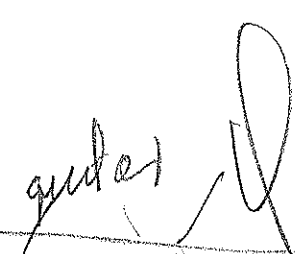


INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION
"SALVADOR ZUBIRAN"

PROYECTO

NORMAS Y PROCEDIMIENTOS QUE REGIRAN LAS
ACTIVIDADES EN EL LABORATORIO DE
INVESTIGACION DEL DEPARTAMENTO DE
GASTROENTEROLOGIA, INNSZ.


QUE PRESENTA LA DRA. MA. DE LOURDES RODRIGUEZ FRAGOSO
A CONSIDERACION Y APROBACION, DEL JEFE DEL DEPARTAMENTO
DE GASTROENTEROLOGIA.

ABRIL DE 1995.

I N D I C E

CAPITULO I

CONSIDERADOS.....	3
DISPOSICIONES GENERALES.....	5

CAPITULO II

DEL PERSONAL DEL LABORATORIO DE INVESTIGACION.....	7
--	---

CAPITULO III

DEL USO DE MANEJO DE MATERIAL RADIOACTIVO.....	14
--	----

CAPITULO IV

DEL USO Y MANEJO DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	17
---	----

CAPITULO V

DEL USO Y MANEJO DE SOLVENTES QUÍMICOS.....	21
---	----

CAPITULO VI

DE LOS PROYECTOS DE INVESTIGACION.....	24
--	----

ARTICULOS TRANSITORIOS

ACUERDOS POR LOS QUE SE ESTABLECEN LAS NORMAS Y PROCEDIMIENTOS QUE REGIRAN LAS ACTIVIDADES DEL LABORATORIO DE INVESTIGACION DEL DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGIA, INNSZ.

CONSIDERANDO.

PRIMERO.- Conforme a lo previsto en los reglamentos internos de las Universidades y la Coordinación de Enseñanza del INNSZ, la incorporación de estudiantes de pregrado y posgrado a grupos de trabajo en laboratorios de investigación del INNSZ requiere de normas que regulen la selección y desempeño de éstos.

SEGUNDO.- Que conforme a lo previsto por la Comisión Nacional de Seguridad Nuclear y Salvaguardias (CNSNS) y al Reglamento Interno del INNSZ, el manejo de material radiactivo, requiere de normas eficaces para mantener un mejor control del manejo del material radiactivo, así como de los desechos , para aumentar o garantizar la Seguridad Radiológica del personal ocupacionalmente expuesto, que trabaja en el Laboratorio de Investigación.

TERCERO.- Que conforme a lo previsto en el Acuerdo del Secretario de Salud acerca de las Comisiones de Investigación y de Etica en Establecimientos Médicos, y a la Subdirección General de Investigación del INNSZ, se requiere de normas que regulen el uso, manejo y desecho de material biológico por parte del personal.

CUARTO.-Que conforme a lo previsto por el Comité de Investigación Biomédica y por el Comité de Investigaciones en Animales del INNSZ, se requiere del lineamientos para el uso y manejo de animales en proyectos de investigación.

QUINTO.- Que como complemento de la normatividad, expedida por el INNSZ, para regular las actividades de los laboratorios de investigación es necesario contar con un manual de Normas y Procedimientos específicos para el laboratorio investigación del Departamento de Gastroenterología del INNSZ.

Por lo antes expuesto el Departamento de Gastroenterología, tiene a bien expedir el siguiente:

ACUERDO

Por el que se establecen las Normas y Procedimientos que regirán las actividades del personal adscrito al mencionado laboratorio, para el desarrollo de trabajos de Investigación Básica y Clínica.

CAPITULO I

DISPOSICIONES GENERALES

ARTICULO PRIMERO. Las presentes Normas y Procedimientos regularán las actividades del personal adscrito al Laboratorio de Investigación del Departamento de Gastroenterología.- INNSZ.

ARTICULO SEGUNDO. Para efectos administrativos de las presentes Normas y Procedimientos, se entenderá por:

- a) Estudiantes. Todo aquel personal en etapa de formación académica inscrito a cualquier Universidad, que se encuentre realizando estudios de Pregrado, Posgrado y Especialidad, en el INNSZ.
- b) Personal del Laboratorio. Todo aquel personal que perciba salario o remuneración económica en el INNSZ, asignado al laboratorio temporal o permanentemente (personal de intendencia, administrativo o de investigación).
- c) Personal ocupacionalmente expuesto. Toda persona que estando trabajando en protocolos de investigación, requiera para el desarrollo de los mismos, el uso de material radiactivo, químico o biológico potencialmente peligroso.
- d) Material Biológico. Todo aquel material que proceda o sea obtenido de algún componente biológico de seres humanos (cualquier líquido corporal, tejido o células), de algún animal de experimentación, bacteriológico o viral.
- e) Protocolo de Investigación. Todo aquel diseño experimental que tenga como objetivo contribuir al conocimiento del proceso Salud-Enfermedad y que aporte datos sobre nuevas estrategias para el tratamiento de procesos patológicos del hombre.

f) Jefe del Laboratorio. Investigador Titular que ha sido designado por el Jefe del Departamento como responsable del laboratorio de investigación.

ARTICULO TERCERO.- El Investigador en el ámbito de sus correspondientes funciones, queda facultado para supervisar el cumplimiento y ejecución de las presentes Normas y Procedimientos. Asimismo, para interpretarlas para efectos administrativos, en este último caso si fuera necesario, oyendo la opinión del Jefe del Departamento de Gastroenterología.

CAPITULO II

DEL PERSONAL DEL LABORATORIO DE INVESTIGACION

I. PERSONAL EN FORMACION ACADEMICA

ARTICULO CUARTO.- Cualquier estudiante de Institutos Superiores (UNAM, IPN, CINVESTAV, etc.) podrá solicitar su incorporación al laboratorio de investigación al Jefe del Laboratorio y/o al Jefe del Departamento.

ARTICULO QUINTO.- Se aceptarán estudiantes para incorporarse al laboratorio de investigación de acuerdo a los siguientes rubros:

a) Dependiendo de la disponibilidad de recursos y espacio físico en el laboratorio.

b) Estudiantes de Licenciatura que quieran realizar Servicio social: el tiempo de la estancia en el laboratorio deberá ser de 6 a 12 meses, dependiendo de los Reglamentos de la Universidad de adscripción. Sin embargo, el tiempo diario que deberá permanecer en el laboratorio será de 4 horas como mínimo, y el horario quedará fijado de común acuerdo con el Jefe del Laboratorio. Esto asegurará , que durante este tiempo aprenderá técnicas básicas del laboratorio y pueda aportar un servicio al Instituto.

c) Estudiantes de Licenciatura que esten realizando tesis: podrán realizar trabajo experimental para la obtención de su título, en un período mínimo de 8 meses y máximo de un año. Para lo cual se le pedirá una permanencia semanal mínima de 30 horas en el laboratorio, para que logre cumplir todos los objetivos propuestos en su tesis.

d) Estudiantes de Posgrado que este realizando el trabajo experimental para su tesis de grado deberá estar de tiempo completo en el laboratorio, para que termine en un período de tiempo razonable (2 años para Maestría y 3-4 años para Doctorado).

e) Es deseable que los estudiantes consigan apoyo económico a través de las Universidades a Instituciones como el CONACYT, debido a que ni el Departamento ni el Instituto cuentan con recursos para otorgar becas.

ARTICULO SEXTO.- Los estudiantes que se incorporen al trabajo del laboratorio deberán:

a) Tener como asesor de tesis al Jefe del Laboratorio o a un Investigdor adscrito al mismo.

b) Participar únicamente en los protocolos que se estén desarrollando en el mismo.

c) Al finalizar su estancia y/o tesis deberá dar los créditos correspondientes al Departamento e Instituto.

OBLIGACIONES DEL PERSONAL EN FORMACION ACADEMICA.

ARTICULO SEPTIMO.- Todo estudiante que se encuentre realizando alguna actividad en el laboratorio tendrá la obligación de:

a) Cuidar y mantener en perfectas condiciones todo el equipo e infraestructura del mismo.

b) Optimazar todos los recursos materiales con que se cuente, para garantizar que contarán con el apoyo para la terminación de su grado académico.

c) En el caso de que utilice material y soluciones de uso común deberá de prepararlas, si éste las terminó.

d) Reportar cualquier desperfecto del equipo al Jefe del laboratorio o al personal adscrito al mismo.

e) Mantener una conducta adecuada y respeto hacia el personal del laboratorio, así como al resto del personal del Departamento e Instituto.

ARTICULO OCTAVO.- Todo estudiante que se encuentre realizando alguna actividad tendrá la obligación de participar en actividades académicas, dentro y fuera del Instituto. Las actividades serán asignadas por el Jefe del laboratorio y podrán incluir:

a) Asistencia a cursos especiales.

b) Participación en seminarios periódicos del Laboratorio.

c) Asistencia a sesiones del Departamento y sesiones generales del Instituto.

d) Asistencia a congresos o reuniones científicas.

ARTICULO NOVENO.- Los estudiantes tendrán estrictamente prohibido prestar equipo y reactivos del laboratorio, sin previa autorización del Jefe del laboratorio o personal adscrito a él.

ARTICULO DECIMO.- El estudiante que contravenga las Normas del laboratorio, dependiendo de la falta será amonestado.

a) Verbalmente y en privado por el Jefe del Laboratorio.

b) Verbalmente y en público por el Jefe del Laboratorio.

c) Suspendido temporalmente de sus actividades en el Laboratorio.

d) Será dado de baja ante la Coordinación de Enseñanza del INNSZ y , por lo tanto causará suspensión definitiva del laboratorio.

DE LOS DERECHOS DE LOS ESTUDIANTES.

ARTICULO DECIMO PRIMERO.- El Jefe del Laboratorio y el personal de investigación deberá de apoyar al estudiante con los recursos materiales para que pueda terminar su trabajo experimental y obtenga el grado académico.

ARTICULO DECIMO SEGUNDO.- El Jefe del Departamento apoyará con la autorización del trámite para la obtención de la credencial que lo acredite como estudiante adscrito al Instituto, y pueda hacer uso del servicio de biblioteca y comedor.

ARTICULO DECIMO TERCERO.- Los estudiantes adscritos al laboratorio podrán hacer uso del equipo e infraestructura disponible, que requiera para su trabajo de investigación.

ARTICULO DECIMO CUARTO.- Los estudiantes recibirán los créditos de su trabajo de las presentaciones a congresos y publicaciones a que diera lugar su investigación.

ARTICULO DECIMO QUINTO.- Los asesores de tesis adscritos al laboratorio tendrán la obligación de supervisar y asesorar, académica y administrativamente, el trabajo de sus estudiantes para que terminen exitosamente su grado académico.

ARTICULO DECIMO SEXTO.- De contar el Departamento y el laboratorio con recursos económicos, los estudiantes serán apoyados para que asistan a Congresos, siempre y cuando sus trabajos sean enviados a dichos eventos.

II PERSONAL ADSCRITO AL INSTITUTO.

ARTICULO DECIMO SEPTIMO.- El personal adscrito con categorías de ayudante de investigador y de investigador asociado deberá apoyar al jefe del laboratorio en los protocolos que este último indique, y dependiendo de su involucración en el proyecto recibirá los créditos correspondientes de las presentaciones orales y publicaciones escritas a que diera lugar.

ARTICULO DECIMO OCTAVO.- Los ayudantes de investigador o investigadores asociados deberán de preparar su propio material y soluciones para el desarrollo de su trabajo experimental.

ARTICULO DECIMO NOVENO.- Los investigadores asociados adscritos al laboratorio podrán realizar proyecto de investigación independientes, dentro de la línea del laboratorio. Sin embargo, deberán obtener recursos propios por donativos.

ARTICULO DECIMO VIGESIMO.- Al personal adscrito con las categorías de ayudante de investigador o investigador asociado, se les evaluará su trabajo y desempeño en el laboratorio y, dependiendo de esto, recibirá los siguientes estímulos:

- a) Las facilidades para que pueda incorporarse a algún programa de posgrado, y pueda mejorar curricularmente.
- b) Facilidades para que asista a cursos de capacitación.
- c) Facilidades para que asista a congresos y/o reuniones científicas.
- d) En el caso de que tenga el grado de M. en C. o este inscrito en algún programa de Doctorado, podrá fungir como asesor de un estudiante de Licenciatura, siempre y cuando:

- 1.- Realice la supervisión del trabajo experimental del estudiante.
- 2.- Tenga la categoría de investigador asociado, por la Coordinación de los Institutos de Salud.
- 3.- Que la tesis del estudiante este relacionada con su protocolo de investigación.

e) Recibirá los créditos como asesor del estudiante

ARTICULO VIGESIMO PRIMERO.- En relación al personal de intendencia, la persona asignada al laboratorio deberá:

- a) Tener las nociones sobre el lavado y manejo del material del laboratorio, de acuerdo a las áreas de trabajo.
- b) Tener las nociones mínimas sobre el manejo de material radiactivo, químico y biológico.
- c) Apoyar tanto al personal del laboratorio como a los estudiantes en el manejo y preparación del material, para lograr un máximo aprovechamiento de las actividades en el laboratorio.

ARTICULO VIGESIMO SEGUNDO.- El personal administrativo (secretarial) asignado al laboratorio, deberá:

- a) Apoyar al Jefe del laboratorio en todas las actividades administrativas a que diera lugar el trabajo dentro del mismo (redacción de memorandums, requisiciones, cartas, resúmenes, artículos, etc.)
- b) Apoyar al personal de investigación y de posgrado en trámites administrativos necesarios.

ARTICULO VIGESIMO TERCERO.- Todo personal del laboratorio que se encuentre realizando alguna actividad de investigación tendrá la obligación de:

- a) Cuidar y mantener en perfectas condiciones todo el equipo e infraestructura del mismo.
- b) Optimizar todos los recursos materiales con que se cuente, para garantizar que contarán con el apoyo para la terminación de los proyectos de investigación.
- c) Reportar cualquier desperfecto del equipo al Jefe del laboratorio.
- d) Indicar al Jefe del laboratorio de posibles préstamos de equipo y/o reactivos a otros laboratorios.
- e) Mantener una conducta adecuada y respeto hacia el personal del laboratorio, así como al resto del personal del Departamento e Instituto.

ARTICULO VIGESIMO CUARTO.- Al personal de Laboratorio que contravenga las Normas y procedimientos que regirán las actividades del laboratorio, dependiendo de la magnitud de la falta serán sujetos a :

- a) Amonestación verbal y en privado, por el Jefe del laboratorio.
- b) Amonestación verbal y en público, por el Jefe del laboratorio.
- c) Será turnado al Jefe del Departamento de Gastroenterología o bien al Departamento de Personal respectivo

CAPITULO TERCERO

DEL USO Y MANEJO DE MATERIAL RADIATIVO

ARTICULO VIGESIMO QUINTO.- Se considera personal ocupacionalmente expuesto a radiactividad a aquel personal de investigación y de intendencia que por su trabajo se exponga a las fuentes o manipule el material y/o equipo contaminado con radioactividad.

ARTICULO VIGESIMO SEXTO.- Toda persona que haga uso del material radiactivo, sea estudiante o personal adscrito al Instituto, debera ser dado de alta en el Departamento de Medicina Nuclear, y solo podrá hacer uso de ese material si tiene permiso de la Comisión Nacional de Seguridad Nuclear y Salvaguardias (CNSNS) y de la Comisión de Seguridad Radiologica del INNSZ.

ARTICULO VIGESIMO SEPTIMO.- El material radiactivo será utilizado almacenado y desechado solamente en áreas restringidas en el laboratorio, siguiendo las medidas de seguridad establecidas en el manual de Seguridad Radiológica del INNSZ (uso de guantes, papel absorbente, contenedores, etiquetas de radioactividad, uso de mandil de plomo, etc.

ARTICULO VIGESIMO OCTAVO.- El Jefe del laboratorio designará el personal encargado de recoger y transportar los desechos radioactivos, de acuerdo al lugar establecido por la Comisión de Seguridad Radiológica del INNSZ.

ARTICULO VIGESIMO NOVENO .- El Jefe del laboratorio designará a una persona para que lleve un control de las entradas y salidas del material radiactivo, el cual deberá coincidir con aquel que lleve la Comisión de Seguridad Radiológica del INNSZ.

ARTICULO TRIGESIMO .- El personal ocupacionalmente expuesto deberá:

- a) Realizarse exámenes de laboratorio periódicos.
- b) Conocer las medidas a seguir en caso de accidente.
- c) Monitorear antes y después de trabajar la presencia de radiactividad.
- d) Reportar al Jefe del laboratorio la presencia de radioactividad en el lugar de trabajo y en otros sitios no asignado, así como cualquier accidente.

ARTICULO TRIGESIMO PRIMERO.- El personal que utilice material radioactivo que no siga los lineamientos y medidas de seguridad requeridos por la comisión Nacional de Seguridad Nuclear y Salvaguardias y la Comisión de Seguridad Radiológica del INNSZ, será acreedor a una Sanción la cual consistirá.

- a) En una amonestación verbal, por parte del Jefe del laboratorio.
- b) En una suspensión temporal del manejo de material radiactivo en el laboratorio.
- c) Turnado a la Comisión de Seguridad Radiológica del INNSZ, la cual estará facultada para pedir su baja temporal o definitiva ante la Comisión Nacional de Seguridad Nuclear y Salvaguardias (CNSNS).

ARTICULO TRIGESIMO SEGUNDO.- Quedará estrictamente prohibido para los trabajadores ocupacionalmente expuestos y personal adscrito al laboratorio:

- a) Ingerir y almacenar alimentos en las áreas de manejo de material radiactivo.
- b) Fumar o aplicarse cosméticos dentro del área de trabajo.

c) Usar la bata de trabajo para ir al comedor y salir a la calle, si estuvo trabajando con material contaminado.

d) Correr cerca de áreas de manejo de material radiactivo.

e) Transportar material radiactivo de un Departamento a otro, sin etiquetar y sin contenedores.

f) Transportar material radiactivo fuera del Instituto, sin causa justificada y previo consentimiento del Jefe del laboratorio.

CAPITULO IV

DEL USO Y MANEJO DE MATERIAL BIOLÓGICO

ARTICULO TRIGESIMO TERCERO.- Se considera personal ocupacionalmente expuesto a todo aquel personal de investigación e intendencia que por su trabajo se exponga a las fuentes y manipule material y/o equipo contaminado con material biológico potencialmente peligroso.

ARTICULO TRIGESIMO CUARTO.- Toda persona ocupacionalmente expuesta deberá conocer y llevar a cabo todas las medidas pertinentes para la prevención y control de la transmisión de enfermedades potencialmente infecciosas propias del hombre o de animales. Esto con la finalidad de conservar su salud y evitar accidentes de trabajo.

ARTICULO TRIGESIMO QUINTO.- Todo personal que esté vinculado con protocolos de investigación que impliquen el uso de material biológico deberá seguir las siguientes normas de seguridad para laboratorios de acuerdo a la Comisión de Seguridad e higiene de la Secretaría de Salud y del INNSZ.

a) Evitar el contacto de la piel con el material contaminado, así como con superficies, materiales y objetos expuestos a este material mediante el uso de bata y guantes.

b) No tocar la piel, u otras superficies corporales con guantes potencialmente infectantes.

c) No transportar muestras potencialmente contaminantes, sin guantes y sin etiquetar.

d) Lavarse las manos después de quitarse los guantes y la bata.

e) Emplear dispositivos mecánicos o perillas para aspiración de muestras biológicas. Nunca se deberá pipetear con la boca.

f) Descontaminar las superficies de trabajo de manera rutinaria, al inicio y al final de la jornada, empleando soluciones inactivantes.

g) No manipular las jeringas y agujas desechables sin guantes. Depositarlas inmediatamente después de ser utilizadas, en recipientes irrompibles que contengan alguna solución inactivante.

h) Emplear guantes de latex grueso para el lavado y descontaminación del material, equipo y de las áreas de trabajo. Desechar los guantes cuando presenten algún indicio de deterioro.

i) No desechar muestras biológicas sólidas en tarjas o botes de basura.

j) No almacenar comidas o bebidas en el mismo lugar donde hay material biológico.

k) No trabajar con material biológico si existe alguna herida en las manos.

ARTICULO TRIGESIMO SEXTO.- Toda persona adscrita al laboratorio que utilice material potencialmente contaminante, en sus protocolos de investigación, deberá recibir inmunizaciones de acuerdo a la procedencia del material biológico (ejem. vacuna contra la hepatitis).

ARTICULO TRIGESIMO SEPTIMO.- Toda persona que trabaje con muestras biológicas deberá conocer cuales son las medidas a seguir para desechar un material contaminado y el destino final del mismo:

a) Utilizar cualquiera de las siguientes soluciones inactivantes o desinfectantes: hipoclorito de sodio al 1% etanol al 70% formaldehído al 4%, glutaraldehído al 2%, peróxido de hidrógeno al 6%, o yoduro de polividona al 2.5%.

b) El material biológico deberá permanecer al menos durante dos horas en solución inactivante.

c) Desechar en la tarja solo el material que haya sido previamente inactivado.

d) Eliminar en contenedores especiales todo el material punzocortante para su eliminación posterior.

ARTICULO TRIGESIMO OCTAVO.- Todo resto de material biológico humano o de animales de experimentación deberá ser enviado al incinerador para su eliminación, en bolsas gruesas. Los métodos alternativos podrán ser el uso de autoclaves al 120°C o de agentes químicos inactivantes.

ARTICULO TRIGESIMO NOVENO.- En caso de que la persona sufra exposición de piel o mucosa al material contaminado deberá:

a) Si se trata de mucosas lavarla con abundante agua.

b) Si se trata de una herida, provocar su sangrado, sea por expresión o quirúrgicamente, y nunca por succión.

c) Realizar un lavado con agua y jabón.

d) Notificar al Jefe del laboratorio o al personal adscrito al Instituto, para que se tomen las medidas de atención a las que dé lugar, independientemente de la hora en que ocurrió el accidente.

ARTICULO CUADRAGESIMO.- El personal ocupacionalmente expuesto que no siga los lineamientos y medidas de seguridad adecuadamente, será acreedor a una sanción la cual consistirá:

a) En una amonestación verbal, por parte del Jefe del laboratorio.

- b) En una suspensión temporal del manejo de material biológico.
- c) Suspendido definitivamente de proyectos de investigación que impliquen el manejo de material biológico.

ARTICULO CRUADRAGESIMO PRIMERO.- Quedará estrictamente prohibido para el personal ocupacionalmente expuestos y al personal adscrito al laboratorio:

- a) Ingerir y almacenar alimentos en las áreas de manejo de material biológico.
- b) Fumar o aplicarse cosméticos dentro del área de trabajo.
- c) Usar la bata de trabajo para ir al comedor y salir a la calle, así estuvieron trabajando con material biológico potencialmente infectante.
- d) Usar objetos de uso común como teléfonos, apagadores de luz, perillas de puertas, manijas de agua etc., cuando se este trabajando con muestras biológicas infectantes.
- e) transportar material biológico de un Departamento a otro, sin etiquetar y sin contenedores.
- f) transportar material biológico fuera del Instituto, sin causa justificada y previo consentimiento del jefe del laboratorio.

CAPITULO V

DEL USO Y MANEJO DE REACTIVOS Y SOLVENTES QUIMICOS

ARTICULO CUADRAGESIMO SEGUNDO.- Se considerará personal ocupacionalmente expuesto a todo aquel personal de investigación que se exponga o manipule material químico potencialmente peligroso, ejem. agentes corrosivos, venenos, carcinógenos y mutágenos.

ARTICULO CUADRAGESIMO TERCERO .- Toda persona que se encuentre realizando alguna actividad en el laboratorio deberá tener las nociones mínimas en cuanto a tipo, propiedades y efectos tóxicos de los reactivos químicos y solventes, además de conocer los antidotos y medidas a seguir en caso de accidente.

ARTICULO CUADRAGESIMO CUARTO .- El asesor del estudiante indicará los reactivos y solventes que pueden poner en peligro la salud del estudiante, así como deberá indicar el lugar donde se deberá de trabajar.

ARTICULO CUADRAGESIMO QUINTO .- Todo el personal deberá leer la leyenda que presenta cada reactivo, para conocer el tipo de reacción adversa que puede presentar el manejo inadecuado del mismo.

ARTICULO CUADRAGESIMO SEXTO .- El Jefe del laboratorio asignará las áreas para almacenar reactivos y solventes para su mejor conservación, tomando en consideración sus propiedades químicas y físicas para evitar accidentes: refrigeración congelación, ultracongelación, oscuridad, etc.

ARTICULO CUADRAGESIMO SEPTIMO .- Todo solvente químico deberá tener un lugar bien establecido dentro del laboratorio, para evitar posibles rupturas, derrames, incendios y desastres dentro del mismo.

ARTICULO CUADRAGESIMO OCTAVO .- El Jefe del laboratorio designará la persona encargado para llevar el registro de los reactivos y solventes, para el control de los mismos.

ARTICULO CUADRAGESIMO NOVENO .- Todo reactivo que de acuerdo a sus propiedades y efectos tóxicos pueda poner en peligro la salud, deberá ser usado con guantes, cubrebocas, lentes de seguridad, perillas, mascarilla o dentro de campana de extracción, según corresponda.

ARTICULO QUINCUAGESIMO .- Todo el personal que se encuentre realizando alguna actividad de investigación tendrá la obligación de:

- a) Reportar cuando se termine algún reactivo.
- b) En caso de cambiar de frasco un reactivo, se deberá etiquetar correctamente el nuevo envase, así como indicará con una advertencia cuando se trate de material corrosivo o tóxico.
- c) En caso de preparar soluciones, deberá ser rotulado el frasco con una etiqueta que incluya: nombre de la persona que lo preparó, composición química, concentración y fecha.
- d) Hacer limpieza de balanzas, espátulas y magnetos.
- e) Limpiar la mesa donde prepare y maneje reactivos, así como su zona asignada de trabajo.
- f) Reportar derrames de solventes y ácidos.
- g) Conocer la ubicación del extinguidor y equipo para lavado de ojos.

ARTICULO QUINCUAGESIMO PRIMERO.- Quedará estrictamente prohibido encender mecheros, cerillos, cigarrillos u hornos cerca del lugar donde se encuentren ubicados los solventes.

ARTICULO QUINCAGESIMO SEGUNDO .- Para el desecho de soluciones, reactivos y solventes, todo el personal tendrá la obligación de indicar al personal de intendencia cual será el destino final de éste, e indicar cuales serán las medidas de seguridad que deberá seguir para evitar posibles quemaduras o daños contra su salud.

ARTICULO QUINCAGESIMO TERCERO .- El personal ocupacionalmente expuesto que no siga los lineamientos y medidas de seguridad adecuadamente, será acreedor a una sanción la cual consistirá:

- a) En una amonestación verbal, por parte del Jefe del laboratorio.
- b) En una suspensión temporal del manejo de reactivos y solventes.
- c) suspendido definitivamente de proyectos de investigación.

CAPITULO VI

DE LOS PROYECTOS DE INVESTIGACION

ARTICULO QUINCUAGESIMO CUARTO .- Todo proyecto que se realice en el laboratorio de investigación deberá estar registrado en la Subdirección de Investigación del INNSZ.

ARTICULO QUINCUAGESIMO QUINTO .- El Jefe del laboratorio será la única persona en el laboratorio que tendrá la facultad y autorización para enviar proyectos a los Comités del Instituto para su evaluación, previo Vo. Bo. del Jefe del Departamento.

ARTICULO QUINCUAGESIMO SEXTO - El Jefe del laboratorio tiene la responsabilidad de garantizar que el material biológico empleado en los proyectos de investigación no tenga un mal uso y de que se lleven a cabo todas las consideraciones éticas pertinentes.

ARTICULO QUINCUAGESIMO SEPTIMO .- El Jefe del laboratorio podrá hacer uso de animales de bioterio, siempre y cuando tenga el Vo.Bo. del Comité de Investigaciones en Animales (CINVA) del INNSZ. El Jefe del laboratorio esta comprometido a que los animales serán adquiridos, mantenidos y empleados de acuerdo a los manuales y guías de procedimientos de la Unidd de Investigación Experimental del INNSZ.

ARTICULO QUINCUAGESIMO OCTAVO - El jefe del laboratorio será responsable de la supervisión de los proyectos que se realicen en el laboratorio, así como deberá informar ante los Comités involucrados.

ARTICULO QUINCAGESIMO NOVENO .- El Jefe del laboratorio podrá incluir en los proyectos, a los estudiantes que esten trabajando en el laboratorio, como colaboradores, siempre y cuando el trabajo forme parte de sus tesis para obtener un grado académico o de su Servicio Social.

ARTICULO SEXAGESIMO .- El Jefe del laboratorio deberá recurrir, dentro de lo que le sea posible a la búsqueda de donativos externos para obtener recursos para terminar sus proyectos.

ARTICULO SEXAGESIMO PRIMERO .- En caso de donativo el Jefe del laboratorio será el responsable de la compra de equipo y/o material necesario, y contará con el apoyo administrativo por parte del INNSZ, y técnico por parte del Departamento.

ARTICULO SEXAGESIMO SEGUNDO.- El Jefe del laboratorio deberá presentar los resultados obtenidos en los proyectos en congresos y reuniones científicas y de enviarlos a publicación para su divulgación. Deberá otorgar créditos al laboratorio, Departamento, Instituto y a la fuente de los recursos económicos.

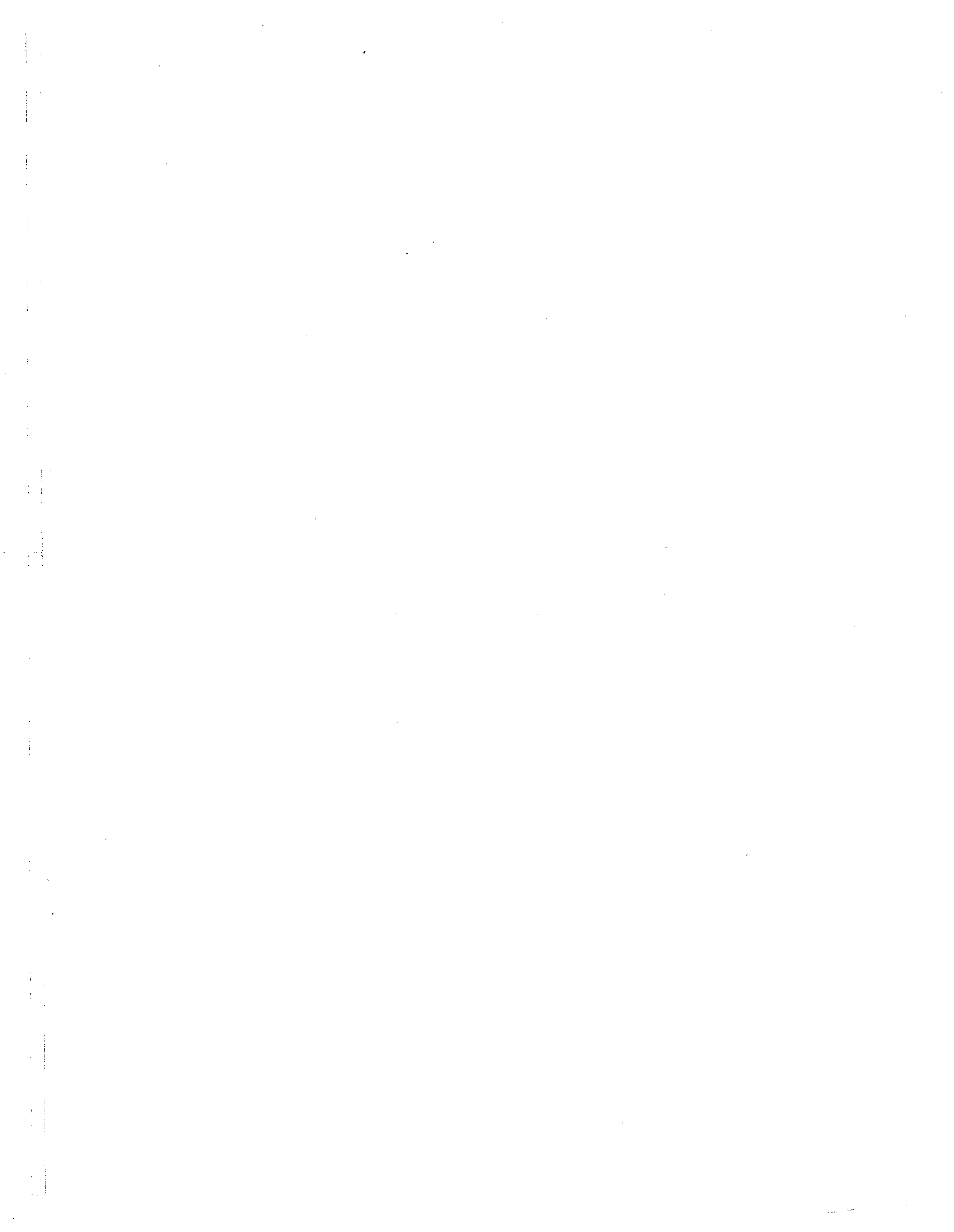
ARTICULO SEXAGESIMO TERCERO.- El Jefe del laboratorio podrá realizar proyectos de colaboración con otros Institutos de investigación, siempre y cuando haya un acuerdo en el aporte de recursos humanos y materiales para el desarrollo de los mismos, así como de los créditos.

ARTICULOS TRANSITORIOS.

PRIMERO .- Las presentes Normas entrarán en vigor a partir de la fecha de su expedición.

SEGUNDO.- De ser posible, podrá ser aplicado en otros laboratorios del Departamento.

SE EXTIENDE EN LA CIUDAD DE MEXICO, DISTRITO FEDERAL A LOS DOS DIAS DEL MES DE MARZO DE MIL NOVECIENTOS NOVENTA Y CINCO.



**INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION
SALVADOR ZUBIRAN.**

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DEL
LABORATORIO DE INVESTIGACION DEL
DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGIA**

DRA. LOURDES RODRIGUEZ FRAGOSO

ABRIL 1995

PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO DE INVESTIGACION

INTRODUCCION.....	1
CAPITULO I LAVADO Y PREPARACION DE MATERIAL.....	3
IV.-CAPITULO II TECNICAS RELACIONADAS CON LA PREPARACION DE MATERIAL BIOLÓGICO Y LA OBTENCION DE SU COMPONENTES CELULARES.....	10
A) HOMOGENADOS TISULARES.....	10
B) OBTENCION DE SUERO.....	11
C) OBTENCION DE CELULAS NUCLEARES.....	11
D) EXTRACCION DEL ADN DE CELULAS BLANCAS	12
E) EXTRACCION DEL ADN DE UNA MUESTRA DE TEJIDO.....	13
F) EXTRACCION DE ARN TOTAL	14
G) AISLAMIENTO DE MEMBRANAS CELULARES.....	16
CAPITULO III TECNICAS RELACIONADAS CON LA DETERMINACION DE COMPONENTES CELULARES HEPATICOS.....	18
A) DETERMINACION DE TRANSAMINASA GLUTAMICO PERUVICA	18
B) CUANTIFICACION DE PROTEINA TOTAL (METODO DE BRADFORD).....	20
C) DETERMINACION DE GLUCOSA-6-FOSFATASA.....	21
D) DETERMINACION DE GAMMA-GLUTAMIL- TRANSPEPTIDASA.....	22
E) DETERMINACION DE GLUCOGENO.....	23
F) DETERMINACION DE COLAGENA TOTAL.....	24
CAPITULO IV TECNICAS RELACIONADAS CON LA	

BIOLOGIA MOLECULAR..... 27

A) ELECTROFORESIS DE PROTEINAS	27
B) ELECTROFORESIS EN EL GEL DE AGAROSA 1%.....	28
C) ANALISIS DEL ADN POR LA TECNICA DE SOUTHERN-BLOTTING.....	30
D) ANALISIS DEL ARN POR LA TECNICA DE NORTHERN-BLOTTING.....	33
E) TECNICA DE PCR (REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA).....	39
F) AISLAMIENTO DE PLASMIDO A GRAN ESCALA.....	43

**VII.- CAPITULO V TECNICAS RELACIONADAS
CON EL CULTIVO DE TEJIDOS Y CELULAS..... 46**

A) HISTOCULTIVO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	46
B) CULTIVO Y ALMACENAMIENTO DE UNA LINEA CELULAR Y HUMANA.....	47
C) COLECCION DE EXTRACTOS CELULARES.....	48
D) ALMACENAMIENTO DE CELULAS.....	49
E) DETERMINACION DE VIABILIDAD CELULAR.....	50
F) TINCION DE CULTIVO CELULARES.....	50
G) PREPARACION DE ARN DE CELULAS EN CULTIVO.....	51

**VIII.- CAPITULO VI TECNICAS RELACIONADAS
CON EL ACTIVADOR DEL PLASMINOGENO..... 53**

A) EXTRACCION DE ACTIVADOR DE PLASMINOGENO DE TEJIDO.....	53
B) ANALISIS ELECTROFORETICO DEL ACTIVADOR DE PLASMINOGENO.....	54
C) ENSAYOS DE INVASION.....	55
D) PURIFICACION DE PLASMINOGENO HUMANO.....	57

INTRODUCCION

Para constituirse como una ciencia, la biología ha tenido que trabajar sobre su propio concepto de vida, defendiendo la independencia de sus métodos, tan distintos de aquellos de la física y química. En el presente, para proceder con el análisis de la estructura de los seres vivos, la biología ha tenido que recurrir a una estrecha cooperación con la física y química; tal grado de refinamiento se ha logrado que el resultado ha sido la aparición de la biología molecular.

La biología molecular, probablemente no intenta definir la naturaleza de los seres vivos, pero nos ilustra sobre sus partes constituyentes. Profundiza sobre la manera en la cual ella esta organizada y revela minuciosamente sus detalles, a nivel de células individuales, o mejor aún, de la estructura de las moléculas las cuales caracterizan la célula.

Desafortunadamente el hombre no puede observar los fenómenos que la rodean, sino dentro de límites muy restringidos; la mayor parte de aquellos escapa naturalmente a sus sentidos y la simple observación no le basta. Para extender sus conocimientos, ha debido aumentar la potencia de sus órganos con ayuda de aparatos especiales y a la vez se ha armado de diversos instrumentos que le han servido para penetrar en el interior de los cuerpos para descomponerlos y estudiar sus moléculas elementales. Hay por lo tanto que establecer una gradación necesaria entre los distintos procedimientos de investigación.

La investigación, ya sea simple, ya sea armada y perfeccionada, está pues destinada a hacernos descubrir y comprobar los fenómenos que nos rodean. Este es un nivel al cual uno puede tener solamente acceso por el empleo de todos los métodos y técnicas disponibles en el área de la bioquímica, física moderna, genética, fisiología, etc., y por supuesto de los recursos económicos para el desarrollo de las más sofisticadas técnicas de observación.

Conservar la salud y curar las enfermedades, tal es el problema que la Medicina ha plantado desde su origen y cuya solución científica aún pesigue. El estado actual de la investigación hace presumir que esta solución se hará esperar todavía largo tiempo. No obstante, la Medicina

experimental ha enfocado a tres áreas importantes la investigación: la fisiología, la patología y la terapéutica. El conocimiento de las causas de los fenómenos de la vida en el estado normal, es decir, la fisiología, nos enseña a mantener las condiciones normales de la vida y a conservar su salud. El conocimiento de las enfermedades y de las causas que las determinan, es decir, la patología, conduce por una parte, a prevenir el desarrollo de las condiciones mórbidas, y por otra a combatir sus efectos por los agentes medicamentosos, es decir a curar las enfermedades.

Así pues, es el interés del Departamento de Gastroenterología contar con un laboratorio de investigación que le permita lograr parte de algunos de esos objetivos de la medicina experimental, y contribuir en el conocimiento del proceso salud-enfermedad.

CAPITULO I. LAVADO Y PREPARACION DE MATERIAL.

El trabajo del laboratorio de investigación implica el uso tanto de técnicas sencillas como sofisticadas, para la cuantificación de un determinado componente biológico. La mayor parte de las técnicas empleadas en investigación implican el uso de micrométodos, de ahí que las cantidades que se empleen sean del orden de microlitros, microgramos, nanogramos, milimoles, nanomoles, etc. Esto por un lado economiza el uso de reactivos y reduce la cantidad de muestra biológica a emplear. Sin embargo, por otro lado esto implica que se debe tener un gran cuidado en la preparación del material del laboratorio durante el desarrollo de los protocolos de investigación. La presencia de restos de reactivos, muestras biológicas o radiactividad en el material del laboratorio a emplear serán causas de error en los resultados, y por lo tanto de tiempo y dinero.

Mucho del trabajo de investigación y los resultados que se obtengan de éste van a depender en gran medida del cuidado que se tenga al lavar, esterilizar y preparar material de cristalería, puntas para micropipetas, tubos eppendorf, etc. De ahí que este trabajo debe ser realizado por personal de intendencia que haya sido capacitado, previamente, en un laboratorio de investigación. Esto es, que conozca tanto el material como las técnicas de lavado y esterilización. El buen desempeño de éstas actividades en el laboratorio de investigación serán la clave del éxito del mismo.

MATERIAL DE USO FRECUENTE.

A) MATERIAL DE CRISTALERIA

- 1.- El agua de la tina se debe cambiar una vez por semana. Ya llena la tina se esparcen aproximadamente 3 puños de jabón sigmaclin.
- 2.- El material depositado es el que resulta del trabajo del día anterior. Así que al menos tiene más de medio día remojado.
- 3.- De acuerdo al tamaño del material se cepilla con un escobillón fuera de la tina varias veces con el mismo jabón.

4. Se enjuaga bien al chorro del agua. Después se enjuagan 2 veces más con agua destilada. (la espuma del jabón sigmaclin es muy persistente, por lo que la única forma de retirarlo es enjuagarlo muy bien).

5. Una vez enjuagado el material se coloca en los cestos de metal para posteriormente secarse en el horno. Ya seco se envuelve con papel aluminio, o se tapa según el caso y se pegan pedazos recortados de cinta testigo.

6. El material se esteriliza en la autoclave por 20 minutos a 15 lb. presión y se coloca en las gavetas.

7. El material grande como probetas y matraces aforados de 1 litro se colocan en una charola metálica. Se sujeta con cinta y se esteriliza en la central de equipos.

8. Los moldes pirex se lavan con el agua de la tina y un estropajo, se enjuagan bien y se dejan escurrir para después guardarse.

B) PIPETAS

Hay depósitos móviles y un bote de pipetas con agua y sigmaclin.

1. El agua de los depósitos se cambia cada semana, y la del bote dependiendo de la apariencia que tenga.

2. Las pipetas se retiran de los depósitos y se enjuagan al chorro del agua antes de meterse al bote de las pipetas.

3. En el recipiente de pipetas se dejan remojando un día o bien, depende de la cantidad de pipetas.

4. El día que se vayan a lavar se voltean un rato con las puntas hacia arriba y se lavan por agitación con el agua de jabón retenido.

5. Se enjuagan muy bien al chorro del agua. Y después dos veces con agua destilada.

6. Se escurren y se secan en el horno colocándose en los cestos con las puntas hacia arriba.
7. Ya secas, se envuelven en papel aluminio y se colocan en paquetes de 3 ó 4 pipetas del mismo volumen (5 ó 10 ml.).
8. Con un lápiz, pluma o marcador se les pone sobre la cinta testigo el número del volumen que contienen ya sea de 5 ó 10 ml.
9. Se esterilizan con el resto del material y se guardan.

C) MATERIAL CONTAMINADO CON MUESTRAS BIOLÓGICAS

1. La cubeta de agua tiene sigmaclín. El material se deja remojando por lo menos 1 día.
2. Se calienta el material en la cubeta y se deja de 5 a 10 minutos hirviendo.
3. Se deja enfriar un poco y se cepilla varias veces muy bien.
4. Se enjuaga varias veces al chorro del agua y dos con agua destilada.
5. El material se escurre y se seca al horno. En el caso de los tubos, una vez secos se colocan en su lugar. El resto del material como las cajas de cultivo se envuelven para esterilizarse.

D) CAJAS DE CULTIVO DE PLÁSTICO.

1. Las cajas con agar se esterilizan antes de darse a lavar.
2. Se le retira el agar y se dejan remojando.
3. Estas cajas no se hierven con el resto del material. Se lavan con agua no muy caliente y se tallan con el estropajo suavemente.

4. Se enjuagan de la manera acostumbrada y se dejan escurrir. (No se meten al horno).

5. Se envuelven en papel y a los paquetes se le coloca trozos cortados de cinta testigo verde (cinta testigo para gas) y se esterilizan con gas en la central de equipos.

E) TUBOS COREX Y MATERIAL CON FENOL.

1. La cubeta de agua tiene sigmaclin. El material se deja remojando por lo menos 1 día. (Pero habrá ocasiones que los tubos corex se necesiten el mismo día).

2. Se calienta el material en la cubeta y se deja de 5 a 10 minutos hirviendo (con el mismo jabón que ya tiene la cubeta).

3. Se deja enfriar un poco y se cepilla varias veces muy bien con el agua de jabón.

4. Se enjuaga varias veces al chorro del agua y dos con agua bidestilada.

5. El material se escurre y se seca al horno.

6. Los tubos corex se envuelven en papel aluminio en números pares (2,4,6) y deben ser del mismo tamaño.

7. Se esterilizan y se guarda.

F) PIPETAS DE FENOL

1. Se hierven unos minutos con el material de fenol y las puntas de las pipetas se voltean. De tal manera que quedan hacia arriba.

2. Se lavan con el mismo jabón a manera de agitación.

3. Se enjuagan muy bien al chorro del agua. Y después dos veces con agua destilada.

4. Se escurren y se secan en el horno colocándose en los cestos con las puntas hacia arriba.

5. Ya secas, se envuelven en papel aluminio y se colocan en paquetes de 4 ó 3 pipetas del mismo volúmen (5 ó 10 ml).

6. Con un lápiz, pluma o marcador se les pone sobre la cinta testigo el número del volúmen que contienen ya sea de 5 ó 10 ml.

G) FRASCO DE FENOL.

1. Se deja remojando y se hierve con el resto del material.

2. Se talla muy bien con el escobillón y se enjuaga.

3. Como el olor del fenol persiste mucho, tanto la tapadera como el frasco se dejan nuevamente en la cubeta del material de fenol con agua y sigmaclin limpios por otras dos veces más. De manera que se lavan por lo menos tres veces.

4. Después de la tercera vez se seca en el horno y se esteriliza.

H) TUBOS EPPENDORF Y PUNTAS DE MICROPIPETA.

1. Los tubos se colocan en un recipiente para tubos y puntas con agua y sigmaclin.

2. Antes de lavarse se tira esa agua y se enjuagan cuidando que no se desborde el agua y se caigan las puntas.

3. Se escurren y se dejan en una palangana.

4. Se les pone un puño de sigmaclin y agua hierviéndolo.

5. Se les deja remojando 20 minutos para que se despinten los tubos. Estos se tallan uno por uno con el escobillón chico.

6. Las puntas amarillas y azules solo se enjuagan.

7. Tanto los tubos como las puntas se enjuagan muy bien al chorro del agua y por último se enjuagan con agua destilada.

8. Se sacuden bien y se dejan escurrir en un cesto.

9. De preferencia las puntas se escurren en un cesto cubierto con papel aluminio.

10. Ya secos, tubos y puntas (azules y amarillas se guardan por separado en bolsas de plástico).

I) VIALES CON MATERIAL RADIOACTIVO.

1. El líquido se desecha en un envase de plástico junto con la tapadera.

2. En un recipiente de plástico se ponen a remojar con detergente durante dos días.

3. Se enjuagan bien y se ponen a hervir 15 minutos en una cubeta con agua y 1 o 2 tápas de dextran líquido.

4. los viales no se cepillan, se enjuagan muy bien al chorro del agua y por último con agua destilada.

5. Se escurren y se secan en el horno.

6. Los viales se colocan en una caja de cartón boca abajo.

J) RECIPIENTES DE PLASTICO PARA LAVAR MEMBRANAS.

1. Se dejan bajo el chorro del agua por lo menos 10 minutos.
2. Se lavan con un poco de sigmaclin y estropajo.
3. Se enjuagan bien con el chorro del agua y con agua destilada al último.
4. Se dejan escurrir bien, y ya secos se guarda.

CAPITULO II. TECNICAS RELACIONADAS CON LA DETERMINACION DE COMPONENTES CELULARES HEPATICOS.

La obtención y preparación de las muestras biológicas a emplear implica un cuidadoso procesamiento, pues de acuerdo a la manera como se realice nos permitirá identificar o no alguna molécula en particular, encontrar actividad biológica de alguna enzima, etc. Es de particular importancia aquellas muestras que provienen de pacientes y que han sido obtenidas a través de una biopsia o una cirugía, pues difícilmente se podrá contar nuevamente con otra muestra igual.

De ahí que el manejo y proceso de las muestras biológicas requieran un cuidado riguroso, y que se realicen no solo las medidas pertinentes para la obtención y preservación de las diferentes constituyentes tisulares y celulares, sino para que éstas sean de alta calidad. El uso de procedimientos básicos del laboratorio como la refrigeración, la congelación, la incubación, la filtración etc., para la preparación del material biológico serán de gran importancia para tal finalidad.

A) OBTENCION DE HOMOGENADOS TISULARES.

Procedimiento.

- 1.- Se obtendrán las piezas de tejido, ya sea de animal o de pieza quirúrgica humana.
- 2.- Se colocarán en una solución bufer de fosfatos en hielo, se lavarán dos veces con esa solución para eliminar todo tejido hemático.
- 3.- El tejido será faccionado con tijeras y colocado en un homogenizador tipo Dounce con 20 ml. de bufer. (la composición de este bufer dependerá para que se utilizará el homogenado).
- 4.- Se darán varios golpes al homogenizador hasta que el tejido esté líquido completamente.
- 5.- Almacenar a -4°C hasta que sea utilizado.

B) OBTENCION DE SUERO.

Procedimiento.

- 1.- Se obtendrá sangre a animales de experimentación por punción cardiaca o bién a sujetos humanos por venopunción. La cantidad mínima será 5 cc.
- 2.- La sangre será colocada en tubos de ensaye sin anticoagulante en hielo. Se despegará el tejido hemático del tubo con un isopo de madera.
- 3.- Centrifugar a 3000 rpm. por 5 minutos a -4°C .
- 4.- Posterior a este tiempo se separará el suero del paquete globular con una pipeta Pasteur. Se pasará éste a un tubo de ensaye y se almacenará a -4°C hasta su uso.

C) OBTENCION DE CELULAS NUCLEARES.

Procedimiento.

1. Extraer 30 ml. de sangre con jeringa heparinizada. Transferir a un tubo de 50 ml. previamente etiquetado con los datos del paciente ó No. de animal. Llenar el tubo con bufer PAS. Agitar por inversión tapando con parafilm y centrifugar a 2,000 rpm a 4°C por 15 minutos.
2. Aspirar con vacío la capa del sobrenadante, teniendo cuidado de no aspirar ninguna materia blanca de la interfase. Llenar el tubo con bufer AKC (bufer lisador). Se tapa con parafilm, mezclar suavemente y dejar reposar durante 30 minutos a 4°C , después centrifugar a 1,500 rpm a 4°C por 10 minutos.
3. - Sacar el tubo de la centrifuga y detectar la capa de las células blancas (precipitado blanco), con cuidado aspirar el sobrenadante y dejar la pastilla de células blancas intacta.

4.- Resuspender el precipitado con bufer salino de fosfato (PBS) y llenar el tubo con el mismo, centrifugar a 1,500 rpm a 4°C por 5 minutos.

5.- Aspirar el sobrenadante y resuspender el precipitado con bufer AKC, centrifugar inmediatamente a 1,500 rpm a 4°C por 5 minutos .

6.- Aspirar el sobrenadante y resuspender la pastilla con PBS para un lavado final. Centrifugar a 1,500 rpm por 5 minutos a 4°C

a) Si quedan eritocitos visibles repetir etapa 4 y 5

b) al final de etapa 6 se puede almacenar la muestra a -70°C.

7.- Aspirar el sobrenadante y proceder inmediatamente a la extracción del ADN.

D) EXTRACCION DEL ADN DE CELULAS BLANCAS.

Procedimiento.

1.- En un tubo de 50 ml. resuspender la pastilla de células blancas en 3 ml. de bufer RSB, (10 mM tris, 10mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 7.4) utilizando agitador vortex o con una pipeta Pasteur.

2.- Agregar 120 µl. de SDS al 25%. Resuspender con la pipeta Pasteur e incubar a 65°C durante 1 hora.

3.- Agregar 40 µl. de proteinasa K, (10 mg/ml) mezclar suavemente e incubar a 65°C durante 2 hrs. (Preincubar la proteinasa K, 5-10 min. a 37°C).

4.- Al final de este tiempo, agregar otros 40 µl. de proteinasa k, mezclar e incubar a 65°C durante toda la noche.

5.- Extracción con fenol-cloroformo, aprox. 2 ml. de fenol neutralizado y precalentado a 65°C y 2 ml. de cloroformo. Centrifugar a 1,500 rpm por 5 minutos.

6.- Separar la fase acuosa con una pipeta Pasteur y ponerlos en 1 tubo falcon de 50 ml. agregar 2 ml. de bufer RSB 10/1

7.- Repetir extracción con fenol-cloroformo.

8.- Obtener fase acuosa (5 ml) y en un tubo corex de 15 ml. precipitar el ADN con etanol frío. (125 ml. de NaCl 4M y 2.5 vol. de etanol) a -70°C por 30 minutos.

9.- Centrifugar a 11,000 rpm a 10°C por 20 minutos.

10.- Descartar sobrenadante, secar la pastilla (ADN) y resuspenderlo en 250 ml. de bufer RSB 10/1 pH 8.0 y pasarlo en un tubo eppendorf de 1.5 ml.

11.- Leer la D.O. a 260/280 nm (con 2 ml. de la solución).

E) EXTRACCION DEL ADN DE UNA MUESTRA DE TEJIDO

Procedimiento.

1.-Obtención de la muestra, depositar el tejido en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL. previamente etiquetado y sumergido en nitrógeno líquido o en su defecto en hielo seco-acetona. Posteriormente la muestra se procesa inmediatamente o bien se almacena a -70°C hasta su procesamiento.

2.- Homogenizar el tejido con 1 ml. de bufer de homogenizar en un tubo de 50 ml. utilizando el politrón.

3.- Transferir el homogenado a un tubo eppendorf de 1.5 ml.

4.- Centrifugar a 2,000 rpm a 4°C durante 10 minutos.

5.- Decantar el sobrenadante y resuspender el precipitado con:

● 500 ul de bufer A (Tiocianato de sodio, citrato de Na, sarcosyl, 2-mercapto EtOH)

● 20 ul de SDS 25%

● 10 ul de proteinasa K (10 mg/ml)

e incubar a 50°C durante 4 horas.

6.- Extracción con fenol-cloroformo.

7.- Centrifugar a 6,000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos.

8.- transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf y precipitar con etanol frío.

9.- Centrifugar a 11,000 rpm durante 20 minutos a 4°C y la pastilla se disuelve en 500 ul de bufer 10/1 pH 8.0.

10.- Agregar 5 ul de RNAsa (5 u/ml) e incubir a 37°C por 1 hora.

11.- Parar la reacción con:

● 4 ml. SDS al 25 %

● 2 ml. NaCL 4.0 M

● 5 ml. Proteínasa K (10 mg/ml)

e incubar a 37°C durante 1 hora.

12.- Extracción con fenol-cloroformo.

13.- precipitar la fase acuosa con etanol frío.

14.- Resuspender la pastilla con 50 ml. de bufer 10/1 pH 8.0 y leer la D.O. a 260/280 mm.

F) EXTRACCION DE ARN TOTAL.

Procedimiento.

1.- Homogenizar con un politrón 20-mg del tejido en 2 ml. de la siguiente solución (Sol. A): Tiocianato 4M, Citrato de Na 25mM, Sarcosyl 0.5% y 2 mercaptoetanol 0.1 %

- 2.- Transferir el homogenado a un tubo de vidrio corex de 15 ml.
- 3.- Agregar los sig. reactivos:
 - 0.2 ml. de acetato de sodio 2M pH 4.0
 - 2.0 ml. de fenol neutralizado caliente.
 - 0.4 ml. de cloroformo.
- 4.- Agitar vigorosamente y enfriar en hielo 15 min.
- 5.- Centrifugar a 10,000 rpm durante 30 min. a 4°C.
- 6.- Obtener la fase (2-3 ml) y precipitar con 2.5 volúmenes de etanol durante 30-60 min. a -70°C. Esta mezcla debe contener una conc. final de NaCl de 0.1 M esto se logra adicionando a la fase acuosa 175 ul de NaCl 4M por c/7 ml. de vol. final antes de agregar el Et OH.
- 7.- Centrifugar 20 min. a 8,000 rpm -10°C.
- 8.- Desechar sobrenadante, escurrir los tubos y disolver la pastilla en 0.4 ml. de sol. A. Transferir a un tubo eppendorff y extraer el ARN con un volumen igual de una sol. 1:1 de fenol/ cloroformo. Congelar entre -20° y -40°C durante 5 min. y centrifugar 10 min. a 10,000 rpm a 4°C.
- 9.- Obtener la fase acuosa (fase superior) y precipitar con EtOH-NaCl (0.1 M NaCl = 37 ul y 2.5 vol de EtOH= llenar el tubo) a -20°C durante 30 a 60 min. Centrifugar como se indica en el paso 7.
- 10.- Resuspender la pastilla en bufer TE 10:1 (Tris-HCl 10mM pH 7.0 - EDTA 1mM 400 ul a pH 7.4) y extraer el ARN por 2a. vez con un volumen igual de una sol. 1:1 de fenol/cloroformo congelar a -20°C 5 min. y centrifugar 10 min. a 10,000 rpm a 4°C.
- 11.- Obtener la fase acuosa y precipitar con EtOH-NaCl como en el paso 9 y centrifugar.
- 12.- Resuspender la pastilla en bufer TE 10:1 pH 7.4 en un volúmen que varía de acuerdo al tamaño de la pastilla.

13.- Determinar la D.O. a 260/280 nm y correr la electroforésis. Una buena preparación del ARN debe tener una rec 260/280 entre 1.7 a 1.9. Una unidad de D.O. a 260 nm = 40 ug ARN.

6) AISLAMIENTO DE MEMBRANAS DE CELULAS HEPATICAS.

Procedimiento.

- 1.- Picar el hígado
- 2.- Homogenizar 8 veces con 25 ml. NaOH.
- 3.- Llevar a 250 ml. con NaHCO_3
- 4.- Agitar 3 minutos en hielo
- 5.- Filtrar, primero con gaza doble y después cuádruple.
- 6.-Centrifugar 3000 rpm durante 30 minutos.
- 7.- Descartar el sobrenadante y volver a homogenizar 3 veces.
- 8.- Medir el volúmen (hacer esta relación)
4.8 ml. susp. de células + 6.2 ml. sacarosa 69% (11 ml)
No siempre sale de suspensión de células 4.8 ml.
Entonces se hace $x (x) (11) 4.8 =$ El volúmen a que se va llevar.
- 9.- Ajustar el refractómetro a 44%
- 10.- Pasarlo a un tubo de ultracentrífuga agregando sacarosa 42% \pm la mitad.
- 11.- Centrifugarlo a 25,000 rpm y sacar la capa sobrenadante.

12.- Pasarlo por aguja 18 y 20 varias veces. (pasandolo a un vaso; primero con aguja del 18 y después del * 20). Esto es para romper algunas células que quedaron enteras.

13.- Centrifugarlo a 15,000 rpm. 15 min. agregándole bicarbonato 1mM (para limpiar de la sacarosa).

14.- Tirar el sobrenadante y la parte que queda abajo es la membrana de hepatocitos.

CAPITULO III. TECNICAS RELACIONADAS CON LA DETERMINACION DE COMPONENTES CELULARES HEPATICOS.

El laboratorio de investigación del Departamento de Gastroenterología desarrolla proyectos relacionados con esta rama de la Medicina. Algunas de las enfermedades que han sido de particular interés para varios profesores del Departamento es la hepatitis y la cirrosis hepática. Esto ha traído como consecuencia que se implementen, no solo en el laboratorio de análisis clínicos, sino también en el laboratorio de investigación algunas técnicas para el estudio de estas enfermedades.

Estas técnicas tienen la ventaja de que son fáciles de realizar y altamente reproducibles; asimismo, pueden ser utilizadas tanto para animales de experimentación como en muestras provenientes de pacientes. Las técnicas que se describen a continuación, permiten tener una visión de la integridad estructural y/o funcional del hígado.

A) DETERMINACION DE TRANSAMINASA GLUTAMICA PIRUVICA.

La actividad de la transaminasa glutámica pirúvica (TGP) se determina por el método de Reitman-Rankel (*), en el que se mide el complejo formado por piruvato y 2,4-dinitrofenilhidrazina, que se produce a partir de la alanina y el alfa-ceto-glutarato. El complejo colorido de hidrazina absorbe a 515 nm.

Procedimiento

a) PREPARACION DE SOLUCIONES.

1.- Bufer de fosfatos 0.1M pH 7.5

2.- Solución de sustrato: D/L alanina (1.78 g), ac. alfa-ceto-glutarato (30 mg), NaOH 1N (0.5 ml), ajustar a 100 ml con bufer de fosfatos.

3.- Reactivo cromógeno: 2,4 dinitrofenil hidracina (1mM) en HCl 1N.

4.- Solución NaOH 0.4N

5.- Sol. estandar de pirúvato (2umoles/ml) en bufer de fosfatos.

b) ENSAYO.

- Preparar tubos en duplicados, uno corresponderá al blanco y el otro al problema, agregar las soluciones de la siguiente manera:

	Blanco	Problema
Solución sustrato	0.250 ml	0.250 ml
Suero problema	-----	0.050 ml

- Mezclar y agitar suavemente, incubar a 37°C durante 60 minutos.

- Agregar 250 ul de reactivo cromógeno e incubar por 5 minutos.

- Agregar suero problema solo al tubo blanco (0.050 ml.) e incubar otros 15 minutos a 37°C.

- Detener la reacción con NaOH 0.4N (2.5 ml).

- Leer en espectrofotómetro a 515 nm. e interpolar datos en una curva estandar de pirúvato.

c) CURVA DE CALIBRACION DE PIRUVATO.

	T u b o s					
Solución (ml)	1	2	3	4	5	6
(2)	0.5	0.47	0.45	0.42	0.4	0.37
(5)	----	0.02	0.05	0.07	0.10	0.12
(1)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.10	0.1
(3)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
(4)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Actividad en mUI	0	8.3	16.7	25	33	41

*Reifman S. and Frankel S., Am. J. Clin Pathol. 28: 56-63, 1957.

B) CUANTIFICACION DE PROTEINA TOTAL (METODO DE BRADFORD).

La determinación de proteínas se realiza siguiendo el método de (*Bradford). Este método se basa en la formación de un complejo colorido que resulta de la unión de la proteína con el colorante azul brillante de Coomassie, el cual absorbe a 595 nm.

Procedimiento.

Reactivo de Bradford: Azul de Coomazie G-250 100 mg. en 50 ml. de etanol al 85%, 100 ml. de ac. fosfórico a) 85% y 850 ml de agua.

Albúmina sérica bovina (BSA): 0.1. mg/ml

1.- Hacer curva estandar de proteína: colocar las siguientes cantidades (hacer por duplicado).

Tubos	DDW		BSA		R. Bradford
1	80 ul	+	20 ul	+	2.5 ml
2	60 ul		40 ul		2.5 ml
3	40 ul		60 ul		2.5 ml
4	20 ul		80 ul		2.5 ml
5	0 ul		100 ul		2.5 ml

Agitar en vortex y leer a 595 nm en un espectrofotómetro.

2.- Para muestras, preparar tubos (hacer por duplicado).

Tubo	DDW		R. Bradford
5-20ul de muestra	95-80 ul	+	2.5 ml.

Agitar en vortex y leer en espectrofotómetro a 595nm.

* Bradford M. Anal. Biochem 72:248 1926.

C) DETERMINACION DE GLUCOSA-6-FOSFATASA (EN SUERO)

La actividad de esta enzima se determinó de acuerdo al método de Traiger y Plass (*), el cual se basa en la hidrólisis de la glucosa-6-P a fosfato inorgánico.

Procedimiento.

I. Reacción Enzimática.

a) Colocar en cada tubo problema

- 150 ml. de amortiguador de citrato 0.1M PH 6.5
- 250 ml. de G-6- fosfato (0.01 M).
- 100 ml. de suero.

b) Incubar durante 1 hora a 37°C

c) al pasar este tiempo adicionar 500 ul. de ácido tricloroacético al 10% y centrifugar durante 5 minutos a 1000 rpm.

II. Tomar 0.6 ml. *(600 ul) del sobrenadante y determinar fósforo.

* Puede tomarse 0.3 ml. + 0.3 ml. de H₂O para que pueda leerse fácilmente en el espectro.

1.- Poner tubos:

0.3 ml. de agua (300 ul.)

0.3 ml. de muestra (300 ul)

0.2 ml de Ac. ascórbico al 10% (Recién preparado) (200 ul.)

1.2 ml. de molibdato de amonio 0.42M en H₂SO₄/1N.

2.- Incubar a 37°C por 30 minutos

3.-Leer A 820 nm en un espectrofotómetro

Se coloca un tubo blanco con 100 ul. de agua desde el principio de la reacción enzimática.

Las lecturas se interpolan en una curva tipo de fósforo.

Curva estandar de fósforo.

Solución stock KH_2PO_4 10mM en H_2SO_4 0.1N

1.- Tomar un mililitro de la solución anterior y hacer una dilución con agua.

2.- Preparar una serie de tubos y agregar las siguientes soluciones:

No. Tubo	Solución
1	0.1 ml. de KH_2PO_4 , 0.5 ml. H_2O , 0.2 ac. ascórbico y 1.2 de molibdato de amonio.
2	0.2 ml. KH_2PO_4 , 0.4 ml H_2O , 0.2 ml. de ac. ascórbico y 1.2 ml de molibdato de amonio.
3	0.3 ml. KH_2PO_4 , 0.3 ml H_2O , 0.1 ml de ac. ascórbico y 1.2 ml. de molibdato de amonio.
4	0.4 ml KH_2PO_4 , 0.2 ml H_2O , 0.2 ml de ac. ascórbico y 1.2 ml de molibdato de amonio.
5	0.5 ml KH_2PO_4 , 0.1 ml H_2O , 0.2 ml. de ac. ascórbico y 1.2 ml de molibdato de amonio.

3.- Incubar los tubos a 37°C por 30 minutos y leer a 820 nm. Hacer curva DO vs moles de Pi.

* HIKARU K. Clin. Chim. A. 4: 554, 1959.

D) DETERMINACION DE GAMMA-GLUTAMILTRANSPEPTIDASA

La actividad de la gamma glutamil transpeptidasa se determina de acuerdo a los métodos establecidos por Glossman y Neville (*), el cual implica la obtención de gamma glutamil glicilglicina y p-nitroanilina, a partir del sustrato gamma-glutamilo-p-nitroanilida, y de un receptor gamma glutamilo como lo es la glicilglicina, a través de la actividad de la gamma glutamil transpeptidasa.

Procedimiento.

- 1.- Preparar tubos
- 400 ul tris HCl 200 mM PH 8.2
 - 100 ul MgCl₂ 200 mM
 - 100 ul glicil - glicina 40 mM PH 8.2
 - 200 ul glutamil p-nitroanilina 10mM (agitar)

Agitar los tubos

2.- Previa incubación por 10 min. de la preparación anterior a 37°C se inicia la reacción con 200 ul. de la preparación enzimática (5-20 mg de proteína).

3.- Se inicia a 37°C (generalmente 30 min.) y se detiene la reacción con 2 ml. de Ac. acético 1.5 M.

4.- Se lee en celdillas standar a 410 nm determinándose la p-nitroanilina mediante curva std.

La reacción es lineal en el tiempo hasta la utilización de aprox 10% del citrato (producción de aprox. 200 ug p-nitroanilina en la mezcla de la reacción de tal forma que la actividad de un homogenado de corteza renal puede ser lineal hasta por 20 min.

* Glossmaun M. and Neville D. M., FEBS Letters 19 (4): 340 1972.

E) DETERMINACION DE GLUCOGENO.

El contenido de glucógeno se determina utilizando el método de la antrona (*). Este método se basa en la formación de un complejo colorido que resulta de la unión del glúcido con el reactivo de la antrona, el cual absorbe a 620 nm.

Procedimiento.

- 1.- A cada tubo que contiene un trozo de hígado previamente pesado agregar 3 ml. de KOH 30%.
- 2.- Hervir en baño de agua (H₂O) ± 1/2 hrs. tapando los tubos con canicás, quedando líquidos, nada de tejido.
- 3.- Enfriar y pasar cuantitativamente a un matraz de 50 ml. volumétrico con H₂O. Agitar muy bien.
- 4.- Tomar dos (2) ml. con pipeta volumétrica de c/matraz y volver a diluir a 50 ml. con H₂O. De los segundos matraces tomar alícuotas de 5 ml. y pasarlas a tubos grandes. Agregar:
 - 1 tubo blanco con 5 ml. de H₂O.
 - 1 tubo st. con 5 ml. de una solución de glucosa 20 mg/ml.
- 5.- Preparar solución de antrona 0.2% g. en ac. sulfúrico 95% colocar el reactivo en hielo y agregar 10 ml. del mismo a cada tubo con una bureta, los tubos deben estar en hielo.
- 6.- Agitar cuidadosamente (no usar vortex).
- 7.- Tapar los tubos fríos con canicás y ponerlos en un baño hirviendo durante 10 minutos.
- 8.- Enfriar inmediatamente con agua y con hielo.
- 9.- Leer a 620 nm y hacer cálculos para conocer la concentración de glucógeno total.

* Fong I., Schoffner F.C. and kerk P., Arch. Biochim. Biophys. 45: 319-326, 1963.

F) DETERMINACION DE COLAGENA TOTAL (EN REBANADAS DE TEJIDO).

La concentración de colágena es determinada por la medición del contenido de hidroxiprolina en muestras de hígado fresco, después de la digestión con ácido (*).

Procedimiento.

- 1.- Se sacrifican las ratas, se toma un trozo de hígado, se seca con papel filtro y posteriormente se pesan 100 mg. y se colocan en una ampolleta.
- 2.- A la ampolleta se le agregan 2 ml. de HCl 6 N y se sellan con el soplete.
- 3.- Una vez selladas se colocan en horno a 100°C durante 20 hrs.
- 4.- Ya hidrolizadas se rompe la ampolleta y se ponen a evaporar el tiempo suficiente para que queden completamente secas.
5. Las muestras secas se resuspenden en solución amortiguadora: primero con 2 ml. se agita con vortex, y se vacía en tubos de ensaye. Después se agrega 1 ml nuevamente a la ampolleta para lavarla completamente y se vacía en el mismo tubo de ensaye. Se centrifuga a 3000 rpm durante 15 minutos.
- 6.- El sobrenadante se saca con pipeta Pasteur y se vacía en un tubo de ensaye. Se le agrega una porción de anorita, se centrifuga a 3000 rpm durante 15 minutos y nuevamente se vacía el sobrenadante en un tubo de ensayo. Si no sale claro se vuelve a colocar anorita y se centrifuga (hacer 2 veces).
- 7.- Se toma 1 ml. de este sobrenadante más 1 ml. de agua, se colocan en tubo con tapón y se le agrega 1 ml. de sol. de cloramina T. Además se pone un tubo blanco (con 2 ml. de agua) y 2 tubos con sol. estandar de hidroxiprolina.

Para preparar el tubo estandar de la hidroxiprolina:

Estandar hidroxiprolina 10 μ mol/ml. Se toman 100 μ l, de esta solución y se lleva a 1 ml. con agua. Se toman 100 μ l de esta misma solución y se lleva a 2 ml. con agua. Y se sigue el mismo procedimiento. (De esta manera se oxidan 0.1 μ mol).

8.- Pasados 20 minutos se detiene la reacción por la adición de 500 μ l de tiosulfato de sodio 2 M, 1 ml de NaOH 1N y aproximadamente 2 g. de NaCl. Agitar inmediatamente (De esto depende que se detenga la reacción).

9.- Agregar 6 ml. de tolueno y agitar durante 1 minuto para extraer los productos de la oxidación de la prolina.

10. Para convertir el producto de la oxidación de hidroxiprolina a pirrol: Se extrae la capa de tolueno, se desecha y el contenido acuoso se cubre con perlas de vidrio y se coloca en un baño hirviendo durante 20 minutos.

11.- Se enfrían los tubos y el pirrol se extrae con 6 ml. de tolueno, agitar 1 minuto.

12.- Tomar una alícuota de 1 ml. de la fase de tolueno y mezclar con 4 ml. de reactivo de Ehrlich y agitar vigorosamente. Los tubos se mantiene a temperatura ambiente por 30 minutos para desarrollar el color. Leer en espectro a 560 nm.

* J. Gottlird, A. Kaplan, and S. Udenfried, J. Biol. Chem. 241: 7-15, 1966.

CAPITULO IV. TECNICAS RELACIONADAS CON LA BIOLOGIA MOLECULAR.

La Biología Molecular es una rama de las ciencias biológicas que intenta explicar la vida y sus manifestaciones como una serie de reacciones. La aplicación de las técnicas de la biología molecular permite manipular moléculas críticas de procesos importantes como el crecimiento y división celular, entre otros.

Los métodos de laboratorios de la biología molecular implican desde procesos muy simples a muy complejos. No obstante, el laboratorio de investigación del Departamento de Gastroenterología cuenta con la infraestructura para desarrollar esas metodologías para el estudio de enfermedades relacionadas con el área de la Gastroenterología.

A continuación se describen algunos de los procedimientos que han sido utilizados y aún se siguen utilizando en el laboratorio de investigación.

A) ELECTROFORESIS DE PROTEINAS

El sistema de electroforesis más comúnmente usado para la separación unidireccional de proteínas desnaturalizadas es el sistema de Laemmli (*). Este sistema es extensamente usado para la medición de peso molecular, de una determinación proteína.

Procedimiento.

1.- Limpiar vidrios, canales y separadores.

2.- Unir los vidrios con los separadores y preparar las soluciones.

a) Solución Base:

20 ml. de acrilamida al 30%, 15 ml. de solución separadora (50 ml. 1M tris-HCl + 4 ml. SDS 10% + 46 ml. de DDW), 5 ml de agua, 80 ul de temed y 320 ul de amonio persulfato al 10%.

Agregar esta solución en el espacio que hay entre los vidrios, dejar polimerizar.

b) Solución Separadora:

Preparar en tubo 485 ml. de acrilamida al 30%, 3.15 ml de solución separadora, 2 ml. de agua, 15 ul de temed, 51 ul de amonio persulfato al 10%. Agregar a los vidrios y después agregar 500 ul de agua en la parte superior. Dejar polimerizar.

c) Solución Concentradora.

Preparar en tubo 1.20 ml de acrilamida al 30%, 2.5 ml de solución concentradora (75 ml de tris-HCl 2M + 4 ml SDS 10% y 46 ml de agua), 5.92 ml. de agua, 25 ul de temed y 25 ul de amonio persulfato al 10%. Secar el agua y posteriormente agregar la solución. Colocar el peine, evitar que queden burbujas y dejar polimerizar.

2.- Preparar la muestra

a) colocar 5ug de proteína y agregar bufer de muestra (0.6 ml de tris-HCl 1M, 5 ml de glicerol, 2 ml de SDS 10%, 0.5 ml de 2 mercaptoetanol, 1 ml de azul de bromofenol 1% y 0.9 ml de agua). Hervir la muestra a 100°C por 10 min. Centrifugar.

b) Preparar marcadores de peso molecular agregar bufer de corrida. Hervir y centrifugar.

3.- Cuando polimerice se quita el peine, se prepara la cámara y se agregan las muestras con jeringa Hamilton. Al final se colocan los marcadores.

4.- Conectar los electrodos y encender el aparato . Se corre a 200V (100mA) por 80 minutos.

5.- Antes de que salga el frente apagar el aparato. Sacar el gel.

6.- Teñir por 30 minutos.

7.- Desteñir por el tiempo necesario

* Laemmli, U., Nature 227, 680-685 (1970) .

B) ELECTROFORESIS DEL ADN EN EL GEL DE AGAROSA

Las electroforesis en geles de agarosa son usadas para resolver fragmentos de ADN sobre las bases de su peso molecular. La distancia migrada en el gel varía inversamente proporcional con el log. del peso molecular. Esta técnica puede ser usada para resolver ADN complejos (ADN genómico) para análisis de Southern Blot.

Procedimiento.

- 1.- Disolver 0.8 gr. de agarosa en 100 ml. de bufer TAE (1X) en un baño María, (tris base 1.6M, acetato de sodio 0.8M, EDTA 40mM, pH 7.2).
- 2.- Después de que se disuelve la agarosa completamente se deja a temperatura ambiente y cuando la temperatura es de aproximadamente 60°C se le agrega 4 ml. de bromuro de etidium (10 mg/ml).
- 3.- Agregar la agarosa disuelta al molde de plástico con el peine y dejar gelificar a temperatura ambiente.
- 4.- Poner el gel junto con el molde en la cámara de electroforésis.
- 5.- Agregar el bufer de corrida (TAE 1X).
- 6.- Después de quitar el peine, se carga los pozos con las muestras correspondientes, evitando que se pierda la muestra.
- 7.- Correr la electroforésis con una carga de 60 volts x 4 a 6 hrs.
- 8.- Checar el corrimiento de la muestra con una lámpara de luz UV.
- 9.- Lavar el gel 2-3 veces con agua bidestilada y deionizada.
- 10.- Incubar el gel en 0.25 N de HCl durante 25 minutos a temp. ambiente.
- 11.- Lavar el gel varias veces con agua destilada (5x) aproximadamente.

12.- Incubar el gel con 0.2N de NaOH y 0.6 M NaCl durante 30 minutos a temperatura ambiente.

13.- Lavar de nuevo el gel aproximadamente 10 veces con agua bidestilada y deionizada.

14.- Dejar el gel en bufer de fosfatos (0.025 M de bufer de fosfato monobásico y dibásico pH 6.5) mientras se prepara el material para la transferencia.

C) ANALISIS DEL ADN POR TECNICA DE SOUTHERN-BLOTTING.

El análisis de genes puede ser realizado por Southern Blotting (*). Esta técnica se basa sobre los principios de la replicación de ADN. En el desarrollo de la técnica se asume que dos fragmentos de ADN se unirán (hibridiza), si ellos tienen secuencias de nucleótidos a unir. El ADN se transfiere del gel de agarosa a un filtro de nitrocelulosa. Posteriormente es hibridizado a una sonda radiomarcada para detectar especies de ADN hibridizadas.

Procedimiento.

A) Separación del ADN electroforéticamente sobre un gel de agarosa. De la manera como fué descrita previamente:

B) Transferencia a filtro de nitrocelulosa.

1.- Una vez que se tiene el gel de agarosa se pasa a una caja de plástico con 500 ml. de una solución conteniendo: NaCl 5M, NaOH 10M y agua. Dejar a temperatura ambiente.

Agitar periódicamente con la mano. Después de 30 minutos substituir la solución por otra fresca. Continuar agitando por otros 30 minutos. Este paso se realiza para desnaturalizar la doble cadena de ADN.

2.- Llevar el gel a un pH más neutro, substituir el líquido por 500 ml. de una solución conteniendo: acetato de amonio 10M, NaOH 10M y agua. Agitar periódicamente por 30 minutos. Substituir la solución por otra fresca y agitar periódicamente por 30 minutos.

3.- Colocar 500 ml. de la misma solución en otra caja de plástico. Humedecer el papel Watman 3MM con esa misma solución. Colocar una placa de plástico o vidrio en la parte más alta de la caja y colocar una hoja de papel encima de la caja con los extremos doblados para que se humedescan de la solución.

4.- Colocar el gel encima de lo anterior a que quede centrado y alineado con el papel y el vidrio.

5.- Prehumedecer un pedazo de filtro de nitrocelulosa (20 x 20 cm) en agua. Colocar el filtro directamente sobre el gel.

6.- Prehumedecer el papel Watman 3Mm (20 x 20 cm) en agua. Colocar sobre el filtro de NC. Cubrir con un segundo filtro 3MM.

7.- Sobre lo anterior colocar 6 toallas de papel, para iniciar la acción capilar atrayendo el líquido hacia el filtro.

8.- Colocar otros 6 bloques de toallas en diferentes direcciones encima de lo anterior. Al final una placa de plástico o vidrio (aprox. 250 g.). Dejar de 4-12 horas para permitir la transferencia del ADN al filtro de NC.

9.- Remover todo el peso. Remover el gel y descartar. Dejar que se seque el filtro. Marcar el * gel que se trate con fecha, condiciones, muestras, etc.

10.- Colocar el filtro de NC entre dos piezas de papel Watman 3MM. Fijar los extremos con clips.

11.- Colocar en un horno de vacío por 2 horas a 80°C.

12.- Almacenar cuidadosamente (entre dos filtros 3MM) a temperatura ambiente hasta la hibridación.

C) Hibridación del ADN.

1.- Colocar el filtro de NC, del Southern-Blot en una sonda de polietileno sellada con 20 ml. de buffer de hibridación (SSC 20 x, 10 % SDS y agua). Dejarlo al menos 5 minutos a temperatura ambiente.

2.- Colocar un volúmen apropiado de muestra de la sonda ($1-5 \times 10^7$ cpm) en un tubo de plástico de 50 ml.

3.- Adicionar las soluciones en el siguiente orden:

500 ul de stock de ADN
50 ul de NaOH 10M
300 ul de tris 2M pH 7.4
475 ul de HCl 1M

4.- Adicionar 10 ml. del bufer de hibridación al tubo y adicionar todo esto a la bolsa donde se puso el filtro de NC. Sellar la bolsa.

5.- Incubar durante la noche en un baño de agua a 42°C.

6.- Al siguiente día remover el filtro de la bolsa y colocar en una caja de plástico. La bolsa depositarla con desechos radiactivos. Lavar el filtro con 500 ml. de la solución de NaCl 5M, NaOH 10M (en agua); por 5 minutos a temperatura ambiente. Remover el bufer y sustituirlo por una solución fresca. Repetir 3 veces más con intervalos de 20 minutos.

7.- Repetir los lavados con la solución de acetato de amonio 10M, NaOH 10M (en agua), en intervalos de 20 minutos a una temperatura de 45 - 65°C.

8.- Colocar el filtro entre dos piezas de papel Watman 3MM. Secar el filtro de aire por 30 minutos.

9.- Tomar autoradiografía con kodak XAR-5 a -70°C. Exponer durante la noche y desarrollar.

* Southern E.J. Mol. Biol., 98: 503 (1975).

D) ANALISIS DE ARN POR NORTHERN-BLOTTING

En esta técnica se hace el aislamiento del ARN de tejidos congelados. El ARN de interés se separa por tamaño, usando un gel para electroforesis de agarosa y transferido a un medio estable como el papel de nitrocelulosa. El subsiguiente procedimiento de hibridación se realiza con sondas apropiadas las cuales pueden consistir de ADN_o (*).

1.- ELECTROFORESIS DE ARN EN GEL DE AGAROSA-PREPARACION DEL GEL (80 ml al 1%).

Procedimiento.

Disolver la agarosa en agua a 95°C hasta que la solución este transparente, enfriar aproximadamente a 45°C y agregar el MOPS 0.24M, formadehído (13 ml.) y bromuro de etidio (4 ul). Vaciar la mezcla en el molde del gel que ya tendrá el peine. Se deja solidificar durante 20 minutos a temperatura ambiente.

-PREPARACION DE LA MUESTRA

1.- Colocar a baño María a 60°C durante 10 min. una mezcla de los ul necesarios para 10 ug. de la solución del ARN y 23 ul de solución desnaturalizante cuya composición es la siguiente:

Formamida	500 ul
MOPS 12 x	83 ul
Formaldehído 37%	162 ul

2.- Sacar y colocar en hielo.

3.- Agregar a c/muestra 3 ul de la solución o bufer de carga, cuya composición es:

Azul del bromofenol	0.25 %
Cianol - Xileno	0.25 %
Ficoll 400	

4.- Se monta la cámara de electroforésis y se agrega la mitad del bufer de corrida (~250 ml) con el fin de apenas cubrir los pozos con el bufer, el cual se prepara de la siguiente manera:

MOPS 12 x 83.3 ml.

Agua deionizada estéril hasta 1000 ml.

Nota: Solo se requieren 500 ml. del bufer en c/electroforésis.

5.- Se colocan las muestras en los pozos del gel (en el pozo caben 35 μ l como máximo), se agrega la otra mitad del bufer de corrida. Se conectan los electrodos y se enciende la fuente de poder. Se corre la electroforesis durante 4.5 hs a 30-35 volts.

6.- Se apaga la fuente de poder y se saca el gel del molde y se lava varias veces con H₂O destilada.

7.- Se observa el gel con luz U.V. y se obtienen fotografías del mismo.

2.) TRANSFERENCIA DEL ARN DEL GEL DE AGAROSA A LA MEMBRANA DE NITROCELULOSA.

Procedimiento.

ETAPA I

1.- Remover el exceso de formaldehído enjuagando el gel varias veces en agua destilada.

2.- Equilibrar el gel incubándolo con amortiguador de PO₄ 0.025 M pH 6.5 durante 20 min. a temperatura ambiente con agitación suave.

3.- Cortar la membrana (gene screen) a la medida exacta del gel (usar guantes).

4.- Humedecer la membrana en amortiguador de PO₄ 0.025 M pH 6.5 durante 15 min. antes de colocar el gel.

5.- Humedecer 1-2 piezas de papel filtro # 2 con amortiguador de PO_4 y colocarlas en un soporte de vidrio elevado de modo que los extremos del papel queden dentro del amortiguador.

6.- Colocar 4 piezas del papel filtro (de la misma medida del gel) sobre la membrana húmeda.

7.- Colocar toallas absorbentes (cortadas de la misma medida del gel) sobre el papel filtro.

8.- Dejar que continúe la transferencia por lo menos 12 hrs. las toallas absorbentes se cambian frecuentemente y se agrega amortiguador de fosfatos si es necesario.

ETAPA II

9.- Retirar las toallitas y el papel filtro sin despegar la membrana.

10.- Retirar el gel y la membrana como una unidad

11.- Marcar líneas de referencia en la membrana con lápiz (n.2) y comprobar que todo el ARN ha sido transferido.

12.- Desprender el gel de la membrana para que se pueda lavar (usar guantes).

13.- Lavar cuidadosamente la membrana con amortiguador para eliminar el residuo de agarosa, ya que este puede interferir con la autoradiografía .

14.- Secar la membrana en papel filtro y después a temperatura ambiente.

15.- Colocar la membrana que contiene el RNA envuelta en papel filtro y aluminio en un horno con vacío a $60 - 95^\circ\text{C}$ durante 2-4 hrs.

-PREPARACION DEL cDNA MARCADO CON ^{32}P .

1) Sacar todos los reactivos y calentar el baño María a 37°C. El bufer de la polimerasa y el iniciador tímico de bovino deben estar en hielo así como el RNA Transportador

2) Colocar en un tubo appendorff de 1.5 ml.

- * - 2 ul ADD esteril
- 1 ul NaOH 0.5 N
- 2 ul cDNA clone (200 ug /ml) que este a tem. amb.

Esperar de 2-3 min.

3) Agregar los siguientes reactivos.

- 1 ul Tris-HCl 1 M pH 7.0
- 1 ul Iniciador tímico de bovino (5 mg/dl)
- 2 ul Bufer de polimerasa 10 x (17.5 mM Mgac+0.5 mM d TP)
- 10 ul *³²P-dCTP
- 1 ul Enzima polimerasa (Pol I klenow fragment)

* Si se pone menos radioactivo compensar el vol. con agua la enzima sol I se saca del congelador Antes de usarla y se regresa inmediatamente después al congelador.

4) Se meten los tubos a incubar a 37°C (exactos) en el momento en que se les agrega la pol I durante exactamente/ 9 min.

5) Detener la reacción adicionando 50 ul. de bufer acetato de sodio 3M mantener las sondas en hielo:

6) Adicionar 5 ul de transportador RNA (gérmen de trigo) 5 mg/ml mezclar bien.

7) Precipitar durante 30 minutos en Revco.

8) Centrifugar a 10,000 rpm durante 15 minutos.

9) Pasar el sobrenadante a otro tubo appendorff, escurrir un poco la pastilla y disolverla en 200 ul de bufer TE 10:1 pH 8.

CONTEO DE LA SONDA.

1.- Depositar 2 ul de la sonda marcada en un filtro de vidrio, hacer esto por duplicado para cada sonda.

2.- Lavar los filtros en un matraz kitasato con filtro al vacío, poniendo con pizeta un poco de HCl 0.5 N y luego un poco de etanol. Repetirlo 3 veces.

3.- Colocar cada filtro en un vol. que contenga 5 ml. de líquido de centello y contar ^{32}P durante 1 min. cada vol.

-PREHIBRIDACION E HIBRIDACION.

1.- Prehibridar la membrana tratándola con la siguiente solución (para preparar un vol. de 8 ml.)

- | | |
|--|--------|
| - Formamida (desionizada) 4 ml. sol 100% | 50% |
| - Polivinil Pirrolidona (40 kDa) 0.16 ml. sol 2% | 0.04% |
| - Albúmina sérica bovina 0.16 ml sol. 2% | 0.04 % |
| - Ficoll (400 KDa) 0.16 ml sol. 2 % | 0.04 % |
| - SSC 2 ml. sol. 20 x (NaCl, citrato sodio y agua , pH7) | 5 x |
| - SDS 0.32 ml de sol. 25% | 1% |
| - cDNA 1.5 ml de sol. 250 mg/ml | |
| - DDW 0.520 ml (agua bidestilada) | |

Preincubar a 65°C por 15 minutos.

Colocar la membrana y la sol. de prehibridación en una bolsa de plástico, sellarla y colocarla a 42°C en agitación constante durante ~ 16 hrs.

2.- Al finalizar este período adicionar el cDNA radidactivo (preincubado a 65°C 15 min.) a la bolsa de plástico, sellar e incubar en agitación constante a 42°C durante 46-48 hrs.

LAVADO DE LA MEMBRANA

a). Retirar la sol. de hibridación y lavar la membrana de la siguiente manera:

- Lavar 2 veces con 100 ml. c/vez de bufer SSC 2x y 900 ml. de bufer SSC DDW temperatura ambiente durante 5 min. con agitación constante.

- Lavar 2 veces con 100 ml. c/vez con una sol. que contenga SSC 2x y SDS al 0.5% a 65°C durante 30 min. con agitación constante 100 ml (20x SSC 20 ml, 25% SDS y 880 ml, DDW).

- Lavar 2 veces con 100 ml. de bufer SSC 0.1 a temperatura ambiente durante 30 min. con agitación constante 5 ml. de bufer 20x SSC en 995 ml DDW.

b). Secar la membrana con papel filtro, exponer y desarrollar la autoradiografía.

-AUTORADIOGRAFIA

1.- Después del lavado secar la membrana en una pieza de papel filtro y colocarla en una bolsa de plástico. Acomodarla y pegarla en los intensificadores del cassette kodak x- Omatt.

2.- En el cuarto oscuro colocar la película sobre la membrana y cerrar el cassette.

3.- Colocar a -70°C durante 24-72 hrs.

4.- Terminado el tiempo de exposición colocar la película en una sol. de revelado durante 5 min. en cuarto oscuro.

5.- Lavar la película en una charola con agua durante 30 seg. a 1 min.

6.- Colocar la película en una sol. fijadora de 3-5 min. agitando c/min.

7.- Colocar la película en agua durante 15-20 min. primero en el cuarto oscuro y después en el laboratorio.

*Lehrach, H., D., Wazney J., and Boedkker H. Biochemistry, 16: 4743 (1977).

E) TECNICA DE PCR (REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA)

Esta técnica se basa en la identificación de genes mediante el uso de una polimerasa de ADN termoestable. En esta técnica se usa secuencias de nucleótidos los cuales son específicos para genes determinados, las llamadas secuencias de oligonucleótidos que son usados con ADN desconocido. La mezcla de nucleótidos se trata con una polimerasa termoestable sobre, varios ciclos de amplificación. Los resultados son verificados por técnicas de Southern blotting para identificar genes amplificados. La técnica puede revelar la presencia de una simple copia del gen, que no puede ser identificado por cualquier otra técnica.

Procedimiento.

1.- Material y Métodos. El método desarrollado es de PCR, el procedimiento se realiza según especificaciones de Perkin Elmer Cetus señaladas en el Kit No. 55623-1/90 Part. No. N-801-0055. Lote No. AK 4879.

2.- Incluye: Un templete control del bacteriófago lambda, cuyo genoma es igual a 48.5 Kb. y la longitud del segmento blanco es de las bases 7131 a la 7630 (500 pb).

3.- Soluciones.

AmpliAq DNA Polimerasa	50 ul	5u/ml.
dATP	32 ul	10mM.
dCTP	320 ul	10mM Disolver en DDW
dGTP	320 ul	10mM estéril pH=7
dTTP	320 ul	10mM.
Bufer (10X)	1.4 ml *	
Templete Control.	100 ul	1ug/ml
Iniciador Control 1	50 ul	20uM.
Iniciador Control 2	50 ul	20uM.

* bufer: 100 mM Tris-HCl pH 8.0, a 25 °C., 500 mM KCl., 15mM MgCl₂
0.01 % (w/v) Gelatina.

ENSAYO:

Inicialmente se realiza la amplificación control de la siguiente manera:

Procedimiento:

1.- Dilución del Template Control.

Se diluye el template control 1:10 en una solución que contiene:

- 10 mM Tris-HCl pH 8.0 a 25°C.
- 1 mM E.D.T.A.
- 10 mM NaCl.

2.- Se recomienda preparar previamente una solución o mezcla madre que contenga agua destilada y desionizada estéril (DDW estéril). Bufer, dNTP's y la enzima, la cual se distribuirá en alícuotas individuales en cada tubo, con lo cuál se reducirá la variabilidad tubo a tubo.

Mezcla Madre:

Reactivo:		Orden de Adición	
DDW estéril	1	61.5ul.	
Bufer (10X)	2	10ul	1X.
dATP	3	2 ul	200uM
dCTP	4	2ul	200uM
dGTP	5	2 ul	200uM
dTTP	6	2 ul	200uM
AmpliTag DNA Polimerasa	7	0.5ul	2.5U/100ul
<hr/>			
Volumen de la mezcla madre		80.0ul.	
Iniciador Control 1	5	5ul	1.0ul
Iniciador Control 2	5	5ul	1.0ul
Template Control 1:10 diluido	6	10ul	1ng/100ul
Volúmen Total		100 ul.	

3.- Después la mezcla total se somete a una serie de ciclos con 3 diferentes temperaturas correspondientes a los pasos de desnaturalización, alineación y extensión respectivamente. Lo cual se hace en un equipo automatizado Modelo PHC-2: 1-800-227-0627 Bio-Synthesis, Inc. el cual se programa con las siguientes especificaciones:

No. de ciclos = 30

Cada ciclo comprende 3 segmentos de diferentes temperaturas.

Paso	Segmento	Temperatura	Tiempo
-Desnaturalización	1	94°C	1 min.
-Alineación	2	55°C	1 min.
-Extensión	3	72°C	1 min.

Nota:

La mezcla total previamente antes de someterse a los ciclos se calienta a 94-95°C como paso inicial de desnaturalización. Para reducir evaporación y reflujo, agregar sobre la mezcla (tapar la mezcla) con 50-100 ul de Aceite Mineral.

Para separar los productos de la amplificación del aceite mineral se agregan 100 ul de cloroformo Q.P. La fase acuosa que se forma contiene el ADN amplificado la cual puede ser transferida a otro tubo con una micropipeta automática.

4.- Los productos obtenidos del PCR se someten a una electroforesis para confirmar que el fragmento amplificado sea la secuencia adecuada

PREPARACIÓN DEL GEL PARA ELECTROFORESIS: GEL DE AGAROSA AL 2%.

1.- Se disuelven 2 grs. de agarosa (Agarosa calidad:Molecular Biology Reagent. No. A9539. SIGMA) en 100 mls de bufer TAE (1X) (se obtiene de una dilución 1:10 de la solución Stock de TAE (10X).

2.- Se deja enfriar a temperatura ambiente y cuando se encuentre en una temperatura aproximada de 60°C se agregan 4 ul de bromuro de etidio (10mg/ml).

3.- Se vierte el gel en un molde plástico, evitando la formación de burbujas, se coloca el peine en la cara superior del molde y se deja solidificar a temperatura ambiente en un lugar completamente plano.

Nota: La concentración de agarosa en el gel se selecciona de acuerdo a la longitud de los fragmentos amplificados.

ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS DEL PCR.

1.- Se colocan en los pozos, del gel de agarosa al 2%, los productos amplificados junto con un marcador de peso molecular previamente seleccionado en base a la longitud de los fragmentos amplificados, el cual es pBR322 DNA-BstN I Digest (*303-1, Biolabs) con 6 fragmentos: 1857, 1060, 929, 383, 121 y 13 pb. respectivamente.

Las cantidades colocadas en cada pozo son las siguientes:

De producto Amplificado: El cual se trabaja por duplicado, se colocaron 30 ul + 3 ul de solución de carga.

De pBR322 DNA-BstN I digest: 5 ul + 3n ul de solución de carga. Evitar la pérdida de muestra.

2.- Se coloca el gel junto con el molde en la cámara de electroforesis.

3.- Se colocan los electrodos con el polo negativo del lado del frente y el polo positivo del lado del final de la cámara.

4.- Se agrega el bufer de corrida (TAE [1X1]), evitando tapar el gel.

5.- Correr la electroforesis con una carga de 80 volts y una vez que se vea que la muestra salió del pozo agregar el resto del bufer cuidadosamente.

Tiempo de corrimiento: 2 horas.

6.- Checar el corrimiento tanto de los productos amplificados como del marcador de peso molecular con una lámpara de luz UV.

Posteriormente se fotografía el gel (estando en la lámpara de luz UV). Se checa las bandas obtenidas de los fragmentos amplificados comparando con las bandas del marcador de peso molecular comprobando que corresponden a 500pb.

Una vez que se checa que tanto los reactivos como el aparato funcionan bien, se procedió a realizar el mismo procedimiento con el fin de detectar ADN de muestras biológicas.

* Rogers M.F., D C. Y. Rayfield M, et al N. Engl J. Med. (1989) 320: 1649-1654

F) AISLAMIENTO DE PLASMIDO A GRAN ESCALA

1.- Se crecen 250 ul de cultivo de células transformadas (DH alfa 5/pCP10) en 250 ml. de medio LB con 25ug/ml de ampicilina.

2.- Centrifugar el cultivo en 2 botellas de boca ancha de 250 ml por 10 minutos a 8,000 rpm.

3.- Descartar el sobrenadante.

4.- Los botones se resuspenden (c/u) en 3 ml. de bufer , (25mM TrisCl, 10 mM EDTA, 15% sacarosa) y se pasan a 2 tubos corex de 30 ml.

5.- Incubar el tubo 20 minutos en agua helada (c/hielo).

6.- Agregar 12 ml. del bufer 2 (0.2 M NaOH, 1% SDS). Se mezcla por inversión. NO VORTEX.

- 7.- Incubar en agua helada 10 minutos.
- 8.- Añadir 75 ml. de acetato de sodio 3M. Se mezcla por inversión. NO VORTEX.
- 9.- Incubar en hielo 20 minutos
- 10.- Centrifugar 30 minutos a 11,000 rpm, a 4°C .
- 11.- Recuperar el sobrenadante (± 20 ml.) en tubos de 50 ml. (4 tubos con ± 12.5 ml. c/u).
- 12.- Se agrega a cada tubo 25 ml. de etanol frío y NaCl 4M (25 ul/ul). Se mezcla por inversión.
- 13.- Posterior a eso se incuba a -70°C durante toda la noche.
- 14.- Al día siguiente centrifugar 11,000 rpm, 20 minutos a 4°C.
- 15.- Descartar el sobrenadante y cada botón (4) se resuspende en 2.5 ml de TE. Se deja finalmente 2 tubos de 50 ml. con 5 ml. de solución cada uno.
- 16.- Agregar a cada tubo 50 ul. de RNA sm (1mg/ml.). Se incuba 20 minutos a 37°C.
- 17.- Agregar a cada tubo 11ul de proteinasa K . Se incubó 30 minutos a 37°C.
- 18.- Añadir 1 volumen (25ml) de fenol precalentado a 65°C. se mezcla perfectamente. Después se agrega 1 volumen (2.5 ml) de cloroformo y se mezcla bien. Esto se hace en tubos corex de 15 ml.
- 19.- Se centrifuga 20 minutos a 10,000 rpm a 4°C.
- 20.- Recuperar sobrenadante con tubos corex de 15 ml. y añadir 2.5 volúmenes de etanol helado. Precipitar a -70°C por 30 minutos
- 21.- Centrifugar a 11,000 rpm por 20 minutos a -10°C.

22.- Descartar sobrenadante y disolver la pastilla en 1.6 ml. de DDW.
Añadir 2 ml. de 13% PEG y mezclar.

23.- Incubar en hielo 1 hora

24.- Centrifugar a 10,000 rpm por minutos a 4°C.

25.- Descartar sobrenadante y lavar pastilla con 70% etanol.

26.- Resuspender en 10 ul de TE.

27.- Almacenar a -4°C hasta su uso.

CAPITULO V. TÉCNICAS RELACIONADAS CON EL CULTIVO DE CELULAS Y TEJIDOS.

La validez de los cultivos celulares como un modelo de función fisiológica in vivo es ya bien aceptado. La ventaja de trabajar con líneas celulares es que se puede crear un ambiente que favorece la migración y proliferación celular. El aprovisionamiento de un ambiente apropiado, con nutrientes, hormonas y sustratos es fundamental para funciones especializadas. Sin embargo, las técnicas de cultivos celulares presentan algunas limitaciones, pues restringen el estudio a un solo tipo celular y se evitan las interacciones célula-matriz extracelular.

Las técnicas de cultivo requieren de trabajar bajo condiciones de esterilidad y con el apoyo de un equipo apropiado. La ejecución cuidadosa de las técnicas darán un alto grado de reproducibilidad y esterilidad, lo cual evitará la posibilidad de contaminación durante la propagación y manipulación de las células.

En la actualidad el laboratorio de investigación cuenta con equipo para realizar las técnicas de cultivo de células y tejidos. El uso de estos modelos in vitro en el Departamento de Gastroenterología proporcionarán información suficiente durante el estudio de algunas funciones y características estructurales de células provenientes del tracto gastrointestinal; además, facilitarán no solo la investigación de conductas patológicas sino la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con esta rama de la medicina.

A) HISTOCULTIVO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.

1.- El tejido puede ser obtenido a través de una biopsia de pacientes ó bien de animales de experimentación. Sin embargo cualquiera que sea el origen, debe ser hecha una buena esterilización del sitio de la incisión quirúrgica.

2.- Remover el tejido asepticamente y transferirlo inmediatamente al laboratorio de cultivo de tejidos en una solución de sales balanceadas (BSS= bicarbonato de sodio, glucosa, sales inorgánicas), o bien en medio lo

más rápido posible. De no ser posible esto, puede ser mantenido en refrigeración por unos minutos.

3.- Una vez que el tejido está en el laboratorio de cultivo, se coloca en una caja de petri y con pieza y bisturí se retira todo el tejido conectivo que sea posible a manera que quede solo el tejido de interés a cultivar.

4.- Enjuagar varias veces en una solución de sales balanceadas y colocar el trazo de tejido en un plato de cultivo con un pequeño volumen de medio (10 ml) y altas concentraciones de suero (40-50%). Una vez que se adhiere a la superficie, la migración y proliferación de las células se inician.

5.- En este momento el tejido esta listo para que se realicen los estudios de cuantificación enzimática, hormonal u otros.

6.- Si se desea obtener cultivos primarios celulares de este tejido es necesario el cambiar el medio y suplementarlo con suero y antibióticos.

7.- Una vez haya migrado la suficiente cantidad de células del tejido, se retirará este y se permitirá la proliferación celular.

8.- Cuando las células ocupen el 80% de la superficie del plato se procederá a hacer la propagación celular.

B) CULTIVOS Y MANTENIMIENTO DE UNA LINEA CELULAR HUMANA.

Soluciones:

Suero fetal de bovino, medio mínimo esencial Dulbecco, glutamina 0.1M, tripsina 0.125% y gentamicina. Solucion bufer de fosfatos.

Metodología.

1.- Observar las cajas y ver si existe un crecimiento del 80% de células en la caja, bajo un microscopio invertido.

2.- Encender la campana 30 minutos antes de que se trabaje, limpiar con alcohol y encender gas.

3.- Calentar las soluciones a baño María a 37°C.

4.- Preparar la cantidad de medio que se vaya a utilizar, y suplementarlo con:

Colocar 10 % de FCS, 4mM glutamina, 1 ul /ml de gentamicina.

5.- Lavar las células con PBS, si es una caja de 10 ml usar 2 ml. de PBS. Lavar dos veces, aspirar y tirar soluciones.

6.- Agregar 2 ml. de tripsina dejar que se despeguen las células, dar movimientos circulares a la caja. Hasta que, las células caigan al inclinar el plato.

7.- Lavar en la misma solución el plato y pasar a un tubo cónico.

8.- Tomar 5 ml. de medio preparado y lavar el plato, posteriormente agregar esa solución al tubo cónico.

9.- Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos.

10.- Tirar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 2 ml de medio suplementado. Tomar una alícuota y contar el número total de células, en una cámara de Newbauer.

11.- Colocar en un plato 250,000 células y agregar medio suplementado.

12.- Incubar a 37°C y revisar diariamente las células, bajo microscopio invertido.

C) COLECCION DE EXTRACTOS CELULARES.

1.- Aspirar medio del plato y lavar dos veces con PBS.

- 2.- Agregar 2 ml. de tripsina 0.125% dar movimiento circular hasta que las células caigan al inclinar el plato.
- 3.- Lavar el plato con esa solución y pasar a tubo cónico.
- 4.- Agregar 5 ml. de medio suplementado al plato y lavarlo con medio . Agregar el líquido al tubo cónico.
- 5.- Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos. Posterior a ese tiempo se saca y desecha el sobrenadante. (Se puede tomar alícuota si se desea hacer alguna determinación).
- 6.- Se resuspende la pastilla en PBS y se vuelve a centrifugar.
- 7.- Se aspira el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 50 ul. de triton X-100 al 0.1%.
- 8.- Colocar las muestras en tubos de 1.5 ml. y almacenar en congelación a -70°C.

D) ALMACENAMIENTO DE CELULAS.

- 1.- Aspirar medio y desechar.
- 2.- Lavar dos veces con 5 ml. de PBS, aspirar y desechar.
- 3.- Agregar 2 ml. de tripsina 0.125%, mover el plato en forma circular y cuando las células caigan al inclinar el plato. Pasar el líquido a un tubo cónico.
- 4.- Lavar el plato con 5 ml. de medio suplementado y agregar la solución al tubo cónico.
- 5.- Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos.
- 6.- Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 900 ul de medio suplementado en un criovial. Agregar 100 ul de DMSO y colocar el criovial en hielo.

7.- Almacenar el criovial en nitrógeno líquido o en Revco. -70°C .

E) DETERMINACION DE VIALIDAD CELULAR.

Soluciones:

Sales balanceadas de Hank

Solución azul de tripano: 0.4 % azul de tripano en 0.81% (w/v) de NaCl y 0.06% (w/v) K_2HPO_4

Procedimiento.

- 1.- Preparar una suspensión celular en solución de sales balanceadas de Hanks en una concentración de aproximadamente 5×10^5 cel/ml.
- 2.- Mezclar 0.5 ml. de solución de azul de tripano con 0.5 ml. de la suspensión celular. Esperar 5-15 minutos.
- 3.- Transferir una gota de esa mezcla a una cámara de Newbawer.
- 4.- Contar el número de células no teñidas y el número de células teñidas en una área de 5 cuadrados.
- 5.- El porcentaje de células viables es la relación de no teñidas a el número total de células (teñidas no teñida) contadas.

F) TINCION DE CULTIVOS CELULARES (CON GIEMSA).

- 1.- Remover el medio de la caja de cultivo.

- 2.- Lavar las células en PBS.
- 3.- Agregar una mezcla de metanol y sales balanceadas de Hanks 1:1. Remover la solución.
- 4.- Agregar metanol a las células y dejar por 10 minutos. Remover la solución.
- 5.- Enjuagar las células con metanol, remover la solución.
- 6.- Cubrir las células con tinción de Giemsa y dejarlo por 2 minutos.
- 7.- Retirar el colorante y lavar el cultivo con agua, enjuagar la caja con agua deionizada.
- 8.- Dejar que el plato seque el aire.

G) PREPARACION DE ARN DE CELULAS EN CULTIVO.

Procedimiento.

- 1.- Remover el medio del plato y lavar una vez con bufer salino de fosfato (PBS).
- 2.- Remover el PBS por aspiración y adicionar 1-8 ml de solución GT (Guaridina Tiocianato, N-Lauril-sorcosina de sodio, Citrato de sodio, y beta-mercaptoetanol).
- 3.- Dejar la solución de 2-3 minutos. La solución se hará muy viscosa debido al ADN.
- 4.- Transferir la solución a un tubo de 50 ml.
- 5.- Homogenizar con un politrón durante 15-30 segundos.
- 6.- Enjuagar la sonda entre las preparaciones con agua autoclaveada.

7.- Colocar la capa homogenada con una solución de 1 1/2 ml. de una solución de CsCl (CsCl, EDTA disódica 0.1M, en agua). Esterilizar por autoclave y cuantificar a 30,000 rpm durante 22-24 horas a 20°C.

8.- Remover cuidadosamente la solución superior incluyendo cerca del 20% de la capa de solución CsCl.

9.- Enjuagar las paredes del tubo con 2-3 ml. de la solución GT. Remover esta solución junto con la solución de CsCl (10%).

10.- Remover el resto de solución de CsCl con una pipeta Pasteur, cuidando evitar la pequeña pastilla transparente del ARN en el fondo del tubo.

11.- Resuspender el ARN en 100 ul. de solución GT.

12.- Transferir la solución a tubos de 1.5 ml. previamente esterilizados por autoclave.

13.- Agregar 5 ul. de una solución de ácido acético 1M y 50 ul de etanol, agitar y dejar reposando al menos 2 horas a -80°C.

14.- Centrifugar 5 minutos en nanofuga a temperatura ambiente.

15.- Resuspender la pastilla en 200 ul. de agua.

16.- Agregar acetato de sodio pH 5.5 a una concentración final de 0.2M y agregar 2.5 volúmenes de etanol. Dejar al menos 20 minutos a -80°C.

17.- Centrifugar 5 minutos, resuspender la pastilla en agua.

18.- Determinar la recuperación del ARN por A260
A260 = 35 mg/ml.

19.- Estimar la calidad de ARN por una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Correr cerca de 1ug. por línea. La banda de ARNr 285 debe ser más intensa que el 185 (π 1kb).

La obtención debe ser 50-200 ug. ARN por 10^7 células.

* Turpin E. et al., Biotechniques 4:11 (1986).

CAPITULO VI. TECNICAS RELACIONADOS CON EL ACTIVADOR DEL PLASMINOGENO.

La conservación de plasminógeno a plasmina es un evento clave en muchos procesos fisiológicos y patológicos que requieren de proteólisis extracelular regulada. Degradación focal directa de proteínas involucradas en las interacciones célula-célula o célula-matriz, ya ha sido discutida. De hecho se ha mostrado que se requiere de un control complejo de la cascada enzimática, que se activa tras la acción del activador de plasminógeno. Se sabe que este sistema participa en muchos procesos que requieren movimiento y reorganización de células y matriz extracelular como la ovulación, implantación de trofoblasto, embriogénesis, angiogénesis, así como en los procesos de invasión y metástasis tumoral. De ahí el interés de este laboratorio, abordar en este complejo sistema proteolítico y vincularlo con algunos procesos patológicos del área de la Gastroenterología, por ejemplo la cirrosis hepática, en la que existe un depósito de matriz extracelular en el hígado y en la transformación del hepatocito al fenotipo neoplásico en el carcinoma hepatocelular.

A) EXTRACCION DE ACTIVADOR DE PLASMINOGENO DE TEJIDO.

Procedimiento.

- 1.- Lavar el tejido 3 veces con solución salina de fosfato (PBS).
- 2.- Pesar las muestras y cortar en pequeñas porciones con tijeras
- 3.- Colocar en un homogenizador tipo Dounce y agregar 3 ml. de bufer detergente: acetato (acetato de potasio 0.075M, NaCl 0.3M, EDTA 0.01M , l-arginina 0.1M, triton x-100 0.25% a pH 7.2).
- 4.- Homogenizar las muestras hasta que estén completamente líquidas.
- 5.- Centrifugar a 3000 rpm por 20 min. a 4°C.

6.- Separar el sobrenadante y almacenar a -80°C (esta es la fuente de urokinasa).

B) ANALISIS ELECTROFORETICO DEL ACTIVADOR DEL PLASMINOGENO (ZIMOGRAMA).

La electroforésis en geles de poliacrilamida conteniendo dodecilsulfato de sodio (SDS) ha sido exactamente aplicado para el estudio de los activadores de plasminógeno. Esta técnica se basa sobre la absorción de que la gelatina es un senciible y satisfactorio sustrato para la plasmina y que la gelatina y el plasminógeno son copolimerizados dentro de la matriz del gel de poliacrilamida; ellos se retendrán en la subsecuente electroforesis de muestras con enzimas para proporcionar en sustrato in situ para la actividad del activador de plasminógeno *.

Procedimiento.

1.- Preparar los geles con una mezcla preparada de las siguientes soluciones:

Acrilamida al 30%	3.30 ul.
Tris-HCl 1.5 M con SDS 0.4 %	2.25 ml.
Plasminógeno purificado	0.1 ml
Gelatina 1g%	0.9 ml.
Amonio persulfato 100 mg/ml	0.020 ml.
TEMED	0.010 ml.

2.- Dejar polimerizar a temperatura ambiente. Cuando esta se haya completado preparar el gel concentrador con el peine para colocar las muestras, la mezcla de soluciones debe ser la siguiente:

Acrilamida al 30%	0.2 ml.
Tris HCl 0.5M pH 6.8	0.25 ml.
Persulfato de amonio	0.02 ml.
TEMED	0.01 ml.
agua	1.55 ml.

3.- Adicionar bufer de corrida (0.025 M tris, 0.192M glicina - NaOH pH 8.5, 0.1% SDS), a las cámaras superior e inferior. Agregar las muestras a los canales en un volúmen final de 5-50 ul con un bufer de muestra (2.5% SDS, 1g% sacárosa y 4 ug/ml rojo fenol).

4.- La electroforesis se realiza a 8mA de corriente. Cuando el frente llegue a la parte inferior del gel de resolución se detiene la corriente y se remueve el gel.

5.- Lavar el gel a temperatura ambiente durante 30 minutos en triton al 2.5%.

6.- Retirar el tritón 2.5% y agitar nuevamente con tris-HCl 0.1M pH 8.1.

7.- Incubar a 37°C por 6-12 horas.

8.- Agitar el gel a temperatura ambiente con una solución desteñidora (metanol: ac. acetico: agua) durante 15 minutos.

9.- Posteriormente se fijan y tiñen durante 1 hora con una solución teñidora que contenga metanol: ac acetico: azul de coomassie R-250 y agua.

10.- Agitar nuevamente en una solución desteñidora para que se visualisen las bandas de actividad proteolítica.

* Heussen C., and Dowd E.B. Analytical Biochem. 102: 196-202 (1980).

C) ENSAYOS DE INVASION.

Este ensayo se utiliza para medir la capacidad de las células para atravesar una membrana basal artificial. En este estudio se utiliza una cámara de Boyden modificada a la que se le agrega un extracto comercial de membrana basal (matrigel) para que sirva como una barrera durante la migración de las células . *

Procedimiento.

1.- Colocar en cámaras "transwell" 50 ul. de extracto matrigel. Dejar polimerizar a 37°C para que se forme una capa sobre el filtro del "transwell".

2.- Colocar 10^5 células sobre el extracto de matrigel en medio suplementado. Colocar también medio en la parte inferior de la cámara. Dejar las células que se adhieran al matrigel por un espacio de 5-9 horas.

3.- A las 24 horas retirar el medio de la cámara, así como el matrigel y células

4.- Teñir los filtros con azul de metilo y contar el No. de células que migraron.

* Frandsen T.L. et al. Fibrinolysis 6 (4): 71-76 (1992) .

D) PURIFICACION DE PLASMINOGENO HUMANO.

Procedimiento.

1.- Centrifugar el plasma durante 50 minutos a 7000 rpm.

2.- Precipitar sobrenadante con solución saturada al 20% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por 1 hora.

Preparación: 106 g. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para 1 litro en cuarto frio con agitación.

3.-Centrifugar el sobrenadante por 20 minutos a 9000 rpm. a temperatura fria; dejar en el cuarto frio toda la noche.

4.- Centrifugar durante 20 minutos a 10,000 rpm., filtración.

5.- Pasar sobre una columna de licina=seforasa previamente lavada con 1 litro de 0.05M de bufer de fosfato pH 7.4, en cuarto frio.

6.- Lavar con un volúmen igual de 0.3 M bufer de fosfato pH. 7.4.

7.- Eluir el plasminógeno con un volúmen igual de 0.2M EACA. en bufer fosfato 0.1M. pH 7.4 y coleccionar fracciones.

8.- Leer fracciones a una absorvencia de 280m/m. y almacenarlas.

9.- Liofilizar en porciones de 10 mg. p/g. Después de la ilución del p/g. de la columna, lavarla con 100 ml. 0.1M NaOH y un lit. PBS + 0.02% NaN_3 (Lavar columna)

$$\frac{\text{mg}_p/\text{g}}{1.7} = D. 0280 \times \text{ml}$$

10.- Agregar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 60%.

361 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para 1 litro en el cuarto frio durante 1 hora o sobre la noche.

11.- Centrifugar a 4000rpm. durante 20 minutos.

12.- Disolver la pastilla en 5 ml. de PBS: 4 mg. p/g /ml y dializar toda la noche contra 2 litros de PBS 6 ml P/g

Tratamiento (disopropil fluoro fósforo).

20 ul de DFP 6 M
+ 40 ul de esopropanal.
60 ul.

13.-Tomar 30 ul y agregar a las 6 ml. de p/g. (20mM DFP). dejar por 1 hora a 37°C.

14.- Dializar contra 2 x 1 litro PBS c/u durante 30 minutos en cuarto frio.

15.- Dializar contra 50mM $\text{NH}_4 \text{HCO}_3$ 2 litros durante la noche, 2 x litro cada 2 hora en el cuarto frio.

16.- Almacenar a -4°C hasta su uso. Cuando se vaya a utilizar resuspender un PBS a una concentración de 2 mg/ ml.