. Sobre proporcionado por FedEx para embalar las muestras.



NOTA IMPORTANTE:

Al envío debe adjuntarse copia de los permisos de colecta, acceso a recurso genético y permiso de exportación proporcionado por entidades como la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA) de acuerdo con la normatividad vigente.

4. Llamar a Fedex: Marcar al teléfono 018000110339 opción 1 (Español), opción 3 (Otros servicios), opción 1 (Servicio internacional), opción 1 (Programar una recolección) y finalmente 0 (Comunicarse con un representante Fedex). Cuando se haya comunicado, solicitarle al representante de Fedex el servicio de recolección, para esto debe tener a la mano la guía internacional aérea, en donde se encuentran datos importantes para la recolección (dirección, datos del paquete, código postal, número de la cuenta de Macrogen, etc.).

La persona encargada de recibir al agente FedEx debe asegurar la entrega de:

- 1.1. Plato(s) o tubo(s) con muestras y cebadores.
- 1.2. Orden de FedEx completa y firmada.
- 1.3. Carta a FedEx firmada manifestando ausencia de riesgo biológico de las muestras para enviar.
- 1.4. Orden impresa de Macrogen.
- 1.5. Permisos de colecta, acceso a recurso genético y exportación.

E. Referencias bibliográficas

- Fedex. <http://www.fedex.com/co/?cmp=KNC-1001200-4-2-950-1000000-LAC-CO-ES-CORGFEDEX000000>. [Consultado el 18 de noviembre de 2014].
- Macrogen. <http://www.macrogen.com/eng/>. [Consultado el 18 de noviembre de 2014].
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467.



Protocolo para el préstamo de material de la Colección Entomológica, Tecnológico de Antioquia (CETdeA)

Manuel A. Ramírez-M.

A. Fundamento teórico

Las colecciones o museos entomológicos tienen entre sus objetivos principales el obtener, preservar y mantener la información representada en la historia entomológica del planeta (Colvin, 2014). Además de estudiar e interpretar esta historia, compartirla por medio de publicaciones, actividades educativas y de investigación para público general o científico.

Debido a la importancia de socializar este conocimiento depositado en una colección, la Colección Entomológica del Tecnológico de Antioquia (CETdeA) desarrolla este protocolo (de uso interno) para el préstamo de material entomológico. La CETdeA reconoce la importancia de hacer accesible y visible el material depositado en ella, no solo a través de la publicación de resultados de investigaciones realizadas por el personal vinculado a la colección, sino también a través del préstamo de sus especímenes a científicos calificados a nivel mundial.



Estos préstamos permitirán a los investigadores conocer nuestra fauna local; identificar el material por parte de especialistas de los diferentes grupos de insectos, y fortalecer el desarrollo de investigaciones interinstitucionales por medio del intercambio de material.

B. Objetivo

Presentar secuencialmente los procedimientos necesarios para el préstamo del material entomológico de la Colección Entomológica, Tecnológico de Antioquia (CETdeA).

C. Requerimientos

Materiales

- Dos cajas para embalaje: una caja interna (en la que se organizan los insectos) la cual debe ser más alta que la altura del alfiler donde están montados los especímenes, y otra caja externa para depositar la caja interna. La caja externa debe ser del doble de las dimensiones de la caja interna, asegurando que esta quede completamente inmersa, con un mínimo de 5 cm a cada lado de la caja (Fig. 1).
- Entretapa de cartón para sostener los alfileres, preferiblemente en la parte superior debe llevar una manija (puede elaborarse con cinta adhesiva) con el fin de facilitar la manipulación. (Fig.1).
- Relleno de embalaje (poliestireno expandido, espuma, plástico con burbujas) (Fig. 2), para disminuir el movimiento y vibración de la caja interna durante el envío.
- Rótulo. con los datos del remitente y de la persona o institución a la que se hace el préstamo. Los rótulos deben ubicarse en al menos dos laterales de la caja y en la cara superior, marcado con "Este lado arriba". El exterior de la caja debe estar claramente marcado: "Fragil – Insectos muertos de Investigación Científica – sin valor comercial".
- Formato de movimiento de colecciones: se anexarán dos copias firmadas del FORMATO DE PRÉSTAMO DE MATERIAL (Anexo 2) en el paquete, una de las cuales debe ser firmada por el investigador o responsable de recibir el material en préstamo, una vez verifique el contenido del envío. Esta carta debe ser devuelta a la CETdeA
- Alfileres



Recomendaciones

- Si el envío es de especímenes en seco (montados en alfileres entomológicos), para el embalaje guiarse por medio de la Fig. 1.
- Si el envío es de material en líquido (alcohol u otro medio) asegurar cada frasco con alfileres para evitar que se muevan dentro de la caja.
- Si el envío incluye tanto especímenes en seco como en líquido, deben ir organizados apropiadamente en cajas de envío independientes.

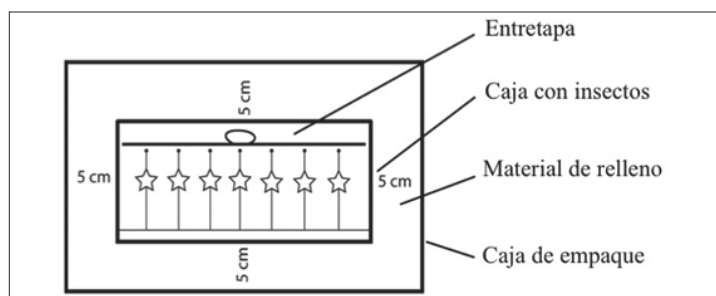


Figura 1. Vista frontal del embalaje de especímenes.

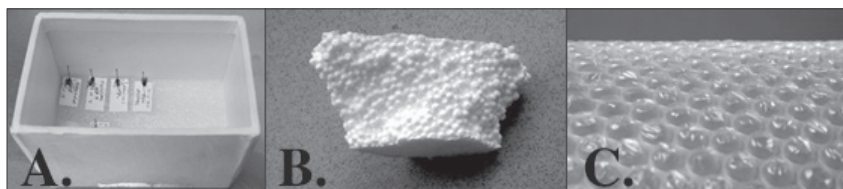


Figura 2. Materiales utilizados para el embalaje de las muestras.
A) Caja para guardar especímenes. B) Poliestireno expandido.
C) Plástico con burbujas.

D. Procedimiento

1. Recepción de solicitudes

- 1.1.** Toda solicitud de préstamo de material, a un miembro del grupo de investigación vinculado con la colección entomológica, debe ser reenviada a la persona encargada de la Colección Entomológica.



- 1.2. El encargado de la CETdeA enviará vía e-mail a la persona o institución solicitante el "Formulario de solicitud de material" (Anexo 3) junto con el "Reglamento de préstamo" (Anexo 4) de la colección. El formato de solicitud debe ser diligenciado en su totalidad y ser reenviado en medio físico (papel) o por correo electrónico.
- 1.3. La solicitud será considerada por el encargado de la CETdeA y el director/a del grupo de investigación a la cual está adscrita la colección, siguiendo los lineamientos expuestos en el "Reglamento de préstamo" (Anexo 4).
- 1.4. Una vez aprobada la solicitud o rechazada por algún motivo (p. ej., no se cuenta con el material solicitado en préstamo o cualquier otro causal), el encargado de la CETdeA, dará comunicación escrita vía e-mail al solicitante informando acerca de la aprobación o negación de la solicitud de préstamo y dará una fecha tentativa para el envío del mismo en caso de ser aprobado.

2. Envío del material

- 2.1. El material solicitado será separado apropiadamente del resto del material de la colección entomológica por parte del encargado de la colección.
- 2.2. El encargado verificará que el material esté debidamente rotulado (etiqueta de localidad, número de catálogo, etiqueta de identificación).
- 2.3. Se señalará en la base de datos de la CETdeA el material que se enviará en calidad de préstamo.
- 2.4. El encargado de la colección realizará el registro de datos respectivos del "Formato de préstamo de material" (Anexo 2) de la CETdeA.
- 2.5. Se hará el envío o entrega del material al solicitante a la dirección institucional suministrada por este.



- 2.6. Para la realización del envío es necesario escribir la carta (con copia) de envío de las muestras, en hojas con membrete, en el cual se incluyen los datos completos del destinatario del préstamo (exactamente los mismos datos con que se rotula la caja). Tanto la caja con los especímenes como la carta anteriormente nombrada se llevan a la oficina de ARCHIVO institucional.
- 2.7. El costo del envío de retorno del material corre por cuenta de la institución del destinatario.
- 2.8. El encargado de la colección entomológica se comunicará vía e-mail con el especialista para informarle que el material solicitado está en proceso de envío.

3. Retorno del material

- 3.1. Emplear exclusivamente el correo oficial para la devolución del material (No usar correos privados).
- 3.2. El material solicitado en calidad de préstamo debe ser devuelto en un plazo de 6 meses, contados después de la fecha en que el material haya sido recibido por la institución solicitante.
- 3.3. El material prestado debe retornar en las fechas especificadas, con carta que informe la devolución del material además en la caja de envío debe incluirse copia del "Formato de préstamo de material" (Anexo 2).
- 3.4. En caso tal que el lapso de los 6 meses de préstamo no sea suficiente, el solicitante deberá hacer expresa su necesidad de extensión o prórroga de la fecha de retorno del material con un mes de anticipación, en forma escrita en papel o vía e-mail a la persona encargada de la Colección Entomológica. El plazo máximo de la prórroga será de 6 meses más.
- 3.5. El material debe regresar en el mismo estado en el que se envió, cualquier modificación debe registrarse según lo expresado en el "Formato de préstamo de material" (Anexo 2).
- 3.6. Una vez recibido el material, el encargado de la Colección Entomológica lo revisará y será reincorporado a la colección. Se señalará en la base de datos que el material ha sido devuelto.



- 3.7. En caso que se incumpla por parte del solicitante alguno de los apartados "Cambios de dirección, Transferencia de préstamos, o Disecciones y extracciones de ADN (sin previo consentimiento)" del "Reglamento de préstamo" (Anexo 3) se realizará una reunión entre el encargado de la Colección Entomológica y el director/a del grupo de investigación al cual está adscrita la colección, en la cual se discutirán las acciones a seguir para recuperar el material.

E. Referencias bibliográficas

Colvin, M. (2014). Entomological Collections - Their historic importance and relevance in the 21st century [Online]. Retrieved from <http://www.dispar.org/reference.php?id=g2>



Gestión de información de colecciones de investigación biológica mediante el programa Specify 6

Manuel A. Ramírez M.
Andrés López Rubio

A. Fundamento teórico

El manejo de bases de datos biológicas permite gestionar la información de los especímenes de una forma rápida y clara para los investigadores. Uno de los proyectos diseñados para gestionar material de colecciones biológicas y que tiene soporte a nivel mundial es Specify - Software Project, desarrollado por la Universidad de Kansas, el cual es una plataforma (Specify Collections Consortium, 2018) que hace un seguimiento de las transacciones de especímenes, enlaza imágenes para registros y permite publicar datos en internet. Este proyecto contiene un paquete de programas gratuitos que incluye Specify 7, Specify 6 web, Specify Cloud y Specify Insight. Para mayor información de las funcionalidades de estos programas visite la página web: <http://www.sustain.specifysoftware.org/>



En la aplicación de escritorio Specify 6, se pueden almacenar datos de colecta, clasificaciones taxonómicas y estratigráficas, cuadernos de campo, secuencias de ADN, referencias bibliográficas, y enlazarlas a un espécimen. La utilización de este tipo de programas simplifica y facilita el correcto funcionamiento de una colección biológica o un museo. El proyecto Specify cuenta con soporte técnico a través del correo electrónico support@specifysoftware.org.

Esta guía se ha desarrollado a partir de la versión Specify 6.6.01; si usted usa una versión más actualizada, puede revisar el manual del programa en la página web del programa en caso de que sea necesario.

Es de gran relevancia que la(s) persona(s) que estén a cargo del ingreso de esta información en la base de datos conozcan la importancia y rigurosidad con la que este proceso debe hacerse para garantizar el ingreso óptimo de los datos.

B. Objetivo

Describir paso a paso el manejo y acceso de la información en la base de datos Specify 6.6.01

C. Requerimientos

Equipo

Computador con la aplicación Specify 6.6.01 instalada. En caso de que los datos se almacenen en un servidor, el equipo idem debe contar con acceso a internet.

D. Procedimiento

* Si usted cuenta con una base de datos previa de los especímenes de su colección en el formato de salida de Microsoft Excel®, ésta se puede exportar al programa Specify (ver "Gestión de información de colecciones de investigación biológica mediante el programa Specify 6: Importación de datos desde Excel" en este mismo manual).

"Los requerimientos mínimos para la instalación de Specify son:

- CPU reciente (intel I5, i7)
- 2Gb de memoria RAM
- Java Runtime Environment(JRE) 8
- Servidor MySQL 5.1 o posterior
- Mínimo 175 MB libres de espacio en disco para instalación de Specify
- Mínimo 150 MB libres de espacio en disco para instalación de MySQL
- Monitor con resolución de 1280 X 1027"



1. En el escritorio o en las aplicaciones buscar el icono de Specify, dar doble clic para abrir (Fig. 1).

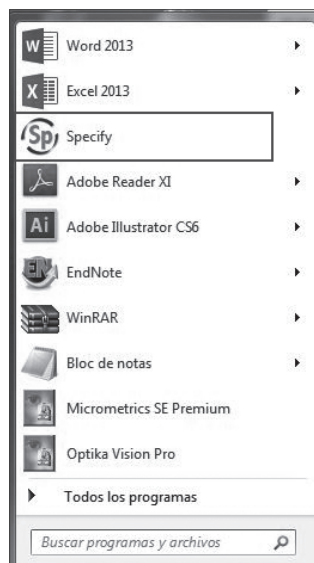


Figura 1. Menú de inicio e icono de la aplicación Specify.

- 1.1. Una vez abierto el programa se despliega una pantalla en donde se le pedirá el registro "LOGIN" (Fig. 2). Utilice la información provista por el encargado de la colección para acceder al programa.

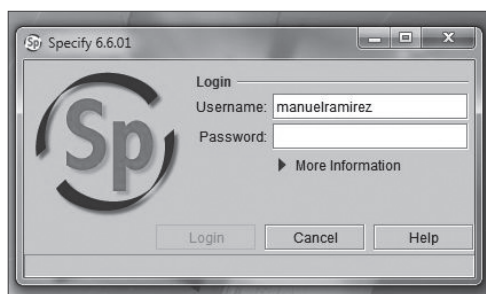


Figura 2. Pantalla de registro para el ingreso al programa Specify.



- 1.2. En el pantallazo inicial, después de iniciar sesión, se puede observar el número que aparece en "CATALOGED LAST YEAR", ese número indica cuál fue el último número de catálogo que se ingresó. Conocer este número ayudará al usuario saber con cuál número de catálogo se va a continuar el ingreso de nuevos registros (Fig. 3).

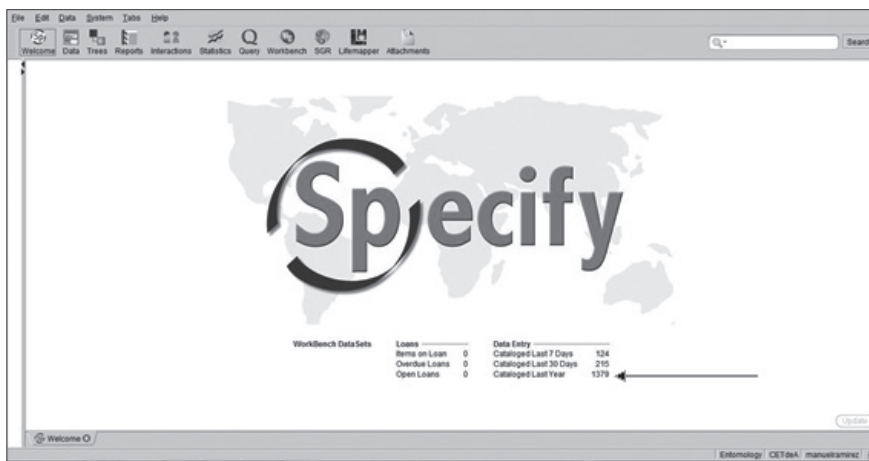


Figura 3. Pantalla inicial del programa Specify. La flecha indica el campo 'Cataloged Last Year'.

- 1.3. Para empezar a ingresar los datos ubique en la parte superior izquierda el ícono "Data" y selecciónelo (Fig. 4). Inmediatamente se desplegará en la columna izquierda el menú. Para comenzar a ingresar nuevos registros, seleccionar la opción "Collection Object" (Fig. 5).

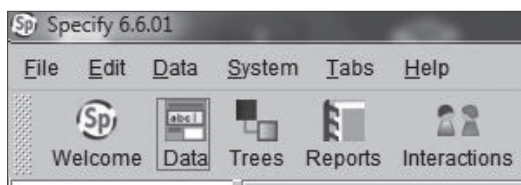


Figura 4. Ícono Data.



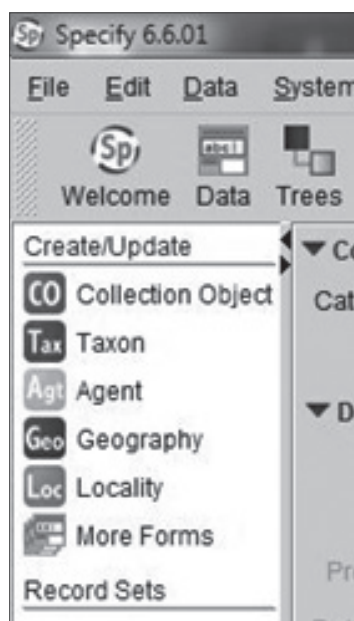


Figura 5. Menú Data.

1.4. Menú "Collection Object". Aquí encontrará los siguientes campos (Fig. 6):

- **Catalog number:** Número de catálogo. Se trata de un número que es único para cada espécimen de la colección y se asigna de forma incremental. El programa está configurado para hacer la asignación de forma automática y continua. Este número solo es visible hasta que usted selecciona la opción 'SAVE' al finalizar el ingreso de sus datos por cada número de catálogo.
- **Accession:** Es un código que puede ser alfa numérico que hace referencia a la tenencia legal de ese espécimen dentro de la colección. A la colección. Este campo se configura cuando se está instalando el programa.
- **Atl Cat Number:** Número de catálogo alternativo que puede darse de forma independiente para cada espécimen en los diferentes proyectos en el cual sus muestras son catalogadas en la base de datos.
- **Cataloger:** Nombre de la persona que ingresa los datos al programa. Este debe ser provisto por el encargado de la colección.



- **Cataloged Date "Full Date":** Fecha en la que se ingresan los datos al sistema siguiendo el formato dd/mm/aaaa.
- **Project Number:** Código del proyecto o de la muestra.

Figura 6. Campos del menú "Collection Object" (Objeto de colección).

- 1.5. Menú 'Determinations' para ingresar los datos en esta sección, seleccione el símbolo.

Figura 7. Menú 'Determinations'

- **Taxon:** Corresponde a la identificación del espécimen. Se debe escribir el nombre de la máxima categoría taxonómica posible (Familia, Género, Especie) y se desplegará un menú el cual usted debe seleccionar el correspondiente (Fig. 8). Las opciones son predeterminadas para cada colección.





Figura 8. Opciones desplegables del menú "Taxon".

Si el nombre no aparece en las opciones que se despliegan, por favor informe al encargado de la colección, para que este ingrese el nombre y esté disponible.

- **Determined date:** Fecha en la cual se identificó el espécimen, en caso de no conocerla, utilizar la misma fecha de colecta, siguiendo el formato dd/mm/aaaa (Fig. 7).
- **Determiner:** Apellido de la persona que identificó el material. Escribir el apellido y seleccionar del menú que despliega la opción correspondiente (Fig. 7). Si el nombre no aparece en las opciones que se despliegan, por favor informe al encargado de la colección, para que este ingrese el nombre y esté disponible. Las opciones son predeterminadas para cada colección.

1.6. Menú 'Collecting Information' (Fig. 9).

- **Collector Number:** en algunas instituciones a cada colector se le asigna un número específico.
- **Method:** Método de colecta, seleccione entre las opciones que se despliegan.
- **Start Date:** Fecha del día en que se monta la trampa, siguiendo el formato dd/mm/aaaa.
- **End Date:** Fecha en que se recolectan los especímenes, siguiendo el formato dd/mm/aaaa.
- **Verbatim Date:** es la fecha en la que se produjo el evento de colecta tal como está en las notas de campo del recolector.
- **Locality:** Localidad de donde proviene el espécimen. Escribir el nombre de la localidad y seleccionar del menú que se despliega.
- **Locality and Habitat Notes:** Información adicional concerniente al lugar de donde proviene la muestra.



Figura 9. Campos del menú "Collecting information" (Información de recolecta).

1.7. Menú 'Collectors'. Para ingresar los datos en esta sección, seleccione el símbolo "más" (+) luego se desplegará la siguiente ventana (Fig. 10):

Figura 10. Ventana del menú "Collectors" (colectores).

Agent: colectores. Nombre de la persona que realizó el muestreo. Escribir el primer apellido y seleccionar la opción del menú que se despliega. Seleccionar en botón "ACCEPT". La ventana se cerrará. Si necesita adicionar más nombres de colectores seleccione el símbolo "más" (+) y repita los dos pasos anteriores.

1.8. 'Preparations' para ingresar los datos en esta sección, seleccione el símbolo "más" (+), luego se desplegará la siguiente ventana (Fig. 11):



Figura 11. Campos del menú "Preparations" (preparaciones).

- **Prep Type:** Tipo de preparación. Seleccione del menú según sea el caso:
 - Pinned: Montado en alfiler.
 - Alcohol: Muestra en líquido.
 - ADN
 - Tejido criopreservado.
 - **Prepared Date:** Fecha de preparación del espécimen. Si no conoce esta fecha utilice la fecha que se realizó la colecta siguiendo el formato dd/mm/aaaa.
 - **Count:** Si el espécimen está montado en alfiler seleccione "PINNED". Si la muestra está almacenada en líquido y contiene más de un espécimen, escribir el número de especímenes contenidos en el frasco.
 - **Prepared By:** Nombre de la persona que realiza el montaje, casi siempre es la misma persona que identifica la muestra. Escriba el primer apellido y seleccione del menú que se despliega.
 - **Storage:** hace referencia al lugar físico en donde se almacenan las muestras, este menú despliega opciones como: caja, gabinete, vial, etc.
- 1.9. 'Col Obj Attribute' (Fig. 12), para ingresar los datos en esta sección, seleccione el símbolo "más" (+).



▼ Col Obj Attribute +

Sex: [dropdown] Weight: [text input] Length: [text input] Stage: [dropdown]

Remarks: [text area]

Figura 12. Campos del menú "Col Obj Attribute" (atributos del objeto de colección).

- **Sex:** sexo del espécimen. Seleccione del menú que se despliega Male (macho), Female (hembra) o Unknown (desconocido).
- **Weight:** peso del espécimen (si se tiene).
- **Length:** Longitud del espécimen (si se tiene).
- **Stage:** Estado de desarrollo. Seleccione del menú que se despliega según sea el caso: Adult (adulto), Egg (huevo), Larvae (larva), Nymph (ninfa), o Pupae (pupa).
- **Remarks:** En este espacio se utiliza para registrar información adicional del espécimen. Por ejemplo, si al espécimen se le realizó extracción de genitales, o alas para estudios específicos.

1.10. Attachments

Este campo se utiliza para adjuntar información adicional del espécimen, sean fotos, archivos con las secuencias de ADN, etc. Para adjuntar esta información seleccione el símbolo más (+) y aparecerá una nueva ventana en la cual buscará el archivo que usted desea adjuntar (Fig. 13). Si desea puede darle un título al archivo. Para finalizar seleccione la opción "ACCEPT". Repita este paso para cada archivo adjunto adicional.



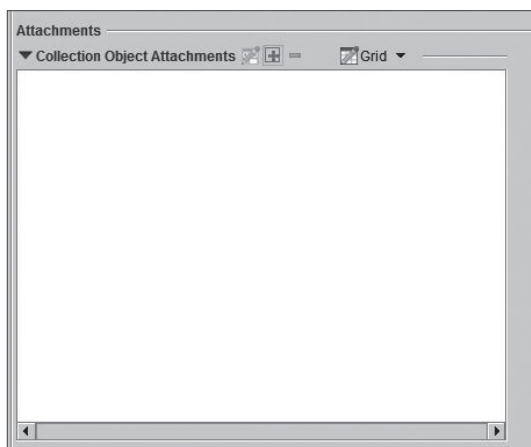


Figura 13. Menú "Attachments" (adjuntos).

- 1.11.** Para finalizar. Cerciórese de haber ingresado los datos que dispone para su espécimen. Cuando todo esté correcto, en la esquina inferior derecha está el botón 'SAVE' (Fig. 14), seleccione este botón y de esta forma la información será guardada. Después de hacer este procedimiento aparecerá el número de catálogo correspondiente al espécimen, confirme que corresponda exactamente con el número asignado. Si no aparece esta opción (SAVE) habilitada es porque hace falta información y hay información mal diligenciada, el programa le mostrará los campos que presentan error señalándolos de color rojo. Si esto ocurre, rectificar la información.

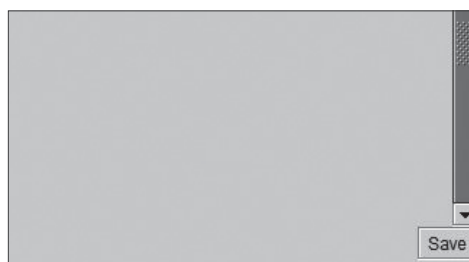


Figura 14. Botón "Save" (guardar).



INGRESAR UN NUEVO REGISTRO

Para ingresar un nuevo registro diríjase a la esquina superior izquierda y en 'Collection Object' seleccione el botón "más" (+) y aparecerán los espacios en blanco para poder ingresar su nuevo registro (Fig. 15).

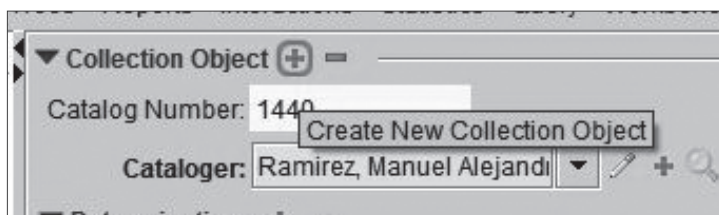


Figura 15. Ingresar nuevo registro seleccionando el botón "+".

NOTA: para optimizar tiempo en el ingreso de la información de los especímenes, después de completar toda la información para el primer registro que ingresa en su sesión, diríjase a la esquina superior izquierda y seleccione la pestaña 'DATA', luego escoja la opción 'CONFIGURE CARRY FORWARD' (Fig. 16).

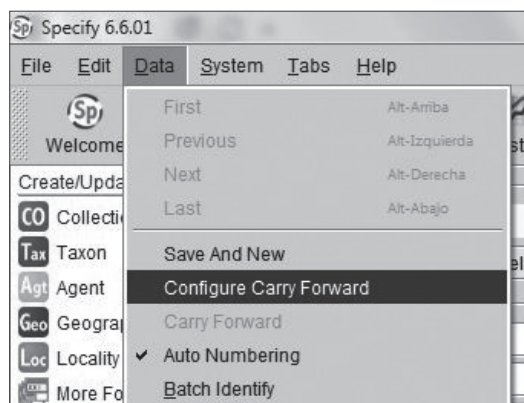


Figura 16. Configuración de la opción "Configure Carry Forward" en la pestaña "Data".



Aparecerá la siguiente ventana (Fig. 17):

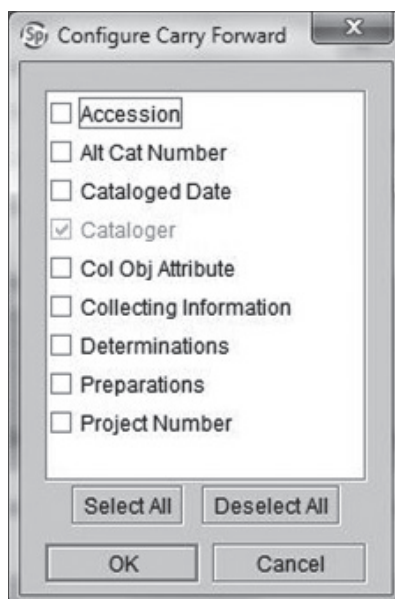


Figura 17. Campos del menú "Configure Carry Forward".

En este menú seleccione la opción '*SELECT ALL*' y luego '*OK*'. Este procedimiento permite que al ingresar un nuevo registro (información de otro espécimen) se mantengan exactamente los datos del registro anterior (excepto el número de catálogo). Utilizar esta opción es recomendable cuando tiene series de especímenes con los mismos datos (incluyendo los de identificación), en los cuales lo único que cambia es el número de catálogo.

Si utiliza esta opción tenga cuidado con la información de las siguientes casillas:

- **Project Number.**
- **Determined Date.**
- **Start Date.**
- **End Date.**
- **Prepared Date** (dentro del menú '*Preparations*')



Ingreso de registros de secuencias de ADN asociadas a especímenes registrados en la colección CETdeA.

Antes de ingresar secuencias de ADN, es necesario que cada secuencia tenga un número de acceso en la base de datos de Genbank¹. Adicionalmente, se necesita conocer el número de registro del espécimen (BOLD simple id) en la plataforma BOLD. También se requiere conocer el número de catalogación del espécimen al cual se le va a asociar una o varias secuencias de ADN.

Para ingresar un nuevo registro, haga clic en el icono data (ver figura 4). Cuando aparezca el menú data ubique el ícono DNA Sequence (Fig. 18), haga clic en él. A continuación, se desplegará el formulario de ingreso de secuencias de ADN (Fig. 19).

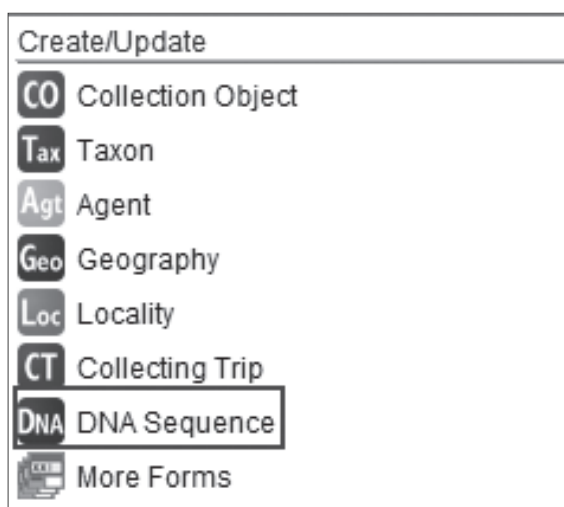


Figura 18. Ubicación del icono para abrir el formulario de secuencias de ADN.

1. Base de datos del National Center for Biotechnology Information donde se reportan secuencias disponibles al público (Benson et al., 2013)



Figura 19. Formulario de datos para el ingreso de secuencias de ADN.

A continuación, se describe el contenido a ser almacenado en cada uno de los campos del formulario:

- **BOLD barcode Id:** número de identificación de la secuencia barcode en la plataforma Barcode of Life Data System — BOLD.
- **BOLD last update:** Número de fecha de actualización de datos en la plataforma BOLD.
- **BOLD simple id:** código del espécimen asociado a la secuencia de ADN en la plataforma BOLD.
- **Collection object:** número de catalogación que identifica al espécimen en el CETdeA, y al cual se va asociar la secuencia de ADN.
- **NCBI Accession:** código de la secuencia asignada por el Centro Nacional de Información en Biotecnología — NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- **NCBI Accession release date:** ingrese la fecha en que la secuencia depositada en el NCBI se hizo disponible al público general (en formato día/Mes/Año: DD/MM/AAAA).
- **Molecule type:** seleccione el tipo de topología de la molécula a partir de la cual se obtuvo la secuencia de ADN. Si se trata de un gen de origen mitocondrial o de cloroplasto, seleccione la opción circular. Si se trata de un gen de origen nuclear, seleccione la opción lineal.



- **Sequencer:** hace referencia a la empresa en la cual se llevó a cabo el secuenciamiento de las muestras. Debe hacer una búsqueda en la tabla de agentes (Fig. 20).
- **Target Marker:** seleccione la región a la cual pertenece la secuencia. En caso de que en la lista no se encuentre la región correspondiente, por favor comuníquese con el administrador de la base de datos para actualizar la lista.
- **Gene Sequence:** Pegue en este campo la secuencia consenso en texto plano, con las abreviaturas de las bases nucleotídicas (A, G, T, C) en mayúscula sostenida.

A.

DNA Sequence

BOLD Barcode Id: BOLD Last Update: BOLD Sample Id:

Collection Object: Molecule Type: Sequencer:

B.

Agent

Agent Type: Title:

Name: First Name: Middle Initial:

Abbreviation: Email:

Addresses

☐ Is Primary

Address:

Address2:

City: State: Postal Code: Country:

Room/Building: Phone1: Phone2: Fax:

Attachments

Agent Specialties

Specialty Name:

GUID:

Save Cancel Help

C.

Agent Search

Agent Info

Last Name/Org: First Name:

Address:

City: State:

Postal Code: Country:

(You may wish to place an "*" before or after the word(s), for a wild card search.)

Search Results

First Name	Last Name	Email	Address	City	State	Postal Code	Country
	Macrogen Korea	info@macrogen.com	10F, 254 Beotkkot-ro Geumcheon-gu	Seoul		08511	Republic of Korea

OK Cancel Help

Figura 19. Búsqueda e ingreso de agente de secuenciamento en el formulario de secuencias de ADN. (A) Vista desde el formulario de secuencias. (B) Formulario de ingreso de agentes. (C) Formulario de búsqueda de agentes.



En caso de que exista más de una secuencia asociada a un espécimen, debe ingresar un registro nuevo para cada una. Recuerde guardar cada registro antes de iniciar un registro nuevo, usando el botón "Save" (guardar) (Fig. 14).

Si usted no realiza esta acción, al momento de ingresar un nuevo registro todos los espacios quedarán en blanco.

Salir del programa

Para salir del programa señale la pestaña "File" del menú ubicado en la esquina superior izquierda, después seleccione la opción "Exit".

E. Referencias bibliográficas

- Benson D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Res.*, 41 (Database issue), D36-42. Doi: 10.1093/nar/gks1195
- Specify Collections Consortium. (2018). Specify. Lawrence, Kansas: Specify Collections Consortium. Retrieved from <http://www.sustain.specifysoftware.org/>



Protocolo de lavado y esterilización de material en autoclave semiautomatizado

Juliana Pérez

A. Fundamento teórico

Cuando se procesan muestras de ácido desoxirribonucleico (ADN) es importante que todo el material utilizado sea estéril para evitar contaminación, no solo de microorganismos presentes en el ambiente, sino también de restos de ADN que pueden dar lugar a falsos positivos. Con la desinfección y esterilización se busca evitar contaminación de las muestras, aspecto esencial en la validez de los resultados obtenidos (Lauer, Battles & Vesley, 1982).

B. Objetivo

Describir el protocolo de lavado y esterilización de materiales utilizados los procedimientos de biología molecular



C. Requerimientos

Materiales

- Esponja de lavado
- Frascos de vidrio
- Puntas y tubos
- Algodón
- Papel aluminio
- Cinta indicadora de esterilización
- Marcador indeleble punta fina
- Papel Kraft o Tela no tejida para esterilización

Reactivos

- Jabón alcalino: Dextrán, Alconox, etc. (5 %)
- Ácido clorhídrico HCl 5 %
- Agua destilada

Equipos

- Calentador
- Autoclave

D. Procedimiento

Todo el material a utilizar en los procesos de biología molecular debe estar estéril. En particular, el material que está en contacto directo con las muestras como maceradores, viales y puntas, deben ser esterilizados antes de usarlos, excepto que la casa comercial indique que ya han pasado por este proceso. Si se reutiliza material (por ejemplo, maceradores) es necesario realizar un proceso previo de lavado.

Lavado

1. Sumergir por 24 horas el material en la solución de jabón alcalino (5 %).
2. Transferir el material (puntas, maceradores y viales) a agua destilada y dejar en ebullición durante 30 minutos.
3. Lavar cuidadosamente con escobillón o esponja después del paso anterior.
4. Sumergir por 12 horas en solución de HCl (5 %).
5. Lavar con agua corriente y dejar en agua destilada durante 24 horas, repetir este último procedimiento dos veces.



Esterilización

El material debe estar seco. Dependiendo del material a esterilizar considere lo siguiente: viales y maceradores deben ir en frascos con cierre no hermético, se puede utilizar papel aluminio como tapa. Las puntas deben organizarse en sus respectivas cajas. En caso de otro material, procure envolverlo en papel Kraft o tela no tejida para esterilización. Luego del empaque, a cada recipiente o material pegue un fragmento de cinta indicadora de esterilización sobre la cual deberá indicarse la fecha y el responsable de la esterilización.

Para proceder a esterilizar, el encargado del proceso debe saber manipular el equipo para evitar accidentes.

1. Verifique que el autoclave tenga un nivel de agua que permita sumergir la resistencia y subir al máximo el flotador. El nivel de agua adecuado es muy importante para alcanzar la presión de vapor requerida en el proceso y evitará que el equipo se dañe o genere alarmas. Sobrepasar el límite del nivel de agua afectará el proceso.
2. Depositar el material marcado en el autoclave. Organícelo de modo que haya una buena distribución en el interior y permita la circulación del vapor de aire.
3. Cerrar el autoclave después de introducir el material. Para procurar el cierre hermético deben girarse las perillas opuestas simultáneamente.
4. Encender el autoclave y programarlo. El autoclave debe alcanzar una presión de 15 a 20 psi durante 15 minutos. Configure la presión SP (sterilization pressure) y el tiempo ST (sterilization time) de esterilización usando el panel. Presione el botón SET para configurar SP y ST, y utilice las flechas para subir o bajar el valor indicado al requerido.
5. Posicionar las válvulas verticalmente (apertura). Una vez haya un escape vigoroso y permanente de vapor posicionar las válvulas horizontalmente (cierre).
6. Una vez cerradas las válvulas, el equipo automáticamente ejecutará el programa de esterilización configurado previamente y se apagará al finalizarlo.
7. Cuando el autoclave esté completamente frío, destápelo y verifique el cambio de color en la cinta indicadora. Tenga precaución de no quemarse al retirar el material.



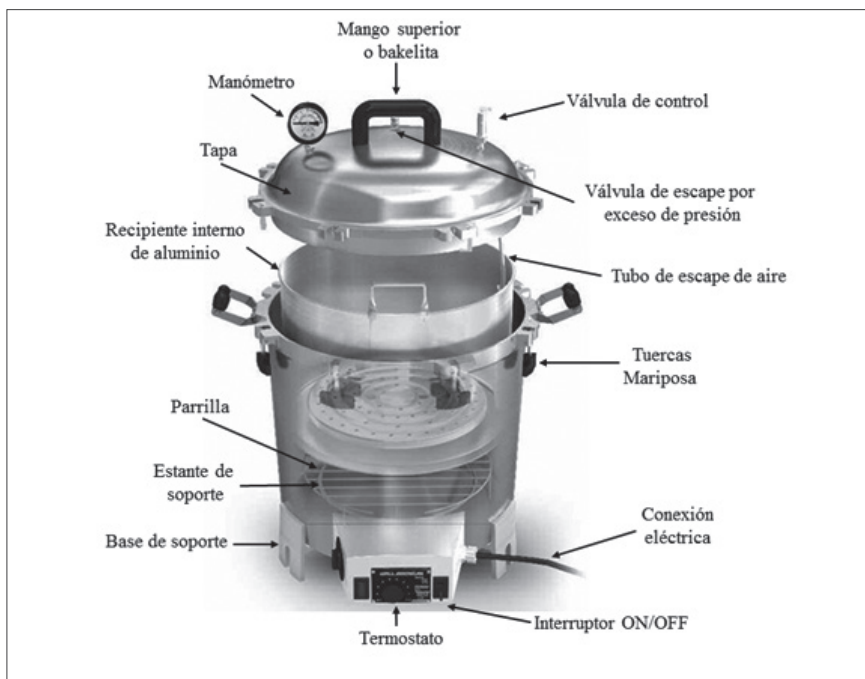


Figura 1. Partes de una autoclave. Modificado de: <http://jaeger.com.gt/>

E. Referencias bibliográficas

Lauer, J.L., Battles, D.R. & Vesley, D. (1982). Decontaminating infectious laboratory waste by autoclaving. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(3), 690-694.



Electroforesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) en gel de agarosa

Alejandra Pérez Cardona
Luz Miryam Gómez

A. Fundamento teórico

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas, de acuerdo a su tamaño y reactividad (Westermeier et al., 2005), y puede ser utilizada en la separación del ADN. El ADN posee carga negativa debido a la presencia de grupos fosfato en su estructura, característica que permite que, bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado, las moléculas migren en dirección al ánodo (carga positiva) (Westermeier, 1997).

Para la electroforesis de ADN generalmente se emplea gel de agarosa como material de soporte. La agarosa es un polímero natural, polisacárido formado por galactosas alfa y beta que se extrae de las algas de los géneros *Gellidium* y *Gracillaria*.

La agarosa es soluble en agua a temperaturas superiores a los 65 °C, dependiendo del grado de sustituciones hidroxietílicas de sus cadenas laterales. Su temperatura de gelificación puede variar entre los 17 y los 40



°C y forma fibras helicoidales súperenrolladas con radio entre 20-30 nm dependiendo de su concentración. La polimerización de la agarosa resulta en una red tridimensional de poros con diámetros entre 50 – 200 nm de acuerdo a la concentración de agarosa utilizada (Ausubel et al., 1994).

La movilidad de la molécula en el gel está influenciada por su tamaño, las moléculas más grandes migran más lentamente debido a que tienen más resistencia al interior del gel, mientras que las moléculas pequeñas se desplazan más rápidamente (Sambrook & Rusell, 2001).

La velocidad de migración de las moléculas de ADN en el gel está determinada por varios parámetros como:

- **Peso del ADN:** las moléculas de ADN lineal de doble cadena migran a través del gel a velocidades que son inversamente proporcionales a su número de bases. Debido a la fricción que impone la malla del gel de agarosa según su concentración, las moléculas de mayor tamaño migran más lentamente con respecto a las de menor tamaño.
- **Concentración de agarosa:** Dependiendo de la concentración de agarosa, las muestras migran con mayor facilidad o no en el gel. Para permitir una mejor resolución de las bandas se han determinado concentraciones de agarosa (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración de agarosa para separar moléculas de ADN lineal (Ausubel et al., 2003).

% de agarosa	Tamaño del ADN (pb)
0,75	10000-15000
1,0	500-10000
1,25	300-5000
1,5	200-400
2,0	100-2500
2,5	50-1000

- **Conformación del ADN:** el ADN puede presentar diferentes conformaciones que afectan la movilidad en el gel de agarosa. El ADN circular de doble cadena súperenrollado (Forma I) migra a mayor velocidad que el circular enrollado y circular relajado (Forma II).



- **Voltaje aplicado:** 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 aumenta en fragmentos de ADN de alto peso molecular, la movilidad se limita, esto genera que las moléculas no se separen completamente a pesar de aumentar el voltaje de la electroforesis.
- **Buffer de electroforesis:** la migración del ADN es afectada por la composición y fuerza iónica del buffer de electroforesis. Actualmente se utilizan diferentes buffers, los más utilizados son el buffer TAE (Tris, Ácido Acético, EDTA) y TBE (Tris, Borato, EDTA).

Los ácidos nucleídos separados en geles de agarosa pueden visualizarse mediante tinción con intercalantes, lo cual permite evaluar su integridad y estimar su concentración mediante un análisis comparativo con patrones de peso molecular conocido. Los intercalantes actúan mediante inserción entre las pares de bases que conforman el ácido nucléico. El bromuro de etidio es ampliamente utilizado para la visualización de ADN y ARN. Sin embargo, éste es un reactivo altamente tóxico, con propiedades mutagénicas, por lo que debe ser manejado con extremo cuidado en el laboratorio. En la actualidad existen colorantes fluorescentes alternativos, como SYBR Safe, SYBR Gold, SYBR Green I, Vistra Green, Ez visión, Syto60, desarrollados específicamente para reducir los riesgos potenciales de mutagénesis (Posso, 2009).

Este procedimiento se lleva a cabo en una cámara de electroforesis la cual está compuesta por, una bandeja de gel, una peñilla y una fuente de poder (Fig. 1).



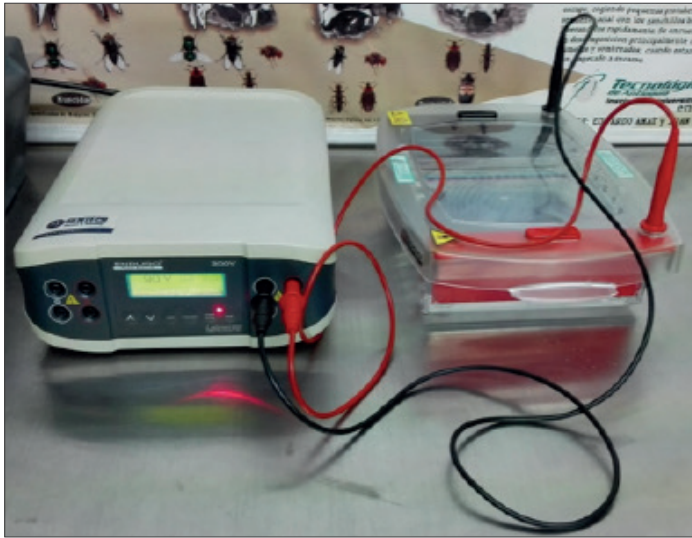


Figura 1. Equipo de electroforesis. Foto de las autoras.

B. Objetivo

Conocer el proceso para llevar a cabo una electroforesis en gel de agarosa

C. Requerimientos

Materiales

- Erlenmeyer
- Palilla
- Soporte para tomar el Erlenmeyer
- Balanza
- Micropipetas de 10 y 20 μ l
- Puntas estériles para micropipetas
- Papel parafinado
- Horno microondas
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder
- Transiluminador/ Fotodocumentador



Reactivos

- Agarosa
- Buffer de electroforesis TBE
- Marcador de peso molecular
- Tinción para ADN (EZ-Vision© o Gel Red™)

D. Procedimiento

Verifique que cuenta con todos los materiales para la preparación del gel de agarosa y acondicione la cámara. Tenga en cuenta que el ADN tiene carga neta negativa y por tanto migra hacia el polo positivo, es por esto que la peinilla para formación de los pozos donde se depositan las muestras debe de localizarse hacia el polo negativo (indicado con el color negro en la cámara de electroforesis).

- Para el montaje de los geles deben existir dos recipientes que contengan TBE (Tris, Borato, EDTA) 1X, uno para la preparación de los geles y otro para utilizarlo como buffer de corrido en la electroforesis.
- Calcule y pese los gramos de agarosa que se requieren para preparar el gel a la concentración requerida. Ej. Para preparar un gel al 2 % en un volumen final de 60 ml se requerirá 1,2 g de agarosa, que se disolverán en el TBE 1X.
- Calentar la mezcla en un horno microondas hasta que la solución este completamente transparente, lo que indica que la agarosa se ha disuelto completamente (dejar aproximadamente un minuto en el horno microondas, este no es un tiempo estándar, y debe adecuarse de acuerdo al volumen empleado). Es importante prestar atención a este proceso, para evitar que se dé una ebullición prolongada que conlleve a la pérdida de la solución.
- Luego de este proceso retire el Erlenmeyer del horno y permita su enfriamiento hasta una temperatura de 40 °C. Puede auxiliarse de un baño de agua usando un recipiente que lo contenga. Es importante agitar continuamente para evitar la formación de grumos.
- Sirva la solución en la bandeja de la cámara de electroforesis, ésta debe estar completamente equilibrada. Al momento de verter la agarosa en la cámara de electroforesis evite la formación de burbujas. En caso de que se presenten retírelas con ayuda de una punta antes de que se polimerice el gel.



IMPORTANTE: Recuerde insertar el peine inmediatamente después de verter la agarosa en la cámara, para permitir la formación de los pozos.

- Cuando la agarosa este completamente gelificada (aprox. 45 min) retire el peine y los soportes laterales suavemente. Transfiera el gel en la bandeja a la cámara de electroforesis. Cúbralo con suficiente buffer TBE 1X, de modo que el gel quede cubierto, cobrepasando el del nivel del gel por aproximadamente 2-5 mm.
- En papel parafinado mezcle 2 μ l de solución de tinción (EZ visión 10.000X) con 3 μ l de la muestra de ADN, mezcle completamente utilizando la pipeta. Tenga en cuenta el orden en que siembra las muestras en cada pozo de la cámara, con el fin de saber cómo interpretar los resultados obtenidos en cada carril.
- Proceda a dispensar la mezcla en cada pozo con mucho cuidado de no perforar el gel. Realice el mismo procedimiento para el marcador de peso molecular.
- Cierre la cámara y aplique el voltaje que se ha estandarizado (generalmente a 10 voltios por cm de gel). Verifique el funcionamiento de la cámara mediante de la observación de pequeñas burbujas que se desplazan desde las resistencias del ánodo y el cátodo a la superficie. Adicionalmente algunos buffers de carga (ej. EZ-Vision) tienen colorantes que permiten indirectamente detectar el movimiento de las moléculas de ADN a lo largo del gel.
- Cuando las muestras hayan corrido durante el tiempo configurado, retire el gel de la cámara de electroforesis y trasládalo hasta el transiluminador, visualice el marcador de peso molecular y las muestras procesadas. Fotografíe, procurando que el gel quede centrado. Recuerde protegerse de la luz UV mediante el uso de gafas y la pantalla del transiluminador.



E. Referencias bibliográficas

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman J.G., Smith J.A. & Struhl, K. (Eds.) (2003). Current protocols in molecular biology. 5 vols. USA: John Wiley & Sons Inc.
- Posso Duque, Duina (2009). Protocolo de electroforesis del ADN en geles de agarosa. Protocolos de laboratorio UEG. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Altos de Pipe- Venezuela. Recuperado de: <http://www.ivic.gob.ve/ecologia/ueg/>.
- Sambrook, J.F. & Rusell, D.W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3.rd ed. Vol 1. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Somma, M. y Querci, M. (s. f.). Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Electroforesis en Gel de Agarosa. Sesión nº 5. Recuperado de: <https://www.yumpu.com/es/document/view/14379889/electroforesis-en-gel-de-agarosa-europa>
- Westermeier, R. (1997). Electrophoresis in Practice: a Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separation. Weinheim: VCH.
- Westermeier, R. (2005). Electrophoresis in Practice. 4.th ed. Wiley-Vch.



Protocolo para la limpieza y funcionamiento de la cámara de condiciones ambientales controladas

Andrés López Rubio

A. Fundamento teórico

Las condiciones ambientales influyen sobre el desarrollo del ciclo de vida de los insectos. En la entomología forense es muy importante determinar la duración del ciclo de vida y determinar curvas de crecimiento para cada especie, bajo diferentes escenarios climáticos, con el fin de aplicar esta información para los cálculos del IPM (Intervalo post mortem).

Los escenarios climáticos en el laboratorio se pueden simular a través de una cámara de condiciones climáticas controladas (Fig. 1), equipo que permite controlar variables como temperatura, humedad y tiempos de iluminación (CCI, 2010; Panasonic, 2012)



Tabla 1. Descripción de las partes de una cámara de cría.

Nombre	Descripción
Puerta frontal	Permite el acceso al interior de la cámara de condiciones controladas
Panel de control	Contiene los botones y las pantallas que permiten mostrar el estado actual y modificar las condiciones al interior
Soporte frontal	Sostiene la cámara de condiciones controladas
Ruedas de desplazamiento	Permiten la movilidad del equipo
Terminal para conectar alarma remota	Permite el acceso remoto
Puerta de vidrio interna	Mantiene las condiciones del aire dentro de la cámara
Interruptor de puerta frontal	Controla la circulación del aire cada vez que se abre la puerta frontal
Documento de salida del ventilador	Hace parte del sistema de circulación del aire de la cámara
Toma de aire para sistema de circulación	Proporciona la entrada de aire a la cámara
Interruptor de encendido/apagado	Permite el encendido y apagado del equipo
Caja de interruptores	Permite realizar conexiones de componentes y accesorios
Puerta lateral	Acceso lateral a la cámara
Estantes interiores	Permiten la disposición de material al interior de la cámara
Bandeja de evaporación de agua	Recipiente en el que se evapora el agua
Ventana para verificación de formación de escarcha	Función de visualización
Filtro	Función de purificación
Tanque de agua de reserva	Almacenamiento de agua
Ducto para humidificación	Eleva o mantiene la humedad en el aire
Entrada de suministro de agua	Suministro de agua al sistema



1. Encendido

El interruptor de encendido se encuentra ubicado en la parte frontal de la cámara, en la parte inferior izquierda. Para acceder a éste abra la puerta izquierda y ubique el interruptor de corriente con el interruptor de circuito.

2. Ajuste de estantes

Los estantes se pueden ajustar a la altura de los elementos que se van a ubicar en su interior. Para ajustar la altura, insertar los clips de ayuda dentro de la ranura con la altura deseada.

3. Panel de control

En el panel de control se tiene acceso a la información del funcionamiento de la cámara, así como el ingreso de los valores para su programación (Fig. 2).

3.1. Visualización de información en el panel LCD

Cuando la cámara está encendida muestra la información de hora, temperatura, fecha, humedad, luminosidad (Fig. 3).



Figura 1. Componentes de cámara de condiciones ambientales controladas. 1. Puerta frontal; 2. Panel de control; 3. Rueda; 4. Pies de nivelación.



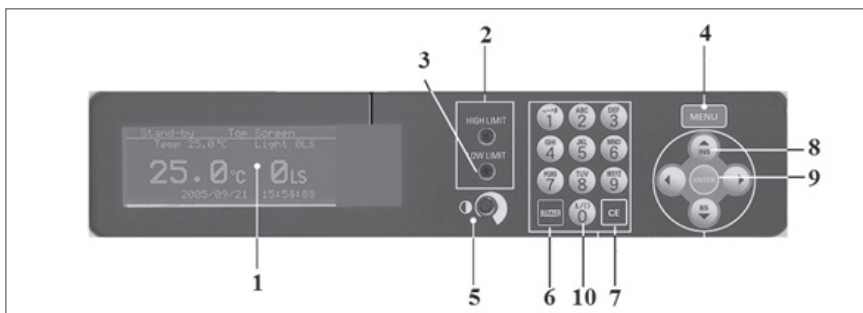


Figura 2. Panel de control. 1. Panel LCD; 2. Volumen de alarma de límite de temperatura alta; 3. Volumen de alarma de límite de temperatura baja; 4. Botón de menú; 5. Perilla de ajuste de contraste del panel LCD; 6. Botón de detención de alarma; 7. Tecla de borrado; 8. Cambio de teclado; 9. Tecla introducir "enter"; 10. Tecla de entrada de caracteres.

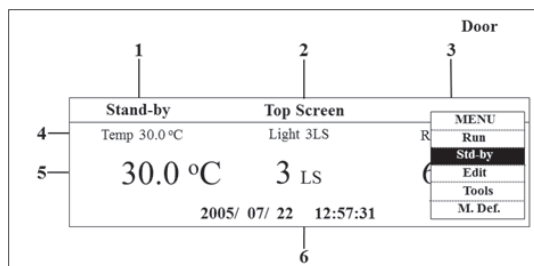


Figura 3. Panel LCD 1. Visualización del estado de funcionamiento; 2. Visualización del nombre del programa; 3. Visualización de estado de la puerta; 4. Visualización de ajustes; 5. Visualización de valores actuales; 6. Visualización de fecha y hora.



Condiciones para la instalación del equipo:

El lugar donde se ubique el equipo debe cumplir las siguientes condiciones

- Estar instalado lejos de la luz solar directa.
- Adecuada ventilación. Dejar por lo menos 10 cm alrededor del equipo y otros objetos.
- Alejado de fuentes y objetos que generen calor.
- La superficie sobre la cual se dispone el equipo tiene que estar completamente nivelada.
- Ausencia de gases corrosivos o inflamables.
- Libre de objetos que tengan la posibilidad de caer sobre el equipo.
- El suministro debe estar por lo menos a 50 cm o mayor altura respecto al suelo. Revise que la manguera esté bien instalada antes de abrir el paso de agua del tanque. La manguera de desagüe debe conectarse a una salida de alcantarillado, de no ser posible, ubicar esta manguera en un contenedor.

B. Objetivo

Desarrollar los procedimientos para limpieza y operación de la cámara de condiciones ambientales controladas.

C. Requerimientos

Equipos

- Cámara de condiciones ambientales controladas PANASONIC MLR-351H.

Materiales

- Agua.
- Jabón.
- Toallas desechables.
- Guantes.



D. Procedimiento

Limpieza

A la hora de iniciar o finalizar un proceso de cría se debe realizar una limpieza en el interior, con el fin de eliminar cualquier sustancia o agente externo que pueda alterar el proceso de cría.

Para la limpieza se deben utilizar guantes de látex o nitrilo, jabón neutro, toallas desechables y alcohol. Realizar el siguiente procedimiento:

1. Con la toalla desechable impregnada de jabón se debe limpiar todo el interior de la cámara.
2. Con una toalla húmeda se quita el exceso de jabón.
3. Por último, se hace una limpieza con alcohol con una toalla de papel absorbente.

Operación del sistema

Existen dos formas de programar el sistema, una que es la “Operación en espera”, y por “Programación”.

1. Operación en espera (Standby/Std-by)

Esta es la programación que trae por defecto el equipo. Con este tipo de operación, las condiciones de las variables son constantes. Sin embargo, se pueden cambiar cuando sea necesario.

a. Con el panel de visualización LCD, presione el botón “MENU” para mostrar la ventana de menú, seleccione “Std-by”, y presione la tecla “ENTER” (Fig. 4).



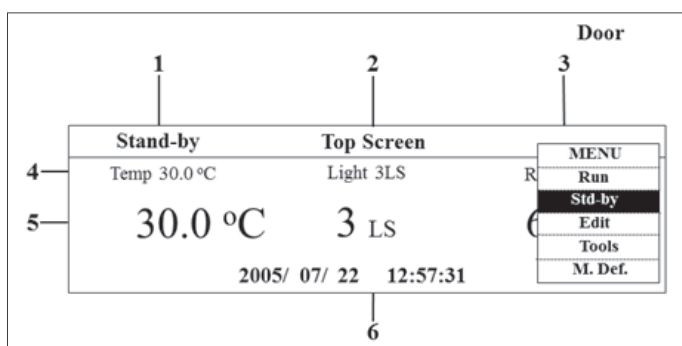


Figura 4. Operación en espera (Standby). Ventana de MENU.

b. Se muestra la pantalla de ajuste "Standby". Ajuste cada parámetro. Presione el botón "MENU" al completar el ajuste del parámetro. Se muestra la ventana del "MENU".

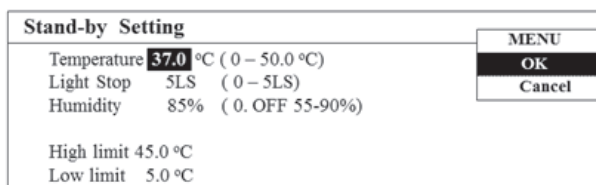


Figura 5. Operación en espera (Standby). Memorizar valores de funcionamiento.

Los rangos ajustables de cada parámetro son:

- Temperatura: 0 °C–50 °C
- Pasos de luz: 0LS–5 LS
- Humedad: OFF o 55 %HR–90 %HR



2. Programación

Se tienen dos opciones, las cuales son “modo reloj (clock mode)” y “modo de temporizador (timer mode)”. El modo reloj es usado para establecer un tiempo de cambio al siguiente paso en un tiempo del día (24 hr). El modo temporizador es utilizado para establecer cada cambio en un tiempo determinado.

Modo reloj (Clock mode)

Visualizando el panel LCD, presione la tecla “MENU” para mostrar la ventana del menú. Seleccione “EDIT”, y presione la tecla “ENTER” (Fig. 6).

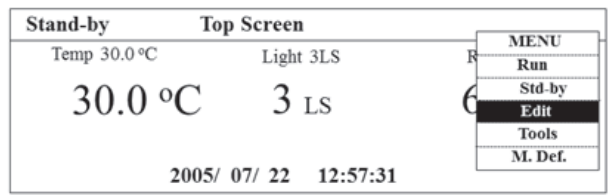


Figura 6. Menú editar para programación por reloj de tiempo.

Se abre la pantalla de nombre de programa almacenado “Program Name Stored”. Presione la tecla “MENU” y seleccione “NEW” (nuevo), y presione la tecla “ENTER”. Si hay programas grabados aparecerán sus nombres, de lo contrario, estará en blanco (Fig. 7).

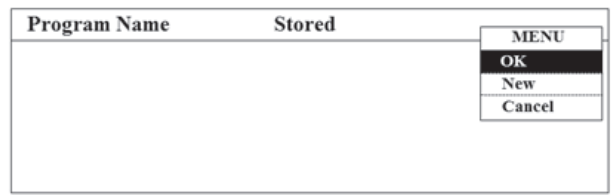


Figura 7. Visualización de programas editados.



Se visualiza un modelo de programa (Fig. 8). La pantalla es desplazada a la siguiente página utilizando la tecla de desplazamiento

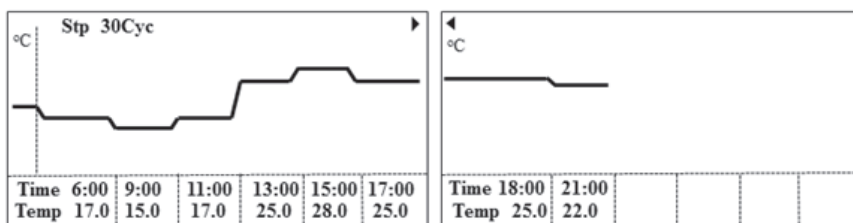


Figura 8. Visualización de un modelo de programa.

hacia la derecha. El número de pasos (Stp: pasos) y el número de ciclos (Cyc: número de repeticiones) se pueden cambiar en la esquina superior izquierda de la pantalla (Fig. 9). Resaltar el valor numérico con la tecla de dirección.

El número de pasos (Spt) se puede cambiar con la opción insertar "INSERT" o borrar "DELETE" de la ventana del menú. Presione el botón "MENU".

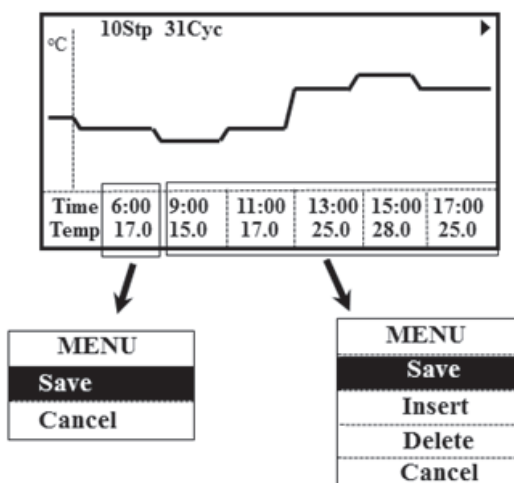


Figura 9. Insertar o borrar pasos.



El número de pasos máximos es de 12.
El número máximo de ciclos es 98.
Si el ciclo está en 99, quiere decir repetición ilimitada.

Para programar resalte el valor numérico de cada sección de tiempo (TIME) con la tecla de movimiento, a continuación, ingresar el valor con el teclado numérico (Fig. 10).

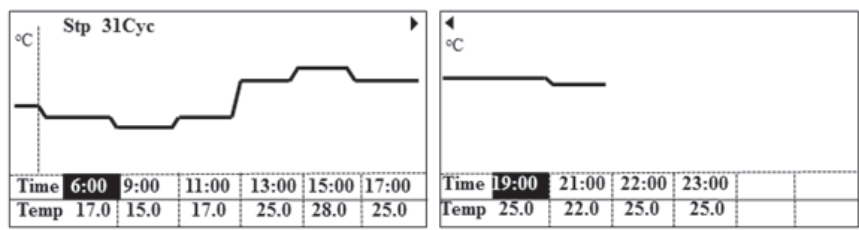


Figura 10. Desplazamiento a través del tiempo de programación.

Mueva la tecla cursor hacia abajo y seleccione la temperatura. El rango de funcionamiento es entre 0.0 °C y 50.0 °C (Fig. 11).

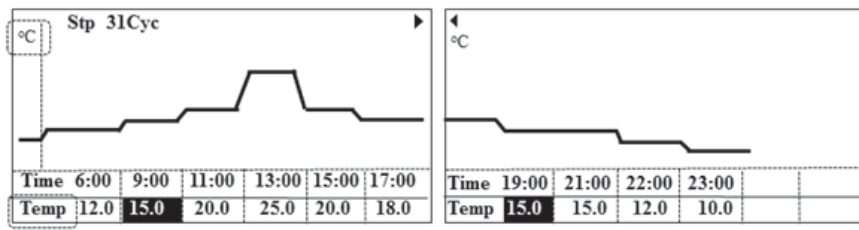


Figura 11. Ajuste de temperatura. (During temperatura setting, "°C" is displayed at upper left= Durante el ajuste de la temperatura, "°C" se muestra en la esquina superior izquierda).



Mover el cursor hacia abajo con la tecla de desplazamiento para editar la siguiente variable "LIGHT" o luz (Fig. 12).

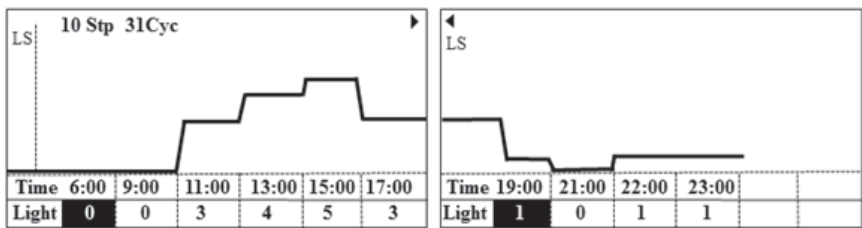


Figura 12. Edición de la variable luz "LIGHT".

Establezca el valor de luz que desee. El rango de este ajuste es entre 0 y 5 (Fig. 13).

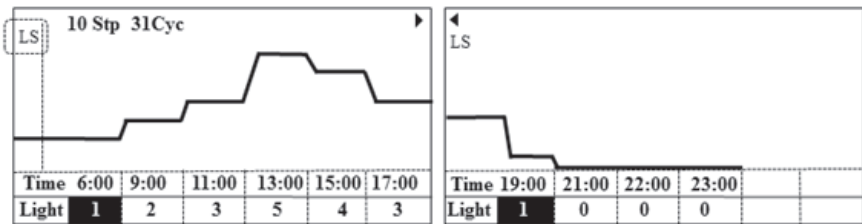


Figura 13. Ajuste del valor de la intensidad de luz "LIGHT". (During light step setting, "LS" is displayed at upper left= durante el ajuste de la luz, "LS" se muestra en la esquina superior izquierda).

Mueva la tecla de desplazamiento hacia abajo para editar la variable "RH" humedad relativa (Fig. 14).

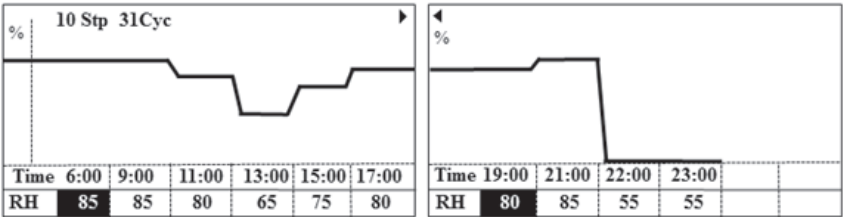


Figura 14. Edición de la variable humedad relativa "RH".

Establezca el valor de humedad relativo que desee. El rango de esta variable es entre 55 % y 90 % (Fig. 15).

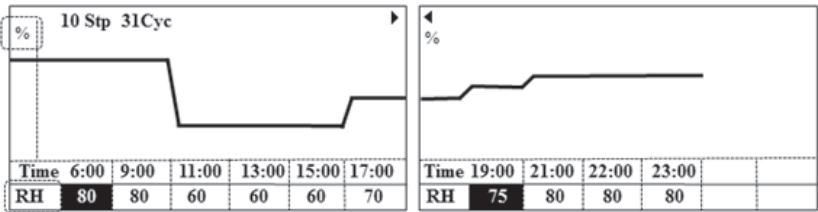


Figura 15. Ajuste de la variable humedad relativa "RH".

Al completar todos los ajustes de las variables, presione la tecla "MENU" para mostrar la ventana del menú. Seleccione guardar "SAVE", y presione la tecla "ENTER". Se abre la pantalla de guardar programa "SAVE PROGRAM" (Fig. 16).



Save Program
Program ████████████████████

Figura 16. Ventana de Guardar Programa "Save Program".

Introduzca el nombre del programa, y presione la tecla "MENU" para mostrar la ventana del menú. Seleccione "guardar como" "SAVE AS", y presione la tecla "ENTER, para finalizar el proceso de programación (Fig. 17). El número máximo de caracteres para nombrar el programa es de 16. Se puede crear y guardar un máximo de 10 programas.

Save Program				
Program Oze	<table border="1"> <tr><td>MENU</td></tr> <tr><td>Save As</td></tr> <tr><td>Cancel</td></tr> </table>	MENU	Save As	Cancel
MENU				
Save As				
Cancel				

Edit function of characters			
Shift key			
- Upward shift key: Space insertion		- Downward shift key: backspace	
- Leftward shift key: Move a cursor left		- Rightward shift key: Move a cursor right	
Character input key			
1 key: space,-,#,@,1	2 key: A,B,C,a,b,c,2	3 key: D,E,F,d,e,f,3	
4 key: G,H,I,g,h,i,4	5 key: J,K,L,j,k,l,5	6 key: M,N,O,m,n,o,6	
7 key: P,Q,R,S,p,q,r,s,7	8 key: T,U,V,t,u,v,8	9 key: W,X,Y,Z,w,x,y,z,9	0 Key: &./,(),-,0

Figura 17. Edición del nombre del programa y edición de función de caracteres.



3. Iniciar un programa.

- Con la pantalla de inicio, presione la tecla "MENU" para mostrar la ventana del menú. Seleccione "correr" "RUN", y presione la tecla "ENTER" (Fig. 18).

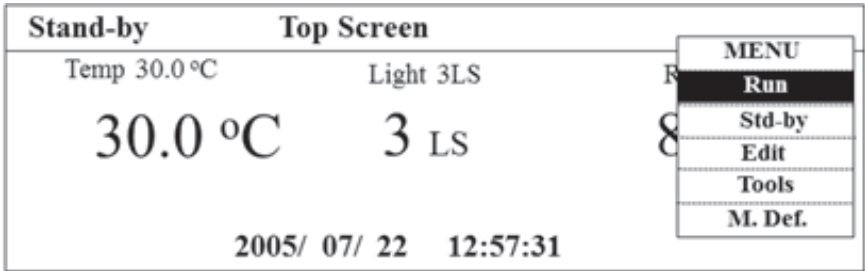


Figura 18. Ingreso al menú "correr" "RUN".

- Se abre la pantalla con los nombres de los programas almacenados. Seleccione el nombre del programa deseado y presione la tecla "MENU" para iniciar el programa. Seleccione "OK" en la ventana del menú, y presione la tecla "ENTER" (Fig. 19).

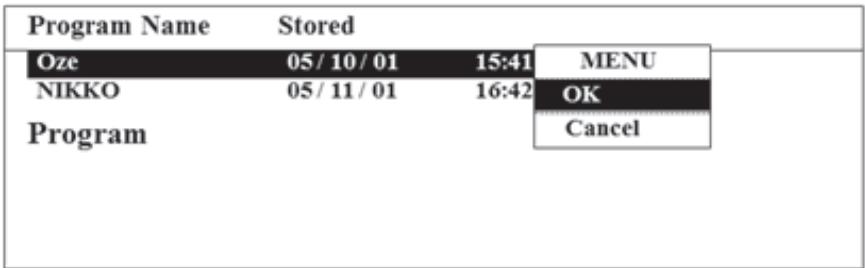


Figura 19. Selección y puesta en marcha de un programa almacenado.



- Se abre las “opciones de inicio” “START OPTIONS”. En esta pantalla, ajuste el temporizador “TIMER” (selección de modo de reloj “CLOCK MODE” o modo temporizador (TIMER MODE”).

En caso de que se requiera unir dos programas realice el siguiente proceso:

Unir “JOIN” (unir otros programas), y la fecha de inicio. Seleccione 1 (CLOCK) para el temporizador “TIMER”. Para unir “JOIN”, seleccione 2 (No). Introduzca la fecha de inicio (2005 10 01) y la hora (06:00:00), y presione la tecla “MENU” para mostrar la ventana del menú. Seleccione “OK”, y presione la tecla “ENTER” (Fig. 20).

Start options		
Timer	1	(1.Clock 2.Dec)
Join	2	(1-Yes 2.No)
Start at		
Date	05 / 10 / 01	(YY / MM / DD)
Time	06 : 00 : 00	(hh : mm : ss)

MENU
 OK
 Cancel

Figura 20. Selección del temporizador, fecha y hora de inicio del programa.

Temporizador “TIMER” (selección de modo reloj “CLOCK MODE” o modo temporizador “TIMER MODE”)

1. **Clock (reloj):** Muestra la hora de inicio de cada uno de los pasos.
2. **Timer (temporizador):** Muestra el tiempo restante hasta el siguiente paso.

Comenzar a las... “START AT” (fecha de inicio deseada).

Primero, se muestra la hora y la fecha de cuando se abre la ventana. Ingrese la fecha y hora de inicio deseada.

Se muestra el programa deseado. Revise los valores de ajustes del programa y presione la tecla “MENU” para mostrar la ventana del menú. Seleccione comenzar “START”, y presione la tecla “ENTER” (Fig. 21).



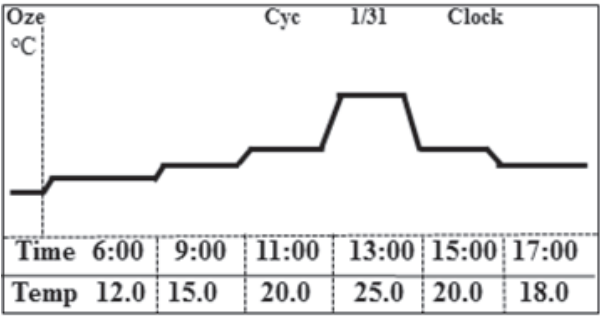


Figura 21. Selección del programa a iniciar.

El programa se inicia en la hora y fecha deseada. Durante el funcionamiento programado, se muestra la pantalla gráfica como la Fig. 22. Para cambiar la pantalla gráfica a la pantalla inicial, presione la tecla "MENU" para mostrar la ventana del menú. Seleccione "TOP" y presione la tecla "ENTER". Para cambiar a la pantalla gráfica, presione la tecla "MENU" para mostrar la ventana del menú. Seleccione "GRAPH" y presione la tecla "ENTER".

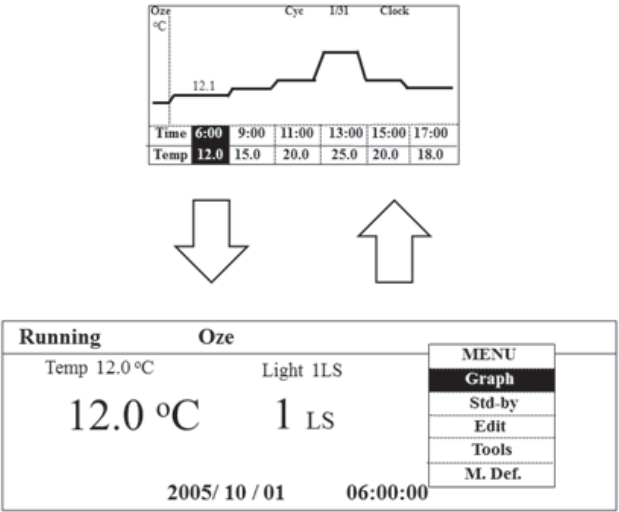


Figura 22. Cambio de pantalla gráfica a pantalla inicial y viceversa (Superior: pantalla gráfica; Inferior: pantalla inicial).



4. Detención del programa.

Durante el funcionamiento programado es posible detener el programa en cualquier momento.

Presione la tecla "MENU" para mostrar la ventana del menú y seleccione "GRAPH" cuando se muestra la ventana inicial. Después presione la tecla "ENTER".

Presione la tecla "MENU" bajo el programa que está funcionando y se abre la ventana del menú. Seleccione "STOP", y presione la tecla "ENTER" (Fig. 23).

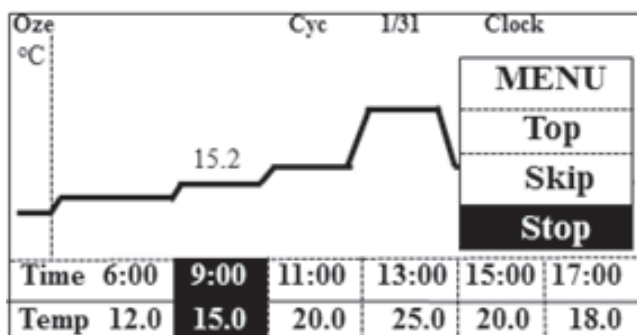


Figura 23. Detención del programa en funcionamiento.

Aparece la pantalla de confirmación de la detención del programa. Presione la tecla "MENU". Seleccione "OK" y presione la tecla "ENTER" para detener el programa (Fig. 24).





Figura 24. Pantalla de confirmación de la detención del programa.

Después de detener el programa, el equipo continúa funcionando bajo los parámetros de funcionamiento “en espera”.

E. Referencias bibliográficas

- CCI (2010). Cámaras para crías de insectos. Recuperado de <http://cci-calidad.blogspot.com/2010/03/camaras-para-cria-de-insectos.html>
- Panasonic (2012). Operating Intructions Versatile Environmental Test chamber. 60 p.



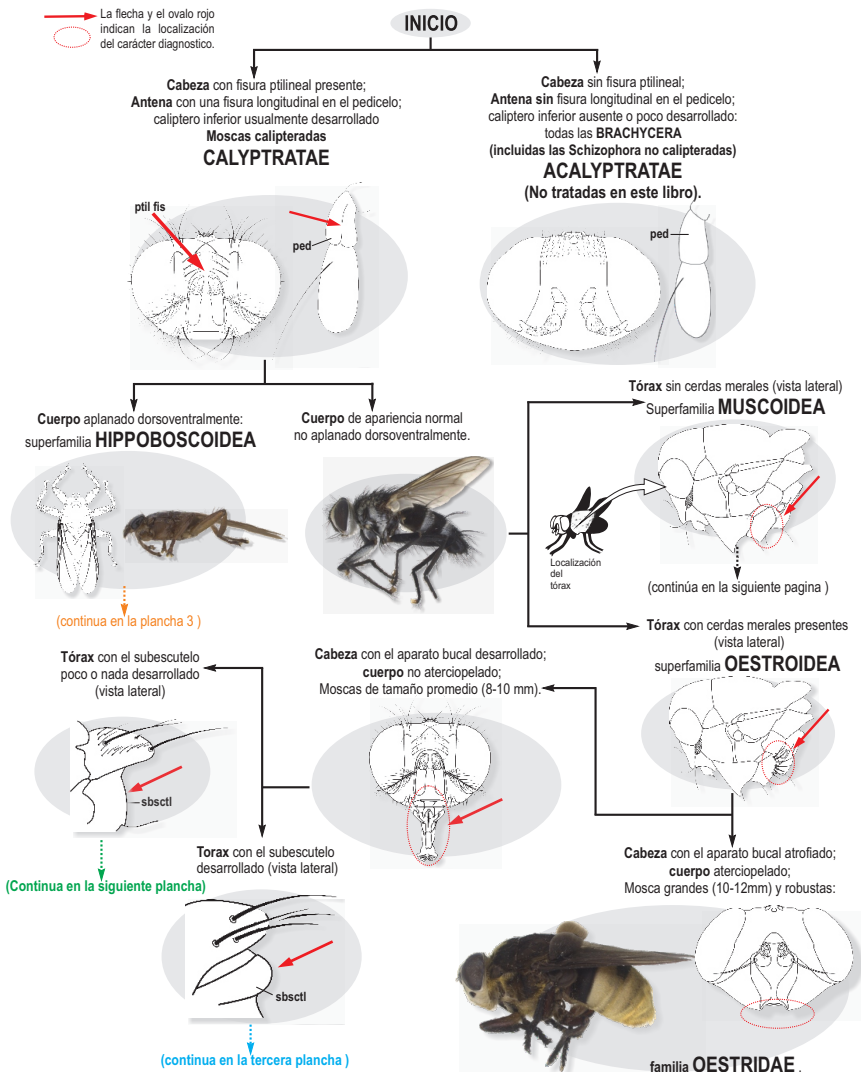
Anexos

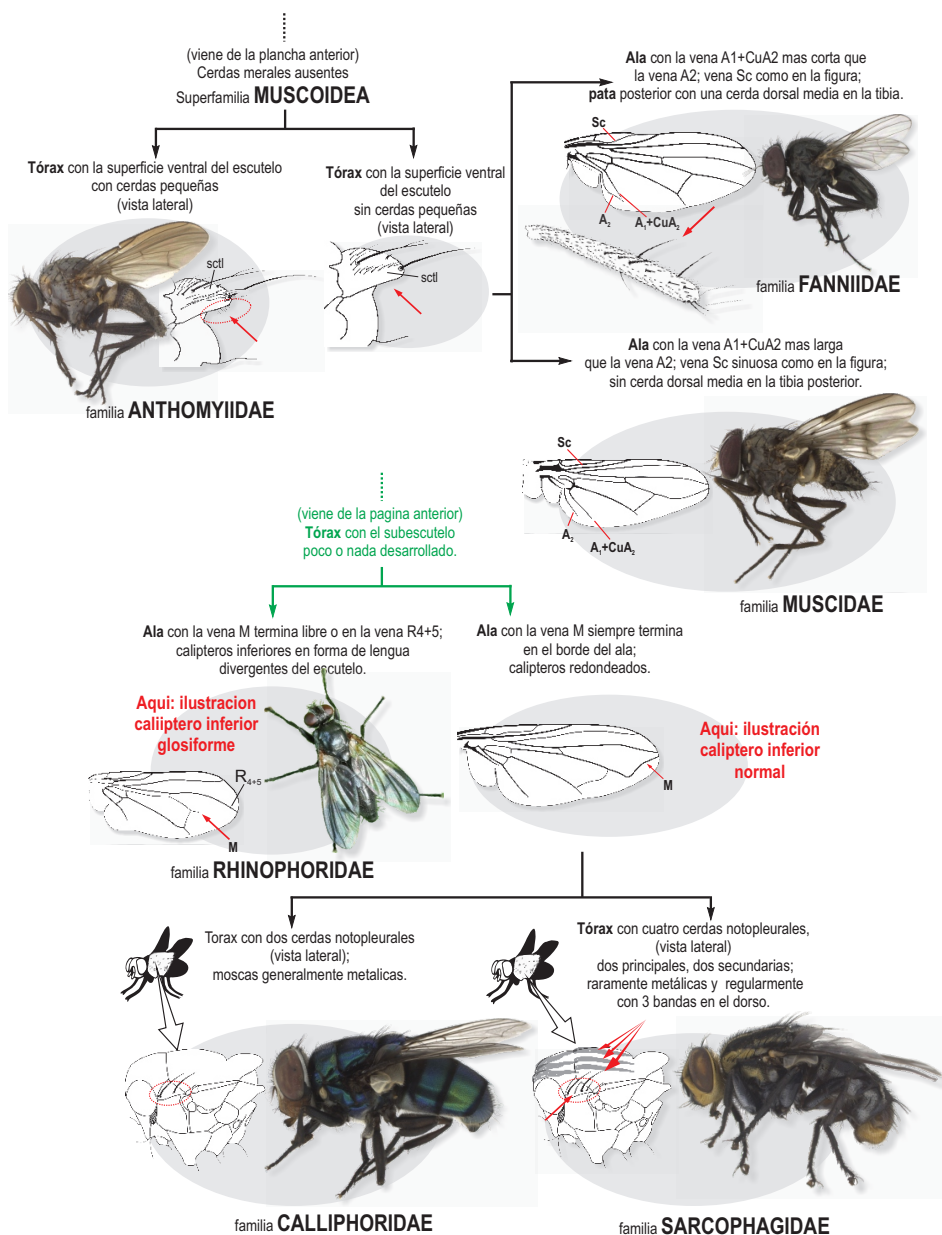


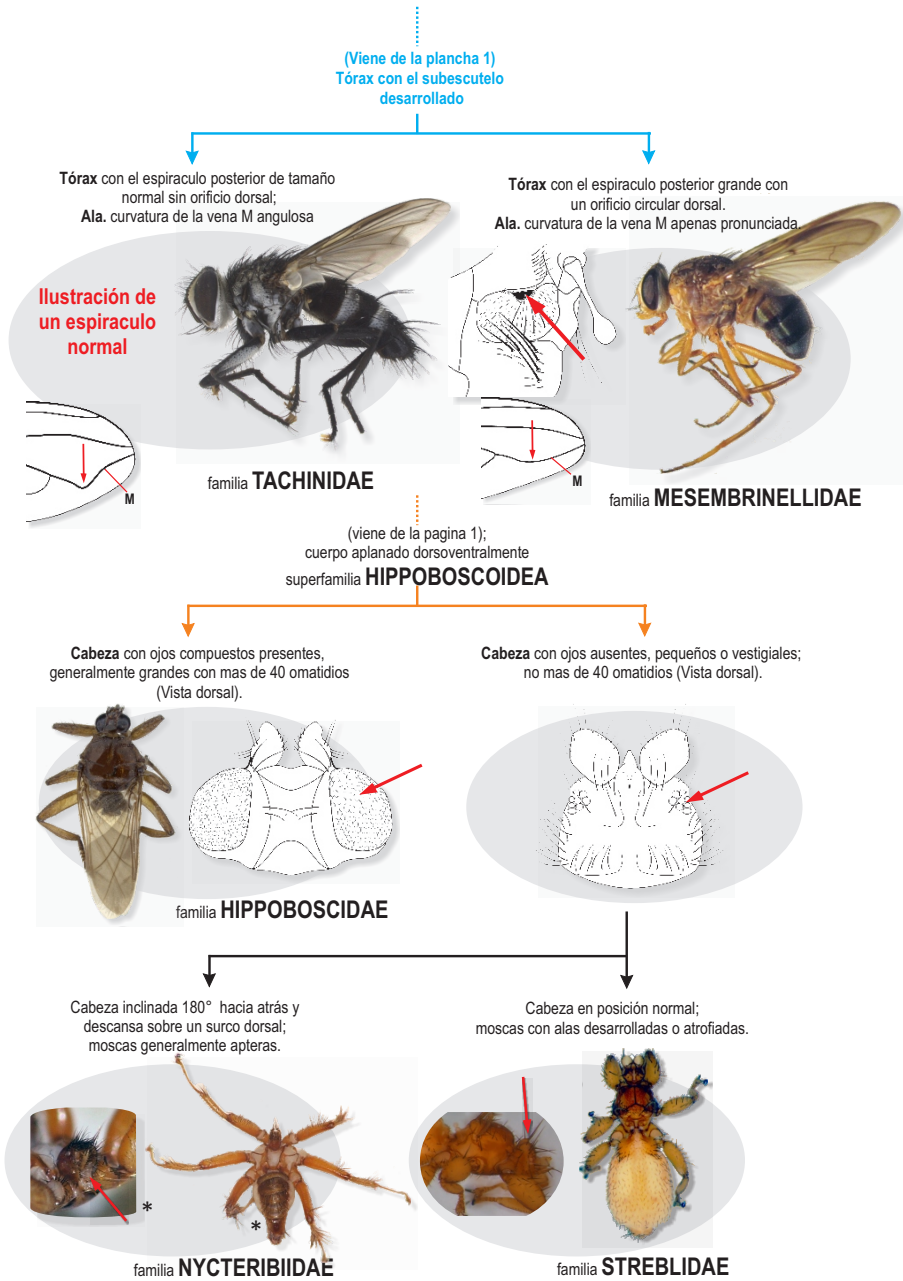
Clave ilustrada para la identificación de familias de moscas calípteras (Diptera, Calyptratae)

Eduardo Amat, Rodrigo Vieira y Manuel Ramírez-Mora.

→ La flecha y el ovalo rojo indican la localización del carácter diagnóstico.







*
Fotografía de RUI ANDRADE





Anexo 2

FORMATO PRÉSTAMO DE MATERIAL COLECCIÓN ENTOMOLÓGICA TECNOLÓGICO DE ANTIOQUIA - INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA

Fecha de préstamo:

Contenido: Número total de especímenes, tipo de montaje, familia y orden al que pertenecen.

Propósito: () Obsequio, () Canje, () Revisión taxonómica y estudios sistemáticos.

Fecha de devolución:

Institución – Individuo:

Autorizado en la CETdeA por:

Firma: _____

Nombre de quien solicita el préstamo:

Institución:

Dirección:

DETALLE DE LOS ESPECÍMENES (VER LISTA ANEXA)

TÉRMINOS: si se requiere una extensión del tiempo de préstamo, debe hacerse por medio de una carta con mínimo 30 días de anticipación al término del préstamo inicial. Ningún procedimiento destructivo o alteración de los especímenes pueden llevarse a cabo sin una debida autorización escrita del curador. Todas las partes de los especímenes deben ser devueltas a menos que el curador decida lo contrario. Cualquier daño o pérdida de un espécimen deben ser reportados. Los tipos deben ser devueltos un mes después de su préstamo. Los tipos deben ser enviados por correo certificado. Todo el material debe ser devuelto a la Colección Entomológica del Tecnológico de Antioquia, Medellín, Colombia.

Se autoriza la disección de los especímenes: Sí () - No ().

(firma) _____



Material recibido en buenas condiciones (DD-MM-AAAA): _____

Firma: _____

Nombre de quien solicita

Institución

Dirección

Retornar una copia a:

Colección Entomológica

Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria

Calle 78B N.º 72A - 220

Tel: (+574) 4547082

Medellín, Colombia.

Catálogo	Género	Especie	Departamento	Fecha	Determinó	Observaciones



Anexo 3

**FORMULARIO SOLICITUD DE MATERIAL
COLECCIÓN ENTOMOLÓGICA
TECNOLÓGICO DE ANTIOQUIA - INSTITUCIÓN UNIVERSITARIA**

Solicitud N.º _____

Este formulario debe ser completado, firmado y enviado al curador/ responsable de la colección: Colección Entomológica, Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria Calle 78B N.º 72A - 220 Tel: (+574) 4547082, **o una vez firmado y escaneado, puede ser enviado por correo electrónico a** Luz M. Gómez P.: lunamigopi@gmail.com

Solicitante

Curador o responsable de la institución solicitante del material.

Apellido y nombre: _____

Cargo: _____

Dirección postal: _____

Correo electrónico: _____

Para ser estudiado por:

Apellido y nombre: _____

Cargo: _____

Dirección postal: _____

Correo electrónico: _____

Teléfono / Fax: _____

MATERIAL SOLICITADO (Indicar especie o máxima identificación posible, localidad de procedencia y otros datos relevantes).



PROPÓSITO DE LA SOLICITUD (Tildar y completarse según corresponda)

- ☐ Solamente estudios morfológicos o anatómicos, sin acceso a material genético.
- ☐ Estudios de filogenia o taxonomía molecular utilizando secuencias genéticas.

Describir brevemente el tipo de estudio.

- ☐ Otros estudios genéticos, bioquímicos, físico-químicos, etc. Describir brevemente el tipo de estudio.

Al firmar la presente solicitud, el prestatario acepta las normas establecidas en el REGLAMENTO DE PRÉSTAMO de la Colección Entomológica, Tecnológico de Antioquia (CETdeA).

Se firma en conformidad:

Fecha _____

SOLICITANTE (Curador o responsable de la institución solicitante del material)

Firma: _____

Nombre y apellido: _____

Institución: _____

Dirección: _____





Anexo 4

COLECCIÓN ENTOMOLÓGICA TECNOLÓGICO DE ANTIOQUIA (CETDEA)

REGLAMENTO DE PRÉSTAMO: PROCEDIMIENTO PARA APROBACIÓN DE NUEVOS PRÉSTAMOS

La aprobación de un nuevo préstamo será dada por el encargado de la colección y el director/a del grupo. La aprobación está sujeta a las consideraciones expuestas a continuación.

Afiliación institucional

El solicitante debe tener una afiliación con algún museo o colección reconocidos o algún centro de investigación o universidad. Bajo ninguna circunstancia el préstamo será enviado a una dirección personal.

Préstamo a estudiantes

No se hacen préstamos directamente a estudiantes. La solicitud debe ser diligenciada por el director de la investigación, el cual será el responsable por el buen cuidado y retorno de los especímenes.

Duración del préstamo

El préstamo del material a investigadores o instituciones se realizará por un período inicial de seis (6) meses desde la fecha de recepción de los especímenes. Cuando se trate de ejemplares tipo, el período se reducirá a tres (3) meses.

La renovación del préstamo del material es permitida. Esta solicitud debe hacerse por escrito mínimo un mes antes de la fecha de vencimiento.



Cambios de dirección

Es responsabilidad del solicitante informar al encargado de la CETdeA cualquier cambio de dirección. Los especímenes prestados no deben ser movidos a una nueva colección o ubicación sin el permiso para la transferencia por parte del encargado de la CETdeA.

Transferencia de préstamos

Los especímenes prestados no se deben ser prestados secundariamente o transferidos para el cuidado de otros investigadores sin la autorización escrita para su transferencia por parte del encargado de la CETdeA.

Disecciones y extracciones de ADN

No se permite la destrucción total de los especímenes. Se permite la disección de los especímenes para investigaciones morfológicas, monografías o revisiones; sin embargo, es preferible usar material duplicado cuando sea posible. Las estructuras extraídas deben ser almacenadas en microviales, montadas en placas permanentes justo con el resto del espécimen. Los microviales deben estar con el individuo disectado y los montajes en placas deben llevar el mismo rótulo del espécimen disectado. Si las estructuras extraídas son para estudios con microscopía electrónica, estas requieren autorización escrita por parte del encargado de la CETdeA. Si el material solicitado es para realizar estudios moleculares, es necesario contar con la autorización escrita por parte del encargado de la CETdeA.

Retención de especímenes

Todo el material enviado en calidad de préstamo debe ser devuelto, salvo que se haya acordado previamente con el encargado de la CETdeA la retención de algunos especímenes.

Formato de préstamo

El formato de préstamo debe ser firmado y devuelto con prontitud a la recepción de las muestras. Cualquier daño durante el transporte se debe detallar en el formulario en el momento de su recepción. Al firmar el formato de préstamo, el prestatario se compromete a respetar y cumplir las normas establecidas aquí.

Préstamo a visitantes

Los visitantes pueden llevar a mano en calidad de préstamo los especímenes seleccionados durante su visita; sin embargo, se debe



proporcionar toda la información al personal ser aprobado el préstamo antes de que los especímenes dejen la colección. Cada visitante debe colocar un marcador en el exterior (en el interior en su caso) de cada bandeja de la que se eliminan las muestras, con el fin de permitir que el personal de la colección coloque los especímenes devueltos.

Devolución y envío de los especímenes

Se alienta a los prestatarios para devolver las muestras tan pronto como sea posible después de la finalización del proyecto. Los ejemplares deben ser devueltos separados por especie y debidamente rotulados. La determinación de cada espécimen no debe estar acompañada por ningún otro tipo de identificación o código personal.

Los especímenes prestados deben remitirse en las cajas originales en las cuales se hizo el envío. Deben embalsarse y enviarse adecuadamente para asegurar su retorno. Los frascos o preparados microscópicos deben embalsarse de forma separada del material montado en alfileres. Los ejemplares grandes y los viales que contengan genitales deben asegurarse apropiadamente con alfileres entomológicos. Un mínimo de 5 cm de embalaje debe rodear la caja que contiene los especímenes a devolver. Se debe colocar una etiqueta de envío en la caja en la que resalte que el material se está devolviendo. Al interior de la caja debe llevar copia del formato de préstamo indicando que el material se está devolviendo. El exterior de la caja debe estar claramente marcado: "Fragil – Insectos muertos de Investigación Científica – Sin valor comercial". Emplear exclusivamente el correo oficial para la devolución del material (NO transportadores privados).

Publicación de resultados

El prestatario debe agradecer el préstamo en cualquier artículo basado total o parcialmente en el estudio del material prestado, y enviar una copia de las publicaciones a la CETdeA. Los investigadores que designan material tipo de los especímenes de la CETdeA, deben solicitar el número de catálogo al encargado de la CETdeA.



Anexo 5

FICHA DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS Grupo de Investigación en Ciencias Forenses y de la Salud

Fecha:	Ficha #
Nombre del proyecto:	
Nombre de los participantes:	
Hora de inicio de trabajo:	Hora final de trabajo:
Método de extracción:	
Tipo de muestra usada para la extracción y cantidad:	
Tiempo de preservación de las muestras:	
Volumen de resuspensión de ADN y medio de preservación:	
Número de alícuotas y volumen por alícuota:	
Ubicación de las alícuotas:	

VERIFICACIÓN DE LA CALIDAD DEL ADN EXTRAÍDO: GEL DE EXTRACCIÓN

Pozo	Código de la muestra
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	

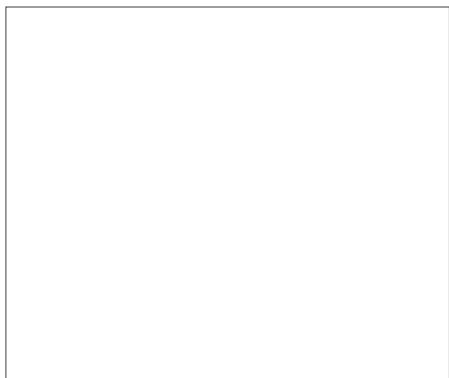


Foto gel de agarosa al __%, __ voltios, __ minutos

Tipo de buffer de carga: _____

Volumen de buffer de carga por muestra: __ul

Volumen de ADN por muestra: __ul





Formato de PCR y electroforesis- Termociclador Piko, ThermoScientific

Plato #: _____
Marcador molecular: _____

Marcador molecular: _____

Primers: _____

Primers: _____

Usuario: _____
Fecha de la electroforesis: _____

Fecha de la electroforesis: _____

Número de muestras: _____

Foto gel de agarosa al __%, __ voltios, __ minutos

Reacción de PCR

Componente	C1	C2	1X	__X
Taq Buffer				
dNTPs Mix				
Forward Primer				
Reverse Primer				
MgCl ₂				
Taq DNA pol				
Agua MQ				
DNA				
Volumen total				

Posición de muestras en plato

A B C D E F G H I J K L M N O P

Notas

A diagram showing a rectangular arrangement of circles. There are 6 rows and 10 columns of circles. The rows are labeled 1 through 6 at the bottom, starting from the bottom row as 1 and going up to 6.

Programa de PCR		t (seg.)
Paso	T (°C)	
Precalentamiento		
Desnaturalización		
Hibridación		
Extensión		
Extensión final		

Nro de ciclos: _____



Guia Aérea Internacional FedEx

[illegible]

Anexo 8

Factura FedEx

PROFORMA INVOICE 0002

INTERNATIONAL AIR WAYBILL NO.		8042-6009-8144							
DATE OF EXPORTATION				EXPORT REFERENCES					
SHIPPER/EXPORTER Luz Miryam Gómez Piñerez				CONSIGNEE					
Grupo de investigación en Ciencias Forenses y de la Salud									
Tecnológico de Antioquia				Tel:					
Calle 78 B # 72A-220									
Medellín - Antioquia									
COUNTRY OF EXPORT co				IMPORTER-IF OTHER THAN CONSIGNEE					
COUNTRY OF MANUFACTURE CO									
COUNTRY OF ULTIMATE DESTINATION Korea									
MARKS/NOS	NO OF PKGS	TYPE OF PACKIN G	FULL DESCRIPTION OF GOODS	QTY	UNIT OF MEASURE	WEIGHT Unit	UNIT VALUE USD	TOTAL VALUE	
1	1	rack	DNA samples	1	gr	100	1	1	
						Total Weight	Total Amount		
						100	USD 1		

FOR U.S. EXPORT ONLY: THESE COMMODITIES, TECHNOLOGY, OR SOFTWARE WERE EXPORTED FROM THE UNITED STATES IN ACCORDANCE WITH THE EXPORT ADMINISTRATION REGULATIONS. DIVERSION CONTRARY TO UNITED STATES LAW IS PROHIBITED.

I DECLARE ALL THE INFORMATION CONTAINED IN THIS INVOICE TO BE TRUE AND CORRECT.

SIGNATURE OF SHIPPER/EXPORTER (type name and title and sign)

DATE

Luz Miryam Gómez Piñerez



Anexo 9

Ejemplo de carta para FedEx

Medellín, XX de XX de XX

Señores
FEDEX
Ciudad

Asunto: Declaración de contenido de paquete

Cordial saludo,

Mediante la presente me permito declarar que el paquete para ser enviado a la empresa MACROGEN (Corea del Sur), contiene fragmentos de ADN de genes mitocondriales, provenientes de moscas colectadas en campo. Estos fragmentos fueron obtenidos por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las copias de fragmentos de ADN contenidas en estos tubos son inertes, por lo que no representan riesgo infeccioso ni contagioso para el personal en tierra y en aire que esté relacionado con su logística y transporte.

Estimamos que el material que se envía representa un valor equivalente a UN DÓLAR (USD \$ 1). Esperamos poder contar con su colaboración para el envío satisfactorio de estas muestras.

Atentamente,

Persona responsable del envío
Institución
Dirección
Teléfonos de contacto



Tipografía: Corbel

Materiales: bond de 75 gramos alta blancura, propalcote 300 gramos

Tecnológico de Antioquia - Institución Universitaria

Facultad de Derecho y Ciencias Forenses

PBX: (+57 4) 444 3700 ext.

correo@tdea.edu.co

Campus Universitario, calle 78B 72A-220

Medellín, Colombia, Suramérica

2018

Este libro se terminó de imprimir
en los talleres de Divegráficas
en el mes de noviembre de 2018



Tecnológico
de Antioquia
Institución Universitaria
VIGILADA MINEDUCACIÓN



GICFS
Grupo de Investigación
Ciencias Forenses y Salud

