

# MANUAL DE PROTOCOLOS

Oscar Medina Contreras

November 6, 2023

## Table of contents

<b>Aislamiento de células de <i>lamina propria</i> intestinal</b>	<b>5</b>
Propósito . . . . .	5
Alcance . . . . .	5
Políticas de operación, normas y lineamientos . . . . .	5
Descripción del Protocolo . . . . .	5
Diagrama de Flujo . . . . .	6
Anexos . . . . .	6
Documentos de Referencia . . . . .	7
<b>Generación de bacterias competentes</b>	<b>8</b>
Propósito . . . . .	8
Alcance . . . . .	8
Políticas de operación, normas y lineamientos . . . . .	8
Descripción del Protocolo . . . . .	8
Diagrama de Flujo . . . . .	9
Anexos . . . . .	9
Documentos de Referencia . . . . .	10
<b>Congelar células</b>	<b>11</b>
Propósito . . . . .	11
Alcance . . . . .	11
Políticas de operación, normas y lineamientos . . . . .	11
Descripción del Protocolo . . . . .	11
Diagrama de Flujo . . . . .	12
Anexos . . . . .	12
Documentos de Referencia . . . . .	12
<b>Conteo y viabilidad celular</b>	<b>13</b>
Propósito . . . . .	13
Alcance . . . . .	13
Políticas de operación, normas y lineamientos . . . . .	13

Descripción del Protocolo . . . . .	13
Diagrama de Flujo . . . . .	14
Anexos . . . . .	15
Documentos de Referencia . . . . .	15
<b>Descongelar células</b>	<b>16</b>
Propósito . . . . .	16
Alcance . . . . .	16
Políticas de operación, normas y lineamientos . . . . .	16
Descripción del Protocolo . . . . .	16
Diagrama de Flujo . . . . .	17
Anexos . . . . .	17
Documentos de Referencia . . . . .	17
<b>Purificación de ADN de geles de agarosa</b>	<b>18</b>
Propósito . . . . .	18
Alcance . . . . .	18
Políticas de operación, normas y lineamientos . . . . .	18
Descripción del Protocolo . . . . .	18
Diagrama de Flujo . . . . .	20
Anexos . . . . .	20
Documentos de Referencia . . . . .	20
<b>Electroforesis de ADN</b>	<b>21</b>
Propósito . . . . .	21
Alcance . . . . .	21
Políticas de operación, normas y lineamientos . . . . .	21
Descripción del Protocolo . . . . .	21
Diagrama de Flujo . . . . .	22
Anexos . . . . .	23
Documentos de Referencia . . . . .	23
<b>Formación de esferoides tumorales</b>	<b>24</b>
Propósito . . . . .	24
Alcance . . . . .	24
Políticas de operación, normas y lineamientos . . . . .	24
Descripción del Protocolo . . . . .	24
Diagrama de Flujo . . . . .	25
Anexos . . . . .	25
Documentos de Referencia . . . . .	25
<b>Tinción para citometría de flujo</b>	<b>26</b>
Propósito . . . . .	26
Alcance . . . . .	26
Políticas de operación, normas y lineamientos . . . . .	26
Descripción del Protocolo . . . . .	26

Diagrama de Flujo . . . . .	28
Anexos . . . . .	28
Documentos de Referencia . . . . .	28
<b>Peritonitis</b>	<b>29</b>
Propósito . . . . .	29
Alcance . . . . .	29
Políticas de operación, normas y lineamientos . . . . .	29
Descripción del Protocolo . . . . .	29
Diagrama de Flujo . . . . .	31
Anexos . . . . .	31
Documentos de Referencia . . . . .	31
<b>Extracción de proteínas totales para espectrometría de masas</b>	<b>32</b>
Propósito . . . . .	32
Alcance . . . . .	32
Políticas de operación, normas y lineamientos . . . . .	32
Descripción del Protocolo . . . . .	32
Diagrama de Flujo . . . . .	34
Anexos . . . . .	34
Documentos de Referencia . . . . .	35
<b>Obtención de células linfoides de pulmón</b>	<b>36</b>
Propósito . . . . .	36
Alcance . . . . .	36
Políticas de operación, normas y lineamientos . . . . .	36
Descripción del Protocolo . . . . .	36
Diagrama de Flujo . . . . .	37
Anexos . . . . .	37
Documentos de Referencia . . . . .	37
<b>Digestión de ADN con enzimas de restricción</b>	<b>38</b>
Propósito . . . . .	38
Alcance . . . . .	38
Políticas de operación, normas y lineamientos . . . . .	38
Descripción del Protocolo . . . . .	38
Diagrama de Flujo . . . . .	39
Anexos . . . . .	39
Documentos de Referencia . . . . .	39
<b>Uso del citómetro de flujo Cytotflex LX</b>	<b>40</b>
Propósito . . . . .	40
Alcance . . . . .	40
Políticas de operación, normas y lineamientos . . . . .	40
Descripción del Protocolo . . . . .	40
Diagrama de Flujo . . . . .	41

Anexos . . . . .	41
Documentos de Referencia . . . . .	41
<b>Transformación bacteriana: choque térmico</b>	<b>42</b>
Propósito . . . . .	42
Alcance . . . . .	42
Políticas de operación, normas y lineamientos . . . . .	42
Descripción del Protocolo . . . . .	42
Diagrama de Flujo . . . . .	43
Anexos . . . . .	43
Documentos de Referencia . . . . .	43
<b>Scratch Wound Healing Assay</b>	<b>44</b>
Propósito . . . . .	44
Alcance . . . . .	44
Políticas de operación, normas y lineamientos . . . . .	44
Descripción del Protocolo . . . . .	44
Diagrama de Flujo . . . . .	46
Anexos . . . . .	46
Documentos de Referencia . . . . .	46
actualizaciones . . . . .	47

# Aislamiento de células de *lamina propria* intestinal

UIEEN-PL-013 BIOLOGÍA CELULAR

## Propósito

Obtener células de lámina propia de intestino de ratón para su análisis posterior.

## Alcance

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que deseen extraer células de lámina propia de intestino de ratón en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

## Políticas de operación, normas y lineamientos

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento.

Los residuos de tipo CRETI (Corrosivos, Reactivos, Explosivos, Tóxicos e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052-SEMARNAT-2005.

El manejo de animales de laboratorio, se debe de realizar según los lineamientos de la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, sobre las especificaciones técnicas para el cuidado, uso y disposición final de productos biológicos, excretas y cadáveres. Así como la norma oficial mexicana NOM-087-ECOL-1995, que establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos, que se generan en establecimientos que presten atención médica.

## Descripción del Protocolo

### Pasos

- Precalentar a 37°C solución de PBS 1X y Solución de Hanks-SFB (5%).
- Eutanasiar a los ratones por dislocación cervical. Una vez muertos los ratones, realizar una incisión abdominal por planos por piel y peritoneo. Separar el intestino delgado del estómago y hacer un corte en el píloro gástrico. Eliminar el

ciego y continuar hasta el recto.

- Extraer cuidadosamente el intestino, retirar el tejido mesentérico adyacente y las placas de Peyer.
- Cortar el intestino longitudinal de extremo a extremo y colocarlo en una bandeja con PBS 1X/37°C y agitar suavemente. Transferir a una nueva bandeja y repetir dos veces el proceso.
- Cortar el intestino en fragmentos de 0.5cm y colocar en un tubo falcón (50ml): EDTA (2mM) en solución de Hanks-SFB (30ml). Agitar a 250 rpm/37°C/20 minutos.
- Remover el tejido y repetir la incubación con soluciones frescas.
- Cortar finamente el tejido en fragmentos de 1mm y agregar collagenasa tipo IV (1mg/ml) y DNasa I (800µg) disueltas en solución de Hanks-SFB (20ml). Poner en agitación continua 200rpm/37°C/10 minutos.
- Pasar la solución por un colador celular de 100µm y colectar la suspensión celular, agregar 20ml de solución de Hanks-SFB frío. Centrifugar 1500 RPM/4°C/5 min.
- Resuspender el botón celular y contar las células en la cámara de Neubauer.

#### Notas

- Es importante mantener las soluciones a 37°C.

## Diagrama de Flujo



Figure 1: Figura

## Anexos

### Soluciones

### Solución de Hanks

Header 1	Header 2
HBSS	4.75g
Bicarbonato de sodio	0.17g
HEPES	1.2g
SFB	25ml
H <sub>2</sub> O	Aforar a 1L

Reactivos

HBSS *Sigma H2387*

## Documentos de Referencia

# Generación de bacterias competentes

UIEEN-PL-005 BIOLOGÍA MOLECULAR

## Propósito

Generar bacterias *E. coli* químicamente competentes de las cepas TOP10 y DH5 $\alpha$  por medio de sales.

## Alcance

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que deseen generar bacterias químicamente competentes en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

## Políticas de operación, normas y lineamientos

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento. Los residuos de tipo CRETI (Corrosivos, Reactivos, Explosivos, Tóxicos e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052- SEMARNAT-2005.

## Descripción del Protocolo

### Pasos

- Picar una colonia de bacterias, cepas TOP10 o DH5 $\alpha$ , y colocar en 15ml de caldo LB (Luria-Bertani) sin antibiótico.
- Incubar a 37°C/200rpm/12-16 hrs.
- Transferir 10ml del crecimiento bacteriano a 200ml de caldo LB estéril sin antibiótico.
- Incubar a 37°C/200rpm y medir la densidad óptica a 600nm cada hora.
- Una vez llegado a una densidad óptica de 0.6 colocar el cultivo bacteriano en tubos falcón de 50ml fríos.
- Centrifugar a 5000rpm/30 minutos/4°C.



- Desechar el sobrenadante y resuspender las bacterias en 10ml de  $\text{CaCl}_2$  0.1M frío.
- Centrifugar 10 minutos/5000rpm/4°C.
- Desechar el sobrenadante y resuspender las bacterias en 10ml de  $\text{CaCl}_2$  0.1M frío.
- Incubar una hora en hielo.
- Centrifugar 5000rpm/10 minutos/4°C y eliminar el sobrenadante.
- Añadir 2ml de  $\text{CaCl}_2$  y 20% glicerol frío.
- Incubar 5 minutos en hielo.
- Preparar alícuotas de 100 $\mu\text{l}$ .
- Congelar inmediatamente en nitrógeno líquido.
- Almacenar a -70°C.

#### Notas

- Todo debe realizarse bajo el mechero en condiciones de esterilidad.
- Todos los reactivos e insumos utilizados deben de ser estériles.

### Diagrama de Flujo



Figure 2: Figura

### Anexos

Soluciones

$\text{CaCl}_2$

Header 1	Header 2
CaCl <sub>2</sub>	11.098g
H <sub>2</sub> O	100ml

Ajustar pH a 7.5 y esterilizar

Reactivos

CaCl<sub>2</sub> *Sigma*

### Documentos de Referencia

@Ramos2014 Manual de “pENTR™ Directional TOPO Cloning Kits” life technologies Current Protocols in Molecular Biology, Section 1.2.1, Supplement 59. Frederick M. Ausubel et al. 2003.

# Congelar células

UIEEN-PL-002 CULTIVO CELULAR

## Propósito

Mantener un cultivo celular *in vitro* en condiciones apropiadas para su crecimiento, propagación o almacenamiento para los fines que se requiera.

## Alcance

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que realicen cultivo celular y que deseen congelar, descongelar, contar y determinar la viabilidad celular en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

## Políticas de operación, normas y lineamientos

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento. Los residuos de tipo CRETI (Corrosivos, Reactivos, Explosivos, Tóxicos e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052-SEMARNAT- 2005.

## Descripción del Protocolo

### Pasos

- Cosechar las células y resuspender en 5ml de medio de cultivo.
- Centrifugar a 1500rpm/5 minutos/4°C.
- Remover el sobrenadante y añadir 1 ml de medio crioprotector.
- Resuspender las células y pasar **inmediatamente** a hielo.
- Guardar a -80°C/24 hrs y posteriormente almacenar en nitrógeno líquido.

### Notas

- Partir de células con una confluencia del 80-90%.
- Congelar a una concentración de  $10^6$ - $10^7$  células/ml.

### Diagrama de Flujo



Figure 3: Figura

### Anexos

#### Soluciones

#### Medio crioprotector

Header 1	Header 2	Concentración
SFB	45ml	90%
DMSO	5ml	10%

#### Nomenclatura

SFB: suero fetal bovino

DMSO: dimethylsulfoxide

### Documentos de Referencia

# Conteo y viabilidad celular

UIEEN-PL-004 CULTIVO CELULAR

## Propósito

Mantener un cultivo de celular *in vitro* en condiciones apropiadas para su crecimiento, propagación o almacenamiento para los fines que se requiera.

## Alcance

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que realicen cultivo celular y que deseen congelar, descongelar, contar y determinar la viabilidad celular en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

## Políticas de operación, normas y lineamientos

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento. Los residuos de tipo CRETI (Corrosivos, Reactivos, Explosivos, Tóxicos e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052- SEMARNAT-2005.

## Descripción del Protocolo

### Pasos

- Limpiar el hemocitómetro con alcohol al 70%. Esperar a que esté seco por completo y colocar el cubreobjetos en la rejilla.
- Mezclar 10  $\mu$ l de una suspensión celular uniforme con 90  $\mu$ l de azul de tripano 0.4%. Incubar 2 min.
- Colocar 10  $\mu$ l de la mezcla bajo el cubreobjetos y observar al microscopio con una magnificación 40x.
- Contar las células sin colorante presentes en los cuadrantes 1, 2, 4 y 5 del hemocitómetro (Fig. 1) sin considerar las células que toquen las líneas.
- Calcular concentración de células:

$$clulas/ml = \frac{clulas * 10^5}{volmen}$$

- Calcular la viabilidad celular

$$viabilidad = \frac{clulas}{total} * 100$$

- Limpiar el hemocitómetro con alcohol 70% y secar.

#### Notas

- 

### Diagrama de Flujo



Figure 4: Figura 1. Hemocitometro



Figure 5: Figura 2. Conteo celular



Figure 6: Figura 3. Viabilidad celular

## **Anexos**

Soluciones

## **Documentos de Referencia**

## Descongelar células

UIEEN-PL-003 CULTIVO CELULAR

### Propósito

Mantener un cultivo celular *in vitro* en condiciones apropiadas para su crecimiento, propagación o almacenamiento para los fines que se requiera.

### Alcance

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que realicen cultivo celular y que deseen congelar, descongelar, contar y determinar la viabilidad celular en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

### Políticas de operación, normas y lineamientos

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento. Los residuos de tipo CRETI (Corrosivos, Reactivos, Explosivos, Tóxicos e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052- SEMARNAT-2005.

### Descripción del Protocolo

#### Pasos

- Colocar un vial de células congeladas en baño maría a 37°C, mover suavemente el vial hasta que las células se descongelen.
- Transferir con una micropipeta el contenido a un tubo falcón 15ml y añadir 9ml de medio de cultivo suplementado (glutamina, antibióticos, 1% piruvato y 10% suero fetal bovino). Centrifugar a 1200rpm/5 minutos/4°C (para lavar y quitar todo el DMSO).
- Desechar sobrenadante y repite dos veces el proceso.
- Resuspender las células en medio de cultivo y transferir a la botella de cultivo.
- Observar las células al microscopio invertido.



- Incubar a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 80% de humedad relativa.
- Cambiar el medio de cultivo según el tipo celular.

#### Notas

- Todo debe realizarse en condiciones de esterilidad.
- Congelar a una concentración de 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> células/ml

### Diagrama de Flujo



Figure 7: Figura

### Anexos

#### Soluciones

Medio crioprotector: 90% suero fetal bovino, 10% DMSO

### Documentos de Referencia

# Purificación de ADN de geles de agarosa

UIEEN-PL-006 BIOLOGÍA MOLECULAR

## Propósito

Extraer fragmentos de ADN de interés de geles de agarosa con el kit GeneJet gel extraction and DNA Cleanup micro kit

## Alcance

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que deseen extraer fragmentos de ADN de geles de agarosa en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

## Políticas de operación, normas y lineamientos

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento. Los residuos de tipo CRETI (Corrosivos, Reactivos, Explosivos, Tóxicos e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052- SEMARNAT-2005.

## Descripción del Protocolo

### Pasos

- Corroborar la presencia del fragmento de ADN de interés.
- Con una navaja de bisturi limpia, cortar la agarosa lo más cercano a la banda de ADN, tratar de adquirir el menor volumen de gel. Se recomienda tener un volumen 200mg.
- Colocar en tubo de centrifuga de 1.5 ml.
- Agregar 200µl de buffer de extracción y mezclar.
- Incubar la mezcla a 50-58°C por 10 minutos o hasta que el gel se encuentre completamente disuelto. Invertir el tubo por unos minutos para facilitar el proceso de fundición.

- Adicionar 200 $\mu$ l de etanol (96-100%) y mezclar.
- Transferir la muestra a la columna de purificación de ADN.
- Centrifugar la columna de 30-60 segundos a 14,000xg, descartar sobrenadante y colocar la columna de purificación de ADN en el tubo de colección.
- Agregar 200 $\mu$ l de buffer de prelavado (suplementado con etanol) a la columna de purificación de ADN y centrifugar por 30-60 segundos a 14,000xg.
- Descartar el sobrenadante y colocar la columna de purificación nuevamente en el tubo de colección.
- Adicionar 700 $\mu$ l de buffer de lavado (suplementado con etanol) a la columna de purificación de ADN y centrifugar de 30-60 segundos a 14,000xg. **Repetir este paso.**
- Descartar el sobrenadante y colocar la columna de purificación nuevamente en el tubo de colección.
- Centrifugar la columna de purificación de ADN 1 minuto a 14,000g para remover por completo el buffer de lavado. Este paso es esencial para remover el etanol en la solución purificada de ADN. La presencia de etanol puede inhibir las reacciones enzimáticas.
- Transfiera la columna de purificación de ADN a un tubo de micro centrifuga 1.5ml limpio.
- Adicionar 10 $\mu$ l de buffer de elución a la columna de purificación de ADN, centrifugar por 1 minuto a 14,000g, para eluir el ADN.
- Descartar la columna de purificación y guardar el ADN purificado a -20°C.

#### Notas

- Si el fragmento de ADN extraído se utilizará en experimentos de clonación, exponer pocos segundos a luz UV o colocar una placa de plástico o vidrio sobre el gel agarosa durante la iluminación con UV.
- Para geles de agarosa 1% prolongar el tiempo de incubación 15 minutos.
- Si el fragmento de ADN es 10kb centrifugar la columna por 2 minutos a 14,000g.
- El volumen recomendado de buffer de elución es 6-10 $\mu$ l, si es 10 $\mu$ l baja el rendimiento de ADN. Si el fragmento de ADN es 10kb el volumen de elución debe incrementar entre 15-20 $\mu$ l para obtener un óptimo rendimiento. No es recomendado un volumen de elución menor 10 $\mu$ l.

## Diagrama de Flujo



Figure 8: Figura

## Anexos

Soluciones

## Documentos de Referencia

@cite Manual de “GeneJet gel extraction and DNA Cleanup micro kit”. Thermo Scientific Current Protocols in Molecular Biology, Section 2.6.1, Supplement 59. Frederick M. Ausubel et al. 2003.

# Electroforesis de ADN

UIEEN-PL-001 BIOLOGÍA MOLECULAR

## Propósito

Separar las moléculas de ADN de acuerdo a su peso molecular a través de geles de agarosa.

## Alcance

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que necesiten separar moléculas de ADN a través de geles de agarosa en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

## Políticas de operación, normas y lineamientos

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento. Los residuos de tipo CRETI (Corrosivos, Reactivos, Explosivos, Tóxicos e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052- SEMARNAT-2005.

## Descripción del Protocolo

### Pasos

- Determinar el porcentaje de gel a preparar en base al tamaño de la molécula de ADN a analizar ([Tabla 1](#)).
- Pesar la cantidad de agarosa requerida para la resolución deseada.
- Disolver en 100ml de TAE 1X. Agitar.
- Calentar la agarosa hasta que se disuelva por completo.
- Agregar 4µl de SYBR Safe 10,000X.
- Sellar completamente la base para preparación de geles de agarosa con cinta adhesiva y posteriormente vaciar la agarosa.

- Colocar el peine y dejar que solidifique la agarosa. Una vez solidificado retirar la cinta adhesiva y el peine y colocar la base dentro de la cámara de electroforesis.
- Agregar 200ml de TAE 1X (cubrir entre 0.5 o 1cm por encima del gel).
- Mezclar las muestras de interés con buffer de carga (6X) y colocar cada una de las muestras en los pozos.
- Colocar el marcador de peso molecular (marcador de peso molecular + buffer de carga 6X) en un pozo.
- Cerrar la cámara de electroforesis y conectar a la fuente de poder.
- Encender la fuente de poder, seleccionar voltaje constante de 100V y migrar durante 20 minutos.
- Analizar el gel en el fotodocumentador utilizando el programa SYBR safe/green (488nm).

#### Notas

- Asegúrese de que no queden burbujas atrapadas debajo de los peines y de ser así, eliminar antes de correr el gel.
- Permitir a la agarosa en polvo hidratarse en la solución durante unos minutos antes de calentar: esto permite una disolución más sencilla, rápida y reduce la formación de espuma.
- Para prevenir el sobrecalentamiento de la agarosa, si se usa un microondas sacar el vaso de precipitados después de 1 minuto y mover cuidadosamente. Volver a colocar dentro del microondas y continuar 1 minuto más. Si se hierve demasiado tiempo puede causar hidrólisis y una menor fuerza de resolución del gel.

@cite 10.1002/9780470089941.et0702s10

#### Diagrama de Flujo



Figure 9: Figura

## Anexos

### Tabla 1

Table 4: Tamaño de ADN y porcentaje de gel

Tamaño	Concentración
>2kb	0.6%
1-2	0.8%
0.5-1	1%
0.2-0.5	1.5%
<0.2	2%

### Soluciones

#### Preparación de TAE

Reactivo	Concentración
Tris	40mM
Ácido Acético	20mM
Na <sub>2</sub> EDTA	1mM
H <sub>2</sub> O	aforar a 1L

### Reactivos

UltraPure Agarose *Thermo*

SYBR Safe *Thermo*

Buffer carga 6X *Promega*

Marcador de peso molecular *Thermo*

TAE 1X *S*

### Documentos de Referencia

# Formación de esferoides tumorales

UIEEN-PL-009 CULTIVO CELULAR

## Propósito

Realizar un cocultivo celular en 3D con células estromales y células leucémicas para los fines que se requiera.

## Alcance

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que deseen realizar cocultivo en 3D en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

## Políticas de operación, normas y lineamientos

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento. Los residuos de tipo CRETI (Corrosivos, Reactivos, Explosivos, Tóxicos e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052- SEMARNAT-2005.

## Descripción del Protocolo

### Pasos

- Contar con un cultivo de células estromales (ejemplo: OP-9, HS5) y un cultivo de células leucémicas (CCRF) por separado.
- Preparar agarosa al 1% (ver protocolo [Electroforesis de ADN](#)), llevarla a ebullición y mantener caliente.
- Preparar una placa de 96 pozos con fondo cóncavo y por columna agregar a cada pozo 100µl agarosa 1%, recubrir el pozo y retirar la agarosa, repetir el proceso para cada pozo de la columna.
- Dejar una columna sin recubrir de agarosa y agregar antibiótico al 1%.
- Repetir los dos pasos anteriores para recubrir toda la placa (Fig. 1).
- Realizar el conteo celular de las células estromales.



- Sembrar 10,000 células por pozo en 100 $\mu$ l de medio, tratar de no mover la placa hasta el siguiente día.
- Una vez formada la esfera colocar 10,000 células leucémicas y nuevamente esperar un día sin mover la placa.
- Después de dos días observar en el microscopio invertido, el esferoide debe estar formado.

### Diagrama de Flujo



Figure 10: Figura

### Anexos

Soluciones

### Documentos de Referencia

@cite Shain KH, Dalton WS, Tao J. 2015. The tumor microenvironment shapes hallmarks of mature B cell malignancies. *Oncogene* 34:4673-4682.

# Tinción para citometría de flujo

UIEEN-PL-011 INMUNOENSAYOS

## Propósito

Realizar una tinción de superficie e intracelular de células linfoides de ratones de la cepa CD57 para su posterior análisis por citometría de flujo.

## Alcance

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que deseen Realizar una tinción de superficie e intracelular de células linfoides de ratones de la cepa ¿??? para su posterior análisis por citometría de flujo en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

## Políticas de operación, normas y lineamientos

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento. Los residuos de tipo CRETI (Corrosivos, Reactivos, Explosivos, Tóxicos e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052- SEMARNAT-2005. Se debe de dar seguimiento a la norma oficial mexicana NOM-087-ECOL-1995, que establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos, que se generan en establecimientos que presten atención médica.

## Descripción del Protocolo

### Pasos

- Tinción de viabilidad
  - Agregar  $1.5 \times 10^6$  células en tubos para citometría de flujo, centrifugar a 1500rpm/4°C/5 minutos.
  - **Lavar:** Agregar 3ml de PBS 1x. Centrifugar a 1500 rpm/4°C/5 minutos. Decantar el sobrenadante.
  - Agregar la tinción de viabilidad e incubar 30 minutos/obscuridad/4°C.

- Lavar.
- Tinción de superficie
  - Resuspender las células en 200 $\mu$ l de buffer de FACS.
  - Agregar 2 $\mu$ l gama globulinas humanas e incubar 20 minutos/obscuridad/4°C.
  - Agregar anticuerpos de superficie titulados, incubar 30 minutos/obscuridad/4°C.
  - **Lavar:** Agregar 3ml de buffer de FACS. Centrifugar a 1500 rpm/4°C/5 minutos. Decantar el sobrenadante.
  - Agregar solución fijadora (500 $\mu$ L), incubar 20 minutos/obscuridad/4°C.
  - Lavar.
  - Resuspender las células en 200 $\mu$ l de buffer de FACS.
  - Analizar la muestra inmediatamente o en los 2 días posteriores a la tinción.
- Tinción intracelular
  - Realizar tinción de superficie.
  - Resuspender las células en 1ml de buffer de permeabilización.
  - **Lavar:** Agregar 3ml de buffer de permeabilización. Centrifugar a 1500 rpm/4°C/5 minutos. Decantar el sobrenadante.
  - Agregar anticuerpos intracelulares e incubar 30 minutos/obscuridad/4°C.
  - Lavar.
  - Resuspender en 200 $\mu$ L de solución fijadora.
  - Analizar la muestra inmediatamente o en los 2 días posteriores a la tinción.

#### Notas

- Conservar las muestras teñidas en refrigeración hasta realizar el análisis.

## Diagrama de Flujo



Figure 11: Figura

## Anexos

### Soluciones

#### Solución de FACS

Header 1	Header 2	Header 3
PBS	490ml	98%
SFB	10ml	2%

#### Nomenclatura

SFB: suero fetal bovino

PBS: buffer de fosfatos

#### Documentos de Referencia

# Peritonitis

UIEEN-PL-016 MODELOS ANIMALES

## Propósito

Texto

## Alcance

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que Texto en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

## Políticas de operación, normas y lineamientos

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento. Los residuos de tipo CRETI (Corrosivos, Reactivos, Explosivos, Tóxicos e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052- SEMARNAT-2005.

## Descripción del Protocolo

### Pasos

- Disuelva 10 mg de zymosan de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma Z4250) en 50 ml de PBS estéril y luego diluya 10 veces para obtener una solución de trabajo de 20 mg/ml.
- Autoclave a 121°C durante 20 min.
- Mantenga el zimosan esterilizado en autoclave en hielo.
- Inyectar 0,5 ml de zymosan i.p. (10 mg/cavidad peritoneal del ratón; mezcle zimosan inmediatamente antes de la inyección para garantizar una suspensión uniforme) con una aguja 25G 5/8.
- Esperar 4 h.
- Sacrificar ratones por exposición a dióxido de carbono.

- Realice una pequeña incisión (~0,5 cm) a lo largo de la línea media del abdomen que permita retirar la piel para exponerla el abdomen, que luego se rocía con etanol al 70%.
- Inyecte 3 ml de solución de lavado de PBS/EDTA 2 mM helada con una jeringa y una aguja de 25G 5/8.
- Masajee suavemente el abdomen del ratón con la longitud de una aguja de 1½ de 18G para asegurarse de que las células sueltas adheridos a la pared peritoneal u otros órganos se desprenderán y quedarán suspendidos en el líquido de lavado.
- Use una aguja 18G 1½ para extraer suave y lentamente el líquido de lavado de la cavidad peritoneal. Transfiera el líquido a un tubo de centrifuga de 15 ml y manténgalo en hielo. Es posible que no obtenga los 3 ml debido a los volúmenes muertos en el peritoneo.
- Transferir 200µl células a un tubo cónico de 15 mL, centrifugar y desechar el sobrenadante.
- Teñir las células con los anticuerpos apropiados (CD45-PerCP, F4/80-PE/Cy7, Ly6G-APC) durante 15 min en hielo.
- Lavar las células con tampón de tinción, seguido de resuspensión en 300µl de buffer de tinción. Agregar 30µl de perlas de conteo (30,000 partículas)
- Ejecutar en el flujo.
- Conocemos el número total de cuentas, por lo que los números absolutos de celdas se pueden calcular en relación con las cuentas. Debe multiplicar 15 veces, ya que de 3 mL se utilizaron 200 µl de exudado. (Número absoluto de celdas) = (recuento de celdas) / (recuento de perlas) X 30 000 X 15

## Notas

- Lista
- @cite  
@Ramos2014  
@cite Wooki

## Diagrama de Flujo



Figure 12: Figura

## Anexos

Soluciones

Reactivos

- Zymosan de *Saccharomyces cerevisiae* [Sigma Z4250](#)

## Documentos de Referencia

# Extracción de proteínas totales para espectrometría de masas

UIEEN-PL-012 PROTEÓMICA

## Propósito

Extraer las proteínas totales de las muestras de interés para su posterior análisis en el espectrometro de masas.

## Alcance

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que deseen extraer proteínas totales de alguna muestra de interés para su posterior análisis en el espectrometro de masas en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

## Políticas de operación, normas y lineamientos

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento. Los residuos de tipo CRETI (Corrosivos, Reactivos, Explosivos, Tóxicos e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052-SEMARNAT-2005.

## Descripción del Protocolo

### Pasos

- Lisis
  - Se tiene que considerar que partiendo de una cantidad de 3 millones de células se obtiene aprox. 50µg de proteína. Transferir las células a un tubo falcon y centrifugar a 3500 RPM/ 5 min/ 4°C, retirar el sobrenadante.
  - Lavar 2 veces el botón celular con PBS (1X; 4ml/frío).
  - Recuperar el botón celular y añadir buffer de extracción de lisis (300µl), resuspender la muestra y transferir a un tubo eppendorf.
  - Sonicar 20 pulsaciones a media potencia (1 pulso:1 seg; descanso: 1 seg; en frío), evitar tocar las paredes del tubo).
- Reducción y alquilación



- Incubar 30 min/40°C. Añadir Tris (90 $\mu$ l, pH 8.6).
  - Agregar IAM (1M; 78 $\mu$ l), incubar TA/oscuridad/ 30 min.
- Precipitación de proteínas
  - Tomar 100 $\mu$ l del lisado y agregar 4 volúmenes acetona 99.5% (400 $\mu$ l).
  - Incubar toda la noche a -20°C. Lavar el botón obtenido con acetona al 95% (200 $\mu$ l), resuspender con vortex y centrifugar a 14 000 RPM/15°C/10 minutos, retirar sobrenadante. Realizar dos veces. Descartar el sobrenadante y secar el botón a TA/~5 minutos.
- Determinación de proteínas Resuspender el botón de proteínas en NH HCO (50mM; 20 $\mu$ l) y CHAPS 5% (20 $\mu$ l). Agitar en vortex, no tocar la tapa del tubo (5 minutos). Agregar urea (4M; 20 $\mu$ l), agitar en vortex 5 minutos. Cuantificar proteína por Bradford: 300 $\mu$ l del reactivo + 10 $\mu$ l de muestra. Leer la absorbancia a una longitud de onda de 595nm, extrapolar el dato obtenido en una curva estándar de proteína disuelta en NH HCO (50mM; 20 $\mu$ l) y CHAPS 5% (20 l), para obtener la concentración de proteína del lisado total. Con base al dato obtenido del lisado celular, volver a precipitar solo el volumen necesario para obtener 50 $\mu$ g de proteína. Resuspender el botón de proteínas en NH HCO (50mM; 20 $\mu$ l) y GndCl (50mM; 100 $\mu$ l). Agitar en vortex, no tocar la tapa del tubo (5 minutos).
- Digestión de las proteínas Añadir tripsina a una concentración 1 g/ l, agitar suavemente. Incubar a 37 °C y en agitación por 18hrs. Transcurrido el tiempo acidificar la muestra agregando TFA que quede con un volumen final al 0.1%.
- Desalado con SEP PAK C18 Preparar solución A: Agua Milli Q/TFA (0.1%) y solución B: Acetonitrilo/Agua Milli Q/TFA 60:40:0.1. La muestra debe tener un pH2-3 sino acidificar la muestra con ácido fórmico o trifluoroacético (pH 2-3). Activar la columna con 2ml de solución B (hacer pasar el volumen por una micropipeta o jeringa). Equilibrar la columna con 3ml de solución A. Pasar por la columna la muestra (en un volumen no menor de 500 $\mu$ l, si se tiene menos agregar solución A) dos veces y despacio; goteo no mayor a una gota por segundo. Desalar con 5ml de solución A (eluir despacio). Eluir con 500 $\mu$ l de solución B, recuperar el eluato y volverlo a pasar por la columna. Agregar 500 $\mu$ l más de solución B a la columna (hacerlo pasar solo una vez), para obtener un volumen final de 1ml. Congelar la muestra (20 min a -80) y secar al vacío. Congelar los péptidos secos antes de ser analizados. Al momento de analizar resuspender en 50  $\mu$ l agua ácida (FA 0.1%).

## Notas

- Si el número de células 10 millones, agregar buffer de extracción de lisis (500 $\mu$ l).

- Los pasos consecutivos se tienen que realizar si se tiene 3 millones de células; si hay una cantidad menor de células: primero precipitar todo el lisado, saltar los pasos siguientes hasta determinación de proteínas y resuspender el botón de proteínas en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (50mM; 20μl) y GndCl (50mM; 100μl) y continuar con la digestión de proteínas.

@cite Geiger, T., Wehner, A., Schaab, C., Cox, J. & Mann, M. Comparative proteomic analysis of eleven common cell lines reveals ubiquitous but varying expression of most proteins. Mol. Cell. Proteomics 11, M111.014050 (2012). @cite Aasebo EMØ, Vaudel M, Farag Y, Selheim F, Berven F, et al. Freezing effects on the acute myeloid leukemia cell proteome and phosphoproteome revealed using optimal quantitative workflows. J Proteomics. )2016).

## Diagrama de Flujo



Figure 13: Figura

## Anexos

### Soluciones

### Buffer de extracción

First Header	Second Header
SDS	4%
DTT	100mM
Tris	100mM, pH 8.6
Inhibidores de proteasas	1X
H <sub>2</sub> O	117μl

## **Nomenclatura**

CHAPS 3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1- propanosulfato DTT: ditioneitol GndCl: cloruro de guanidinio IAM: iodoacetamida  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  : bicarbonato de amonio SDS: dodecil-sulfato sódico TA: temperatura ambiente TFA: ácido trifluoroacético

## **Documentos de Referencia**

# Obtención de células linfoides de pulmón

UIEEN-PL-008 BIOLOGÍA CELULAR

## Propósito

Extraer células linfoides de pulmón de ratón para los fines que se requiera.

## Alcance

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que Texto en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

## Políticas de operación, normas y lineamientos

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento. Los residuos de tipo CRETI (Corrosivos, Reactivos, Explosivos, Tóxicos e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052- SEMARNAT-2005. El manejo de animales de laboratorio, se debe de realizar según los lineamientos de la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, sobre las especificaciones técnicas para el cuidado, uso y disposición final de productos biológicos, excretas y cadáveres. Así como la norma oficial mexicana NOM-087-ECOL-1995, que establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos, que se generan en establecimientos que presten atención médica.

## Descripción del Protocolo

### Pasos

- Eutanasiar a los ratones (BALB/C o C57BL6) mediante dislocación cervical. Perfundir los pulmones con PBS 1X, removerlos y colocarlos en PBS 1X / SFB (5%). Disgregar el tejido con RPMI, SFB al 2%, colagenasa (1mg/ml) y DNasa I (1mg/ml). Mantener en agitación a 250 rpm por 11 minutos a 37°C. Pasar las células por una membrana de nylon de 40-70 micras de diámetro, recolectar y lavar con PBS1X. Eliminar los eritrocitos con solución de lisis eritrocitario por 5 minutos/37°C. Lavar las células con PBS1X 1500 RPM /4°C / 5 minutos y

resuspender las células en PBS1x (2ml; frío).

@cite Valle-Rios, R. et al. Isthmin 1 is a secreted protein expressed in skin, mucosal tissues, and NK, NKT, and th17 cells. J. Interferon Cytokine Res. 34, 795--801 (2014).

### Diagrama de Flujo



Figure 14: Figura

### Anexos

Soluciones

### Documentos de Referencia

# Digestión de ADN con enzimas de restricción

UIEEN-PL-007 BIOLOGÍA MOLECULAR

## Propósito

Utilizar enzimas de restricción para cortar en un sitio específico del ADN de interés.

## Alcance

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que deseen cortar un fragmento sitio específico de DNA para su uso posterior en otros experimentos en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

## Políticas de operación, normas y lineamientos

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento. Los residuos de tipo CRETI (Corrosivos, Reactivos, Explosivos, Tóxicos e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052- SEMARNAT-2005.

## Descripción del Protocolo

### Pasos

- En un microtubo estéril agregar: Buffer de Enzima (10X) 2 $\mu$ l BSA acetilado 10 $\mu$ g/ $\mu$ l 0.2 $\mu$ l ADN 1 $\mu$ g/ $\mu$ l 1 $\mu$ l Enzima de restricción 1 U H<sub>2</sub>O Volumen final 20 $\mu$ l
- Centrifugar por unos segundos. Incubar a 37 °C 1-4hrs.
- Analizar en gel de agarosa.

### Notas

- Este ensayo se ha probado para un volumen de sustrato de ADN 0.2-1.5 $\mu$ g, usando un exceso de enzima 2-10 veces sobre la cantidad ADN usado. Si se usa un contenido grande de DNA o enzima, se pueden obtener resultados erróneos.

@cite Manual de HindIII. Promega Corporation

## Diagrama de Flujo



Figure 15: Figura

## Anexos

Soluciones

## Documentos de Referencia

# Uso del citómetro de flujo Cytoflex LX

UIEEN-PL-015 EQUIPOS

## Propósito

Texto

## Alcance

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que Texto en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

## Políticas de operación, normas y lineamientos

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento. Los residuos de tipo CRETI (Corrosivos, Reactivos, Explosivos, Tóxicos e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052- SEMARNAT-2005.

## Descripción del Protocolo

### Pasos

- Lista

### Notas

@cite 10.1002/9780470089941.et0702s10



## Diagrama de Flujo



Figure 16: Figura

## Anexos

Soluciones

## Documentos de Referencia

# Transformación bacteriana: choque térmico

UIEEN-PL-010 BIOLOGÍA MOLECULAR

## Propósito

Incorporar con eficiencia un vector exógeno a la cepa bacteriana TOP10, DH5 $\alpha$  o BL21 por choque térmico

## Alcance

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que deseen realizar transformación bacteriana de las cepas bacterianas TOP10, DH5 $\alpha$  ó BL21 en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

## Políticas de operación, normas y lineamientos

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento. Los residuos de tipo CRETI (Corrosivos, Reactivos, Explosivos, Tóxicos e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052- SEMARNAT-2005.

## Descripción del Protocolo

### Pasos

- Mezclar 3 $\mu$ l del vector exógeno con un vial de bacterias competentes.
- Incubar 30 minutos en hielo.
- Incubar 60 segundos a 42°C.
- Incubar 2 minutos en hielo.
- Añadir 200 $\mu$ l de medio SOC, e incubar 37°C/200rpm/1hr.
- Plaquear en agar LB con antibiotico de selección.
- Incubar 12-16hrs a 37°C.

@cite Manual de “pENTR™ Directional TOPO Cloning Kits” de Invitrogen.

## **Diagrama de Flujo**



Figure 17: Figura

## **Anexos**

Soluciones

## **Documentos de Referencia**

# Scratch Wound Healing Assay

UIIEN-PL-020 CULTIVO CELULAR

## Propósito

Desarrollar ensayos de herida en líneas celulares epiteliales.

## Alcance

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que *blah blah blah* en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

## Políticas de operación, normas y lineamientos

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento. Los residuos de tipo CRETI (Corrosivos, Reactivos, Explosivos, Tóxicos e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052- SEMARNAT-2005.

## Descripción del Protocolo

### Pasos

- Immortalized human keratinocytes (HaCat) were cultured in DMEM/Hams F12 medium supplemented with bicarbonate, an antibiotic-antimycotic, and 10% FBS (GIBCO), at pH 7.2. Cells were sown in treated culture plates (75 cm<sup>2</sup>) (Nest), and cultured at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub>. Medium was changed every third day. When the keratinocytes were 80% confluent in the culture plate, they were harvested for the assays. Cell harvest was done by extracting medium with a sterile pipette, washing with PBS (pH 7.2), extracting the buffer and adding 3 ml 0.05% trypsin EDTA. The plate was incubated at 37 °C for 4 mins to activate the enzyme and disrupt cell-cell and cell-matrix interactions. Cell detachment was confirmed with an inverted microscope. Because FBS inhibits trypsin-EDTA and therefore its activity, 5 ml medium was added to the box. The total volume in the plate was recovered and placed in a 15 ml tube (Nest). After centrifuging at 1500 rpm for 5 mins, the supernatant was removed and 1 ml medium added. The tube

was mixed gently to disperse the cells. Cell counts were done using 10  $\mu$ l of this mixture in a manual hemocytometer and expressed as cells in 1 ml. Based on the cell counts, calculations were done of the amount of medium (ml) required per ml cell-containing medium, considering the number of cells to be sown in each well and well volume (ml).

- For the assay, a keratinocyte density of  $5 \times 10^4$  cells in 300  $\mu$ l medium per well was used. This was placed in each well of treated 48-well plates (Nest), the plate was incubated and growth monitored until 80% confluence was attained. This was achieved 24 h after sowing, at which time the wound was made in the cells. The culture medium was removed from each well and two washes done using 300  $\mu$ l fresh, sterile PBS 1X 7.2. During the second wash, a scratch wound was made in the cells using a 1 ml pipette tip (blue) by applying enough force to disrupt the cells without damaging the plastic. The PBS 1X pH 7.2 was removed and a third wash done to remove as much debris as possible, after which PBS was placed over the cells.
- Quantification of cell wound healing in the presence of the peptide fractions was done by adding them to the wounded cells and monitoring the healing process. A negative control (medium alone) and positive control (10 ng/mL EGF; GIBCO) were used. Fractions (hydrolyzed collagen minor of 3 kDa and peak 2) were dissolved in culture medium (12% DMEM/HAMS) at a 3.5 mg/ml concentration. The PBS in the well was removed, and the fractions and controls added to the wells. Six replicates were done per control and per fraction. The plates were incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The healing process was monitored at 24 after wound induction (time zero, 0 h), and the experiment stopped when any of the controls or fractions exhibited 90% healing. Images were taken at 0 and 24 by placing a plate under an inverted, phase-contrast microscope (10X) equipped with a digital camera. A positive control was added into the in vitro assay, rh-fgf-b (thermo Fisher) as well as control without wound and a control of wound with only media.
- Using the images, healing rate was measured using the Tscratch software (Gebäck, Zurich, Switzerland).<sup>14</sup> Images were analyzed per condition, per time point, and means and standard deviations calculated. A Student's t-test was applied to analyze the results; significance was set at  $P < 0.05$ .

•

## Notas

- Pico 2 menor de 3 kda Se pesaron 3.5 mg / ml (mililitros de medio) Al final en 300  $\mu$ l debe haber una concentración de 0.2 mg /ml

$$V_1 C_1 = V_2 C_2 \quad V_1 = [\text{No pozos} \times 300] [0.2 \text{ mg/ml (C2)}] \quad 3.5 \text{ mg /ml (C1)}$$

$$V_2 = (\text{Número de pozos} \times 300 \text{ ul medio})$$

Control sin herida Control con herida y solo medio Control + Factor crecimiento (  $3\mu\text{l/ml}$  de medio) rh-fgf-b thermo Fisher. Puesto que no teníamos otro factor Muestras: pico 2 proveniente de col hidrolizado menor de 3 kda, colágeno hidrolizado menor de 3 kda

### Diagrama de Flujo



Figure 18: Figura

### Anexos

Soluciones

### Documentos de Referencia

@cite 10.1002/9780470089941.et0702s10

## actualizaciones

versión		Elaboró	Revisó
2023.04	inicial	Oscar Medina Contreras	Oscar Medina Contreras
2024.01	a ctualización	Oscar Medina Contreras	Oscar Medina Contreras