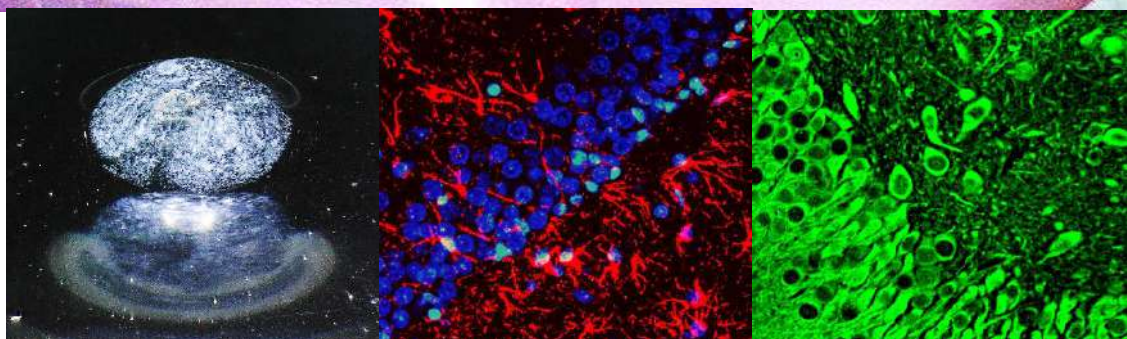


Laboratorios de

Investigación en Biotecnología Médica

Aspectos funcionales y diseño



EDITOR:

N. Emmanuel Díaz Martínez



Laboratorios de Investigación en Biotecnología Médica
Aspectos funcionales y diseño
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco,
A.C.

EDITOR:

Dr. N. Emmanuel Díaz-Martínez

Investigador

Biotecnología Médica y Farmacéutica

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Primera edición

D.R. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco

Av. Normalistas No. 800 Colinas de la Normal. Gdl., Jal., 44270

ISBN: 978-607-96619-6-0

Diseño de portada: Dr. N. Emmanuel Díaz-Martínez

Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio

sin la autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales.

Printed and made in Mexico.

AUTORES:

Abel Gutiérrez Ortega
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Alba Adriana Vallejo Cardona
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Alexei Fedórovish Licea Navarro
Departamento de Innovación Biomédica
Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

Alejandro Arturo Canales Aguirre
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Alfredo Ignacio Feria y Velasco
Departamento de Biología Celular y Molecular
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, U. de G.

Alma Cecilia Bou Schreiber
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Ana Laura Márquez Aguirre
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Ana Paola Gutiérrez Ordoñez
Departamento de Innovación Biomédica
Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

Ángel Eduardo Absalón Constantino
Departamento de Biología Molecular
Instituto Politécnico Nacional

Ángel Hilario Álvarez Herrera
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Armando Erick Elizondo Quiroga
Centro Regional de Investigación en Salud Pública
Instituto Nacional de Salud Pública

Benjamín Macuil Rojas
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México

Carlos Cesar Bravo Reyna
Departamento de Cirugía Experimental
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

Darwin Eduardo Elizondo Quiroga
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Eduardo Padilla Camberos
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Emmanuel Díaz Martínez
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Erika Elizabeth León Acosta
Departamento de Innovación Biomédica
Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

Erika Nahomy Marino Marmolejo
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Héctor Ariel Rico Morales
Unidad de Experimentación Animal, Conjunto E Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

Ikuri Álvarez Maya
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Johanna Bernáldez Sarabia
Departamento de Innovación Biomédica
Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada

Jorge Bravo Madrigal
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Mario Alberto Flores Valdez
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Moisés Martínez Velázquez
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Mónica Alejandra Anaya Segura
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Néstor Fabián Díaz Martínez
Departamento de Biología Celular
Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”

Ofelia Yadira Lugo Melchor
Unidad de Servicios Analíticos y Metrológicos
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Rodolfo Hernández Gutiérrez
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Sara Elisa Herrera Rodríguez
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Sergio Sandoval Ávila
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Tanya Amanda Camacho Villegas
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Ulises Alfonso Gómez Pinedo
Instituto de Neurociencias
Hospital Clínico San Carlos

Yanet Karina Gutiérrez-Mercado
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Zaira Yunuen García Carvajal
Biotecnología Médica y Farmacéutica
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Inocencio Higuera Ciapara
Director General
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

CONTENIDO:

Prólogo **XV**

Dr. Mario Alberto Flores Valdez

Dr. N. Emmanuel Díaz Martínez

Dr. Inocencio Higuera Ciapara

Capítulo I

Área de Biología Molecular

- Implementación de un área de síntesis y secuenciación de DNA

Ikuri Álvarez, Mónica Anaya & Yadira Lugo

Introducción; Secuenciación de ADN **1**

Secuenciación Masiva **3**

Practicas Generales de Secuenciación Masiva: Secuenciación enzimática de Sanger **4**

Métodos de amplificación **7**

Los equipos de secuenciación **8**

Diseño de un Laboratorio de Secuenciación Masiva **13**

Problemas en la implementación de un Laboratorio de Secuenciación Masiva **14**

Referencias **24**

Capítulo II

Área de Biología Celular

- Proyección de un laboratorio para la investigación en células troncales humanas

Fabián Díaz, Cecilia Bou, Benjamín Macuil, Carlos Bravo, & Emmanuel Díaz

Antecedentes y origen **25**

Introducción **25**

Puntos a considerar cuando se inicia con un laboratorio de investigación en células troncales humanas	26
Estándares de calidad	26
Normatividad y Reglamentación	28
Ubicación del Laboratorio	39
Diseño del Laboratorio. Especificaciones	40
Equipo	43
Prácticas Generales en el Laboratorio de Cultivo Celular	45
Cultivo celular, crio preservación y Banco de Células	46
Contaminación de los cultivos celulares	49
Registros y bitácoras sugeridas	49
Registro de reactivos y consumibles	50
Entrenamiento requerido para el uso del laboratorio de cultivo celular	50
Monitoreo	51
Referencias	52

Capítulo III

Área de Inmunología

- Desarrollo de un laboratorio para el estudio del Sistema Inmunológico

Sara Herrera, Ángel E. Absalón, Rodolfo Hernández & Ángel H. Álvarez

Introducción. Inmunología	54
Objetivo de un laboratorio de inmunología	56
Tipos de laboratorios de inmunología	56
Infraestructura básica de un laboratorio de inmunología enfocado a la investigación; diseño estructural	58
Capital humano del laboratorio de inmunología en investigación: responsables	60
Perfiles que debe cumplir el personal de laboratorio; Director técnico científico del laboratorio	61
Aseguramiento de la calidad en los laboratorios	62

Sistema de gestión de calidad	63
Implementación de control de calidad en los procesos analíticos	66
Procesos de verificación y/o calibración de equipos e instrumentos	67
Documentación de los procesos	68
Manejo de muestras: obtención de muestras	69
Aspectos regulatorios: Normatividad en el manejo de laboratorios	71
Estrategias de competitividad: certificaciones y acreditaciones	72
Referencias	73

- Diseño racional de vacunas

Mario A. Flores

Introducción	76
Construcción de una cepa de Mycobacterium bovis BCG recombinante como candidato contra tuberculosis latente	77
Desarrollo de nuevas vacunas contra tuberculosis a nivel mundial	78
Desarrollo de vacunas contra tuberculosis en CIATEJ	79
Referencias	81

- Desarrollo de vacunas contra garrapata de ganado bovino

Moisés Martínez

Introducción	83
Desarrollo de nuevas vacunas contra garrapatas a nivel mundial	84
Desarrollo de vacunas contra garrapatas en CIATEJ	85
Referencias	87

- Evaluación de dos cápsides potivirales expresadas en Escherichia coli como adyuvantes o acarreadores de epítomos para el desarrollo de vacunas subunitarias contra dos enfermedades virales porcinas

Abel Gutiérrez

Introducción. El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino y el circovirus porcino tipo 2	88
Vacunas disponibles contra el PRRSV y PCV-2	88
Desarrollo de nuevas vacunas subunitarias en CIATEJ contra PRRSV y PCV-2 basadas en cápsides potivirales	88
Mezcla TEV CP y proteína quimérica PRRSV	89
Conclusiones	91
Fusión genética PRSV CP y epítipo C-terminal PCV-2	92
Conclusiones	92
Referencias	94

Capítulo IV

Área de Microbiología

-Puesta en marcha de un laboratorio de experimentación microbiológica

Jorge Bravo, Erika N. Marino & Yadira Lugo

Introducción	96
Objetos y tipos de laboratorios de microbiología	97
Infraestructura básica de un laboratorio de microbiología	99
Diseño estructural	99
Equipamiento	102
Capital humano del laboratorio	106
Sistema de gestión de calidad	108
Relación cliente-laboratorio	111
Manejo de muestras	113
Administración de recursos del laboratorio	114
Ejecución sistemática de procedimientos: problemas durante el procesamiento de muestras	115
Niveles de bioseguridad	116
Estrategias de competitividad	117

Referencias	126
-------------	-----

-Elementos básicos en el diseño y operación de un laboratorio de bioseguridad nivel III

Johanna Bernáldez, Erika León, Ana P. Gutiérrez, Tanya Camacho & Alexei Licea

Introducción	128
Barreras de contención primaria	129
Barreras de contención secundaria	137
Principios básicos en el diseño de un laboratorio de contención	137
Equipos	144
Proceso de desinfección	147
Confinamiento de residuos peligrosos	148
Vigilancia médica y sanitaria	150
Documentación	151
Conclusiones	152
Referencias	153

Capítulo V

Área de Nanotecnología

- Consideraciones básicas para un laboratorio de nanotecnología aplicada a la salud

Tanya Camacho, Alba Vallejo & Zaira García

Introducción	154
Definición de nanotecnología y nanomedicina	154
Sistemas de liberación de fármacos	156
Alcances de la nanomedicina en la liberación de fármacos	159
Puesta en marcha de un laboratorio para síntesis y caracterización de nanopartículas aplicadas a la nanomedicina	160
Centros de Investigación de nanotecnología en México	168

Normativa y nanotecnología	169
Regulaciones nacionales e internacionales aplicadas a la nanotecnología	170
Conclusiones	180
Referencias	182

Capítulo VI

Área de Neurociencias

- Definición de las condiciones necesarias para la investigación en el Sistema Nervioso Central

Yanet K. Gutiérrez, Sergio Sandoval, Alfredo Fera, Ulises Gómez, Alejandro Canales & Emmanuel Díaz

Introducción	188
Especificaciones del laboratorio	188
El objetivo del trabajo a desarrollar	189
Equipos del laboratorio de neurociencias; Área de cirugía y equipo estereotáxico	190
Prácticas generales en el laboratorio; fijación y corte de cerebro de rata	198
Entrenamiento requerido para trabajar en el laboratorio de neurociencias	203
Bitácoras del laboratorio	204
Referencias	205

Capítulo VII

Área de Bioterio

- Consideraciones para el desarrollo de una investigación con modelos animales

Ana L. Marquez, Eduardo Padilla, Yanet Gutiérrez, Eduardo Rico & Emmanuel Díaz

Introducción	212
Puntos a considerar cuando se inicia con un bioterio: tipo de bioterio	212
Normatividad y reglamentación	213
Ética en el manejo de animales	214

Diseño del bioterio: localización y ubicación	215
Prácticas generales en la experimentación animal: confinamiento primario	224
Técnicas experimentales: analgesia y anestesia	231
Administración de fluidos y sustancias	233
Toma de muestras	238
Procedimientos quirúrgicos y cuidados durante la cirugía	243
Eutanasia	244
Personal involucrado: funciones y responsabilidades del responsable del bioterio	246
Entrenamiento y capacitación	247
Programa interno de cuidado y uso de los animales	248
Subprograma de evaluación médica y medicina preventiva	248
Subprograma de salud y seguridad ocupacional	249
Referencias	253

Capítulo VIII

Área de Insectario

- Diseño de un laboratorio de investigación para vectores transmisores de enfermedades (insectario)

Darwin Elizondo, Armando Elizondo

Introducción	255
Puntos a considerar en la puesta en marcha de un insectario. Objetivo(s) del trabajo a desarrollar	255
Normatividad y reglamentación	256
Diseño del insectario: especificaciones	257
Equipo y mobiliario en las diferentes áreas de un insectario: área de larvas	259
Prácticas en el tema de alimentación sanguínea de insectos (hematofagia)	260
Consumibles básicos en un insectario	263
Prácticas generales en insectarios	263

Del campo al insectario, generación de colonias artrópodos de importancia medica: generalidades	263
Protocolos básicos de laboratorio para establecer las colonias de Artrópodos	266
Referencias	276

PRÓLOGO

La biotecnología tiene como propósito fundamental obtener productos de valor para el ser humano, a través del aislamiento, purificación, manipulación y en algunos casos, el adecuado uso de organismos vivos o sus partes, típicamente en el rango celular y/o molecular, y en años recientes incluso a escala nanométrica. Entre los primeros productos documentados que se originaron por la biotecnología y que han acompañado a la humanidad, tenemos a la cerveza, el vino y el pan.

A raíz de la introducción en la década de los 70's del siglo XX, de herramientas que permitieron la manipulación a nivel genético (Ingeniería Genética), el potencial de aplicación de productos obtenidos a través de la biotecnología se incrementó exponencialmente. Entre las áreas de utilidad más prometedoras se encontraron las relacionadas al área de la salud y es lo que en esta obra entendemos como Biotecnología Médica y Farmacéutica.

Como parte natural de ciclo de vida de cualquier organismo, éstos se ven expuestos a una gran variedad de estímulos y retos que debe sortear para continuar su existencia en un estado de equilibrio; en términos sencillos, podemos pensar en que los desajustes conducen a padecimientos o enfermedades. En este mismo tenor, gracias a la biotecnología médica y farmacéutica, es posible contar con nuevos métodos, herramientas y productos que detecten (diagnóstico), corrijan (terapia) y en el mejor de los casos, prevengan (vacunas) los efectos nocivos derivados del desequilibrio a nivel celular o molecular. Estos enfoques también pueden combinarse, como en el caso de la teranóstica (terapia y diagnóstico al mismo tiempo). Merced a que estos desarrollos tienen como fin fundamental aplicarse o beneficiar al ser humano, es preciso que se realicen bajo ciertas directrices, prácticas, con cierto nivel de entrenamiento y dentro de instalaciones que garanticen la eficacia y seguridad de uso, tanto para quienes los generan como para quienes serán sus beneficiarios finales.

En esta obra, hacemos un recuento de la experiencia ganada en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ, A.C.) precisamente durante la implementación y puesta en marcha de las líneas de investigación en biotecnología médica y farmacéutica, lo que ha implicado en términos de creatividad por un lado y apego a prácticas estandarizadas por otro, buscando el balance que permita generar - con imaginación y creatividad - estrategias para atender las necesidades de salud del país, a la vez de atender con rigor las disposiciones regulatorias nacionales e internacionales.

Confiamos en que esta obra será de amplio beneficio para los investigadores y/o empresarios interesados en este fascinante campo del conocimiento humano.

Mario A. Flores, Emmanuel Díaz & Inocencio Higuera

Este libro fue conducido bajo el auspicio del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, (CIATEJ) A.C. Se agradece el apoyo y la ayuda de cada investigador que con su experiencia y conocimiento contribuyó a la realización y culminación de esta obra intelectual. Cada autor es responsable de la información contenida en este texto.

Este trabajo fue impreso gracias al financiamiento del proyecto interno de Red de Biotecnología Aplicada a la Salud (clave 1006000001).

Implementación de un área de síntesis y secuenciación de DNA

Ikuri Álvarez, Mónica Anaya & Yadira Lugo

INTRODUCCIÓN; Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN es el proceso de la determinación de una secuencia de nucleótidos de ciertas moléculas de ADN - desde un segmento corto de una sola molécula, tal como una región reguladora o un gen, hasta colecciones de genomas enteros. En la década de 1970, las primeras secuencias de ADN se obtuvieron a través de técnicas extremadamente laboriosas. Un ejemplo es la secuenciación de un par de docenas de bases del *lac operator* (Gilbert y Maxam, 1973). La primera revolución en el campo de la secuenciación del ADN se llevó a cabo en la segunda mitad de la década de 1970 con métodos diseñados por Allan Maxam y Walter Gilbert (Maxam y Gilbert, 1977) así como por Frederick Sanger y colaboradores (Sanger, 1977). Ambas técnicas incrementaron en gran medida el rendimiento de la secuenciación del ADN. El método de Maxam Gilbert y colaboradores, sin embargo, era más complejo e implicó el uso de productos químicos riesgosos. El método de Sanger, por otra parte, ofrece una mayor eficiencia global después de una serie de optimizaciones, en particular por la sustitución de material radioactivo para teñir los nucleótidos por el uso de la electroforesis capilar en lugar de geles. Esta técnica dominó la secuenciación de ADN en las siguientes décadas y condujo a la determinación de una secuencia de referencia del genoma humano completo al comenzar el nuevo milenio (El Genoma Humano Consorcio Internacional de Secuenciación 2001; Venter, 2001).

Sin embargo, el método de Sanger continua manteniendo algunas desventajas: en general, el proceso es laborioso, y consume mucho tiempo y reactivos, lo que implica mayores gastos. Los costos de la secuenciación del genoma de Craig Venter (Levy, 2007), por ejemplo, utiliza una plataforma automatizada de Sanger, y se estima en 70 millones de dólares (Metzker, 2010). Esto dio lugar a la investigación y la ingeniería de métodos alternativos y más eficientes en la década del 2000 - la llamada Secuenciación de la Siguiete Generación (NGS; del inglés Next Generation Sequencing) o métodos de secuenciación de segunda generación. Su diseño es más eficiente, en particular con respecto a la mano de obra y los reactivos, por lo que la competencia entre diversos proveedores ha provocado una caída constante en los costos de secuenciación desde la introducción de estas tecnologías (Mardis, 2008).

Tecnologías de secuenciación de siguiente generación

Numerosas plataformas NGS (Metzker Pareek, 2011) se han puesto en marcha. Las tres primeras plataformas, que en la actualidad siguen siendo las más prevalentes, son en orden cronológico: el 454 (Margulies, 2005) que es un enfoque de la pirosecuenciación basada en matrices, Illumina (Bentley, 2006) que es otro método de secuenciación por síntesis y SOLiD (Valouev, 2008) la realización de secuenciación por ligación. Sin entrar en detalles de los métodos individuales algunas de las características fundamentales que comparten son los siguientes:

1. Amplificación sin plantilla molde con emulsión de PCR o amplificación en fase sólida.
2. Inmovilización de moldes para algún tipo de estructura sólida, que permite el procesamiento masivo en paralelo.
3. La obtención de imágenes de los nucleótidos incorporados en las moléculas sintetizadas (secuenciación por síntesis) o hibridación de sondas en los moldes (secuenciación por

ligación). Las plataformas como Pacific Biosciences (Eid, 2009) o Helicos (Helicos BioSciences Corporation) generalmente omiten la etapa de amplificación y utilizan moldes de una sola molécula. Sin embargo, otros métodos, tales como el de Oxford Nanopore (Oxford Nanopore Technologies Ltd), emplean también secuenciación de una molécula, y además interrogan la molécula directamente; y no a través de la síntesis o la hibridación complementaria (Adessi, 2000).

El impacto de la Secuenciación de la Siguiente Generación

La opción de la secuenciación de grandes cantidades de ADN bajó el costo en forma considerable, lo que ha sido muy afortunado para la genómica y ha dado lugar a la promoción y el establecimiento de varias sub-disciplinas.

El principal conductor para la secuenciación económica del genoma a gran escala ha sido el sector médico. La compilación de catálogos detallados de alelos de enfermedades humanas subyacentes ayudarán a diseccionar sus mecanismos y dará lugar a un mejor tratamiento, en particular haciendo posible la medicina personalizada (Hingorani, 2010). Tradicionalmente, el descubrimiento de variantes se realizaba mediante la secuenciación de un pequeño grupo de individuos. Estas variantes se utilizaron para construir los chips de ensayo que hicieron económicamente factible la determinación del genotipo de miles de individuos adicionales. Tales datos de variación fueron empleados con éxito en varios estudios de casos y controles a gran escala (Wellcome Trust Case Control de Consorcio 2007, 2010; Barrett, 2008). Esta estrategia, sin embargo, sólo puede capturar variantes comunes y, además carece de un sesgo en el muestreo. La secuenciación a gran escala de miles de individuos puede proporcionar un catálogo detallado de la variación humana a muy bajas frecuencias alélicas. La recopilación de dichas fuentes de densa variación de todo el genoma en los seres humanos es precisamente el objetivo del proyecto Genomas 1000 (The 1000 Genomes Project Consortium 2010) y el proyecto UK10K (The UK10K Project). Con la caída de los costos de secuenciación, la genotipificación está desplazando el enfoque tradicional, y se está dirigiendo a la secuenciación del genoma.

Además de su implicación en la asociación con las enfermedades, la secuenciación de todo el genoma de los individuos también se está beneficiando enormemente a los estudios de genética de poblaciones. Los datos del proyecto 1000 Genomas ya han sido utilizados para inferir las tasas de mutación (Conrad, 2011) y los tiempos coalescentes (Li y Durbin, 2011) en los seres humanos.

Los bajos costos de la secuenciación de todo el genoma también han llevado recientemente a la secuencia de las múltiples cepas de organismos del modelo animal. Por ejemplo, se han reportado las secuencias de 17 cepas puras de ratones de laboratorio (Keane, 2011). Como resultado, hay un extenso catálogo de variación de genotipos que proporciona un recurso extremadamente valioso para el estudio de las asociaciones genotipo-fenotipo. Otro ejemplo es la secuenciación del genoma de la rata espontáneamente hipertensa (Atanur, 2010).

La viabilidad de la secuenciación masiva de todo el ADN contenido en una compleja muestra ambiental ha establecido el campo de la metagenómica. Estudios recientes remarcables han sido por ejemplo la reconstrucción del genoma del Neandertal, un homínido extinto, a partir de muestras de huesos fósiles (Green, 2010) y la secuenciación de un catálogo de genes microbianos del intestino humano (Qin, 2010). Uno de los objetivos finales de la secuenciación del medio ambiente es transferir la información extraída de los genomas de los organismos a las formas de vida sintéticas. Estos podrían ser diseñados

de diversas maneras para beneficiar a la humanidad y reducir los problemas ecológicos, que sirve como medicina, combustible o fertilizante por nombrar algunas aplicaciones. Un último ejemplo de esta lista no muy exhaustiva de la secuenciación de alto impacto de bajo costo del ADN es el desarrollo de varios ensayos de lectura de alto rendimiento que ahora se utilizan de forma rutinaria. En particular, se trata del chip-Seq para el interrogatorio del genoma completo del DNA-a-Proteína (Johnson, 2007), y el RNA-Seq para el análisis de transcriptomas (Mortazavi, 2008). Otros ensayos que se basan en la secuenciación del ADN en alguna etapa son metilo-Seq para analizar el estado de metilación del ADN (Brunner, 2009) y el DNase-Seq (Crawford, 2006) junto con el FAIRE-Seq (Giresi, 2007) para identificar regiones en el genoma que se caracterizan presentar la cromatina abierta.

Secuenciación Masiva

Los nuevos instrumentos de secuenciación hacen que sea posible generar rápidamente grandes cantidades de datos de secuencia sustancialmente a menor costo. Estas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento (por ejemplo Roche 454 FLX, Life Technology SOLiD, Dover Polonator, Helicos Heli Alcanse e Illumina Genome Analyzer) hacen que la secuenciación del genoma, la resecuenciación, secuenciación de transcripción al igual que la cuantificación de la expresión génica, así como las interacciones proteína-ADN y la metilación de ADN sea viable a una escala imprevista. En el campo de la genómica evolutiva, la secuenciación de alto rendimiento permite estudios de genomas enteros de especímenes antiguos de diferentes grupos de homínidos. Además, ha permitido estudios a gran escala de genética de poblaciones de seres humanos en la actualidad, así como diferentes tipos de secuencia basada en estudios de genómica comparativa de primates. Estas comparaciones de seres humanos con los simios y homínidos directamente relacionados son importantes no sólo para comprender mejor los orígenes del hombre y el fondo biológico de lo que distingue a los seres humanos, aparte de otros organismos, sino también para la comprensión de las bases moleculares de las enfermedades y trastornos, en particular las que afectan exclusivamente características de los humanos, tales como trastornos del habla, autismo o la esquizofrenia.

Las tecnologías de alto rendimiento actuales tienen una tasa de error promedio de 1/25 a 1/1,000, que es considerablemente mayor a la tasa 1/10,000 a 1/100,000 observado para la secuencia de Sanger de alta calidad de las lecturas. Además, actualmente se utilizan protocolos aleatorios de dispersión para la inmovilización de moldes de secuenciación en lugar de las perlas u otras superficies sólidas que pueden causar señal mixta en las lecturas. La mayoría de los errores en los nuevos instrumentos se originan a partir del umbral y de la señal de detección. Pero además, la tasa de error aumenta sustancialmente con la posición en la secuencia debido a las reducciones del daño a la molécula y eliminación gradual, un proceso en el que no todas las copias de la molécula se extienden por igual en cada paso de secuenciación.

Los avances tecnológicos en secuenciación hacen atractivo utilizar un enfoque basado en la secuenciación para identificar y cuantificar el transcriptoma de una célula en lugar de utilizar matrices que se limitan al análisis de las transcripciones específicas conocidas en el momento del diseño. Además, desde las tecnologías basadas en la hibridación que son bastante sensibles a polimorfismos en la región de las transcripciones, los estudios inter-especies fueron siempre un reto con matrices con especial procedimientos de análisis que tienen que ser aplicadas para evitar sesgos de especies, por ejemplo, sondas de enmascaramiento con diferencias en las especies consideradas. A pesar del protocolo de Expresión Génica Digital descrito por Illumina que supera las limitaciones de un diseño estático, así como la hibridación y sesgos de GC observados para las tecnologías de la

matriz, las características específicas de este tipo de datos también complican el análisis. Por otro lado, el problema del mapeo de miles de millones de lecturas de grandes genomas de referencia ha estimulado el desarrollo de algoritmos de mapeo muy eficientes. Hoy en día, es posible generar alineaciones, de alta cobertura precisa de grandes genomas, tales como el genoma humano, en cuestión de días. Sin embargo, todavía se requiere una buena cantidad de potencia de los equipos de cómputo, lo que podría no estar disponible para todos. Por lo tanto, todavía hay una necesidad de crear aún más algoritmos eficientes de tiempo que aumenta la precisión de alineación. El uso de una referencia para guiar las alineaciones reduce la complejidad y exigencias computacionales, sino que también introduce un sesgo de referencia. El sesgo de referencia puede ser laborioso, pero sigue siendo manejable el tiempo que se realiza. Como el montaje de novo, hay cuestiones importantes en el mapeo de repeticiones y duplicaciones comunes, que requiere más tiempo lee e inserte tamaños, así como la precisión de resolver. Sin embargo, incluso con longitudes de lectura de 1 kb se estima que más de 1,5% del genoma humano no puede ser cubierto únicamente. La secuenciación masiva en paralelo ha proporcionado a los investigadores herramientas valiosas para su uso en estudios de transcriptómica, metagenómica y epigenéticos. El paso más fundamental para todas estas aplicaciones, junto con las aplicaciones más tradicionales de resecuenciación y la variante de descubrimiento, es la alineación a un genoma de referencia o el montaje de novo para proporcionar un contexto para el creciente número de aplicaciones de análisis de secuencias de ADN aguas abajo, por ejemplo, el genotipado y cuantificación de los niveles de expresión génica.

Prácticas Generales de Secuenciación Masiva: Secuenciación enzimática de Sanger

A mediados de 1970, Frederick Sanger y colaboradores secuenciaron el primer genoma completo, se trataba del bacteriófago ϕ X174, el cual tiene aproximadamente 5 kb, con un método llamado "plus and minus" mismo que fue mejorado por el mismo grupo de investigación, esta mejora también supero a otra metodología enunciada por Maxam y Gilbert, que emergió poco antes, pero fue considerada más laboriosa, requería de mayor tiempo y conseguía menos pureza, por ende el método de Sanger evolucionó y prácticamente, precedió a las metodologías actuales para secuenciar ADN.

El método de secuenciación enzimática de Sanger, también es llamado terminación de la cadena o didesoxi, debido a que, además de usar dinucleótidos convencionales (dNTPs), también usa sus análogos; didesoxinucleótidos (ddNTPs), que son dNTPs modificados, en lugar de contener un grupo 3'-hidroxilo (-OH) en la desoxirribosa tienen un hidrogeno (H), impidiendo la formación del enlace fosfodiéster, por lo tanto, se realiza una elongación incompleta y estos ddNTPs se posicionan en el final de una cadena recién sintetizada, ya que no se puede seguir elongando, con ello se consiguen fragmentos de diferente tamaño debido a que la localización de ddNTPs es específica según el nucleótido al que se están pareando.

La realización de una reacción con una cadena molde, los cuatro dNTPs, un iniciador (pudieron sintetizar el iniciador o primer, cuando Sanger y colaboradores implementaron la técnica, ya que se conocía la secuencia de ciertas proteínas del bacteriófago) y ADN polimerasa (En el caso del grupo de Sanger, se usó el fragmento Klenow de la polimerasa I de *E. coli*), más la inclusión de ddTTPs, produce una mezcla de ADN recién sintetizado, dicha mezcla, como ya se explicó, contendrá diferentes residuos de ADN, de diferentes tamaños, ya que de manera azarosa, los residuos llegaron a diferentes interrupciones, por ejemplo, según se vaya uniendo un ddTTP (2',3'-didesoxitimidina trifosfato) a la cadena en

síntesis, en el lugar de un dTTP, de igual manera con los ddNTPs restantes (ddATP, ddGTP y ddCTP).

Además si las ddTTPs están marcadas con ^{32}P , y se da lugar a una consecuente separación electroforética, en geles de poliacrilamida, es posible visualizar, mediante autoradiografía, la mezcla de residuos como un patrón de bandas ordenadas según su tamaño, siendo que los residuos o fragmentos más pequeños migran más rápido que los de mayor tamaño, y cada uno de los fragmentos puede ser separado de los contiguos, los cuales podrían aun diferir, en tamaño, sólo por un nucleótido. Si se realiza el mismo proceso para la misma cadena molde en reacciones separadas donde cada una incluya uno de los ddNTPs restantes, entonces se puede conocer el orden completo de los nucleótidos que componen a la cadena molde.

Después de más de una década de que esta innovadora técnica se publicará, avances importantes continuaron hasta la automatización de la secuenciación Sanger. Dentro de los más importantes se encuentran los siguientes, el descubrimiento y descripción de una enzima nueva que sintetiza ADN; el establecimiento de la estructura que conforma el ADN, en 1953, la revelación de la Taq polimerasa, la cual es aislada de *Thermus aquaticus* y lo más importante, es que es termoestable y el uso de la misma en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), desarrollada por Mullis y colaboradores, en 1990, la cual permite amplificar un fragmento de ADN de forma exponencial, debido a los múltiples ciclos de cambios de temperatura que se programan. Al mismo tiempo, ya se había logrado el marcaje de ADN con fluoróforos, lo cual permitió evitar el uso de compuestos radioactivos, sustituyendo así el ^{32}P , por cuatro diferentes moléculas que podían etiquetar o macar el ADN y con ello detectar la base que termina el fragmento, es decir, el ddNTP responsable de la terminación, es también el ddNTP que lleva la marca fluorescente. Sin olvidar avances tecnológicos en el campo de la informática y el almacenamiento de datos.

No obstante, se realizó una reacción basada en la terminación específica para cada base con cuatro diferentes fluoróforos, así los fragmentos que terminan con una adenina emiten luz en el espectro a diferente longitud de onda que los que terminan con una timina, guanina o citosina y así con cada terminación, los fragmentos se pasan por un tubo de gel de acrilamida (ahora un capilar) para su separación electroforética, con esto y la detección de luz que se acopló a una computadora, la cual va procesando y registrando, se lograron desarrollar máquinas automatizadas, con la capacidad determinar la secuencia de miles de pares de bases por día.

Con el aprovechamiento de la electroforesis capilar basada en la secuenciación Sanger, los científicos han adquirido la práctica de esclarecer información genética de cualquier sistema biológico, el uso de termocicladores para reacciones PCR y equipos automatizados para realizar la electroforesis capilar permiten a una reacción de secuenciación Sanger, diestramente automatizada. En el año 2003, se hizo posible la detección de 96 o hasta 384 reacciones de manera simultánea con este sistema, y sin que la calidad disminuya, se pueden secuenciar 700-800 pares de bases (pb) por reacción. Aún más, es considerado como el método más preciso, en nuestros días, la tecnología de Sanger sigue siendo el estándar de oro para secuenciar, incluso el método Sanger es utilizado para confirmar nuevas mutaciones que han sido identificadas por tecnologías NGS, las cuales han emergido para dar solución a la producción a mayor escala (masiva) de secuencias, sobretodo en la mejora de aprovechamiento de tiempo y costo.

Secuenciación de Segunda y Tercera Generación

Las tecnologías de secuenciación de segunda y tercera generación, son las afamadas tecnologías masivas y paralelas, y han iniciado una revolución en las ciencias genómicas, incluso han superado lo enunciado por la ley de Moore, se han generado diferentes sistemas en relativamente, muy poco tiempo. Permiten secuenciar desde una gigabase (Gb) hasta alcanzar el orden de una terabase (Tb), dependiendo el instrumento. Además, siendo que fueron más de 10 años lo que tardó secuenciar y analizar el primer genoma humano con electroforesis capilar basada en Sanger, con tecnologías NGS es posible obtener más de cinco genomas humanos en una semana, y el precio decreció de los millones a los miles de dólares, aun secuenciando más genomas.

Por otro lado, con algunas excepciones, dichas tecnologías pueden leer fragmentos más cortos que secuenciadores capilares acoplados con tecnología Sanger. Esta desventaja es debido a la señal generada frente a ruido, analizar los datos se vuelve un mayor reto a cambio de generar tantas lecturas. En contraste, a esa desventaja, más aplicaciones son encontradas en estos instrumentos, por ejemplo, cada lectura digital, de un secuenciador de detección masiva y paralela, se origina de un fragmento de la biblioteca, es decir se puede contar literalmente, el número de lecturas de un ARN mensajero (mARN).

Otra gran ventaja que han traído estas nuevas tecnologías, es que están implementadas de tal hecho que consideran alineamientos de las secuencias generadas, para que a pesar de que la fragmentación fue al azar, si se conoce el orden de la secuencia. Dicho evento se logra porque los adaptadores contienen una etiqueta. Así, si se conocen alrededor de las últimas 100 bases de una secuencia y se alinean perfectamente con las primeras 100 de otra, se sabe que es la continuación, y es sucesivo con las siguientes secuencias que componen la muestra. Además, con los genomas de referencia, se logra corroborar los resultados.

En la mayoría de los sistemas el primer paso es construir una biblioteca genómica, en días actuales, es más sencillo, rápido y asequible lograr una biblioteca genómica, ya que no hay necesidad de un intermediario como *E. coli* o siquiera de clonación. En este argumento, una biblioteca genómica se define como una muestra de ADN de interés fragmentada al azar, ya sea por medios físicos o enzimáticos. El fin es obtener fragmentos pequeños, entre 100 y 800 nucleótidos de longitud, según el sistema.

El siguiente paso de ligación, in vitro y de manera flanqueante, oligonucleótidos se unen a los fragmentos de ADN generados en la biblioteca, esos oligonucleótidos son llamados adaptadores, a menudo adaptadores universales de ligación, ya que suelen ser de un solo tipo. Dichos adaptadores a su vez tienen secuencias complementarias a otros oligonucleótidos, aquellos que van a iniciar la amplificación de las secuencias fragmentadas, y en si la propia secuenciación, una vez que las secuencias fragmentadas de la muestra se han unido a los adaptadores, las secuencias complementarias de los adaptadores hibridan con los oligonucleótidos iniciadores y entonces, el ADN es amplificado clonalmente por PCR, ya sea por una PCR emulsión (ePCR), PCR puente o amplificación empleando polonio, al mismo tiempo con estrategias de liberación de compuestos químicos, terminación cíclica reversible o marcaje, se va captando la luz que se desprende al momento que los nuevos nucleótidos hibridan, dicho sistema óptico se combina con un procesador para determinar el orden de los nucleótidos.

Otra elemento en común que tienen estos sistemas, es la agrupación, los amplicones que se van generando clonalmente, se agrupan y cada grupo queda separado de los otros

grupos de amplicones. En algunos sistemas, existen lavados intermedios para eliminar las bases nucleotídicas que no hibridaron.

Entonces, en lugar de consumir tiempo clonando, eligiendo colonias, amplificando y aislando el ADN, en un solo día, es posible obtener la biblioteca genómica, con sus fragmentos ligados a los adaptadores, purificados, amplificados y además de cuantificar la biblioteca generada, existiendo cientos de millones de fragmentos de ADN listos para ser secuenciados en paralelo. Estos pasos de preparación son equivalentes para todas las tecnologías mencionadas, químicamente variando en la amplificación y detección. Adicionalmente se omite la fragmentación cuando se opta por el uso de productos de PCR, procediendo directo a la ligación, según la aplicación que busquemos.

La amplificación de la biblioteca y detección de la amplificación varían según la tecnología, la amplificación en general es clonal, ya sea generada en una nanoesfera o en una placa de vidrio, comenzando de una sola copia de un fragmento para obtener cientos de miles, la amplificación es necesaria para producir una señal suficiente que pueda ser detectada en tiempo real, realizando una ePCR o una PCR puente, las cuales son expuestas a continuación. Mientras que la detección, que es más propia de cada sistema, se abordará de manera delimitada, adyacente a las especificaciones de cada instrumento.

Métodos de amplificación

En la secuenciación masiva y paralela existen, diferentes tipos de amplificación con resultados equiparables, la enzimática, también llamada secuenciación por síntesis, y la que es por ligación, y sin olvidar a la amplificación in situ, utilizada por los equipos de tercera generación (Mitra y Church, 999).

Amplificación enzimática

Este tipo de amplificación es dirigida por una polimerasa. Con cualquier tipo de amplificación enzimática, puede ocurrir un suceso llamado "jackpotting", que significa que algunos fragmentos de la biblioteca amplificarán con preferencia, sin embargo, este evento puede aminorarse o ajustarse, repitiendo las lecturas con el mismo inicio y fin, aumentando la cantidad de ADN inicial.

PCR emulsión

La ePCR es generada en microreactores de emulsión agua y aceite, donde se contiene la biblioteca genómica, nanoesferas magnéticas (beads) y el mix necesario para que una PCR convencional suceda. Un microreactor idóneo contiene un solo fragmento, una sola nanoesfera, primers y el mix PCR. A uno de los extremos de los fragmento se une el primer, y al otro, un adaptador universal. El siguiente paso es desnaturalizar el fragmento de doble cadena, con ello se obtiene una cadena sencilla. Las nanoesferas están cubiertas por una secuencia que puede hibridar con el adaptador universal que ya se unió a los fragmentos de la biblioteca, dicha secuencia se encuentra unida a la superficie de las nanoesferas, mismo hecho que permite la alineación del fragmento de cadena sencilla con el adaptador de la nanoesfera, que va a permitir la amplificación clonal.

Como ya se mencionó, la polimerasa dirige la amplificación clonal, en este caso, extendiendo la cadena complementaria desde la nanoesfera hasta el sitio del primer. El paso subsecuente es una nueva desnaturalización, que separa a la cadena original de la nanoesfera y dejando a la recién sintetizada unida por un enlace azúcar-fosfato a la nanoesfera. A continuación, se realiza una nueva alineación de la cadena en sentido reversa a un nuevo sitio de hibridación para el adaptador, además un primer es unido a la

cadena recién sintetizada, esto da pie a que la extensión continúe, dependiendo del sentido de la cadena sucede el sentido de la amplificación. Se realizan, aproximadamente, 60 ciclos que abarcan desnaturalización, alineación y extensión.

Se estima que el 15% de los microreactores tienen reacciones exitosas. Sin embargo a pesar del volumen de una sola copia se amplifican clonalmente miles de copias del fragmento de AND, después de romper la emulsión, los nanoesferas son tratados con un desnaturalizante que remueve las cadenas que no se unieron.

PCR puente

Para continuar con este tipo de PCR, generalmente, se hace uso de la sonicación para obtener los fragmentos que constituirán la biblioteca genómica, una vez unidos los adaptadores flanqueantes a los fragmentos, se realiza una electroforesis en gel para seleccionar los fragmentos que se encuentran entre 200 y 300 pb, esa parte del gel es cortada, a esos fragmentos seleccionados son hibridados con primers que permiten la amplificación. Después de un lavado, los fragmentos de la biblioteca se van uniendo al azar, a los fragmentos se han unido adaptadores flanqueantes, que a su vez se unirán a los iniciadores.

Se realiza en una placa de vidrio, que contiene carriles independientes, y cada carril es un canal cubierto con dos tipos de oligonucleótidos, uno de ellos es complementario a uno de los adaptadores que flaquean el fragmento, para que pueda iniciarse la amplificación, una vez que se han formado la doble cadena, se continua con un paso de desnaturalización y la cadena molde original es removida por lavados, el adaptador queda libre y se une al segundo tipo de oligonucleótido o iniciador formando un puente, de ahí el nombre, así la polimerasa puede generar la parte complementaria de la cadena formando un puente de doble cadena. La doble cadena se separa, quedando una sola cadena en cada uno de los iniciadores unidos a la placa de vidrio y quedando uno de los adaptadores, esa región libre permite que se repita el proceso una y otra vez.

Ya que se formaron grupos de amplificadas clonales, las cadenas reversa son escindidas y removidas por lavado, dejando solo las cadenas forward, y los primers que ya no son necesarios son bloqueados, dentro del adaptador que queda sin unión a la placa, hay un iniciador de secuenciación, así es como inicia la primer lectura de bases, ya que al unirse la base complementaria se excita con una fuente de luz y se emite una señal fluorescente específica para cada especie de base. El mismo proceso ocurre con las cadenas reversa, después de haber obtenido las cadenas en sentido forward.

Cada grupo en la PCR puente consiste en alrededor de 1000 amplicones clonales. Varios millones de grupos pueden ser secuenciados en una ubicación distinta en uno de los ocho carriles independientes. Por lo cual pueden secuenciarse ocho bibliotecas independientes en una sola corrida.

Los equipos de secuenciación

Estos sistemas tecnológicos recientemente desarrollados, se clasifican prácticamente como NGS o de segunda o tercera generación, en esta última no se requiere de una amplificación para que una señal se capte, si no que una sola cadena sencilla de ADN es suficiente para que se determine su secuencia, con ello se evita el jackpotting y algunos falsos negativos. Analizaremos lo básico de los siguientes sistemas, mismos que siguen vigentes:

- Segunda generación
 - Roche/454, desarrollado en el 2000 y comercializado en 2005
 - illumina de Genoma Analyzer, comercializado en 2007
 - SOLiD System de Applied Biosystems, desarrollado en 2005
 - Ion Torrent de Life Technologies, comercializado en 2011

- Tercera generación
 - ZS genetics
 - HeliScope
 - PacBio
 - Oxford Nanopore

Roche 454

El instrumento Roche 454, comenzó a comercializarse en el año 2005, fue el primero en su clase. En cuanto a la creación de la biblioteca, los fragmentos generados son menores a 800 pb. La síntesis de enriquecimiento de los fragmentos, es dirigida por una ePCR, su sistema de detección hace uso de la pirosecuenciación, determinando el orden de las bases cuando se libera pirofosfato.

Después de la ePCR, se continua cargando los nanoesferas en una placa plana de múltiples pocillos con capacidad de picolitros (picotiterplate), donde cada pocillo debe alojar una sola nanoesfera con un fragmento y sus posteriores amplicones, después se agregan nanoesferas más pequeñas que tienen enzimas inmovilizadas, ATP sulfurilasa y luciferasa, que son necesarias para la generación de luz.

Los oligonucleótidos que inician la secuenciación hibridan con los adaptadores que están unidos a las nanoesferas y ligados a los amplicones de cadena sencilla. La pirosecuenciación consiste en cientos de ciclos donde se agrega polimerasa y una sola especie de nucleótido (adenina, guanina, timina o citosina), en cada ciclo. Al añadirse un nucleótido a la cadena se libera una molécula de pirofosfato, que a su vez produce un haz de luz, señal que es detectada por un dispositivo de fibra óptica acoplado por cargas, dando lugar a la generación de un pirograma.

La mayor desventaja que presenta el sistema de Roche 454, es la dificultad para determinar el número de nucleótidos incorporados en regiones homopoliméricas que contienen más de 5-6 nucleótidos, por ejemplo, AAAAAA, TTTTTTTT, GGGGGGG, CCCCCCCCC, etc., dado que la señal lumínica se duplica en caso de detectar un homodímero, un par de bases consecutivas de la misma especie, sin embargo al exceder cinco bases de la misma especie la precisión en la detección de la intensidad lumínica es insuficiente. Otra desventaja es el costo económico.

Dichas desventajas son superadas; el instrumento puede leer 400,000 lecturas por corrida, de fragmentos de una longitud de cientos de pb. Lo cual es substancial en el caso de realizar un análisis metagenómico y/o un ensamblaje de novo, cuando a partir de la información de un grupo de secuencias se reconstruye la secuencia de la muestra (diferente al mapeo donde si conocemos la secuencia que queremos ensamblar).

El primer modelo comercial, el GS20, es capaz de secuenciar hasta 20 millones de bases en cuatro horas, mejorando simplemente la cinética de la reacción química de secuenciación, en el año 2007 apareció el modelo GS-FLX capaz de producir hasta 100 millones de bases en un tiempo similar, en 2009 el GS-FLX-Titanium que genera

secuencias de 400 bases, lo que duplica la efectividad del modelo anterior, y durante 2010 se espera que lleguen a proporcionar lecturas de más de 600 bases. Como puede inferirse, la longitud de las lecturas generadas se acerca a las obtenidas por el método de Sanger, lo que las convierte en ideales para la secuenciación de genomas de novo.

Illumina

El sistema illumina o también conocido como Solexa es un instrumento capaz de producir cientos de gigabases en una sola corrida. Como todos los sistemas NGS, en un paso inicial, una muestra de ADN genómico (gADN) después de ser extraída, es fragmentada en una biblioteca de pequeños fragmentos que serán secuenciados en millones de reacciones que se realizan al mismo tiempo. Las lecturas, entonces, son re-ensambladas, ordinariamente, usando un genoma de referencia (conocido) o de ser el caso una ensamblaje de novo.

La PCR que se realiza en el caso de illumina es la PCR puente, a la placa de vidrio que utilizan se le ha dado el nombre de flow cell, contiene ocho carriles independientes, por tanto, ocho bibliotecas independientes pueden ser secuenciadas en paralelo en una sola corrida, después de la PCR puente y una vez enriquecido, el sistema detecta la incorporación de bases al complementar las cadenas. Haciendo uso de bases nucleotídicas modificadas que van a incorporarse para complementar la cadena, cada base A, C, G, y T tiene un fluoróforo correspondiente, con una longitud de onda específica, que la cámara detecta, además estas bases se dice que son de terminador reversible (bases RT). Cuando una base RT se incorpora, en la reacción sucede un bloqueo que permanece hasta después de la etapa de detección, aquellos nucleótidos que no se unieron son removidos por un lavado para continuar con el ciclo: una vez acontecido todo lo anterior, entonces, se eliminará el terminal de bloqueo del extremo 3' de la base RT que impedía continuar con la síntesis de la cadena. Posteriormente, la base fluorescente también es removida para evitar ruido de fondo en el siguiente paso de la incorporación. Una nueva tanda de bases nucleotídicas son agregadas a la reacción completando el fragmento de ADN. Una diferencia importante con la pirosecuenciación, es que se usa una sola cámara que captura la imagen de la única base incorporada a cada momento de forma secuencial.

Los tipos de errores dominantes pueden ser dos que el bloqueo no suceda, incorporándose dos bases RT en un solo ciclo de incorporación, considerando a ese amplicón sin sentido con el resto del clúster. El otro sería que se pierda la fluorescencia, imposibilitando la detección de la base nucleotídica que acaba de ser incorporada, mientras que la fluorescencia perdida puede ocasionar ruido afectando gravemente la señal. Sin embargo, es considerado como un sistema bastante rápido, aproximadamente en 25 horas puede tener la información de seis genomas.

SOLiD

Otro sistema caracterizado por las múltiples aplicaciones que se pueden realizar en su instrumento es SOLiD, comercializado por Applied Biosystems. Con este sistema la fragmentación o generación de la biblioteca, puede ser con la unión de adaptadores que flanquean a los fragmentos o bien se separan los fragmentos en dos y se unen con un cebador que queda en la mitad. También hace uso de la ePCR, en nanoesferas magnéticas, los productos amplificados y seleccionados son hibridados en una placa de vidrio, por otro lado, para identificar a la secuencia de cada fragmento, emplea una ADN ligasa en lugar de una polimerasa y oligonucleótidos marcados (octámeros).

El proceso de secuenciación incluye distintas rondas de hibridación y ligación, con 16 dinucleótidos marcados con 4 colores distintos. Los datos de secuenciación son obtenidos

a partir de alineamientos secuenciales con primers universales que hibridan en N, N menos 1, N menos 2, etc., es decir, cuando el primer universal hibrida con el adaptador, en la posición N-menos-cero, la secuencia se determina para las bases 5, 10, 15, 20, y así sucesivamente. La siguiente reacción, el primer se coloca en N menos 1, y la secuencia se determina para bases 4, 9, 14, etc. La belleza de este enfoque es que, en el diseño de los octámeros, las dos primeras bases se identifican con una secuencia conocida y específica, que corresponde al grupo fluorescente en particular. Después de capturar la fluorescencia generada al ligar un octámero y que corresponde a las dos primeras bases del mismo, se escinde el octámero.

Empleando este código de colores, cada posición es evaluada por duplicado, que proporciona una referencia cruzada y se obtiene una tasa de sustitución de errores extraordinariamente baja. Aumentando drásticamente la discriminación entre errores de secuencia y polimorfismos de una sola base nucleotídica (SNPs). Dentro de las desventajas son los pares de bases que se leen en un fragmento por corrida.

Ion Torrent

La secuenciación por Ion Torrent es un método de secuenciación de ADN basado en la detección de los protones que se liberan durante la polimerización del ADN, cuando se usa una ADN polimerasa, debido a la generación de enlaces covalentes cuando una base nucleotídica se incorpora de manera complementaria, entonces además de pirofosfato se libera un protón (H⁺), aquí está lo interesante en el caso de esta metodología, la liberación del protón hace que en la reacción se logre un detectable cambio de pH, y no hay necesidad de un análisis óptico, ni del uso de la luz, de cámaras, etc., la detección es meramente química y una detección directa.

En primer lugar, después de generar los fragmentos de la biblioteca, los fragmentos son clonados en nanopartículas, Ion Sphere™ particles, que si difieren de las usuales por Roche, prácticamente en tamaño. Cada Ion Sphere™ particle entra a un micropocillo de un microchip (Ion chip), por centrifugación. A continuación, se baña el microchip con una solución de uno de los nucleótidos. Cuando dicho nucleótido se incorpora en la cadena de ADN y se libera el protón la base del pocillo actúa como un potenciómetro o sensor iónico que conduce la señal química, traduciéndola en información digital, al transmitirla directamente a un sistema computacional, sin necesidad de que esa señal química sea procesada durante la transferencia.

La exactitud que ha alcanzado el secuenciador en febrero de 2011 era de un 99% basada en lecturas de 400 pb. Por otro lado, para los homopolímeros el diseño del sistema permite confirmar los casos, por ejemplo, si hay dos bases idénticas en la cadena de ADN, el voltaje se duplica, y entonces, se registran dos bases idénticas en el servidor Torrent. Si el siguiente nucleótido responsable del cambio de pH no coincide, no se registra ningún cambio. Para óptimos resultados se recomienda una secuenciación bidireccional. La principal ventaja de este proceso es la velocidad de secuenciación, así como los bajos costos de operación, ya que la secuenciación ocurre a tiempo real.

Dentro de todo, la ventaja más útil en este sistema es la rapidez en el tiempo de respuesta, que es muy corto, siendo muy importante en algunos casos clínicos. No obstante, existen algunas limitaciones. Una de ellas son las repeticiones de bases. Si hay más de una base idéntica seguida en la cadena molde, se añadirán más dNTPs en el mismo momento, generando un cambio de pH más pronunciado, lo cual, actualmente, no se detecta con mucha precisión. Otra limitación sería la longitud de los fragmentos de ADN que se

estudian. Éstos no pueden pasar de las 400 pares de bases, aunque esta limitación está bajo estudio por la compañía

ZS Genetics, el microscopio del ADN

Este sistema aprovecha el uso de un microscopio electrónico y la capacidad de capturar imágenes punto a punto con una resolución de hasta 0.1 nm. Los microscopios electrónicos generan un contraste para las cargas de los núcleos atómicos (Z), sin embargo, el ADN esta hecho a partir de elementos químicos de Z muy ligeras, H, C, N, O y P, 1, 6, 7, 8 y 15 respectivamente, lo cual hace a la molécula de ADN esencialmente invisible en un microscopio electrónico. Entonces, este sistema solo usa una sola molécula, de la cual los átomos son etiquetados de manera individual, esto permite una visión directa por medio del microscopio electrónico.

Al hacer ese etiquetado, es como combinar las Z de los elementos y con ello se hacen visibles las bases nucleotídicas. Primero la cadena doble de ADN es separada, una vez que se tiene la cadena sencilla, se complementa con dNTPs modificados, unidos a átomos pesados, cada especie con un átomo distinto. Con ello se genera la imagen de una cadena y al capturar estos datos se van generando la secuencia de la cadena sencilla original. Con un tiempo de trabajo en horas en lugar de días como los sistemas de segunda generación, este sistema además alcanza hasta las 10,000 pb por lectura.

HeliScope

Es considerada como la primera tecnología que fue capaz de visualizar la secuencia usando una sola molécula de ADN. Usando un flow cell donde se carga la muestra y que contiene 25 canales y cada uno puede contener 16 millones de cadenas de ADN para secuenciarlas. Cuando la muestra es cargada, entonces la celda o flow cell es adaptado al instrumento HeliScope, el cual tiene un sistema óptico complejo con cuatro cámaras digitales y una placa de granito, además, la cubierta de la superficie de la celda permite que pueda ser lavada entre las reacciones.

A dicho conjunto se le añaden bases nucleotídicas modificadas a través de un sistema de fluidos, preciso y automatizado en intervalos de tiempo. Un láser va captando la señal generada en cada incorporación y esta detección es grabada por las cámaras, procesando los datos con algoritmos especializados.

PacBio

También llamado SMRT, por sus siglas en inglés; Single-molecule real-time, se basa en la secuenciación por síntesis y la detección al momento de las bases fluorescentes que se van incorporando. Lo que es dominante en la técnica que usa PacBio, son los volúmenes de detección con los que son capaces de trabajar las estructuras físicas que guían a las ondas electromagnéticas, llamadas ZMWs (Zero-mode waveguides), mismas que detectan volúmenes en zeptolitros (10^{-21} L). El sistema hace uso de un dispositivo o celda SMRT, la cual tiene decenas de miles de ZMWs.

A su vez en el fondo de cada ZMW, que son tipo un pocillo, se inmoviliza un complejo templado-polimerasa y en el mismo ZMW se agregan bases nucleotídicas fluorescentes, cada una de las especies es cargada con un fluoróforo distinto, los ZMWs son iluminados desde la parte inferior con una luz atenuada, mientras van incorporándose las bases se genera un pulso de luz, debido a que la cadena fosfato es escindida y este hecho libera el fluoróforo que estaba unido.

Es la primer tecnología que en sus nuevos sistemas de ensamblaje corrigen los errores, además, ha disminuido los costos, la capacidad de las lecturas ha llegado hasta 40,000 pb con un tamaño medio de 14,000 pb, lo cual ya supera al método Sanger. Otra gran ventaja, es que para la preparación de la biblioteca no se necesita amplificar por PCR o enriquecer la biblioteca; el ADN secuenciado es el ADN original o la cadena templado de la muestra. Sin embargo, de aquí mismo, surge otra desventaja, por no realizar una amplificación se necesita una cantidad mayor de templado o ADN inicial.

Oxford Nanopore

La secuenciación por nanoporos es un análisis simple y directo. No obstante, es un método que ha estado en desarrollo desde 1995. Un nanoporo es un pocillo es escala mononanométrica en su diámetro interno, una placa o dispositivo que usa este método de secuenciación se halla dividida en compartimentos y está cubierta de nanoporos, donde pasa una carga iónica, y a través de la observación de los cambios en la corriente eléctrica dentro de cada nanoporo, los cuales son debidos a los iones que pasan de un compartimiento al otro, identificando los nucleótidos que pasan dentro del mismo.

La cantidad de la corriente observada es sensible a la forma y el tamaño del nanoporo. Si pasa una base u otra molécula por el nanoporo, la magnitud de la corriente varía y esa variación depende de la base nucleotídica que paso por el nanoporo. Por tanto registrando estos cambios o disrupciones específicas de corriente que genera una especie de base, es que se secuencia la hebra de ADN.

Las formas en que se hace pasar el ADN por los nanoporos son dos, ya sea por una electroforesis o por una reacción enzimática. Así mismo, el dispositivo en uno de sus compartimentos y contiguos a los nanoporos tienen sensores que registran las variaciones de corriente.

Hay diferentes tipos de dispositivos, incluso existe una versión portátil, otra versión para múltiples muestras y una instalación modular para mayor escala. Sin embargo, el flujo de trabajo de este novedoso sistema se encuentra aún en desarrollo, con la adaptación de sistemas electrónicos en biología, para lograr poca intervención humana.

Diseño de un Laboratorio de Secuenciación Masiva

La principal consideración que se tienen que tomar en el diseño de un laboratorio de secuenciación masiva, más que contar con el espacio adecuado, es diseñar un espacio que prevenga o controle la contaminación.

Históricamente, el diseño del laboratorio es un factor muy importante para controlar la contaminación, y una de las características más común en el diseño de un laboratorio de secuenciación es contar con dos cuartos separados, uno que nos permita la preparación de la muestra, preparación de reactivos y la extracción y purificación de ADN que se va a utilizar durante el análisis y otro que nos permita llevar acabo el desarrollo y la preparación de las reacciones para la secuenciación del ADN.

El diseño de algunos laboratorios incorporan un sistema de control de presión de aire positiva para prevenir el flujo del aire del cuarto del análisis al de preparación de la muestra y reactivos. El aire del cuarto de análisis debe de ser ventilado hacia el exterior del laboratorio. La implementación de las características del diseño del laboratorio es más sencilla cuando se planea una nueva construcción que cuando se intenta adaptar un espacio en un edificio viejo para este tipo de laboratorio. Si no hay disponibilidad de colocar

múltiples cuartos, la consideración que se debe de tomar es colocar una campana de flujo laminar que tenga luz ultravioleta (UV). El entrecruzamiento del ADN inducido por la luz UV minimiza los efectos de la contaminación durante la preparación de las muestras.

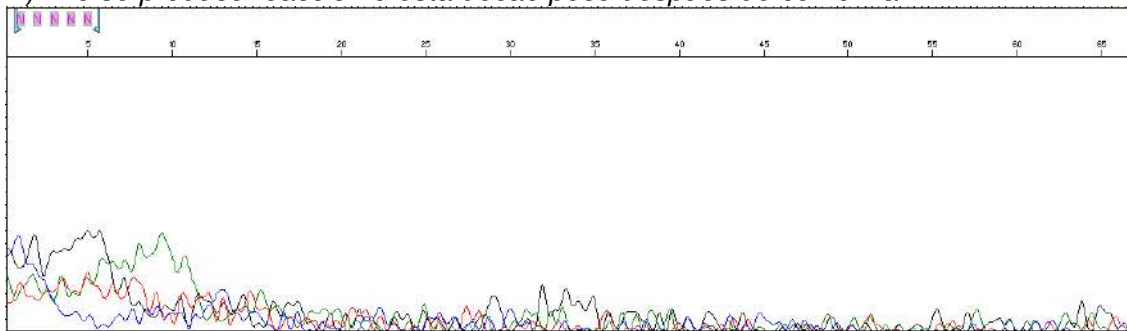
Otros métodos para prevenir la contaminación son las prácticas de laboratorio del personal. El flujo de operaciones desde la recepción de la muestra hasta el análisis del producto a secuenciar involucra una serie de pasos que van de “limpio” a “contaminado”. Por lo tanto, se permite que no se realice movimiento de reactivos u equipos en la dirección reversa a este flujo. Por ejemplo, las micropipetas que son utilizadas en el área de la post-amplificación de las muestras nunca deben utilizarse durante en el área de la pre-amplificación. Las batas del laboratorio que son utilizadas en el área de post-amplificación deben ser removidas antes de entrar al área de la pre-PCR. Los guantes se desechan después de usarlos en el área de post-PCR. Las mesas de trabajo deben de limpiarse usando agentes descontaminantes, así como una solución de blanqueador o preparación comercial.

Otra alternativa para reducir la contaminación es modificar los procedimientos que se utilizan en el laboratorio. Como modificaciones podemos incluir estrategias de reactivos, sistemas analíticos cerrados, utilizar métodos que no involucren hacer copias de ADN y ARN.

Problemas en la implementación de un Laboratorio de Secuenciación Masiva

Uno de los puntos más importantes durante la secuenciación masiva de ADN es la calidad de los resultados debido a que depende en gran medida de la pureza y correcta cuantificación de las muestras de ADN analizadas. Se recomienda utilizar protocolos de extracción, purificación y cuantificación fiables que permitan verificar la integridad y concentración de la muestra. Así mismo se recomienda la utilización de alícuotas fiables del cebador.

A) No se produce reacción o ésta decae poco después de comenzar

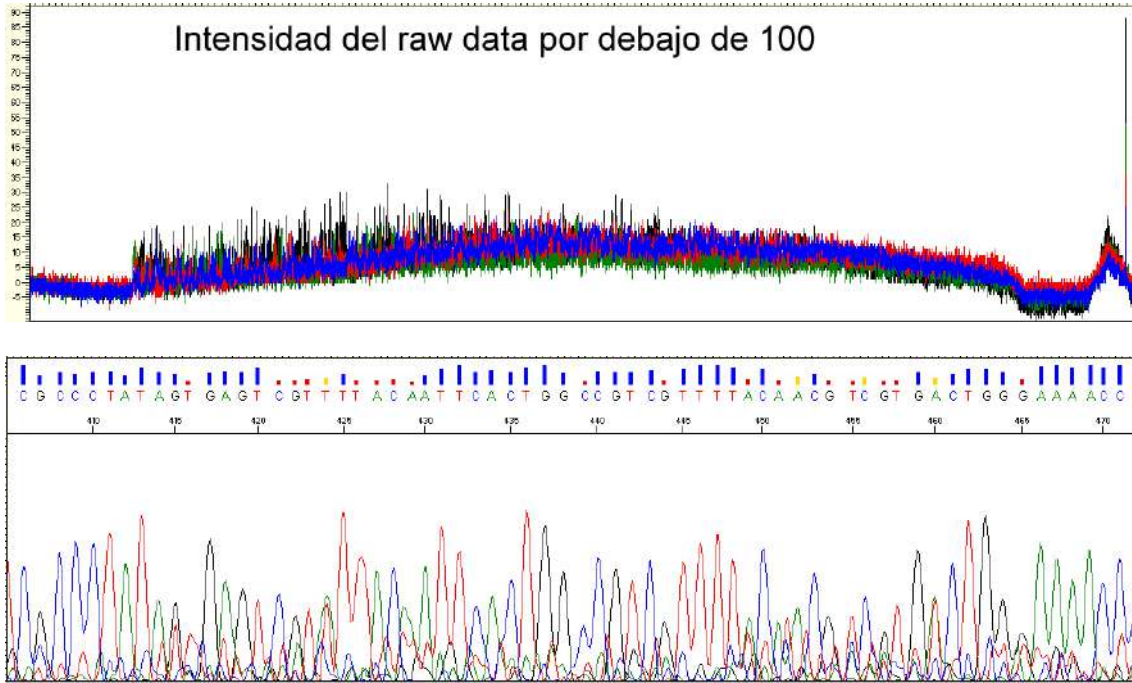


Possible causa	Possible solución
No hay ADN o hay menos del necesario	Aumentar la cantidad de DNA
No hay cebador o la concentración es inferior a la necesaria	Aumentar la concentración o cantidad de cebador
El cebador no encuentra el sitio de hibridación	Cambiar el cebador
El DNA presenta contaminación	Volver a preparar el DNA
El cebador está mal diseñado o la temperatura de <i>melting</i> no es la adecuada	Rediseñar el cebador
El sitio de unión del cebador en el vector se ha perdido o dañado	Volver a clonar en el vector

En los productos de PCR puede que los amplificados no sean el producto de la amplificación con los dos cebadores

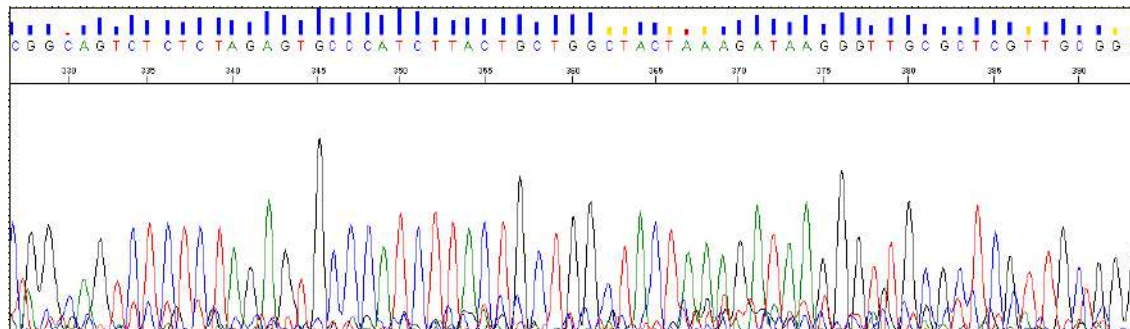
Cambiar de cebador

B) Señal de baja intensidad



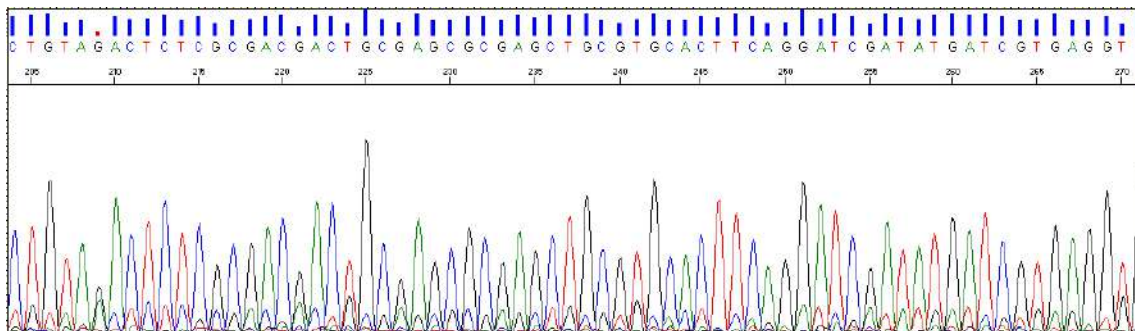
Posible causa	Posible solución
Mala calidad del DNA	Volver a purificar el DNA
DNA presenta estructura secundaria en el sitio de hibridación del cebador	Cambiar de cebador
La concentración del DNA inferior a la necesaria	Aumentar la concentración
El cebador utilizado en la secuenciación no es el adecuado: - Estructura secundaria - Tm del cebador demasiado baja	Cambiar el cebador

C) El cromatograma es correcto pero presenta mucho ruido de fondo



Posible causa	Posible solución
Existe un sitio secundario subóptimo de unión del cebador que da lugar a picos extra de menor intensidad	Intentar eliminar añadiendo DMSO en la secuenciación, incrementando la temperatura de hibridación o cambiar de cebador
La cantidad de DNA es insuficiente y la señal es demasiado baja confundándose con el ruido normal de fondo.	Aumentar la cantidad de DNA
El DNA presenta contaminación con otro DNA que contiene un sitio de hibridación para el primer de secuenciación	Purificar el DNA
La PCR no fue específica y existen amplicones contaminantes en la muestra	Cambiar de cebador o purificar por gel el amplicón de interés
Cebador mal purificado	Cambiar de cebador o purificar
Fragmento de PCR mal purificado	Eliminar los cebadores de la amplificación

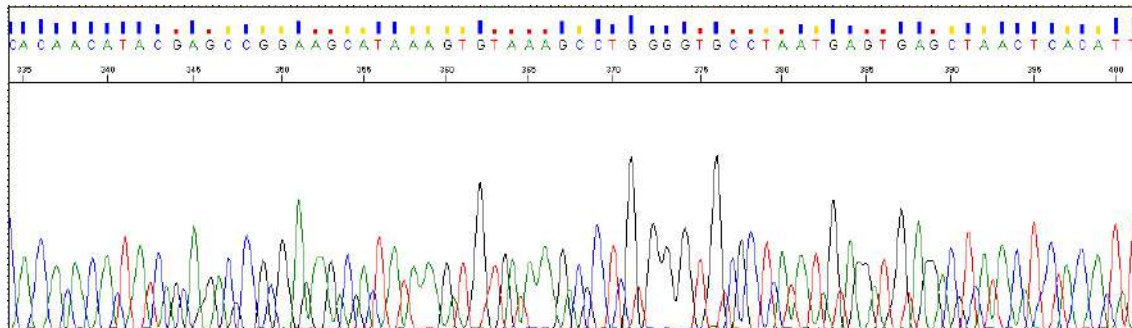
D) El cromatograma presenta una secuencia “sombra”



Posible causa	Posible solución
Cebador mal purificado o parcialmente degradado ¹	Cambiar la alícuota de cebador o purificar por gel

1. Puede verse una “secuencia sombra” (N-1, N-2 o N-i). El cebador está compuesto mayoritariamente por cadenas completas (N), pero debido a una purificación defectuosa puede existir una subpoblación de moléculas con una base menos (N-1), o si el problema es mayor con N-i bases menos. Esto da lugar a un cromatograma ilegible al tener picos superpuestos y desfasados.

E) El cromatograma presenta dos secuencias superpuestas

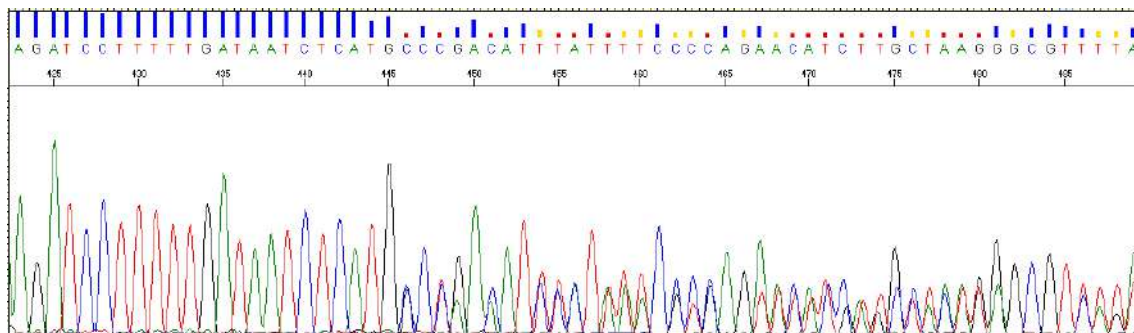


Posible causa	Posible solución
El cebador tiene varias dianas	Cambiar de cebador
Presencia de cebadores procedentes de la PCR	Purificar mejor el DNA
Cebador degenerado	Cambiar de cebador
DNA subclonado existiendo dos sitios diana para el cebador universal utilizado ¹	Secuenciar con otro cebador
Hay más de un DNA molde en la muestra ²	Aislar de nuevo el DNA
PCR inespecífica: diana del cebador en ambos extremos, es decir, amplicón inespecífico generado por un solo cebador	Cambiar de cebador

1. Comprobar, si se ha arrastrado *polinker* durante la subclonación, que cebadores universales tienen sitio de hibridación duplicado y no utilizarlos en la secuenciación de esa muestra.

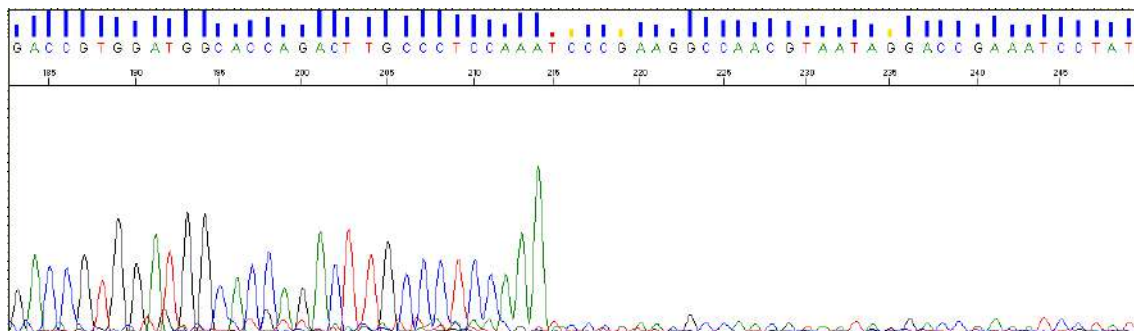
2. Asegurarnos de que partimos de una única colonia o que no es PCR múltiple con amplificaciones secundarias.

F) La reacción comienza de forma normal pero existe doble lectura a partir de un determinado punto



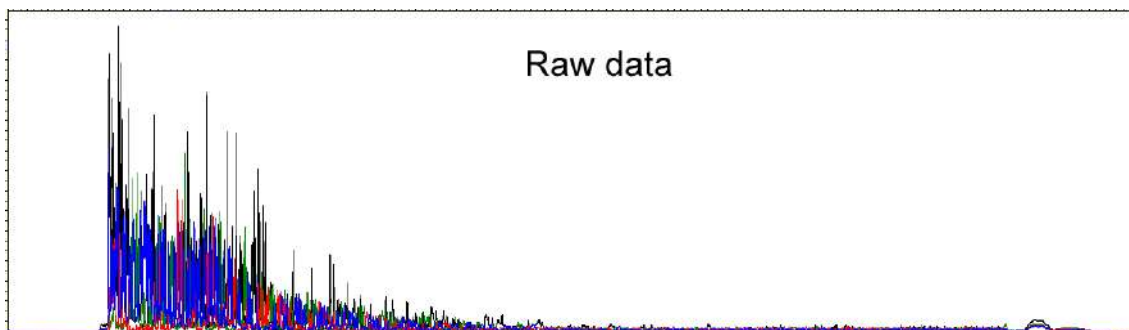
Posible causa	Posible solución
Clon múltiple, PCR múltiple: más de un molde de DNA en la muestra	Volver a preparar la muestra para aislar un único molde
Diana múltiple del cebador en el DNA	Cambiar de cebador
Mutaciones de inserción o deleción	

G) La secuencia pierde bruscamente la señal y cae



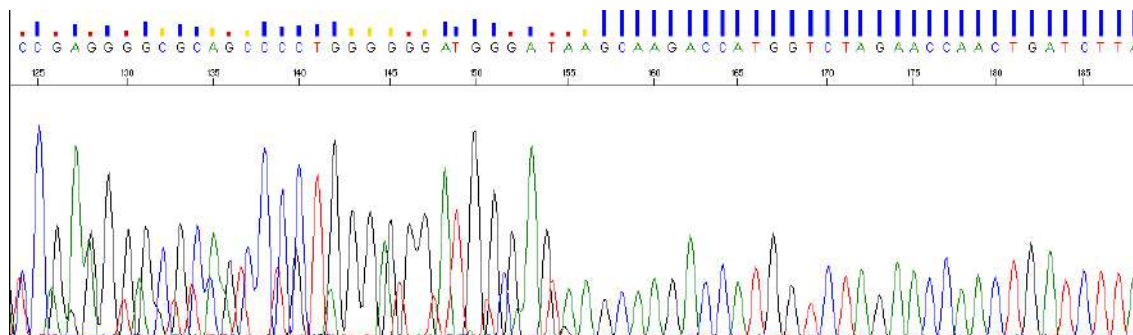
Posible causa	Posible solución
Efecto de una estructura secundaria	Añadir DMSO
La cantidad entre el DNA y el cebador no es la equilibrada	Respetar las concentraciones y cantidades indicadas en las tablas de entrega de muestras
Interacción con secuencias del vector que dan lugar a estructuras que impiden la progresión de la polimerasa	Realizar PCR sobre el clon (cebadores universales o propios) y mandar a secuenciar el amplicón resultante y no el DNA plasmídico
DNA cortado, digerido a ese nivel o finalización de producto de PCR	-

H) La señal decae progresivamente de forma temprana



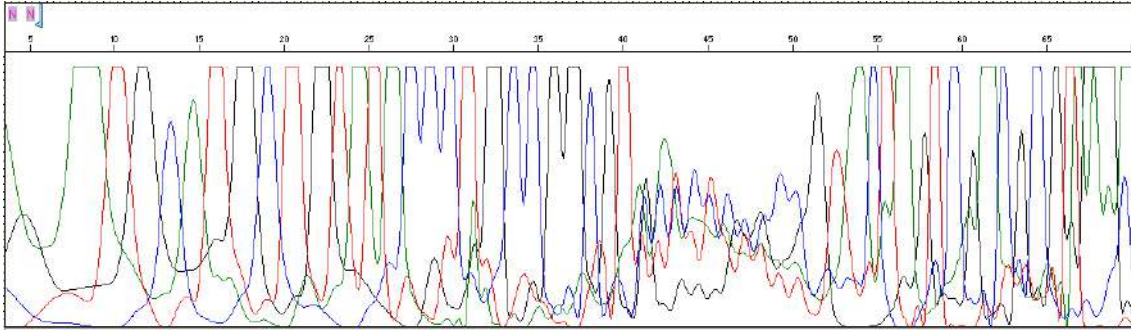
Posible causa	Posible solución
Presencia de compuestos contaminantes en la muestra	No resuspender nunca el DNA en solución que contenga EDTA

I) Doble lectura inicial que se resuelve antes de la base 200



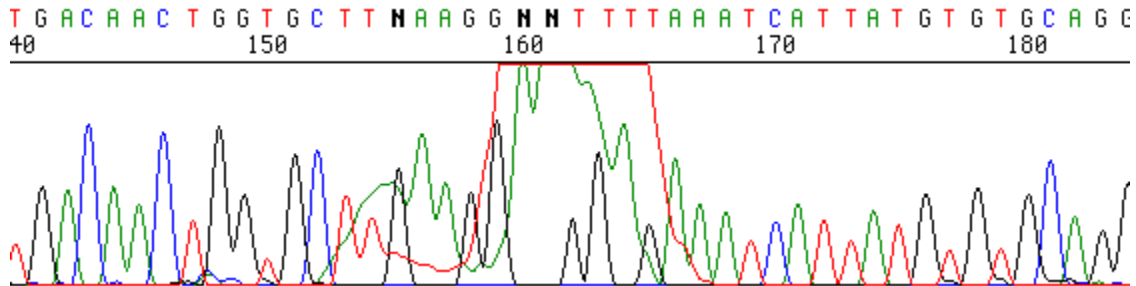
Posible causa	Posible solución
Presencia de <i>primer dimers</i> o amplicones inespecíficos de menor tamaño que el producto de interés	Optimizar las condiciones de PCR para evitar la aparición de artefactos o purificar el producto de interés a partir de gel

J) Presencia de picos saturados y fuera de escala en el cromatograma



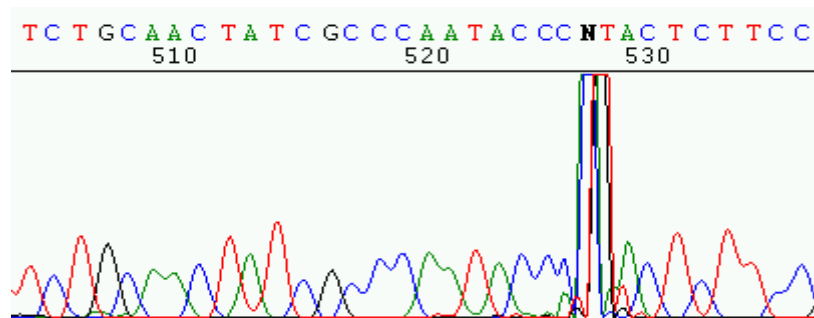
Posible causa	Posible solución
Demasiada cantidad de DNA	Reducir la cantidad de DNA (según figura en las tablas de entrega de muestras)

K) La secuencia es normal pero aparece un pico de forma repentina



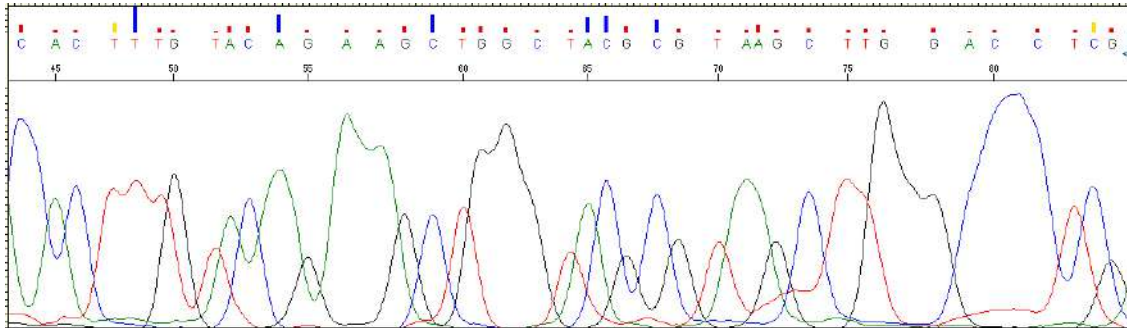
Posible causa	Posible solución
Terminadores no incorporados	Repetir la reacción de secuenciación

M) Aparición de un pico anómalo con los colores correspondientes a todas las bases



Posible causa	Posible solución
Burbuja en el capilar	Volver a inyectar la muestra o repetir la reacción de secuenciación

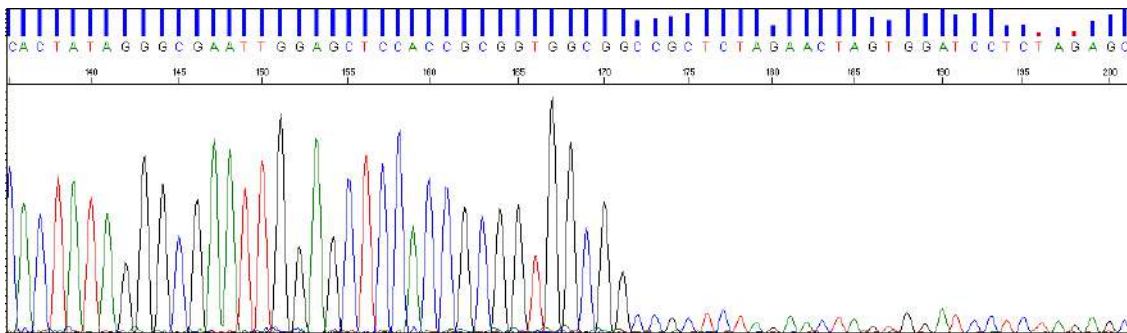
L) Aparición de picos muy abiertos con la consecuente pérdida de resolución



Possible cause	Possible solution
Exceso de DNA (capilar)	Respetar la cantidad y concentración de DNA
Presencia de sales o contaminantes en la muestra	Volver a purificar la muestra
Problema del capilar*	Repetir la secuencia y, si el problema persiste, reemplazar capilares

*Esta causa solamente es aplicable si el problema de falta de resolución es consistente para todas las muestras corridas en ese capilar.

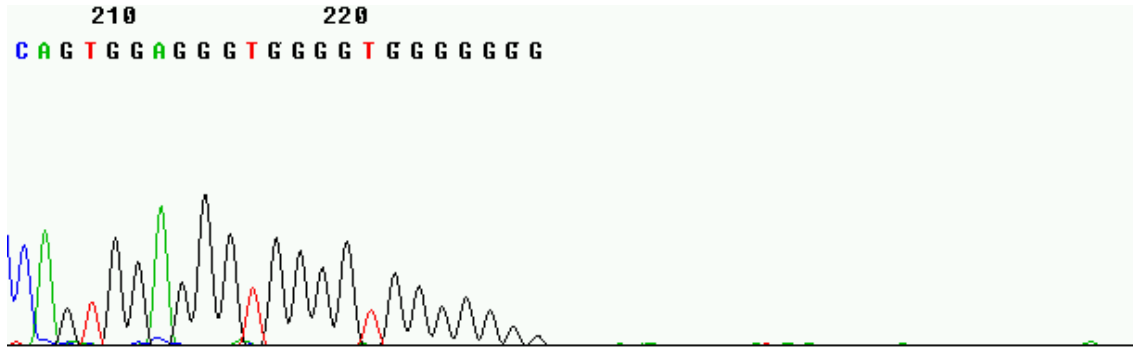
M) Secuenciación de regiones ricas en GCs



Possible cause	Possible solution
Estructura secundaria en la cadena molde de DNA	Añadir DMSO en la secuenciación, aumentar la t° de desnaturalización a 98 $^{\circ}$, aumentar el número de ciclos de PCR. Si es posible diseñar oligos que salven la región rica en GC.

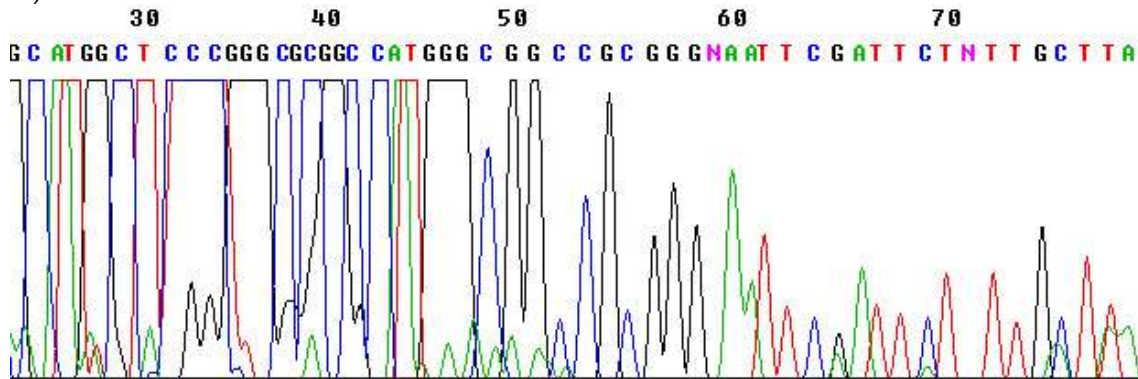
Cuando se secuencien organismos con un alto contenido GC indicarlo en el apartado de observaciones del formulario de solicitud.

N) Pérdida de la señal debido a una zona rica en G



Posible causa	Posible solución
Presencia de una estructura secundaria	Repetir secuenciación añadiendo DMSO
Homopolímero G	Secuenciar cadena complementaria

O) Presencia de microsatélites

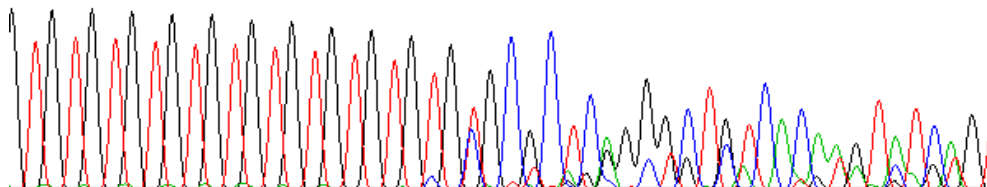


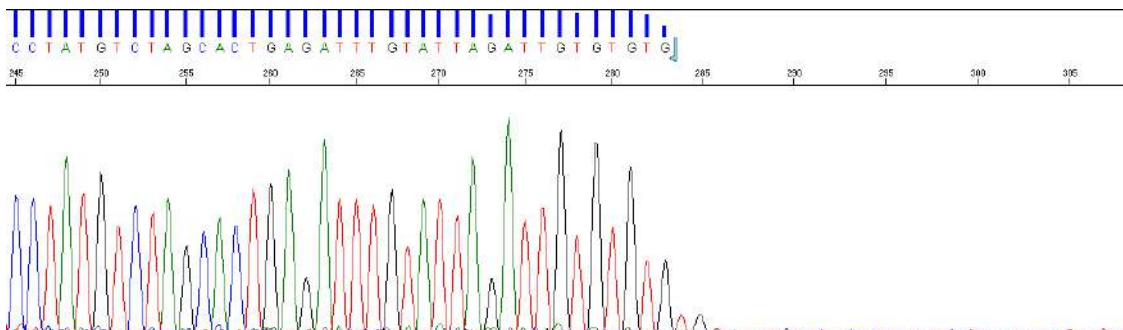
Posible causa	Posible solución
Presencia Microsatélites	Secuenciar a partir del plásmido no del producto de PCR y añadir DMSO en la reacción de secuenciación
	Crear deleciones en esas zonas
Repeticiones dinucleótidos GC	Cambios ya recomendados

P) Presencia de zonas ricas de GT o GA

250 260 270 280 290

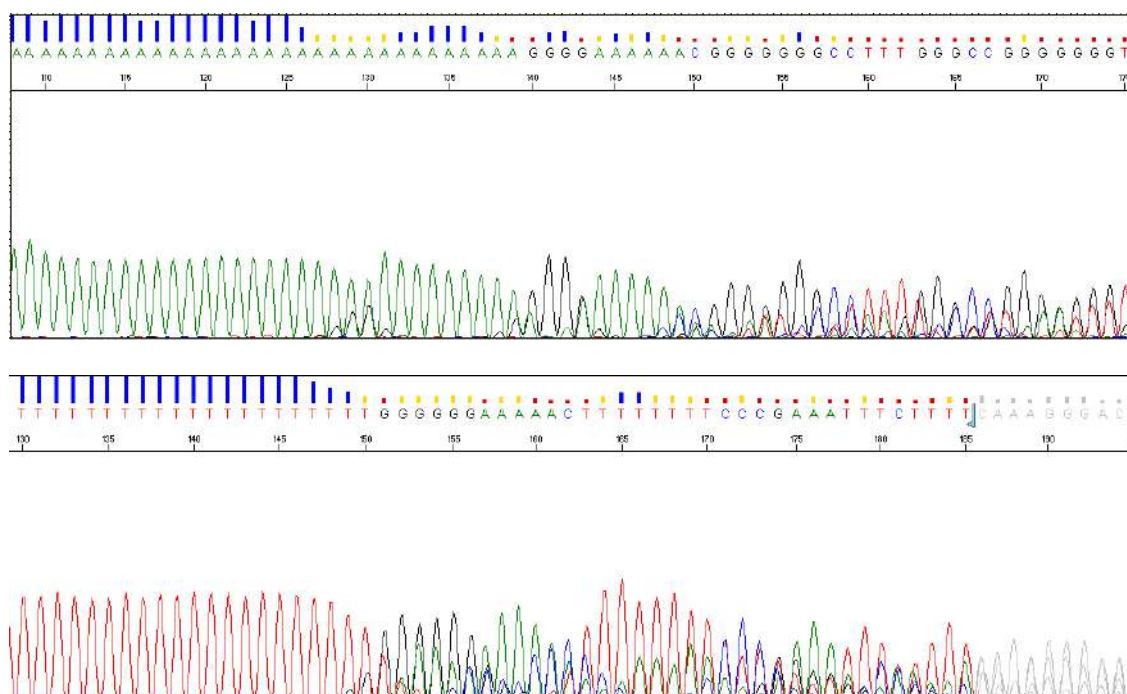
3 T G T G T G T G T G T G T G T G T G N G C G C T C N G G G C T N T C A C A A G T A T C A G T





Possible cause	Possible solution
Repetitions dinucleotides GT or GA	Sequencing the complementary strand
Formation of duplexes that alter the stability of the primer	Using lower sequencing temperatures than standard

Q) Presence of a zone with polyA or polyT



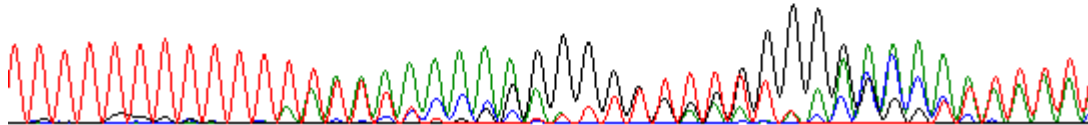
Possible cause	Possible solution
Presence of polyA/polyT ¹	Sequencing complementary strand
	Using a degenerate primer of the type T25(A, G or C) if the base following the polyA/polyT region is not known, or specific primers T25A, T25G or T25C. The 3' base of the primer allows anchoring this to the sequence at the end of the homopolymer, improving the results obtained

1. The polymerase "patina" giving place to an illegible reading after the homopolymeric region, although the data before that region are of good quality. This problem can be produced in the sequencing reaction or in the amplification,

aunque en este último caso no son aparentes cuando el fragmento se visualiza en un gel de agarosa.

R) Presencia de largos homopolímeros

T T T T T T T T T T T T T T H H H A A A A A A G G G G N T T T H G G G N A N A A N H H H H I
 20 130 140 150 160



Posible causa	Posible solución
Homopolímero causa deslizamiento de la polimerasa generándose una secuencia ilegible	Secuenciar cadena complementaria Usar un cebador más interno Empleando cebador degenerado del tipo T25(A, G ó C) o los cebadores individuales específicos T25A, T25G ó T25C.
En los productos de PCRs pueden existir saltos, problemas que no existen en el material clonado	Secuenciar el material clonado, además del amplificado. Si es posible, es mejor verificar la especificidad de la secuencia a partir de otros clones

REFERENCIAS

Adessi, C., et al. (2000). "Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms." *Nucleic Acids Res* 28(20): E87.

Mardis, E. R. (2008). "Next-generation DNA sequencing methods." *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9: 387-402.

Mitra, R. D. and G. M. Church (1999). "In situ localized amplification and contact replication of many individual DNA molecules." *Nucleic Acids Res* 27(24): e34.

Sanger, F., et al. (1992). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977." *Biotechnology* 24: 104-108.

Capítulo II

Proyección de un laboratorio para la investigación en células troncales humanas

*Fabián Díaz, Cecilia Bou, Benjamín Macuil,
Carlos Bravo & Emmanuel Díaz*

Antecedentes y origen

En los últimos años, la investigación con células troncales ha hecho importantes contribuciones a nuestra comprensión de la biología. La habilidad para reprogramar células somáticas a células troncales, ha hecho que esta interesante área de investigación sea accesible a casi cualquier laboratorio, a pesar de las variantes en los escenarios éticos, políticos y económicos de cada país.

Los promisorios resultados de la investigación con células troncales han atraído la atención de más médicos, científicos de materiales, químicos, físicos y otros no especialistas en este campo de investigación. Aunque esta situación es deseable, el investigador novato normalmente se enfrenta a la difícil tarea de establecer y mantener un laboratorio de células troncales, a menudo sin acceso a la información adecuada. Éstos asignan una cantidad significativa de recursos para mantener su enfoque en instaurar un espacio equipado con tecnología avanzada, pero la entrega de datos sólidos y confiables es a menudo descuidada, lo que puede resultar en la interrupción o el retraso en el trabajo de laboratorio y por consiguiente la pérdida o aplazamiento de publicaciones. Es entonces imperante la necesidad de hacer aportaciones en lo relativo a cómo establecer un laboratorio para la investigación con células troncales humanas (Inamdar, 2012).

INTRODUCCIÓN

El establecimiento de un laboratorio que funcione de manera adecuada para el cultivo de células troncales humanas es la base para el desarrollo de las investigaciones en dicha área de estudio (Freshney, 2005). Es por ello que el objetivo del presente capítulo es describir las principales consideraciones a tomar en cuenta para el establecimiento exitoso de un laboratorio para el cultivo de células pluripotentes que se encuentre bien equipado y que opere bajo prácticas científicas adecuadas, lo que permitiría la obtención de datos precisos y altamente reproducibles que faciliten el desarrollo de conocimiento de frontera. Para lo anterior es esencial recordar que uno de los principales objetivos de cualquier laboratorio es el de ser competente a nivel de infraestructura, además de caracterizarse por desarrollar ciencia de calidad haciendo uso de los recursos de investigación de manera eficiente. Es por eso que aquí abordamos los puntos primordiales para el exitoso establecimiento y manejo de un laboratorio de investigación en células troncales.

El presente texto es una herramienta de apoyo dirigida a los investigadores involucrados en el uso de células humanas, con el propósito de facilitarles la realización de los procedimientos requeridos para iniciar con una nueva línea de investigación en el campo. Resaltamos lo referente a la normatividad vigente en el país sobre el uso de células humanas, así como lo relativo al adecuado diseño, equipamiento y operación de un laboratorio de cultivo celular.

Puntos a considerar cuando se inicia con un laboratorio de investigación en células troncales humanas. Objetivo(s) del trabajo a desarrollar

El primer cuestionamiento que debe responderse previo al diseño y construcción de un laboratorio especializado en el cultivo de células humanas es, “¿qué respuestas pretenden ser contestadas con la investigación realizada en el naciente recinto para el cultivo celular?”. Se debe mencionar que una discrepancia entre las expectativas de la empresa o institución financiadora y los objetivos del investigador responsable del proyecto a desarrollar pueden conducir al fracaso. Es imperativo que exista un consenso entre todos los participantes del proyecto: investigadores, Institución Financiadora e Institución Anfitriona, el cual se recomienda sea detallado en un contrato o en algún otro tipo de documento legal. Dicho manuscrito deberá describir extensamente qué tipo de resultados deberán de ser obtenidos en el nuevo laboratorio, el tipo de trabajo que se llevará a cabo y bajo qué estándares será operado. El proceso anterior es un precursor esencial que permitirá una exitosa conclusión en lo relativo al diseño y construcción del laboratorio en cuestión (Andrews, 2009).

En resumen, el esfuerzo de planear y de estandarizar los procesos y sistemas requeridos, concluirán en un laboratorio eficiente sólo si todos los señalamientos y requisitos son establecidos desde el comienzo (Figura 1). El punto crítico a la hora de iniciar con un laboratorio es planear el éxito a largo plazo.

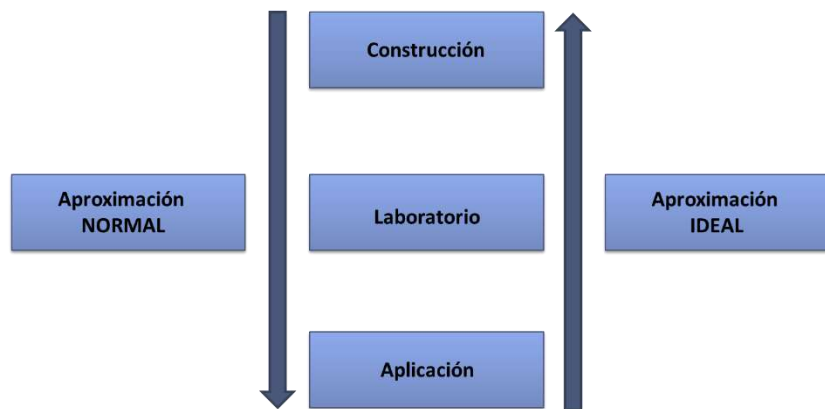


Figura1. Aproximación ideal para el diseño y construcción de un laboratorio de cultivo celular. Modificado de Loring J.F., 2012.

Estándares de calidad

La implementación de sistemas de control de calidad permitirá la obtención de resultados confiables, trazables y reproducibles, por lo que decidir bajo qué estándares operará el nuevo laboratorio es un importante segundo punto a considerar. A continuación se enlistan los estándares de calidad aplicables al trabajo que involucra el cultivo celular (FDA, 2004):

-Norma ISO 9000: describe los fundamentos de los sistemas de gestión de calidad y especifica la terminología utilizada en dichos sistemas. Es necesario recordar que cualquier proceso de producción que involucre cultivo celular y trabajo de investigación debe operar como un sistema de gestión de calidad (ISO, 2014).

-Norma ISO 9001: especifica los requisitos para los sistemas de gestión de calidad aplicables a toda organización que necesite demostrar su capacidad para proporcionar productos que cumplan los requisitos de sus clientes. Su principal objetivo es aumentar la satisfacción del consumidor (ISO, 2014).

-Norma ISO 19011: proporciona orientación relativa a las auditorías de sistemas de gestión de calidad y de gestión ambiental (ISO, 2014).

-Norma ISO 13485:2003: ofrece información respecto a los sistemas de gestión de calidad y requisitos para fines reglamentarios de dispositivos médicos (ISO, 2014).

-Norma ISO 17025:2005: esta norma internacional establece los requisitos generales para la competencia en la realización de ensayos o de calibraciones, incluido el muestreo. Cubre los ensayos y las calibraciones que se realizan utilizando métodos normalizados, métodos no normalizados y métodos desarrollados por el propio laboratorio. Esta Norma es aplicable a todos los laboratorios, independientemente de la cantidad de empleados o del alcance de sus actividades que involucren ensayos o calibraciones (ISO, 2014).

-Norma ISO 13408: comprende un conjunto de normas que ofrecen una guía sobre los procesos, programas y procedimientos para el desarrollo, validación y control rutinario de los métodos que involucran la manufactura de productos para el cuidado de la salud (ISO, 2014). A continuación se enlistan el conjunto de normas que la conforman:

ISO 13408-1:2008: procesos asépticos en productos al cuidado de la salud. Parte 1: requerimientos generales.

ISO 13408-2:2003: procesos asépticos en productos al cuidado de la salud. Parte 2: filtración

ISO 13408-3:2006: procesos asépticos en productos al cuidado de la salud. Parte 3: liofilización.

ISO 13408-4:2005: procesos asépticos en productos al cuidado de la salud. Parte 4: tecnología Clean-in-place (CIP), uso de químicos, calor y agua para desinfectar equipo sin desmantelar la planta.

ISO 13408-5:2006: procesos asépticos en productos al cuidado de la salud. Parte 5: esterilización.

ISO 13408-6:2005: procesos asépticos en productos al cuidado de la salud. Parte 6: sistemas aisladores.

ISO 13408-7:2012: procesos asépticos en productos al cuidado de la salud. Parte 7: procesos alternativos para dispositivos médicos.

-Norma ISO 19001: es una norma que reglamenta todo lo relacionado con el diagnóstico *in vitro* a través de los distintos dispositivos médicos que se han patentado (ISO, 2014).

-Norma ISO 9004: proporciona directrices que consideran tanto la eficacia como la eficiencia del sistema de gestión de la calidad. El objetivo de esta norma es la mejora del desempeño, de la organización y la satisfacción de los clientes y de otras partes interesadas (ISO, 2014).

Las normas anteriormente descritas, son una serie de reglamentos oficiales desarrollados por la Organización de Estándares Internacionales (ISO, por sus siglas en inglés) que conforman un conjunto coherente de cánones que rigen los sistemas de gestión de calidad. La más contundente razón para implementarlas en un laboratorio de células troncales humanas es que éstas permitirán mejorar la eficiencia y efectividad de todas las operaciones. Cabe mencionar que la ISO se encarga de desarrollar Estándares Internacionales; sin embargo, no está involucrada en procesos de acreditación de Instituciones u Organizaciones. La acreditación es realizada por empresas externas generalmente privadas.

Accreditación se define como la evaluación independiente de los organismos de evaluación de la conformidad respecto a las normas reconocidas para garantizar su imparcialidad y competencia (ISO, 2015). A través de la aplicación de las normas nacionales e internacionales, gobierno, compradores y consumidores pueden tener confianza en los resultados de calibración y pruebas, informes de inspección y certificaciones proporcionadas. Los organismos de acreditación se establecen en muchos países con el propósito principal de garantizar que los organismos de evaluación de la conformidad están sujetos a la supervisión de un organismo autorizado. Los organismos de acreditación, que han sido evaluados por sus pares como competentes, firman acuerdos que mejoran la aceptación de los productos y servicios a través de las fronteras nacionales, creando así un marco para apoyar el comercio internacional a través de la eliminación de barreras técnicas. Estos acuerdos son gestionados por el Foro Internacional de Acreditación (IAF), en el campo de sistemas de gestión, de productos, de servicios, personal y otros programas similares de evaluación de la conformidad, y la Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios (ILAC), en el campo de la acreditación de laboratorios y organismos de inspección. En México, la empresa encargada de emitir dichas acreditaciones es la Entidad Mexicana de Acreditación A.C. (EMA), la cual tiene como objetivo acreditar a los organismos de la evaluación de la conformidad: laboratorios de ensayo, laboratorios de calibración, laboratorios clínicos, unidades de verificación (organismos de inspección), organismos de certificación, Proveedores de Ensayos de Aptitud y a los Organismos Verificadores/Validadores de Emisión de Gases Efecto Invernadero (OVV GEI). La EMA cuenta con los máximos reconocimientos internacionales por el Foro Internacional de Acreditación (IAF) y la Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios (ILAC). Es necesario dirigirnos a esta empresa con la finalidad de gestionar la acreditación de acuerdo a los estándares de calidad correspondientes.

Normatividad y Reglamentación

Cuando se establece un nuevo laboratorio para el cultivo de células troncales humanas, obtener la aprobación apropiada que permita el manejo de ese tipo de material biológico, suele ser un proceso lento y que requiere de un gran compromiso. En la mayoría de los casos, las diversas solicitudes a realizarse deben de presentarse ante juntas de revisión y comités especializados; deben de ser obtenidas y ejecutadas autorizaciones para la transferencia y uso de diversos materiales, y el personal involucrado debe de ser entrenado previo a que se pueda llevar a cabo el cultivo de las células de interés en el nuevo laboratorio. Por todas las razones anteriores, en esta guía se sugiere la obtención de las certificaciones y autorizaciones Institucionales correspondientes, previo a la construcción del nuevo cuarto de cultivo. Los protocolos a seguir dependen del país, estado, ciudad e institución en la que nos encontremos ubicados (Figura 2). Todos los elementos antes mencionados juegan un papel importante en la aprobación institucional requerida previo al uso de células troncales.

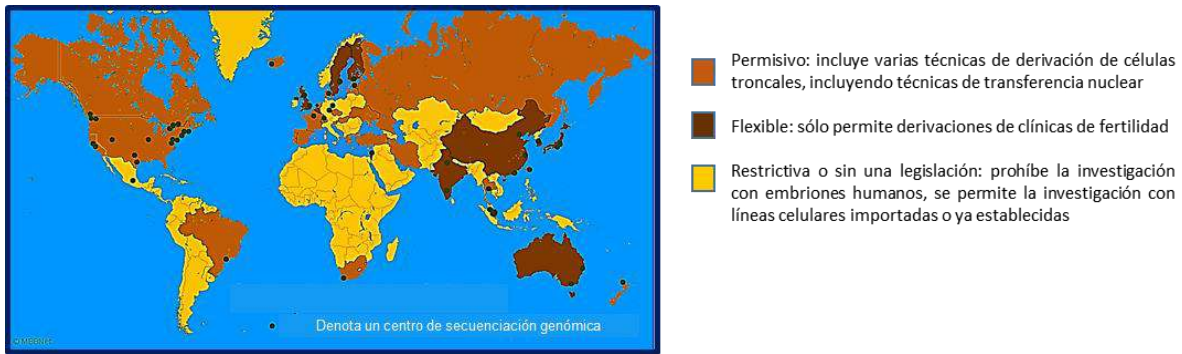


Figura 2. Mapa en donde se exhibe el tipo de política vigente en lo relativo al uso de células troncales en cada país. Modificado de MMBNet (Minnesota's virtual biomedical and biosciences community).

En México, la Ley General de Salud (LGS) y el Reglamento de la Materia (LGSMIS) regulan la investigación en materia de salud a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). La COFEPRIS es un órgano desconcentrado con autonomía administrativa, técnica y operativa y al frente de ésta se encuentra un Comisionado Federal designado por el Presidente de la República, a propuesta del Secretario de Salud; siendo la Secretaría de Salud quien supervisa a la COFEPRIS. Dicho organismo ejerce sus atribuciones de regulación, control y fomento sanitario en lo relativo a:

- El control y vigilancia de los establecimientos de salud.
- La prevención y el control de los efectos nocivos de los factores ambientales en la salud del hombre.
- La salud ocupacional y el saneamiento básico.
- El control sanitario de productos, servicios y de su importación y exportación y de los establecimientos dedicados al proceso de los productos.
- El control sanitario del proceso, uso, mantenimiento, importación, exportación y disposición final de equipos médicos, prótesis, órtesis, ayudas funcionales, agentes de diagnóstico, insumos de uso odontológico, materiales quirúrgicos, de curación y productos higiénicos, y de los establecimientos dedicados al proceso de los productos.
- El control sanitario de la publicidad de las actividades, productos y servicios.
- **El control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y sus componentes, células de seres humanos.**
- La sanidad internacional.
- **El control sanitario de las donaciones y trasplantes de órganos, tejidos células de seres humanos** (DOF, 2015).

Es muy importante mencionar que es imperativo estar al tanto de lo establecido por la Ley General de Salud vigente publicada en el Diario Oficial de la Federación. A continuación se señalan los puntos críticos a tomar en cuenta a la hora de establecer un laboratorio para la investigación con células troncales:

- **Artículo 17 bis.** La Secretaría de Salud ejercerá las atribuciones de regulación, control y fomento sanitarios que conforme a la presente Ley, a la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal, y los demás ordenamientos aplicables le corresponden a dicha dependencia en las materias a que se refiere el artículo 3o. de esta Ley en sus fracciones I, en lo relativo al control y vigilancia de los

establecimientos de salud a los que se refieren los artículos 34 y 35 de esta Ley: XIII, XIV, XXII, XXIII, XXIV, XXV, XXVI, ésta salvo por lo que se refiere a cadáveres y XXVII, esta última salvo por lo que se refiere a personas, a través de un órgano desconcentrado que se denominará Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

Para efectos de lo dispuesto en el párrafo anterior compete a la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios:

- I. Efectuar la evaluación de riesgos a la salud en las materias de su competencia, así como identificar y evaluar los riesgos para la salud humana que generen los sitios en donde se manejen residuos peligrosos;
- II. Proponer al Secretario de Salud la política nacional de protección contra riesgos sanitarios así como su instrumentación en materia de: establecimientos de salud; medicamentos y otros insumos para la salud; **disposición de órganos, tejidos, células de seres humanos y sus componentes**; alimentos y bebidas, productos de perfumería, belleza y aseo; tabaco, plaguicidas, nutrientes vegetales, sustancias tóxicas o peligrosas para la salud; productos biotecnológicos, suplementos alimenticios, materias primas y aditivos que intervengan en la elaboración de los productos anteriores; así como de prevención y control de los efectos nocivos de los factores ambientales en la salud del hombre, salud ocupacional y saneamiento básico;
- III. Elaborar y expedir las normas oficiales mexicanas relativas a los productos, actividades, servicios y establecimientos materia de su competencia, salvo en las materias a que se refieren las fracciones I y XXVI del artículo 3o. de esta Ley;
- IV. Evaluar, expedir o revocar las autorizaciones que en las materias de su competencia se requieran, así como aquellos actos de autoridad que para la regulación, el control y el fomento sanitario se establecen o derivan de esta Ley, sus reglamentos, las normas oficiales mexicanas y los demás ordenamientos aplicables;
- V. **Expedir certificados oficiales de condición sanitaria de procesos, productos, métodos, instalaciones, servicios o actividades relacionadas con las materias de su competencia;**
- VI. Ejercer el control y vigilancia sanitarios de los productos señalados en la fracción II de este artículo, de las actividades relacionadas con los primeros, de su importación y exportación, así como de los establecimientos destinados al proceso de dichos productos y los establecimientos de salud;
- VII. Ejercer el control y vigilancia sanitarios de la publicidad de las actividades, productos y servicios a los que se refiere esta Ley y sus reglamentos;
- VIII. **Ejercer el control y la vigilancia sanitarios de las donaciones y trasplantes de órganos y tejidos y células de seres humanos, salvo a lo dispuesto por los artículos 329, 332, 338 y 339 de esta Ley;**
- IX. Ejercer las atribuciones que esta Ley y sus reglamentos le confieren a la Secretaría de Salud en materia de sanidad internacional, con excepción de lo relativo a personas;
- X. Imponer sanciones y aplicar medidas de seguridad en el ámbito de su competencia;
- XI. Ejercer las atribuciones que la presente Ley, la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal, y los demás ordenamientos aplicables le confieren a la Secretaría de Salud en materia de efectos del ambiente en la salud, salud ocupacional, residuos peligrosos, saneamiento básico y accidentes que involucren sustancias tóxicas, peligrosas o radiaciones;
- XII. Participar, en coordinación con las unidades administrativas competentes de la Secretaría de Salud, en la instrumentación de las acciones de prevención y control de enfermedades, así como de vigilancia epidemiológica, especialmente cuando éstas se

relacionen con los riesgos sanitarios derivados de los productos, actividades o establecimientos materia de su competencia, y

XIII. Las demás facultades que otras disposiciones legales le confieren a la Secretaría de Salud en las materias que conforme a lo dispuesto en este artículo sean competencia de la Comisión.

- **Artículo 17 bis 1.** El órgano desconcentrado a que se refiere el artículo 17 bis tendrá, únicamente, autonomía administrativa, técnica y operativa y su presupuesto estará constituido por:

I. Las asignaciones que establezca la Ley de Ingresos y el Presupuesto de Egresos de la Federación, y

II. Los recursos financieros que le sean asignados, así como aquellos que, en lo sucesivo, se destinen a su servicio. Los ingresos que la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios obtenga por concepto de donativos nacionales e internacionales, rescate de seguros y otros ingresos de carácter excepcional podrán ser recuperados por dicha Comisión y destinados a su gasto de operación conforme a lo que establezca el Presupuesto de Egresos de la Federación para el ejercicio fiscal correspondiente.

- **Artículo 17 bis 2.** Al frente de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios estará un Comisionado Federal el cual será nombrado por el Presidente de la República, a propuesta del Secretario de Salud; siendo la Secretaría de Salud a quien corresponderá la supervisión de este órgano desconcentrado.

- **Artículo 313.** Compete a la Secretaría de Salud:

I. **El control y la vigilancia sanitarios de la disposición y trasplantes de órganos, tejidos y células de seres humanos, por conducto del órgano desconcentrado denominado Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios;**

II. La regulación sobre cadáveres, en los términos de esta Ley;

III. **Establecer y dirigir las políticas en salud en materia de donación, procuración y trasplantes de órganos, tejidos y células, para lo cual se apoyará en el Centro Nacional de Trasplantes, y en el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea;**

IV. Emitir las disposiciones de carácter general que permitan la homologación de los criterios de atención médica integral en la materia, y

V. **Elaborar y llevar a cabo, en coordinación con las instituciones públicas del Sistema Nacional de Salud y con los gobiernos de las entidades federativas, campañas permanentes de concientización sobre la importancia de la donación y los trasplantes.**

- **Artículo 314.-** Para efectos de este título se entiende por:

I. **Células germinales, a las células reproductoras masculinas y femeninas capaces de dar origen a un embrión;**

I Bis. **Células progenitoras o troncales, aquellas capaces de autoreplicarse y diferenciarse hacia diversos linajes celulares especializados;**

II. Cadáver, el cuerpo humano en el que se haya comprobado la pérdida de la vida;

III. **Componentes, a los órganos, los tejidos, las células y sustancias que forman el cuerpo humano, con excepción de los productos;**

IV. Componentes sanguíneos, a los elementos de la sangre y demás sustancias que la conforman;

V. **Destino final, a la conservación permanente, inhumación, incineración, desintegración e inactivación de órganos, tejidos, células y derivados, productos y**

cadáveres de seres humanos, incluyendo los de embriones y fetos, en condiciones sanitarias permitidas por esta Ley y demás disposiciones aplicables;

VI. Donador o disponente, al que tácita o expresamente consiente la disposición en vida o para después de su muerte, de su cuerpo, o de sus órganos, tejidos y células, conforme a lo dispuesto por esta Ley y demás disposiciones jurídicas aplicables;

VII. Se deroga.

VIII. Embrión, al producto de la concepción a partir de ésta, y hasta el término de la duodécima semana gestacional;

IX. Feto, al producto de la concepción a partir de la decimotercera semana de edad gestacional, hasta la expulsión del seno materno;

X. Órgano, a la entidad morfológica compuesta por la agrupación de tejidos diferentes, que mantiene de modo autónomo su estructura, vascularización y capacidad de desarrollar funciones fisiológicas;

XI. Producto, a todo tejido o sustancia extruida, excretada o expelida por el cuerpo humano como resultante de procesos fisiológicos normales. Serán considerados productos, para efectos de este Título, la placenta y los anexos de la piel;

XII. Receptor, a la persona que recibe para su uso terapéutico un órgano, tejido, células o productos;

XIII. Tejido, a la entidad morfológica compuesta por la agrupación de células de la misma naturaleza, ordenadas con regularidad y que desempeñen una misma función;

XIV. Trasplante, a la transferencia de un órgano, tejido o células de una parte del cuerpo a otra, o de un individuo a otro y que se integren al organismo;

XV. Banco de tejidos con fines de trasplante, establecimiento autorizado que tenga como finalidad primordial mantener el depósito temporal de tejidos para su preservación y suministro terapéutico;

XVI. Disponente secundario, alguna de las siguientes personas; él o la cónyuge, el concubinario o la concubina, los descendientes, los ascendientes, los hermanos, el adoptado o el adoptante; conforme a la prelación señalada;

XVII. Disposición, el conjunto de actividades relativas a la obtención, extracción, análisis, conservación, preparación, suministro, utilización y destino final de órganos, tejidos, componentes de tejidos, células, productos y cadáveres de seres humanos, con fines terapéuticos, de docencia o investigación;

XVIII. Asignación, el proceso mediante el cual el Comité Interno de Trasplantes selecciona los receptores de órganos y tejidos, obtenidos de un donador que haya perdido la vida;

XIX. Autotrasplante, trasplante que consiste en obtener un órgano o tejido del propio paciente y volverlo a implantar en él;

XX. Coordinador hospitalario de donación de órganos y tejidos para trasplantes, el médico especialista o general, debidamente capacitado por la Secretaría de Salud que realiza las funciones de procuración de órganos a que se refiere esta Ley;

XXI. Coordinación Institucional, la representación nombrada por cada institución de salud en el país ante la Secretaría de Salud con el fin de atender en el ámbito de su competencia, las políticas en salud en materia de donación y trasplantes de órganos, tejidos y células;

XXII. Distribución, al proceso a través del cual se determina el establecimiento de salud donde serán trasplantados los órganos y tejidos, obtenidos de un donador que haya perdido la vida;

XXIII. Implante, al procedimiento terapéutico consistente en la sustitución de una parte del cuerpo por material biológico nativo o procesado, o bien sintético, que podrá quedar o no integrado al organismo y sin que desempeñe alguna función que requiera la persistencia viva de lo sustituido;

XXIV. Institución de salud, a la agrupación de establecimientos de salud bajo una misma estructura de mando y normativa;

XXV. **Preservación, a la utilización de agentes químicos y/o modificación de las condiciones del medio ambiente durante la extracción, envase, traslado o trasplante de órganos, tejidos o células con el propósito de impedir o retrasar su deterioro;**

XXVI. **Procuración, al proceso y las actividades dirigidas a promover la obtención oportuna de órganos, tejidos y células donados para su trasplante, y**

XXVII. **Trazabilidad, a la capacidad de localizar e identificar los órganos, tejidos y sus componentes, y células, en cualquier momento desde la donación, y en su caso, hasta el trasplante o la transfusión.**

- **Artículo 314 Bis.- Los gobiernos de las entidades federativas deberán establecer centros de trasplantes, los cuales coadyuvarán con el Centro Nacional de Trasplantes presentando sus programas de trasplantes e integrando y actualizando la información del Registro Nacional de Trasplantes, de conformidad con lo que señalen esta Ley y las demás disposiciones aplicables.**
- **Artículo 314 Bis 1.- El Subsistema Nacional de Donación y Trasplantes está constituido por las dependencias y entidades de la Administración Pública, tanto federal como de las entidades federativas, el Centro Nacional de Trasplantes, los Centros Estatales de Trasplantes y el del Distrito Federal y las personas físicas o morales de los sectores público, social y privado que presten servicios de salud o se dediquen a actividades relacionadas con los trasplantes o la donación de órganos, tejidos y células, así como por los programas y los mecanismos de vinculación, coordinación y colaboración de acciones que se establezcan entre éstas. La política en materia de donación y trasplantes deberá guiarse por la transparencia, la equidad y la eficiencia, debiendo protegerse los datos personales en términos de las disposiciones aplicables.**
- **Artículo 314 Bis 2.- El Centro Nacional de Trasplantes tendrá a su cargo la coordinación del Subsistema Nacional de Donación y Trasplantes cuyas funciones se establecerán en la reglamentación respectiva.**
- **Artículo 315.- Los establecimientos de salud que requieren de autorización sanitaria son los dedicados a:**

I. La extracción, análisis, conservación, preparación y suministro de órganos, tejidos y células;

II. Los trasplantes de órganos y tejidos;

III. Los bancos de órganos, tejidos y células;

IV. Los bancos de sangre y servicios de transfusión, y

V. La disposición de células progenitoras o troncales. La Secretaría otorgará la autorización a que se refiere el presente artículo a los establecimientos que cuenten con el personal, infraestructura, equipo, instrumental e insumos necesarios para la realización de los actos relativos, conforme a lo que establezcan las disposiciones de esta Ley y demás aplicables.

- **Artículo 316.** Los establecimientos a que se refiere el artículo anterior contarán con un responsable sanitario, de quien deberán dar aviso ante la Secretaría de Salud. **Los establecimientos en los que se extraigan órganos, tejidos y células, deberán de contar con un Comité Interno de Coordinación para la donación de**

órganos y tejidos, que será presidido por el Director General o su inmediato inferior que sea médico con un alto nivel de conocimientos académicos y profesionales en la materia. Este comité será responsable de hacer la selección del establecimiento de salud que cuente con un programa de trasplante autorizado, al que enviará los órganos, tejidos o células, de conformidad con lo que establece la presente Ley y demás disposiciones jurídicas aplicables. A su vez, los establecimientos que realicen actos de trasplantes, deberán contar con un Comité Interno de Trasplantes que será presidido por el Director General o su inmediato inferior que cuente con un alto nivel de conocimientos médicos académicos y profesionales, y será responsable de hacer la selección de donantes y receptores para trasplante, de conformidad con lo que establece la presente Ley y demás disposiciones jurídicas aplicables. Los establecimientos en los que se extraigan órganos y tejidos y se realicen trasplantes, únicamente deberán contar con un Comité Interno de Trasplantes. El Comité Interno de Trasplantes deberá coordinarse con el comité de bioética de la institución en los asuntos de su competencia. Los establecimientos que realicen actos de disposición de sangre, componentes sanguíneos y células progenitoras hematopoyéticas, deberán contar con un Comité de Medicina Transfusional, el cual se sujetará a las disposiciones que para tal efecto emita la Secretaría de Salud. Los establecimientos de atención médica que transfundan sangre y sus componentes deberán contar con un Comité de Medicina Transfusional. Los establecimientos de atención médica que utilicen células progenitoras o troncales para regeneración de tejidos deberán contar con el Comité Interno de Trasplantes a que se refiere el artículo 316 de esta Ley. En caso de que el establecimiento cuente con la autorización sanitaria para hacer trasplante de órganos y tejidos a que se refiere el artículo 315, fracción I de esta Ley, se deberá conformar un subcomité que deberá presentar los casos al Comité Interno de Trasplantes. Los comités y subcomités a que se refiere este artículo se integrarán y sujetarán a las disposiciones que para tal efecto emita la Secretaría.

- **Artículo 316 Bis.-** Los establecimientos a los que se refieren las fracciones I y II del artículo 315 de esta Ley deberán contar con un coordinador hospitalario de donación de órganos y tejidos para trasplantes que esté disponible de manera permanente. El coordinador hospitalario de la donación de órganos y tejidos para trasplantes de los establecimientos a los que se refieren las fracciones I y II del artículo 315 deberá ser un médico especialista o general, que cuente con experiencia en la materia y esté capacitado por la Secretaría de Salud para desempeñar esa función, quien podrá auxiliarse en su caso de otros profesionales de la salud debidamente capacitados en la materia. Corresponderá a los coordinadores a los que se refiere este artículo:

- I. Detectar, evaluar y seleccionar a los donantes potenciales;
- II. Solicitar el consentimiento del familiar a que se refiere esta Ley;
- III. **Establecer y mantener coordinación con el Comité Interno de Trasplantes durante el proceso de procuración de órganos y tejidos;**
- IV. **Facilitar la coordinación entre los profesionales de la salud encargados de la extracción del o de los órganos y el de los médicos que realizarán el o los trasplantes,**
- V. **Coordinar la logística dentro del establecimiento de la donación y el trasplante;**
- VI. Resguardar y mantener actualizados los archivos relacionados con su actividad;
- VII. **Participar con voz en el Comité Interno de Trasplantes;**
- VIII. **Fomentar al interior del establecimiento la cultura de la donación y el trasplante;**

- IX. Representar al responsable sanitario del establecimiento en ausencia de éste, y
X. Lo que le atribuya esta Ley y las demás disposiciones aplicables.

- **Artículo 317. Los órganos no podrán ser sacados del territorio nacional. Los permisos para que los tejidos y sus componentes, así como las células puedan salir del territorio nacional, se concederán siempre y cuando estén satisfechas las necesidades de ellos en el país, salvo casos de urgencia.**
- **Artículo 318.- Para el control sanitario de los productos y de la disposición del embrión y de las células germinales, se estará a lo dispuesto en esta Ley, en lo que resulte aplicable, y en las demás disposiciones generales que al efecto se expidan.**
- **Artículo 319.- Se considerará disposición ilícita de órganos, tejidos, células y cadáveres de seres humanos, aquella que se efectúe sin estar autorizada por la Ley**
- **Artículo 321.- La donación en materia de órganos, tejidos, células y cadáveres, consiste en el consentimiento tácito o expreso de la persona para que, en vida o después de su muerte, su cuerpo o cualquiera de sus componentes se utilicen para trasplantes.**
- **Artículo 321 Bis.** La Secretaría de Salud promoverá que en todo establecimiento de atención obstétrica, se solicite sistemáticamente a toda mujer embarazada su consentimiento para donar de manera voluntaria y altruista la sangre placentaria para obtener de ella **células troncales o progenitoras para usos terapéuticos o de investigación**, por medio de una carta de consentimiento informado, garantizándole en todo momento su plena voluntad, libertad y confidencialidad, de conformidad con las demás disposiciones jurídicas aplicables.
- **Artículo 322.-** La donación expresa podrá constar por escrito y ser amplio cuando se refiera a la disposición total del cuerpo o limitada cuando sólo se otorgue respecto de determinados componentes. En la donación expresa podrá señalarse que ésta se hace a favor de determinadas personas o instituciones. También podrá expresar el donante las circunstancias de modo, lugar y tiempo y cualquier otra que condicione la donación. Los disponentes secundarios, podrán otorgar el consentimiento a que se refieren los párrafos anteriores, cuando el donante no pueda manifestar su voluntad al respecto. La donación expresa, cuando corresponda a mayores de edad con capacidad jurídica, no podrá ser revocada por terceros, pero el donante podrá revocar su consentimiento en cualquier momento, sin responsabilidad de su parte. En todos los casos se deberá cuidar que la donación se rija por los principios de altruismo, ausencia de ánimo de lucro y factibilidad, condiciones que se deberán manifestar en el acta elaborada para tales efectos por el comité interno respectivo. En el caso de sangre, componentes sanguíneos y células progenitoras hematopoyéticas se estará a lo dispuesto en las disposiciones jurídicas que al efecto emita la Secretaría de Salud.
- **Artículo 323.-** Se requerirá que el consentimiento expreso conste por escrito:
 - I. Para la donación de órganos y tejidos en vida, y**
 - II. Para la donación de sangre, componentes sanguíneos y células progenitoras hematopoyéticas en vida.**

- **Artículo 324.-** Habrá consentimiento tácito del donante cuando no haya manifestado su negativa a que su cuerpo o componentes sean utilizados para trasplantes, siempre y cuando se obtenga también el consentimiento de cualquiera de las siguientes personas que se encuentren presentes: el o la cónyuge, el concubinario, la concubina, los descendientes, los ascendientes, los hermanos, el adoptado o el adoptante. Si se encontrara presente más de una de las personas mencionadas, se aplicará la prelación señalada en este artículo. Las disposiciones reglamentarias determinarán la forma para obtener dicho consentimiento. El escrito por el que la persona exprese no ser donador, podrá ser privado o público, y deberá estar firmado por éste, o bien, la negativa expresa podrá constar en alguno de los documentos públicos que para este propósito determine la Secretaría de Salud en coordinación con otras autoridades competentes. Las disposiciones reglamentarias determinarán la forma para obtener dicho consentimiento.

- **Artículo 327.-** Está prohibido el comercio de órganos, tejidos y células. La donación de éstos con fines de trasplantes, se regirá por principios de altruismo, ausencia de ánimo de lucro y confidencialidad, por lo que su obtención y utilización serán estrictamente a título gratuito. No se considerarán actos de comercio la recuperación de los costos derivados de la obtención o extracción, análisis, conservación, preparación, distribución, transportación y suministro de órganos, tejidos, incluyendo la sangre y sus componentes, y células progenitoras o troncales.

- **Artículo 330.-** Los trasplantes de órganos, tejidos y células en seres humanos vivos podrán llevarse a cabo cuando hayan sido satisfactorios los resultados de las investigaciones realizadas al efecto, representen un riesgo aceptable para la salud y la vida del donante y del receptor, y siempre que existan justificantes de orden terapéutico.

- **Artículo 333.-** Para realizar trasplantes entre vivos, deberán cumplirse los siguientes requisitos respecto del donante:
 - I. Ser mayor de edad y estar en pleno uso de sus facultades mentales;
 - II. Donar un órgano o parte de él que al ser extraído su función pueda ser compensada por el organismo del donante de forma adecuada y suficientemente segura;
 - III. Tener compatibilidad aceptable con el receptor;
 - IV. Recibir información completa sobre los riesgos de la operación y las consecuencias de la extracción del órgano o tejido, por un médico distinto de los que intervendrán en el trasplante;
 - V. Haber otorgado su consentimiento en forma expresa, en términos de los artículos 322 y 323 de esta Ley, y
 - VI. Los trasplantes se realizarán, de preferencia, entre personas que tengan parentesco por consanguinidad, civil o de afinidad. Sin embargo, cuando no exista un donador relacionado por algún tipo de parentesco, será posible realizar una donación, siempre y cuando se cumpla con los siguientes requisitos:
 - a) Obtener resolución favorable del Comité de Trasplantes de la institución hospitalaria, donde se vaya a realizar el trasplante, previa evaluación médica, clínica y psicológica; Asimismo, para realizar trasplantes entre vivos, cuando el receptor y/o el donador sean extranjeros, deberá además de cumplir lo previsto en el presente artículo y demás disposiciones aplicables, acreditar su legal estancia en el país con la calidad migratoria específica que corresponda, y el establecimiento en el que se vaya a realizar el trasplante, deberá inscribir al paciente al Registro Nacional de Trasplantes con una antelación de al

menos quince días hábiles si se trata de un trasplante entre familiares por consanguinidad, civil o de afinidad hasta el cuarto grado.

b) El interesado en donar deberá otorgar su consentimiento expreso ante Notario Público y en ejercicio del derecho que le concede la presente Ley, manifestando que ha recibido información completa sobre el procedimiento por médicos autorizados, así como precisar que el consentimiento es altruista, libre, consciente y sin que medie remuneración alguna. El consentimiento del donante para los trasplantes entre vivos podrá ser revocable en cualquier momento previo al trasplante, y

c) Haber cumplido todos los requisitos legales y procedimientos establecidos por la Secretaría, para comprobar que no se está lucrando con esta práctica.

- **Artículo 334.-** Para realizar trasplantes de donantes que hayan perdido la vida, deberá cumplirse lo siguiente:

I. Comprobar, previamente a la extracción de los órganos y tejidos y por un médico distinto a los que intervendrán en el trasplante o en la extracción de los órganos o tejidos, la pérdida de la vida del donante, en los términos que se precisan en este título;

II. Existir consentimiento expreso del disponente, que conste por escrito o no constar la revocación del tácito para la donación de sus órganos y tejidos;

- **Artículo 335.-** Los profesionales de las disciplinas para la salud que intervengan en la extracción de órganos y tejidos o en trasplantes deberán contar con el entrenamiento especializado respectivo, conforme lo determinen las disposiciones reglamentarias aplicables, y estar inscritos en el Registro Nacional de Trasplantes.

- **Artículo 337.-** Los concesionarios de los diversos medios de transporte otorgarán todas las facilidades que requiera el traslado de órganos y tejidos destinados a trasplantes, conforme a las disposiciones reglamentarias aplicables y las normas oficiales mexicanas que emitan conjuntamente las secretarías de Comunicaciones y Transportes y de Salud. **El traslado, la preservación, conservación, manejo, etiquetado, claves de identificación y los costos asociados al manejo de órganos, tejidos y células que se destinen a trasplantes, se ajustarán a lo que establezcan las disposiciones generales aplicables. El traslado de órganos, tejidos y células adecuadamente etiquetados e identificados, podrá realizarse en cualquier medio de transporte por personal debidamente acreditado bajo la responsabilidad del establecimiento autorizado para realizar trasplantes o para la disposición de órganos, tejidos y células.**

- **Artículo 339. La distribución y asignación en el territorio nacional de órganos, tejidos y células, con excepción de las progenitoras o troncales, de donador con pérdida de la vida para trasplante, deberá sujetarse a los criterios previstos en la presente Ley y los emitidos por la Secretaría de Salud, mediante disposiciones de carácter general que deberán publicarse en el Diario Oficial de la Federación.**

- **Artículo 340.-** El control sanitario de la disposición de sangre lo ejercerá la Secretaría de Salud a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

- **Artículo 341.-** La disposición de sangre, componentes sanguíneos y células progenitoras hematopoyéticas con fines terapéuticos estará a cargo de bancos de sangre y servicios de transfusión que se instalarán y funcionarán

de acuerdo con las disposiciones aplicables. La sangre será considerada como tejido.

- **Artículo 342.-** Cualquier órgano o tejido que haya sido extraído, desprendido o seccionado por intervención quirúrgica, accidente o hecho ilícito y que sanitariamente constituya un deshecho, deberá ser manejado en condiciones higiénicas y su destino final se hará conforme a las disposiciones generales aplicables, salvo que se requiera para fines terapéuticos, de docencia o de investigación, en cuyo caso los establecimientos de salud podrán disponer de ellos o remitirlos a instituciones docentes autorizadas por la Secretaría de Salud, en los términos de esta Ley y demás disposiciones generales aplicables.
- **Artículo 342 Bis.** Los tejidos músculo-esquelético, cutáneo y vascular, obtenidos de donadores con pérdida de la vida y la membrana amniótica, podrán destinarse a procedimientos que permitan obtener insumos para la salud, para efectos de implantes. Estos tejidos únicamente se podrán obtener en los establecimientos autorizados por la Secretaría de Salud, en los términos del artículo 315 de esta Ley. Los establecimientos para la atención de la salud en los cuales se obtenga la donación de los tejidos antes referidos, se sujetarán a las disposiciones que dicte la Secretaría de Salud. Las disposiciones que emita la Secretaría de Salud contemplarán, al menos, los mecanismos de aprovechamiento, procesamiento o utilización, bajo condiciones que garanticen calidad, seguridad y eficacia.
- **Artículo 342 Bis 1.** El plasma residual podrá destinarse a procedimientos de fraccionamiento para obtener hemoderivados. Tanto los establecimientos de salud que suministren el plasma residual, como los establecimientos que lo reciban para elaborar hemoderivados, deberán estar autorizados conforme a los artículos 198 fracción I y 315 de esta Ley. Asimismo, se sujetarán a las disposiciones que dicte la Secretaría de Salud. Las disposiciones que emita la Secretaría de Salud contemplarán, al menos, los mecanismos de aprovechamiento, procesamiento o utilización bajo condiciones que garanticen calidad, seguridad y eficacia.
- **Artículo 342 Bis 2.** La Secretaría de Salud establecerá las disposiciones aplicables para regular la disposición y procesamiento de los tejidos y el plasma residual referidos en los artículos 342 Bis y 342 Bis 1 de esta Ley, a fin de garantizar la trazabilidad en cuanto a origen y destino de los mismos. Asimismo, establecerá los mecanismos para promover la accesibilidad a los hemoderivados del plasma residual y de los insumos para la salud a que se refiere el artículo 342 Bis, en condiciones de equidad y seguridad en beneficio para la salud pública.

Además de la Ley General de Salud vigente, existen legislaciones locales de importancia que deben ser consideradas, tales como el Código Penal para el Distrito Federal, el Código Penal para el estado libre y soberano de Jalisco y el Código Civil Federal, entre otras. A continuación se describen los artículos clave del Código Penal para el Distrito Federal relativos al uso de células troncales humanas:

- **Artículo 149.** A quien disponga de óvulos o espermatozoides para fines distintos a los autorizados por sus donantes, se le impondrán de tres a seis años de prisión y de cincuenta a quinientos días multa-

- **Artículo 154.** Se impondrán de dos a seis años de prisión, inhabilitación, así como suspensión por igual término para desempeñar cargo, empleo o comisión públicos, profesión u oficio, a los que:
 - I. Con finalidad distinta a la eliminación o disminución de enfermedades graves o taras, manipulen genes humanos de manera que se altere el genotipo;
 - II. Fecunden óvulos humanos con cualquier fin distinto al de la procreación humana; y**

III. Creen seres humanos por clonación o realicen procedimientos de ingeniería genética con fines ilícitos.

En materia de legislación relativa al uso de células troncales el estado libre y soberano de Jalisco menciona en su código penal lo siguiente:

- **Artículo 179 Bis.** Al ascendiente que ejerza la patria potestad o al que tenga a su cargo la custodia de un menor de catorce años, aunque ésta no haya sido declarada, que ilegítimamente lo entregue a otro para su custodia a cambio de un beneficio económico, se le aplicará pena de prisión de dos a ocho años y multa por el importe de veinte a cien días de salario. Cuando por consecuencia del tráfico del menor, éste resultare afectado en su integridad física por **extraerle algún miembro u órgano**, se aplicará como sanción una pena de seis a diez años de prisión, independientemente de las que pudieran resultar por la comisión de cualquier otro delito.

De igual forma el Código Civil Federal señala lo siguiente:

- **Artículo 22.- La capacidad jurídica de las personas físicas se adquiere por el nacimiento y se pierde por la muerte; pero desde el momento en que un individuo es concebido, entra bajo la protección de la ley y se le tiene por nacido para los efectos declarados en el presente Código.**

Ubicación del laboratorio.

El último punto a considerar previo al diseño y construcción de un laboratorio para la investigación con células troncales humanas, hace referencia a la ubicación del nuevo recinto. Debemos recordar que las actividades que involucren el cultivo celular pueden verse afectadas de manera adversa por diversos factores. En lo general, el principal requerimiento consiste en localizar el nuevo laboratorio en un espacio donde el ambiente sea limpio y pueda mantenerse bien controlado. Cualquier fuente de contaminación tales como polvo, aerosoles, áreas húmedas, laboratorios en donde se trabaje con microorganismos, así como vivarios o bioterios, suelen ser muy problemáticos ya que representan un grave riesgo para los cultivos. Cabe señalar que áreas poco ventiladas suelen incrementar la susceptibilidad a la contaminación (Lyons, 2007).

Se subraya que, cuando se proyecta operar bajo buenas prácticas de laboratorio, existen consideraciones adicionales en términos de servicios disponibles e instalaciones. Restricciones sobre la ubicación particular en términos de fuentes locales de contaminación, incluyen:

-Tener accesos directos desde un pasillo principal o de otras áreas de actividades no relacionadas.

- Establecer el laboratorio con grandes áreas de espacio muerto.
- Laboratorios con techos bajos que no aporten espacio suficiente para la instalación de filtros HEPA.
- Laboratorios muy pequeños o estrechos que obstaculicen el movimiento del usuario.
- Se sugiere que el equipo pesado como centrifugadoras e incubadoras se ubiquen de tal manera que permitan la limpieza adecuada del laboratorio.

Diseño del Laboratorio. Especificaciones.

Para dar comienzo al diseño del laboratorio, se recomienda realizar un bosquejo por escrito en donde pueda ser identificado el trabajo de ingeniería necesario para cada una de las áreas a construir; así mismo, en el boceto se debe incluir el acabado que se le dará a cada uno de los componentes del laboratorio, así como el equipo y materiales con el que se contará. Es útil adoptar esta estrategia ya que permitirá operar bajo los estándares de calidad más altos una vez que se haya concluido la construcción. Cabe señalar que prestar atención a la ergonomía es un punto importante ya que un laboratorio incómodo o congestionado incrementa la probabilidad de que en él se sufran accidentes o que exista contaminación de los cultivos (Wesselschmidt, 2006).

Los principios primordiales a seguir a la hora de construir cada una de las áreas que conformarán el laboratorio, son:

1. El laboratorio deberá de ser construido en un ambiente ordenado y poco concurrido. La disposición deberá permitir el cultivo celular, pruebas bioquímicas, así como la realización de experimentos bajo microscopio. De igual manera, se debe designar un área para consumibles e insumos y otra exclusiva para desechos.
2. Normalmente se definen dos áreas de trabajo: un área de cultivo con secciones que puedan ser dedicadas a diferentes tipos de células y un área de biología molecular con equipo apropiado y organizado para un constante flujo de trabajo. El área de biología molecular es adyacente al cuarto de cultivo, permitiendo un fácil acceso, pero manteniendo la integridad de ésta.
3. Si es posible, la construcción deberá consistir en una estructura modular que permita que, en el caso de ser necesario, el laboratorio pueda ser reconfigurado fácilmente.
4. Un sistema centralizado de CO₂ con los tanques localizados fuera de los laboratorios, ahorra espacio y simplifica el monitoreo de los niveles, además de que no compromete la limpieza del cuarto al realizar los cambios de tanques. Es importante mencionar que las líneas deben ser individuales para cada equipo: incubadoras, citómetro y microscopios (en caso de que en los estudios de imagenología se requieran estudios con células vivas).
5. Agua de alta calidad para el laboratorio debe ser proveída por un sistema Mili-Q. Hay que subrayar que la calidad del agua es indispensable para el cultivo celular, así como para las técnicas de biología molecular.
6. Para facilitar la limpieza y el mantenimiento del laboratorio se recomienda usar pisos recubiertos de vinyl, así como pintura con concentraciones bajas de componentes orgánicos volátiles.

7. Idealmente los cuartos deben de tener iluminación fluorescente y la temperatura ambiente debe ser constante (18-22°C). El aire circulante debe de pasar a través de filtros 0.22um HEPA; el diseño de los cuartos de cultivo debe de tener una presión positiva, mientras que los utilizados en áreas de biología molecular o los usados para trabajo que involucren virus deberán contar con presión negativa.

8. Los requerimientos de seguridad para los laboratorios, conforme a los estándares de la jurisdicción local, deberán incluir: lava-ojos, regaderas, kits de primeros auxilios, extinguidores y un kit para derrames de químicos. Así mismo, contenedores de desechos deberán estar localizados al final de cada mesa de trabajo (se sugieren aquellos que cuentan con tapas activadas por pedal).

9. Las áreas comunes de trabajo serán convenientemente localizadas a la mitad del laboratorio. Computadoras comunes, puertos de conexión y teléfonos, deberán estar situados al final de las estaciones de trabajo.

10. Cuando la disposición del equipo de laboratorio haya sido determinada, los contactos eléctricos deben de ser planeados dependiendo del voltaje y tipo de requerimiento (alto o bajo voltaje, entradas trifásicas, etc.). Además, cierto equipo como máquinas de hielo y autoclaves, requieren un fácil acceso a entradas y salidas de agua.

11. Las incubadoras, congeladores y ultra-congeladores deberán de estar conectados a una planta de emergencia con un sistema de alarma.

A continuación se muestra una posible disposición para el laboratorio de cultivo celular en donde se resalta la necesidad de segregar los espacios destinados para cada una de los actividades a desarrollar (Figura 3). Cabe señalar que los principios anteriormente enlistados han sido ilustrados en el esquema.

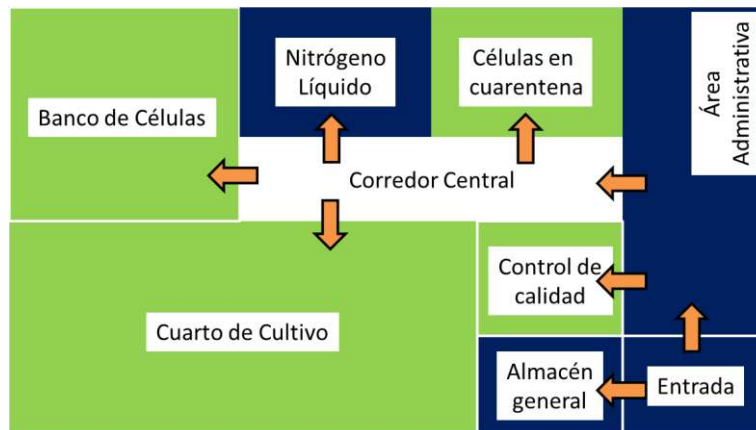


Figura 3. Disposición sugerida para el laboratorio de cultivo celular. En el esquema se puede observar la circulación y la disposición de las principales áreas que integran nuestro laboratorio de cultivo celular. Modificado de Inamdar, M.S., 2012.

Calidad del Aire

Cuartos limpios pueden ser construidos de manera efectiva tomando en cuenta dos puntos clave que nos permiten tener éxito en el proceso: el espacio disponible y un financiamiento robusto. Un cuarto limpio es un laboratorio diseñado para operar con ciertos estándares de calidad de aire, en donde se presta especial atención en el tipo de muebles y acabados, los

cuales debe tener un diseño que impida el crecimiento de microorganismos. Así mismo, los materiales usados en su construcción no deben liberar partículas en el interior del laboratorio y deben estar sometidos a limpieza y desinfección de manera regular (Vranch, 2007).

Uno de los aspectos más importantes para un laboratorio de células troncales es lograr demostrar que el personal es capaz de mantener cultivos celulares por periodos extendidos, en general, sin usar antibióticos; para lo cual se requiere de infraestructura adecuada que provea aire de calidad, así como la ejecución de protocolos acertados que permitan mantener la limpieza del laboratorio.

Chequeos periódicos con métodos simples son suficientes para demostrar que el laboratorio mantiene los estándares requeridos. A pesar de lo anterior, es importante mencionar que cierto grado de contaminación es inevitable. Cuando los materiales desarrollados o procesados en el laboratorio pretenden ser utilizados en el área clínica, usualmente se requiere lo siguiente para cumplir con los estándares de calidad correspondientes: todo el trabajo de cultivo celular debe llevarse a cabo en una campana Clase 100 ubicada en un cuarto limpio Clase 10 000, así mismo, el personal debe utilizar de manera obligatoria guantes y ropa estéril.

Logística

Para el éxito del laboratorio de células troncales, es de suma importancia elaborar planes de contingencia en caso de fallo de cierto equipo; así mismo, es importante considerar fuentes de contaminación tales como el agua presente en baños maría, aire acondicionado o equipo de alta humedad tales como las incubadoras.

El aire acondicionado requiere de mantenimiento regular y debe ser ubicado en un lugar donde no interrumpa el flujo laminar de los cuartos de bioseguridad; así mismo, debe permitir el fácil acceso al personal de mantenimiento.

Así mismo, las incubadoras deben de ser cuidadosamente mantenidas para evitar la contaminación: el agua usada para conservar la humedad debe ser regularmente limpiada y tratada, de igual manera, los filtros de los inyectores de gas deben de ser reemplazados periódicamente y la toma y fuentes de agua deben ser ubicadas en sitios en donde no exista una contaminación asociada a microorganismos (Stacey, 2004).

Por su parte, el área de criopreservación (almacenamiento en nitrógeno líquido) requiere de especial atención, debe ser un sitio bien ventilado y permitir la disipación rápida de los gases liberados por el uso normal de nitrógeno líquido. Los congeladores y ultracongeladores también deben estar ubicados en áreas con una ventilación abundante, pero jamás deben localizarse junto a contenedores de nitrógeno líquido (Fountain, 1997).

Servicios (Gas, aire acondicionado y electricidad)

Un laboratorio para el cultivo celular requiere de nitrógeno líquido y CO₂. Los requerimientos del área de almacenaje están encaminados a evitar la contaminación y a garantizar la seguridad de los usuarios, tal como fue mencionado previamente. Se debe tomar en cuenta el hecho de que los cilindros de gas deben de ser ubicados fuera de las áreas limpias para que éstos puedan ser reemplazados sin riesgo de que se contaminen los cultivos. En el caso en particular del CO₂ se recomienda contar con al menos un tanque de repuesto el cual pueda ser cambiado de manera manual o automática por cualquier usuario una vez que el tanque principal en uso se agote.

Es importante mencionar que el fallo de los inyectores de gas puede resultar desastroso, por lo que se les debe dar un mantenimiento constante en acuerdo con las normas estipuladas para el almacenaje y manejo de gases presurizados. En particular, el laboratorio para el cultivo celular debe asegurarse de que los tanques de gas sean movidos de manera segura (evitando el contacto con otros objetos) y revisados de manera periódica por personal certificado.

Aire acondicionado

El aire acondicionado es esencial para contrarlar la temperatura del laboratorio cuando se presentan climas extremos, pero son una fuente de contaminación e interfieren con el flujo de aire mantenido en las áreas de bioseguridad clase II. Seleccionar el lugar en donde se ubicará debe ser un proceso cuidadoso, además de que debemos de tomar en cuenta que la unidad de servicio debe ser de fácil acceso para el personal de mantenimiento. En el mercado se encuentran disponibles aires acondicionados con filtros de alta calidad, los cuales nos permiten tener control no sólo sobre la temperatura, sino también sobre la humedad de las áreas; por lo que se recomienda no escatimar en gastos al respecto.

El aire filtrado (idealmente filtrado por filtros HEPA) provee de presión positiva en áreas limpias, lo que nos garantiza una calidad de aire adecuado siempre y cuando se mantenga el sistema monitoreado de manera regular y que el personal capacitado por el proveedor original le dé servicio periódicamente al equipo.

Electricidad

Un generador de electricidad que nos respalde en caso de que falle el proveedor de energía habitual, es esencial para cierto equipo (aquellos aparatos vitales para el mantenimiento y almacenaje de las células). Así mismo, lámparas de emergencia alimentadas con baterías deben de ser instaladas para evitar accidentes ocasionados por oscuridad en áreas de trabajo en los momentos previos a que el generador comience a funcionar. Los segundos que pasan entre el corte del proveedor habitual de electricidad y el funcionamiento del generador de respaldo, pueden resultar en la interrupción del flujo de aire requerido en las áreas con bioseguridad clase II, por lo que el ambiente estéril se verá comprometido. Se recomienda que campanas, incubadoras y filtros de aire, estén conectados a una fuente de electricidad ininterrumpida.

Equipo

En esta sección se enlista el equipo mínimo requerido para el cultivo básico y la caracterización de células troncales (Wesselschmidt, 2011).

Área de cultivo celular.

Dependiendo del espacio disponible, las áreas de cultivo celular deberán de ser separadas en cuartos especializados (o áreas) para células de origen humano, para células de origen no humano (células nodrizas de ratón) y para trabajo con virus. Idealmente cada cuarto deberá tener puertas automáticas de vidrio deslizantes para un rápido acceso, con una presión positiva en el caso de cuartos de cultivo, y negativa en el caso de trabajo con virus. Es necesario equipar a cada cuarto de cultivo con estaciones de trabajo independientes, que consisten en:

-Campanas.

Se sugiere el uso de campanas equipadas con una base térmica y un microscopio estereoscópico para facilitar el aislamiento de colonias u otras manipulaciones. De igual manera, se recomienda que cuente con lámparas germicidas UV, salidas para CO₂, un

equipo de vacío con frascos de 2L de colecta, suministros eléctricos y pipetores. El uso de ventanas neumáticas sería deseable. La campana acoplada a un microscopio es una buena combinación o si no se cuenta con esta configuración un solo gabinete o estación de trabajo será necesario (Figura 4).



Figura 4. Ejemplo de un área de trabajo en donde se observa la campana de bioseguridad, incubadora y estación de trabajo. El personal debe de contar con las medidas necesarias de higiene y protección.

-Incubadoras.

Las incubadoras de CO₂ deberán de estar situadas a un costado de la campana de flujo laminar (jamás deben de ser colocadas atrás del usuario), minimizando así los movimientos innecesarios de los platos de cultivo y reduciendo el derrame o caída accidental de medio. Es importante mencionar que las tomas eléctricas en algunas incubadoras deben permitir la instalación temporal de equipo en el interior de ellas, por ejemplo orbitadores para la formación de cuerpos embrionarios o cultivos en tres dimensiones, Figura 4.

Existen muchas incubadoras de CO₂ disponibles en el mercado, los criterios de selección más importantes son: un interior fácilmente sanitizable o de esterilización automática, pantalla con niveles de CO₂ y las alarmas pertinentes.

Dentro del mínimo equipo necesario debemos considerar la adquisición de pipetores automáticos, un dispositivo de aspiración con velocidad de vacío regulable e intercambiador de puntas, un baño María (37°C), una centrífuga de baja velocidad, un juego de micropipetas (0.5-1000uL), un vortex, equipo de criopreservación y consumibles plásticos desechables.

Área de microscopía.

Dentro del cuarto de cultivo puede existir un microscopio invertido para campo claro/contraste de fase para visualización de células o realizar conteos celulares, puede requerirse también un microscopio estereoscópico en el caso de que se aíslen colonias de manera manual, por ejemplo.

Cabe señalar que los microscopios deberán estar físicamente aislados de centrifugas y cualquier equipo que produzca vibración.

Área de almacenamiento

Dentro de esta área se debe contar con gabinetes y repisas para el almacenamiento de los consumibles requeridos para el cultivo celular, un refrigerador (4°C), un congelador (-20°C),

un ultracongelador (-70 to -85°C) y un congelador criogénico (-140°C , usualmente nitrógeno líquido).

Área de biología molecular

El área de biología molecular es descrita en otro capítulo de este libro, sin embargo para el análisis correcto del cultivo celular necesitará equipo compartido de esta área.

La organización del área de biología molecular debe de ser determinada de acuerdo al espacio disponible y al número de trabajadores. Para una mayor eficiencia en áreas de alta densidad, el espacio puede ser organizado en áreas funcionales de un flujo específico de trabajo. En este sistema todo el equipo y reactivos están a la mano para un proceso en dado, de tal manera que el personal del laboratorio pueda tener todo disponible para realizar su tarea. Por ejemplo, el área de inmunohistoquímica con todo el equipo y anticuerpos fácilmente disponibles a la mano, una mesa separada con cabina de flujo laminar para la preparación de RNA y PCR la cual estaría lejana al área de manipulación y análisis, reduciendo así la posible contaminación con productos, etc. Cada área deberá contar con las herramientas básicas tales como: un juego de micropipetas (0.5-1000 μL), una microcentrifuga, un vortex, un refrigerador (4°C), un congelador (-20°C) y consumibles.

Es importante también tener un área común que cuente con el equipo generalmente empleado: como son balanzas analíticas, una centrifuga, un espectrofotómetro, un equipo de lectura de geles UVP, un transiluminador, un potenciómetro y una ultracentrífuga. Como consideraciones adicionales podemos incluir el siguiente equipo: un citómetro de flujo, un microscopio de epifluorescencia y si el presupuesto lo permite, un microscopio confocal.

Área de cuarentena

Se debe contar con un área destinada a cuarentena para aislar cultivos celulares que pongan en riesgo a las demás líneas celulares. Esta área debe contar con el siguiente equipo: una campana de flujo laminar, una incubadora, un microscopio de contraste de fases, un baño María (37°C), una centrifuga de baja velocidad, pipetores, un dispositivo de aspiración y los suficientes consumibles necesarios para montar un experimento.

Prácticas generales en el laboratorio de cultivo celular

Respecto a la calidad del aire, se requiere de cuidado y atención a detalle. Todo el personal debe estar bien entrenado en lo referente al mantenimiento del laboratorio. Cada miembro del laboratorio debe compartir la responsabilidad del adecuado uso y mantenimiento del equipo. Cabe señalar que en lugares con climas cálidos y húmedos, una fumigación regular para el control de plagas es requerida. Así mismo, dado el alto número de partículas en el aire que caracteriza a la atmósfera de grandes ciudades, todos los manejos de los cultivos celulares deben de ser realizados dentro de las campanas de flujo laminar.

Una de las mayores diferencias operacionales entre un laboratorio de investigación en el que se usa células troncales y un laboratorio en donde no se manejan modelos celulares *in vitro*, es la necesidad de esterilizar y/o desinfectar (usualmente con isopropanol al 70%) todo el material que entre al laboratorio.

En los cuartos limpios, el personal deber prescindir de su vestimenta habitual, la cual debe ser sustituida por ropa limpia y estéril. Así mismo, debe lavar sus manos previamente con jabones y geles antibacteriales. Todos los que ingresen al cuarto de cultivo deberán usar cubre bocas, guantes y gorros, los cuales deben de ser empacados y esterilizados de manera individual. Se ha demostrado que la indumentaria en el cuarto de cultivo reduce la

diseminación de microorganismos desde más de 10.000 partículas por minuto a 3.000, o de 50.000 microorganismos por pie cúbico a 500, así como su capacidad para evitar la contaminación de un lado a otro o por contacto directo.

Respecto a los reactivos comúnmente usados, es necesario que se conozcan las propiedades de cada uno de ellos, lo cual garantizará la seguridad de todo el personal. Así mismo, es importante tener un stock para evitar así la interrupción de experimentos importantes. Otro aspecto crítico a considerar es que todo el personal debe de ser responsable de monitorear de manera constante la fecha de caducidad de los reactivos, lo cual nos asegurará la obtención de resultados confiables y reproducibles (Stacey, 2007).

Cultivo celular, crio preservación y Banco de Células

Instrucciones respecto a los principios de las buenas prácticas de laboratorio, son las mismas en el área de cultivo celular, éstas nos ayudan en la ejecución de los protocolos habituales y todo el personal sin excepción que tenga acceso al laboratorio debe de ser entrenado en lo referente y respetar el 100% de los puntos establecidos en dichas guías.

Protocolos básicos. Pasaje celular

El pasaje o subcultivo celular es un procedimiento que consiste en la extracción de todas o algunas de las células de un plato de cultivo y colocarlas en otra caja con medio fresco y nuevo, evitando así la senescencia y muerte celular ocasionada por mantenerlas en un estado confluyente o simplemente por el incremento de células que se encuentren en división. Es recomendable hacer un pasaje de células cuando éstas se encuentren en la fase de replicación máxima, ya que si alcanzan más del 90% de confluencia la morfología comenzará a perderse y las células se deteriorarán rápidamente después de unos pocos pasajes más (Demirovic and Rattan 2011). Para realizar este proceso de manera correcta es necesario considerar que todos los materiales a utilizar deberán estar estériles y se manejen con precaución para evitar cualquier tipo de contaminación. De igual manera es necesario etiquetar correctamente las nuevas botellas, platos o placas que serán utilizadas para mantener el orden dentro de nuestro protocolo (Popovic, 2015; abcam.com/technical). Existen características propias de cada línea celular, por lo que la forma de disgregación será diferente en cada caso, con la finalidad de poder realizar un pasaje correctamente (Tabla 1).

Tabla 1. Diferentes tipos de agentes de disociación utilizados según la línea celular. Se puede observar la característica de la línea celular de trabajo y el agente de disociación preferible. Modificado de thermofisher.com

Característica de línea celular	Agente de disociación
Células mitóticas, células de baja adherencia	Balanceo o agitación, pipeteo vigoroso, disociación mecánica
Células sensibles a proteasas y células poco adherentes.	Raspador, PBS-EDTA
Células de alta adherencia	Tripsina-Acutasa
Células con alta densidad o multicapas	Tripsina-colagenasa
Sustituto de la tripsina para células de alta adherencia que sean sensibles a esta	Combinación de varias proteasas recombinantes

Pasaje enzimático

Para el pasaje de las células adherentes siempre será necesario preparar el material que se utilizará antes de iniciar, de esta forma conseguimos evitar interrumpir el procedimiento: se debe contar con el frasco o plato de cultivo conteniendo a las células a las cuales se les realizara el pasaje, nuevas cajas a las cuales se subcultivaran, medio de cultivo a temperatura ambiente, un buffer de fosfatos o una solución de Hanks, tripsina, tubos de 15

ml, cámara de Neubauer, azul de tripano, pipetor, pipetas serológicas, botella de desechos, micropipetas y puntas para micropipetas estériles (Villegas and McPhaul 2005).

El pasaje utilizando tripsina se resume a continuación:

1. Retirar las células de la incubadora y dentro de la campana de flujo laminar, iniciar el procedimiento de aspirado, retirando gentilmente el medio de cultivo del plato en donde se encuentran las células.
2. Lavar en tres ocasiones con un buffer de fosfatos (tres ml por cada 10 cm² aproximadamente) deslizando el líquido por una de las paredes del plato y balancear suavemente para lavar todas las células, posteriormente aspirar el buffer y desecharlo.
3. Agregar tripsina al plato (0.5ml por cada 10cm²), homogenizar gentilmente e incubar a 37°C durante cinco minutos. Una vez disociadas las células, agregar el triple del volumen utilizado de tripsina de medio de cultivo que contenga suero para inactivar la tripsina.
4. Retirar a las células con una pipeta serológica y colocarlas dentro de un tubo de 15ml, centrifugar y desechar el sobrenadante, para resuspender el pellet formado de células en un ml de medio de cultivo fresco y realizar el conteo celular, sembrar a la densidad deseada en un plato de cultivo nuevo. La tabla 2 ejemplifica la cantidad de medio recomendado para la superficie y tipo de placa de cultivo.

Tabla 2. Densidad celular y volumen de medio recomendado para las diferentes placas y superficie de sembrado. Modificada de Corning, cell culture selection guide.

Botella	Rendimiento celular promedio (100% de confluencia)	Volumen de medio recomendado (ml)
25 cm²	2.5x10 ⁶	5-7.5
75cm²	7.5 x10 ⁶	15-22.5
100cm²	1x10 ⁷	20-30
150cm²	1.5x 10 ⁷	30-45
175 cm²	1.75x10 ⁷	35-52.5
Placas con pozos	Rendimiento celular promedio por pozo (100% de confluencia)	Volumen de medio trabajado por pozo (ml)
6 pozos	9.5x10 ⁵	1.9-2.9
12 pozos	3.8x10 ⁵	0.76-1.14
24 pozos	1.9x10 ⁵	0.38-0.57
48 pozos	9.5x10 ⁵	0.19-0.285

Pasaje con métodos físicos

No en todos los casos se utilizará una remoción química de las células como método de disociación, ya que puede resultar tóxico para ellas, es por esto que existen otros protocolos de pasaje celular siendo el más comúnmente utilizado el “scraper” o raspador (Therault, 2013). A continuación se describe brevemente el procedimiento:

1. Retirar las células de la incubadora y en la campana de flujo laminar comenzar el procedimiento aspirando el medio de cultivo del plato en donde se encuentran las células, posteriormente añadir medio de cultivo al plato con el que se esté trabajando.

2. Con ayuda del scraper, raspar delicadamente toda la superficie del frasco de cultivo celular en donde se encuentran adheridas las células. Es importante cerciorarse de que se estén desprendiendo las células con ayuda de un microscopio invertido.

3. Retirar con la ayuda de una pipeta serológica la suspensión de células disgregadas y colocarlas en un tubo de 15 ml, centrifugar el contenido del tubo y desechar el sobrenadante. Inmediatamente resuspender el pellet en medio fresco, para realizar el conteo celular y sembrar a la densidad deseada en un plato de cultivo nuevo.

Células en suspensión

Las células en suspensión son aquellas células cuya característica principal es que no son adherentes o por situaciones de crecimiento se evita que se adhieran al plato de cultivo (Wang, 2015). El material necesario para realizar el pasaje de líneas celulares con estas características es el mismo previamente mencionado.

1. Retirar las células de la incubadora y en la campana de flujo laminar comenzar el procedimiento; con la ayuda de una pipeta serológica aspirar gentilmente el volumen necesario del medio que contiene las células para realizar un conteo celular y decidir la cantidad de células que se subcultivaran. Una vez determinado esto, colocar la cantidad de medio fresco necesario al plato nuevo, tomando en cuenta el volumen del medio con células que se le agregará, ver tabla 2.

2. Tomar el volumen necesario para obtener la densidad celular deseada y colocarlo en la nueva botella, regresar las células a la incubadora.

Crio-preservación

La crio-preservación es un método de conservación de las líneas celulares a bajas temperaturas (entre -80°C y -196°C) esto con la finalidad de tener un banco celular maestro para su uso en un futuro. Es importante resaltar que, cuando se realiza un congelamiento rápido, los cristales de hielo se forman en el interior de la célula antes de que ésta logre deshidratarse, causando lisis celular (Munevar, 2015). En contraste, cuando se hace un congelamiento demasiado lento la deshidratación excesiva puede causar también este efecto en la célula, debido a esto, se tiene que utilizar un método con una congelación suficientemente rápida para evitar la completa deshidratación pero suficientemente lenta para evitar la formación de cristales al interior de la célula (Wagner K, 2010). Para lograr esto se utiliza un medio de crio-preservación que puede contener medio de cultivo celular suplementado con suero o reemplazo de suero además algunos protocolos utilizan el uso de dimetil sulfoxido ya que es un agente penetrante el cual desplaza el H_2O del interior de la célula, evitando así la formación de cristales, el inconveniente de utilizar este reactivo es la toxicidad que produce en las células cuando se encuentra a temperatura ambiente, debido a esto, el método de crio-preservación se aplica durante la última etapa del procedimiento para obtener así la mayor cantidad de células viables (Hank-Sorencen, 2011; Villegas and McPhaul 2005).

El procedimiento se describe brevemente a continuación:

1. Preparar medio de crio-preservación y almacenar a 4°C para su uso. Una vez disgregada la línea celular, centrifugar la suspensión y resuspender la pastilla con medio fresco para realizar el conteo.

2. Tomar la cantidad necesaria de la suspensión celular y colocarla dentro del crio-vial previamente cargado con el medio de crio-preservación frío.
3. Colocar los viales dentro de una cámara de isopropanol y almacenarla a -80°C durante 24 horas. Finalmente transferir los viales al tanque de nitrógeno líquido en la fase que corresponda (líquida o gaseosa).

Almacenamiento

Para tener un correcto almacenamiento de la línea celular se debe considerar ciertos aspectos básicos como crio-preservar las células adecuadamente, libres de contaminación microbiana y cruzada con otras líneas celulares en temperaturas óptimas y sin fluctuaciones (Wagner K, 2010; Perepelkin, 2015).

El etiquetado de los viales es otro aspecto importante al considerar cuando se va a realizar el almacenamiento, esto para la fácil identificación de la línea celular. Como mínimo, el etiquetado debe llevar el nombre de la línea celular, número de pasaje y de células, la fecha en la que se realizó el método de crio-preservación y las siglas de la persona que realizó el congelamiento; es necesario considerar el material con el que se realice el etiquetado ya que se encontrara sometido a bajas temperaturas (figura 5D).

Línea celular:	
No. de células	
Pasaje:	
Fecha:	Nombre:

Figura 5. Identificación de criviales con la información mínima necesaria.

Al igual que en todos los procedimientos, es necesario contar con el material de protección y la correcta capacitación para poder trabajar con un tanque de nitrógeno líquido, ya que puede resultar peligroso.

Contaminación de los cultivos celulares

La contaminación de los cultivos celulares es una de las causas más comunes de pérdida de tiempo y gasto innecesario de recursos. La pérdida ocasional de los cultivos debido a infecciones bacterianas o fúngicas ocurre en la mayoría de los laboratorios, por lo que se recomienda tener protocolos rutinarios y programas de contingencia (como área de cuarentena) con la finalidad de detectar la presencia de micoplasma y otros microorganismos en nuestras células de interés, para lo cual existen en el mercado kits de detección que son sencillos y rápidos de ejecutar. Cabe mencionar que en algunos casos es importante descartar de manera inmediata los cultivos afectados por contaminación y así mismo hay que desechar todos los medios abiertos con la finalidad de excluir las fuentes más directas de contaminación.

Cuando la contaminación se encuentra ampliamente distribuida en todos los diferentes tipos de cultivo manejados en el laboratorio, es importante considerar un cierre total del cuarto de cultivo y descartar todas las células y medios que se encuentren un uso. Para su reapertura resulta necesario una desinfección previa, así como pruebas periódicas de contaminación para evitar contingencias posteriores (Stecey, 2011).

Registros y bitácoras sugeridas

Los buenos registros son muy importantes para la adecuada operación de un laboratorio de células troncales: la papelería relacionada a cotizaciones, compras, pedidos, órdenes, envíos, certificados de análisis, hojas técnicas, acuerdos, colaboraciones, transferencias y

licencias, deben ser organizados y llenados en un sistema fácil de comprender por todo el personal que tenga acceso al laboratorio. Esto es particularmente importante en el caso de las células humanas, en donde los permisos para el fin académico o comercial, deben de ser establecidos desde un principio (Loring, 2012).

Registro de reactivos y consumibles

Un aporte confiable de reactivos es indispensable para el establecimiento de un laboratorio de células troncales humanas. En general, la mayoría de ellos puede utilizarse con confianza, sin embargo algunos de ellos presentan variación entre lote y lote.

El nivel de los reactivos en stock necesita estar siempre en niveles óptimos para asegurar la continuidad de los experimentos necesarios. Como una regla general se recomienda tener un mínimo de tres veces el tiempo de entrega. Por ejemplo, reactivos que tarden una semana en ser entregados, por lo menos se recomienda que se mantenga un mínimo de reactivo suficiente para tres semanas.

Para todos los reactivos es importante mantener las fechas de caducidad y números de lote. Estos números deberán de ser guardados y mantenidos en los inventarios. Cada trabajador deberá tomar en cuenta estos números, los cuales serán necesarios para la realización de los experimentos.

Sistema de inventariado en los congeladores.

Mantener el inventario de las células almacenadas es indispensable para el correcto funcionamiento de las actividades diarias del laboratorio, permitiendo así planear a largo plazo la viabilidad de futuros experimentos. Es necesario implementar un sistema de etiquetas y registros que contemplen lo esencial para la recuperación de las células congeladas. Lo anterior puede hacerse de manera electrónica o manualmente mediante el uso de libretas. En ambos casos la información necesita ser constantemente actualizada y cada vial debe de estar marcado eficientemente para evitar que se borre la información:

- Tipo celular
- Número de pasaje
- Fecha
- No. de células congeladas
- Nombre de la persona que las congelo
- Referencia para buscarla en índice

Entrenamiento requerido para el uso del laboratorio de cultivo celular.

El entrenamiento de las personas involucradas con el laboratorio nos provee de un nivel de competencia que nos conduce a la precisión en los resultados y a la efectividad de nuestros procesos. Es importante recordar que la calidad es fundamental para una operación exitosa del laboratorio para el cultivo de células troncales (Vunjak, et al. 2006).

Se recomienda que el personal tenga los estudios suficientes en el área de las ciencias biológicas y de la salud en rubros teóricos y prácticos. Así mismo, se sugiere que el entrenamiento previo del personal incluya:

-Competencia para garantizar la seguridad dentro del laboratorio.

-Competencia en las técnicas asépticas requeridas para el cultivo celular y todos los procesos relacionados a esto.

- Competencia en los protocolos requeridos para realizar un banco de células troncales.
- Competencia en la caracterización celular.
- Competencia en pruebas de seguridad en células y líneas celulares.
- Competencia en control de calidad.
- Competencia en el mantenimiento de los documentos y bitácoras requeridos.
- Competencia en el uso de todo el equipo del laboratorio.

Monitoreo

Con la finalidad de revisar que todos los sistemas de trabajo están siendo usados de manera apropiada, además de garantizar su funcionamiento adecuado, se sugiere la realización de auditorías constantes. Éstas pueden ser llevadas a cabo por el personal del laboratorio de manera rutinaria, pero al menos dos veces al año, proveedores externos deben acudir a checar el equipo que hemos adquirido. De lo contrario, no podremos demostrar adherencia a los estándares internacionales (por ejemplo ISO9000, ISO17025, ISOP13485).

REFERENCIAS

Inamdar, M. S., Healy, L., Sinha, A., Stacey, G. (2012) Global Solutions to the Challenges of Setting up and Managing a Stem Cell Laboratory, *Stem Cell Rev and Rep* 8:830–843.

Freshney, IR. Laboratory Design and Layout. In: Ian Freshney, R., editor. *Culture of Animal Cells: a manual of basic technique*. 5. New Jersey: John Wiley & Sons; 2005. p. 43-51.

Andrews, ISCBI, et al. (2009). Consensus guidance for banking and supply of human embryonic stem cell lines for research purposes; the international stem cell banking initiative. *Stem Cell Review and Reports*, 5, 301–314.

FDA GMP (2004). Title 21, code of federal regulations, part 210: Current good manufacturing practice in manufacturing, processing, packaging or holding of drugs; general. US FDA, April, 1st 2004.

Certification, (2015), <http://www.iso.org/iso/home/standards/certification.htm>.

Lyons, I.; Tan, D.; Schwartz, PH.; Rao, M (2007). Setting up a facility for human embryonic stem cell research. In: Loring, JF.; Wesselschmidt, RL.; Schwartz, PH., editors. *Human Stem Cell Manual: A Laboratory Guide*. 1. New York: Elsevier; p. 389-413.

Wesselschmidt RL, Thompson B (2006). Bioprocessing Tutorial: Embryonic stem cell research operations. *Genetic Engineering News*; 26:34–35.

Vranch, S. (2007). Facilities for animal cell culture. In Stacey & J. Davis (Eds.), *Medicines from animal cells*. Chichester: Wiley.

Stacey, G. N. (2004). Cell line banks in biotechnology and regulatory affairs. In B. Fuller, E. E. Benson, N. Lane (Eds.), *Life in the frozen state*. Taylor-Francis.

Fountain, D., Ralston, M., Higgins, N., Gorlin, J. B., Uhl, L., Wheeler, C., et al. (1997). Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. *Transfusion*, 37, 585–591.

Wesselschmidt, R. L., Schwartz, P. H. (2011) The Stem Cell Laboratory: Design, Equipment, and Oversight, *Methods Mol Biol*. 767: 3–13.

Stacey, G. N. (2007). Quality control of human stem cell lines. In J. Masters, B. Palsson, & J. Thomson (Eds.), *Human embryonic stem cells (human cell culture–volume 6)* (pp. 1–22). Tokyo and New York: Springer.

Stacey, G. N. (2011). Cell culture contamination. *Methods in Molecular Biology*, 731, 79–91.

Loring J.F., Peterson S.E. (2012) *Human Stem Cell Manual*. Oxford, UK. Academic Press Elsevier.

Vunjak-Novakovic, G., Freshney R. I. (2006) *Basic Principles of Cell Culture*, in *Culture of Cells for Tissue Engineering*. Hoboken, NJ, USA. John Wiley & Sons, Inc.

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. (2009) Programa de acción específico 2007-2012. México, D.F. Secretaría de Salud.

Demirovic, D. and S. I. Rattan (2011). "Curcumin induces stress response and hormetically modulates wound healing ability of human skin fibroblasts undergoing ageing in vitro." *Biogerontology* 12(5): 437-444.

Popovic, A., T. Wiggins, et al. (2015). "Differential susceptibility of primary cultured human skin cells to hypericin PDT in an in vitro model." *J Photochem Photobiol B* 149: 249-256.

Therriault, B. L., L. Portelance, et al. (2013). "Establishment of primary cultures from ovarian tumor tissue and ascites fluid." *Methods Mol Biol* 1049: 323-336.

Villegas, J. and M. McPhaul (2005). "Establishment and culture of human skin fibroblasts." *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 28: Unit 28 23.

Wang, G., Y. Wang, et al. (2015). "Establishment and characterization of a novel cell line derived from thymoma with myasthenia gravis patients." *Thorac Cancer* 6(2): 194-201.

Haack-Sorensen, M. and J. Kastrup (2011). "Cryopreservation and revival of mesenchymal stromal cells." *Methods Mol Biol* **698**: 161-174.

Perepelkin, N. M., K. Hayward, et al. (2015). "Cryopreserved amniotic membrane as transplant allograft: viability and post-transplant outcome." *Cell Tissue Bank*.

Munevar, J. C., N. Gutierrez, et al. (2015). "Evaluation of two human dental pulp stem cell cryopreservation methods." *Acta Odontol Latinoam* **28**(2): 114-121.

Wagner K, Welch D. (2010) Cryopreserving and recovering of human iPS cells using complete Knockout Replacement feeder-free medium" *J Vis Exp* Jul 15; (41).

Fuentes electrónicas:

www.corning.com

www.abcam.com

www.thermofisher.com

Conceptos básicos para el desarrollo y funcionamiento de un laboratorio de inmunología

*Sara E. Herrera, Ángel E. Absalón,
Rodolfo Hernández & Ángel H. Álvarez*

INTRODUCCION. Inmunología

La inmunología es una rama de las ciencias biomédicas, que estudia los aspectos del sistema inmune de cualquier organismo, incluyendo, su estructura y su funcionamiento tanto, en su estado sano como enfermo (Keeneth M, 2011). Se encarga del estudio y diagnóstico de desórdenes inmunológicos: como enfermedades autoinmunes; hipersensibilidad (como las alergias); deficiencia inmune. Tiene un papel importante en estudios de inmunocompatibilidad para evitar el rechazo de trasplantes y en bancos de sangre.

El sistema inmune es el responsable de establecer los mecanismos a través de los cuales los seres vivos se defienden de todo lo que les es extraño, conocido de manera genérica como antígeno (microorganismo y sustancias tóxicas) (Bretscher P, 1970). Así también, tiene la capacidad de reconocer y eliminar células tumorales, lo que se conoce como vigilancia inmunológica. Este concepto fue propuesto por Macfarlane Burnet en 1950, gracias a sus observaciones y hallazgos experimentales en modelos animales. Estableciendo, que una de las funciones del sistema inmune consiste en reconocer y destruir a las células cancerosas antes de su proliferación y establecimiento como tumor, además de la eliminación tumores ya formados (Macfarlane B, 1976). Algunos de sus resultados fueron muy cuestionados en esos tiempos, no obstante, hoy en día está bien fundamentada la importancia y función de la vigilancia inmunológica.

Los mecanismos a través de los cuales responde el sistema inmune, se denominan, inmunidad, la cual, de forma general se divide en dos tipos: la Inmunidad natural (innata) y la inmunidad adquirida o específica.

-La inmunidad natural o innata son las barreras que no permiten la entrada de materiales nocivos al cuerpo, se encuentra constituida principalmente por: 1) las barreras mecánicas como la piel; mucosas que produce secreciones (como las sebáceas y el sudor), las que contiene ácidos grasos bactericidas y fungicidas como los triglicéridos; el moco de la mucosa genital, respiratoria, ocular y oral, que poseen actividad bactericida y viricida; los estornudos, cilios, parpadeo, movimiento peristáltico intestinal, flujo de orina; 2) células como los macrófagos, células Natural Killer (NK), el sistema del complemento, moléculas solubles con actividad sobre las células como citocinas e interferones.

-Inmunidad adquirida. Se pone en marcha cuando un antígeno entra en contacto directamente con las células del sistema inmune, dando lugar a la memoria inmunológica; donde, hay una primera respuesta, menos intensa, y en sucesivos contactos se dan respuestas secundarias más potentes debido a esta memoria. Existen dos grandes poblaciones de linfocitos, que son los encargados de la inmunidad específica: Linfocitos B; encargados de la inmunidad humoral y Linfocitos T; encargados de la inmunidad celular, con dos subpoblaciones: Linfocitos T citotóxicos (CD8+) y Linfocitos T cooperadores (CD4+).

Algunos de los mecanismos como se establece la inmunidad adquirida o específica, se basa en la *selección clonal*; donde, el antígeno previamente visto, selecciona a aquellos linfocitos que son capaces de reconocerle de forma específica a los antígenos y son los que proliferan (Coutinho A, 1984). Estos linfocitos activados ponen en marcha distintos mecanismos para eliminar al antígeno: a) los linfocitos B activados se transforman en la célula plasmática que sintetizan inmunoglobulinas (anticuerpos). La unión antígeno-anticuerpo favorece fenómenos destinados a la eliminación del antígeno por inflamación o fagocitosis; b) linfocitos T citotóxicos lisan las células tumorales o infectadas por virus; c) los linfocitos T colaboradores interactúan con los linfocitos B, con los linfocitos T citotóxicos y con las células fagocíticas (Kenneth M, 2011).

Inmunólogo

Un inmunólogo es el científico que investiga o estudia el sistema inmune de vertebrados, incluyendo el sistema inmune humano (AAAAI, American Academy of Allergy, Astma, and Immunology). Son considerados inmunólogos tanto, los investigadores que trabajan realizando las investigaciones en los laboratorios, así como, los médicos quienes tratan a los pacientes con desordenes inmunes. Algunos inmunólogos son médicos y científicos, combinando las investigaciones en laboratorio y el cuidado del paciente ("Office of Science Education - LifeWorks - Immunologist").

Los inmunólogos investigadores abordan, temas de inmunología, como la inmunidad innata donde, se encuentran incluidas células como las del linaje linfopoyético (eosinófilos, mastocitos, entre otras), células NK, las respuestas mediadas por los patrones moleculares de reconocimiento de patógenos (PAMPs) a través de receptores conservados (TLRs). Temas de la inmunidad adquirida, como la expansión de células T cooperadoras y citotóxicas, la producción de anticuerpos por células B y la expresión de moléculas como, citocinas asociadas a estas respuesta y a patologías específicas, todo lo que en su conjunto genera involucra a la respuesta inmune (Kenneth M, 2011).

Anteriormente, los inmunólogos invertían mucho tiempo en las mesetas de laboratorio trabajando principalmente, mediante la observación de las células a través del microscopio, por lo que, el entendimiento de la respuesta inmune estaba acotada a lo que podían observar. Actualmente, el trabajo del inmunólogo y las herramientas que usan diariamente son considerablemente diferentes.

Actualmente, los investigadores pueden estudiar al sistema inmune haciendo uso de diversas herramientas y tecnologías, que permiten, por ejemplo el poder realizar estudios en los animales completos, órganos, tejidos y células, así como, dilucidar las vías moleculares para entender la compleja cadena de las vías moleculares de la respuesta del sistema inmune. También, se puede evaluar con mucho más detalle la acción de las células del sistema inmune en asociación con una variedad y en las diferentes etapas de las enfermedades causadas por patógenos (Kenneth M, 2011).

Existen enfermedades, que han representado todo un reto de estudio a nivel inmunológico, como la causada por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el cáncer. Las que han motivado a los inmunólogos a estudiar los mecanismos inmunes, para contribuir al mejoramiento de estas devastadoras enfermedades. El conocimiento generado sobre el estudio del VIH ha contribuido al progreso de su entendimiento, actualmente se ha dilucidado el papel de la respuesta inmune celular para controlar esta infección viral, logro que ha generado conocimiento para el desarrollo de nuevas vacunas experimentales contra el VIH y otras enfermedades del sistema inmune (Jaspan H, 2006).

Objetivo de un laboratorio de inmunología

El objetivo de un Laboratorio de inmunología es, proporcionar un espacio físico con las instalaciones e infraestructura necesarias para el montaje de experimentos que generen conocimiento de las características estructurales, de los componentes, así como del mal funcionamiento del sistema inmune, con la finalidad de realizar investigación de calidad y vanguardia que pueda contribuir en el mejoramiento y atención de las enfermedades inmunológicas e infecciosas.

Tipos de laboratorios de inmunología

Existen diversos tipos de laboratorios de inmunología de acuerdo al foco de estudio. A continuación se mencionan algunos de los tipos de laboratorios de inmunología:

1. Enfocado a investigación
2. Enfocado a la inmunología clínica
3. Enfocado a inmunología experimental
4. Enfocado inmunopatología
5. Enfocado a la inmunoregulación
6. Enfocado a la inmunología molecular

Laboratorio de inmunología enfocado a investigación

Un laboratorio de investigación en inmunología permite al investigador y sus estudiantes generar las experiencias y las condiciones para abordar una pregunta inmunológica a través de la experimentación. Algunas de las metodologías que se pueden realizar en un laboratorio de inmunología en investigación son: el análisis de subpoblaciones de linfocitos en diferentes tejidos, aislamiento de células mononucleares de diversos tejidos por gradientes de centrifugación, el aislamiento de órganos linfoides y la evaluación de la resistencia natural a infecciones, la actividad citotóxica de macrófagos, la caracterización de subpoblaciones de células T de bazo o timo, la citometría de flujo, el diagnóstico de enfermedades o de respuesta inmune humoral (anticuerpos) por ensayos de ELISA, ensayos de hemaglutinación, lisis mediada por complemento, entre otras. Uno de los objetivos de este tipo de laboratorios es el de formar recursos humanos para generar personal altamente calificado en tecnología de vanguardia en las áreas de la inmunología.

Laboratorio de inmunología enfocado a la inmunología clínica

La inmunología clínica está enfocada al estudio de los mecanismos inmunológicos involucrados directamente en los procesos patológicos. El análisis de las respuestas inmunes de los pacientes, analizando los mecanismos inmunes involucrados durante la inducción y resolución de las enfermedades en humanos. Su principal objetivo es, generar los conocimientos que darán soporte a los fundamentos para evaluar nuevos esquemas de ensayos clínicos terapéuticos en pacientes, los cuales son inicialmente desarrollados y evaluados en modelos animales, en los que, se mimetizan enfermedades de humanos. En los laboratorios de Inmunología clínica se realizan las pruebas de laboratorio que en conjunto con la consulta clínica, permiten diagnosticar enfermedades autoinmunes e inmunodeficiencias, trastornos inmunoproliferativos, las alergias, y algunos aspectos de las enfermedades infecciosas. Gran parte del trabajo, se realiza considerando en conjunto, los resultados generados de los laboratorios de diagnóstico molecular, de microbiología, de virología y de hematología, los que en conjunto son utilizados para obtener un diagnóstico del padecimiento o también, pueden ser interpretados para elucidar diversos escenarios clínicos. En estos laboratorios un aspecto importante, es la interacción cercana del investigador con el paciente, logrando, la traducción de los conocimientos obtenidos a partir de la investigación, que contribuyan para el beneficio sobre la salud del paciente (<https://nei.nih.gov/intramural/clinici>). Empleando técnicas como la citometría de flujo se

puede realizar el diagnóstico de leucemias y linfomas, mientras que, estudios de inmunohistoquímicos pueden ser empleados para evaluar proliferación anormal de diferentes tipos de células neoplásicas.

Laboratorio de inmunología enfocado a inmunología experimental

La inmunología experimental se enfoca a crear o reproducir las condiciones de una patología humana en un modelo animal, en el que, se podrán realizar diversas pruebas. En los laboratorios de inmunología experimental, los investigadores se enfocan en problemas relacionados a los mecanismos celulares y las moléculas que participan en la inducción o modulación de fenómenos, por ejemplo la inflamación. Para este tipo de experimentación son fundamentales los modelos animales, en los que primero, se induce a nivel experimental la enfermedad o padecimiento específico a estudiar, ya contando con el modelo experimental, el investigador puede abordar las preguntas que generen un conocimiento mayor con respecto de la patología a estudiar (<https://nei.nih.gov/intramural/expimm>). Es importante mencionar que siempre que se requiera el uso de modelos animales, es necesario contar con los permisos para su uso, avalado por un comité para el cuidado, buenas prácticas y buen uso de los mismos (CICUAL).

Laboratorio de inmunología enfocado a inmunopatología

Los laboratorios de inmunopatología se enfocan al estudio del mecanismo como actúa el sistema inmunitario ante una patología, así también, al estudio de las desviaciones de la respuesta inmune (ineficiente), asociada a una determinada enfermedad. El objetivo de estos laboratorios es determinar las causas de diferentes enfermedades inmunitarias que existen, para encontrar un tratamiento eficaz.

Las enfermedades causadas por desórdenes del sistema inmune caen en dos categorías:

1. Inmunodeficiencias, en las que el sistema inmune falla para proporcionar una respuesta adecuada, como en la enfermedad granulomatosa crónica.
2. Autoinmunidad en la cual el sistema inmune monta una respuesta contra proteínas o componentes del mismo organismo, reconociéndolos como no propios y puede llegar a provocar una disfunción importante, donde el sistema inmunitario destruye células propias del organismo, o enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, enfermedad de Hashimoto y miastenia gravis.

Además, existe otro tipo de desorden, que incluyen, los procesos de hipersensibilidad donde el sistema inmune responde inapropiadamente o monta una reacción exagerada como es el caso en el asma y las alergias.

Algunas técnicas empleadas para el diagnóstico son análisis inmunofenotípicos por citometría de flujo, con ensayos de inmunohistoquímica y de hibridación *in situ*. (<http://www.clevelandcliniclabs.com/laboratory-medicine/immunopathology/>).

Laboratorio de inmunología enfocado a la inmunoregulación

Los laboratorios de inmunoregulación están enfocados en elucidar los mecanismos o moléculas que influyen sobre la respuesta inmune humana tanto en la salud como en la enfermedad. Por ejemplo, estudiar la progresión de la enfermedad mediante la regulación de la replicación del VIH influenciada por citocinas endógenas.

Algunos laboratorios de inmunoregulación se enfocan en el estudio del papel de las citocinas y de las interacciones de las mismas en diversos contextos celulares, en procesos de inflamación, aterogénesis, en respuestas inmunes específicas, oncogénesis y en desordenes inmunopatológicos (Landskron G, 2014).

La identificación de citocinas en células, puede evaluarse por tinción intracelular mediante citometría de flujo, por inmunohistoquímica en tejidos mediante inmunoreacción con anticuerpos o por medición de las mismas en suero o plasma mediante pruebas de ELISA para entender los perfiles inmunes (Freer G, 2013 y Whiteland J, 1997).

Laboratorio de inmunología enfocado a la inmunología molecular

Un laboratorio de inmunología molecular se enfoca a entender los mecanismos celulares y moleculares que regulan la homeostasis inmune (equilibrio inmune). Por ejemplo, el estudio de las moléculas que pueden influir o regular a nivel de mecanismos epigenéticos, durante el desarrollo natural de los linfocitos para su diferenciación o programación hacia la muerte celular, mecanismos moleculares involucrados en la inflamación, durante el desarrollo del sistema nervioso central y otros procesos celulares, donde el papel regulatorio por presencia de las citocinas pro-inflamatorias o anti-inflamatorias es fundamental. Por ejemplo, algunos papeles regulatorios que ejercen las citocinas:

1. Durante los mecanismos de diferenciación del linaje de células T, las citocinas activan factores de transcripción, promoviendo la transcripción génica, determinando, la programación de la muerte de células T y así asegurar la generación de células eficientes.
2. Como mediadores de la inflamación en la neurovascularización retinal, produciendo una resistencia a insulina, un mecanismo que protege a este órgano del estrés metabólico. (https://nei.nih.gov/intramural/mol_imm/immunology).

Como se mencionó arriba, existen laboratorios de inmunología enfocados a diferentes usos, de acuerdo al tipo de estudios. Sin embargo, para cualquiera que sea el propósito final de uso, los laboratorios requieren de diseños específicos. En este capítulo se abordarán los conceptos básicos para el desarrollo de un laboratorio de inmunología en investigación.

Infraestructura básica de un laboratorio de inmunología enfocado a la investigación; diseño estructural

El diseño estructural de los laboratorios requiere de la ingeniería y del análisis integrado del conocimiento, del uso que se le dará y de los fines del mismo, para realizar todas las consideraciones pertinentes de los problemas que pudieran impactar en el desarrollo del mismo como la estabilidad, la seguridad y la utilidad. No hay estándares nacionales en México, en cuanto a las dimensiones de la superficie de espacio por persona que trabaja en el laboratorio. Sin embargo, las sugerencias a tomar en cuenta para el diseño de laboratorios de investigación en Inmunología de acuerdo a otros estándares, se considera, como un buen espacio para el laboratorio, dimensiones de entre 28 y 33 metros cuadrados por área de investigación, una superficie razonable para proporcionar un área de trabajo segura. Lo ideal es que exista un espacio de alrededor de 1,5 metros cuadrados como mínimo entre personal sentado en una silla de laboratorio y cualquier mesa de trabajo o equipo de laboratorio que esté detrás.

El diseño general para el área de trabajo de cualquier laboratorio de diagnóstico o investigación en inmunología debe incluir normas básicas de construcción consideradas para toda área que tenga como finalidad manipular muestras biológicas potencialmente

infecciosas, debe considerarse un componente cerrado del laboratorio en general, separado de las otras secciones del laboratorio por puertas que se puedan bloquear. Aunque no es obligatorio, también es recomendable contar con flujo de aire unidireccional hacia adentro desde el laboratorio principal hacia el laboratorio de procesamiento de muestras biológicas. Si el centro de la unidad tiene un diseño abierto y no tiene un techo falso, el laboratorio puede tener paredes de vidrio o de plexiglás transparentes, que le dan un aspecto abierto pero brindan una barrera de seguridad del piso al techo ante posibles exposiciones a aerosoles. En el caso de haber un falso techo colocado, las paredes transparentes deben penetrar la cubierta más allá del techo para sellar el área. En el caso de tener que adecuar un nuevo laboratorio dentro de un laboratorio anteriormente construido que no cuente con aire ambiental direccional, se recomienda el funcionamiento continuo de gabinetes de seguridad biológica (biological safety cabinets, BSC) para que los aerosoles potenciales tengan cierta dirección (Barrientos T, 2005).

Servicios

El área de servicios generales deberá contener un área de lavado de material de esterilización, la cual deberá estar ubicado muy aparte de las áreas técnicas de trabajo. Los servicios sanitarios deberán de contar con sanitarios y lavamanos. El área de aseo contará con un almacén para material de limpieza la cual contará con anaqueles para el resguardo del material y con tarjas para el lavado del material. Se debe contar con los suficientes protocolos de limpieza y desinfección de las áreas de trabajo y de material no desechable. Para el almacenamiento de reactivos y suministros el área deberá contar con la estantería de almacenamiento adecuada. El área para residuos deberá contar con la iluminación y ventilación adecuada con acceso restringido y con señalización suficiente para ser vista por el personal claramente. Las paredes deberán ser completamente lisas y de fácil desinfección. Esta área no deberá contar con instalaciones especiales de ductos para evacuar los residuos.

El laboratorio deberá tener suficiente y adecuada iluminación natural y/o artificial en todos los sitios de trabajo para la realización de los ensayos sin ninguna dificultad y a cualquier hora de trabajo, y además debe tener la ventilación natural y artificial para que el analista realice el trabajo con condiciones mínimas de comodidad y que permitan una adecuada recirculación del aire. La temperatura deberá estar entre 15 - 25 grados centígrados, debiendo contar con monitores físicos o electrónicos de la temperatura debiendo contar con los requisitos para el mantenimiento de la temperatura de los equipos o la establecida por el fabricante para el almacenamiento de los reactivos.

Los espacios diseñados como oficinas para supervisores y director del laboratorio que dan al laboratorio, representan áreas híbridas dentro del laboratorio. Esas oficinas por lo general están diseñadas para que su mantenimiento permita una desinfección sencilla o eficiente.

El laboratorio general debe tener espacios de trabajo con asientos diseñados con suficiente superficie para que haya una computadora en cada estación. Se deben preferir las mesas de trabajo con estantes intermedios para colocar utensilios ubicados sobre el centro de la mesa; esto proporciona espacio para guardar suministros sin que haya desorden en el área de trabajo. Los estantes para almacenamiento deben tener un borde de 1 cm (1/2 pulgada) para asegurar de que las sustancias químicas no puedan deslizarse desde el estante. Por comodidad, se recomienda contar con tomacorrientes en cada estación de trabajo.

Los tanques de dióxido de carbono y gas anaeróbico de preferencia deben de ubicarse fuera del laboratorio (preferentemente, protegidos o incluso instalados fuera del edificio). Si

los residuos se descontaminan en el lugar antes de su desecho, el laboratorio debe tener una autoclave suficientemente grande para sus necesidades. La autoclave se debe instalar en un área bien ventilada, o bien, el escape se debe realizar a través de una campana de captura colocada encima del mismo (Miller, 2012).

Las áreas de recepción de material biológico y preparación deben estar diseñadas con suficiente capacidad para albergar la mayor cantidad de muestras prevista. Esa área deberá tener un BSC clase IIA2, donde haya un lavamanos y una estación de emergencia para lavado de ojos. Las instalaciones de teléfono, computadoras y tomacorrientes deben estar incluidos en el módulo, el uso de tecnología inalámbrica puede reducir la necesidad de cableado de teléfonos y computadoras en cada módulo. Se debe contemplar un espacio para refrigerador para uno o dos refrigeradores contiguos con puertas de vidrio o un refrigerador doble que permita un fácil acceso de muestras.

Equipamiento

En los laboratorios donde se desarrollan diferentes técnicas analíticas, estas, van demandando una creciente cartera de mediciones biológicas, lo que hace que el requerimiento de equipos instrumentales vaya en constante crecimiento, y los equipos indispensables en un laboratorio de inmunología incluyen: autoclaves, incubadoras con CO₂ con chaqueta de agua, tanques de CO₂, bombas de vacío, cabinas de seguridad biológica II (BSC II), ultracongeladores, estereomicroscopios, microscopios invertidos, microscopios de epifluorescencia, pipetores semiautomáticos, cabinas de mantenimiento de animales, minishakers de placas de ELISA, espectrofotómetros lectores de placas de ELISA para métodos colorimétricos o por fluorescencia, lector de ELISPOT, lavadores de placas y cubetas, densitómetros UV-visible, centrífugas y citocentrífugas refrigeradas, termostatos o baños de calentamiento de agua, baños con agitación, congeladores, liofilizadores, medidor de pH, hematocitómetro, equipos para realizar inmunohistoquímica, citómetros de flujo, contenedores de nitrógeno líquido, frigoríficos, entre otros.

Capital humano del laboratorio de inmunología en investigación: responsables

Es fundamental en los laboratorios de investigación en inmunología dentro de su capital humano, cuenten con un responsable sanitario, el cual puede ser contratado atendiendo la norma, NOM-007-SSA3-2011 del Diario Oficial de la Federación Mexicana, la cual es aplicable para los laboratorios donde se manejen muestras biológicas humanas, establece que éstos, deberán contar con un responsable sanitario que deberá ser: un químico con currículum orientado al laboratorio clínico, que cuente con un mínimo de 3 años de experiencia comprobable en el área técnica o con especialidad, grado universitario de maestría o doctorado, expedido por institución de enseñanza superior reconocida oficialmente registrado por la autoridad educativa competente. También, podría ser un médico cirujano con certificado de especialización en patología clínica, grado universitario de maestría o doctorado en las áreas de laboratorio clínico, expedido por institución de enseñanza superior o de salud reconocida oficialmente y registrado por la autoridad educativa competente.

El responsable sanitario deberá cumplir, entre otras funciones: informar por escrito a la Secretaría de Salud, en los términos, forma y periodicidad que la misma determine, los casos de enfermedades transmisibles y de notificación obligatoria, así como adoptar las medidas necesarias para la vigilancia epidemiológica, para cumplir con lo establecido en las disposiciones jurídicas aplicables; comunicar por escrito a la Secretaría de Salud, el horario de asistencia al establecimiento, así como cualquier modificación al mismo; comunicar por escrito a la Secretaría de Salud, la fecha de su designación, renuncia o

sustitución; notificar, en su caso, al Ministerio Público y demás autoridades competentes, los casos en que se presume la comisión de hechos ilícitos; atender, documentar y dar seguimiento en forma directa. Verificar la responsabilidad profesional en que se pudiera incurrir; vigilar y mantener el buen funcionamiento de la recepción, toma, conservación, transporte y procesamiento de muestras, dentro y fuera del establecimiento; vigilar que se lleven a cabo los sistemas de control administrativo, técnico y de calidad, tanto internos como externos que determine esta norma; firmar los reportes de los resultados o vigilar que sean firmados por el personal profesional o técnico autorizado, de manera autógrafa o en su caso, digitalizada o electrónica, de conformidad con las disposiciones jurídicas aplicables; vigilar que dentro de los establecimientos a su cargo, se apliquen las medidas de seguridad e higiene para la protección de la salud del personal ocupacionalmente expuesto, de conformidad con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana, vigilar que se mantenga actualizada la documentación curricular y laboral de su personal; vigilar que el personal profesional y técnico reciba capacitación continua y cuente con el soporte documental; se debe establecer el procedimiento sistemático para el reclutamiento y entrenamiento del nuevo personal (NOM-007-SSA3-2011).

Perfiles que debe cumplir el personal del laboratorio; Director técnico científico del laboratorio

Los perfiles mínimos que debe cumplir el personal que fungirá como el Director Técnico Científico del Laboratorio: deberá ser un profesionista de las ciencias biológicas cuya especialización sea en un Laboratorio clínico, o médico con maestría o doctorado en ciencias (inmunología); contar con experiencia demostrable en el área de inmunología (participación en talleres nacionales o internacionales o publicaciones en revistas indexadas); demostrar experiencia profesional en las actividades en investigación; contar con habilidades científicas para proponer y desarrollar nuevos procedimientos; tener la capacidad de verificar el buen funcionamiento del laboratorio (interpretación y reporte de todos los procedimientos); deberá estar actualizado sobre la normatividad y legislación nacional relevante.

Auxiliares o analistas

Para el caso de auxiliares o analistas, podrán ser profesionistas en el área de las ciencias biológicas con entrenamiento demostrable, en laboratorio clínico (bacteriólogo, microbiólogo), toma de muestras e interpretación de resultados. El auxiliar de laboratorio será un técnico de preferencia con entrenamiento en métodos inmunológicos. Debe contar con las competencias especificadas en el acuerdo ISO15189:2007. 5.0. Requisitos Técnico 5.1. Personal 5.1.3. Donde la competencia se entiende, como el producto de la formación académica básica, de postgrado y educación continua, así como contar con experiencia de varios años en un laboratorio clínico o de investigación (ISO 15189:2007).

Técnicos

En el laboratorio los técnicos son requeridos, este tipo de personal deberá ser evaluado verificando, para que pase los estándares de calidad estipulados que se requieren para las pruebas analíticas. Deberán emitírseles su respectiva autorización por escrito para la realización de determinadas pruebas de laboratorio, manipulación de equipos específicos, y emisión de conceptos e interpretaciones. Deberá haber un programa periódico de procedimientos para la evaluación del personal del laboratorio y especificar qué actividades de formación o reentrenamiento se consideren necesarias con base en dicha evaluación (Prieto, 2013).

Programa de capacitación continúa

Dado que el personal de cualquier tipo de laboratorio, son una parte esencial para actividades de diagnóstico y durante la investigación, por lo que, es fundamental que el personal reciba la capacitación adecuada y continúa, primeramente, a través del entrenamiento interno y posteriormente con el entrenamiento externo.

El entrenamiento interno, debe de darse, previo a desempeñar las funciones para las cuales el profesional fue contratado. Después de esto, la capacitación debe ser constante durante los tres primeros meses y posteriormente anual, siempre basada a un calendario establecido para poder verificar el desempeño óptimo de sus funciones (A.E.F.A).

El entrenamiento externo, se dará, mediante cursos de educación continua una vez al año, que sean interactivos teórico-prácticos. Se debe promover la asistencia a conferencias y congresos de actualización. Así también, visitas de entrenamiento a laboratorios especializados. Y si es posible, capacitación en estancias en el extranjero, las cuales pueden realizarse por medio de la obtención de becas de entrenamiento en algunas asociaciones o instituciones como: FCC, SEQC y AACC (www.ifcc.org, www.seqc.es y www.aacc.org)

Aseguramiento de la calidad en los laboratorios

El aseguramiento de la calidad describe un amplio rango de actividades para prevenir problemas de calidad y optimizar la precisión y exactitud de los ensayos. Los equipos a utilizarse deben contar con las condiciones técnicas de calidad y soporte técnico-científico, debiendo contar con manuales (equipos automatizados y semiautomatizados). Los equipos solo deberán de ser manipulados por personal calificado que hayan cumplido con la capacitación suficiente para su uso. Todo equipo utilizado en el laboratorio deberá cumplir los estándares internacionales para la realización de las mediciones analíticas para el cual fue diseñado. Su mantenimiento debe realizarse por técnicos especializados y certificados a través del proveedor o servicio externo. El equipo crítico tendrá un registro de vida indicando nombre y número telefónico del fabricante o distribuidor, número de modelo, número de serie, número de inventario, fecha de compra, y localización de trabajo, a su vez, deberán estar localizables las fichas técnicas y documentos que cubren las garantías y los contratos de servicio de mantenimiento.

Un programa de aseguramiento de la calidad incluye:

- Documentación adecuada de los procedimientos
- Selección del personal
- Entrenamiento del personal
- Mantenimiento del equipo y su control
- Purificación del agua
- Manejo de muestras
- Control de calidad de los ensayos
- Interno
- Externo

Del mismo modo, se debe efectuar un control de formación, adiestramiento y actualización periódica del personal. Para ello, resulta imprescindible conocer la estructura y organización del servicio en relación a los servicios asistenciales, docentes y de investigación que se prestan. Se debe disponer de datos acerca de los recursos humanos disponibles, en relación con su número, capacitación profesional, puesto que ocupan y trabajo que

desempeñan. Es necesario establecer la jerarquía que se aplicará en la toma de decisiones, desempeñando el director técnico la misión de controlar y evaluar las diferentes áreas (Gutiérrez J, 2001). Para asegurarse de la calidad, también es requerida la implementación de controles de calidad en los insumos, desde los más simples, por ejemplo el agua, es fundamentales en un laboratorio de inmunología en investigación. Para poder tener fiabilidad de los datos, es necesario tener para el agua un programa de monitoreo de su calidad, del cual dependerán la calidad de las soluciones necesarias para los experimentos, para lo cual, se requiere de la estricta adherencia a los procedimientos. La aplicación y el seguimiento de estos procedimientos se conoce como la garantía de calidad (Implementación del Sistema de gestión de Calidad, 2006).

Sistema de gestión de la calidad (SGC)

Los Sistemas de Gestión de la Calidad sirven para conducir y operar una organización en forma exitosa. El objetivo está enfocado al logro de resultados de calidad, para satisfacer las necesidades, expectativas y requisitos de las partes interesadas, según corresponda. El conjunto de Manuales de Calidad, Procedimientos Normalizados de Operación (PNO's), instructivos, formularios, informes y bitácoras, sirven de evidencia para documentar el Sistema de Calidad de una organización, y es el soporte para cualquier Sistema de Gestión de la Calidad, pues en ellos se plasman no sólo las formas de operar de la organización, sino toda la información que permite el desarrollo de los procesos y la toma de decisiones. La documentación contribuye a lograr la conformidad con los requisitos del cliente y la mejora de la calidad. Provee la formación apropiada. La repetitividad y la trazabilidad. Proporcionar evidencias objetivas para evaluar la eficacia y la adecuación continua del sistema de gestión de la calidad, a través, de diferentes tipos de documentos: 1.- Documentos que proporcionan información sobre el SGC de la organización (manuales de calidad); 2.- Documentos que proporcionan información relacionada con actividades específicas (procedimientos) y 3.- Documentos que proporcionan evidencia objetiva de las actividades llevadas a cabo o de los resultados obtenidos en registros o bitácoras (Certificación - Sistemas de gestión de calidad). Estos documentos son confidenciales, deben estar controlados, y siempre debe haber una revisión periódica, así como una distribución de ellos en cada una de las áreas correspondientes. Para establecer, vigilar y registrar la calidad en todos los aspectos del trabajo y con ellos llevar una mejora continua.

Debe considerarse que, la implementación del SGC es un proceso lento y costoso y, por esta razón es importante primero garantizar el establecimiento de todas las normas necesarias de rendimiento, las que deben estar claramente definidas. En los laboratorios para su implementación, se inicia con el examen y documentación de todos los aspectos de la gestión del laboratorio. Donde debe estar incluidas claramente las líneas de identidad de la comunicación y la responsabilidad, la descripción y documentación de todos los procedimientos que se llevan a cabo, y la documentación de los controles instrumentales y analíticas. Dentro de este, debe haber procedimientos de control y evaluación específicos diseñados para monitorizar cuantitativamente la exactitud y precisión de los ensayos específicos. La implementación de SGC en los laboratorios de inmunología en investigación sería de gran importancia, para garantizar su operación de forma exitosa y para el logro de resultados de calidad.

Organización (manuales)

Los Manuales deben ser aprobados, estarán en un lugar accesible, se actualizarán al menos cada año, con bibliografía de apoyo reciente, y existirán copias en varios sitios del laboratorio. Es necesario aprobar y fechar todos los cambios que se realicen. El Manual de la calidad ha de contener información sobre los distintos temas relacionados con el control

de calidad del laboratorio, entre los que se incluirán la estructura orgánica del laboratorio, recursos humanos, normativa de construcción, instalaciones, precauciones de seguridad, instrumentación y obtención de material y reactivos. Además del Manual de la Calidad también se recogerá la información acerca de la muestra (tipo, soporte, cantidad y conservación), la técnica empleada para la determinación, el plazo de entrega e interpretación de los resultados, informes recibidos de evaluaciones de calidad (auditorías externas e internas), manipulación y eliminación de residuos peligrosos, prevención de contaminación ambiental, mantenimiento y cuidado del equipo, limpieza del lugar de trabajo, registro, eliminación y procesamiento de las muestras, y registro y notificación de los resultados en un manual de procedimientos. El manual de procedimientos englobará todas las pruebas que se llevan a cabo en los aspectos del fundamento de las técnicas, realización, límites de comportamiento normal, tipo de muestra a aplicar, preparación de reactivos, controles de calidad, y cálculos y presentación de los resultados. Se guardarán los procedimientos antiguos durante dos años. Finalmente, los manuales se deben aplicar siguiendo escrupulosamente las “buenas prácticas de laboratorio” (BPL) establecidas en las normas de sistemas de calidad ISO 9000, para que los laboratorios demuestren que sus productos satisfacen los estándares de calidad establecidos (Buenas Prácticas de Laboratorio y las Normas ISO 9001:2000).

Diseño de procedimientos normalizados de operación

Para realizar los procedimientos normalizados de operación (PNOs), se requiere primero generar los documentos que describen, con mucho detalle, las instrucciones necesarias para llevar a cabo de manera reproducible y repetible una operación específica, un análisis o una acción determinada. Los PNO's deben estar redactados de una forma clara y concisa empleando vocabulario sencillo, para ser fácilmente comprendidos por el personal específico que los va a realizar.

Es muy conveniente generar PNO's, puesto que si se requiere contratar a cualquier tipo profesional nuevo involucrado en procesos importantes en el Laboratorio de Inmunología en Investigación, se contará con un documento que describe detalladamente, cómo realizar una actividad, lo que contribuye a la capacitación en un menor tiempo, además de ser un documento que permite recordar de manera sencilla una determinada actividad. Ejemplo de un PNO, Figura 1 (Elaboración de PNO's para un sistema de documentación en un laboratorio farmacéutico, tesis, 2007 y Formato PNO).

P.N.O.
(PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN)

PARA ACCESO Y RESTRICCIONES DEL PERSONAL, ASÍ COMO INDUMENTARIA Y EQUIPO DE SEGURIDAD CORRESPONDIENTES.

I.- Se identificarán las áreas de acceso al personal así como las de restricción al personal ajeno al establecimiento.

II.- El personal portará la bata reglamentaria.

III.- En caso de que el personal eventualmente este expuesto a alguna zona de riesgo, (mantenimiento o remodelación del establecimiento) deberá portar casco protector.

IV.- Cuando el personal tenga alguna afección en las vías respiratorias y el IMSS, no le acredite incapacidad correspondiente, esté deberá portar cubre bocas y usar periódicamente sanitizante.

NOMBRE DE LA FARMACIA: _____
 DIRECCIÓN: _____
 COLONIA: _____ C.P. _____
 DELEGACION/MPIO: _____ ESTADO: _____
 NOMBRE Y FIRMA DEL RESPONSABLE SANITARIO: _____
 NOMBRE Y FIRMA DEL PROPIETARIO: _____
 EN CASO DE NO TENER EL FORMATO DE LICENCIA SANITARIA Y OPERACIÓN DEL
 AVISO DE FUNCIONAMIENTO: _____
 FECHA: _____

Figura 1. Ejemplo de un PNO para acceso y restricciones del personal, indumentaria y equipo de seguridad

Alcance del SGC

Los Sistemas de Gestión de la Calidad pueden ser aplicables a cualquier sector productivo empresarial como lo son las pequeñas y medianas industrias de cualquier ramo y por supuesto las grandes transnacionales. Y pueden ser implementados en cualquier tipo de organización, incluyendo los laboratorios de investigación, donde el interés este encaminado a mejorar su desempeño día a día. El alcance del SGC está determinado de acuerdo a la naturaleza de los productos de la organización y sus procesos de realización, el resultado de una evaluación de riesgo, consideraciones comerciales, requisitos contractuales y reglamentarios.

Debido a que el SGC fomenta la mejora continua, sería muy conveniente implementarlo (con toda la documentación arriba mencionada), en el laboratorios de investigación en inmunología, sin embargo se debe mencionar, que el alcance para un laboratorio de investigación sería acotado, sin llegar a la certificación por la norma ISO:9001, debido su propia naturaleza.

Certificación vs Acreditación

Existen dos diferencias fundamentales entre la acreditación y la certificación: su objetivo y el contenido de normas en las que se basan. La certificación es usada para verificar que el personal tiene el perfil profesional a fin para el desempeño ciertas tareas, así también, sirve para la evaluación integral de un proceso, sistema, producto, evento, o habilidad típicamente medido contra alguna norma o estándar existente, por ejemplo ISO:9001. En los laboratorios también se pueden certificar determinados productos que cumplen con los estándares preestablecidos, las agencias gubernamentales pueden certificar que una empresa está cumpliendo con las regulaciones existentes (tales como límites de emisión).

La certificación puede ser otorgada por el Instituto Mexicano de Normalización y Certificación (IMNC) (Entidad Mexicana de Acreditación A.C).

La acreditación es el reconocimiento formal, de que una organización o individuos son competente para llevar a término tareas específicas. Solo puede ser otorgada por un organismo de control competente autorizado, después de la debida evaluación para la acreditación, en nuestro país, lo emite la Entidad Mexicana de Acreditación (Peter, Unger). La acreditación se le puede conferir a los laboratorios cuando tienen un SGC de acuerdo al tipo de organización y de acuerdo a las regulaciones, normas o estándares correspondientes, y realizan exitosamente ensayos específicos de acuerdo a los parámetros de calibración y que están acuerdo a los alcances de la acreditación.

En un laboratorio de inmunología en investigación, las acreditaciones de un ensayo o producto no serían requeridas, no obstante, alguna de las pruebas, por ejemplo el ensayo de ELISA para la evaluación de alguna molécula específica podría acreditarse siempre y cuando se empleen kits o pruebas comerciales, después de lo cual, el servicio podría ser ofertado, lo que nos daría una ventaja competitiva comercial, en ese ensayo en específico. Sin embargo, si se implementa satisfactoriamente el sistema de Gestión de Calidad, el Laboratorio podría ser evaluado para obtener una certificación de acuerdo al requerido por el Instituto Mexicano de Normalización y Certificación (IMNC) (Entidad Mexicana de Acreditación A.C).

Implementación de control de calidad en los procesos analíticos

Se requiere de la implementación de control de calidad en los procesos analíticos, con el fin de demostrar que un laboratorio está produciendo datos de precisión adecuada, ya que la precisión y la sensibilidad son necesario (Analytical Methods Committee, Royal Society of Chemistry, 1992). Todos los datos del control de calidad se deben revisar, firmar por el supervisor o director del laboratorio y guardar, al menos, durante dos años en un lugar fácilmente accesible para su posterior revisión en caso necesario (Bioanalytical Method Validation, 2011) .

Validación del sistema analítico

La validación de un sistema analítico es a menudo referido como la prueba de idoneidad del sistema, afín de comprobar el rendimiento de los métodos y de los equipo en el día a día.

Validación de un método analítico

La validación de un método bioanalítico incluye todos los procedimientos que demuestran que un método particular utilizado para la medición cuantitativa de analitos en una matriz biológica dada, tal como sangre, plasma, suero, u orina, es fiable y reproducible para el uso previsto. Los parámetros fundamentales para esta validación incluyen (1) la exactitud, (2) precisión, (3) la selectividad, (4) sensibilidad, (5) reproducibilidad, y (6) la estabilidad. La validación implica documentar, a través del uso ensayos específicos, que las características del funcionamiento del método son adecuados y fiables para las aplicaciones analíticas destinadas. La aceptabilidad de los datos analíticos corresponde directamente a los criterios utilizado para validar el método.

Para la validación de los métodos analíticos, es necesario contrastar los resultados obtenidos con los resultados de laboratorios de referencia, (validación del sistema analítico). Ya que, los laboratorios de referencia tienen la capacidad de realizar pruebas que: a) se solicitan con escasa frecuencia; b) tienen un carácter muy especializado; c) se

desea determinar de un modo más específico algún agente patógeno de gran importancia para la salud pública; o d) contrasten periódicamente los resultados habituales del laboratorio. Del mismo modo, son necesarios estos laboratorios para proporcionar sueros de referencia y reactivos estandarizados con fines de control de la calidad y formación profesional, así como para que, opcionalmente, facilite muestras anónimas con clave cifrada para que el laboratorio solicitante pueda poner a prueba su competencia (Gutiérrez J, 2001).

Procesos de verificación y/o calibración de equipos e instrumentos

Como se mencionó anteriormente, para la validación de un sistema analítico, además de comprobar el rendimiento de los métodos, se requiere también comprobar el rendimiento y buen funcionamiento de los equipos usados en el día a día en los laboratorios de investigación. Razón por la que, se controlan, calibran y mantienen todos los equipos de análisis, medición y ensayo para demostrar que los productos (resultados) cumplen con los requerimientos especificados.

Verificación y/o calibración de equipos

La verificación y/o calibraciones pueden llevarse a cabo basados en un programa de mantenimiento continuo y agendado. En el laboratorio se determinará el seguimiento a realizar a los equipos, para lo que, en primer lugar se hace necesario conocer el aparataje inventariable, estableciendo su grado de pertenencia al laboratorio, rendimiento actual y tiempo previsto de funcionamiento operativo del mismo. Por otra parte, la verificación se define como un procedimiento diseñado para asegurar que un equipo está haciendo la función para lo que fue diseñado, a diferencia de la verificación, la calibración de un equipo, es un proceso de dos veces de la medición y el ajuste de la precisión del equipo con relación a un estándar de medición. Cada equipo debe calibrarse con base en un equipo de prueba certificado y validado por un estándar reconocido. En caso de que no exista un estándar, se debe identificar la base de la calibración. Cuando un equipo está fuera de los límites de calibración, es necesario verificar las pruebas realizadas con dicho equipo desde la última calibración aceptable. Será necesario evaluar el impacto de cualquier equipo fuera de tolerancia, sobre la calidad del producto o resultados para tomar acciones correctivas. Su mantenimiento debe realizarse por técnicos especializados y certificados a través del proveedor o de un servicio externo.

Es importante mencionar que las calibraciones son acciones que solo pueden ser ejecutadas por técnicos especializados y certificados. La verificación y calibración son requeridas y deben garantizar la validez de los resultados generados en el equipo. Todos los registros de los resultados de la calibración y la verificación deben resguardarse.

Verificación y/o calibración de instrumentos

Los sistemas de aseguramiento de la calidad y cantidad de productos y servicios exigen la correcta indicación de los instrumentos de medición, cuya precisión debe ser consistente con su uso. Se define instrumentos a las balanzas, pesas, potenciómetro, bloques de calentamiento, hornos, termómetros, medidores de energía, material de vidrio para laboratorios, refrigeradores y congeladores, entre otros.

Los requisitos de calidad que deben cumplir tanto los equipos como los instrumentos son en base a una serie de normas contenidas en la ISO No. 9000 y la ISO No. 17025. En nuestros días, la aplicación de la metrología legal y la metrología industrial, permite asegurar la respuesta de los instrumentos de medición, lo que es importante para la trazabilidad con la realización de las unidades del Sistema Internacional (SI).

La verificación es la actividad básica principal que se realiza usando los sistemas de metrología legal a diferencia de la calibración es utilizada en el aseguramiento de la calidad y se realiza por medio de metrología industrial. Los organismos de acreditación la refieren como la acción fundamental que prueba la correcta indicación de un instrumento de medición. Con la finalidad del aseguramiento de la calidad de los resultados generados en el laboratorio de inmunología en investigación será necesario que todos los equipos e instrumentos de laboratorio se les realicen verificaciones y/o calibraciones.

Certificados de calibración de equipos e instrumentos

En el caso de los equipos, los certificados de calibración son los documento expedidos después de calibrados, siempre y cuando hayan cumplido con las condiciones y criterios para el otorgamiento de los mismos. Donde, se documentan los resultados obtenidos de acuerdo a los parámetros verificados, la fecha en la cual fueron realizadas las mediciones y las condiciones en las que se practicaron, deben incluir un cálculo de incertidumbre, el periodo de tiempo de validez para la calibración. Un certificado de calibración sin todos los parámetros documentados es incompleta. No obstante dicho certificado como tal no acredita el correcto funcionamiento del equipo calibrado (“The State Operations Manual”).

En el caso de los instrumentos, el contenido de los certificados de calibración está prescrito en la cláusula 5.10 de la norma NMX-17025-IMNC: 2000, que, en términos generales, incluye: a) la identificación del instrumento bajo calibración; b) la identificación del poseedor del instrumento; c) los resultados de la calibración, compuestos esencialmente por: los errores de medición de las lecturas del instrumento respecto a los valores indicados del patrón, y la incertidumbre de tales errores (la información sobre los errores y sus incertidumbres puede presentarse en forma de tablas, gráficas o ecuaciones); d) las condiciones relevantes observadas durante la calibración, el método de calibración, en ocasiones el origen de la trazabilidad; e) información que avala su validez, limitaciones y advertencias (Lazos-Martínez, R, 2002).

Informes de funcionamiento de los equipos

En los laboratorios de investigación se requieren los informes del funcionamiento de los equipos, para cubrir con los parámetros de calidad antes mencionados. Los informes del funcionamiento de un equipo se generan agrupando los datos generados de: a) los informes de verificación de los equipos; b) los certificados de calibración; además de, c) los datos generados en las hojas de funcionamiento de los equipos, donde se indica el tiempo de uso, las condiciones de uso y las fallas detectadas.

Las hojas de funcionamiento de equipos simples y complejos deben estar pegadas al mismo, si es posible. Estas, se guardarán durante toda la vida del equipo, y reflejarán la fecha y los parámetros que son medidos (comportamiento, desviación de función, problemas de función, acción correctora, incidentes, mantenimiento preventivo). Estos informes nos dan referencia integral del funcionamiento, que está supeditado al tiempo de uso del equipo, la vida media del equipo y a los programa de mantenimiento, preventivo y correctivo así como, a los procesos de verificación y/o calibración de equipos.

Documentación de los procesos

Un proceso, son el conjunto de actividades relacionadas mutuamente o que interactúan para generar valor (resultado). Un proceso se define como todas las actividades para poder llegar a un resultado. La documentación de procesos es una manera más sistemática de mejorar los métodos informales con los que la mayor parte de la gente mantienen encendidos sus “radares” durante proyectos complejos o a largo plazo. Es fundamental,

pues es una herramienta que ayuda a que el personal, investigadores del proyecto hagan un rastreo cuidadoso de eventos significativos en el mismo, “con la finalidad de discernir con mayor precisión qué está sucediendo, cómo está sucediendo y por qué podría estar sucediendo. Es una manera sistemática de reflexionar, analizar y descubrir los patrones que favorecen o dificultan el cambio (Casey, 2003). Las ventajas que ofrece la documentación de los procesos, es que la próxima vez que se realice la tarea se tiene un documento para poder realizarla paso a paso.

Desarrollo de procedimientos, protocolos investigación

Los procedimientos, son una sucesión cronológica y secuencial de pasos concatenadas que constituyen la manera de efectuar un trabajo dentro de un ámbito predeterminado de aplicación. El desarrollo de los procedimientos y protocolos de investigación que se realizan en los laboratorios aseguran: a) que las actividades se realizan de una forma independiente de la persona responsable de llevarlas a cabo; b) que se realizan de una forma ordenada y sin improvisaciones y finalmente c) que conducen al objetivo cubierto por el procedimiento.

Para los ensayos analíticos o de investigación se pueden seguir protocolos de investigación, de literatura científica como los manuales de procedimientos de ensayos en inmunología (Current Immunology Protocols), artículos de investigación (JCR) o bien en protocolos ya implementados por el mismo usuario. Los procedimientos generados, implementados y estandarizados, deberán ser documentados obligatoriamente en las bitácoras o manuales de trabajo que se deberán encontrar y no salir de laboratorios.

Organización de la documentación dentro del laboratorio.

Es conveniente la siguiente organización de la documentación dentro de los laboratorios: 1) Laboratorios-organización y administración; 2) Laboratorio-Manuales; 3) Laboratorios-Técnicas y procedimiento (Good laboratory practice manual).

La organización de la documentación es parte de las buenas prácticas de laboratorio, que son una serie de reglas y procedimientos establecidos por organismos como la OCDE (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos), FDA (Food and Drug Administration), La Agencia de Protección Ambiental (EPA), entre otras. A pesar de que estas prácticas no están normadas en muchos países, si se consideran de cumplimiento obligatorio, debido a que es la única forma de asegurar la calidad e integridad de los datos obtenidos en determinados estudios o investigaciones. Dicho sistema establece las condiciones bajo las cuales se planifican, realizan, controlan, registran, archivan e informan los estudios realizados por un laboratorio. Por otro lado, no debemos olvidar que en el laboratorio existen riesgos constantes, por lo que seguir estos lineamientos nos ayudará también a prevenir accidentes o consecuencias graves en todas las personas que están en contacto directa o indirectamente con el trabajo que ahí se realiza (Buenas Practicas de Laboratorio). Sin embargo no existe una normativa específica para los Laboratorios de investigación en Inmunología.

Manejo de muestras: obtención de muestras

Para la obtención de muestras para la investigación en un laboratorio de inmunología, ya sea de sangre o fluidos de pacientes, primero, se debe contar con acuerdos de colaboración legales entre alguna/s instituciones de salud los centros de investigación. Las Instituciones de salud, serán las responsables por la toma de muestras por venopunción o por la vía correspondiente. Una vez obtenida la muestra será transportada al laboratorio de inmunología, guardada la muestra en un recipiente apropiado y bajo las condiciones específicas según el ensayo, sea temperatura ambiente, con refrigerantes, con hielo seco.

Para el manejo de la muestra será necesario: a) Usar guantes de látex o vinil impermeables a los líquidos; b) Limpiar la superficie de los contenedores de muestra y los guantes con un desinfectante; c) Etiquetar la muestra adecuadamente; d) Los guantes deben eliminarse y desecharse en un contenedor que pase por el autoclave, e) Lavar las manos con agua y jabón inmediatamente después de quitarse los guantes. Siguiendo con todos los requerimientos de la NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Para el caso de uso de muestras de animales se deben tomar las mismas consideraciones, ya que algunas enfermedades pueden presentarse un riesgo para los humanos. En cualquier circunstancia de contaminación de las manos o del cuerpo con sangre u otro fluido, deberá notificar al supervisor y al servicio de salud, para que sean debidamente tratadas.

Etiquetado de las muestras

Las etiquetas de la muestra deben realizarse con tinta indeleble, en un lugar específico del contenedor y deben contener la información, la hora de tomada la muestra, el tipo de muestra (líquido ceforraquídeo, sangre, suero, entre otros), el nombre o número de paciente al que pertenezca, todo es parte fundamental de la identidad del registro biológico; esta es una etapa muy importante, pues es allí donde se adjunta a la muestra la información que llevará permanentemente, sin la cual, pierde todo su valor. Se debe realizar un etiquetado seguro e inequívoco a las muestras (procedimientos básicos en la toma de muestras biológicas para diagnóstico). Es fundamental anexar cualquier tipo de información que pueda ser importante para futuros estudios que se realicen con esta muestra, a partir de la cual, se pueden generar innumerables investigaciones lo que incrementa en gran medida el valor científico del espécimen (Normas generales para tratamiento de muestras biológicas).

Mantenimiento de muestras

Existen protocolos para la preservación y manejo de las muestras biológicas teniendo en cuenta la preservación preventiva como una herramienta para disminuir el deterioro que se pueda presentar. Las muestras serán mantenidas a las condiciones adecuadas según el protocolo de investigación o metodología a seguir o el tipo de ensayo que se vaya a realizar. Por ejemplo, en el caso de muestras para fenotipificación con anticuerpos mediante citometría de flujo, puede ser guardada la sangre a temperatura ambiente o bien a 4°C previa a la tinción; en el caso de sueros o plasmas para determinación de inmunoglobulinas o citocinas por ELISA, deben conservarse a -20 °C y sin ciclos de congelamiento y descongelamiento continuo, en el caso de tejido para inmunohistoquímicas, si son criocortes conservar siempre a -20°C, en parafina a temperatura ambiente. También durante el almacenamiento se considerarán las Normas generales para tratamiento de muestras biológicas. Se debe seguir la NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 para el manejo de los residuos peligrosos biológico-infecciosos.

Eliminación o destrucción de muestras

Los laboratorios de investigación en inmunología deberán cumplir con las disposiciones legales aplicables según la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Cumplir con las disposiciones correspondientes a las siguientes fases de manejo, según el caso: a) identificación de los residuos; b) envasado de los residuos generados; c) almacenamiento temporal; d) recolección y transporte externo; e) tratamiento; f) disposición final.

En las áreas de generación de los establecimientos generadores, se deberán separar y envasar todos los residuos peligrosos biológico-infecciosos, de acuerdo con sus características físicas y biológicas infecciosas, conforme a la tabla 2 de esta Norma Oficial Mexicana. Durante el envasado, los residuos peligrosos biológico-infecciosos no deberán

mezclarse con ningún otro tipo de residuos municipales o peligrosos. Para el caso de muestras de animales se deben tomar las mismas consideraciones (NOM-087-ECOL-SSA1-2002).

Aspectos regulatorios: Normatividad en el manejo de laboratorios

NOM-SSA-166, Los laboratorios deberán apegarse a la aplicación de la norma NOM-SSA-166, la cual es de carácter obligatoria en el territorio nacional para los profesionales, técnicos y auxiliares para la salud de los sectores público, social y privado que intervengan en la organización y funcionamiento de laboratorios clínicos.

Para poder dar cumplimiento de esta Norma es necesario consultar las siguientes y dar cumplimiento a las:

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.

NOM-009-STPS-1993, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene para el almacenamiento, transporte y manejo de sustancias corrosivas, irritantes y tóxicas en los centros de trabajo.

NOM-012-STPS-1993, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo donde se produzcan, usen, manejen, almacenen o transporten fuentes generadoras o emisoras de radiaciones ionizantes.

NOM-114-STPS-1994, Sistema para la identificación y comunicación de riesgos por sustancias químicas en los centros de trabajo (NOM-SSA-166).

Seguridad biológica y química.

NOM-087-SEMARNAT-SSA-2002. El laboratorio de Inmunología en investigación deberá cumplir con esta Norma, donde se definen, como residuos peligrosos a todos aquellos residuos que por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables y biológico-infecciosas, que representan un peligro para el equilibrio ecológico o el ambiente; mismos que serán manejados en términos de la propia ley, su Reglamento y normas oficiales mexicanas que expida la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales previa opinión de diversas dependencias que tengan alguna injerencia en la materia, correspondiéndole a la citada SEMARNAT su regulación y control.

Dando cumplimientos a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995, para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que presten servicios de atención médica. Así como al manejo de Los residuos peligrosos biológico-infecciosos en términos de las regulaciones ambientales antes señaladas, de acuerdo a la NOM-087-ECOL-1995.

NOM-052 SEMARNAT-2005. El laboratorio de Inmunología en investigación deberá cumplir la NOM-052-SEMARNAT 2005, donde se establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.

Estrategias de competitividad: certificaciones y acreditaciones

El Laboratorio de Investigación en Inmunología podría ser evaluado para obtener una certificación por el Instituto Mexicano de Normalización y Certificación (IMNC) sí, se implementa completamente el sistema de Gestión de Calidad, con las características previamente descritas en este capítulo.

Para la acreditación que es el reconocimiento oficial de la competencia técnica de laboratorios de pruebas para generar resultados confiables. Se tendría que someter a una evaluación de tercera parte, relativa a un organismo de evaluación de la conformidad (OEC), solo sí el laboratorio manifiesta la demostración formal de su competencia para llevar a cabo tareas específica y la de evaluación se dé de acuerdo a conformidad. Y tendría que ser de una competencia técnica específica (Entidad Mexicana de Acreditación A.C).

Aprobación por organismos gubernamentales nacionales e internacionales

La entidad mexicana de acreditación, A.C. (EMA) es la primera entidad de gestión privada en nuestro país, que tiene como objetivo acreditar a los organismos de la evaluación de la conformidad: Laboratorios de ensayo, laboratorios de calibración, laboratorios clínicos, unidades de verificación (organismos de inspección), organismos de certificación, Proveedores de Ensayos de Aptitud y a los Organismos Verificadores/Validadores de Emisión de Gases Efecto Invernadero (OVV GEI). Actualmente la EMA cuenta con los reconocimientos internacionales por el Foro Internacional de Acreditación (IAF) y la Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios (ILAC), confirmando que nuestra entidad trabaja con apego a las normas nacionales e internacionales (Entidad Mexicana de acreditación).

REFERENCIAS

A.E.F.A. Requisitos mínimos para el laboratorio de análisis clínicos (Documento de consenso aprobado el día 26 de octubre de 2001).

Analytical Methods Committee, Royal Society of Chemistry. (1992). "Proficiency testing of analytical laboratories". *The Analyst*, 117, 97-104.

Barrientos-Tejeda AM, Chilge GC, Casquero-Cavero JM, Collantes-Lazo HV, et al. (2005). "Bioseguridad en laboratorios de ensayo biomédicos y clínicos". Ministerio de Salud, República del Perú. p. 1-107.

Bioanalytical Method Validation. U.S. May (2001) Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) BP. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>

Bretscher P; Cohn M (1970). "A theory of self-nonsel self discrimination". *Science* **169** (3950): 1042–49.

Buenas Prácticas de Laboratorio. <http://www.metrixlab.mx/no-cat/buenas-practicas-de-laboratorio/>

Buenas Prácticas de Laboratorio y las Normas ISO 9001:2000. <http://elfoscientiaie.ciqa.edu.cu/PDFs/Biotecnol%20Apl/2008/25/3/BA002503EF254-257.pdf>

Macfarlane burnet Frank. Classic in oncology (1976) CA-A Cancer Journal for Clinicians, Vol. 26, No. 2 March/April, 116-118). Calibración y verificación de instrumentos."

Certificación - Sistemas de gestión de calidad. Salud y Seguridad. ISO 9001 - <http://www.sgs.mx/es-ES/Health-Safety/Quality-Health-Safety-and-Environment/Quality/Quality-Management-Systems/ISO-9001-Certification-Quality-Management-Systems.aspx>

Coutinho A et al. (1984). "From an antigen-centered, clonal perspective of immune responses to an organism-centered network perspective of autonomous reactivity of self-referential immune systems". *Immunological Reviews* **79**: 151–168. doi:10.1111/j.1600-065x.1984.tb00492.x

Current Protocols in Immunology. Online ISBN: 9780471142737. DOI: 10.1002/0471142735

Disease Control and Prevention, Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) (http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/su6101a1_ensp.htm).

Elaboración de PNO's para un sistema de documentación en un laboratorio farmacéutico. Tesis. Daniela Izaguirre Cervantes. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. 2007. Universidad Nacional autónoma de México. Facultad de estudios Superiores.

<http://avalon.cuautitlan2.unam.mx/biblioteca/tesis/383.pdf>

Entidad Mexicana de acreditación <http://www.ema.org.mx/portal/index.php/Conozca-a-Nuestros-Acreditados/oec-con-cero-no-conformidades.html>

Entidad mexicana de acreditación, a. c. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS CRITERIOS DE APLICACIÓN DE LA NORMA NMX-EC-17025-IMNC-2006 / ISO/IEC 17025:2005 http://200.57.73.228:75/pqtinformativo/GENERAL/Carpeta_2_Criterios_evaluacion/MP-FE005_Criterios_de_aplicacion_NMX-EC-17025-IMNC-2006.pdf

Formato PNO. <http://www.anafarmex.com.mx/wp-content/uploads/2014/04/formato-pno.pdf>

Freer G, Rindi L. (2013). "Intracellular cytokine detection by fluorescence-activated flow cytometry: basic principles and recent advances". *Methods*; 61(1):30-8. doi: 10.1016/j.ymeth.2013.03.035.

Fundación Annie E. Casey (2003). "Topic Paper Process Documentation." Escrito para 'Making Connections A Neighbourhood Transformation Family Development Initiative'. Baltimore, EEUU. http://www.aecf.org/initiatives/mc/lp/lp_reading/processdocumentation8.5x11.pdf

Good laboratory practice training manual for the trainer: a tool for training and promoting good laboratory practice (GLP) concepts in disease endemic countries (2008). 2nd ed. ISBN 978 92 4 154756 7 (NLM classification: QY 25). <http://www.who.int/tdr/publications/documents/glp-trainer.pdf>

Gutierrez J, Fernández F, Soto MJ, Maroto MC (2001). "Control de calidad interno del inmunodiagnóstico microbiano para conseguir la calidad global". *Enferm Infecc Microbiol Clin* 19:488-494.

Implementación del Sistema de gestión de Calidad, en base a la norma ISO 9001:2000. (2006) Tesis para obtener el título en ingeniería industrial. Ramirez Melo Claudia y Sánchez Herrera María Cinthia. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Campus Sahagún

Jaspan HB; Lawn SD; Safrit JT; Bekker LG (2006). "The maturing immune system: implications for development and testing HIV-1 vaccines for children and adolescents". *AIDS* 20 (4): 483–94.

Kenneth Murphy, (2011) Janeway's Immunobiology textbook.
Laboratorio de calibraciones industriales. <http://www.labci.com.ar/nota4.html>

Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. (2014). "Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment". *J Immunol Res* 149185. doi: 10.1155/2014/149185.

Lazos-Martínez, R., Uso de certificados de calibración. Notas. Centro Nacional de Metrología, México, diciembre 2002. Disponible en <[http:// www.cenam.mx](http://www.cenam.mx)>

Miller JM, Astles R, Baszler T, Chapin K, et al. (2012) Pautas para prácticas laborales seguras en laboratorios de diagnóstico médico para humanos y animales. Centers for Disease Control and Prevention, Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) (http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/su6101a1_ensp.htm).

Normas generales para tratamiento de muestras biológicas.
<http://www.eccpn.aibarra.org/temario/seccion2/capitulo38/capitulo38.htm>

NORMA Oficial Mexicana, Secretaría de Salud NOM-007-SSA3-2011. Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. Diario Oficial (2012) p. 24-35.
http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5240925&fecha=27/03/2012

NORMA Oficial Mexicana NOM-166-SSA1-1997, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/166ssa17.html>

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-052-SEMARNAT-2005, Norma publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de junio de 2006.
http://www.inb.unam.mx/stecnica/nom052_semarnat.pdf

NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>

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.
http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4884397&fecha=07/11/1995

"Office of Science Education - LifeWorks - Immunologist". Retrieved 2009-09-10.
<http://nihlifeworks.org/Alphabetical%2BList/Immunologist.html>

Peter Unger, "Accreditation or Registration?"
http://www.nist.gov/nvlap/upload/Accreditation_vs_Registration.pdf

Procedimientos básicos en la toma de muestras biológicas para diagnóstico.
http://www.indre.salud.gob.mx/sites/indre/descargas/pdf/procedimientos_basicos_en_la_toma_de_muestras_2014.pdf

Prieto L, Salinas MA, Arias YR, Rodríguez LM, Giraldo MC, Suárez DM, Alvarez CM (2013). “Estándares de calidad para laboratorios que realizan pruebas de inmunogenética para transplante de órganos”. En: Mesas de Trabajo Laboratorio de Inmunogenética. Universidad de Antioquia, Colombia. p. 1-39.

“The State Operations Manual” Appendix C – Interpretive Guidelines, Calibration and Calibration Verification Procedures (493.1255) available at the CMS website at <http://www.cms.hhs.gov/clia>

US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; 2007.
<http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmb15/bmb15toc.htm>.

Whiteland JL, Shimeld C, Nicholls SM, Easty DL, Williams NA, Hill TJ. (1997). “Immunohistochemical detection of cytokines in paraffin-embedded mouse tissues”. J Immunol Methods; 210(1):103-8.

Fuentes electrónicas:

<https://nei.nih.gov/intramural/clini>

<https://nei.nih.gov/intramural/expimm>

<http://www.clevelandcliniclabs.com/laboratory-medicine/immunopathology/>

https://nei.nih.gov/intramural/mol_imm/immunology

www.ifcc.org

www.seqc.es

www.aacc.org

INTRODUCCIÓN

Una vacuna es un producto que estimula el sistema inmune de una persona a producir respuesta ante una enfermedad específica, buscando la protección de dicha persona contra tal enfermedad (<http://www.cdc.gov/vaccines/vac-gen/imz-basics.htm>). Estos productos han ido evolucionado a lo largo del tiempo, desde microorganismos atenuados (de limitada capacidad para causar enfermedad), como ocurrió con el primer biológico obtenido por Edward Jenner en 1796 contra la viruela. En casos como éste, la atenuación podía conseguirse por medio de diversas condiciones de cultivo y pasajes seriales de microorganismos completos en el laboratorio, como fue el caso de la vacuna contra la tuberculosis, o mediante la inactivación por medios químicos como el formaldehído para diversas bacterias y virus. En algunas preparaciones, no fue necesario usar el microorganismo completo sino sólo componentes (toxinas) cuya pérdida de actividad por estrategias de laboratorio (y producir así los toxoides) permitían que mediante la intervención del sistema inmune fuera suficiente para evitar la enfermedad, como en el caso de la difteria, tos ferina y tétanos, por citar algunos ejemplos.

Hoy en día, los retos cruciales en el diseño y evaluación de nuevas vacunas son la respuesta rápida y eficiente a enfermedades infecciosas emergentes, provocadas por diversas variantes antigénicas de microorganismos y aún aquellas resistentes a agentes antivirales y antibióticos, así como buscar las mejores estrategias para lograr la prolongación de la memoria inmune, o bien, la reprogramación de la respuesta ante eventos autoinmunes, así como la activación de un tipo específico de respuesta inmune que favorezca la contención de la enfermedad. Dentro de los aspectos prácticos a considerar, también está la pertinencia de los modelos a usar y ensayos a realizar para evaluar la seguridad y eficacia de las vacunas, buscando se mimeticen lo mejor posible las situaciones encontradas por los microorganismos durante el proceso natural de infección.

A fin de favorecer la estabilidad o potencia (capacidad de estimular al sistema inmune para inducir respuesta protectora), o bien derivado del proceso de producción, las vacunas suelen contener algunos compuestos distintos de los microorganismos en sí, como: (i) geles o sales de aluminio, que se usan como adyuvantes, para promover una respuesta más rápida, potente y persistente a la vacuna, (ii) proteína derivada de huevo en vacunas contra influenza y fiebre amarilla, ya que suelen usarse huevos de gallina en la producción de estas vacunas, (iii) glutamato monosódico y 2-fenoxietanol, que se usan como estabilizadores, para proteger de luz, calor, acidez y humedad y (iv) timerosal, compuesto derivado de mercurio que se añade en algunos casos de viales que contienen más de una dosis de vacuna, para prevenir su contaminación (<http://www.cdc.gov/vaccines/vac-gen/additives.htm>).

Para 2012, el mercado mundial de vacunas osciló en 27, 300 millones de dólares americanos, y se esperaba creciera a una tasa de 12% entre 2012 y 2017, para llegar a 47,500 millones de dólares americanos en 2017 (Global Vaccine Market Report and Forecast to 2017, de RNCOS). Con estas cifras, es importante destacar que hay aún oportunidades para conseguir vacunas nuevas o mejoradas para cerca de dos decenas de padecimientos, incluyendo neumococo, influenza, cáncer, poliomielitis, rotavirus, meningococo, DTP, hepatitis, MMR, malaria, rabia, VIH, tuberculosis, varicela, fiebre amarilla, dengue y encefalitis, entre otras. De acuerdo a este estudio, los mercados clave

incluyen a los Estados Unidos de América, Europa, Japón, China, India y Brasil, lo cual nos deja en perspectiva la oportunidad de incluir a nuestro país como un sector privilegiado en la Investigación y Desarrollo de nuevas vacunas. Un punto que podría resultar fundamental en el éxito de nuevas vacunas es considerar el potencial de diversidad genética de la población nacional y cómo impactan las vacunas desarrolladas y evaluadas en otros países en la protección conferida a connacionales, así como de aquellos agentes nocivos que perjudiquen particularmente a nuestros habitantes. En ese sentido, es oportuno abrir espacios de investigación en nuestro país, que verifiquen estos efectos, para así aprovechar la presencia en México de transnacionales especializadas en el campo, como son GSK, Sanofi-Pasteur, Pfizer, Merck, Astra Zeneca y Baxter, entre otros.

En respuesta a esta oportunidad, el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), A.C., cuenta con la Dirección de Biotecnología Médica y Farmacéutica, donde en la sub-línea de investigación “Desarrollo y evaluación de vacunas y compuestos inmunomoduladores” nos enfocamos a la búsqueda y caracterización de nuevos antígenos para el enriquecimiento de formulaciones ya existentes o el desarrollo de nuevas vacunas, ya sean convencionales o recombinantes, mediante estrategias donde coinciden la bioinformática, microbiología molecular y clásica, genómica, biología molecular e ingeniería genética, modelos animales, inmunología, entre otras disciplinas. Así mismo, se está trabajando con moléculas con actividad adyuvante que induzcan una respuesta inmune protectora en el individuo vacunado, pero que sobre todo reduzcan la cantidad de antígeno en las formulaciones, buscando disminuir los costos de producción. Además, nuestro grupo tiene la infraestructura y la capacidad técnica para evaluar la eficacia de nuevas vacunas desarrolladas por empresas farmacéuticas que requieran controles de calidad externos. Entre dichas instalaciones podemos considerar: (1) Laboratorio de bioseguridad nivel 3 (BSL3), (2) Laboratorio de bioseguridad nivel 2 (BSL2), (3) Laboratorio de Cultivo Celular, (4) Laboratorios de Experimentación Animal (módulos vacunas y farmacología-toxicología), (5) Laboratorio de Biología Molecular, (6) Laboratorio de Genómica y (7) Laboratorio de Biotecnología. A continuación, citamos ejemplos de vacunas desarrolladas en CIATEJ, A.C.

Construcción de una cepa de Mycobacterium bovis BCG recombinante como candidato contra tuberculosis latente

La enfermedad: en la actualidad la tuberculosis (TB) sigue siendo un problema importante de salud pública. De los 9 millones de personas que se calcula que contrajeron la TB en 2013, más de la mitad (56%) pertenecían a las regiones de Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental, y una cuarta parte a la de África, que también fue la que presentó mayores tasas de incidencia y mortalidad en relación con el tamaño de la población. Solo India y China representaron el 24% y el 11% de los casos, respectivamente (http://www.who.int/tb/publications/global_report/qtbr14_execsummary_summary_es.pdf).

Aunque muchos de los casos de TB pueden ser tratados con fármaco-terapia, en años recientes se ha incrementado la aparición de cepas fármaco-resistentes en todas partes del mundo, con casos intratables en la India (Donald & van Helden, 2009, Loewenberg, 2012). La principal ruta de infección en la tuberculosis es la aérea, por la exposición al bacilo normalmente al entrar en contacto con las secreciones respiratorias que despiden las personas con tuberculosis pulmonar, cuando tosen, hablan o estornudan. Se estima que de 1 a 3 bacterias es una dosis suficiente para provocar infección con *M. tuberculosis* en humanos (Van Rhijn, 2008). Según estimaciones de la OMS, se ha considerado que una tercera parte de la población estaría infectada en fase latente con *Mycobacterium tuberculosis*.

La vacuna: *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) es la única vacuna disponible y aprobada por la OMS para prevenir y reducir la incidencia de la enfermedad en humanos mediante una estrategia profiláctica de inmunización (WHO, 2009). BCG es una vacuna viva atenuada, derivada de 230 pasajes seriales *in vitro* de una cepa virulenta de *Mycobacterium bovis*, desarrollada por Albert Calmette y Camille Guérin entre los años 1908 y 1921. Durante la subcultivación se acumularon alteraciones genéticas, incluyendo deleciones (pérdida de genes) y duplicaciones, que resultaron en la pérdida de factores de virulencia, lo que produjo la atenuación.

BCG ha sido utilizada como vacuna en humanos desde 1921, y a la fecha más de 3 mil millones de dosis han sido administradas con cerca de 115 millones de dosis adicionales aplicadas anualmente a alrededor del 80% de los niños en el mundo en humanos desde 1921 (Andersen & Doherty, 2005, Skeiky & Sadoff, 2006). BCG es una vacuna segura, los efectos secundarios son bien tolerados y sólo está contraindicada para individuos inmunocomprometidos, como personas con SIDA, en quienes puede causar una seria enfermedad diseminada e incluso la muerte (Tullius et al., 2008). Sin embargo, su efectividad aún es un tema controversial. Por una parte, reduce el riesgo para las formas diseminadas de TB en la infancia temprana, incluyendo la enfermedad miliar y la tuberculosis meníngea, proporcionando una eficacia mayor al 80% contra estas formas severas de la enfermedad (Colditz, 1995; Rodrigues, 1993; Trunz, 2006; McShane, 2011; McShane & Williams, 2011; Meena & Rajni, 2010). No obstante, la eficacia de la protección contra la TB pulmonar, la forma predominante en adultos, es variable, se estima de estudios clínicos aleatorizados en un rango de 0 a 80% (Brewer, 2000). Además, esta vacuna no previene la infección primaria y, más importante, no previene la reactivación de la infección pulmonar latente, la principal fuente de diseminación bacilar en la comunidad. Por otra parte, se debe considerar que el periodo de inmunidad conferido por la BCG después de la vacunación neonatal disminuye gradualmente, extendiéndose a no más de 10 a 20 años (Doherty & Andersen, 2005), por lo que tiene un pequeño efecto en la tasa de TB en adultos y que además no es efectiva en poblaciones sensibilizadas previamente por antígenos micobacterianos (Trunz, 2006). Así mismo, distintas cepas BCG vacunales poseen mutaciones en reguladores transcripcionales, como PhoP y Crp (Brosch, 2007), que controlan la expresión de múltiples genes y por ende, su capacidad de multiplicación en el hospedero, grado de virulencia y presentación de antígenos varía, con consecuentes cambios en eficacia de protección en modelos experimentales (Castillo-Rodal, 2006) y en población humana (Mahomed, 2006). Actualmente la bacteria *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) se usa para inmunizar personas sanas que nunca han estado en contacto con *Mycobacterium tuberculosis*.

Desarrollo de nuevas vacunas contra tuberculosis a nivel mundial

En el desarrollo de nuevas vacunas, la mayoría de las estrategias se enfocan en prevenir la enfermedad activa o progresiva, mediante el uso de variantes atenuadas de *Mycobacterium tuberculosis*. Como ejemplos podemos citar auxótrofos para aminoácidos (Sampson, 2004), para metabolismo de nucleótidos (Brown, 2005; Sambandamurthy, 2005; Sambandamurthy, 2006), carentes de reguladores transcripcionales, como PhoP (Martin, 2006) o incapaces de producir algunos lípidos, como la mutante en *fadD26* (Infante, 2005). Otros intentos se han basado en la producción de cepas BCG recombinantes que expresan antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, como los antígenos Ag85A y Ag85C, ESAT-6, Ag 38KDa, Ag 19KDa; o incluso aquellas que producen citocinas como IL-18 y TGF- β (Hernandez-Pando, 2007). Cabe resaltar que salvo dos casos recientes, por un lado una vacuna subunitaria basada en la mezcla de una proteína expresada durante la infección

aguda, y otra implicada en infección crónica en ratones (Aagaard, 2011), y por otro una cepa BCG modificada para sobreexpresar antígenos del regulón DosR (Flores Valdez & Schoolnik, 2010), son escasos los esfuerzos comunicados a la fecha para conseguir una vacuna contra tuberculosis latente. En la patente US 7,935,354B2, se construyó una cepa BCG modificada, capaz de expresar al regulador transcripcional DosR, de manera constitutiva, e inducir así la transcripción de la mayor parte de los 40 genes que integran el regulón DosR, entre cuyos antígenos se encuentran proteínas reconocidas preferentemente por personas con tuberculosis latente. Variantes basadas en el mismo DosR o miembros de su regulón se han comunicado en las solicitudes de patente AU20110203012 y US20070945680 20071127.

Desarrollo de vacunas contra tuberculosis en CIATEJ

En nuestro caso, buscamos modificar a la vacuna actual contra la tuberculosis humana, la bacteria BCG, por medio de la eliminación de un gen (secuencia de material hereditario de los organismos vivos) identificado como importante en la multiplicación en macrófagos, de acuerdo al estudio de Graham Stewart y colaboradores (Stewart, 2005). Este proceso se logra mediante el “intercambio” (por un evento llamado recombinación homóloga) de ese gen, por otra versión en la que “desaparece” el gen de interés y se coloca otro para permitir que la bacteria sobreviva en presencia de un antibiótico. Así, se puede identificar aquella vacuna modificada por la “selección” de usar ese antibiótico, que matará a todas las bacterias donde no se haya efectuado el “intercambio”. Esto se promueve por el uso de herramientas de laboratorio que varían en su eficacia: en nuestro caso, fue necesario recurrir a 3 métodos diferentes, ya que los 2 primeros no tuvieron éxito. Finalmente, pudimos obtener la vacuna modificada, en buena medida gracias al esfuerzo de un tesista de licenciatura, Michel de Jesús Aceves Sánchez, y a la comunicación con grupos de investigación de Inglaterra y Estados Unidos que donaron herramientas para buscar el “intercambio” de genes. Durante el transcurso de la investigación se confirmó la capacidad que tiene el gen que reemplazamos en la vacuna modificada, de dar origen a un producto (enzima) que reduce la cantidad de una molécula pequeña que transmite “señales” al interior de la bacteria (conocida como segundo mensajero). Esta “señal” es necesaria en otras bacterias, para controlar su capacidad de causar daño a quienes infectan (virulencia) o resistir ataques de nuestras defensas (respuesta inmune) o bien otras moléculas que usamos para combatir infecciones (antibióticos).

Con la cepa BCG modificada, hemos encontrado por medio de electroforesis bidimensional, espectrometría de masas y bioinformática, que como consecuencia de la eliminación genética que realizamos, se modula la expresión de diversas proteínas, algunas de ellas antigénicas, y a partir de los cambios observados, derivamos hipótesis sobre la capacidad de resistir estrés por la combinación de pH ácido y NaNO_2 , que simularía estrés producido por especies reactivas de nitrógeno, incrementándose la tolerancia en la nueva vacuna ante esta combinación. Además, como ya se citó, la función predicha del gen eliminado hacía suponer que ocurrirían cambios en la producción de biopelículas y por comparación con el papel demostrado en otras bacterias de dicha estructura (*Salmonella*, *Staphylococcus*, *Yersinia* y *Pseudomonas*, entre otros) surgió la hipótesis que posteriormente demostramos experimentalmente, que esta nueva vacuna podría permanecer por más tiempo dentro de un hospedero, como fue el caso en pulmones de ratones BALB/c infectados por vía intravenosa. Además, también en ratones BALB/c, demostramos que la inmunización de los mismos indujo una mayor proliferación de linfocitos T $\text{CD8}^+\text{IFN}\gamma^+$, y por último, que una dosis de 1/3 de nuestra BCG modificada, comparada con una dosis completa de BCG vacuna actual, protege de manera equivalente contra la pérdida de peso en ratones inmunizados y luego infectados con *M. tuberculosis* H37Rv vía intratraqueal, después de

26 semanas de infección. Estos resultados alentadores nos llevaron a tener desde abril de 2015, una evaluación en otro modelo de infección por aerosol en ratones, en colaboración con Colorado State University, a fin de verificar si usando una ruta de infección natural (opuesta a la infección intratraqueal con altas cargas de micobacteria virulenta) observamos un grado similar, menor o mayor de protección ante la infección en fase crónica (6 meses después del reto con *M. tuberculosis*). Como parte del tema de investigación del Dr. Mario Alberto Flores Valdez, se han generado otras dos cepas BCG recombinantes que también presentan resultados prometedores respecto a la capacidad de proteger contra la infección progresiva en modelos murinos, que están siendo objeto de mayores caracterizaciones preclínicas, en búsqueda de aportar ya sea estas nuevas cepas candidatas a vacuna, o bien, mediante el mapeo de diferencias antigénicas, algunas otras moléculas que pudieran purificarse u obtenerse por métodos de ingeniería genética para constituir vacunas subunitarias enfocadas a fase latente de infección. Un área de particular interés adicional, es revisar el efecto de diversos candidatos vacunales en población con mayor susceptibilidad a tuberculosis, como es el caso de personas con diabetes.

REFERENCIAS

Aggaard, C., T. Hoang, J. Dietrich, P. J. Cardona, A. Izzo, G. Dolganov, G. K. Schoolnik, J. P. Cassidy, R. Billeskov & P. Andersen, (2011) A multistage tuberculosis vaccine that confers efficient protection before and after exposure. *Nat Med* **17**: 189-194.

Andersen, P. & T. M. Doherty, (2005) The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nature reviews. Microbiology* **3**: 656-662.

Brewer, T. F., (2000) Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guerin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin Infect Dis* **31 Suppl 3**: S64-67.

Brosch, R., S. V. Gordon, T. Garnier, K. Eiglmeier, W. Frigui, P. Valenti, S. Dos Santos, S. Duthoy, C. Lacroix, C. Garcia-Pelayo, J. K. Inwald, P. Golby, J. N. Garcia, R. G. Hewinson, M. A. Behr, M. A. Quail, C. Churcher, B. G. Barrell, J. Parkhill & S. T. Cole, (2007) Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 5596-5601.

Brown, N., M. Jacobs, S. K. Parida, T. Botha, A. Santos, L. Fick, B. Gicquel, M. Jackson, V. Quesniaux & B. Ryffel, (2005) Reduced local growth and spread but preserved pathogenicity of a DeltapurC Mycobacterium tuberculosis auxotrophic mutant in gamma interferon receptor-deficient mice after aerosol infection. *Infect Immun* **73**: 666-670.

Castillo-Rodal, A. I., M. Castanon-Arreola, R. Hernandez-Pando, J. J. Calva, E. Sada-Diaz & Y. Lopez-Vidal, (2006) Mycobacterium bovis BCG substrains confer different levels of protection against Mycobacterium tuberculosis infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* **74**: 1718-1724.

Colditz, G. A., C. S. Berkey, F. Mosteller, T. F. Brewer, M. E. Wilson, E. Burdick & H. V. Fineberg, (1995) The efficacy of bacillus Calmette-Guerin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis: meta-analyses of the published literature. *Pediatrics* **96**: 29-35.

Doherty, T. M. & P. Andersen, (2005) Vaccines for tuberculosis: novel concepts and recent progress. *Clin Microbiol Rev* **18**: 687-702.

Donald, P. R. & P. D. van Helden, (2009) The global burden of tuberculosis--combating drug resistance in difficult times. *The New England journal of medicine* **360**: 2393-2395.

Flores Valdez, M. A. & G. K. Schoolnik, (2010) DosR-regulon genes induction in Mycobacterium bovis BCG under aerobic conditions. *Tuberculosis (Edinb)* **90**: 197-200.

Hernandez-Pando, R., M. Castanon, C. Espitia & Y. Lopez-Vidal, (2007) Recombinant BCG vaccine candidates. *Curr Mol Med* **7**: 365-372.

Infante, E., L. D. Aguilar, B. Gicquel & R. H. Pando, (2005) Immunogenicity and protective efficacy of the Mycobacterium tuberculosis fadD26 mutant. *Clin Exp Immunol* **141**: 21-28.

Loewenberg, S., (2012) India reports cases of totally drug-resistant tuberculosis. *Lancet* **379**: 205.

Mahomed, H., M. Kibel, T. Hawkridge, H. S. Schaaf, W. A. Hanekom, K. Itoni, D. Michaels, L. Workman, S. Verver, L. Geiter & G. D. Hussey, (2006) The impact of a change in bacille Calmette-Guerin vaccine policy on tuberculosis incidence in children in Cape Town, South Africa. *Pediatr Infect Dis J* **25**: 1167-1172.

Martin, C., A. Williams, R. Hernandez-Pando, P. J. Cardona, E. Gormley, Y. Bordat, C. Y. Soto, S. O. Clark, G. J. Hatch, D. Aguilar, V. Ausina & B. Gicquel, (2006) The live Mycobacterium tuberculosis phoP mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Vaccine* **24**: 3408-3419.

McShane, H., (2011) Tuberculosis vaccines: beyond bacille Calmette-Guerin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**: 2782-2789.

McShane, H. & A. Williams, (2011) Tuberculosis vaccine promises sterilizing immunity. *Nat Med* **17**: 1185-1186.

Meena, L. S. & Rajni, (2010) Survival mechanisms of pathogenic Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *FEBS J* **277**: 2416-2427.

Rodrigues, L. C., V. K. Diwan & J. G. Wheeler, (1993) Protective effect of BCG against tuberculous meningitis and miliary tuberculosis: a meta-analysis. *Int J Epidemiol* **22**: 1154-1158.

Sambandamurthy, V. K., S. C. Derrick, T. Hsu, B. Chen, M. H. Larsen, K. V. Jalapathy, M. Chen, J. Kim, S. A. Porcelli, J. Chan, S. L. Morris & W. R. Jacobs, Jr., (2006) Mycobacterium tuberculosis DeltaRD1 DeltapanCD: a safe and limited replicating mutant strain that protects immunocompetent and immunocompromised mice against experimental tuberculosis. *Vaccine* **24**: 6309-6320.

Sambandamurthy, V. K., S. C. Derrick, K. V. Jalapathy, B. Chen, R. G. Russell, S. L. Morris & W. R. Jacobs, Jr., (2005) Long-term protection against tuberculosis following vaccination with a severely attenuated double lysine and pantothenate auxotroph of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* **73**: 1196-1203.

Sampson, S. L., C. C. Dascher, V. K. Sambandamurthy, R. G. Russell, W. R. Jacobs, Jr., B. R. Bloom & M. K. Hondalus, (2004) Protection elicited by a double leucine and pantothenate auxotroph of Mycobacterium tuberculosis in guinea pigs. *Infect Immun* **72**: 3031-3037.

Skeiky, Y. A. & J. C. Sadoff, (2006) Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nature reviews. Microbiology* **4**: 469-476.

Stewart, G. R., J. Patel, B. D. Robertson, A. Rae & D. B. Young, (2005) Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification. *PLoS Pathog* **1**: 269-278.

Trunz, B. B., P. Fine & C. Dye, (2006) Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet* **367**: 1173-1180.

Tullius, M. V., G. Harth, S. Maslesa-Galic, B. J. Dillon & M. A. Horwitz, (2008) A Replication-Limited Recombinant Mycobacterium bovis BCG vaccine against tuberculosis designed for human immunodeficiency virus-positive persons is safer and more efficacious than BCG. *Infect Immun* **76**: 5200-5214.

Van Rhijn, I., J. Godfroid, A. Michel & V. Rutten, (2008) Bovine tuberculosis as a model for human tuberculosis: advantages over small animal models. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **10**: 711-715.

Fuentes electrónicas:

<http://www.cdc.gov/vaccines/vac-gen/imz-basics.htm>

<http://www.cdc.gov/vaccines/vac-gen/additives.htm>

Global Vaccine Market Report and Forecast to 2017, de RNCOS. Mayo 2013.

http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr14_execsummary_summary_es.pdf

Desarrollo de vacunas contra garrapata de ganado bovino

Moisés Martínez

INTRODUCCIÓN

La ganadería extensiva se conserva como una actividad de relevancia en el contexto socioeconómico de México, ya que en su conjunto con el resto del sector primario, ha sido sustento para el desarrollo de la industria nacional, debido a que proporciona alimentos, materias primas, divisas y empleos, además, distribuye ingresos en el sector rural y utiliza recursos naturales que no tienen características adecuadas para la agricultura u otra actividad pecuaria. En nuestro país esta actividad se desarrolla principalmente en zonas tropicales y subtropicales, donde la producción de bovino para carne constituye una de las actividades fundamentales del subsector pecuario nacional, por la contribución que realiza a la oferta de productos cárnicos, así como su participación en la balanza comercial del país, donde las exportaciones de ganado en pie es su principal rubro. Se ha estimado que en el 2001 la población total de ganado bovino fue de 30, 620, 930 cabezas (García, 2003). La producción de ganado se ve afectada por problemas de salud, donde las garrapatas y las enfermedades que transmiten son las principales limitantes, siendo la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* la más importante. Las garrapatas producen bajas en la fertilidad del ganado, mayor tiempo en la engorda y dificultad en la importación de razas mejoradas para incrementar la calidad genética en áreas infestadas por garrapatas. La situación zoonosanitaria actual de la campaña nacional contra la garrapata *R. microplus* se encuentra dividida en tres fases. La fase libre representa principalmente la zona norte y centro del país y comprende 94.4 millones de hectáreas, que equivalen al 47.88% del territorio nacional. Las zonas en fase de erradicación representan 1.1 millones de hectáreas que se ubican en las áreas en las cuales el parásito ha sido eliminado por efectos de la campaña y comprenden un 0.57% del territorio. Por último, las áreas en fase de control alcanzan una superficie de 101.6 millones de hectáreas y representan el 51.5% del país, lo que da una idea clara de la problemática que se tiene.

El método de control de garrapatas más utilizado, que consiste en romper el ciclo reproductivo de éstas, ha sido la aplicación de tratamientos con compuestos químicos denominados genéricamente acaricidas, entre los cuales se incluyen las familias de los organoclorados, organofosforados, piretroides, amidinas y lactonas macrocíclicas (FAO, 1987). Estos productos han sido utilizados con éxito en el control de las garrapatas, sin embargo, desafortunadamente en años recientes, su uso irracional, continuo e intensivo ha ocasionado la generación de poblaciones de garrapatas resistentes a la acción de prácticamente cualquier acaricida disponible en el mercado, en diferentes partes de México y del mundo (Schroder, 1992). Adicionalmente, el uso de acaricidas presenta serios inconvenientes como los altos costos que representa el desarrollo de nuevos compuestos químicos, su toxicidad en mamíferos, su residualidad en los productos alimenticios obtenidos de la actividad ganadera y la contaminación ambiental que éstos generan. Por lo tanto, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de control.

El uso de vacunas como método preventivo es una herramienta que ha arrojado resultados alentadores en diversas regiones del mundo, convirtiéndose en una de las opciones más promisorias. Las ventajas de las vacunas es que pueden tener un efecto de larga duración, no presentan complicaciones de residualidad en animales y en sus derivados, ni de contaminación ambiental, hay menor probabilidad de que se desarrolle resistencia hacia ellas y actúan sobre blancos muy específicos (Pruett, 1999). Actualmente, las únicas vacunas contra ectoparásitos comercialmente disponibles (GAVAC y TickGARD), son las

derivadas de Bm86, una proteína de membrana de las células de intestino de la garrapata *R. microplus*. La vacunación de bovinos con el antígeno Bm86 induce la producción de inmunoglobulinas específicas que son ingeridas con la sangre, conforme la garrapata se alimenta. Al ingresar, los anticuerpos interactúan con el antígeno en la superficie del intestino, formándose el complejo de ataque a la membrana y causando la ruptura de la pared intestinal, fuga de la sangre hacia la cavidad corporal y la muerte (Rand, 1989). Estas vacunas han sido utilizadas con cierto grado de éxito para controlar las infestaciones de garrapatas y han reducido la incidencia de enfermedades causadas por éstas, como la babesiosis y la anaplasmosis. No obstante, se ha observado que estas vacunas tienen una efectividad variable contra las garrapatas de la especie *R. microplus* de diferentes áreas geográficas. Esta variación en la efectividad se ha atribuido principalmente a la variación antigénica que muestra la proteína Bm86 obtenida de diferentes cepas a nivel mundial, concluyéndose que a mayor variación antigénica, menor es la protección ofrecida por la vacuna. Con respecto a estudios realizados en México, se ha observado una baja eficacia protectora de la vacuna GAVAC, del 51% y 58%, en las cepas mexicanas de *R. microplus*, Tuxpan y Mora, respectivamente (García-García, 1999). El paso limitante en el desarrollo de nuevas vacunas ha sido la identificación de blancos antigénicos apropiados.

Desarrollo de nuevas vacunas contra garrapatas a nivel mundial

De manera general, se han explorado dos tipos distintos de blancos antigénicos para el desarrollo de vacunas antigarrapatas. Al primer tipo pertenecen los antígenos convencionales secretados en la saliva durante la adhesión y alimentación de la garrapata en el hospedero. Estos son llamados "antígenos expuestos". Usualmente son proteínas o péptidos sintetizados en las glándulas salivales. Los antígenos expuestos son introducidos al hospedero en el sitio de alimentación de la garrapata, lo que generaría una activación del sistema inmune del mismo. Sin embargo, como todos los artrópodos hematófagos, las garrapatas producen todo un arsenal de moléculas bioactivas en sus glándulas salivales (Brossard y Wikel, 2004). Estas moléculas son secretadas en la saliva para contrarrestar los mecanismos de defensa inmunes, inflamatorios y hemostáticos del hospedero, que tendrían la función de prevenir la adhesión y alimentación exitosa de la garrapata. El patrón general de inmunomodulación inducida por la saliva de la garrapata consiste en una regulación negativa de las citocinas Th1 y regulación positiva de las citocinas Th2, lo que conduce a la supresión de la respuesta de anticuerpos del hospedero (Brossard y Wikel, 2004). Por lo tanto, la respuesta inmune inducida por los antígenos expuestos no proporciona suficiente protección contra las garrapatas. Esto se ha observado en diversos estudios en donde se han evaluado algunos antígenos expuestos como vacunas recombinantes antigarrapata, entre los cuales se encuentran: Calreticulina, Proteína de unión a inmunoglobulina, Proteína de unión a histamina, P29, HL34, RIM36 y 64TRPs (Nuttall, 2006). Los resultados de estos estudios en general, han sido desalentadores.

En contraste, los "antígenos ocultos" de la garrapata, normalmente permanecen fuera de la vista de los mecanismos de defensa inmune del hospedero (Willadsen y Kemp, 1988). Aunque los antígenos ocultos no inducen una respuesta inmune durante la adhesión y alimentación de la garrapata, ellos son inmunogénicos cuando se preparan como extractos de tejidos de garrapatas (o como proteínas recombinantes) y se inoculan artificialmente en un animal. La vacunación con un antígeno oculto induce inmunoglobulinas específicas que son ingeridas con la sangre, conforme la garrapata se alimenta. Si es dirigida contra ciertos antígenos derivados del intestino de la garrapata, los anticuerpos interactúan con el antígeno oculto en la superficie del intestino, formando el complejo de ataque a la membrana y causando ruptura de la pared intestinal, fuga de la sangre hacia la cavidad corporal y la muerte (Rand, 1989).

Entre los antígenos ocultos evaluados como vacunas recombinantes antigarrapata se encuentran: Bm86, Bm91, Bm95 (la cual es una variante de Bm86), Vitelina, BmPRM, HLS1, Voraxina, HLS2, P27/30 y 4D8 (también llamada Subolesina; Nuttall, 2006). La desventaja de estos antígenos es que varios de ellos fueron generados a partir de especies de garrapatas que son irrelevantes para el ganado bovino, como *Haemaphysalis longicornis* (HLS1, HLS2, P27/30), *Amblyomma hebraeum* (Voraxina) e *Ixodes scapularis* (4D8). Adicionalmente, los ensayos de inmunización se realizaron en modelos animales como ratones, conejos y ovejas, lo que hace que los resultados sean difícilmente extrapolables a los bovinos.

Desarrollo de vacunas contra garrapatas en CIATEJ

Existen dos vías para el desarrollo de vacunas, la vía clásica y la vía inversa. La primera se emplea para identificar proteínas inmunogénicas a partir de diferentes preparados, como son los extractos crudos de diferentes tejidos de la garrapata, con los cuales se inmuniza a los bovinos. Una vez realizada la inmunización, se obtienen sueros provenientes de muestras de sangre de los bovinos, con los cuales se identifica a las proteínas de garrapata que fueron específicamente reconocidas por los anticuerpos generados por dicha inmunización. Una vez identificado el antígeno de interés, se procede a determinar su secuencia de nucleótidos codificante, para posteriormente clonarse en un vector determinado y de esta manera expresar la proteína recombinante. Enseguida se procede a purificar dicha proteína y a evaluarla como antígeno vacunal.

La vía inversa se basa en el empleo de la tecnología del ADN recombinante, que permite aislar genes específicos que llevan la información codificante para proteínas que se encuentran en la superficie celular de los distintos tejidos de la garrapata. El gen candidato se selecciona a partir del genoma de la especie para la cual se desea desarrollar la vacuna. A este gen se le realizan diferentes análisis bioinformáticos, los cuales permiten determinar por ejemplo si codifica para un antígeno potencial, predecir la estructura y localización de la proteína deducida, así como la predicción de la existencia de regiones con capacidad para activar el sistema inmune del hospedero. Una vez determinado el mejor candidato, éste se introduce en un vector determinado, se induce la expresión de la proteína recombinante, se purifica y se usa como inmunógeno para evaluar su potencial inmunoprotector.

El proceso para la vacunología convencional es más lento, desde cinco hasta quince años, mientras que la vacunología inversa se puede realizar entre uno y tres años. En nuestro caso, hemos seguido ambas estrategias y a través de ellas hemos logrado la identificación de antígenos con potencial inmunoprotector. Para el desarrollo racional de nuevas vacunas antigarrapata, los candidatos vacunales deben reunir una serie de requisitos, como son: a) expresarse en diferentes tejidos y en las diversas etapas del desarrollo de la garrapata (principalmente en etapa larvaria y adulta que es en donde se da la interacción hospedero-parásito), para contar con un mayor número de moléculas blanco; b) localizarse en la superficie celular, donde son más fácilmente accesibles a los anticuerpos producidos por el hospedero inmunizado; c) realizar funciones importantes en la garrapata, para que su inhibición afecte la viabilidad del parásito y de su descendencia y d) ser inmunogénicos, es decir, que sean capaces de generar una respuesta celular y/o de anticuerpos que le brinde protección al hospedero. Adicionalmente, las estrategias biotecnológicas actuales están enfocadas al desarrollo de vacunas universales, basadas en antígenos altamente conservados entre las diferentes especies de garrapatas, vacunas mejoradas basadas en cocteles de antígenos, así como vacunas regionales hechas a la medida de las necesidades particulares de los sistemas de producción. En la actualidad tenemos en evaluación una

serie de candidatos vacunales, los cuales se encuentran en proceso de protección de propiedad industrial.

REFERENCIAS

Brossard, M. y Wikel, S.K. (2004) Tick immunobiology. *Parasitology*. 129: S161–S176.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (1987) Epidemiology of tick-borne diseases: epidemiological parameters and their application to the control of tick-borne disease control. A practical field manual. Vol. II. Rome: FAO/WHO. Pp. 373-381.

García-García, J.C., González, I.L., González, D.M. et al. (1999) Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp. Appl. Acarol.* 23: 883–895.

García, C.M. (2003) Perspectivas de la ganadería tropical de México ante la globalización. Conferencia magistral. Memorias del XXVII Congreso Nacional de Buiatría. Villahermosa, Tabasco, México. Pp. 172-182.

Nuttall, P.A., Trimnell, A.R., Kazimirova, M. y Labuda, M. (2006) Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunology*. 28: 155-163.

Pruett, J.H. (1999) Immunological control of arthropod ectoparasites-a review. *Int. J. Parasitol.* 29: 25-32.

Rand, K.N., Moore, T., Sriskantha, A. et al. (1989) Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 9657–9661.

Schroder, J. (1992) Chemical control of ticks on cattle. *Tick vector biology: medical and veterinary aspects*. Springer, Berlin.

Willadsen, P. y Kemp, D.H. (1988) Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. *Parasitol. Today*. 4: 196–198.

Evaluación de dos cápsides potivirales expresadas en *Escherichia coli* como adyuvantes o acarreadores de epítomos para el desarrollo de vacunas subunitarias contra dos enfermedades virales porcinas.

Abel Gutiérrez

INTRODUCCIÓN. El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino y el circovirus porcino tipo 2

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS, por sus siglas en inglés) es uno de los principales problemas en la industria porcícola a nivel mundial y es causado por un virus que lleva el mismo nombre (PRRSV), perteneciente a la familia *Arteriviridae* que afecta a cerdos de todas las edades, causando problemas respiratorios en lechones y abortos en cerdas gestantes. El genoma de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva de este virus codifica para varias proteínas estructurales, de las cuales GP3, GP4, GP5, M y N han sido más estudiadas en cuanto al papel que desempeñan algunos de sus epítomos en la respuesta inmune, ya sea neutralizante o no neutralizante, que inducen en el huésped durante el proceso de infección. Por su parte, el circovirus porcino tipo 2 (PCV-2, por sus siglas en inglés) pertenece a la familia *Circoviridae* y es responsable de una serie de condiciones patológicas que reciben el nombre de enfermedades asociadas a circovirus porcino (PCVD) (Tischer, 1986; Allan, 1999). Tales enfermedades son la causa de grandes pérdidas económicas en la industria porcícola a nivel mundial. Si bien, la morbilidad y mortalidad son variables, dependiendo de la granja y el lote de animales analizados, las tasas habituales son de 4-30 % y 70-80%, respectivamente (Segalés, 2002). De hecho, la morbilidad puede generar pérdidas de 3 a 5 dólares por animal infectado (Gillespie 2009). El genoma de ADN monocatenario de este virus codifica para la única proteína estructural, que corresponde a la proteína de la cápside. De esta proteína, cuatro regiones y más de cinco distintos epítomos han sido descritos (Mahé, 2000; Lekcharoensuk, 2004; Tribble, 2011). Incluso, se ha identificado un fragmento inmunogénico de hasta 20 amino ácidos localizado en el extremo C-terminal (Lekcharoensuk, 2004; Truong, 2001; Shang, 2009; Huang, 2012).

Vacunas disponibles contra el PRRSV y PCV-2

En la actualidad, existen vacunas disponibles comercialmente contra el PRRSV, inactivadas y atenuadas, sin embargo, su eficacia protectora varía dependiendo de la zona geográfica en la que son utilizadas. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas vacunas contra el PRRSV, particularmente, aquellas basadas en epítomos que induzcan una respuesta de anticuerpos rápida contra el virus como una alternativa ante la aparición constante de nuevas variantes, es necesario. En lo que respecta al PCV-2, también existen vacunas comercialmente disponibles, desde las inactivadas hasta las subunitarias producidas de forma recombinante, i.e., las generadas mediante el sistema de expresión basado en baculovirus.

Desarrollo de nuevas vacunas subunitarias en CIATEJ contra PRRSV y PCV-2 basadas en cápsides potivirales

En CIATEJ, se ha estado realizando investigación durante los últimos 5 años para explotar las propiedades estructurales de las cápsides de algunos potivirus expresadas de manera recombinante en *Escherichia coli*. Las partículas tipo virus (PTVs) o pseudovirales, se han convertido en los últimos años en una tecnología aceptable en el campo de la vacunología, ya que asemejan la estructura tridimensional de un virus infeccioso y a la vez carecen del genoma viral empacado dentro de su cápside, siendo reconocidas como seguras para aplicaciones biomédicas (Vicente, 2011). Las características de las PTVs incluyen la propiedad de autoensamblaje, una superficie altamente ordenada y una repetitividad

superficial, además de su diversidad en tamaño y forma para el despliegue de moléculas de distinta naturaleza química, tanto dentro como fuera de su estructura (Jennings, 2008). Los potivirus son la familia más numerosa de virus de RNA de cadena positiva que infectan plantas. Estos virus poseen una arquitectura con simetría helicoidal, formando partículas filamentosas flexibles de 9 a 12 nm de ancho y 700 a 900 nm de longitud. Alrededor de 2000 copias de la proteína de la cápside (CP, por sus siglas en inglés) que es la única proteína estructural en estos virus, forman la partícula viral (Shukla, 1988). La lista de CPs potivirales que se han logrado expresar en forma recombinante incluye el virus del mosaico del pasto Johnson (JGMV) (Jagadish, 1991; Jagadish, 1996), el virus de la mancha anular de la papaya (PRSV) (Nagel, 1985), el virus del mosaico de la soya (SMV) (Eggenberger, 1989), el virus del mosaico amarillo del frijol (BYMV) (Hammond, 1989), el virus del mosaico amarillo de la calabacita (ZYMV) (Gal-On, 1990), el virus Y de la papa (PVY) (Stram, 1993), el virus de la mancha eruptiva de la ciruela (PPV) (Jacquet, 1998), el virus del bandeo de las venas del pimiento (PVBV) (Joseph, 1999) y el virus del jaspeado del tabaco (TEV) (Voloudakis, 2004).

Mezcla TEV CP y proteína quimérica PRRSV

Se generó en CIATEJ una mezcla que consiste en PTVs conformadas por la CP del TEV y una proteína quimérica multiepítomos del PRRSV, ambas expresadas de forma independiente en *E. coli*. Para el desarrollo de las PTVs, se diseñaron seis versiones distintas de la CP del TEV: secuencia nativa TEV CP, mutante sencilla de sustitución aminoacídica conservativa (K17R TEV CP) y doble (K17R/25 K20R TEV CP), con o sin una etiqueta de seis histidinas (His) en el extremo C-terminal. El diseño y la planeación para la generación de las distintas versiones se realizó con la utilización del programa informático CLC Main Workbench versión 6.0 (CLC Bio) empleando las herramientas de alineamiento de secuencias, análisis de propiedades de iniciadores de PCR, construcción de plásmidos y localización y visualización de marcos abiertos de lectura. Primeramente, se adquirió de Genscript la secuencia sintética que codifica para la versión TEV CP nativa, optimizada para su expresión en *E. coli* y ajustada en su composición GC. Esta secuencia fue enviada por el fabricante dentro del plásmido pUC57. La mutación sencilla como doble se realizó con el kit basado en PCR QuickChange II site-directed mutagenesis (Agilent Technologies) siguiendo las instrucciones del proveedor. Todas las versiones fueron amplificadas mediante PCR en el termociclador T100 (Biorad) con un iniciador sentido en combinación con uno u otro iniciador antisentido que contiene o no el codón de término de la traducción, que agregan además los sitios NcoI y XhoI en los extremos 5' y 3' de los amplicones, respectivamente. En todos los casos, se utilizó la enzima termoestable GoTaq (Promega) e iniciadores de PCR de la compañía IDT. Los amplicones fueron purificados con el kit MinElute Gel Extraction (Qiagen) e insertados en los sitios NcoI y XhoI del plásmido de expresión pET28a+ (Novagen) basado en la RNA polimerasa del fago T7. El análisis de colonias para cada construcción pUC57 y pET28 se realizó mediante extracción de ADN plasmídico con el kit GeneJet plasmid miniprep (Thermo) y patrón de restricción con enzimas NcoI/XhoI (Promega) en gel de agarosa al 1%/SYBR Safe (Life Technologies) en cámara de electroforesis horizontal de ácidos nucleicos Mini-Sub Cell (Biorad). La visualización se realizó en el sistema EZ de documentación de geles (Biorad). Para todas las construcciones, se emplearon células electrocompetentes de *E. coli* cepa TOP10, cubetas de electroporación de 0.1 cm gap (Biorad) y electroporador Gene Pulser II (Biorad). Las construcciones fueron finalmente movilizadas mediante electroporación a la cepa expresante BL21 Star (DE3) (Life Technologies) de *E. coli*. Las clonas bacterianas fueron colocadas en ultracongelador Nuaire a -80°C como semilla de almacenamiento a largo plazo. La manipulación de las clonas, como el plaqueo e inoculación en medio LB líquido y semisólido, así como TB líquido, se llevó a cabo en un gabinete de flujo laminar (VECO).

Las clonas expresantes BL21 Star se propagaron en agitador orbital de piso con control de temperatura (New Brunswick) en medio TB (Sigma-Aldrich). La inducción de la expresión de la TEV CP se llevó a cabo con IPTG 1mM (Promega) a 20°C por 12h. Las células fueron lisadas mediante sonicación con el instrumento Microson XL-2000 (Misonix) en solución amortiguadora Tris 20 mM, pH 8.0 y NaCl 500 mM para la recuperación de la proteína soluble total (TSP). El análisis de la expresión de las proteínas recombinantes se realizó mediante SDS-PAGE en sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (Biorad) y geles precargados 4-20% (Biorad) o al 12% y tinción con azul de Coomassie. La expresión también se analizó mediante ensayo Western blot colorimétrico con anticuerpos primarios anti-His 6 (Roche) y anti-TEV conjugado a fosfatasa alcalina (Agdia), anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (Biorad), los sustratos de peroxidasa (Biorad) y fosfatasa (Sigma-Aldrich) en membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare). Para medir los niveles de expresión relativos de las distintas versiones TEV CP se utilizó el kit de ELISA TEV DAS (Agdia) y la lectura de la placa de microtitulación se realizó en el instrumento xMark (Biorad). Cabe mencionar que la manipulación de cepas recombinantes se llevó a cabo de acuerdo al Manual de Buenas Prácticas para la Manipulación de Microorganismos Genéticamente Modificados, elaborado por el Comité de Bioseguridad del CIATEJ.

Las versiones TEV CP no etiquetadas con la secuencia de seis histidinas fueron parcialmente purificadas mediante precipitación con PEG 8000 al 3% y NaCl 500 mM. Por otra parte, la purificación de las versiones TEV CP que contienen la etiqueta de hexahistidinas se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados utilizando columnas His Trap HP de 1 ml (GE-Healthcare). En ambos casos, el proceso de purificación fue monitoreado por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Finalmente, todas las preparaciones se diafiltraron contra solución amortiguadora en dispositivos Amicon Ultra de 3kDa (Merck-Millipore). La concentración de proteína se estimó con reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich) empleando una curva de albúmina sérica bovina como referencia y utilizando el instrumento xMark (Biorad). Para determinar el tamaño y estructura de las PTVs ensambladas a partir de las diferentes versiones TEV CP, se realizó microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las soluciones proteicas (0.4 mg/ml) fueron adsorbidas en rejillas de cobre recubiertas de formvar y teñidas negativamente con una solución acuosa de acetato de uranilo al 2%. Las rejillas fueron examinadas con un microscopio JEM-100C (JEOL) a un voltaje de aceleración de 80 kV. La TEM se llevó a cabo en el Laboratorio Avanzado de Nanoscopía Electrónica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados.

La proteína quimérica PRRSV se diseñó en base a los reportes sobre los epítomos neutralizantes de algunas de las proteínas estructurales del PRRSV. De este modo, se diseñó una secuencia quimérica que contiene, del extremo amino al carboxilo terminal, las secuencias: eGP3-eGP3-eGP4-edGP5-edM (e: eptítomo, ed: ectodominio). Cada uno de estos componentes está separado por una secuencia espaciadora de cuatro alaninas. A partir de esta secuencia se generó un gen sintético (Genscript) bordeado por los sitios de restricción NcoI y XhoI que se insertó posteriormente en el plásmido de expresión pET32a+ (Novagen), generando una fusión traduccional de la secuencia quimérica a tiorredoxina y etiqueta de seis histidinas en los extremos amino y carboxilo terminal, respectivamente. Se utilizaron los mismos instrumentos y metodologías que los descritos para las PTVs hasta obtener la clona expresante con el plásmido construido. Del mismo modo, las condiciones de expresión, purificación y diafiltración de la proteína PRRSV quimérica fueron similares a las empleadas para las versiones TEV CP etiquetadas, con la excepción de que la inducción se realizó a 30°C por 4h y que se realizaron dos pasos secuenciales de purificación por

cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados. Se analizó la antigenicidad de la proteína PRRSV quimérica mediante ELISA utilizando sueros porcinos positivos a PRRSV que fueron confirmados previamente con el kit PRRS (IDEXX). Para el ensayo de antigenicidad, se sensibilizó la placa con 5 µg de proteína quimérica en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6, se adicionaron sueros a una dilución 1:100, anticuerpo anti-IgG porcina conjugado a peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich) y substrato TMB (Sigma-Aldrich). La lectura de la placa se llevó a cabo como se describe anteriormente.

Para evaluar la inmunogenicidad de la mezcla TEV CP/PRRSV quimérica, 20 ratones BALB/c hembra de seis semanas (Harlan, México) se dividieron en cuatro grupos. A los grupos se aplicó por vía subcutánea en un esquema de primoinmunización y refuerzo a los días 1 y 14 100 µl de: Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 500 mM (vehículo), 25 µg de His-TEV-CP₁₇, 10 µg de His-TEV-CP₁₇ más 10 µg de PRRSV quimérica, o 25 µg de His-TEV-CP₁₇ más 10 µg de PRRSV quimérica. Se colectaron muestras sanguíneas por la cola de los animales los días 0, 13 y 28 y se procesaron para la obtención del suero. Una vez finalizado el experimento, se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se almacenaron a -20°C hasta su disposición para incineración por prestación de servicio externo. El manejo de los animales se llevó a cabo en el Módulo de Evaluación de Vacunas del Laboratorio de Experimentación Animal del CIATEJ. Los insumos utilizados en este Módulo fueron cama Teklad Aspen Sani-Chips (Harlan) y alimento para roedor Teklad 18% Protein (Harlan). El cambio de cama, alimento y agua se hizo dos veces por semana.

La respuesta de anticuerpos específica contra la proteína quimérica (IgG, IgG1, IgG2a e IgG2b) se condujo de acuerdo a un protocolo previamente reportado (Guerrero-Rodríguez, 2014).

CONCLUSIONES

1. Todas las versiones TEV CP se expresaron de forma soluble en las clonas recombinantes de *E. coli*.
2. La mutante de una sola sustitución de Lisina por Arginina de la TEV CP se expresó y purificó en mayores niveles respecto a las otras versiones.
3. Las versiones TEV CP que contienen la etiqueta de seis histidinas en su extremo carboxilo se auto-ensamblaron en PTVs que superaron los 1000 nm en promedio. Por el contrario, las versiones no etiquetadas no generaron PTVs.
4. La etiqueta de seis histidinas jugó un papel clave en el ensamblaje de las PTVs. Se está estudiando actualmente si el ensamblaje ocurre dentro de las células o durante el proceso de purificación por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados.
5. Se seleccionó la versión TEV CP con los mejores niveles de expresión y purificación, denominada His-TEV-CP₁₇, para el experimento de inmunización. El rendimiento para esta versión fue de 10 mg/l de medio de cultivo.
6. La proteína PRRSV quimérica purificada alcanzó rendimientos de 15 mg /l de medio de cultivo.
7. La proteína PRRSV quimérica purificada fue reconocida por 36 sueros porcinos seleccionados aleatoriamente que habían sido confirmados previamente como positivos para PRRSV por una prueba comercial de ELISA.
8. El experimento de inmunización indicó que las PTVs de la TEV CP tienen actividad adyuvante y que ésta es dosis-dependiente, ya que se alcanzaron títulos de 62,500 de IgG total en los grupos inmunizados con las dos mezclas TEV CP y PRRSV quimérica y una mayor respuesta de IgG2a en el grupo inmunizado con la mezcla que contiene 25 µg de

TEV CP (título de 12,500) en comparación con la mezcla que contiene 10 µg de ésta (título de 2,500).

9. Se tiene la perspectiva de realizar un ensayo clínico en cerdos para evaluar la eficacia de la mezcla que mejores resultados generó en ratones.

Fusión genética PRSV CP y epítipo C-terminal PCV-2

Se generó en CIATEJ una fusión traduccional de la PRSV CP y un epítipo de la cápside del PCV-2 que se expresó en *E. coli* a fin de evaluar a las PTVs de la PRSV CP como acarreadoras de epítipos al sistema inmune.

Se seleccionó el epítipo PCV2b-224 (FNLKDPPLNP) para generar las distintas fusiones traduccionales como se describe a continuación. El gen quimérico denominado PRSV-PCV219-28, fue diseñado de forma que incluye el epítipo PCV-2 en un sitio de alta antigenicidad de acuerdo a un análisis realizado con la herramienta de antigenicidad (escala de Welling) del programa informático CLC Main Workbench 6.0 (CLC Bio) y fue sintetizado comercialmente (GenScript). Simultáneamente, se diseñaron dos juegos de iniciadores de PCR para generar los genes PRSV-CP que contienen el epítipo en su extremo amino o carboxilo (PRSV-PCV2-N y PRSV-PCV2-C, respectivamente), mediante reacciones secuenciales de PCR, utilizando como molde un plásmido de expresión que contiene el gen nativo de un aislado de la PRSV CP descrito previamente (Guerrero-Rodríguez, 2014). Los tres genes quiméricos fueron diseñados para incluir un sitio NcoI, un inicio de la traducción y un codón de glicina en su extremo 5' y un sitio XhoI en el 3'. Los genes quiméricos se insertaron en el plásmido de expresión pET28a+ (Novagen).

Los protocolos, reactivos e instrumentos utilizados para la construcción de plásmidos, expresión y purificación de proteína, observación de partículas, así como de inmunización, fueron similares a los descritos anteriormente. Sin embargo, se describirán los protocolos donde hubo diferencias más notables. Para la purificación de las partículas quiméricas, las muestras proteicas fueron tratadas con PEG 8000 al 4% por 1.5 h a 4°C en agitación constante y dejadas por 1 h a temperatura de cuarto. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas (4°C, 20 min, 5000rpm), y el precipitado se solubilizó toda la noche en ¼ v/v del volumen de medio de cultivo original de fosfato de sodio 10 mM, NaCl 300mM, EDTA 10 mM, pH 7.4. Luego, las muestras se centrifugaron (4°C, 20 min, 5000rpm) y los sobrenadantes enriquecidos con PTVs se filtraron a través de dispositivos Amicon Ultra-4 100 kDa MWCO (Merck-Millipore) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Referente al experimento de inmunización, 20 ratones BALB/c hembra de cuatro semanas (Harlan) se dividieron en cuatro grupos de 5 individuos. Los distintos grupos fueron inmunizados con 20µg de PRSV-PCV2-N, PRSV-PCV219-28, PRSV-PCV2-C, o PRSV CP nativa. Para medir los niveles de IgG contra el epítipo PCV-2, éste se adquirió comercialmente (Biomatik) y se usó para sensibilizar una placa de 96 pozos DNA-BIND plate (Costar) con 5 µg de péptido toda la noche a 4°C.

CONCLUSIONES

1. Las tres proteínas quiméricas PRSV CP-PCV2 se expresaron en la fracción soluble de *E. coli*. Asimismo, las tres proteínas se purificaron parcialmente mediante precipitación con PEG 8000 al 4%. Sus rendimientos oscilaron entre los 65 a 80 mg/l de medio de cultivo.
2. La posición del epítipo de PCV-2 en la PRSV CP afecta de forma importante su autoensamblaje en PTVs, ya que se generaron PTVs menores a 200, entre 150 a 500, y

menores a 100 nm, en las fusiones del epítipo en el extremo amino, en la posible región inmunogénica identificada *in silico* y en el extremo carboxilo, respectivamente.

3. La proteína quimérica PRSV CP-PCV2 que contiene el epítipo en el extremo carboxilo indujo una mayor respuesta de IgG total contra dicho epítipo en los ratones inmunizados en comparación con las otras proteínas quiméricas. No obstante, los títulos de IgG fueron de 10.

4. Las PTVs formadas por la PRSV CP acarrean el epítipo del PCV-2 de forma eficaz al sistema inmune cuando se fusiona al extremo carboxilo.

4. Se sugiere realizar un estudio clínico en cerdos para determinar la eficacia de las PTVs formadas por la PRSV CP que contiene el epítipo PCV2b-224 en su extremo carboxilo.

REFERENCIAS

- Allan, G.M., Mc Neilly, F., Meehan, B.M., Kennedy, S., Mackie, D.P., Ellis, J.A., Clark, E.G., Espuna, E., Saubi, N., Riera, P., Bötner, A., Charreyre, C.E. (1999). Isolation and characterization of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland. *Veterinary Microbiology*, 66, 115-123.
- Eggenberger, A.L., Stark, D.M., Beachy, R.N. (1989). The nucleotide sequence of a soybean mosaic virus coat protein-coding region and its expression in *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* and tobacco callus. *Journal of General Virology*, 70, 1853-60.
- Gal-On, A., Antignus, Y., Rosner, A., Raccah, B. (1990). Nucleotide sequence of the zucchini yellow mosaic virus capsid-encoding gene and its expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 87, 273-277.
- Gillespie, J., Opriessnig, T., Meng, X.J., Pelzer, K., Buechner-Maxwell, V. (2009). Porcine circovirus type 2 and porcine circovirus-associated disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23, 1151-1163.
- Guerrero-Rodríguez, J., Manuel-Cabrera, C.A., Palomino-Hermosillo, Y.A., Delgado-Guzmán, P.G., Escoto-Delgadillo, M., Silva-Rosales, L., Herrera-Rodríguez, S.E., Sánchez-Hernández, C., Gutiérrez-Ortega, A. (2014). Virus-like particles from *Escherichia coli*-derived untagged papaya ringspot virus capsid protein purified by immobilized metal affinity chromatography enhance the antibody response against a soluble antigen. *Molecular Biotechnology*, 56, 1110-1120.
- Hammond, J., Hammond, R.W. (1989). Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the bean yellow mosaic virus coat protein gene. *Journal of General Virology*, 70, 1961-1974.
- Huang, L., Lu, Y., Wei, Y., Guo, L., Liu, C. (2012). Identification of three new type-specific antigen epitopes in the capsid protein of porcine circovirus type 1. *Archives of Virology*, 157, 1339-1344.
- Jacquet, C., Delecolle, B., Raccah, B., Lecoq, H., Dunez, J., Ravelonandro, M. (1998). Use of modified plum pox virus coat protein genes developed to limit heteroencapsidation-associated risks in transgenic plants. *Journal of General Virology*, 79, 1509-1517.
- Jagadish, M.N., Edwards, S.J., Hayden, M.B., Grusovin, J., Vandenberg, K., Schoofs, P., Hamilton R.C., Shukla, D.D., Kalnins, H., McNamara, M., Haynes, J., Nisbet, I.T., Ward, C.W., Pye, D. (1996). Chimeric potyvirus-like particles as vaccine carriers. *Intervirology*, 39, 85-92.
- Jagadish, M.N., Ward, C.W., Gough, K.H., Tulloch, P.A., Whittaker, L.A., Shukla, D. D. (1991). Expression of potyvirus coat protein in *Escherichia coli* and yeast and its assembly into virus-like particles. *Journal of General Virology*, 72, 1543-1550.
- Jennings, G.T., Bachmann, M.F. (2008). The coming of age of virus-like particle vaccines. *Journal of Biological Chemistry*, 389, 521-536.
- Joseph, J., Savithri, H.S. (1999). Determination of 430 3'-terminal nucleotide sequence of pepper vein banding virus RNA and expression of its coat protein in *Escherichia coli*. *Archives of Virology*, 144, 1679-1687.
- Lekcharoensuk, P., Morozov, I., Paul, P.S., Thangthumnyom, N., Wajjawalku, W., Meng, X.J. (2004). Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *Journal of Virology*, 78, 8135-8145.
- Mahé, D., Blanchard, P., Truong, C., Arnauld, C., Le Cann, P., Cariolet, R., Madec, F., Albina, E., Jestin, A. (2000). Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *Journal of General Virology*, 81, 1815-1824.
- Nagel, J., Hiebert E. (1985). Complementary DNA cloning and expression of the papaya ringspot potyvirus sequences encoding capsid protein and a nuclear inclusion-like protein in *Escherichia coli*. *Virology*, 143, 435-441.
- Segalés, J., Domingo, M. (2002). Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review. *Veterinary Quarterly*, 24, 109-124.

- Shang, S.B., Jin, Y.L., Jiang, X.T., Zhou, J.Y., Zhang, X., Xing, G., He, J.L., Yan, Y. (2009). Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus, and antigenic phenotype of porcine circovirus type 2. *Molecular Immunology*, 46, 327-334.
- Shukla, D.D., Strike, P.M., Tracy, S.L., Gough, K.H., Ward, C.W. (1988). The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. *Journal of General Virology*, 69, 1497-1508.
- Stram, Y., Sela, I., Edelbaum, O., Tanne, E., Karchi, M., Karchi, H. (1993). Expression and assembly of the potato virus Y (PVY) coat protein (CP) in *Escherichia coli* cells. *Virus Research*, 28, 29-35.
- Tischer, I., Miels, W., Wolff, D., Vagt, M., Griem, W. (1986). Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Archives of Virology*, 91, 271-276.
- Trible, B.R., Kerrigan, M., Crossland, N., Potter, M., Faaberg, K., Hesse, R., Rowland, R.R. (2011). Antibody recognition of porcine circovirus type 2 capsid protein epitopes after vaccination, infection, and disease. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18, 749-757.
- Truong, C., Mahe, D., Blanchard, P., Le Dimna, M., Madec, F., Jestin, A., Albina, E. (2001). Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection. *Archives of Virology*, 146, 1197-1211.
- Vicente, T., Roldão, A., Peixoto, C., Carrondo, M.J.T., Alves, P.M. (2011). Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107, S42-S48.
- Voloudakis, E., Malpica, C.A., Aleman-Verdaguer, M.-E., Stark, D.M., Fauquet, C.M., Beachy, R.N. (2004). Structural characterization of Tobacco etch virus coat protein mutants. *Archives of Virology*, 149, 699-712.

Puesta en marcha de un laboratorio de experimentación microbiológica

Jorge Bravo, Erika N. Marino & Yadira Lugo

INTRODUCCIÓN

El estudio de los microorganismos, ha contribuido a un avance sustancial de la sociedad en muchos aspectos: desde incrementar el promedio de vida de la población al desarrollar tratamientos específicos contra agentes infecciosos; generar diversas clases de antibióticos y productos biotecnológicos; mejorar las condiciones sanitarias de preparación de alimentos; aprovechar la capacidad de remediación de consorcios microbianos en diversos ambientes contaminados, así como su uso en la ingeniería genética como herramientas para mantener, propagar o modificar el material genético, entre muchas otras contribuciones. Para lograr estos avances ha sido necesario contar con laboratorios adecuados para el manejo de los microorganismos.

En el siglo XIX aparecieron los primeros laboratorios de microbiología, los cuales se enfocaron al diagnóstico de las enfermedades infecciosas, en ellos surgieron las primeras técnicas de cultivo, así como técnicas para observar las bacterias mediante tinciones y también métodos para diferenciar e identificar a los posibles patógenos. El continuo avance en el descubrimiento de la etiología de muchas de las enfermedades infecciosas, generó un crecimiento en el número de laboratorios microbiológicos, así mismo propició el surgimiento de carreras profesionales enfocadas a preparar especialistas en el manejo, aislamiento e identificación de microorganismos a partir de muestras clínicas, a quienes en general se les denominó microbiólogos.

Tal como lo hemos mencionado, la microbiología actualmente está involucrada en muchas más áreas, debido a que prácticamente todo nuestro planeta alberga diversas clases de microorganismos, que cumplen funciones importantes en la naturaleza, lo cual ha originado la especialización de laboratorios donde se estudien diferentes enfoques de la microbiología. De tal manera que ahora podemos encontrar laboratorios de microbiología: clínica, sanitaria, ambiental, agrícola, veterinaria, o aquellos involucrados en la investigación de relaciones entre microorganismos, generación de organismos genéticamente modificados o para el aislamiento de microorganismos de interés biotecnológico o industrial.

La infraestructura requerida para cada tipo de laboratorio varía, debido al tipo particular de métodos y técnicas que se realizan; sin embargo, en general la mayoría de los laboratorios realizan las siguientes funciones: cultivo, identificación, detección mediante técnicas microscópicas, moleculares o inmunológicas, detección de metabolitos característicos de ciertos microorganismos, así como detección de anticuerpos en sueros de individuos infectados con algún patógeno. Así mismo todo laboratorio, independientemente de su área de estudio, debe considerar establecer sus políticas de comunicación con sus clientes, los procedimientos de obtención, identificación, transporte, manejo y preservación de muestras, los criterios para determinar si una muestra es representativa para un determinado análisis y los criterios para determinar si la muestra fue tomada adecuadamente o fue contaminada durante alguna etapa. También todo laboratorio debe contar con un sistema que le permita rastrear muestras, resultados, procesos y diagramas a fin de clarificar todas las etapas del proceso para cada una de las pruebas así como emitir los resultados.

Todas las funciones mencionadas arriba, deben monitorearse y verificarse mediante un sistema de calidad, donde se asegure la veracidad de los resultados utilizando patrones de referencia, a través de un programa de control de calidad interno. Finalmente es indispensable además participar en programas externos de la calidad, donde se analicen muestras previamente verificadas y se constate el desempeño del laboratorio para alcanzar los resultados esperados.

El éxito en sistematizar los procesos, el seguir normas de calidad y lograr un buen desempeño en las evaluaciones externas de la calidad, pueden permitir a los laboratorios alcanzar tanto certificados como acreditaciones que les darán la oportunidad de crecer con mayor solidez; ya que esta clase de laboratorios suelen ser considerados competentes en las pruebas acreditadas, lo que significa que sus resultados tienen validez ante diversas instituciones ya sea internacionales o nacionales.

Objeto y tipos de laboratorios de microbiología

Cada laboratorio microbiológico debe tener un objetivo claro, mismo que debe ser entendido por todo el personal que en él labore, usualmente el objetivo suele estar implícito en la misión declarada por la organización. Esta debe tener la claridad necesaria para poder conocer el tipo de infraestructura y el personal que requerirá el laboratorio para un adecuado funcionamiento. Aunque existen una gran variedad de laboratorios microbiológicos, a continuación mencionaremos los principales objetivos de los más comunes:

Enfocados a análisis clínicos

El objetivo principal de este tipo de laboratorios es confirmar o descartar un diagnóstico de infección en un paciente, así como determinar patrones de susceptibilidad del agente infeccioso. Para tal propósito se analizan muestras biológicas humanas tales como exudados, materia fecal, orina, sangre y otros fluidos. Dichos laboratorios deben contar con métodos para aislar microorganismos, identificarlos o detectarlos y determinar su patrón de susceptibilidad frente a ciertos antibióticos candidatos a utilizarse como tratamiento. Usualmente las muestras que llegan a estos laboratorios suelen tomarse en el mismo laboratorio, directamente de los pacientes ya sea ambulatorios u hospitalizados, o bien provienen de otras subunidades encargadas de la toma de muestras. Los laboratorios microbiológicos que realicen estudios clínicos deben además registrarse ante la secretaria de salud mediante el aviso de funcionamiento y aviso del responsable sanitario, así como cumplir la normatividad aplicable de acuerdo a la NOM 007 SSA3-2011.

Enfocados a inocuidad alimentaria

La rápida globalización de la producción y comercialización de los alimentos ha aumentado la probabilidad de que se produzcan rechazos internacionales relacionados con alimentos contaminados. Esto es cierto en particular para los sistemas de producción agropecuaria y las cadenas productivas asociadas, donde la demanda de alimentos seguros es cada día más grande, por lo tanto las acciones en inocuidad alimentaria juegan un papel clave para facilitar cambios positivos. La inocuidad alimentaria es la garantía de que los alimentos no causarán daño al consumidor, cuando se preparen y/o consuman de acuerdo con el uso a que se destinan. Un alimento se considera contaminado cuando contiene agentes vivos (virus o parásitos riesgosos para la salud), sustancias químicas tóxicas u orgánicas extrañas a su composición normal o componentes naturales tóxicos en concentración mayor a las permitidas. Muchas veces la causa de la contaminación del alimento se debe a las medidas higiénicas inadecuadas en la producción, preparación y conservación; lo que facilita la presencia y el desarrollo de microorganismos que debido a su actividad o al uso de las sustancias nutritivas presentes en éste lo transforman de manera inaceptable para

la salud humana. Por todo esto, el principal objetivo de este tipo de laboratorios van enfocados a caracterizar el tipo de microorganismo o toxinas que están contaminando a los alimentos que puedan ser un riesgo para la salud o que estén alterando la composición normal de los alimentos de acuerdo a los estándares de calidad permitidos en las normativas establecidas de cada país. Los laboratorios de microbiología con enfoque a inocuidad alimentaria permiten la implementación, optimización y validación de metodología según requerimientos o necesidades de los usuarios, basándose en metodología oficiales o de referencia, respaldados por resultados de investigaciones internacionales reconocidas. Los principales usuarios de estos laboratorios son los productores del sector agroalimentario que va desde la producción primaria hasta la producción del alimento preparado, transportistas, distribuidores, organismos de control y consumidores, estos alimentos pueden ser para consumo nacional y/o de exportación.

Las principales actividades que realiza un laboratorio de inocuidad microbiológica son las siguientes:

- a. Análisis microbiológicos de aguas y alimentos.
- b. Vigilancia epidemiológica.
- c. Asesorías y capacitación en la implementación de sistemas de calidad enfocados a puntos críticos de contaminación en la producción de alimentos.
- d. Investigación principalmente para identificar los agentes contaminantes y las fuentes de contaminación, valorar en términos reales el impacto sobre la salud del consumidor e incluso buscar nuevas alternativas para eliminar la contaminación microbiológica de los alimentos.

De esta manera se contribuye a respaldar la calidad de los productos y procesos finales mejorando el enfoque hacia el mercado consumidor.

Enfocados a la sanidad ambiental

Esta clase de laboratorios entre otros objetivos, busca aprovechar la variada capacidad metabólica de una comunidad de microorganismos para disminuir o eliminar el impacto de un residuo contaminante. Debido a que actualmente no es posible lograr el aislamiento in vitro, de la mayoría de los microorganismos procedentes de fuentes ambientales, no ha sido posible el lograr mantener en forma pura cepas con diversas capacidades metabólicas, sin embargo se han podido mantener y estabilizar comunidades de bacterias que en conjunto logran degradar compuestos contaminantes, dichos comunidades, se le denomina consorcios, y estos laboratorios enfocan sus esfuerzos en lograr aislarlos y estabilizarlos en diversos sustratos.

Enfocados a investigación

Sería muy difícil establecer el alcance de un laboratorio de microbiología enfocado a la investigación, sin embargo todos ellos enfocan sus esfuerzos en generar conocimiento que pueda ser utilizado posteriormente para algún propósito útil para la sociedad, en dichos laboratorios es fundamental seguir el método científico y se debe considerar siempre el uso de material de referencia, tales como cepas tipificadas, antisueros, anticuerpos, que permitan verificar cada etapa de los experimentos, aunque el tipo de muestras varía enormemente, en general los productos del resultado de la investigación en estos laboratorios suelen ser publicaciones, mismas que deben reflejar que el conocimiento generado es relevante y está suficientemente respaldado con los controles y ensayos pertinentes.

Enfocados al control de procesos

Las empresas de manufactura de fármacos y dispositivos médicos, deben tener laboratorios de microbiología, en donde se evalúe internamente cada lote de producto elaborado, así como el monitoreo continuo y validación de áreas de producción y envasado, todos estos laboratorios deben realizar métodos con trazabilidad documentada y demostrable, ya que estas empresas frecuentemente son auditadas por organismos nacionales encargados de evaluar riesgos. En nuestro país la Comisión Federal de Protección frente a Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) se encarga de la vigilancia y búsqueda de posibles riesgos mediante el análisis de medicamentos, visita a instalaciones y verificación del control de calidad en los productos manufacturados. El tipo de estudios microbiológicos se enfoca a determinar la presencia de organismos mesofílicos y hongos ya sea en aire, superficie o en los productos, utensilios o instalaciones como indicadores de contaminación.

Infraestructura básica de un laboratorio de microbiología

Antes de poder definir la infraestructura básica de un laboratorio de microbiología, es necesario considerar el tamaño del laboratorio, si es un laboratorio central, donde llegan muestras colectadas de pequeñas estaciones, si es considerado un laboratorio de referencia o maquila que concentra muestras de otros laboratorios, si pertenece a gobierno o si es privado, si está dentro de una clínica u hospital, o si es un laboratorio móvil. La complejidad de la infraestructura estará directamente relacionada con el tamaño y cantidad de pruebas que se realicen. En este sentido esperamos una menor infraestructura en estaciones o laboratorios donde únicamente se tomen muestras o se procesen pruebas rápidas. Lo que dará la pauta para determinar la infraestructura necesaria, será en todo caso el alcanzar el objetivo de asegurar la calidad en todo el proceso.

Aun a pesar de la enorme heterogeneidad, en los tipos de laboratorios microbiológicos, así como su tamaño y funciones especiales, existen elementos que deben ser considerados desde el diseño del mismo, ya que de no considerarlo, podría afectar el flujo del trabajo, impidiendo lograr una buena eficiencia. A continuación describiremos algunos elementos que se recomienda considerar durante el diseño.

Diseño estructural

Las dimensiones requeridas en metros cuadrados deben permitir un trabajo ágil y seguro; para determinar el área necesaria es importante considerar:

- 1.-Número de personas que se requiere que laboren.
- 2.-Funciones que realizará el laboratorio (toma de muestra, análisis, recepción de pacientes o clientes etc.
- 3.-Equipamiento necesario para realizar todas las funciones.
- 4.-Tipos de servicios requeridos para el buen funcionamiento de los equipos.
- 5.-Equipo de seguridad para el personal e instalaciones para emergencias.
- 6.-Instalaciones de confinamiento de residuos peligrosos biológico infecciosos.
- 7.-Instalaciones para la contención de aerosoles potencialmente peligrosos.

Aunque arquitectos e ingenieros sean los responsables de diseñar y construir el laboratorio, se requiere una activa participación del microbiólogo, ya que se debe considerar que los diseños propuestos, sean funcionales y permitan la ejecución eficiente y segura del trabajo, en cuanto a las dimensiones la normatividad Mexicana especifica que el índice mínimo de espacio por trabajador no deberá ser menor a 2 metros cuadrados.

En general se deberían considerar las siguientes áreas en un laboratorio de microbiología:

1.-Área de recepción de muestras: Es importante destinar un espacio donde se puedan colocar las muestras que recibe el laboratorio, considerando que los sitios donde se coloquen estas, tengan las características adecuadas para evitar el deterioro o la destrucción de los microorganismos que se pretenden buscar. Durante la recepción de las muestras es necesario confirmar la adecuada obtención de la muestra, así como identificarla adecuadamente y realizar el registro de la misma a fin de que sea integrada al sistema de control interno de muestras. En el caso de laboratorios clínicos es importante considerar espacios privados para la obtención de muestras sanguíneas, o de mucosas faríngeas, vaginales o uretrales.

2.-Área de procesamiento de muestras: Una vez ingresada e identificada la muestra, es necesario mantenerla en las condiciones que aseguren que se logrará realizar el aislamiento o detección del grupo de microorganismos buscados, para esto se requiere una área, no necesariamente un cuarto separado, en la cual se organicen la muestras, se les adicionen suplementos, sustancias preservadoras o estabilizadoras de las comunidades a estudiar, el objetivo fundamental de esta área es propiciar las condiciones adecuadas para facilitar el análisis y evitar alteraciones significativas que impidan una ejecución exitosa y válida del análisis. En esta área puede haber refrigeradores, congeladores, centrifugas y cabinas de bioseguridad.

3.-Área de microscopía: El microscopio es una herramienta fundamental para el microbiólogo, en él se puede conocer el tipo de microorganismos que se espera recuperar de una muestra, esto es fundamental en el caso de las muestras clínicas, ya que la observación de la muestra, puede orientar al médico en la selección de una terapia antimicrobiana contra gram positivos o gram negativos. En el caso del estudio de consorcios o muestras ambientales, la microscopía es una alternativa accesible para evaluar la diversidad microbiana de una muestra, ya que la mayoría de estos no suelen crecer en medios de cultivo sintéticos.

El área de microscopía debe mantenerse aislada de la humedad, algunos laboratorios destinan un cuarto especial aislado de la luz externa, estas áreas son llamados cuartos oscuros y son especialmente útiles en el caso de observaciones en microscopios de fluorescencia o campo oscuro.

4.-Área de preparación de medios: Por lo general debe ser un cuarto, libre del flujo de aire externo, también pueden ser áreas con cabinas de flujo laminar, estas áreas están destinadas tanto a la preparación de soluciones como de medios de cultivo, estos últimos deben esterilizarse y colocarse en placas Petri estériles, asegurando en todo momento la esterilidad, ya que es fundamental para lograr el aislamiento de los microorganismos de interés. Algunas de estas áreas no cuentan con cabinas de flujo laminar, esto no es un impedimento, siempre y cuando se cuente con un suministro de gas así como mecheros Fisher que proporcionen una área aséptica para el vaciado de medios.

5.-Área de lavado de material y de esterilización por autoclave: Dentro de una laboratorio de microbiología es necesario contar con una área donde puedan inactivarse los desechos biológicos así como lavar los recipientes y utensilios una vez esterilizados, dicha área debe estar acondicionada para poder resistir la humedad generada por el autoclave, de igual manera se recomienda una tarja doble suficientemente grande para el lavado adecuado de los materiales. El correcto lavado de material es fundamental para

lograr ejecutar un protocolo, los restos de detergente suelen afectar el crecimiento de diversos microorganismos, por lo tanto es necesario que en dicha áreas se coloquen gráficos que ilustren los procesos de lavado así como las sustancias adecuadas para el lavado del material.

6.-Área especial de contención de agentes potencialmente infecciosos: En aquellos laboratorios que trabajan con agentes infecciosos de nivel de bioseguridad igual o mayor a 2, es indispensable contar con áreas seguras que eviten la dispersión de patógenos, para el caso de agentes patógenos nivel 2, se requieren áreas de trabajo con cabinas de bioseguridad, en el caso de laboratorios que trabajen con patógenos nivel 3 se debe incrementar la instalación e incorporar sistemas de flujo de aire filtrado que remuevan continuamente el aire del laboratorio además de contar con varias esclusas de acceso a laboratorio, las superficies deben tratarse con pintura epóxica, que permita lavarse y/o desinfectarse. El equipamiento debe asegurar la retención dispersión de los patógenos durante todo el tiempo en que sean manejados.

7.-Area de pruebas de biología molecular: La tendencia actual es que todas las pruebas microbiológicas puedan ser sustituidas por métodos moleculares, que además de ser más baratos son mucho más rápidos, por tal motivo estas áreas cada vez son más frecuentes en el laboratorio de microbiología y han complementado muy bien en los procesos de diagnóstico, identificación microbiana y caracterización de variantes microbianas, en especial es una área fundamental de los laboratorios enfocados a la investigación sobre todo en aquellos que desarrollan métodos diagnósticos o dedicados a la epidemiología molecular. Las instalaciones en estas áreas deben proveer una temperatura de 18 a 22°C, para evitar el sobrecalentamiento del equipamiento, también suelen incluir cabinas o estaciones de trabajo destinadas a la extracción y purificación de ácidos nucleicos.

8.-Área para el confinamiento temporal de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI): Los laboratorios microbiológicos frecuentemente generan grandes cantidades de RPBI, los cuales deben ser manejados de modo que disminuyan el riesgo de infección o dispersión de agentes hacia personas o al ambiente, usualmente estos residuos son incinerados por medio de empresas autorizadas, cuyo negocio es el transporte y tratamiento de acuerdo con la norma NOM-087-SEMARNAT- SSA1-2002, ésta también especifica la necesidad de establecer en el laboratorio una zona donde se debe ubicar un contenedor de estos residuos, la cual debe estar protegida del acceso de posible fauna nociva, así mismo debe de estar bien identificada y ubicada en una región de poco tránsito de personas ajenas al laboratorio.

9.-Area de Refrigeradores, congeladores y ultracongeladores: Siempre que sea posible es recomendable destinar un espacio donde se coloquen refrigeradores y congeladores, los cuales serán necesarios para el almacenamiento de reactivos diagnósticos, muestra en proceso de análisis, cepas aisladas, material de uso recurrente etc. Debido a que estos equipos producen mucho calor, es conveniente considerar la instalación de sistemas de control de temperatura.

10.-Almacén de reactivos y material de laboratorio: Se debe destinar áreas para el almacenamiento de materiales para el laboratorio, en las cuales se deberá ordenar el material de acuerdo a la compatibilidad, es decir no se deben almacenar juntos ácidos fuertes con bases fuertes, o bien oxidantes y sustancias alcalina, por tanto se deberá atender lo previsto en la NOM-005-STPS-1998.

11.-Áreas de oficinas, recepción de pacientes, archivo, biblioteca: Un laboratorio también debe tener espacios para personal de apoyo no dedicado al procesamiento de muestras, dicho personal está involucrado en el trato con los clientes o pacientes, por lo que requerirá de áreas seguras libres del riesgo de contacto con material peligroso, así mismo la normatividad nacional indica la necesidad de contar con un archivo con los resultados de los estudios, mismos que deben ser mantenidos al menos durante 5 años, para cualquier aclaración posterior a la emisión de los resultados, este archivo debe estar en una zona protegida de la humedad y de posibles riesgos de incendio, también es conveniente el uso de sistemas de archivo electrónico, sin embargo ante un requerimiento de la autoridad, es necesario demostrar que se puede contar en cualquier momento con los archivos de resultados o pruebas ejecutadas, estas últimas incluso requieren demostrar que se realizaron, mediante los registros a mano en bitácoras. Por otra parte, es conveniente destinar un espacio para colocar libros y/o carpetas de procedimientos, manuales de calidad, auditorías, los cuales deben de estar disponibles tanto para el personal de administración como el directamente relacionado con la ejecución de las pruebas analíticas, por lo que estas áreas suelen estar fuera de las áreas de análisis pero cercanas hacia alguno de los accesos.

12.-Áreas de almacenamiento de alimentos, comedor o cafetería: La normatividad claramente prohíbe el almacenamiento de alimentos en los refrigeradores del laboratorio, así como el comer o fumar dentro de estas áreas, por tal motivo es necesario considerar espacios para estos fines fuera del laboratorio, dicha áreas son necesarias para los empleados, pero no deben en ningún momento representar algún riesgo, por tanto debe especificarse en los reglamentos, la manera de acceder a estos espacios, sobre todo cuando el personal ha estado previamente trabajando en el laboratorio. En estas áreas debe haber un refrigerador destinado al almacenamiento temporal de alimentos, es conveniente también tener alguna cocineta u horno de microondas para calentar los alimentos.

13.-Sanitarios: Los sanitarios deben estar disponible tanto dentro del laboratorio como en áreas externas mismo. Fuera del laboratorio los sanitarios podrán ser usados por el personal administrativo, en cambio los sanitarios del interior de laboratorios deberán ser para el personal que ahí está trabajando, sin embargo debe haber reglas para el uso seguro de estas áreas, el personal debe ir sin bata de laboratorio o guantes, con las manos aseadas y desinfectadas de posibles contaminantes, así mismo deber haber señalización clara que especifique la necesidad de lavarse las manos después de haber usado los sanitarios además de la prohibición de fumar o comer en dichas áreas. Por otra parte, en el caso de laboratorios clínicos es importante considerar sanitarios exclusivos para los pacientes, y en los cuales se prevean las dimensiones adecuadas para permitir a los pacientes coleccionar personalmente muestras fecales o de orina.

Equipamiento

Además de un adecuado diseño de áreas, que muestren funcionalidad y una secuencia lógica desde la recepción de las muestras hasta la emisión de resultados, resulta clara la necesidad de contar con los instrumentos y equipos adecuados para el procesamiento y análisis de muestras. Debido a la gran diversidad de laboratorios, no se puede generar una lista del equipo necesario, ya que algunos de ellos se especializan en pruebas que otros laboratorios no realizan. Sin embargo mencionaremos algunos de los principales.

1.-Cabinas de flujo laminar: Estas son necesarias para asegurar áreas asépticas para la preparación de medios de cultivo y soluciones estériles.

2.-Cabinas de bioseguridad: Son similares a las cabinas flujo laminar, sin embargo se diferencian en que en estas se impide tanto la salida como la entrada de aire del interior y del exterior respectivamente, dicho equipo está diseñado para el trabajo con agentes potencialmente peligrosos, clasificados como nivel 2 o 3 de bioseguridad. Actualmente de acuerdo con la NOM 007 SSA3-2011 es obligatorio contar con este equipo en el caso de laboratorios de microbiología.

3.-Incubadoras de 37°C, 28°C, u otras temperaturas: Las incubadoras son instrumentos que no suelen faltar en prácticamente ningún laboratorio de microbiología, ya que se requieren para el crecimiento y aislamiento de microorganismos, por lo general se requiere una para cada temperatura que se considere, usualmente los patógenos clínicos y los mesófilos crecen a 37°C en tanto que los hongos y levaduras suelen crecer a 28°C, así mismo hay organismo termófilos que requieren temperaturas de crecimiento de más de 50°C; en general para los laboratorios de microbiología se deben adquirir incubadoras con capacidad para proporcionar temperaturas de 20 a 65°C.

4.-Balanzas analíticas y de precisión: Son básicas en cualquier laboratorio, y se requieren para el pesado, en la preparación de soluciones y medios de cultivo respectivamente.

5.-Potenciometros y conductímetros: La preparación de reguladores y medios de cultivo requieren la verificación del pH, estos equipos permiten verificar este parámetro de calidad, por otra parte el conductímetro permite determinar la calidad del agua desionizada en función al contenido de sales, misma que debe mostrar una resistividad de al menos 18MΩ.

6.-Autoclave: Requerida para la esterilización por calor húmedo de medios, material, así como la inactivación de material biológico infeccioso.

7.-Horno de esterilización por calor seco: Requerido para la despirogenización de cristalería que se usa para preparación de medios diseñados para el aislamiento de microorganismos de difícil crecimiento.

8.-Espectrofotómetros, biofotómetros y lectores de microplacas: Instrumentos necesarios para ajustar inóculos a determinadas densidades ópticas, así como para cuantificar metabolitos detectados en microorganismos, o para detectar la capacidad de modificar diversos sustratos mediante el cambio en la absorbancia de sustancias indicadoras. Algunos de estos equipos están acoplados a computadoras y mediante un software pueden realizar el análisis de los resultados de crecimiento y/o actividad sobre determinados sustratos, con el fin de identificar una especie bacteriana o determinar su patrón de susceptibilidad hacia antibióticos.

9.-Cuenta colonias: Equipo útil en la cuantificación de colonias bacterianas, sobretodo en laboratorios enfocados a la inocuidad alimentaria, existen versiones manuales y semiautomáticas de estos equipos.

10.-Homogeneizadores de muestras alimenticias: Estos equipos logran homogeneizar una muestra de alimento, para poder tomar una muestra representativa del mismo, usualmente la muestra se coloca en una bolsa que al colocarse en el equipo esta es

comprimida varias veces, al término de lo cual se obtiene una muestra homogénea cuantitativamente diluida en alguna solución.

11.-Termociclador: Equipo que permite la identificación molecular de especies microbianas por medio de la amplificación de alguna región específica de sus ácidos nucleicos. Esto se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), existen diversas configuraciones algunos son en tiempo real, por lo que se puede determinar durante el corrimiento, el incremento de la amplificación de DNA de una región determinada. También hay termocicladores de punto final, los cuales requieren de un proceso posterior de verificación de la amplificación de la región de interés mediante electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.

12.-Vortex y agitadores: Equipos muy útiles para la homogeneización de soluciones y suspensiones, algunos están acoplados a parrillas de calentamiento, que permiten fundir medios de cultivo.

13.-Bombas peristálticas: Cuando se requiere de la preparación de grandes cantidades de tubos con medios de cultivo, las bombas peristálticas ofrecen una solución en el llenado ágil de este tipo de recipientes, usualmente se puede configurar la velocidad y volumen de dispensado y pueden trabajar con medios y soluciones calientes, por lo que permite el ahorro considerable de tiempo.

14.-Microscopios: Los microscopios son instrumentos indispensables en todo laboratorio de microbiología, son muy variados en complejidad, sin embargo, al menos es necesario contar con alguno de campo claro, de preferencia con contraste de fases, para observar muestras en fresco así como preparaciones teñidas. Por otra parte, cuando se implementan técnicas que requieren el uso de fluorocromos, se requiere el uso de microscopios de fluorescencia, dotados con al menos dos filtros: el azul y el verde para la observación de fluorescencia verde y roja respectivamente. En el caso de laboratorios enfocados al diagnóstico de *Leptospira* spp y otras espiroquetas, es muy recomendable contar con un microscopio de campo oscuro ya que el pequeño diámetro de dichas bacterias impide su clara observación en otros tipos de microscopios.

15.-Baños de recirculación y equipos con bloques de incubación: Frecuentemente es necesario mantener muestras, medios o reactivos a determinadas temperaturas, por tal motivo es importante contar con equipos que puedan suministrar condiciones de incubación en temperaturas altas, para varios métodos microbiológicos se requiere contabilizar bacterias incluidas en medios de cultivo, en este caso los medios de cultivo debe mantenerse fundidos pero a temperaturas mayores a los 45°C y estos instrumentos suelen ser una buena opción para colocar recipientes con dichos medios, una vez colocados las muestras o diluciones bacterianas, se puede agregar el medio fundido, sin el riesgo de afectar la viabilidad de los microorganismos.

En el caso de los laboratorios de análisis de muestras clínicas, cada vez hay más opciones en el mercado de equipos semiautomáticos cuyos costos suelen ser elevados, pero en laboratorios que reciben muchas muestras, suelen ser muy rentables, también hay modalidades o convenios entre las empresas y el laboratorio en el cual se presta el equipo, a condición de la compra mínima de un determinado número de reactivos mensuales. Definitivamente la decisión de adquirir un equipo costoso deberá ser balanceada en función al costo-beneficio este análisis se puede lograr con datos estadísticos del número mensual de muestras, para las cuales se utilizaría el equipo, así como los costos de inversión,

servicios de verificación y los ingresos percibidos en la contratación de las pruebas microbiológicas.

Al igual que cualquier laboratorio es necesario que se cuente con un programa de mantenimiento preventivo del equipo, esto en particular es obligatorio en nuestro país para laboratorios que procesen muestras clínicas, así mismo en el caso de laboratorios acreditados es obligatorio no solo tener el programa de mantenimiento preventivo, sino también un programa de calibraciones y verificaciones del funcionamiento de los equipos con trazabilidad a patrones nacionales.

Servicios

Los servicios con los que debe contar un laboratorio también pueden variar en función al tamaño complejidad y funciones, sin embargo en todos ellos se requieren considerar los siguientes servicios:

1.-Agua potable: Un suministro de agua potable municipal, la instalación debe proporcionar tanto agua caliente como fría, Se recomienda que la ubicación de las tarjas se coloque al final de las mesetas, así mismo, la tubería debe estar pintada de color verde para diferenciarla del drenaje (negro) o del gas (amarilla).

2.-Agua desmineralizada: En laboratorios grandes se aconseja la instalación de sistemas desmineralizantes del agua, con los que se logran ahorros de costo importante, sin embargo antes de invertir en un sistema de esta naturaleza es importante conocer el grado de dureza del agua, ya que en el caso de aguas con altas cantidades de sales, la eficiencia de los cartuchos desmineralizadores, podría no ser la esperada, en estos casos quizá se debe considerar la adquisición de esta agua a través de proveedores que garanticen su calidad.

3.-Energía eléctrica: La instalación eléctrica debe suministrar conexiones para las mesetas de trabajo, usualmente deberían distribuirse cada 1.5 metros, es necesario considerar instalaciones apropiadas para el suministro de 110 y 220 volts, esto debido a que varios equipos requieren este último voltaje. Durante el diseño se deben estimar las cargas que se esperan alcanzar con todos los equipos y se debe considerar que la instalación eléctrica permita soportar la adición de aproximadamente un 20%-40% de carga adicional. No es recomendable que las instalaciones queden sobradas en exceso, debido a podrían dañarse los equipos al regresar la energía eléctrica después de algún apagón, ya que entre mayor capacidad de carga tenga una instalación mayor será el pico de corriente que llegue a las conexiones. En este sentido es indispensable considerar que todo el equipo deber estar conectado a reguladores de corriente y algunos de los equipos que requieran estar continuamente encendidos deberán contar un nobreak con suficiente carga para soportar la suspensión momentánea de la energía eléctrica.

4.-Instalación de gas natural o butano: Aunque en muchos laboratorios de microbiología se ha logrado sustituir con éxito el uso de mecheros de gas por cabinas de flujo laminar, es conveniente contar con este suministro ya que en caso de una falla eléctrica o del equipo, se puede continuar el trabajo empleando mecheros de gas para asegurar trabajar en condiciones asépticas, así mismo resultan de mucha utilidad para fundir medios o disolver soluciones en caso de fallas en la parrilla de calentamiento. La normatividad Mexicana especifica la necesidad de identificar toda la tubería de gas en color amarillo (NOM-028-STPS-1994).

5.-Servicios de recolección de RPBI: La normatividad aplicable a nuestro país, especifica que todas las entidades generadoras de RPBI, deben seguir ciertas directrices para el manejo y confinamiento temporal de estos residuos, además de que deben establecer un contrato con una empresa autorizada para la recolección y disposición final de estos residuos, la frecuencia de recolección varía en función a la cantidad mensual de RPBI producidos sin embargo en cualquier caso la frecuencia debe ser al menos una vez al mes. Es importante considerar usar bolsas y contenedores con los calibres especificados en la NOM 087 SEMARNAT-SSA1-2002, además de asegurar cerrarlos perfectamente para evitar la entrada de moscas u otra fauna nociva que pudiera dispersar los RPBI fuera de sus contenedores.

6.-Superficies de paredes, pisos y techos: La superficie de estos deberá ser lisa, preferentemente pintada con pintura epóxica, para que puedan ser lavadas y sanitizadas, los pisos deben tener una curva sanitaria que impida la acumulación de polvo en el ángulo formado entre el piso y la pared. En el caso de laboratorios de bioseguridad nivel 3 es obligatorio que las paredes tengan un recubrimiento sellador así como un recubrimiento epóxico que pueda ser sanitizado.

7.-Mobiliario: El mobiliario de laboratorio debe ser resistente al derrame de sustancias corrosivas como ácidos o bases, el acero inoxidable es una buena opción aunque también existen resinas plásticas altamente resistentes a estas sustancias. Es conveniente también considerar que suelen ser más útiles a largo plazo aquellas mesas o mobiliario que puede reorganizarse en vez del que está fijo a pisos o paredes. Para el laboratorio microbiológico es indispensable que en el mobiliario se cuente con una gaveta donde se puede almacenar material estéril.

Capital humano del laboratorio

El capital humano es sin dudar el activo más valioso de las instituciones y empresas, en especial en el área microbiológica, es indispensable que la responsabilidad esté a cargo de microbiólogos experimentados en las áreas en las que se enfoque el laboratorio. Además debe haber personal técnico con la competencia técnica en la ejecución de las pruebas que se realicen en el laboratorio, es conveniente también la contratación de auxiliares que preferentemente estén en proceso de preparación técnica en estas disciplinas. Es muy importante que durante la selección de candidatos, se consideren aquellos con intenciones de seguirse preparando, ya que un problema muy frecuente que ocurre en laboratorios de gobierno es la falta de interés por la continua capacitación lo cual ocasiona que el personal únicamente atienda la parte del trabajo que le corresponde olvidando la importancia de la superación personal y más aún que es parte de un equipo. Este conformismo podría impedir el dinamismo, así como la capacidad de enfrentar nuevos retos necesarios para el continuo crecimiento del laboratorio. A continuación indicaremos algunos de los principales roles y responsabilidades que debe ejecutar el personal de un laboratorio de microbiología.

Responsables del laboratorio de microbiología: Los responsables del área de microbiología deberán ser microbiólogos, aunque en nuestro país como tal no está la carrera de Microbiólogo, si hay carreras donde se adquieren los conocimientos y competencias técnicas que requiere el microbiólogo, sin embargo una deficiencia en estas carreras es la poca experiencia con la que salen los egresados, por tanto es necesario que el candidato a responsable del laboratorio pueda demostrar experiencia en dicha área. En el caso de los laboratorios clínicos, la normatividad mexicana a través de la NOM 007 SSA3-2011, especifica que un responsable sanitario podrá ser un químico con 3 años de experiencia demostrable, o grado de especialidad, maestría o doctorado en alguna área de

laboratorio clínico, también puede ser un médico con especialidad en patología clínica, para ambas profesiones los títulos deberán ser expedidos por instituciones con reconocimiento por parte de la Secretaría de Educación Pública.

Aunque estas especificaciones son aplicables al responsable sanitario de un laboratorio especializado en análisis clínicos, es conveniente extrapolar estos requerimientos hacia el responsable de microbiología, ya que el responsable deberá frecuentemente tomar decisiones con base en la experiencia para atender problemas o situaciones no previstas en los manuales de procedimientos.

El responsable debe asegurar que todo el personal a su cargo realice las actividades de acuerdo a los procedimientos, que realicen el control de calidad en sus procesos y debe revisar y firmar cada resultado emitido, también debe asegurarse de que se lleven a cabo las buenas prácticas en el laboratorio y procedimientos de seguridad para evitar riesgos de trabajo, así como cumplir las demás funciones especificadas en la NOM 007 SSA3-2011.

Técnicos: La figura de los técnicos laboratoristas se ha presentado debido a la preparación técnica de estudiantes a nivel medio superior, cuyas prácticas y conocimientos les permite realizar técnicas y procedimientos microbiológicos con éxito, este personal es importante debido a que muchos de los estudios microbiológicos consisten en una secuencia de pasos que tienden a sistematizarse, por ejemplo la preparación de medios de cultivo, toma de muestras biológicas o la ejecución de cualquier prueba microbiológica, aunque no se espera que el técnico lleve la responsabilidad de tomar decisiones, si se debe esperar que sea capaz de detectar errores o resultados inválidos debido a fallas en la ejecución de las pruebas. Para la contratación de este tipo de personal es indispensable que el candidato presente la documentación que le acredite como técnico laboratorista expedida por una institución con reconocimiento por parte de la Secretaría de Educación Pública.

Auxiliares: Los auxiliares usualmente son personas con estudios incompletos a nivel bachillerato o que aún lo están cursando, en la selección de candidatos a auxiliares se debería privilegiar a quienes están en formación ya que durante su trabajo en el laboratorio se espera que adquieran experiencia que le permita comprender de una mejor manera los temas teóricos que llevan en sus cursos. Las funciones que se espera lleve a cabo los auxiliares son aquella de apoyo a los técnicos laboratoristas, tales como preparación de material, soluciones, toma de muestras, esterilización de material, limpieza de material entre otras.

Programa de capacitación continúa

Otro de los puntos clave del personal es la capacitación continua, lo cual debe de ser una actividad permanente para todas las categorías del personal y se tendrá en cuenta las necesidades a corto y largo plazo. La capacitación se organizará de acuerdo a los objetivos planteados por el laboratorio. Los objetivos globales de la capacitación podrían consistir en asegurar:

1. Contar con el personal suficiente de analistas y auxiliares calificados para cada una de las técnicas analíticas.
2. El personal debe tener la capacidad de practicar las técnicas de investigación analítica y perfeccionar su capacidad interpretativa.
3. Que cada empleado comprenda y entienda la finalidad de sus funciones.
4. Que cada empleado comprenda la necesidad de cumplir los requisitos del sistema de calidad.

5. Que los datos analíticos producidos por los analistas sean precisos y significativos para que puedan cumplir los objetivos del laboratorio.

Además de la capacitación general será necesaria una capacitación en la metodología analítica específica, la cual debe ser impartida por propio personal del laboratorio que tenga mayor experiencia y antigüedad en la técnica analítica esto debido a que la probabilidad que otras organizaciones relacionadas no realicen la misma clase de trabajos. También es importante que el personal que realiza análisis, tenga los conocimientos básicos suficientes, de los principios científicos de las operaciones que efectúan, los cuales tendrán que haberse adquirido durante los estudios académicos, pero en caso de identificarse lagunas, estas deberá subsanarse mediante capacitación, seminarios y lecturas relacionadas con dicha metodología.

Todo nuevo empleado debe recibir una orientación general acerca de su nuevo lugar de trabajo, que incluirá los siguientes aspectos; presentación a sus compañeros, información sobre horarios y el volumen de trabajo, horarios de comida, vacaciones, situación de los laboratorios, procedimientos para la eliminación de los desechos o del material contaminado, programa de seguridad y vestimenta adecuada para el trabajo de laboratorio. La siguiente fase de la capacitación podría consistir en examinar las técnicas generales de análisis, buenas prácticas analíticas, uso de equipo y la preparación de soluciones, etc. También se tiene que incluir una familiarización con la parte documental del sistema de gestión de calidad que son los manuales, procedimientos, instructivos, formatos, registros, etc.

Es muy importante que se lleve un registro de la capacitación que aporte una prueba documental de que se ha llevado a cabo la orientación inicial, y que se ha familiarizado con los conceptos del sistema de gestión de calidad además que demuestre su competencia en los procedimientos generales del laboratorio y las metodologías relacionadas con sus funciones.

Sistema de gestión de calidad

Los sistemas de gestión de calidad se pueden aplicar a prácticamente cualquier organización, empresa o institución. En términos generales, los sistemas de gestión de calidad permiten lograr la sistematización de los procesos, lo que redundará en su reproducibilidad, así mismo al incorporar elementos de control de calidad, se pueden lograr ejecutar los procedimientos con la especificación de calidad determinada.

En el laboratorio de microbiología se suelen ejecutar múltiples procedimientos y todos ellos requieren que sean efectuados de la misma manera, asegurando la calidad del procedimiento, por lo anterior se hace necesario el desarrollar un sistema de gestión de calidad, que asegure la sistematización de los procesos, a fin de disminuir los errores determinados que afectan la calidad analítica. Para poder instaurar un sistema de gestión de calidad es importante en primer lugar establecer el alcance del sistema.

Alcance del sistema de gestión de calidad

El alcance del sistema de gestión de calidad, especifica las áreas de una organización o procesos incluidos en la sistematización. En el caso de un laboratorio de microbiología el alcance deberá especificar que procesos se contemplarán, en muchas ocasiones dependiendo de la complejidad y tamaño del laboratorio, no es posible el poder considerar todos los procesos, y es perfectamente factible el iniciar con los procesos básicos y conforme avance y madure el sistema se podrán incluir nuevos procesos o áreas. En estos

casos lo más importante es comenzar con los procesos base, lo cual correspondería a todos aquellos involucrados en la obtención de la muestra, procesamiento de la misma, ejecución de análisis y reporte de resultados.

Acreditación vs certificación

La implementación de sistemas de gestión de calidad se realiza considerando tanto normas internacionales como nacionales, el poder demostrar el cumplimiento de las normas frente a organismos de certificación, permite la obtención de certificados de cumplimiento, los cuales deben ser diferenciados de las acreditaciones, éstas en nuestro país únicamente son otorgadas por la Entidad Mexicana de Acreditación (ema) y reconocen la competencia técnica para realizar algún proceso. Así por ejemplo un laboratorio que se certifique bajo una norma como la ISO 9000:2015, será reconocida mediante un certificado donde señale que dicho laboratorio tiene un sistema de gestión de calidad, en este sentido es importante señalar que este reconocimiento establece que hay un proceso que se efectúa y documenta sistemáticamente conforme a la norma, sin embargo no asegura que los resultados que se generan sean correctos. Por otra parte, un laboratorio que obtenga la acreditación bajo alguna norma, por ejemplo la NMX 17025 es reconocida a nivel internacional como competente, es decir los resultados analíticos que emite son considerados verdaderos por la autoridad.

Implementación de control de calidad en los procesos analíticos

La implementación del control de calidad en todas las etapas de un proceso analítico, es la primera fase que debe realizarse, si se desea realmente generar resultados verdaderos, y también es el camino para lograr una acreditación. Esta implementación consiste en generar un procedimiento que incluya controles y materiales de referencia que permitan al microbiólogo alcanzar un resultado, el cual muestre sin lugar a duda, que ninguna variable presentó errores que ocasionen un sesgo en el resultado, para tal propósito se debe considerar lo siguiente:

1. Material de referencia: Toda validación de un método forzosamente requiere incluir material de referencia, tales como cepas, patrones secundarios o primarios con trazabilidad a un patrón nacional, estos materiales deben tener el reconocimiento de validez por parte de la autoridad, pueden ser usados como testigos o controles positivos o negativos. En microbiología a menudo este tipo de material son cepas de bancos internacionales de cepas tales como la American Type Culture Collection (ATCC), dichas cepas pueden tener patrones conocidos de susceptibilidad antimicrobiana que permiten determinar si las condiciones, medios y procedimientos permiten reproducir los resultados esperados, si esto se logra, entonces se puede considerar como válidos los resultados encontrados en las cepas aisladas de pacientes, de tal manera que se puede afirmar con confianza, que el patrón de susceptibilidad encontrado es verdadero.

2. Diseño básico del procedimiento con controles: La inclusión de controles debe acompañar a todos los procedimientos que realice el laboratorio, así una prueba debe al menos considerar material de referencia que dé el resultado esperado (control +) así como material de referencia que no sea capaz de dar un resultado positivo (control -). Este último control es también muy importante en el laboratorio de microbiología, ya que por ejemplo, existen medios o pruebas que deben demostrar la capacidad de inhibir el crecimiento de diversos microorganismos, si un organismo control negativo muestra crecimiento, estaría indicando que se ha perdido la capacidad inhibitoria del medio.

3. Validación del procedimiento. Todo procedimiento debe ser validado con los controles y materiales de referencia, solo una vez que sea evidenciado y documentado experimentalmente la consistencia, funcionalidad y robustez en los procesos se puede considerar la validación de procedimiento.

4. Diseño del procedimiento normalizado de operación (PNO). Una vez validado el procedimiento es necesario elaborar detalladamente los pasos, controles y resultados que deben obtenerse. Estos procedimientos documentados se deben seguir sin desviación por el personal involucrado en la ejecución del procedimiento. En la NOM 007 SSA3-2011 se especifican los elementos que deben contener los procedimientos que se realicen en laboratorio clínicos.

Procesos de verificación y/o calificación de equipos

Un resultado valido en una prueba analítica requiere de un funcionamiento adecuado de los equipos involucrados en el análisis, de tal manera que al igual que los procedimientos analíticos, los equipos deben ser verificados o calificados mediante kits o material de referencia, estas actividades demandan que sean realizadas por personal especializado, por lo que es frecuente la subcontratación de dichos servicios, a empresas acreditadas que puedan emitir certificados de calibración. Por otra parte en el caso de los laboratorios microbiológicos que realicen análisis clínicos, por normatividad deben sujetarse a un programa anual de mantenimiento preventivo y de calibración de los equipos de laboratorio.

1. Certificados de calibración. Los certificados de calibración son documentos emitidos por organizaciones o entidades, de las cuales se ha reconocido su competencia técnica en la calibración, debido a que mostraron evidencia de que llevan un sistema de gestión de calidad, así como evidencia documental del uso sistemático de procedimientos y controles con trazabilidad a patrones nacionales, los instrumentos que suelen certificarse en el laboratorio son frecuentemente: los termómetros, micropipetas y balanzas.

2. Calificación de equipos. La calificación de equipos es un proceso de verificación del funcionamiento del desempeño del equipo, en el laboratorio de microbiología, las cabinas de bioseguridad deben ser calificadas a fin de determinar si son capaces de brindar protección contra la dispersión de aerosoles, así como su capacidad para filtrar el aire y evitar la salida de partículas hacia el área de trabajo. La calificación puede ser realizada por áreas de validación dentro del mismo laboratorio o bien ser subcontratada a especialistas.

3. Verificación instrumental. La verificación instrumental consiste en determinar periódicamente, que las magnitudes de las mediciones de los instrumentos correspondan a la esperada, para tal fin se puede disponer de materiales de referencia. Usualmente se lleva a cabo por personal del laboratorio. En el laboratorio de microbiología se verifican la temperatura de las incubadoras, empleando termómetros certificados, también se verifica en los espectrofotómetros la exactitud fotométrica, o la exactitud en la longitud de onda del instrumento mediante filtros de referencia.

Documentación de los procesos

Todo sistema de gestión de calidad se fortalece conforme se disminuye la cantidad de formatos a los necesariamente indispensables, sin embargo debe haber una continua documentación y los formatos considerados deben mostrar la utilidad para justificar el tener que llenarlos. A menudo la justificación es el resultado de experimentar errores o eventos no considerados durante la organización del trabajo en el laboratorio, la NOM 007 SSA3-2011 especifica el tipo de documentación deben tener los laboratorios clínicos.

1.- Organización de la documentación. La documentación debe ser organizada en carpetas y colocada en áreas disponibles para los usuarios de los documentos, así mismo debe haber procedimientos para modificar, actualizar o anular documentos del sistema.

2.- Trazabilidad en la documentación. Un elemento clave que determina el éxito en la documentación de los procedimientos, es la trazabilidad de la documentación, que se refiere a que todo estudio o procedimiento realizado se puede seguir su historia hacia atrás, es decir: ¿Cuándo llegó la muestra?, ¿En cuál recipiente se colocó?, ¿Cuáles fueron los procedimientos usados para coleccionar la muestra?, ¿Cuándo se analizó?, ¿Cuáles fueron los controles?, ¿Cuál fue el material de referencia usado como control? etc. Toda esta información deberá estar siempre disponible para cualquier muestra, debido a que en el laboratorio, se esperaría que sistemáticamente se registren todas las etapas de los procesos, incluyendo el control de calidad, esta propiedad de los sistemas de calidad, es muy tomada en cuenta durante las auditorías realizadas a los procesos.

Relación cliente - laboratorio

La satisfacción de todo cliente cuando compra o contrata algún servicio se logra cuando se cubren las expectativas de este, por tanto es necesario y conveniente conocer los requerimientos del cliente y poder establecer desde un principio si se podrán alcanzar o no dichos requisitos. En el caso de laboratorios ya sean públicos o privados, el cliente es quien contrata los servicios, por tanto el laboratorio debe esforzarse por transmitir al cliente el alcance de cada estudio solicitado. Es decir si se solicita un estudio para determinar la microbiota asociada a un determinado suelo. El laboratorio debe describir que clase de análisis realizará y cuales serían el tipo de resultados. Muchas veces el cliente esperaría una lista de los microorganismos, tanto eucariontes como procariontes encontrados en la muestra, pero por otra parte el laboratorio al ejecutar el análisis podría limitar el estudio solo a la identificación de procariontes, el resultado final es la insatisfacción por parte del cliente.

En el caso de los laboratorios clínicos muchas veces puede haber confusión respecto a la figura del cliente, la mayoría de las veces esta figura recae en el medico que trata al enfermo y quien recurre a los servicios de un laboratorio para que le ayude a confirmar un diagnóstico presuntivo. Para los laboratorios clínicos es fundamental el transmitir al médico los alcances de cada una de sus pruebas, por ejemplo, si se ofrece el servicio de cultivos faríngeos, se debe especificar al médico si este incluye pruebas de susceptibilidad antimicrobiana o solo la identificación del patógeno, en el caso de laboratorios que incluyan en el costo del estudio en estas pruebas, es necesario informar al médico sobre los criterios considerados para realizar o no la prueba de antibiograma a los aislados bacterianos recuperados, esto debido a que muchos de las bacterias son parte de la microbiota bucofaríngea y su eliminación debida a un tratamiento antibacteriano, provocaría un desequilibrio en las poblaciones microbianas benéficas, generando problemas al paciente, así como contribuyendo al surgimiento de microorganismos resistentes.

Cuando el paciente solicita personalmente el estudio, entonces se debe considerar que él es el cliente y de igual manera es conveniente averiguar lo que espera el paciente del resultado, a fin de poder indicar si el estudio está dirigido a la obtención de dicha información, y en caso contrario se debería canalizar a su médico tratante, a fin de que le oriente en la selección del estudio más pertinente.

Un elemento fundamental para lograr alcanzar los resultados esperados es el tipo de muestra que se analizará, la cual deber ser representativa y debe estar bien preservada, por lo que es indispensable transmitir al cliente la información pertinente para la obtención

y mantenimiento de la muestra, así como informar que una muestra mal obtenida podría generar resultados no válidos o difíciles de interpretar.

Contactos laboratorio-paciente

Los medios para transmitir instrucciones o comunicaciones con el cliente o el paciente, son variados entre medios impresos, electrónicos, verbales en persona o vía telefónica, en todos los casos es conveniente asegurarse de la comprensión de la comunicación por parte del receptor, para lo cual se recomienda confirmar la información en persona una vez que el cliente o paciente se presente al laboratorio con las muestras, para la obtención de las mismas o para pedir informes.

1.-Instrucción previa obtención de muestras. Se recomienda generar instrucciones por escrito con esquemas que clarifiquen el procedimiento adecuado para la toma de las muestras, así como indicar los criterios para considerar que una muestra no es adecuada para realizar el estudio. Para el caso de laboratorios clínicos la normatividad específica que se deben generar instrucciones y precauciones especiales para la toma y conservación de cada una de las muestras.

2.-Condiciones de entrega de resultados. Es muy importante transmitir al cliente, cuándo se entregará el resultado, y si hay situaciones que podrían causar retrasos, así mismo es necesario solicitar datos de comunicación con el cliente para enviarle por dicho medio comunicados acerca del avance, entrega o posibles retrasos en la entrega de resultados. En caso de demoras extraordinarias, es indispensable comunicarse con el cliente antes de la fecha de la entrega ya que esto es causa frecuente de disgustos por parte del cliente.

3.-Manejo seguro de información y protección de datos. Las leyes mexicanas contemplan que se debe especificar al cliente que toda la información proporcionada será tratada como confidencial y deberá haber garantía de su resguardo, en este sentido los laboratorios deben tener bases de datos con sistemas de seguridad robustos para la protección de dicha información.

4. Entrega de resultados al cliente. La entrega de resultados se puede hacer mediante medios impresos o electrónicos, en todo caso es importante generar el reporte en hojas membretadas, el reporte deberá ser firmado por el responsable sanitario y se debe asegurar la confidencialidad de la información. Excepto en los casos en que sea solicitada en forma escrita por una autoridad competente, o en los casos previstos en las disposiciones jurídicas aplicables en materia de vigilancia epidemiológica. En todos los casos, el reporte debe detallar los métodos que fueron utilizados, así como los controles y estándares utilizados, en el caso particular de los estudios microbiológicos realizados en muestras clínicas, es obligatorio considerar las especificaciones sobre el reporte de resultados, definidos en la NOM 007 SSA3-2011, que contemplan el acompañar el resultado con intervalos de referencia, de acuerdo a la edad y género del paciente, así como utilizar el sistema de medidas especificadas en el la NOM-008 SCFI 2002 Sistema general de medidas.

Aspectos éticos en la relación entre Médico y laboratorio

Los laboratorios que analizan muestras clínicas, dependen en gran medida del número de pacientes o muestras recibidas y dado que la mayoría de las solicitudes de estudios son originadas por los médicos tratantes, se ha generado una relación de dependencia del laboratorio con los médicos, que ha llevado a muchos laboratorios a negociar comisiones a fin de que el médico les envíe pacientes, en este sentido la normatividad Mexicana específica : “Cuando el médico requiriera los servicios de un laboratorio clínico privado,

deberá ofrecer cuando menos tres opciones al paciente, no pudiendo condicionar la prestación de sus servicios profesionales, a la presentación de los resultados de un determinado laboratorio exclusivamente” (numeral 4.6 de la NOM 007 SSA3-2011). Sin embargo, lamentablemente no se especifica la prohibición para otorgar comisiones al médico.

Muchos laboratorios compiten con otros laboratorios no en la calidad de sus resultados, sino en quien puede hacerse de más pacientes al ofrecer las comisiones más altas, esto también ha ocasionado problemas éticos en algunos médicos, que al poder contar con dinero libre de impuestos al recibir estas comisiones, podrían enviar a los pacientes al laboratorio para realizarse estudios no necesarios o poco útiles en su diagnóstico. Por tal motivo esta práctica debe considerarse corrupción y debería prohibirse e investigarse, ya que el principal afectado es el paciente, quien al final debe pagar los altos precios de los estudios de laboratorio, necesarios para poder pagar al médico su respectiva comisión.

Manejo de muestras

Como previamente se ha mencionado, el éxito en alcanzar un resultado válido, recae en gran medida en la calidad de la muestra, la matriz que acompaña la muestra juega un papel importante en el mantenimiento y viabilidad de los microorganismos ahí presentes, de igual manera el ambiente en el cual se colectó la muestra, es el responsable de la presencia de cada una de las poblaciones microbianas.

Cuando se trata de identificar a los microorganismos presentes en la muestra, se deben enfocar los esfuerzos en lograr mantener las condiciones fisicoquímicas tales como nivel de oxígeno y otros gases, temperatura entre otros. Así mismo es necesario iniciar lo antes posible con el análisis microbiológico.

Cuando el enfoque del estudio microbiológico se orienta a la detección de algún género o especie microbiana, las medidas precautorias deben cambiar, a fin de promover la viabilidad del grupo microbiano buscado, procurando inhibir el crecimiento de otras poblaciones, proceso conocido como enriquecimiento.

Obtención e identificación de muestras

Una muestra correcta, debe ser representativa del sitio que requerimos evaluar, es decir si un paciente presenta ulceración en las amígdalas y el médico ha solicitado un cultivo faríngeo, la muestra representativa será solo aquella que contenga microorganismos de las úlceras de las amígdalas.

En el caso de los estudios de microbiológicos de muestras alimenticias, usualmente los resultados se expresan en función a gramos de la muestra o mililitros en caso de muestras líquidas, y en este tipo de muestras se suelen analizar tamaños de muestra de 10g, sin embargo es posible que en un alimento no todo esté contaminado, por tanto podría resultar difícil determinar qué sección del alimento es la que se debe tomar para el estudio, para resolver este problema, se suelen tomar mayores cantidades de alimento, por ejemplo 100g, las cuales son homogeneizadas, esto permite que se distribuya homogéneamente la parte contaminada con el total de la muestra y al extraer una muestra homogeneizada de 10g se tendrá una muestra representativa de los 100g totales.

Mantenimiento de muestras

Para cada análisis realizado en cualquier laboratorio microbiológico, se debe conocer la estabilidad máxima de las poblaciones buscadas en las muestras, por lo que debe haber

criterios en el laboratorio que determinen, en qué momento se efectuarán las pruebas. Si hay sustancias que ayuden a preservar la muestra, tales como medios de transporte o inhibidores reversibles del crecimiento bacteriano, podría ser práctico y conveniente procesar varias muestras a la vez en un lote considerando sus controles y pruebas de calidad. Esto permitirá generar resultados validos con menos material y tiempo, que si se utilizara un control por cada muestra en diferentes momentos. Por otra parte, existen pruebas que deben procesarse inmediatamente, debido a que no hay sustancias conocidas que puedan preservar las poblaciones de las muestras.

Eliminación o destrucción de muestras

Una vez finalizados los estudios se puede proceder a eliminar las muestras, las cuales deben desecharse de acuerdo a lo especificado por la NOM 087 SEMARNAT SSA1 2002 Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos. La normatividad Mexicana, no considera como RPBI a las muestra fecales o de orina, por lo que pueden desecharse directamente en el sanitario, sin embargo es importante considerar la adición de desinfectantes a las muestras fecales en las que se detecten huevecillos, quistes u otras fases parasitarias antes de desecharlas.

Las muestras alimenticias en las que se detecten toxinas o patógenos con baja dosis infectiva, tales como toxinas botulínicas o presencia de *Shigella* spp respectivamente, deben inactivarse previamente antes de eliminarse. Para tal propósito se puede utilizar la autoclave a 121 ° C al menos durante 30 minutos.

Muestras para investigación

Los laboratorios de investigación frecuentemente requieren contar con muestras procedentes de pacientes, para poder acceder a estas muestras es necesaria la aprobación del protocolo de experimentación por parte de un comité de ética e investigación, el cual dé sus observaciones y eventualmente autorice la ejecución del estudio. La obtención de muestras deberá estar sujeta además a un consentimiento informado por parte del paciente, donde se indique el propósito del estudio así como se especifiquen todos los posibles riesgos que podría generar la obtención de la muestra.

Administración de recursos del laboratorio

El laboratorio debe evaluar a proveedores de productos consumibles, suministros y servicios críticos que afectan a la calidad de ensayos y debe mantener registros de dichas evaluaciones y establecer una lista de aquellos que hayan sido aprobados.

Selección de proveedores

Los proveedores se evalúan a través de dos criterios:

1. Se considera un proveedor aprobado en las siguientes circunstancias:
 - a. Está certificado por la serie de Normas ISO
 - b. Entrega certificado de control de calidad
 - c. Está acreditado por el organismo nacional de acreditación, para el caso de los servicios de calibración de equipos e instrumentos.
2. Antecedentes históricos del proveedor. La evaluación se realiza a través de la verificación de la capacidad del proveedor de entregar lo solicitado, para lo cual se establecen los siguientes criterios:
 - a. Calidad de acuerdo a lo especificado
 - b. Oportunidad en la entrega
 - c. Entrega de la cantidad solicitada Cada atributo se califica como:

BUENO: Cuando cumple la totalidad de lo especificado
REGULAR: Cuando cumple parcialmente lo especificado
DEFICIENTE: No cumple lo especificado.

Planeación de compras

La planeación de compras de los materiales, insumos y equipos va enfocada principalmente a los servicios que realiza el laboratorio además de la visión de crecimiento planeada para cumplir objetivos específicos en un corto tiempo.

Control de almacén e inventarios

Los laboratorios deben de contar con procedimientos para la compra, la recepción y el almacenamiento de los reactivos y materiales consumibles de laboratorio que se necesiten para realizar los ensayos. Las indicaciones de almacenamiento se encuentran descritas principalmente en los reactivos e insumos que utiliza el laboratorio pero también deben seguir la normatividad nacional.

Los inventarios deben ser dinámicos a fin de detectar con anticipación la falta de materiales y también para evitar la adquisición de materiales presentes en el almacén.

Ejecución sistemática de procedimientos: problemas durante el procesamiento de muestras.

Pueden ser muy numerosos los problemas a los que se enfrenta el laboratorio durante el procesamiento de las muestras, en algunos casos se puede perder la muestra debido la ruptura accidental de los recipientes o bien cuando accidentalmente se colocó ésta en el área de las muestra procesadas con la consecuente pérdida de viabilidad al no mantenerse en las condiciones requeridas. En estos casos se debe proceder con agilidad para contactar al cliente y solicitar una nueva muestra y si fuere posible procurar ir al domicilio del solicitante, a fin de evitarle molestias por un incidente ocurrido en el laboratorio.

Para el caso de laboratorio de inocuidad, dado que la finalidad de las actividades de control de los alimentos es poder establecer una relación entre los datos analíticos correspondientes a un material de ensayo y el "lote" original del que se ha tomado la muestra, es importante que el laboratorio participe en las deliberaciones sobre los planes de muestreo y en la determinación del tamaño mínimo de las muestras.

La confianza en la decisión de que un "lote" cumple o no una especificación depende de:

1. La eficacia del plan de muestreo para obtener una muestra representativa del lote.
2. La calidad del análisis de esa muestra.

A fin de disminuir la probabilidad de que se presenten este tipo de problemas es conveniente que se establezcan planes de riesgos.

Diseño e implementación de planes de riesgos

Los riesgos en el laboratorio no se pueden eliminar, siempre existirá la posibilidad de que ocurra algún incidente que pueda causar problemas ya sea al personal o en la ejecución del trabajo de laboratorio. Sin embargo lo que sí se puede hacer es disminuirlos. Para lograrlo en primer lugar es necesario identificar los riesgos, después deben ser priorizados en función a su probabilidad de ocurrencia y su impacto, una vez priorizados se deben establecer una serie de estrategias que permitan tomar acciones para disminuir la probabilidad de ocurrencia o disminuir su impacto.

Algunos de los riesgos que suelen presentarse en un laboratorio de microbiología son los siguientes:

- 1.-Infecciones adquiridas en el laboratorio
- 2.-Accidentes de trabajo
- 3.-Incendios
- 4.-Terremotos o daños debidos a fenómenos naturales
- 5.-Robos de equipo
- 6.-Licencias por incapacidad
- 7.-Fallas en la entrega de materiales
- 8.-Interrupción de los servicios (agua, luz, gas, internet, teléfono)
- 9.-Falla técnica de un equipo

Las estrategias usuales para hacer frente a los riesgos consideran: planes para evitar, mitigar y/o transferir estos riesgos a organizaciones competentes. Los riesgos que pueden ser evitados son riesgos cuya ocurrencia se conoce bien, de tal manera que se puede eliminar la fuente potencial del riesgo, los riesgos que se pueden mitigar en general no pueden ser evitados, sin embargo se pueden tomar medidas para disminuir la severidad del impacto, por ejemplo el riesgo de infectarse y desarrollar una enfermedad adquirida en un laboratorio donde se trabaje en el diagnóstico de influenza, podrían tener menos impacto si el personal involucrado se inmunizara anualmente con la vacuna de la influenza. Los planes de transferencia de riesgos se aplican en general para riesgos que terceros especializados pueden afrontar, por ejemplo el riesgo de robo puede ser transferido a un tercero como una agencia de seguros, a la cual se le paga una póliza para que enfrente el pago o reposición en caso de que se presente el robo. Otro ejemplo de la transferencia de riesgos es el contratar laboratorios de referencia para ejecutar estudios que no pudieron realizarse debido a fallas instrumentales en los equipos destinados a la realización de la prueba.

Niveles de bioseguridad

Dado que en el laboratorio de microbiología se trabaja con muestras con microorganismos potencialmente infectivos, muchos de los cuales se cultivan, existe un riesgo potencial de infección, esto se ha constatado al observarse que varios casos de infección, con *Salmonella typhi*, *Brucella spp* o *M. tuberculosis* se han detectado en personal o en familiares, directamente relacionados con estudiantes que trabajan regularmente al laboratorio de microbiología. No todos los microorganismos son igual de peligrosos, esta característica está relacionada con su capacidad de transmitirse de un individuo a otro, así como por su virulencia y capacidad de resistir condiciones ambientales adversas.

El Centro de control de enfermedades (CDC) de los Estados Unidos de América ha clasificado a los microorganismos en niveles de riesgo y ha considerado que el manejo de cada uno de estos microorganismos, debe sujetarse a ser efectuado en instalaciones y bajo procedimientos que incrementan en el nivel de contención, conforme aumenta el nivel de riesgo del microorganismo.

Así en el nivel 1 de bioseguridad, se encuentran los microorganismos que no representan un riesgo conocido para infectar personas sanas, estos microorganismos suelen utilizarse en prácticas para estudiantes que inician su preparación en el campo de la microbiología. También se emplean frecuentemente estos microorganismos, en algunos procesos biotecnológicos, para la obtención de ingredientes alimenticios o industriales. En esta categoría encontramos a la mayoría de microorganismos ambientales, por lo que las

muestras que los contienen en general son inocuas, siempre y cuando no provengan de fuentes contaminadas generadas por la actividad humana.

En el nivel de bioseguridad 2 se trabaja con agentes comúnmente encontrados en muestra clínicas humanas o veterinarias, en ellas se encuentra una gran variedad de especies capaces de infectar y causar enfermedad después del contagio, algunos de los agentes de este nivel son: el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), las bacterias piógenas, las diversas especies de *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Yersinia* spp, *Escherichia coli*, *Listeria* spp. entre otros. El trabajo en estas áreas es de bajo riesgo siempre y cuando se usen guantes, se desinfecte las manos y superficies de trabajo así como se proporcione entrenamiento básico microbiológico y se limite al acceso a dicha áreas, exclusivamente al personal directamente involucrado en el manejo y aislamiento de los microorganismos. En estos laboratorios se requiere el uso de cabina de bioseguridad clase II que eviten tanto la entrada como la salida de aire y partículas.

El nivel de bioseguridad 3 se emplea para el manejo de muestras con la presencia probable de agentes virales no comunes entre la población, así como el manejo de microorganismos que causen infección sistémica, como el hongo *Histoplasma capsulatum* o que muestren una alta capacidad infectiva, tales como *Mycobacterium tuberculosis* o *Brucella* spp. También se especifica en procedimientos en los que se cultiven los patógenos en concentraciones superiores a las encontradas en pacientes enfermos. Las medidas de seguridad contemplan lo previsto en el nivel 2, más el uso de protección personal completa, consistente en: un traje que cubre el cuerpo, dobles guantes, lentes de seguridad o careta y respiradores especiales con filtros HEPA. El acceso a estos laboratorios debe estar restringido a personal con la competencia técnica demostrable. Además de lo anterior las instalaciones del laboratorio deben proveer la contención de los microorganismos, para lo cual se requiere de manejadoras de aire que generen una presión negativa, a fin de evitar la salida de aerosoles fuera de laboratorio, todo el aire debe de filtrarse antes de liberarse al ambiente.

En el nivel de bioseguridad 4, se trabaja con agentes virales exóticos, no presentes de manera natural en el país y que representan un riesgo epidemiológico, tales como el virus del ébola. En estos laboratorios solo trabaja personal autorizado y competente en bioseguridad, y el personal así como los materiales deben ser descontaminados antes de salir del laboratorio. Además de lo previsto en las instalaciones de laboratorios de bioseguridad 3, estos deben tener cabinas de bioseguridad clase III, que disminuyan al mínimo la exposición al agente infeccioso.

En la siguiente dirección se puede consultar el nivel de riesgo al que pertenecen diversas especies microbianas. <http://www.absa.org/riskgroups/index.html>.

Estrategias de competitividad

Todo negocio debe tener una estrategia que le permita no solo mantenerse, sino también crecer. Esto no es la excepción para los laboratorios microbiológicos, para lo cual debe generar una estrategia de competitividad que le permita diferenciarse de negocios similares. No hay una estrategia general que funcione para todos los laboratorios, sin embargo algunos elementos que puede ayudar al desarrollo de esta estrategia pueden ser: la identificación de las necesidades actuales y requerimientos de los clientes, en particular conocer cómo espera el cliente satisfacer sus necesidades con el servicio contratado.

En ocasiones el contar con certificaciones o acreditaciones permite al laboratorio acceder al mercado de estudios cuyos resultados necesitan de un reconocimiento de validez oficial. Se debe considerar además que entre más laboratorios pueden realizar una prueba, mayor podrá ser la oferta, y menor las utilidades, por tanto una estrategia de especialización en pruebas complejas y poco comunes, puede posicionar al laboratorio como una entidad con reconocido prestigio para la ejecución de estas pruebas, lo que posibilitaría a laboratorio a prestar servicios de maquila a otros laboratorios no especializados.

La importancia del mercado y los requerimientos del cliente

Ningún negocio o empresa puede tener éxito si no conoce el mercado y las necesidades del cliente, en este caso los laboratorios que efectúan análisis microbiológicos en las diferentes áreas que hemos revisado, deben conocer la demanda de pruebas en el mercado, el posicionamiento de la competencia así como averiguar las expectativas del cliente, esto último permite conocer específicamente qué demanda el cliente, cuando y porqué solicita un estudio, así mismo es importante conocer las situaciones le disgustan, por ejemplo: precios altos, tiempos largos de entrega resultados, retrasos, falta de comunicación etc. Entre más se conozca al cliente mejores serán las posibilidades de atender los requerimientos que busca el cliente, que le lleven a seleccionar los servicios de laboratorio ofrecidos en vez de los que promueve la competencia.

Las propuestas de valor, difusión y capital financiero

Las ventajas que ofrece un negocio sobre otro son llamadas propuesta de valor, entre más propuestas de valor tenga un negocio mayor será la probabilidad de éxito, Los laboratorios de microbiología deben buscar el mayor número de propuestas de valor siempre alineadas a las necesidades de los clientes, sin descuidar tanto los aspectos de calidad como los aspectos éticos previamente comentado.

También es indispensable la difusión de los servicios que presta el laboratorio, ya que los clientes potenciales debe conocer que hay alternativas de laboratorios, que si consideran sus expectativas y requerimientos, en el caso de los laboratorios clínicos es una buena práctica el difundir entre los médicos el tipo de servicios, pero se debe atender los dispuesto en la NOM 007 SSA3-2011 sobre que el tipo de publicidad debe ser de carácter orientador y educativo.

Otro elemento fundamental es contar con el capital financiero suficiente, no solo para las instalaciones y equipamiento, sino también para poder mantener los sueldos del personal, mientras se alcanza el punto de equilibrio, en este sentido, antes de iniciar un negocio en esta área, debiera haber un estudio de mercado que determinará si es factible el negocio basado en las proyecciones financieras y considerando distintos escenarios económicos.

Certificaciones y Acreditaciones

El desarrollo del mercado y de las organizaciones ha ocasionado la necesidad de asegurar que los laboratorios de calibración y ensayo, operan bajo un Sistema de Gestión de la Calidad conforme con los requisitos indicados en la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006 / ISO/IEC17025:2005, para asegurar la validez técnica y la calidad de los servicios ofrecidos. El ser evaluado por un organismo externo en forma sistemática permitirá a los laboratorios evidenciar que son técnicamente competentes y que son capaces de generar resultados técnicamente válidos.

Los principales beneficios que se obtienen al seguir una normativa son los siguientes:

1. Disponer de métodos de ensayo y calibración armonizados que facilitan el comercio, mediante servicios con un alto grado de confianza y aceptación al ser evaluados con normatividad internacional.
2. Para los consumidores les da mayor certeza de la seguridad sobre lo que compran o consumen.
3. Para los trabajadores, hay satisfacción debido a que laboran en Instalaciones seguras y adecuadas, además del que se facilita la superación del personal, debido a la capacitación continua.
4. Para los empresarios: contar con servicios confiables de laboratorios acreditados a nivel nacional.
5. Para las instituciones y laboratorios: Incrementar el número de servicios ofrecidos, incrementar el nivel de satisfacción de clientes.

Aprobación por organismos gubernamentales nacionales e internacionales

Existen en el mundo muchos planes de acreditación aplicados por entidades oficiales, organismos profesionales u otras organizaciones, habitualmente de alcance nacional o internacional. Estas entidades confieren un reconocimiento oficial de que un laboratorio es competente para llevar a cabo ensayos específicos (o tipos específicos de ensayos). A menudo un plan, obligatorio o voluntario, se aplica a un país, una región, una industria o un sector técnico en particular. A los laboratorios que participan en él se les exige que cumplan ciertos requisitos, y el organismo acreditador lleva a cabo evaluaciones para asegurar ese cumplimiento. La Organización Internacional de Normalización ha establecido en la Guía ISO 25, varias directrices para evaluar la competencia de los laboratorios de ensayo que posteriormente han sido ampliadas por otras organizaciones, por ejemplo en la serie de normas UNE 45000. Las evaluaciones estarán a cargo de evaluadores profesionales, que de ordinario serán especialistas en la misma disciplina que el laboratorio y habrán seguido un curso sobre evaluación de laboratorios.

La acreditación comprende por lo general tres elementos fundamentales:

1. preparación de un Manual de Gestión de Calidad en el que se documenten la política, sistema y procedimientos de la gestión de calidad del laboratorio;
2. visitas periódicas de los evaluadores, y
3. participación en programas adecuados de comprobación de la competencia.

Para conseguir y mantener la acreditación, el laboratorio deberá cumplir los requisitos exigidos por el organismo acreditador con respecto a los tres elementos. A menudo se concede más importancia al hecho de asegurar una buena infraestructura técnica y administrativa en relación con la calidad que a la vigilancia estricta del grado de competencia científica y técnica alcanzado. Esta última cuestión tiene que ver con la "idoneidad para el fin" que habrá de convenirse entre el laboratorio y el cliente, mientras que la primera se refiere a la confianza en los datos proporcionados.

Las principales dependencias encargadas de la evaluación de la conformidad en México requieren del apoyo de personas físicas o morales que apoyen a la autoridad Sanitaria para el control y vigilancia de la normatividad y reglamentos aplicables y que actúen de manera imparcial.

Una forma es mediante reconocimiento y certificación de los laboratorios terceros autorizados. A los cuales se les evalúa la conformidad con base en procedimientos

normalizados y un sistema de calidad. De esta forma se amplía la cobertura de la autoridad sanitaria (Secretaría de salud). COFREPIS faculta a los laboratorios a expedir informes técnicos y reconoce para actos de autoridad.

La entidad mexicana de acreditación (EMA) es una entidad de gestión privada en nuestro país, su principal objetivo es acreditar a los organismos de la evaluación de la conformidad entre ellos los laboratorios de ensayo, laboratorios clínicos y proveedores de ensayos de aptitud. Además la EMA cuenta con reconocimientos internacionales por el Foro Internacional de Acreditación (IAF) y la Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios (ILAC), confirmando que la EMA trabaja en apego a las normas nacionales e internacionales.

Estrategias enfocadas a la especialización de laboratorios

La tarea fundamental de un laboratorio de microbiología es la identificación de microorganismos relacionados con procesos infecciosos o que tengan relación con el humano, a través de metodologías que lo permitan. De manera rutinaria esta identificación se realiza por medio de métodos fenotípicos, estos métodos están estandarizados en los laboratorios y aunque permiten llegar a la identificación de los microorganismos, tienen diversas limitaciones que se hacen más evidentes con algunos tipos de ellos. Derivado de esto, los métodos moleculares permiten soslayar estas limitaciones y se han convertido en una excelente herramienta para la identificación de microorganismos dando precisión y reducción de tiempos de respuesta en los laboratorios de microbiología.

A pesar de esta ventaja, los métodos moleculares para identificación de microorganismos no son utilizados universalmente en los laboratorios, derivado del costo más elevado y del grado de especialización requerida para llevar a cabo dichas metodologías. Sin embargo, la necesidad de una respuesta rápida para la identificación de microorganismos de interés médico, ha llevado a un incremento en la oferta de métodos moleculares rápidos para el diagnóstico microbiológico complementarios, alternativos e incluso de referencia para los métodos fenotípicos, en los párrafos siguientes, describiremos de manera general las estrategias moleculares aplicadas para identificación bacteriana que suelen emplearse en laboratorios especializados en microbiología molecular.

1.-Identificación basada en microbiología molecular: macromoléculas comunes en todos los organismos como los ácidos nucleicos y las proteínas acumulan cambios al azar en el tiempo. Suponiendo que estos cambios ocurren de manera lineal y al azar, las diferencias en las secuencias (nucleótidos o aminoácidos) que componen dos macromoléculas homologas en dos organismos diferentes, reflejan la distancia evolutiva presente entre ellos. Esta idea se ha venido utilizando durante décadas para establecer las relaciones filogenéticas entre los seres vivos, dando la pauta para su clasificación e identificación.

La secuenciación y comparación de secuencias de los ácidos ribonucleicos ribosómicos (ARNr) 16S, permite establecer la relación filogenética entre los organismos procariontes, este hecho ha tenido una gran repercusión en la taxonomía microbiana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y a la identificación rápida y precisa de las bacterias. En microbiología clínica la identificación basada en el gen 16S se utiliza fundamentalmente para bacterias cuya identificación mediante otro tipo de técnicas es imposible, difícil o requiere mucho tiempo.

Se han propuesto y utilizado una amplia variedad de genes como dianas moleculares en los estudios taxonómicos o de filogenia para los distintos géneros o especies, constituyendo como principal el análisis de las secuencias del gen del ARNr 16S y en numerosas ocasiones suficiente para la identificación microbiana precisa. Sin embargo, en otros casos la alta similitud entre los géneros bacterianos o algún cambio en su asignación taxonómica no permite identificar a nivel de especie e incluso de género, y es aquí cuando se tienen que utilizar otros genes como blancos moleculares para la identificación.

a. ARNr 16S. El ARNr 16S, es codificado por el gen *rrs* incluido en el operón de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Es un gen análogo al 18S en eucariotas. La conservación de este gen se observó por primera vez en el género *Bacillus*, y posteriormente en la década de los 80s se comenzó a explorar su papel taxonómico, con lo que se logró definir en los organismos procariotas dos dominios Archea y Bacteria.

Dentro de la secuencia del ARNr 16S encontramos regiones hipervariables especie-específica, también se conoce que tiene regiones en las que tiende a acumular mutaciones y que estas regiones son diferentes según las especies estudiadas. Además también localizamos en la secuencia regiones características específicas para los miembros de un mismo grupo filogenético. Diversos estudios sobre la secuencia del ARNr 16S de distintos grupos filogenéticos, reveló su importancia práctica, la presencia de una o más secuencias características a las que se denomina oligonucleótidos firma. Son secuencias específicas cortas que aparecen en todos (o en la gran mayoría) los miembros de un determinado grupo filogenético y nunca o rara vez en otro incluyendo los más cercanos. Estos oligonucleótidos firma se pueden utilizar para ubicar a cada bacteria dentro de su grupo filogenético.

El análisis de las secuencias del ARNr 16S constituye una herramienta útil en el estudio de la diversidad bacteriana en muestras clínicas y ambientales. La secuencia del gen ARNr 16S consta de aproximadamente 1500 pares de bases y está compuesta de 9 regiones variables (V1- V9) y zonas conservadas, con este tamaño proporciona suficientes polimorfismos inter-específico para diferenciar microorganismos con medidas estadísticas válidas.

El método molecular para la identificación bacteriana, consta de cuatro etapas: 1) Extracción de ADN; 2) Amplificación del gen *rrs* o fragmentos de este; 3) Secuenciación de los fragmentos amplificados; y 4) Análisis de las secuencias en bases de datos.

b. Extracción de ADN. La purificación del ADN puede realizarse a partir de cultivos puros de los agentes patógenos o en su defecto para los casos en los que se tengan bacterias fastidiosas o no cultivables puede obtenerse directamente a partir de la muestra (tejidos, fluidos), siempre y cuando provenga y/o se mantenga estéril, para garantizar que los datos de las secuencias obtenidas son de agentes provenientes de la muestra y no contaminantes en el proceso de obtención de esta. Existen protocolos estandarizados para la extracción de ADN bacteriano, que se fundamentan en la lisis de las células, eliminación de detritus, proteínas y otros contaminantes, precipitación o unión a matrices de los ácidos nucleicos para su lavado y aislamiento. Sin embargo pueden requerirse modificaciones dependiendo del tipo de bacteria y/o del tipo de muestra. Estos protocolos han evolucionado de tal forma que hay disponibles desde aquellos en los que se preparan las soluciones en el laboratorio denominados “caseros”, hasta aquellos comerciales en forma de *kits* adecuados para diversos tipos de muestras. Así mismo, se pueden realizar de manera manual por un operador o de manera automatizada por medio de robots diseñados para este fin.

c. Amplificación del gen *rrs*. La amplificación del ARNr 16S se obtiene a partir de ADN genómico bacteriano a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en un termociclador. Para la amplificación se utilizan oligonucleótidos iniciadores de aproximadamente 20 pares de bases, dirigidos a las regiones conservadas o las regiones conservadas cercanas al 5' y 3' para amplificar el gen completo. En la literatura se encuentran reportados una variedad de oligonucleótidos iniciadores para amplificar diferentes regiones del gen y estos se utilizan dependiendo de la aplicación. Se ha comprobado que para una identificación precisa, no es necesario amplificar todo el gen, de tal manera que fragmentos de 500 o menos pares de bases dirigidos al extremo 5' del gen son suficientes para lograr identificar bacterias. Las regiones más utilizadas para este fin son V3, V4, V6 y V8 (Fig.1). La amplificación se verifica en un gel de electroforesis para cerciorarse de que sea banda única y que tenga el tamaño esperado, el porcentaje de agarosa utilizado para este fin, dependerá del tamaño de la banda.

ADNr 16S

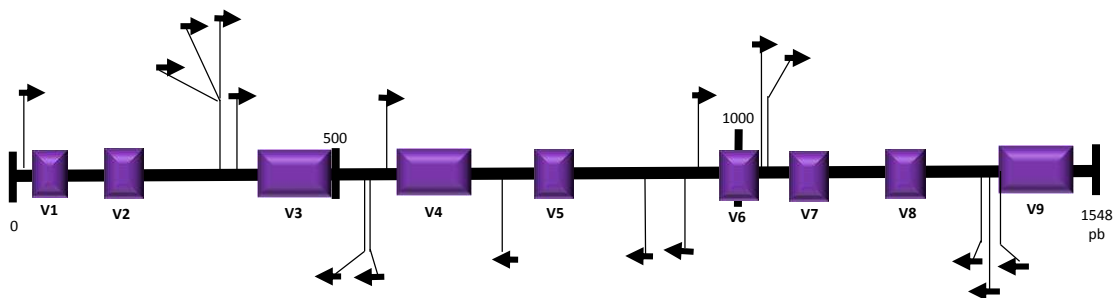


Figura 1. Representación gráfica del gen *rrs*. Ilustración de oligonucleótidos iniciadores para amplificación de fragmentos del gen ADNr 16S, en regiones conservadas. Modificado de López, et al. 2003.

d. Secuenciación. La secuenciación de los fragmentos amplificados del gen *rrs*, se puede llevar a cabo por reacciones de secuenciación de Sanger y separación de fragmentos por electroforesis capilar cuando se analizan bacterias aisladas, es decir, cuando se sabe que los fragmentos amplificados pertenecen a un solo tipo de bacteria, esto para tener resultados que puedan ser analizados. Actualmente se utiliza la secuenciación cíclica en una reacción basada en PCR independientes para cada oligonucleótido iniciador (directo y reversa), en la que no se genera un nuevo molde, si no, se reutiliza en ciclos programados adicionando oligonucleótidos o terminadores (dNTPs) marcados con fluorocromos específicos para cada tipo (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y oligonucleótidos no marcados, los terminadores interrumpen la síntesis de las cadenas de manera aleatoria, y se generan fragmentos de distintos tamaños, los cuales son separados en un proceso de electroforesis capilar, y son detectados a diferente longitud de onda y analizados. Los equipos de secuenciación automática llevan a cabo este proceso, arrojando como resultado las bases asignadas para la secuencia analizada en electroferogramas. El número de bases máximo obtenidas por esta metodología es de 500 a 900, por lo que para tener todo el gen completo serán necesarios al menos 2 pares de oligonucleótidos iniciadores y realizar análisis bioinformático para el alineamiento de las cadenas (directa y complementaria) y de esta manera complementar y eliminar discrepancias originadas por bases ambiguas (asignación de mala calidad) generadas durante el proceso de secuenciación. Así, a pesar de que la secuenciación de un solo fragmento amplificado nos puede llevar a una identificación correcta, la calidad de la secuencia será óptima cuando se analizan ambas cadenas (directa y complementaria) para la corrección de errores.

e. Análisis de las secuencias. La siguiente fase es el análisis de las secuencias para determinar el microorganismo al que pertenece. Esta etapa se realiza en base a la comparación de la secuencia consenso obtenida con las secuencias depositadas en las diferentes bases de datos disponibles de manera pública o privada. Actualmente la base de datos que presenta mayor número de consultas por su versatilidad en organismos, orígenes, genes, tipo y número de secuencias depositadas es el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov) que contiene entre sus programas a BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) útil para el alineamiento de secuencias. Otras bases de datos públicas ampliamente utilizadas son: EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Data Project), RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms), GreenGenes, de la oferta privada se encuentran MicroSeq (Applied Biosystems) y SmartGenes IDNS (Integrated Database Network System). La elección de la base de datos es muy importante y la utilización de más de una es necesaria para corroborar que se llega al mismo resultado.

El análisis de la secuencia de ARNr 16S como herramienta diagnóstica está limitada a infecciones monobacterianas, derivado de que en aquellas en las que exista más de un agente infeccioso se detectaran electroferogramas mixtos que conllevan a una escasa o nula resolución. Existen diferentes estrategias para poder analizar este tipo de muestras, como son: Electroforesis en Gel de Gradiente (DGGE, por sus siglas en inglés) basado en la separación por variaciones en la secuencia de fragmentos del gen ARNr 16S amplificados; amplificaciones por separado para Gram positivos y Gram negativos; pirosecuenciación metagenómica, basada en amplificación del ARNr 16S. También se han utilizado otras regiones del ARNr 16S, para la identificación de microorganismos. Entre ellas tenemos a las regiones del espacio intergénico (ITS) entre 16S y 23S. Estas se presentan en número variable en función del número de operones o alelos. Presentan un tamaño variable entre las diferentes especies de 60 pb (*Thermoproteus tenax*) a 1529 pb (*Bartonella elizabethae*). Este polimorfismo en el tamaño también se presenta en cepas pertenecientes a una misma especie (*S. aureus*, 303 - 551 pb y *H. influenzae* 478 – 723 pb). Este grado de diversidad en las ITSs en diversos géneros, especies y cepas constituye la base para su utilización en identificación, filogenia y tipificación.

rpoB se ha utilizado como gen blanco para identificación, subunidad beta de la ARN polimerasa, enzima imprescindible en el proceso de transcripción. En bacterias es la encargada de la transcripción de ARNm, ARNr y ARNt. La subunidad beta es la principal responsable de la actividad catalítica. Esta enzima se encuentra distribuida de manera universal en las bacterias, esta característica le da su importancia para el uso como gen diana para identificación bacteriana. La secuencia de este gen contiene regiones conservadas y regiones variables, los oligonucleótidos iniciadores se diseñan sobre las regiones conservadas, tratando de incluir al menos una región variable. A diferencia del ARNr 16S, no hay oligonucleótidos iniciadores universales para su amplificación, sin embargo, se utilizan iniciadores de amplio espectro que amplifican secuencias de diferentes órdenes de un mismo *phylum* bacteriano. Secuencias parciales de 300 a 750 pb suelen ser suficientes para la identificación bacteriana de aislamientos clínicos, para la determinación de nuevas especies se tiene que amplificar el gen completo, siendo útil para la identificación bacteriana en los análisis taxonómicos y filogenéticos de cepas de origen humano, animal y ambiental, debido a que permite la identificación a nivel de género y especie, y en ocasiones a nivel de subespecie. También resulta útil en determinados casos para identificar serovariedades.

Otros genes que por sus regiones conservadas y variables y constituyen una buena alternativa para estudios taxonómicos, evolutivos, de ecología y filogenia son *hsp65* en micobacterias, *recA* en genovariedades de *B. cepacia complex*, *hsp60* que codifica para una chaperona y se encuentra altamente conservado en numerosas bacterias, arqueas y eucariotas.

La identificación bacteriana en base al ARNr 16S, es más certera, sólida y reproducible que los análisis fenotípicos resolviendo aproximadamente el 90% de las identificaciones en microbiología. Pero no es infalible, la aplicación complementaria de otros genes como *rpoB* contribuye a una identificación bacteriana más eficiente a nivel de género, especie y subespecie para detectar y reclasificar nuevos organismos y mejorando la resolución filogenética (Tabla 1).

Tabla 1. Sugerencias de la utilización del análisis por ARNr 16S o el gen *rpoB* para la identificación bacteriana.

Escenarios	Sugerencias
Identificación de microorganismos por secuenciación.	Cepas con escasa descripción. Cepas con baja eficiencia de aislamiento. Cepas con fenotipos atípicos. Cepas de difícil fenotipificación. Cepas de crecimiento lento o fastidioso. Nuevos patógenos.
Análisis del ARNr 16S. Criterio para la identificación de especie	Mínimo 98.5% de similitud. Ideal de 1300 a 1500 pb. <1% de asignaciones ambiguas. Mínimo 98.5% de similitud. Ideal >99% de similitud. Comparación con la secuencia tipo o cepa de referencia que tiene estudios de homología de ADN. Para diferencias <0.5% a la especie más cercana considerar fenotipo.
Análisis del rpoB. Criterio para identificación de especie	Fragmento hipervariable región 2300 a 3300 pb. Según tamaño de fragmento secuenciado: 300 – 600 pb similitud ≥ 94%. 600 – 825 pb similitud ≥ 96%.
Criterio para identificación de género	Distinto género una similitud de < 85.5%
Criterio para la identificación de una nueva especie o subespecie bacteriana.	Nueva especie similitud > 97.7%. Nueva subespecie similitud de 98.2%.

Conforme avanza la tecnología, surgen nuevas metodologías para la identificación molecular de microorganismos, dentro de los cuales encontramos la PCR multiplex acoplada a un análisis de temperatura melting (Septi Fast, Roche Diagnostics), la cual identifica de forma temprana algunos agentes etiológicos bacterianos y fúngicos a partir de la muestra directa. La PCR está basada en la amplificación de las regiones intergénicas del ARNr 16S-23S para bacterias y 18S-5.8S para hongos. Otra plataforma es la amplificación y pirosecuenciación la cual realiza la identificación bacteriana o fúngica mediante PCR de tres regiones del 16S (V1-V3 o V1, V2 y V6) o del 18S respectivamente, en hemocultivos. Recientemente se ha reportado el uso de otra plataforma, basada en amplificación y espectrofotometría de masas para la detección universal de uno o varios patógenos (bacterias, hongos, virus y protozoarios) presentes en una amplia variedad de muestras (clínicas, alimentarias, ambientales o en cultivo) esta técnica ha demostrado buenos resultados en bacteriemias polimicrobianas, la limitante aún es el costo y la mano de obra calificada para llevar a cabo dicho procedimiento.

Una aplicación de la espectrometría de masas (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés *matrix assisted laser desorption/ionization - time of flight*) de gran interés en microbiología es la identificación microbiana. La identificación microbiana por esta técnica fue propuesta hace ya varias décadas, sin embargo, solo recientemente se ha utilizado como un método rápido y fiable para la identificación, a través del perfil de proteínas. Se basa en la detección de proteínas ribosómicas S y L (2000 a 20 000 Da). Los sistemas comerciales disponibles en la actualidad son MicrobeLynx de Waters Corporation, MALDI Biotyper de Bruker Daltonics y AXIMA@SARAMIS de Shimadzu & Anagnostec. Cada técnica recomienda sus propios protocolos para preparación de muestra y tiene asociada una base de datos distinta junto con un software para la adquisición de los espectros y comparación con la base de datos.

Como podemos darnos cuenta actualmente contamos con una amplia gama de métodos moleculares que nos sirven para la identificación de microorganismos, la aplicación de estos dependerá de las necesidades de cada laboratorio, así como de la infraestructura con la que se cuente. Es importante definir los alcances de cada estudio y la capacidad técnica de nuestro laboratorio para tomar la mejor decisión en cuanto a las técnicas que se necesiten implementar.

REFERENCIAS

- Adékambi, T. Drancourt, M. Raoult, D. (2009). The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol.* 17:37-45.
- Bittar, F. Ouchenane, Z. Smati, F. Raoult, D. Rolain, J. M. (2009). MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Pantone-Valentine leukocidin. *Int J Antimicrob Agents.* 34:467-470.
- Clarridge, III J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev.* 17: 840-862.
- Drancourt, M. Bollet, C. Carlioz, A. Martelin, R. Gayral, G. P. and Raoult, D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol.* 38:3623-3630.
- EPA. (1980). Guidelines and Specifications for Preparing Quality Assurance Project Plans. Cincinnati, Ohio, USA. US Environmental Protection Agency.
- FDA. (1982). Bureau of Foods Laboratory Quality Assurance Manual. Washington, DC US Food and Drug Administration.
- Fenollar, F. Roux, V. Stein, A. Drancourt, M. Raoult, D. (2006). Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections. *J Clin Microbiol.* 44:1018-1028.
- Ferreira, L. Sánchez-Juanes, F. González-Avila, M. Cembrero-Fuciños, D. Herrero-Hernández, A. González-Buitrago, J. M. Muñoz-Bellido, J. L. (2010). Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 48:2110-2115.
- Forbes, B. A., Sahm, D. F., Weissfeld, A. S. (1998). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.* St. Louis, Missouri USA. Tenth edition. Mosby, Inc.
- Garfield, F. M. (1991). *Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories,* Arlington, Virginia, USA. AOAC International.
- Isenberg, H. D. (2004). *Clinical Microbiology Procedures Handbook.* Washington, DC USA. ASM press.
- ISO. (1990). *Guía ISO 25, General requirements for the competence of calibration and testing laboratories.* 3a edición. Geneva, Switzerland. International Organization for Standardization.
- Janda, J. M. Abbott, S. L. (2007). ARNr 16S gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol.* 45: 2761-2764.
- Keys, C. J. Dare, D.J. Sutton, H. Wells, G. Lunt, M. McKenna, T. McDowall, M. Shah, H. N. (2004). Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol.* 4:221-242.
- López, I. Ruiz-Larrea, F. Cocolin, R. Orr, E. Phister, T. Marshal, M. VanderGheynst, J. Mills D. A. (2003). Design and Evaluation of PCR Primers for Analysis of Bacterial Populations in Wine by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:11 6801-6807.
- Petrosino, J. F. Highlander, S. Luna, R. A. Gibbs, R. A. (2009). Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial infection. *Clin Chem.* 55:856-66.
- Project Management Institute. (2014). *Fundamentos para la dirección de proyectos (Guía PMBOK®)* quinta edición. USA. PMI
- OMS.(2005). *Manual de Bioseguridad en el laboratorio.* Ginebra Suiza. Tercera edición Organización Mundial de la Salud.

Sadeghifard, N. Gürtler, V. Beer, M. Seviour, R. J. (2006). The mosaic nature of intergenic 16S-23S rRNA space region suggests rRNA operon copy number variation in *Clostridium difficile* strains. *Appl. Environ Microbiol.* 72:7311-7323.

Secretaría de Economía. (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002. Sistema general de unidades de Medida. México D.F. Diario Oficial de la Federación.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2003). Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Protección Ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos-clasificación y especificaciones de manejo. México D.F. Diario Oficial de la Federación

Secretaría de Salud (2011). Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011. Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. México D.F. Diario Oficial de la Federación.

Secretaría del Trabajo y Previsión Social. (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-028-STPS-1994. Relativa a la seguridad – código de colores para identificación de fluidos conducidos en tuberías. México D.F. Diario Oficial de la Federación.

Secretaría del Trabajo y Previsión Social. (1998). Norma Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998. Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas. México D.F. Diario Oficial de la Federación.

Sontakke, S. Cadenas, M. B. Maggi, R. G. Diniz, P. P. Breitschwerdt, E. B. (2009). Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology. *J Microbiol Methods.* 76: 217-225.

Struthers, J. K., Westran, R. P. (2003). *Clinical Bacteriology.* Washington, DC USA. ASM press.

Van Veen, S. Q. Claas, E. C. Kuijper, E. J. (2010). High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol.* 48:900-907.

Von Lilienfeld-Toal, M. Lehmann, L. E. Raadts, A. D. (2009). Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol.* 47:2405-2410.

Capítulo IV

Elementos básicos en el diseño y operación de un laboratorio de bioseguridad nivel III

*Johanna Bernáldez, Erika León, Ana P. Gutiérrez,
Tanya Camacho & Alexei Licea*

INTRODUCCIÓN

Este documento está diseñado con la finalidad de que el lector conozca los aspectos importantes que conciernen a todos los operadores de un laboratorio de contención – nivel de bioseguridad III. Es indispensable que cualquier usuario tenga conocimiento de las responsabilidades y obligaciones de las personas que trabajan con agentes biológicos infecciosos, así como el uso y mantenimiento de las instalaciones y equipos. También es de interés, que el operador identifique los estándares de bioseguridad que se establecen para el manejo adecuado del material de riesgo, la reducción del riesgo por exposición no intencional con el material infeccioso, las prácticas y Procedimientos Normalizados de Operación (PNO). Asimismo, que conozca las acciones preventivas, los planes de contingencia y descontaminación, así como la respuesta a emergencias en caso de accidentes.

En la designación del nivel de bioseguridad del laboratorio, la herramienta más útil para la evaluación del riesgo microbiológico, es la clasificación de los agentes biológicos en Grupos de Riesgo (GR). Esta clasificación ha sido basada en factores característicos de cada microorganismo, por lo que su asignación no difiere, en la mayoría de los casos, de las agencias regulatorias de cada país.

Para el caso particular del grupo de riesgo III, se basa en la consideración de manipular microorganismos que representan un riesgo elevado para el individuo. Usualmente causan enfermedades serias a humanos y animales, que resultan en consecuencias económicas importantes. Corresponde a eventos donde la diseminación no es ordinaria y depende del contacto casual de un individuo a otro, pero existe disponibilidad de medidas preventivas y terapéuticas eficaces. Este grupo de riesgo tiene como microorganismo representativo a *Mycobacterium tuberculosis*, por su alta transmisibilidad como resultado de una exposición por la vía de inhalación, causando enfermedades graves y letales a humanos.

La manipulación de los miembros de ese grupo de riesgo, exige fortalecer los programas de trabajo y de seguridad correspondientes a los laboratorios básicos – niveles de bioseguridad I y II. Por lo tanto, su manipulación debe ser exclusiva de laboratorios especializados de contención denominados laboratorios Nivel de Bioseguridad III, que están concebidos e instalados con modificaciones en aspectos relacionados a diseño e instalaciones especiales, prácticas y procedimientos normalizados de operación e incluyen la vigilancia médica y sanitaria.

Esta clasificación se vincula a la probabilidad de que se generen aerosoles como factor clave, y que debe tenerse en cuenta a la hora de determinar el nivel de riesgo y las medidas de mitigación o control necesarias. Por lo tanto, además de que el operador debe tener conocimiento del riesgo que conlleva manipular especies patógenas, es importante que se cuente con las instalaciones adecuadas para la contención de aerosoles al trabajar y ante un posible accidente debe existir un plan de contingencia. Es por eso, que este capítulo

incluye información que señala los principios básicos y elementos críticos, que se deben evaluar en la planificación, diseño y desarrollo de un proyecto de construcción; así como, buenas prácticas de manejo en las diferentes áreas de un laboratorio de contención – nivel de bioseguridad III, que contribuyan a la protección de todo el personal, y actúen como barrera protectora a la comunidad de los aerosoles que puedan generarse en el laboratorio.

Para la elaboración de este documento, fueron consultados los lineamientos y recomendaciones propuestos por la Organización Mundial de la Salud en su Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, el Departamento de Servicios de Salud Humana del Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC) y en las Normas Oficiales Mexicanas, entre otros.

Barreras de contención primaria

Las barreras de contención primaria abarcan los Equipos de Protección Personal (EPP), entre el usuario y el producto que se manipula; así como las Cabinas de Seguridad Biológica (CSB) mientras las muestras están siendo empleadas para la inoculación de cultivos. El equipo y la ropa de protección personal actúan como barrera para reducir al mínimo el riesgo de exposición a aerosoles, salpicaduras e inoculaciones accidentales.

Las características de los equipos de protección personal, varían en base al tipo de práctica que se esté realizando. A continuación se presenta una descripción general de los EPP, opciones de uso y algunas recomendaciones.

Bata de laboratorio

Las batas de laboratorio son una parte importante del equipo de protección personal. Existen diferentes versiones de batas, las que presentan una abertura frontal conocidas como batas de laboratorio y las que presentan una abertura por la espalda y que son conocidas como bata quirúrgica. Su función principal es brindar protección personal y su eficacia depende de su uso correcto.

Al trabajar en un laboratorio de contención nivel III, es recomendable el uso de batas quirúrgicas desechables que son muy prácticas pero su uso constante conlleva costos elevados para mantenerlas en inventario. En cambio, las batas quirúrgicas reutilizables de las que se muestra un ejemplo en la Figura 1, logran disminuir los costos pero se debe garantizar la esterilización de las mismas después de cada uso posteriormente lavarse y someterse de nuevo a un proceso de esterilización. En caso de un incidente que incluya contaminación es necesario que sean lavadas y esterilizadas de inmediato.

Todo el personal del laboratorio debe usar bata al ingresar a la unidad de trabajo, por lo cual debe existir una zona de vestuario en la que se puedan almacenar las batas de cada uno de los miembros del personal. Es importante recordar que las batas del laboratorio, no deben guardarse en los mismos armarios con la ropa que es empleada en el exterior del laboratorio. Siempre hay que disponer de batas de reserva en caso de contaminación.

Guantes

Los guantes deben garantizar impermeabilidad frente a agentes biológicos infecciosos, flexibilidad máxima y gran sensibilidad, a fin de posibilitar su uso en todo tipo de trabajo. Es necesario que se utilicen en todos los procedimientos que impliquen contacto directo con materiales potencialmente infecciosos. Pueden ser desechables ya sea de látex o nitrilo, y deben ajustarse con la mayor comodidad posible cubriendo hasta las muñecas. Para esto, son recomendables los guantes quirúrgicos estériles, tienen forma anatómica y presentan

puño largo de 30 cm. Otra opción según las actividades a realizar, son los guantes para exploración, que pueden o no ser estériles, con o sin forma anatómica.

Se debe tomar en cuenta los siguientes puntos para el uso de guantes: los guantes desechables no deben re-utilizarse ni llevarse puestos fuera del laboratorio. En una jornada larga de trabajo, se recomienda el cambio periódico de los guantes aún en ausencia de incidentes y deben ser reemplazados cuando estén visiblemente manchados o perforados, tampoco deben ser lavados o desinfectados para re-utilizarse. Los guantes contaminados pueden ser fuente de infección para otros trabajadores del laboratorio, si se utilizan para manejar o manipular equipo en el laboratorio. Por lo cual, una vez utilizados deben ser retirados de manera aséptica y posteriormente lavarse las manos con agua y jabón.

Asimismo, el personal del laboratorio debe ser adiestrado para retirarse los guantes correctamente. Los pasos básicos para desecharlos debidamente y en condiciones de seguridad incluyen: primero retirar un guante agarrándolo por debajo del puño y deslizándolo de modo que salga con el interior hacia fuera. Después, sujetar el otro guante cuidando de no tocar la superficie contaminada y deslizar los dedos desnudos bajo el puño del guante.

Es recomendable hacer uso de dos pares de guantes en una jornada de experimentos en el laboratorio, donde se sabe de antemano que se manipularán cultivos de patógenos. Es conveniente trabajar los cultivos de esta manera, de tal forma que al terminar la jornada, se retire el par de guantes más externo dentro de la cabina y sean dispuestos en una bolsa de Residuos Peligrosos Biológicos Infecciosos (RPBI), manteniendo así un par de guantes limpios para terminar el trabajo.

Respiradores

Los equipos de protección respiratoria se clasifican en función del tipo de cobertura que proporcionan al aparato respiratorio (nariz y boca), del mecanismo mediante el cual protegen al usuario del contaminante o de la deficiencia de oxígeno. Estos mecanismos son la purificación o el suministro de aire. Existen tres tipos de respiradores, que se describen a continuación.

Respirador purificador de media mascarilla

La media mascarilla cubre la nariz, boca y barbilla. La mascarilla está equipada ya sea con cartuchos que atrapan gases y vapores o con filtros que atrapan partículas y purifican el aire al respirar. Este tipo de respirador no suministra aire y no se puede usar en ambientes donde hay una deficiencia de oxígeno o en espacios cerrados. El respirador tiene un factor de protección de 10. Esto significa que quienes la utilizan solo pueden exponerse a contaminantes específicos que tengan una concentración de 10 veces o menor de los límites permitidos por el Límite de Exposición Permisible (PEL) determinados por la Administración de la Salud y Seguridad Ocupacionales (OSHA) para sustancias peligrosas.

Respirador purificador de aire de cara completa

Los respiradores de cara completa proporcionan mayor protección que los de media mascarilla porque tienen una forma que permite que selle mejor alrededor de la cara y un protector fácil que protege a los ojos de sustancias peligrosas. El respirador de cara completa utiliza el mismo tipo de cartuchos y filtros que el de media cara y tienen las mismas limitaciones debido a que no puede usarse en ambientes con deficiencia de oxígeno o espacios cerrados. El respirador purificador de aire de cara completa tiene un factor de protección de 50.

Respirador motorizado purificador de aire

Trabaja mediante un sistema motorizado que utiliza cartuchos y filtros para limpiar el aire ambiental antes de que llegue mediante un flujo constante a la zona de respiración de quien lo usa. Un sistema completo incluye un ventilador, una batería, una pieza para la cabeza y un tubo para respirar. Los respiradores motorizados purificadores de aire tienen las mismas limitaciones que los de media mascarilla o cara completa. Pero presentan un factor de protección de 25 a 50.

En el caso de un laboratorio donde se trabaje con la micobacteria causante de la tuberculosis, es necesario el uso de respiradores cuando se trabaja en la cabina de seguridad biológica, manipulando cultivos o material potencialmente infeccioso; así como, en casos de que se produzca un peligro biológico accidental (como un derrame de medio que contenga el agente infeccioso) fuera de la cabina de seguridad biológica. En estos casos, como se muestra en la Figura 1, es necesario utilizar respiradores de media mascarilla N95, que son respiradores ligeros y desechables, cubren la nariz y la boca, y filtran el 94-95 % de las partículas de 0.3-0.4 μm que se encuentran en el ambiente. Si se utilizan respiradores en un laboratorio, todo el personal debe ser instruido y capacitado para utilizarlos y ajustarlos correctamente, así como informarle de sus limitaciones. El personal debe pasar una prueba de ajuste para asegurar que no se producen fugas. Los respiradores no deben considerarse un sustituto de trabajo en una cabina de bioseguridad biológica.

El procedimiento general para ajustar el respirador consiste en sujetarlo con la mano en forma de copa, situando la pieza nasal en la punta de los dedos y las cintas de la cabeza deben quedar colgando libremente. Se debe colocar el respirador bajo la barbilla con la pieza nasal hacia arriba. Pasar la cinta superior por encima de la cabeza y colocarla en la parte posterior alta; tirar de la cinta inferior por encima de la cabeza y colocarla alrededor del cuello por debajo de las orejas. Colocar las puntas de los dedos de ambas manos en la parte superior de la pieza nasal metálica. Utilizando las dos manos, moldear la zona nasal para adaptarla a la forma de la nariz presionando hacia el interior al mismo tiempo, que se mueven las yemas de los dedos a lo largo de la pieza nasal. Una vez que se ha colocado y ajustado el respirador, el usuario nunca deberá tocar la parte frontal ni colocarlo debajo de la barbilla o sobre la cabeza. Al momento de removerlo, el usuario solo manipulará las bandas sin tocar la parte frontal del respirador.

Lentes

Este accesorio sirve para proteger los ojos de salpicaduras, impidiendo la penetración de partículas y cuerpos extraños. En ocasiones, una pantalla facial puede proteger los ojos. Sin embargo, es recomendable un protector específico que sea independiente o forme un complemento del protector facial. Entre los materiales de uso común para la fabricación de los lentes son los policarbonatos, las resinas acrílicas y los plásticos con base de fibra.

Calzado

El calzado deberá ser cubierto con botas quirúrgicas o reemplazado por calzado de uso exclusivo para laboratorio de contención. No está permitido el uso de zapatillas o zapatos con suela resbalosa. El material de la suela es muy importante y debe presentar un coeficiente de fricción elevado, por lo general se usan suelas externas de caucho o sintéticas. La Figura 1, resume el equipo de protección personal recomendado, que debe utilizar el usuario de un laboratorio de contención nivel III.



Figura 1. Fotografía de una persona utilizando el Equipo de Protección Personal (EPP), de lado superior e inferior izquierdo, se muestra el uso correcto del respirador, cubre cabello y bata quirúrgica, el lado superior derecho el uso de doble guante y lado inferior derecho los cubre zapatos. Fotografía: Marvin Eliu Garay.

Cabinas de seguridad biológica (CSB)

Las cabinas de seguridad biológica, son equipos clave para un laboratorio de contención, ya que su función es dar protección a las personas y al ambiente, contra la exposición a las salpicaduras y aerosoles infecciosos, que se pueden generar al manipular material que contenga agentes infecciosos. Cualquier actividad que transmita energía a un material líquido o semilíquido, por ejemplo al agitarlo, removerlo o verterlo sobre una superficie u otro líquido, puede producir aerosoles.

Según la clasificación de las CSB, se ofrecen distintos grados de protección frente a la contaminación de muestras y cultivos, garantizando la existencia de ambientes controlados. Existen tres clases de cabinas de bioseguridad, conocidas como I, II y III. A su vez las cabinas clase II pueden ser de varios tipos, A1, A2, B1 y B2, los cuales clasifican las variaciones en los flujos de aire, las velocidades, la ubicación del filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air, por sus siglas en inglés) en la cabina, las tasas de ventilación y

los métodos de evacuación del aire. Las CSB clase I y II son las más indicadas para los laboratorios de riesgo moderado y de alto riesgo respectivamente.

La CSB de clase I ofrece protección personal y del entorno, pero no del producto. Lo cual contribuye a aumentar las tasas de contaminación, en especial al trabajar con medios de cultivo líquidos. En cambio una CSB de clase II, ofrece protección personal, del entorno y del producto. Teniendo en cuenta estas consideraciones, se explicará de forma extensa la importancia del uso de la CSB nivel II.

Características de CSB clase II

Estas cabinas tienen dos rejillas, una frontal y una trasera, por las cuales se succiona el aire que circula sobre el área de trabajo. El aire que proviene del laboratorio y que pasa alrededor del trabajador a una determinada velocidad, es succionado a través de la rejilla frontal. La cabina tiene un filtro HEPA a través del cual se suministra un flujo de aire vertical laminar (denominado filtro HEPA de suministro) para proteger al producto y evitar la contaminación cruzada en la superficie de trabajo. También tiene un segundo filtro HEPA a través del cual sale el aire de la cabina (denominado filtro HEPA de extracción), por lo que el aire que circula dentro de la cabina está libre de contaminantes y puede ser reciclado. Se identifica la cabina como de tipo A, si la cabina recicla el aire dentro del laboratorio. Si se extrae el aire hacia el exterior a través de un ducto, se identifica la cabina como de tipo B.

Características de CSB clase II tipo A

El ventilador del equipo absorbe el aire (del ambiente) a través de la abertura frontal a una velocidad promedio de 75 pies lineales por segundo (38.1 cm/s). El aire es suministrado verticalmente a la superficie de trabajo a través del filtro HEPA de suministro y fluye de forma laminar libre de partículas. El flujo laminar minimiza el potencial de contaminación cruzada sobre la superficie de trabajo. El aire que fluye dentro de la cabina, a medida en que se aproxima a la superficie de trabajo, se divide en dos corrientes, una que va hacia la rejilla delantera y otra que va hacia la rejilla trasera. El aire succionado a través de las rejillas frontal y trasera es descargado por el ventilador a través de un sistema de ductos, al espacio localizado entre los filtros HEPA de suministro y extracción. Estos filtros están localizados en la parte superior de la cabina y debido al tamaño relativo de los filtros, aproximadamente el 30% del volumen del aire que circula es extraído de la cabina; el 70% restante es recirculado hacia la zona de trabajo. La mayoría de las cabinas Clase II Tipo A, tienen controles para regular la relación 30/70 del flujo de aire. Estas cabinas se usan para trabajar con agentes de bajo o moderado riesgo biológico. Es de suma importancia mencionar que está prohibido trabajar en este tipo de cabinas con materiales que sean tóxicos o volátiles.

Cabina de Seguridad Biológica Clase II tipo A2

Todas las manipulaciones que involucren el agente infeccioso deberán llevarse a cabo en la CSB. En los laboratorios deben existir Procedimientos Normalizados de Operación (PNO) para trabajar en la cabina y todo el personal debe estar entrenado para seguir estos procedimientos, de forma teórica y práctica. Los procedimientos que involucran su uso son: procedimiento para uso de la cabina; procedimiento en caso de derrame o salpicadura dentro de la cabina; de limpieza mensual y anual; de cambio de filtro HEPA y de lámpara luz UV; calibración de lámpara luz UV y del filtro HEPA; bitácora de usuario de cabina y bitácora de descontaminación.

Las cabinas de seguridad biológica funcionan mediante los principios de filtración y retención de partículas mediante filtros HEPA, flujo laminar y flujo direccional. Los componentes de una cabina de bioseguridad biológica son: Filtros HEPA, Motor/Ventilador

para que fluya el aire a través de la cabina, y rejillas para controlar el balance del aire en la cabina.

Filtros HEPA

Los filtros HEPA son desechables y elaborados comúnmente de microfibras de borosilicato dentro de una capa delgada. Esta capa se pliega para incrementar el área de superficie. Los pliegues son adheridos mediante pegamento formando una estructura, la cual se inserta dentro de un marco. Los filtros HEPA tienen una eficiencia mínima de retención de partículas del 99.99%, cuando el tamaño de las mismas en promedio es de 0.3 μm . Estos filtros resultan adecuados para retener los aerosoles que se generan cuando se realizan procedimientos experimentales con agentes biológicos como agitación, centrifugación o mezclado. El filtro HEPA se encuentra en el sistema de salida de aire de una CSB la cual captura de manera eficaz los organismos infecciosos y asegura que la CSB solo evacúe aire libre de microorganismos.

Flujo Laminar

El flujo laminar se define como el movimiento del cuerpo de aire en una sola dirección con una velocidad uniforme. El flujo laminar descendente de aire dentro de la cabina, captura cualquier aerosol generado dentro de la cabina y es dirigido hacia los filtros HEPA.

Flujo Direccional

El flujo de aire direccional juega un papel clave en el rendimiento de la CSB. El aire es aspirado en la parte frontal de la cabina en la parrilla delantera. Esta cortina de aire hace que sea más difícil para los aerosoles escapar de la zona de trabajo de la cabina hacia el exterior.

Motor/Ventilador

El conjunto de motor / ventilador empuja el aire del ambiente al frente de la cabina y recircula internamente. Durante su recirculación, el aire se divide en dos corrientes separadas. Una corriente se dirige hacia el filtro HEPA de salida y de ahí al exterior, la segunda corriente pasa a través del filtro HEPA de suministro y luego fluye hacia abajo a través de la zona de trabajo.

Técnicas para evitar la dispersión de material infeccioso dentro de la cabina

Para evitar la dispersión del material infeccioso, se recomienda poner un campo de trabajo de material absorbente o toallas con un desinfectante adecuado, que después de ser utilizado o en caso de derrame, sea retirado inmediatamente e introducido en bolsas especiales que tengan el símbolo de riesgo biológico, para su posterior desinfección en autoclave. Para el uso de pipetas serológicas dentro de la cabina, todas las pipetas deben tener trampas de algodón para reducir la contaminación en los dispositivos de pipeteo automático. Debe evitarse la expulsión rápida de material biológico aspirado en una pipeta. No deberá introducirse aire con fuerza de una pipeta en líquidos potencialmente infecciosos. Cuando se utilice una pipeta para añadir un reactivo a un líquido potencialmente infeccioso, se deberá apoyar la pipeta contra la pared interior del recipiente y se dejará salir el líquido suavemente. Se evitará el romper burbujas en un tubo de cultivo abierto. Si eso se requiere, se colocará de nuevo el tapón, se darán unos golpes suaves en la parte superior del tubo, y tras esperar algunos minutos, para que se hayan depositado los aerosoles, se abrirá de nuevo. Al decantar líquidos, se debe asegurar que los tubos se sujeten con cierto ángulo de manera que el líquido se deslice por el lateral del tubo, o se desechará el recipiente para reducir al mínimo las posibles salpicaduras. Las puntas de las micropipetas contaminadas deben sumergirse completamente en un desinfectante

apropiado al agente que se manipula; permaneciendo sumergida en un recipiente irrompible durante el tiempo necesario para su desinfección (Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de Tuberculosis (OMS)).

Las muestras y cultivos para desecho, deben introducirse en bolsas impermeables especiales para autoclave etiquetadas con el símbolo de riesgo biológico. Es recomendable no cerrar las bolsas por completo cuando se van a esterilizar, ya que el vapor debe introducirse para esterilizar apropiadamente, se recomienda dejar un orificio de una pulgada. Las zonas de trabajo se descontaminarán con un desinfectante apropiado después de cada periodo de trabajo, esto incluye antes de iniciar y al término del periodo de trabajo.

Para evitar que el material biológico caiga del asa bacteriológica mientras se realiza un ensayo, ésta debe tener un diámetro de 2-3 mm y terminar en un anillo completamente cerrado, los mangos no deben ser de gran longitud para reducir la vibración al mínimo. Es recomendable el uso de asas desechables. Toda asa bacteriológica que entre en contacto con material infeccioso deberá ser colocada dentro de la cabina en un recipiente de residuos peligrosos. Nunca se sacará un asa contaminada de la cabina sin previa desinfección. Sólo se podrá retirar de la cabina en el contenedor de residuos peligrosos cerrado.

Ubicación

Las corrientes de aire que generan las personas al caminar, abrir y cerrar las puertas, pueden alterar la integridad del flujo de aire que entra a la cabina de bioseguridad, si ésta se encuentra cercana a un punto transitado en el laboratorio. Es por eso que la CSB debe situarse en una zona de poco tránsito en el laboratorio de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Operarios

El objetivo principal de las cabinas de bioseguridad es proteger al personal que trabaja en el laboratorio, por lo que es necesario que el personal que trabaja en un laboratorio de contención conozca los protocolos y manuales de operación y de seguridad de las CBS, principalmente para no disminuir el efecto protector de la cabina.

Colocación del material

La rejilla frontal de entrada de las CSB de clase II no debe estar bloqueada con papeles, instrumentos u otros materiales. Como se muestra en la Figura 2, todo trabajo se debe realizar sobre una toalla absorbente, empapada en desinfectante y colocada de modo que recoja todas las salpicaduras y derrames. Todos los materiales deben colocarse lo más adentro posible de la CSB, es decir, hacia el borde posterior de la superficie de trabajo, sin bloquear la rejilla posterior. El material que pueda generar aerosoles, como el agitador, deberá colocarse hacia el fondo de la cámara. Los artículos voluminosos, como las bolsas específicas para residuos biológicos y los recipientes de desecho, deberán colocarse a un lado del interior de la CSB. El trabajo debe proceder desde las zonas limpias hacia las zonas contaminadas sobre la superficie de trabajo. Nunca debe introducirse documentos dentro de la CSB. La cámara no debe sobrecargarse con materiales y equipos porque la sobrecarga influye en la eficiencia del flujo de aire.



Figura 2. Cabina de Seguridad Biológica clase II tipo A2. Se muestra la distribución y acomodo recomendado de materiales en la cabina. A la izquierda se encuentra el área limpia donde se puede colocar las micropipetas y las gradillas de uso, así como las puntas para las micropipetas. Al centro se localiza la zona de trabajo, donde se dispone una capa absorbente sobre la superficie de trabajo y es ahí donde las muestras se inoculan. A la derecha se encuentra la zona sucia, donde se colocan los contenedores o bolsas de residuos peligrosos biológico infecciosos. Esta disposición puede invertirse para las personas zurdas. Fotografía: Marvin Eliu Garay.

Derrames

Se debe tener un protocolo establecido para casos cuando se presente algún derrame dentro de la cabina. El protocolo debe ser leído y comprendido por todas aquellas personas que utilicen la cabina. La limpieza del derrame debe ser inmediata, tratando de minimizar la producción de aerosoles y utilizando un desinfectante eficaz dependiendo del organismo que se esté trabajando.

Limpieza

Después de realizarse un experimento dentro de la cabina de bioseguridad, todos los materiales que estén dentro deben limpiarse antes de extraerse. Así mismo, se deben limpiar todas las superficies de trabajo, incluyendo la parte trasera de la cabina, las paredes laterales y el interior del cristal de la cabina y charola, utilizando un desinfectante apropiado para inactivar al microorganismo con el que se haya trabajado. Es importante dejar la cabina en funcionamiento unos minutos después para re-circular y limpiar el aire en su interior.

Certificación

Después de la instalación de una CSB o cuando se mueve de lugar, la cabina debe estar certificada para su funcionamiento adecuado, con la finalidad de que las personas que trabajan en ella no vean comprometida su seguridad. Las pruebas deben ser realizadas por personal capacitado y experimentado para realizar pruebas de integridad de la cámara y de los filtros HEPA, de la velocidad del flujo de aire, la presión negativa y alarmas. Además deben revisarse las instalaciones eléctricas, de iluminación y luz UV.

Plan de acción y de preparación para emergencias

Debido al alto riesgo asociado a la manipulación de microorganismos patógenos, un laboratorio de bioseguridad nivel III debe contar con un plan de preparación para

emergencias, este plan debe incluir los procedimientos operativos y de respuesta para 1) desastres naturales, 2) riesgo asociado a exposición y descontaminación; 3) tratamiento médico de emergencia para personas expuestas; 4) vigilancia médica para el personal y para personas expuestas a posible contaminación; 5) manejo clínico de personas expuestas; 6) epidemiología 7) regreso a trabajar en el laboratorio.

Para la elaboración de éstos planes de acción, es necesaria la participación de personal con experiencia en bioseguridad, del personal que labore en el laboratorio de bioseguridad nivel III, del personal de seguridad, así como de las autoridades locales específicamente las autoridades sanitarias.

Barreras de contención secundaria

De acuerdo al Manual de Bioseguridad en el Laboratorio (OMS), se considera barrera secundaria la protección que brindan las instalaciones del laboratorio a todo el personal, protegiendo asimismo a la comunidad de agentes infecciosos que puedan crearse en el laboratorio, siendo indispensable el diseño y la construcción apropiada de las instalaciones. El concepto de barrera secundaria, involucra las características concretas del laboratorio, incluida la separación de distintas zonas y el sistema de ventilación. Las barreras secundarias que se recomiendan para un laboratorio, dependen de los procedimientos que se lleven a cabo y del riesgo de transmisión que llevan asociado. Aquí se describen los principios mínimos necesarios que deben ser evaluados al planificar la construcción y operación de un laboratorio de contención – nivel de bioseguridad III, tomando como referencia el laboratorio desarrollado en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) dentro del edificio del Departamento de Innovación Biomédica y que está diseñado para la manipulación principalmente de cultivos de *M. tuberculosis*.

Principios básicos en el diseño de un laboratorio de contención

De forma general, esta sección enlista los requisitos mínimos que deben considerarse en la planificación de un laboratorio, y que son mencionados en el Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de la OMS.

- Se inicia la planificación a partir de una evaluación de riesgo identificando el microorganismo con el que se va a trabajar y qué se va a hacer con él. Es decir, si su uso será diagnóstico, investigación o producción.
- El aire del laboratorio debe ser filtrado y fluir de las áreas limpias hacia las áreas más contaminadas o de mayor riesgo.
- Se requiere usar filtros HEPA en la extracción de aire.
- El laboratorio debe estar separado o aislado de las áreas comunes, ya sea del laboratorio general o de áreas públicas, por medio de una zona de acceso controlada.
- La entrada debe ser a través de un vestíbulo o esclusa con puertas conectadas de cierre automático y sistema de interbloqueo, evitando que dos puertas estén abiertas al mismo tiempo.
- Se debe tener un mínimo de dos puertas destinadas a mantener la diferencia de presiones entre el laboratorio de contención y el espacio adyacente, además esta área podrá cumplir la función de vestidor.
- Todas las ventanas deben estar cerradas y selladas.
- Se requieren monitores visuales de presurización y alarmas visuales y auditivas.
- Se requiere de cabinas de bioseguridad para trabajar dentro del laboratorio.

- Se debe contar con lavamanos operados por pie o infrarrojo.
- Se deben usar equipos donde se puedan controlar los aerosoles.
- Se necesita contar con un sistema de vigilancia sanitaria y disposición de residuos biológicos infecciosos.

Elementos críticos en la planificación

Las consideraciones críticas en la planificación y desarrollo de un laboratorio de contención, inician haciendo un análisis de las condiciones naturales del área, como temperaturas ambientales (por ejemplo heladas, calores extremos), zona de huracanes, tornados o terremotos, así como establecer el área física donde se construirá el laboratorio. Éste debe estar separado de las zonas del edificio general por las que se circula sin restricciones. Puede realizarse una separación suplementaria habilitando el laboratorio al fondo de un pasillo o instalando un sistema de acceso que delimite un pequeño vestíbulo (como entrada de doble puerta), destinado a mantener la diferencia de presiones entre el laboratorio y el espacio adyacente.

Uno de los puntos más importantes y críticos en el diseño, es la planificación del sistema mecánico redundante de ventilación (extracción y suministro). Es indispensable considerar un diseño de ingeniería para el flujo direccional de aire y cambios de aire por hora, así como la ubicación de las salidas de aire y su efecto con los equipos de contención primaria o con remoción de aerosoles. El aire que ingresa o que se descarga al exterior debe ser filtrado por un sistema HEPA. Las zonas de descarga del aire deben ser áreas estrictamente alejadas de la circulación de personas o animales, nunca ser re-circulado a otra área del edificio. Puede instalarse un sistema de control de la calefacción, la ventilación y el aire acondicionado para impedir una presión positiva sostenida en el laboratorio. El sistema de ventilación del edificio debe estar construido de modo que el aire del laboratorio no se dirija a otras zonas del edificio. Es recomendable el instalar alarmas audibles o claramente visibles para alertar al personal de posibles fallos del sistema de calefacción, ventilación y aire acondicionado.

Es indispensable conocer los requerimientos mínimos en el diseño del laboratorio y equipamiento del mismo. Se recomienda informar a la parte contratista que llevará a cabo la obra, de las características que debe llevar el sistema eléctrico requerido. Considerar el total de tomas eléctricas por circuito, esto incluye número de contactos (regulados o normales) y voltaje (110 y/o 220). Indicar las necesidades especiales de iluminación, como lámparas de luz ultravioleta (UV). Si se requerirá voz y datos, así como la ubicación exacta de los mismos. Del sistema hidro-sanitario, los requerimientos incluyen el tipo de agua, si requiere temperatura especial, humedad de las áreas, tipo de drenaje y la estimación de su uso (cantidad, en litros). Para cancelería, se debe informar si se requieren puertas dobles o sencillas, la cantidad de ventanas y sus dimensiones; aquí se incluye la especificación si se requerirá transfer sanitario, como se observa un ejemplo en la Figura 4, inciso B. En caso de necesitar servicios especiales como líneas de vapor, aire comprimido, vacío o gases (nitrógeno, O₂, CO₂) será necesario indicarlo, así como la especificación de la ubicación de la toma y si requiere alguna presión o flujo específico. En caso de no tener condiciones especiales para los requerimientos mínimos, se recomienda hacer uso de los establecidos por la NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, titulada “Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos”. En caso de utilizarse animales o plantas, debe considerarse el tamaño de los mismos y el diseño de módulos de contención autoventilada, así como iluminación controlada en esos cuartos.

Puntos críticos en la construcción

Cada cuarto debe tener 10 cambios de aire por hora, como mínimo. Para verificación de esto, se realiza una prueba con un balómetro, en la cual se mide por triplicado el flujo de aire de cada uno de los filtros terminales HEPA, se calcula el flujo promedio y el flujo total. Se calculan los cambios de aire por hora (CAH) con la siguiente fórmula $CAH = Q/V$; donde Q = flujo de aire (m^3/h) y V = volumen del área (m^3). Todos los filtros HEPA deberán estar instalados de modo que permitan la descontaminación con gases y la realización de pruebas.

Como generalidades de construcción, hay varios aspectos que considerar. En el diseño de la plomería se recomienda que el abastecimiento de agua esté dotado de dispositivos contra el reflujo. Los tubos de vacío podrían estar protegidos con sifones con desinfectante líquido y filtros HEPA o su equivalente. Las bombas de vacío alternativas también deben estar debidamente protegidas con sifones y filtros. En el diseño de sistemas de controles, la sala del laboratorio debe sellar para su descontaminación. Asimismo, los sistemas de conducción de aire han de estar contruidos de modo que sea factible la descontaminación con gases. Del diseño en la integración de los equipos al laboratorio, preferentemente hacer alusión a diseños de espacios para remover equipos obsoletos del laboratorio. Por otro lado, se requiere que una vez que el laboratorio esté funcionando, sea verificado constantemente y que exista un compromiso del contratista en el éxito del proyecto. Todo esto hará que se puedan detectar y resolver de manera temprana los posibles conflictos operacionales. Para esto, es indispensable una participación activa de todo el personal involucrado en el diseño, construcción, comisionamiento, mantenimiento y operación del laboratorio para garantizar el éxito del proyecto.

Antes de la puesta en marcha del laboratorio de bioseguridad nivel III, es necesario validar si el proyecto satisface los criterios del diseño, este proceso se conoce como comisionamiento. El proceso de comisionamiento asegura que el laboratorio fue construido y funciona tomando en cuenta como fue diseñado. Para esto, es importante hacer revisiones y pruebas de los componentes por ejemplo: motores, generadores y válvulas de aire. También involucra la revisión y las pruebas de sistema incluyendo los sistemas de extracción y los sistemas de energía de respaldo, así como la revisión y pruebas de los sistemas integrados, por ejemplo: los sistemas de ventilación (tanto de suministro como de extracción); la integración de sistemas especiales (gabinetes de bioseguridad); las pruebas de falta de energía y el reinicio de los sistemas.

En relación a todo lo anterior, el diseño de las instalaciones y los procedimientos de trabajo del laboratorio de contención –bioseguridad nivel III deben estar documentados de acuerdo a las normas aplicables. En la Figura 3, se presenta un ejemplo de diseño de un laboratorio de bioseguridad nivel III.

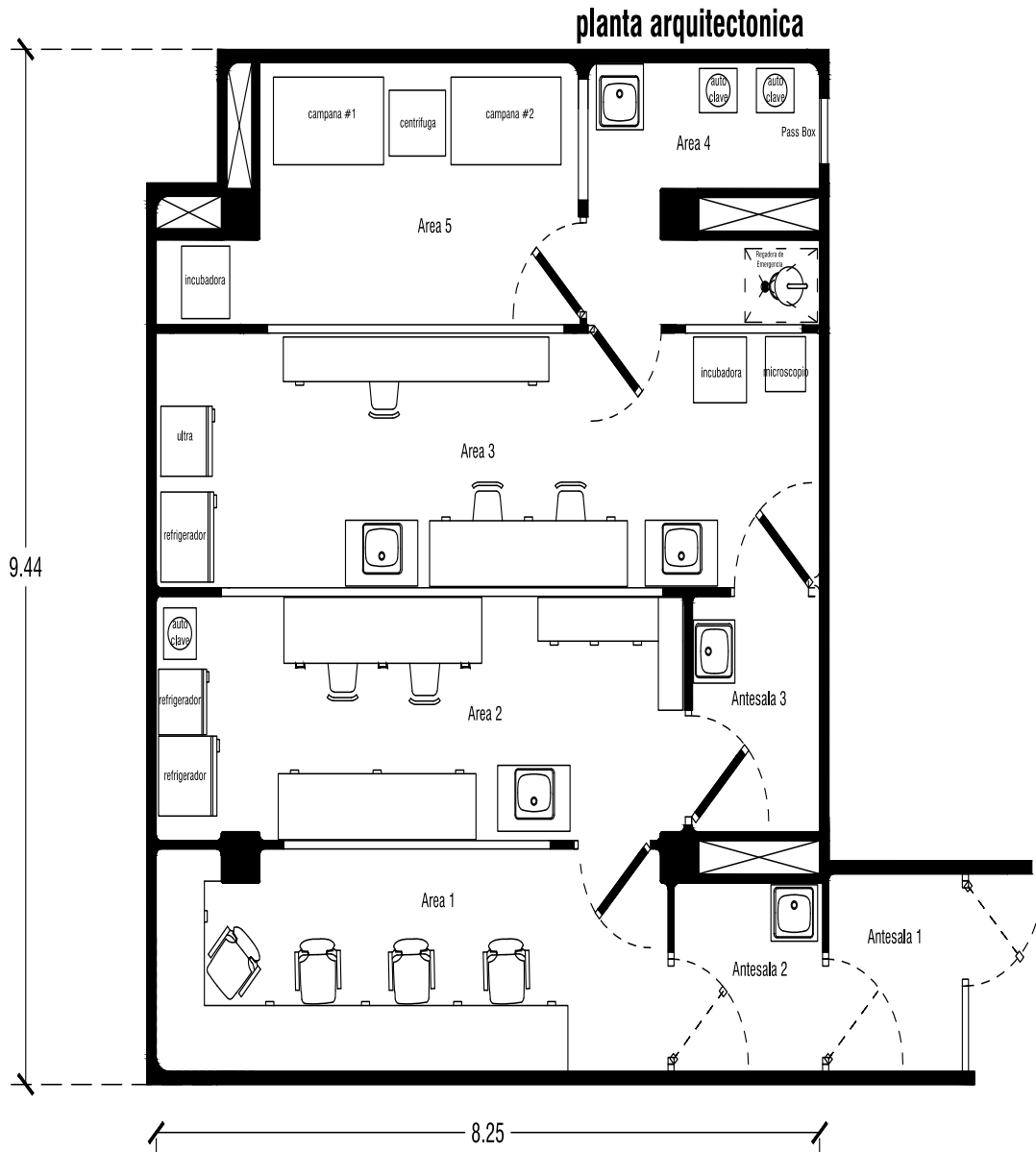


Figura 3. Planos arquitectónicos que ilustran la distribución del laboratorio de contención nivel III del Departamento de Innovación Biomédica, del CICESE. La corriente de aire circula con presión negativa (hacia el interior del laboratorio) y todo el trabajo con material infeccioso se manipula en una Cabina de Bioseguridad. El acceso al laboratorio se realiza a través de un vestíbulo (entrada de doble puerta), que lo separa del laboratorio de bioseguridad nivel III. En la distribución de las áreas se muestran los equipos con los que cuenta el laboratorio. Elaborado por Ing. Ernesto A. Ayón Labastida (CICESE).

Sistema HVAC

Las áreas construidas durante el proyecto deben cumplir con una serie de requisitos mínimos de instalación, operación y desempeño lo que asegurará el trabajo de los operadores. Por lo tanto, el diseño y construcción de los cuartos limpios debe permitir su limpieza, orden y mantenimiento, así como la prevención de la contaminación. Se debe garantizar que las actividades realizadas se efectúen en un ambiente controlado y seguro. Al sistema de aire acondicionado y calefacción se le conoce como HVAC (Heating, Ventilation and Air Conditioning, por sus siglas en inglés). La instalación de un sistema de tal naturaleza tiene la finalidad de lograr las condiciones ambientales establecidas en los requerimientos propuestos por el usuario, para controlar la calidad del aire interior y las posibles contaminaciones. El sistema HVAC está integrado por un sistema de inyección, sistema de enfriamiento y calefacción, sistema de monitoreo de presión diferencial, sistema de control de temperatura y humedad, y sistema de extracción de aire. Todos los anteriores están relacionados y operan de manera independiente.

A continuación, se presenta de forma específica cada uno de los sistemas mencionados, tomándose como ejemplo las características establecidas en el laboratorio de contención de CICESE.

Sistema de inyección de aire

El sistema puede estar construido por equipos y accesorios como la Unidad Manejadora de Aire (UMA), redes de ductos de inyección, compuertas manuales de inyección de aire, rejillas y filtros terminales. La UMA que se encuentra en el laboratorio de contención del CICESE es de tipo horizontal, construida a base de lámina galvanizada y paneles prefabricados con acero pre-pintado y revestimiento de aluminio-zinc, y dos revestimientos metálicos interconectados por un núcleo aislante de PUR (Poliestireno de alta densidad) de superficies lisas e impermeables, sin ranuras o espacios libres y salientes. La UMA está integrada por la sección de caja de mezcla, la sección de filtros con eficiencia del 35 %, sección de enfriamiento y calentamiento, sección del ventilador, sección de filtros tipo bolsa con eficiencia del 65 %, sección de difusor de aire, sección de filtros con eficiencia del 95 % y finalmente, la sección de pleno de descarga. La UMA cuenta con un drenaje completo con la finalidad de permitir la salida de los condensados, así como una base anti-vibratoria. También incluye un cuadro de válvulas para el suministro de refrigerantes a los serpentines.

Funcionamiento del sistema HVAC

En lo relacionado, la NOM-059-SSA1-2013 señala que no debe existir recirculación de aire en los sistemas HVAC de áreas donde se procesan organismos patógenos viables para evitar su liberación al ambiente. Por lo tanto, el diseño y operación del sistema HVAC, se debe apegar a esta norma. En el laboratorio de contención al que hemos hecho referencia, el funcionamiento del sistema permite que el aire proveniente del exterior pase por una primera etapa de filtración con una eficiencia del 35 %. Posterior a esto, el aire pasa por el primer serpentín donde la humedad es ajustada a los requerimientos del usuario, para después dirigirse al segundo serpentín donde es ajustada la temperatura, hasta alcanzar las condiciones deseadas. Después, pasa por la sección del ventilador para ajustar la velocidad y flujo de aire, al requerido. Este aire pasa por una segunda etapa de filtración de 65 % para enseguida dirigirse a la etapa final de filtración, con eficiencia de 95 %. Finalmente, este aire pasa por la sección de pleno de descarga y es enviado por la red de ductos de inyección a los cuartos, en donde es suministrado por medio de filtros terminales HEPA. Las redes de ductos están fabricadas en lámina de acero galvanizado de sección rectangular, y están selladas en todas sus uniones. Para regular el flujo de aire de inyección, se instalaron compuertas de accionamiento manual en todos los ductos de inyección. El

aire inyectado a todas las áreas del laboratorio de contención es a través de filtros terminales HEPA con una eficiencia de 99.99 %.

Sistema de enfriamiento y calentamiento

Este sistema se compone de una unidad condensadora que funciona sólo para enfriamiento, una unidad condensadora que funciona como bomba de calor y una sección de serpentines. Para el control de temperatura se fija un punto, por ejemplo: $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por lo tanto, al incrementar la temperatura en el área, se envía una señal al controlador y éste manda una señal a la unidad condensadora de enfriamiento para que inicie el enfriamiento, de tal forma que al dar la condición requerida la unidad condensadora se apagará, repitiéndose el ciclo las veces que sea requerido. En el caso de que la temperatura esté por debajo de lo indicado, la unidad condensadora de calor, entrará en funcionamiento para dar las condiciones requeridas. Para la humedad, se fijará un límite, por ejemplo: 75 % de humedad relativa (HR), donde un incremento de humedad en el área, enviará una señal al controlador para que se accione la unidad condensadora (bomba de calor) e inicie el proceso de deshumidificación, y al llegar a la condición requerida el equipo se apagará, repitiéndose el ciclo las veces que sea necesario.

Sistema de monitoreo de presión diferencial

La presión diferencial debe ser monitoreada por medio de manómetros, y registrada entre cada cuarto. La presión diferencial se obtiene mediante puertos de registros ubicados en cada área, mismos que son dirigidos a los manómetros por medio de líneas de registro.

Sistema de extracción de aire

El sistema de extracción de aire consta de dos ventiladores de extracción que se encuentran conectados por ductos a rejillas de extracción altas y bajas, instaladas a nivel de pared. Cada unidad cuenta con un banco de filtros, donde en cada uno de éstos se alojan dos filtros de eficiencia 35 % y 95 %, colocados uno tras otro respectivamente. Para su funcionamiento, el aire suministrado a las áreas es extraído por medio de los ventiladores y éste aire pasa primero por el filtro de 35 % para inmediatamente después pasar por el siguiente filtro de 95 % y finalmente, ser descargado al exterior.

Calificación de sistema HVAC

Se deben realizar pruebas de pérdida de energía eléctrica, donde se verifique y documente el estado de los equipos del sistema HVAC, antes de la falla o pérdida de energía eléctrica. El procedimiento que se emplea es el siguiente: 1) simular una falla o pérdida de energía eléctrica por tres minutos; 2) documentar el estado de los equipos de los sistemas de aire HVAC durante la falla; 3) finalmente, restablecer la energía eléctrica y documentar.

La NOM-059-SSA1-2013 señala que el sistema HVAC debe calificarse tomando en consideración al menos los siguientes parámetros: 1) temperatura; 2) HR de las áreas que alimenta; 3) volumen de inyección y extracción de aire; 4) diferencias de presión entre las áreas; 5) número de cambios de aire; 6) conteo de partículas; 7) flujos de aire; 8) niveles de limpieza; 9) velocidad de flujo y 10) pruebas de integridad.

Diseño de distribución de áreas

El laboratorio debe contar con antecámaras de acceso controlado a través de un mínimo de dos puertas, para mantener la presión diferencial entre el laboratorio y los espacios adyacentes. El sistema de doble puerta, debe ser de cierre automático y disponer de un sistema de interbloqueo, donde sólo una de ellas puede estar abierta al mismo tiempo. Debe ajustarse el sensor de cada puerta, a un espacio de varios segundos en lo que

cierra una puerta y se pueda habilitar la siguiente. Por otro lado, estas áreas llegan a funcionar como vestidores, por lo que se debe contar con espacios para separar la ropa limpia de la sucia. En cada una de estas áreas se debe disponer de un lavabo de funcionamiento automático con sensor (libre de manos), como se muestra en el ejemplo de la Figura 4 inciso C y en algunas ocasiones puede ser necesaria una ducha. En las inmediaciones de todas las puertas de salida del laboratorio deberá existir un lavabo que no sea accionado con la mano.

Las superficies de las paredes, pisos y techos deben ser impermeables y fáciles de limpiar. Todas las aberturas existentes en esas superficies (tuberías de servicio) deben estar obturadas para facilitar la descontaminación del área. Los tipos de paredes que se pueden emplear son los clásicos paneles de yeso, bloques de cemento, concreto fundido en sitio, recubiertos con acabados especiales para su fácil limpieza; hasta materiales especiales como paneles de fibra de vidrio reforzados. Para el caso de los materiales de uso para los pisos, existen los epóxicos y vinílicos, sin juntas. Las ventanas deben estar cerradas herméticamente y llevar cristales resistentes a la rotura.

Acabados finales

Los acabados de los muros, techos y pisos tienen que ser lisos y libres de grietas. Las uniones piso-muro, muro-techo y muro-muro deben contar con curvas sanitarias, para permitir su limpieza fácil, como se puede observar en la Figura 4, inciso A. El criterio de aceptación de las condiciones de las puertas, deben incluir acabados sanitarios lisos, libres de abolladuras y/o raspaduras. El material de construcción de las puertas debe ser de material sanitario, de igual forma debe considerarse este mismo criterio para las manijas. Debe corroborarse que las puertas estén niveladas. El gabinete de las lámparas de cada área deberá estar empotrado y a paño al techo. Deberá encontrarse libre de materiales extraños, así como contar con todas las luminarias. Aquí incluimos que las mesas de trabajo deben ser impermeables al agua y resistentes a ácidos, álcalis, solventes orgánicos y al calor moderado. Como acabado final, también se incluye que los filtros terminales HEPA deben estar sellados en todas sus uniones, con materiales como poliuretano elástico, neopreno o gel.

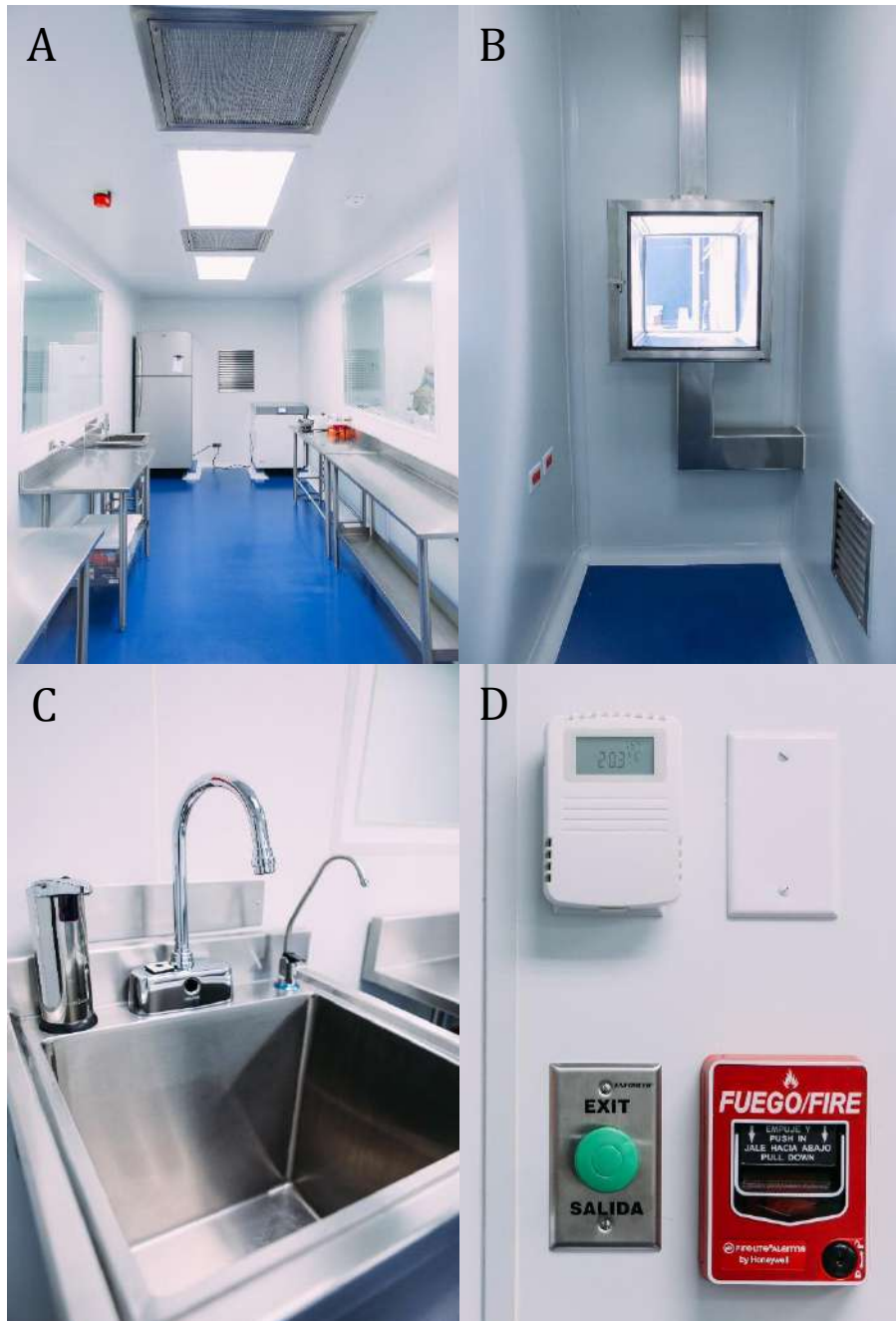


Figura 4.A) Muestra el diseño y acabado de un cuarto limpio del laboratorio de contención (CICESE) donde se observa tipo de paredes, ventanas y piso acabado epóxico, así como los materiales con los que se diseñó el inmobiliario; B) transfer sanitario utilizado para la disposición de RPBI después de su desinfección; C) diseño y material utilizado para una tarja y jabonera libre de manos; D) accesorios que ayudan a la inspección visual de la temperatura, botón de salida y estación que permite activar la alarma de fuego. Fotografía: Marvin Eliu Garay.

Equipos

Como lo indica la norma oficial mexicana NOM-059-SSAI-2013 y el Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de la OMS, los equipos deben estar localizados, diseñados, construidos, instalados y mantenidos en condiciones que permitan su correcta operación y cumplir con el uso propuesto, así como evitar riesgo de contaminación, permitir su montaje y desmontaje para llevar a cabo la limpieza, mantenimiento y esterilización si aplica. Además,

los equipos deben estar ubicados estratégicamente, de manera que no obstaculicen los movimientos del personal. Es muy importante identificar aquellos equipos que estén dañados o que requieran mantenimiento, para conservarse fuera de uso hasta que hayan sido reparados, ya que podrían poner en riesgo al personal. La limpieza y mantenimiento de los equipos debe ser de acuerdo a las especificaciones del fabricante así como de acuerdo a los procedimientos o actividades que se realicen en el laboratorio.

Autoclave

La autoclave es un aparato diseñado para esterilizar el equipo o desechos biológicos por medio de calor y presión dentro de una cámara. Este proceso se basa en el tiempo de duración, temperatura, presión y vapor en el ciclo de esterilización. Para que la autoclave funcione de manera óptima hay dos factores esenciales en el ciclo de esterilización: la temperatura y que todo el aire de la cámara sea sustituido por vapor.

Características generales de las autoclaves

La aplicación de vapor de agua saturado a presión, es el medio más empleado y fiable de esterilizar material de laboratorio. Por lo tanto, cuando se empleó la esterilización en autoclave debe tenerse en consideración que tanto el material como los objetos a esterilizar, deben colocarse en la canasta sin apretarse, para que el vapor pueda circular sin dificultad y el aire pueda salir fácilmente, las bolsas deben permitir que el vapor penetre en su contenido. En general, son utilizadas para esterilizar instrumentos, materiales y soluciones de medios así como para descontaminar material biológico. Con el objetivo de verificar el proceso realizado por la autoclave, se puede realizar una monitorización de la esterilización, utilizando como control químico el viraje de color de cintas adhesivas y/o control biológico, mediante un cultivo de crecimiento de esporas.

La vigilancia regular es conveniente para determinar los ciclos de funcionamiento más adecuados para cada laboratorio. El manejo y el mantenimiento ordinario del equipo es responsabilidad de personas adiestradas. Debido a que la autoclave emplea tanto presión como temperatura alta para la esterilización, es importante usar guantes termoaislantes que cubran hasta el antebrazo, bata y zapatos cerrados para prevenir alguna quemadura al abrir la autoclave, considerando que la puerta no se debe abrir hasta que la temperatura y la presión hayan bajado, esto con la finalidad de evitar aerosoles y quemaduras.

En la preparación del material se debe asegurar que el material se pueda esterilizar en la autoclave. Cualquier material de vidrio se tendrá que inspeccionar que no tenga ninguna grieta antes de esterilizarse, y se debe preparar y empaquetar el material de manera adecuada. Se deben aflojar todas las tapas para evitar acumulación de presión y cualquier recipiente con líquido no debe exceder el 75 % de su capacidad. Los materiales de vidrio, así como los materiales de borosilicato y materiales de plástico, como policarbonato (PC) o polipropileno (PP), deben ser resistentes al calor. Esto puede ser verificado en las características que proporcionan los proveedores de cada material.

Los materiales se deben colocar en una charola de acero inoxidable para mayor estabilidad y facilidad de manejo. Los contenedores de líquidos, bolsas de cajas petri con agar o cualquier material que pueda hervir o derramarse, también deben colocarse en una charola que sea lo suficientemente grande, para contener todo en caso de un derrame. Las bolsas no deben estar selladas por completo, para que el vapor pueda penetrar dejando un espacio para la circulación del vapor.

Durante la operación de la autoclave, se debe verificar que la tapa de la autoclave esté cerrada completamente, mediante el giro de la manija conforme las agujas del reloj. Se debe seleccionar el ciclo apropiado dependiendo del material que se va a esterilizar y ajustar el tiempo y la temperatura si se está usando un ciclo personalizado. Es importante registrar en una bitácora la hora de inicio, ciclo seleccionado y nombre del usuario y éste debe estar cercano a la autoclave con la intención de verificar el buen funcionamiento del equipo.

Para la descarga de la autoclave se debe usar el EPP. Verificar que el ciclo ha terminado y no intentar abrir la tapa del esterilizador hasta que la presión esté en 0 psi. El vapor dentro de la cámara es expulsado dentro de una botella, disminuyendo la presión de la cámara y la temperatura. Después de dejar aproximadamente 10 minutos para que el material se haya enfriado, retirarlo con mucho cuidado teniendo en cuenta no tocar las superficies calientes y teniendo cuidado de no derramar líquidos de los contenedores.

Centrifugas

En el proceso de centrifugación se pueden producir aerosoles, por lo que es muy importante seguir estrictamente las medidas de seguridad cuando se maneja una centrifuga. Se recomienda que las centrifugas estén ubicadas a una altura tal que el personal que la utilicen puedan ver las canastillas y colocarlas correctamente. La tapa de la centrifuga debe estar completamente cerrada durante su funcionamiento, abriéndose exclusivamente cuando el rotor se haya detenido. El equipo debe tener un rotor con cierres de seguridad, así como tapas en cada canastilla las cuales deben ser aseguradas durante cada ciclo de uso. Cada canastilla deberá cargarse, equilibrarse y descargarse dentro de una CSB con el objetivo de contener los aerosoles que pudieran generarse.

La ventilación, el uso de cabinas de bioseguridad biológica y el EPP pueden ayudar a prevenir la inhalación de aerosoles infecciosos. Sin embargo, la consideración más importante para reducir el riesgo de infección, es reducir al mínimo la producción de aerosoles. Por ejemplo, los tubos destinados al uso en la centrifuga, preferentemente deben ser de plástico y deben inspeccionarse para detectar cualquier ruptura antes de usarlos. Los tubos deben estar herméticamente cerrados (con tapón de rosca) para la centrifugación. Los cestos y los soportes se deben emparejar por el peso y equilibrar correctamente con los tubos en su sitio. Cuando se centrifugue una muestra, se hará en una cubeta de seguridad cerrada o un rotor cerrado para evitar la liberación de aerosoles a la centrifuga y al laboratorio. Después de centrifugar, los tubos se deberán colocar en la CSB y se dejarán reposar durante 10 minutos como mínimo, para permitir que los aerosoles se depositen antes de abrir los tubos. Los cestos, rotores y cubetas deben descontaminarse después de cada uso.

Agitador de vórtice

Los agitadores de vórtice deben utilizarse dentro de una CSB, ya que durante el uso se produce un aumento de presión dentro del recipiente o tubo, provocando la generación de aerosoles. Al utilizar un agitador se deben usar tubos de plástico, en particular se recomiendan los de politetrafluoroetileno (PTFE), ya que el vidrio puede romperse y liberar el material infeccioso y causar un daño físico al trabajador. Nunca agitar un tubo abierto, por lo que es importante asegurarse siempre de que las tapas de rosca estén bien cerradas antes de colocarlos en el equipo o agitar. No se deben agitar tubos tapados con algodón o tapón de goma y los tubos agitados se dejarán reposar durante 10 a 15 minutos para reducir al mínimo la propagación de aerosoles.

Incubadora

Según las actividades o ensayos de investigación de cada laboratorio y el microorganismo con el que se esté trabajando, se requerirán ciertas condiciones de temperatura para su cultivo, para esto se recomienda utilizar una incubadora exclusiva, o tomar medidas de seguridad específicas. Si se requiere de un tanque de CO₂ para el equipo, se recomienda que esté localizado fuera del laboratorio de contención y que esté conectado mediante tubería de cobre a través de orificios perfectamente sellados.

Refrigerador, congelador y ultracongelador

Es importante contar con un refrigerador, congelador y ultracongelador, a temperaturas de 4°C, -20°C y -80°C respectivamente, donde se puedan almacenar recipientes, frascos, viales o tubos con el material de trabajo del laboratorio. Éste material debe estar bien identificado con una etiqueta que lleve la información del contenido, la fecha de almacenamiento y el nombre del personal que lo almacenó. Los refrigeradores, congeladores y ultracongeladores, deben recibir limpieza periódica con desinfectantes apropiados. Es recomendable mantener un inventario de su contenido, en caso de material biológico que ya no se vaya a utilizar o que no esté etiquetado debe ser esterilizado y posteriormente desechado.

Proceso de desinfección

Además de las buenas prácticas en el laboratorio, los procesos de esterilización y/o desinfección son eventos que deben realizarse diariamente en el laboratorio con la finalidad de evitar contaminación de medios, cultivos, placas y más importante aún, la infección al humano.

Los desinfectantes son agentes físicos o sustancias químicas que inactivan la proliferación o destruyen a microorganismos de objetos inanimados por ejemplo, micropipetas, campana de flujo laminar, etc. Se debe considerar que la acción microbicida de los desinfectantes depende de la población de organismos que haya que eliminar, la concentración utilizada, el tiempo de exposición y la presencia de residuos contaminados. Es recomendable alternar el uso de los desinfectantes periódicamente y hacer pruebas de esterilidad al material, con la finalidad de determinar la correcta aplicación de los desinfectantes.

Los desinfectantes pueden clasificarse en categorías según su potencia. Los de nivel alto inactivan todas las formas vegetativas de los microorganismos, sin destruir toda la forma de vida microbiana, debido a que no eliminan las endoesporas bacterianas. Inactivan algunas esporas bacterianas, varias esporas fúngicas, todas las bacterias vegetativas, bacilos tuberculosos y todos los virus. La mayoría requiere un tiempo de 20 minutos para ejercer su acción desinfectante. Algunos de los más utilizados son: glutaraldehído al 2%; glutaraldehído fenolado (glutaraldehído 2% más fenol < 10); ácido peracético (en concentraciones que varían del 0.2% al 0.35%) y el hipoclorito de sodio 0.1% (cloro).

Los desinfectantes de nivel intermedio inactivan las bacterias vegetativas. Sin embargo, no eliminan las esporas bacterianas. Son eficaces contra los hongos y la mayoría de los virus. Para una desinfección con estos desinfectantes, el tiempo mínimo de contacto es de 10 minutos. Algunos de estos desinfectantes son los fenoles, alcohol etílico 70% y alcohol isopropílico 70 – 90%. A continuación se detalla las condiciones bajo las cuales son empleados los desinfectantes de nivel alto, dado que son empleados en un laboratorio de contención.

Glutaraldehído

Este desinfectante es soluble en agua y solventes orgánicos como el etanol, benceno y éter, no es corrosivo para metales. En soluciones al 2% y pH 7.5-8.5 es efectivo contra la mayoría de las micobacterias y es estable durante 14 días. Se debe proteger de la luz y mantenerse en recipientes herméticamente cerrados. Su mecanismo de acción es incapacitar a la célula para llevar sus funciones esenciales, así como causando disrupción de la pared de esporas e inhibe la esporulación y germinación. Es un compuesto alquilante de grupos sulfhidrilo, hidroxilo, carbonilo y amino. Altera la síntesis de RNA, DNA y proteínas. Los vapores de glutaraldehído son irritantes en ojos, garganta y tracto respiratorio, por lo que no se deben preparar estas soluciones con agua caliente. Además el personal debe tener los EPP adecuados para la preparación y uso del glutaraldehído 2%.

Cloro

Las soluciones de hipoclorito sódico (lejía doméstica) contienen 50 g/L de cloro y suelen prepararse como solución de trabajo, a una proporción 1:10 en agua. La lejía debe almacenarse en una zona oscura y bien ventilada. En buenas condiciones de almacenamiento, la solución de 50 g/L puede conservarse hasta 3 meses; las soluciones diluidas deben prepararse cada día. El mecanismo de acción de este desinfectante, es a través de la oxidación de aminoácidos y enzimas con grupos sulfhidrilo; pérdida de contenido intracelular; disminución del suministro de nutrientes e inhibición de la síntesis de proteínas. Es un compuesto corrosivo, no apto para limpieza de metales y no se debe esterilizar en autoclave. En cambio se puede utilizar como desinfectante general de materiales no metálicos, pisos y paredes.

Fenol

El fenol debe emplearse a una concentración del 5% en agua. Este desinfectante es incompatible con el cloro, sales alcalinas, tensoactivos no iónicos y detergentes catiónicos. El mecanismo de acción de este compuesto varía según su concentración. A bajas concentraciones (menor o igual a 1%) tiene acción bacteriostática y en concentraciones elevadas es bactericida, inactivando de forma irreversible sistemas enzimáticos esenciales (oxidasas y desoxidasas de membrana), dañando la pared celular y precipitando las proteínas celulares. Es un compuesto mutagénico y corrosivo, por lo que debe utilizarse con cuidado y no se debe esterilizar en autoclave. En caso de limpiar alguna superficie de metal, es necesario hacer una limpieza posterior con agua. Se debe considerar que la inhalación y la exposición dérmica al fenol son sumamente irritantes para la piel, los ojos y las mucosas. Se considera que la ingestión del agente es tóxica.

Confinamiento de residuos peligrosos

Un desecho es considerado como todo aquello que debería descartarse. Los desechos no contaminados sólidos o líquidos son aquellos que pueden ser reutilizados, reciclados o eliminados de igual manera que los residuos domésticos. Sin embargo, los desechos contaminados deben ser eliminados teniendo un tratamiento previo a su disposición final. Estos últimos, se consideran residuos peligrosos biológico infecciosos (RPBI) y deben estar sometidos a los planes de manejo que tiene cada Institución y funcionar en base a la NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

La Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, define como residuos peligrosos a todos aquellos residuos que por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables y biológico-infecciosas, representan un peligro para el equilibrio ecológico o el ambiente. Las fases de manejo de los RPBI radican en la identificación del tipo de residuo, el envasado de los residuos generados, el

almacenamiento temporal, la recolección y el transporte externo, el tratamiento y por último la disposición final. La clasificación de los RPBI, según la Norma Oficial Mexicana es: la sangre, los cultivos y cepas de agentes biológico-infecciosos, los patológicos, los residuos no anatómicos y los objetos punzocortantes, como se esquematiza en la Figura 5. El envasado según su clasificación es la siguiente: la sangre que se encuentra en estado líquido, debe contenerse en recipientes herméticos color rojo. Los cultivos sólidos y cepas de agentes infecciosos, deben depositarse en bolsas rojas de polietileno. Los residuos patológicos sólidos y líquidos, deben depositarse en bolsas amarillas de polietileno y en recipientes amarillos herméticos, respectivamente. Los residuos no anatómicos sólidos y líquidos, deben depositarse en bolsas rojas de polietileno y en recipientes rojos herméticos respectivamente; y finalmente, los objetos punzocortantes, en recipientes rojos rígidos de polipropileno.

Los RPBI deben ser manejados con gran cuidado para no generar focos de infección que puedan dañar al personal del laboratorio, a la población o al ambiente. El peligro de este tipo de desechos, reside en la carga microbiana que se contengan en los cultivos y excreciones de pacientes infectados. Por otra parte, su mal manejo podría permitir el contacto con animales como ratas, ratones, moscas, cucarachas y otros insectos que se alimentan o se reproducen en desechos orgánicos, los cuales son acarreadores pasivos de agentes patógenos.

La recolección y transporte debe realizarse conforme a lo dispuesto en los ordenamientos jurídicos aplicables y cumplir lo siguiente: sólo podrán recolectarse los residuos que cumplan con el envasado, embalado y etiquetado o rotulado. No deben estar compactados durante su recolección y transporte. Los contenedores deben estar desinfectados y lavados después de cada ciclo de recolección. Los vehículos recolectores deberán de ser de caja cerrada y hermética, contar con sistemas de captación de escurrimientos y operar con sistemas de enfriamiento, para mantener los residuos a una temperatura máxima de 4° C. Los RPBI deben ser sometidos a tratamiento por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos y deberán quedar irreconocibles para su disposición final, en los sitios autorizados por las autoridades competentes.



Figura 5. Diagrama que muestra la selección de los residuos peligrosos por su estado físico y en el tipo de envase que corresponde su disposición antes de ser eliminados según la NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

La incineración resulta útil para eliminar desechos de laboratorio, con independencia de que hayan sido descontaminados o no. La incineración de material infeccioso es una alternativa al tratamiento en autoclave solamente si se asegura por parte de la persona competente que los procedimientos de incineración que se siguen son correctos y que logran el objetivo final de eliminar los agentes patógenos.

Vigilancia médica y sanitaria

Los objetivos de los programas de vigilancia médica y sanitaria, incluyen mantener la integridad y seguridad del personal que se encuentren relacionados directamente con agentes patógenos. El principio fundamental de la protección del personal consiste en el uso de EPP adecuado así como, de la capacitación y entrenamiento teórico- práctico en los procedimientos, normas, diseño y operación del laboratorio de contención. Es muy importante que a todos los trabajadores del laboratorio de contención, se les realice un reconocimiento médico orientado a la actividad laboral, el cual incluye un historial clínico detallado, exámenes de laboratorio y una revisión física, la cual se le debe dar seguimiento. Es recomendable que el personal cuente con una tarjeta de contacto médico en la cual se haga constar que la persona trabaja en un laboratorio de bioseguridad nivel III, indicando aquellos agentes infecciosos a los que se encuentra expuesto en el laboratorio.

Es responsabilidad de cada trabajador su seguridad, al seguir los procedimientos establecidos en el laboratorio. Sin embargo, es necesario constituir un comité, que será responsable de elaborar los códigos de la institución en materia de bioseguridad, vigilar que estos códigos se cumplan, examinar los protocolos de investigación, evaluar los riesgos y formular nuevas políticas de bioseguridad.

Documentación

La operación de un laboratorio de contención debe estar sustentada por un sistema de documentación, la cual debe existir en material impreso, electrónico o fotográfico. El objetivo principal es implementar, controlar, supervisar y registrar todas las actividades que se involucren en el funcionamiento del laboratorio de contención.

En general, el sistema de documentación consta de 5 niveles:

Nivel 1: consiste en los documentos legales. Se basan en exigencias regulatorias como leyes, reglamentos, farmacopeas, normas, guías y reportes técnicos.

Nivel 2: abarca los documentos maestros. Estos documentos reflejan los criterios del laboratorio y engloban sus políticas. Sirven de base para generar documentos de niveles menores.

Nivel 3: son los procedimientos. Estos documentos son específicos para cada área o departamento y desglosan las actividades que se realizan, por ejemplo los Procedimientos Normalizados de Operación, protocolos, especificaciones, programas de mantenimiento y de calibración, descripciones de puesto, etc.

Nivel 4: son los instructivos. Estos documentos incluyen actividades sencillas dirigidas al nivel operativo como son los instructivos, guías de trabajo, instrucciones y lineamientos.

Nivel 5: corresponde a los registros. Son documentos generados al momento de la realización de las actividades correspondientes en los documentos de nivel tipo 4 o 3. Como ejemplo bitácoras, certificados, etiquetas y registros.

Los documentos que contienen instrucciones que incluyen los documentos (Nivel 1), deberán ser aprobados y firmados por el personal autorizado, contar con vigencia y fecha de próxima revisión. Los procedimientos o instructivos de trabajo (Nivel 3) deben utilizar un lenguaje claro y sencillos. Además, deben estar disponibles y de fácil acceso para quienes lleven a cabo dichos procedimientos. Los registros de actividades deben realizarse de forma clara, legible e indeleble al momento de la actividad. El acceso a cada tipo de documentación dependerá de las responsabilidades o puesto que desempeñe cada trabajador dentro del laboratorio de bioseguridad nivel III.

Además de la documentación señalada anteriormente, es muy importante solicitar al contratista encargado del proyecto, la entrega de documentos, planos y diagramas del laboratorio para tener un resguardo y acceso a esta información de forma inmediata.

Se deben solicitar ciertos documentos por cada equipo, instrumento o componente del sistema HVAC, entre ellos están: los de prueba de hermeticidad; memoria de cálculo de la instalación eléctrica; memoria de cálculo del sistema HVAC; información técnica del sistema HVAC; información técnica de cuartos limpios e información técnica de instrumentos.

Dentro de los planos y diagramas que el contratista debe entregar una vez hayan sido revisados y aprobados, se encuentran: los planos arquitectónicos, la localización de equipos; detalles, ductos de inyección, ductos de extracción, presiones diferenciales y flujos de aire, clasificación de áreas, diagrama unifilar; ubicación de difusores, rejillas y filtros terminales, ubicación de instrumentos, diagrama unifilar del sistema eléctrico, alumbrado y contactos.

La documentación deberá ser revisada cuidadosamente, aprobada por la persona responsable del laboratorio y mantenidas en bitácoras bien identificadas.

CONCLUSIONES

El alcance pretendido en este capítulo es el de servir como orientación básica al momento de diseñar y operar un laboratorio de bioseguridad nivel III, con la finalidad de disminuir el tiempo que se emplea en la búsqueda de la información necesaria para fundamentar los aspectos arriba mencionados. Además, el texto puede servir como pauta para seguir las normas regulatorias aplicables. Sin embargo, el lector debe tomar en consideración el tipo de organismo u organismos que serán manipulados en el laboratorio de contención a diseñar. Como se mencionó anteriormente, para el caso específico del laboratorio de bioseguridad nivel III que se ha descrito en este capítulo, éste laboratorio fue construido tomando en consideración que los principales organismos de estudio pertenecen al complejo *M. tuberculosis*, y debido al mecanismo de diseminación (la aspersión por aerosoles como principal fuente de contaminación), las normas y procedimientos se han ajustado para evitar la dispersión aérea de éstos microorganismos altamente patógenos. Cabe destacar que en las instalaciones de éste laboratorio es posible trabajar otros organismos bacterianos que por sus características patogénicas y de virulencia necesiten ser manipulados en un laboratorio de bioseguridad nivel III.

En nuestro país existe un número limitado de laboratorios de bioseguridad nivel III, principalmente por los costos asociados a generar la infraestructura y la capacitación adecuada del personal. Pero, al considerar la importancia de trabajar con organismos que representan un problema de salud pública a nivel nacional, es imprescindible el incrementar el número de laboratorios donde se pueda realizar investigación que lleve al entendimiento de la fisiopatogenia y posteriormente al desarrollo de nuevos tratamientos contra la tuberculosis tanto en humanos como en ganado.

La investigación realizada en los laboratorios de seguridad nivel III, tiene como principales objetivos: la búsqueda de nuevos antibióticos; así como el desarrollo de métodos novedosos de diagnóstico que sean más sensibles, específicos y económicos. Además, del desarrollo de vacunas que protejan a la población modificando de manera positiva la epidemiología de los agentes patógenos. Debido a los reportes crecientes de nuevas cepas multidrogaresistentes (MDR) de *M. tuberculosis* cobra relevancia realizar investigación que permita obtener nuevos fármacos y de diferente origen a los ya existentes. Aunado a lo anterior, contar con un personal multidisciplinario que incluya biólogos, químico farmacobiólogos, epidemiólogos, bioestadistas, bioquímicos, virólogos y personal de propiedad intelectual permitirá no sólo generar investigación de vanguardia, sino también lograr la transferencia tecnológica a farmacéuticas tanto nacionales como internacionales.

Nuevas estrategias de tratamiento y detección incluyen la nanobiotecnología, con la generación de nanopartículas inteligentes, que permitan direccionar de forma específica al agente terapéutico hacia las células infectadas por la micobacteria y que entreguen el o los fármacos indicados eliminando solamente las células afectadas.

Finalmente, es responsabilidad del personal científico y de operación, conocer las medidas de bioseguridad a seguir en un laboratorio de contención, para llevar a cabo un buen manejo de las cepas patógenas y permitir la obtención de nuevos medicamentos que impacten en la salud humana evitando accidentes que pongan en riesgo al personal y a la población.

REFERENCIAS

Chosewood, L.D. (2009). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. USA: Center for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health.

Diario Oficial de la Federación. Protección ambiental - salud ambiental - residuos peligrosos biológico - infecciosos - clasificación y especificaciones de manejo. (2003). NORMA Oficial Mexicana. NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

Diario Oficial de la Federación. (2013). BuenasPrácticas de Fabricación de Medicamentos. NORMA Oficial Mexicana. NOM-059-SSA1-2013.Últimas reformas publicadas 22 de julio de 2013.

Diario Oficial de la Federación. (2014). Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Última reforma publicada 02-04-2014.

Gimaldo, M.A. (2015). Manual del curso de elementos críticos en las operaciones de un BSL-3. AMEXBIO. University of Texas Medical Branch (UTMB). Galveston. Texas. USA.

Herman, P., Fauville-Dufaux, M., Breyer, D., van Vaerenbergh, B., Pauwels, K., do Thi, C.D., Sneyers, M., Wanlin, M., Snacken, R., Moens, W. (2006). Biosafety recommendations for the contained use of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in industrialized countries. Division of Biosafety and Biotechnology (www.biosafety.be/CU/PDF/Mtub_Final_DL).

Lara-Villegas H.H., Ayala-Núñez N. V., Rodríguez-Padilla C. (2008). Bioseguridad en el laboratorio: medidas importantes para el trabajo seguro. Bioquímica. 33(2): 59-70.

Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente. (1988). Diario Oficial de la Federación. Últimas reformas publicadas 05 de noviembre de 2013 (<http://www.metro.df.gob.mx/transparencia/imagenes/fr1/normaplicable/2014/1/lgeepa14012014.pdf>).

Organización Mundial de la Salud. (2005). Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Tercera edición (http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf).

Organización Mundial de la Salud. (2013). Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de Tuberculosis (www.who.int/tb).

Organización Panamericana de la Salud. (2002). Cabinas de seguridad biológica: uso, desinfección y mantenimiento. Washington D.C. (<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16575s/s16575s.pdf>)

**Consideraciones básicas para un laboratorio de nanotecnología
Aplicada a la salud**

Tanya Camacho, Alba Vallejo & Zaira García

INTRODUCCIÓN

El carácter revolucionario y el enorme potencial de la nanotecnología y sus múltiples aplicaciones en diversos sectores productivos tienen la capacidad de afectar virtualmente todas las áreas de la actividad económica y los aspectos de la vida diaria. La nanotecnología según expertos, provocará la segunda revolución industrial. Esto porque está transformando los sectores alimentarios, electrónicos, la tecnología de la informática, la óptica, la creación de materiales, la biomedicina, etc. Además, es una tecnología que permite tener un gran impacto en cuestión de innovación y de alto valor agregado en cada uno de los diversos productos.

Hablar de nanotecnología, nanomateriales y nanomedicina es entrar en un tema lleno de controversias y más, si estos productos serán enfocados a la salud humana y animal; ya que no existe una normativa enfocada a este tipo de productos. Sin embargo, existen guías orientativas aplicables tanto para la manufactura, como para la evaluación de seguridad y eficacia de los mismos.

Con la suficiente infraestructura y el apoyo para la transferencia de tecnología, los empresarios, académicos y público interesado pueden formar empresas y obtener beneficios basados en la propiedad intelectual generada a partir de estas innovaciones. Sin embargo, cuando se tiene contemplado incursionar en esta área y tener un producto en el mercado, en cualquiera de las aplicaciones de la nanotecnología es importante tener una visión global de todos los desafíos que se pudieran presentar.

Debido a esto, en este capítulo se pretende abordar de manera general algunos tópicos con la intención de brindar un panorama global de las implicaciones de este mundo “**NANO**”. Por lo que se abordarán los siguientes temas:

- a. Qué es la nanotecnología y su aplicación en Medicina como sistemas de liberación de fármacos,
- b. Puesta en marcha de un laboratorio para síntesis y caracterización en escala nanométrica,
- c. Regulaciones y/o documentos orientativos sobre los productos Nano.

Definición de Nanotecnología y Nanomedicina

El término nanotecnología abarca una amplia gama de tecnologías y materiales. La definición de la US National Nanotechnology Initiative propuesta en el 2000 menciona que la nanotecnología se refiere a los materiales y sistemas cuya estructura y componentes muestran novedad y mejoras significativas en las propiedades físicas, químicas y biológicas de un material a una nanoescala, de 1 a 100 nanómetros.

Una de las áreas de aplicación de la nanotecnología que es de gran interés para los científicos y la sociedad en general es la *Nanomedicina*, que asocia la nanotecnología con las ciencias de la salud y tiene como objetivo el control, la reparación y la mejora integral de todos los sistemas biológicos humanos. Dentro de las aplicaciones de la nanomedicina se pueden incluir la medicina preventiva, la medicina personalizada y las imágenes

multimodales. Obedeciendo a estas aplicaciones, actualmente surge el concepto de teragnosis para nombrar el desarrollo de nanopartículas que diagnostican y administran de manera controlada los fármacos. Así mismo, se ha enfatizado la importancia de que las terapias sean sitio-dirigidas-no invasivas, a través del uso de proteínas específicas o péptidos integrados en nanovesículas para entrega de los fármacos, Figura 1 (Li, 2014). También, se encuentra en desarrollo la "Medicina personalizada", la cual se basa en los perfiles únicos de proteómica, genómica y transcriptómica de un paciente, con la finalidad de desarrollar tratamientos exclusivos para cada individuo. En el futuro, se considera posible contar con nanosistemas médicos que permitan el monitoreo y reparaciones en el cuerpo completo o a nivel celular.

La nanomedicina incluye el desarrollo de nanomateriales como las nanopartículas, vesículas, superficies nanoestructuradas, entre otras. Además de técnicas nanoanalíticas para diagnóstico molecular, tratamiento, seguimiento y terapia de enfermedades.

Hay varios tipos de nanomateriales que han sido investigados para su uso en la nanomedicina por ejemplo, acarreadores de fármacos que permiten la entrega dirigida al tejido blanco e inclusive en dispositivos médicos. Algunos de estos nanomateriales incluyen: polímeros, péptidos, nanoparticulados (micelas, nanocápsulas, nanopartículas, nanoemulsiones, liposomas), sensores, implantes, entre algunos otros.

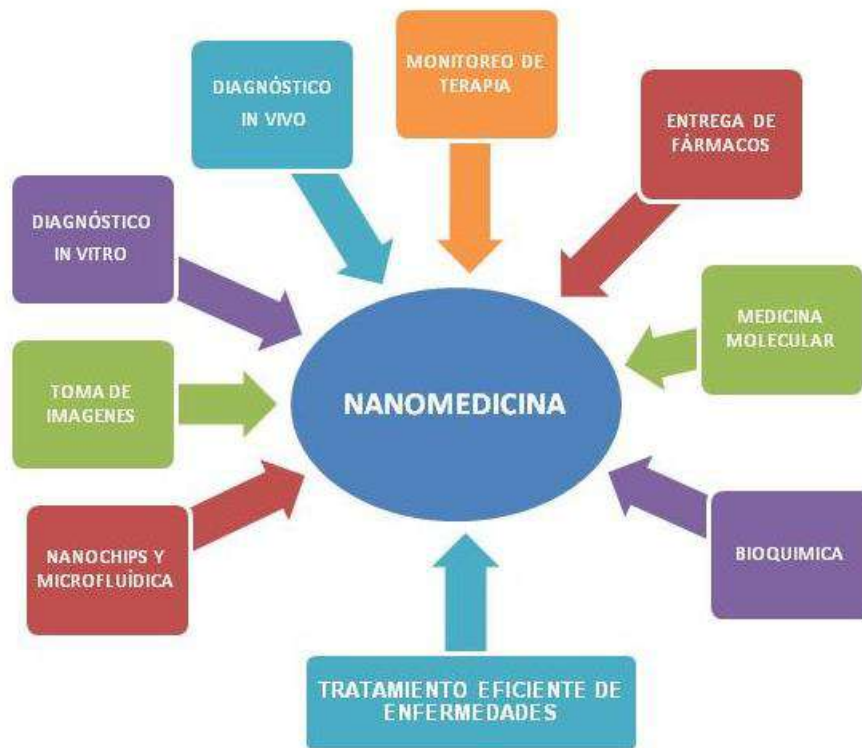


Figura 1. Relación entre la nanomedicina y sus aplicaciones en las ciencias de la salud.

Entre los campos de aplicación con mayor desarrollo de la Nanotecnología destacan los Sistemas de Liberación de Fármacos (DDS, por sus siglas en inglés). En teoría, un DDS ideal debería modular la aplicación del Principio Activo (PA) o fármaco en el lugar y en el momento apropiado, protegiendo al PA frente a una degradación anticipada y con un patrón

de liberación que se ajuste a las necesidades del tratamiento. Además, se considera que un sistema liberador de fármacos ideal no debe ser tóxico; la manufactura a escala industrial debe ser a bajo costo y debe ser efectivo como terapéutico (Coelho, 2010). Por otra parte, actualmente la tecnología de liberación de fármacos intenta cubrir otras necesidades específicas como son:

- a. Evitar problemas relacionados con la solubilidad del fármaco es decir, conseguir una liberación lenta de PA hidrosolubles y mejorar la biodisponibilidad de los PA poco solubles en agua,
- b. Liberar dos o más agentes en una misma formulación por ejemplo, que un mismo DDS libere un antibiótico y un antiinflamatorio,
- c. Desarrollar DDS realmente eliminables, es decir que el nanomaterial utilizado sea biodegradable,
- d. Optimizar la distribución de los PA prolongando su liberación y que el PA se metabolice rápidamente o sea de fácil excreción, para evitar efectos tóxicos o acumulativos,
- e. Generar DDS tejido específicos para controlar la liberación de PA altamente tóxicos (Shi, 2010).

El desarrollo de la Nanotecnología está contribuyendo enormemente en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos; ya que permite que la liberación del fármaco sea mínimamente invasiva porque posibilita la fabricación de dispositivos a escala nanométrica, tamaño que permite atravesar poros y membranas celulares. Otra gran ventaja que ha aportado la Nanotecnología a los DDS, es la posibilidad de incrementar la efectividad del fármaco mediante el control preciso de la dosis requerida y del tamaño, la morfología y las propiedades superficiales del compuesto. Por lo tanto, para tener un DDS eficiente se deberán tomar en cuenta muchas variables. En la siguiente sección, se describen algunas de las estrategias empleadas en la formulación de sistemas nanométricos como sistemas liberadores de fármacos.

Sistemas de liberación de fármacos

Existen más de 30 compuestos terapéuticos basados en sistemas liberadores de fármacos asociados a proteínas y que están siendo probados. Dentro de estos compuestos terapéuticos se incluyen: doxorubicina, docetaxel, colchicina, progesterona, glucocorticoesteroides, trans-retinol, iones metálicos (como cobalto, manganeso, sulfito de hierro, etc). Estos sistemas liberadores de fármacos se han diseñado para el tratamiento de diversos padecimientos, entre los cuales se incluyen, cáncer (mama, ovario, cerebro, etc); enfermedades infecciosas; enfermedades crónicas y enfermedades autoinmunes.

Los DDS que se han diseñado para la entrega de fármacos incluyen *plataformas sintéticas* (silica, polímeros y geles) y *plataformas biológicas* (lípidos, proteínas y oligosacáridos). El mayor incremento en el desarrollo de sistemas liberadores de fármacos a escala nanométrica, se ha dado acoplado proteínas a los DDS. Esto permite la entrega de genes in vivo, el diagnóstico clínico, el diagnóstico médico dirigido a receptores blanco y la adquisición de imágenes inteligentes, entre otras aplicaciones. Sin embargo, estas proteínas deben unirse a los materiales mediante funcionalización de los mismos. Estas funcionalizaciones emplean diferentes reacciones químicas, por ejemplo:

- 1) *Adsorción electroestática*: las proteínas se unen a la superficie de la nanopartícula por diferencia de cargas eléctricas. Algunas de las desventajas de esta técnica es que la interacción que se da suele ser heterogénea y por ende la orientación y arreglos espaciales son diferentes y no controlables, evitando que el diseño sea eficiente.

2) *Conjugación del ligando a la superficie de la nanopartícula:* se lleva a cabo por medio de reacciones químicas que dan como resultado enlaces covalentes en la unión proteína - nanopartícula. En este caso, es posible seleccionar la orientación con la cual se unirá la proteína y es posible controlar el número de uniones a lo largo de la nanopartícula, haciendo más eficiente el diseño.

3) *Conjugación empleando una molécula de unión a proteína:* en este caso, se emplean moléculas adaptadoras para llevar a cabo la unión. Es decir, una molécula bioactiva (por ejemplo, biotina, estreptavidina) se une a la proteína y este bioconjugado se une a su vez a la superficie de la nanopartícula.

4) *Conjugación directa a la superficie de la nanopartícula:* se lleva a cabo por medio de reacciones químicas que dan como resultados enlaces no covalentes entre la proteína y la nanopartícula. El empleo de esta técnica es de gran utilidad cuando se quieren desarrollar biosensores (Aubin, 2008).

Si se planea utilizar la estrategia de generar un DDS acoplado a proteína, es necesario considerar las características fisicoquímicas y estructurales de la proteína que se quiere unir en la nanopartícula. Dentro de estas características se encuentran: la secuencia de aminoácidos y las características de las cadenas laterales de los aminoácidos; el sitio de unión y la afinidad química por su ligando; la sensibilidad a pH y a temperatura; así como la susceptibilidad de ser degradada por proteasas antes de realizar su función. También, se deben considerar las características de las nanopartículas a funcionalizar, por ejemplo: si su núcleo es un metal; porosidad; recubrimiento; carga total de la superficie (negativa o positiva); hidrofobicidad; presencia de grupos funcionales (grupos carboxilos, amino, hidroxilos, etc.).

Ejemplos de Nanomateriales empleados como sistemas de liberación de fármacos

A continuación, se describen los principales nanomateriales que son empleados como DDS en nanomedicina, agrupados en: Nanopartículas liposomales y Nanopartículas no liposomales (basadas en polímeros, cerámicos, metálicos, materiales de carbono-furelenos, nanotubos, puntos cuánticos, etc); como orientación general para quien pretenda desarrollar un nuevo proyecto en este tema.

Nanopartículas liposomales

Los liposomas se pueden definir como esferas microscópicas que varían de 10 a 100 nm de diámetro y tienen como característica principal que están rodeadas por una membrana compuesta de fosfolípidos. Esta membrana fosfolipídica puede envolver una sustancia acuosa que puede contener un fármaco, proteína, etc. Los liposomas fueron el primer sistema de entrega de fármacos descritos en 1965 (Bangham, 1965). Generalmente, los liposomas se clasifican en base al número bicapas que lo rodean:

- a) *Liposomas Multilamelares (MLV):* que tienen diámetros mayores a 0.5 μm y se caracterizan por tener múltiples compartimientos acuosos concéntricos, separados por un espacio acuoso de 5 nm de grosor. Estos liposomas multilaminares son ampliamente empleados cuando se desea una liberación prolongada de los fármacos. Sin embargo, los liposomas multilaminares tienen problemas para mantener la homogeneidad y la reproducibilidad en su producción, sobre todo cuando se considera la producción a gran escala. Aunado a lo anterior, existen problemas de estabilidad física al mantener su estructura cuando son almacenados por largos periodos de tiempo.

- b) *Liposomas Unilamelares*: tienen diámetros de 15-140 nm y están compuestos por una sola bicapa lipídica. Los liposomas unilamelares no tienen tanto problema en la producción a gran escala, y debido a que son más versátiles y permiten la encapsulación de diversas moléculas tanto hidrosolubles como liposolubles, son ampliamente usados. Presentan una mayor capacidad de penetración, difusión y tiempo circulante en sangre y pueden ser empleados para tratamiento y diagnóstico. En la Tabla I, se enlistan algunos liposomas que se encuentran aprobados o en proceso de investigación como tratamiento en humanos.

Los liposomas también son empleados en otras áreas, como la cosmetología debido a la capacidad que tienen de encapsular sustancias hidratantes para ser absorbidas a través de la capa epitelial con una mayor eficiencia.

Nanopartículas (polímeros, cerámicos, metálicos, materiales de carbono-fulerenos y nanotubos, puntos cuánticos)

Las nanopartículas incluyen partículas de diámetro menor a 100 nm, y se pueden clasificar por su origen:

- a) *Nanopartículas basadas en estructuras de carbón*: redes de formas tubulares hexagonales como lo son los nanotubos de carbono (CNT, por sus siglas en inglés, carbón nanotubes) o formas esféricas como los fulerenos. Estas nanopartículas tienen propiedades eléctricas y semiconductoras que son dependientes del carbón. Tienen gran capacidad de adsorción de moléculas (Dellinger, 2013)
- b) *Nanopartículas de base metálica*: se incluyen los puntos cuánticos (QD, por sus siglas en inglés), que contienen electrones libres. Son nanocristales semiconductores coloidales, con diámetros de 2 a 10 nm. Pueden ser sintetizados por electroquímica. Principalmente se emplean seleniuro de cadmio (CdSe), telurio de cadmio (CdTe), arseniuro de indio (InAs) como base para la generación de QD. Se puede controlar el tamaño, la forma y el número de electrones de los puntos cuánticos. Estos puntos cuánticos proveen una superficie para unir agentes terapéuticos y liberar simultáneamente fármacos. También son empleados para la toma de imágenes in vivo (Larson, 2003).
- c) *Nanopartículas a base de dendrímeros*: basados en estructuras poliméricas de crecimiento concéntrico es decir, construidos en forma de árbol en los cuales las ramas crecen unas de otras y en la terminación de cada ramificación se pueden unir proteínas o fármacos. Cuando son empleados en la entrega de fármacos tienen tamaños de 10 a 100nm de diámetro con múltiples grupos funcionales en su superficie y son compatibles con moléculas de ADN. Las aplicaciones biofarmacéuticas incluyen la formulación de DDS con funciones anti-inflamatorias, antivirales, antimicrobianas, anticancerígenas, etc. Sin embargo, una desventaja de los dendrímeros es que pueden ser tóxicos debido a que pueden romper la membrana celular como resultado de la carga positiva de su superficie (Mecke, 2004).
- d) *Nano estructuras basadas en polímeros*: estas estructuras se pueden dividir en dos grupos: 1) templados no proteicos que incluyen polietilenglicol (PEG), poliamidoamina (PAMAM), dextrano y quitosán, entre otros; 2) templados proteicos: que incluyen proteínas obtenidas de forma natural o recombinante, por ejemplo: colágeno, caseína, gelatina, etc. (ver Tabla I). Con las plataformas no proteicas, se pueden generar conjugados poliméricos unidos a fármacos; polímeros unidos a proteínas y polímeros unidos a micelas. Uno de los prototipos que se encuentran en ensayos clínicos es PK1. Este sistema encapsula doxorubicina en

poli-N-2-hidroxipropil metacrilato (PHPMA) y ha demostrado tener una buena liberación del fármaco. La desventaja que presenta es su baja biodegradación.

Como se ha mencionado anteriormente, la Nanotecnología ofrece muchas ventajas como mejorar la biodistribución de los fármacos en la circulación, lo cual incrementan la solubilidad y las propiedades fisicoquímicas del fármaco, entre otras. Sin embargo, obtener nanopartículas de tamaños homogéneos y que puedan ser producidos económicamente de forma estable a gran escala, sigue siendo todo un reto, aunado a que actualmente se debate la toxicidad de estos nanomateriales.

Alcances de la nanomedicina en la liberación de fármacos

Debido al gran auge en años recientes que ha tenido la nanomedicina, se han diseñado nuevas tecnologías que impactan en diversos objetivos en la salud. En la Tabla II, se mencionan los principales impactos de la nanotecnología en la medicina. Actualmente más de 250 productos desarrollados por nanomedicina están siendo probados o utilizados en los seres humanos (Weissig, 2014). Dentro de estos desarrollos se encuentran la optimización en la adquisición de imágenes in vivo, los DDS, seguidos de sustitutos óseos y recubrimientos para dispositivos implantados.

Tabla I. Ejemplos de nanopartículas basadas en liposomas y en plataformas proteicas que se encuentran aprobadas o en fase de investigación para su uso en humano.

Nombre del producto	Fármaco	Indicación	Ruta de inyección	Dimensión en nanoescala (nm)	Estatus ante FDA	Empresa líder
Plataformas liposomales						
Abelcet	Amphotericin B	Infecciones micóticas	Intravenosa	1,600–11,000	Aprobado	Armstrong Laboratorios de México, S. A. de C. V.
Amphocil	Amphotericin B	Infecciones micóticas	Intravenosa	110–114	Aprobado	Bristol-Myers Squibb de México, S. de R. L. de C. V
DaunoXome	Daunorubicina citrato	Sarcoma de Kaposi	Intravenosa	45	Aprobado	Sanofi-Aventis de México, S. A. de C. V
DepoCyt	Citarabina	Meningitis linfomatosa	Intravenosa	20	Aprobado	Pfizer, S. A. de C. V
Doxil	Doxorubicina	Sarcoma de Kaposi	Intravenosa	87	Aprobado	Janssen Biotech, Inc
Plataformas proteicas						
Caseína	Microesferas	Fácil incorporación de fármacos hidrofóbicos No tóxico y biodegradable No hay enlaces disulfuro	Progesterona, doxorubicina, teofilina			
Colágeno	Micro partículas minirods	Baja toxicidad, biodegradabilidad Contiene grupos carboxilo y amino para realizar la unión	Glucocorticoides esteroides, Retinol todo trans			
Proteína de soya	Películas	Extraído de planta	Azul de metileno			

		Altamente soluble en agua No toxico y reusable	rifampicina			
Gelatina	Microesferas hidrogel	Baja toxicidad, Buena biodegradabilidad, usado en las formulaciones de fármacos, posee grupos carboxilos	Colchicina Trombicidina Lisozima			

Tabla II. Aplicaciones de la nanotecnología en la salud humana

APLICACION MEDICA	OBJETIVO	VENTAJAS	NANOMATERIAL EMPLEADO
En el diagnóstico médico	Prevención exitosa y Desarrollo de tratamientos eficientes	Gran sensibilidad, Selectividad comparada con los métodos clásicos	Nanopartículas Puntos cuánticos Nanoagregados Nanopolvos
Imagenología por resonancia magnética nuclear (NMR)	Incremento en la resolución, Mejor contraste y Alta sensibilidad	Detección oportuna Mejorar la toma de decisiones clínicas Disminución de costos asociados a la terapia	Nanopartículas magnéticas por ejemplo nanopartículas de óxido de hierro superparamagnético (SPIO), etc
Diagnóstico in vitro	Generar procedimientos no invasivos Detección confiable y segura	Monitorear niveles de fármacos aplicados a pacientes Detección de marcadores biológicos tamizajes de rutina	Microarreglos de ADN y sistemas de microfluidos para chip de diagnóstico Biochips
Diagnóstico en una célula	Adquisición de resultados estadísticamente significativos Seguimiento adecuado del desarrollo y progresión de una enfermedad	Análisis y entendimiento de padecimiento Diferenciación e interacción célula-célula y célula- tejido.	Semiconductores Biochips Espectroscopia de fuerza atómica Arreglos de anticuerpos
Diagnóstico in vivo	Proveer datos de un paciente y dar seguimiento al desarrollo de la enfermedad y la terapia Específicos, sensibles y reproducibles.	Implantación de dispositivos de diagnóstico que envían de manera continua información hacia un monitor afuera del cuerpo	Biosensores Nanopartículas

Puesta en marcha de un laboratorio para síntesis y caracterización de nanopartículas aplicadas a la nanomedicina

Dentro esta sección, se pretende abordar los requerimientos mínimos para la puesta en marcha de un laboratorio de síntesis y caracterización de nanopartículas. Además, se abordará el tema de seguridad dentro del laboratorio para evitar el riesgo de exposición del personal. Se sugerirán técnicas de caracterización de los nanomateriales y algunos centros de investigación que cuentan con la infraestructura especializada para llevar a cabo estas caracterizaciones. Esto con la intención de ayudar al investigador y/o empresario que pretenda incursionar o generar un laboratorio para trabajar con nanotecnología enfocada a la nanomedicina.

La nanotecnología ha estado presente desde que se utilizan moléculas químicas, un claro ejemplo son los fármacos y las interacciones de mismo con los tejidos. Una de las grandes preocupaciones de los investigadores son las interacciones de los nanomateriales con los tejidos y medio circundante del mismo, ya que muchas de estas interacciones condicionarán la funcionalidad de los mismos; por lo que el estudio de dichas interacciones es un mundo *nano- fascinante*.

Cuando se quiere incursionar en el mundo de la nanotecnología, inmediatamente se vislumbra la necesidad de contar con equipos de trabajo multidisciplinarios, que permitan

el desarrollo y estudio de los nanomateriales. Por lo tanto, el conceptualizar un laboratorio integral para el desarrollo de nanotecnología enfocada al área médica farmacéutica sería costoso. En este sentido, tanto las Universidades como los Centros de Investigación juegan un papel importante, ya que cuentan con personal altamente calificado, con la infraestructura necesaria para la síntesis y la caracterización tanto fisicoquímica como biológica de los nanomateriales. Destacando que inclusive, las pruebas de concepto del prototipo se podrían realizar en estos centros de investigación, lo cual puede favorecer la transferencia de tecnología de productos “nano”.

Consideraciones especiales al trabajar en un laboratorio de síntesis y caracterización de Nanomateriales

Al trabajar con nanomateriales especialmente con nanopartículas, se presentan diversos fenómenos que ponen en riesgo a los seres humanos y al medio ambiente. Son las propias características de la partícula las que se relacionan con la toxicidad. Dentro de estas características se encuentran el tamaño; la forma; la agregación, la aglomeración, la superficie (porosidad, la carga, la reactividad y la composición química); la solubilidad (en lípidos, agua, etc); la cristalinidad (Hubbs, 2013; Pal, 2011), entre otras.

Debido a la escasa información existente que incluya los riesgos asociados a trabajar con nanopartículas, el personal debe implementar un estricto control de seguridad para los procedimientos que realice dentro del laboratorio con la finalidad de reducir el riesgo de exposición. Así como seguir las guías de Buenas Prácticas de Laboratorio (BLP/GLP, por sus siglas en inglés) aprobadas por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD, por sus siglas en inglés <http://www.oecd-ilibrary.org/>) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés). Además, el personal debe emplear Equipo de Protección Personal (PPE, por sus siglas en inglés), el cual incluye guantes (de nitrilo y se recomienda usar un par de guantes por mano, de tal manera que después de estar en contacto con algún compuesto tóxico se elimine el primer par de guantes y se pueda seguir trabajando con el segundo par); bata de laboratorio; lentes de seguridad; máscara protectora; zapatos cerrados y que sean antiderrapantes, etc.

En caso de trabajar con nanomateriales que se encuentren en polvo, se debe trabajar en una campana de flujo laminar y usando máscara autofiltrante (FFP3), garantizando el ajuste correcto de la máscara. La ropa de trabajo más adecuada incluye cofia, bata de laboratorio (de material diferente al algodón) y cubrezapatos.

Se deben mantener etiquetados los químicos bajo la clasificación de peligrosidad y contar con una carpeta que contenga las hojas de seguridad (MSDS, por sus siglas en inglés) de cada reactivo. Para desechar las nanopartículas hay que tomar en consideración las guías de desecho para los materiales químicos con las que fueron sintetizadas (Vishwakarma, 2010). También, se debe contar con ventilación por extracción localizada con filtros capaces de capturar las nanopartículas.

Otros riesgos asociados a trabajar con nanopartículas son los incendios y el riesgo de explosión. Por lo tanto, se recomienda que el laboratorio tenga:

- a) Instalaciones eléctricas antiexplosivas,
- b) Protección contra polvos para equipos eléctricos.
- c) Contar con atmósfera controlada (temperatura, etc)

- d) Almacenar, obtener y manejar los nanomateriales en medios líquidos, en la medida de lo posible.

Con la finalidad de caracterizar la exposición laboral a las nanopartículas hay que identificar lo siguiente:

- a) Determinar los procesos en los cuales puede existir alto riesgo de exposición, por ejemplo los procedimientos que incluyen el calentamiento, los procesos mecánicos y los procesos químicos,
- b) Identificar las fuentes de emisión,
- c) Determinar la toxicidad del nanomaterial,
- d) Determinar la concentración de nanopartículas o nanoaerosoles en el ambiente, entre otros.

Después de la exposición a un nanomaterial, según las asociaciones estadounidenses como los Centros para el control y la prevención de Enfermedades/Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (CDC/NIOSH, por sus siglas en inglés [<http://www.cdc.gov/niosh/>]) los riesgos a la salud se clasifican con base en:

- a) Magnitud y duración de la exposición,
- b) Persistencia del material en el cuerpo,
- c) Toxicidad del material,
- d) Estado de salud general del individuo.

Sin embargo, debido a la escasa información respecto a este tema, los peligros asociados a la exposición con nanomateriales se basan en el juicio profesional, ya que para llevar a cabo una evaluación adecuada es necesario contar con toda la información del proceso de síntesis y manufactura, de los procesos de caracterización del material y bibliografía relevante. Conocer de forma cualitativa el riesgo a la exposición de un nanomaterial implicaría la realización de estudios de dosis respuesta por ejemplo estudios toxicológicos. Un punto importante a considerar son las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, en especial, el tamaño y funcionalización ya que pueden dar lugar a efectos adversos que generarían un daño colateral a la salud. Se recomienda la revisión de los documentos de Colorado-Soriano y colaboradores (2013) y el texto "Approaches to Safe Nanotechnology" (2009) que fue presentado en colaboración entre las agencias estadounidenses Departamento de Salud y Servicios Sociales (HHS, por sus siglas en inglés) y el NIOSH.

Resulta imperativo el educar a estudiantes y al personal que estará expuesto a estos materiales, en el manejo apropiado de los nanomateriales, para evitar exposiciones personales o grupales. El análisis de riesgo de exposición a nanomateriales es un área de oportunidad muy importante que debe ser abordado desde diversas disciplinas para lograr mejores determinaciones y entendimiento del riesgo, que permitan la toma de decisiones que disminuyan los riesgos a la salud del personal que trabaja con nanomateriales, ya sea en el laboratorio como a escala industrial.

Nanotoxicidad en el laboratorio

Aunado al aumento en el diseño de nuevas nanotecnologías, existe una preocupación creciente respecto a la toxicidad asociada al uso de la nanotecnología y a la generación de los nanomateriales, tanto para el paciente que recibe el tratamiento como para el personal que fabrica los nanomateriales. La composición de los nanomateriales y sus propiedades fisicoquímicas están relacionadas con la citotoxicidad; la biodisponibilidad; el transporte; la biotransformación; la absorción por las células y la activación de la respuesta biológica (Li, 2014).

El personal que trabaje con nanopartículas puede entrar en contacto con los nanomateriales por diversas vías. Las principales vías de contacto son la inhalación, la ingestión y el contacto con la piel.

- a) *Por inhalación:* es considerada la principal vía de entrada de nanopartículas al organismo. Debido al tamaño, las nanopartículas podrían ingresar por la nariz sin ser filtradas por la mucosa nasal (Poland, 2008), depositarse en los bronquios, tráquea, alveolos y bronquiolos e introducirse a las células principalmente por endocitosis (Onoue, 2014). Además podrían llegar al cerebro (Oberdörster., 2009).
- b) *Por ingestión:* la ingestión puede ocurrir de forma no intencional con la transferencia del nanomaterial a la boca o por deglución del nanomaterial que se encuentre depositado en las vías altas del sistema respiratorio. Además, la ingestión podría estar acompañada de inhalación. Sin embargo, poco se sabe respecto a los efectos que causa la ingestión accidental de nanopartículas.
- c) *Por vía dérmica:* hay estudios que sugieren que las nanopartículas pueden penetrar a través de los folículos pilosos, entrando en contacto con soluciones acuosas donde podrían disolverse y penetrar la piel. Tinkle y colaboradores (2003), demostraron que partículas menores de 1µm de diámetro pueden penetrar la piel flexionada en un ángulo de 30°. Se ha reportado que los puntos cuánticos (QD, por sus siglas en inglés) penetran el estrato corneo por difusión pasiva y pueden localizarse en capas epidérmicas y dérmicas, después de 8 a 24 horas de contacto (Ryman-Rasmussen, 2006). Sin embargo, no se tiene un entendimiento pleno de los efectos adversos que puedan tener los nanomateriales en lo relacionado a la penetración de la piel; por esta razón es necesario realizar más ensayos en modelos animales.

En caso que las nanopartículas ingresen al organismo y se encuentren en el sistema circulatorio, existe la posibilidad de que lleguen al corazón. Las nanopartículas pueden unirse a factores de coagulación, lo cual puede tener dos consecuencias: la inhibición de la cascada de coagulación (disminuyendo los tiempos de la reacción) o la activación de la coagulación (prolongando los tiempos de reacción). Sin embargo, es necesario realizar más ensayos para optimizar la síntesis de nanomateriales que eviten la trombogenicidad (Ilinskaya, 2013).

Existen reportes que mencionan que las nanopartículas son capaces de penetrar las membranas celulares y podrían ingresar a las células y tejidos. También se ha demostrado

la unión de nanopartículas a moléculas como ADN y ARN. El ingreso de las nanopartículas en células sanas podrían iniciar la producción de especies reactivas de O₂, ocasionando estrés oxidativo que puede inducir muerte celular (Onoue, 2014). Estas dudas surgen principalmente para las nanopartículas que están basadas en compuestos inorgánicos por ejemplo, las nanopartículas de oro, los puntos cuánticos, nanopartículas de óxido de hierro, etc. Sin embargo, hay que mencionar que no todos los nanomateriales causan daños en el organismo, por ejemplo los basados en proteínas (Tabla I).

Debido a la escasa información respecto a la nanotoxicidad al trabajar con nanomateriales es necesario realizar un mayor número de estudios que permitan determinar la toxicología asociada a esta tecnología, considerando que debe ser específica para cada uno de los materiales y que debe incluir tanto al personal que elabora los nanomateriales como a los pacientes que reciben un tratamiento asociado a nanopartículas.

Equipamiento mínimo para la síntesis de Nanomateriales

Un laboratorio de síntesis de nanomateriales podría diseñarse en función de la aplicación y con base en el tipo de nanomaterial a sintetizar. Si las aplicaciones implican la terapia y el empleo de moléculas funcionales tanto químicas como naturales (proteínas, péptidos, etc), el laboratorio puede dividirse en dos áreas: 1) síntesis y obtención de moléculas naturales con propiedades terapéuticas y 2) síntesis y obtención de nanomateriales, ya sean liposomas, nanopartículas, dendrímeros, puntos cuánticos, etc. (Teo 2014; Muñoz, 2012). Ambas áreas pueden servir si se quieren funcionalizar las nanopartículas con estructuras naturales, o bien, ser modificadas con diferentes compuestos químicos.

Para la síntesis de nanomateriales es importante que se considere dentro del diseño del laboratorio una campana de extracción de solventes, debido a que todos los materiales sintéticos o naturales que se utilizan para la formación de las nanopartículas generalmente son extraídos o sintetizados a través de solventes, ácidos y/o bases. La propuesta de equipos básicos y más representativos para la síntesis de diversos nanomateriales se describe en la Tabla III.

Cabe mencionar que los equipos recomendados en la Tabla III, se utilizan con mayor frecuencia para la preparación de algunos tipos de nanopartículas y para la adaptación de las nanopartículas utilizadas en el área de diagnóstico y de entrega de fármacos. Sin embargo, dentro de este listado de equipos no se consideran los equipos especializados en la caracterización de las nanopartículas y que son utilizados para la determinación de las propiedades físicas y químicas.

Caracterización Físicoquímica de Nanomateriales

La caracterización físicoquímica de los materiales se refiere al estudio de la composición; la estructura y el comportamiento de los nanomateriales. Estas características están asociadas al origen y tamaño de los nanomateriales. Es primordial llevar a cabo la caracterización de los nanomateriales, debido a que el comportamiento de las partículas variará dependiendo de la forma en la que fueron sintetizados y estará relacionado al diseño funcional y estructural.

Entre las propiedades fisicoquímicas más relevantes del material se incluyen:

- a) *Tamaño*: define propiedades y comportamiento espacial;
- b) *Relación tamaño/superficie*: determina la capacidad de incremento en el área de contacto;
- c) *Caracterización interfacial*: permite determinar el comportamiento de la interfase de la propia nanopartícula durante el contacto con el PA;
- d) *Pureza*: para evitar efectos secundarios por ejemplo los asociados a la presencia de endotoxinas,
- e) *Estabilidad*: define el tiempo en que el nanomaterial retiene las características iniciales durante su almacenamiento,
- f) *Solubilidad*: se refiere a la interacción del nanomaterial con el medio ya sea acuoso, hidrofóbico, etc (Lin, 2013).

Típicamente, los materiales diseñados con dimensiones a escala nanométrica tienen características fisicoquímicas únicas, las cuales les confieren factores críticos y relevantes que determinarán las interacciones fisiológicas. El estudio de las interacciones fisiológicas pueden proporcionar beneficios en las aplicaciones médicas, incluyendo mejoras en la eficacia y la eficiencia en la administración y entrega de fármaco, en la reducción de efectos secundarios, en la optimización de tratamientos y actualmente, puede apoyar en la prevención o diagnóstico de enfermedades (Lin, 2013).

Para evaluar todas las características físico-químicas y biológicas que presentan las nanopartículas se han desarrollado diferentes técnicas de caracterización, las cuales pueden ser divididas en: ópticas, electrónicas, de barrido, fotónicas, de ión-partícula y termodinámicas (Rao, 2009; Lin, 2013).

Las técnicas ópticas son aquellas en donde el principio de los equipos está basado en los cambios de la trayectoria de un haz de luz. Estas técnicas utilizan mecanismos de reflexión, refracción, dispersión, difracción, interferencia y polarización. Estos cambios en la trayectoria del haz de luz pueden observarse en diferentes rangos incluyendo: el espectro visible, ultra visible e infrarrojo cercano. Las propiedades físicas del nanomaterial que se pueden determinar con las técnicas ópticas son: esfuerzos; deformaciones; microdesplazamientos y reconstrucciones tridimensionales de superficies. Dos ejemplos de equipos que permiten determinar las características anteriormente mencionadas, incluyen la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS, por sus siglas en inglés) que determina de forma directa la distribución del tamaño de partícula. Otro ejemplo, es la técnica de Microscopia Confocal Láser de Barrido (CLSM, por sus siglas en inglés) que permite la determinación indirecta de la distribución tridimensional de las nanopartículas sobre una superficie micrométrica.

Las técnicas electrónicas se basan en un principio similar a las técnicas ópticas, pero en este caso se bombardea la nanopartícula con un haz de electrones y la proyección de la silueta de la nanopartícula se proyecta sobre una pantalla fluorescente o una placa fotográfica. Estas técnicas se utilizan principalmente para obtener imágenes directas de las nanopartículas y permiten determinar propiedades topográficas; de tamaño; de estructura y distribución química de la superficie según sea el tipo de microscopio que se empleó; ya

sea la Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) o la Microscopia Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés). La preparación de las muestras es sumamente importante al emplear alguna de estas técnicas y es crítica cuando se trata de muestras no conductoras, como es el caso de las muestras biológicas. Por ejemplo, para analizar liposomas y que sean observados por TEM, se deben preparar las muestras a través de un pretratamiento criogénico, que evita el rompimiento y la deformación de la estructura del liposoma. Si se requiere observar por SEM, los liposomas deben ser pre-tratados adicionando estructuras copoliméricas. En estos casos, se podría determinar la distribución química elemental y los tamaños de poros donde se pueden encontrar estructuras biológicas como enzimas, ADN, etc dependiendo de la característica del liposoma que se esté analizando.

Las técnicas de barrido, se basan en la interacción entre las fuerzas químicas y físicas en la superficie de la nanopartícula y las del equipo de medición. La técnica más conocida es la Microscopia de Fuerza Atómica (AFM, por sus siglas en inglés), donde la interacción de la punta del microscopio entra en contacto con la superficie del nanomaterial a medir, observándose interacciones de fuerza de repulsión y atracción que son traducidas a imagen. Con estas técnicas de barrido, es posible caracterizar todas las interacciones interfaciales entre la nanopartícula y los componentes que la modifican por ejemplo, proteínas, péptidos, polímeros, ADN, etc.

Las técnicas que se fundamentan en las propiedades de absorción de luz son consideradas técnicas de fotón, y permiten analizar la absorción de la luz por la nanopartícula o en caso que la nanopartícula tenga acoplada una molécula fluorescente. Estas técnicas determinan la capacidad de excitación y de emisión. Estas técnicas son utilizadas en el análisis cualitativo y cuantitativo. Un ejemplo de técnicas de fotón, es el espectrofotómetro de ultravioleta-visible (UV-Vis) que es muy socorrido en el área de análisis químico, debido a que permite determinar desde concentraciones de la solución de las nanopartículas hasta monitorear reacciones de cinética química y biológica.

Dentro de las técnicas de ión de partícula, se destacan la Difracción de Rayos X (XRD, por sus siglas en inglés), la Resonancia Magnética Nuclear (NMR, por sus siglas en inglés) y la espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés). La principal utilidad de estas técnicas es la caracterización químico-estructural de las nanopartículas.

Las técnicas termodinámicas como la termogravimetría (TGA, por sus siglas en inglés), la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés) y la Teoría de Brunauer–Emmett–Teller (BET, por sus siglas en inglés) permiten calcular la complejidad termodinámica de la nanopartícula y el cambio que sufre al interactuar con diversas moléculas por ejemplo ADN, proteínas, etc. dependiendo de la funcionalización de la nanopartícula.

Uno de los retos de la caracterización termodinámica, es utilizar los principios termodinámicos básicos en un sistema biológico heterogéneo, basándose en diferentes técnicas fisicoquímicas que analicen las nanopartículas funcionalizadas y su interacción con el tejido blanco. En la Tabla IV, se mencionan algunos de los parámetros que deben

analizarse para las nanopartículas y las técnicas de caracterización fisicoquímica que pueden ser empleadas.

Tabla III. Equipo mínimo necesario para la síntesis de nanomateriales aplicados en la nanomedicina.

Nanomaterial	Equipo recomendado	Consideraciones y recomendaciones	Bibliografía sugerida
Liposomas	Extrusor	Recomendado para formar liposomas de tamaño controlado, ya que el tamaño depende del tamaño de poro de la membrana	Ferrari M., 2015. Tong W., 2012. Hosta-Rigau L., 2013
	Sonicador de micro punta de titanio	Equipo recomendado para formar vesículas de tamaños por debajo de 200 nm. Sin embargo el tamaño no se controla como con el extrusor. Y debe filtrarse la solución para evitar contaminación de las partículas de titanio que pudieran desprenderse durante la sonicación	
	Sonicador de baño	Utilizado en estructuras liposomales tanto multilamelares como unilamelares. Se requiere de filtración para evitar la gran dispersión de tamaños que varían desde nanómetros hasta micras	
Nanopartículas poliméricas (Dendrímeros y polímeros naturales)	Equipo de vidrio para síntesis de reacciones químicas orgánicas Equipo de destilación. Equipo de nanoencapsulado Horno de calentamiento a vacío.	Las estructuras poliméricas dendríticas su crecimiento son partir de un centro reactivo y el crecimiento controlado de ramas concéntricas capaces de contener diferentes compuestos reactivos. Las estructuras poliméricas naturales, son capaces de degradarse dentro del organismo y poder considerarse para entregas de liberación prolongada.	Musyanovych A., 2014
Derivados de grafeno (nanotubos y fullerenos)	Horno de calentamiento convencional. Liofilizadora Autoclave	Los métodos de obtención de nanopartículas de carbón y de grafeno requieren de reactores que cuenten con una atmósfera inerte y temperaturas extremas. Estas estructuras se recomiendan ser recubiertas para ser utilizadas en el transporte de fármacos	Lan B.Y., 2005, Dutta S., 2010 Fluri F., 2015
Puntos cuánticos	Horno de microondas Reactores de pirólisis por aspersión	Se recomienda elegir el reactor adecuado a la partícula a obtener, debido a que existen diferentes reactores para la fabricación de las nanopartículas, ya que cada una de ellas requiere de condiciones extremas combustión.	Johari-Ahar M., 2015
Nanopartículas metálicas (plata, oro, germanio y platino)	Atomizador por presión, nebulizador ultrasónico o electrostático de acuerdo al tamaño de gota	Dado a que estas estructuras son especializadas y las condiciones de manufactura son extremas, se recomendaría mantener colaboraciones entre los laboratorios de síntesis de nanopartículas y los laboratorios de modificación de superficie de las nanopartícula, y así obtener las nanoestructuras funcionales aptas para el área farmacéutica.	Rai M., 2015 Piazza L., 2015. O'Regan C., 2014
Nanopartículas magnéticas	Equipos de precipitación electrostática, torre empacada, filtros, lavadores de gases, separadores por centrifugación verticales o cámaras de sedimentación		Sirivisoot S., 2015
Nanopartículas cerámicas (Óxidos de titanio, Óxidos de Silice o nitruros)	Equipo de electroquímica		Boissezon R., 2014

Tabla IV. Parámetros de caracterización fisicoquímica y técnicas recomendadas (Lin, 2014).

Característica del Nanomaterial	Técnica
Tamaño/Distribución del tamaño	DLS, FCS, RS, NSOM, NMR, SEM, TEM, STM, AFM, TOF-MS, XRD, SAXS, FS, UV-VIS, AUC, GE, CE, FFF
Carga de la superficie	Potencial Z, EELS, ATR-FTIR, GE, CE
Forma	NSOM, SEM, TEM, STM, AFM, XRD, SAXS, AUC, CLSM
Estructura	TERS, CD, MS, IR, STM, AFM, RS, NMR, XRD, SAXS, FS, DSC, AUC
Composición	MS, NMR
Pureza	MS, NMR, HPLC, HDC
Estabilidad	Potencial Z, CD, TGA, DSC, ITC, HPLC, HDC, Termoforesis
Dispersión	ESEM, TEM, STM, AFM
Propiedades de superficie	CD-ELISA, TOF-SIMS, ATR-FTIR, AFM modificado, XPS
Grosor y densidad de la funcionalización con proteínas	DLS, FCS, TEM, SEC, Centrifugación diferencial
Composición y cuantificación de la funcionalización con proteínas	SDS-PAGE, LC-MS/MS
Conformación de la funcionalización con proteínas	CD, simulation
Afinidad de la funcionalización con proteínas	SEC, SPR, ITC

Nota: Ver lista de acrónimos al final del documento

Centros de Investigación de Nanotecnología en México

Los laboratorios de nanotecnología en México se encuentran dentro de las Universidades públicas como por ejemplo: la Universidad Autónoma de México (UNAM) con el Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNYN); el Instituto Politécnico Nacional (IPN) con el Centro de Nanociencias y Nano y Micro Nanotecnologías (CNMN) y en los Centros de Investigación CONACyT, como el Laboratorio Nacional de Nanotecnología (NanoTech) ubicado en el Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV); el Centro de Investigaciones en Óptica (CIO), entre otros.

De acuerdo a la publicación de la Red Nacional de Nanotecnología, Diagnóstico y prospectiva de la Nanotecnología en México (<http://www.nanored.org.mx/>), se enlistan hasta 56 instituciones que se dedican a estudio y desarrollo de la nanotecnología. Esto obedece a que la nanotecnología es una herramienta para el desarrollo de nuevas alternativas en las distintas áreas de investigación. Además, en México se han formado redes de investigación como son: la Red Internacional de Nanociencia y Nanotecnología (RED INN); la Red de Grupos de Investigación en Nanociencia y Nanotecnología (Red Regina) y la Red Nacional de Nanociencia y Nanotecnología. Existe participación de investigadores mexicanos en redes internacionales como: NanoforumEULA (Red europea y latinoamericana) y la Red Latinoamericana de Nanotecnología y Sociedad (ReLANS). Para mayor información se recomienda visitar la página <http://www.nanored.org.mx>

Normativa y Nanotecnología

México no tiene un plan estratégico para el desarrollo de la nanotecnología, a pesar de que cuenta con centros de investigación, apoyos económicos e investigadores capacitados en el tema (Red Nanotecnología y Nanociencias-Conacyt, 2008). Aunado a que la nanotecnología ha pasado de ser una curiosidad a ser una capacidad y parte de nuestro arsenal de herramientas; tanto las Universidades como los Centros de Investigación juegan un papel importante en la transferencia de tecnología y en su contribución para la comercialización de estos productos, ya que son comúnmente conocidos como la fuente de la innovación tecnológica. Los centros donde se generan nuevos nanomateriales y nanomedicinas cuentan con la experiencia y habilidades para apoyar el desarrollo y la transferencia de tecnología. Además, es posible la generación de empresas incubadas en centros de investigación y la obtención de beneficios basados en la propiedad intelectual generada a partir de estas innovaciones. Sin embargo, cuando se tiene contemplado incursionar en esta área y tener un producto en el mercado, en cualquiera de las aplicaciones posibles, es importante tener una visión global de todos los desafíos que se pueden presentar.

En el campo de la Investigación y Desarrollo (*I+D*) de nanoproductos existen diversos desafíos al momento de comercializar productos de nanotecnología, entre los cuales se encuentran:

- a) Marco regulatorio escaso y/o inadecuado;
- b) Desconocimiento por parte de la población en general de los productos “nano” y de sus posibles beneficios, riesgos a la salud, medio ambiente, etc.
- c) Escaso apoyo y la aceptación por parte del público (ya sea del usuario final o la industria);
- d) Consideraciones en el desarrollo de escalabilidad, reproducibilidad, caracterización, control de calidad, etc;
- e) Perfiles de seguridad de los productos “nano”;
- f) Falta de plataformas multidisciplinares, en las cuales todos los actores implicados se unan y lleguen a acuerdos; y
- g) Una pobre propiedad intelectual y transferencia tecnológica al sector productivo (Kaur, 2014)

Como con cualquier nueva tecnología, uno de los retos para la regulación sanitaria surge de la necesidad de garantizar la seguridad pública cuando los nuevos productos y materiales se introducen en el mercado. Un aspecto débil de las nanotecnologías, es el marco regulatorio a nivel internacional; dada la falta de herramientas adecuadas para la alerta temprana de posibles efectos adversos de los productos y del control del mercado; es decir, la retirada temprana del mercado y el etiquetado de los mismos como parte de la vigilancia del mercado y protección de los consumidores (Mantovani, 2013).

En este sentido, la generación de una nueva regulación debe tomar en cuenta:

- a) *Reglamentos ya existentes*: que son generados por organismos reguladores y que permitan formular nuevas regulaciones que sean nano-específicas y que tengan asistencia semántica acerca de su relevancia e impacto,

- b) *A los fabricantes*: los cuales deben recibir justo a tiempo las regulaciones existentes y deben tener ayuda científica específica de modo que cumplan con las leyes,
- c) *El estado del arte* de trabajos de investigación en materia de nanotecnología relacionados al impacto en la salud,
- d) *A los consumidores*: para obtener detalles de las características de los productos que desean comprar. Sus opiniones y retroalimentación a los fabricantes y a los órganos regulatorios son importantes. Además, los consumidores deben conocer si los productos “nano” tienen efectos negativos (Preethu, 2011),
- e) *Los diferentes actores del gobierno*: de los diferentes países del mundo, que son responsables de la regulación de alimentos, medicamentos, cosméticos, aparatos médicos para uso humano y veterinario, productos biológicos y derivados sanguíneos. Estas agencias gubernamentales, tienen la obligación de regular la multitud de productos de estos sectores de manera que garanticen la seguridad de los consumidores, así como la efectividad de los nanoproductos, antes de ser comercializados en su país o región,

Regulaciones nacionales e internacionales aplicadas a la Nanotecnología

A medida que el número de nuevos productos desarrollados por las nanotecnologías se ha incrementado, la importancia de la comercialización se ha convertido en crucial para las industrias manufactureras. Debido a esto, se enlista una revisión sobre las regulaciones, guías orientativas, documentos sobre la nanotecnología y los nanomateriales de diferentes organismos regulatorios a nivel internacional que deben tomar en cuenta antes de planear un laboratorio, empresa o producto basado en la Nanomedicina.

México. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS)

En México, ya se encuentran desde hace algunos años productos como cosméticos, recubrimientos, bactericidas y textiles, a los que se han incorporado nanomateriales y por ésta razón publicitan propiedades novedosas. Estos productos se encuentran en México ya sea por haber sido importados o porque han sido manufacturados en nuestro país. Sin embargo, el marco regulatorio de nuestro país dirigido por COFEPRIS *no contempla Normativas para este tipo de productos*. Se han hecho grandes esfuerzos para establecer lineamientos generales de los productos de nanotecnologías, para que las dependencias y organismos reguladores del gobierno federal tengan un marco apropiado de acuerdo a aplicaciones, productos y/o servicios que contengan o hagan uso de nanomateriales, producidos directa o indirectamente por el ser humano, en cualquier etapa del ciclo de vida de estos materiales (Lineamientos Regulaciones Nanotecnología, Secretaría de Economía, 2012).

Hoy en día el Centro Nacional de Metrología (CENAM) juega un papel importante en la estandarización de nanomateriales y por tanto, en la generación de patrones de medición a escala nanométrica (Informe de Cuentas de la Administración Pública Federal 2000-2006, CENAM). El CENAM, es participante en la Organización Internacional de Normalización (ISO, por sus siglas en inglés).

Un punto preocupante es la falta de atención de los efectos políticos, sociales, económicos y ambientales de la nanotecnología. La ausencia de regulación es un espacio de

oportunidad para actores de otros países que no pueden investigar o promover ciertos proyectos nanotecnológicos en sus países; pero sus consecuencias a la salud y ambientales son inciertas (Zágado-Lau, 2010).

Estados Unidos de América (EE. UU.) Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA)

La FDA no hace ningún juicio categórico respecto a si la nanotecnología es intrínsecamente segura o perjudicial, y toma en cuenta las características específicas de los productos individuales. La FDA tiene documentos de orientación de productos de nanotecnología que alientan a los fabricantes a consultar con la agencia antes de tomar la decisión de lanzar sus productos al mercado. Realizar consultas con la FDA desde un inicio ayuda en el proceso de desarrollo de productos y facilitan un entendimiento mutuo sobre cuestiones científicas y normativas específicas aplicables al producto de nanotecnología. Además, ayudan a tratar las cuestiones relacionadas con la seguridad, eficacia, impacto en la salud pública y / o situación reglamentaria del producto (<http://www.fda.gov/>). Algunos ejemplos de nanoprodutos aprobados por la FDA son: 1) *Los basados en liposomas*: Doxil (doxorubicina/adriamicina), AmBisome (anfotericina), Diprivan (propofol), 2) *Los basados en nanopartículas*: Abraxane (paclitaxel), Estrasorb (hemihidrato de estradiol), Ontak (denileukindiftitox), entre otros (Bawa, 2013).

Unión Europea (EU)

La política europea respecto a los nanomateriales se desarrolló sobre la base de una Estrategia y Plan de Acción considerada por la Comisión Europea. En este marco, la Comisión Europea adoptó un código de conducta para los sectores de investigación de las nanociencias y las nanotecnologías. Más recientemente, la Comisión Europea ha desarrollado dos revisiones regulatorias y una definición de los nanomateriales (Tabla V) (<http://ec.europa.eu/>).

Agencia Europea de Medicamentos (EMA /EMEA)

Una visión general de las iniciativas adoptadas por la Unión Europea sobre las regulaciones en relación con el desarrollo y la evaluación de la nanomedicina y nanosimilares, indica que los nanomateriales son similares a los productos químicos normales: algunas sustancias pueden o no ser tóxicos (dependiendo de la aplicación). También indica que, existen posibles riesgos relacionados con nanomateriales específicos y usos específicos. Por lo tanto, los nanomateriales requieren una evaluación de riesgos, que debe realizarse sobre una base científica sólida y deberán ser analizados caso por caso para la obtención de información pertinente para decidir su aprobación sanitaria. Además, se indica que algunos de los métodos de evaluación de riesgos actuales son aplicables, pero todavía se requiere de trabajo en aspectos muy particulares dependiendo del nanomaterial y de su uso. A pesar de esto, la EMEA ya ha aprobado una serie de medicamentos basados en nanotecnología y se encuentran en el mercado. Dentro de estos medicamentos se encuentran: 1) *Basados en Nanopartículas liposomales*: Caelyx (doxorubicina), Mepact (mifamurtida) y Myocet (doxorubicina). 2) *Basados en Nanopartículas no liposomales*: Abraxane (paclitaxel), EMEND (aprepitant) y Rapamune (sirolimus). El desarrollo de medicamentos que utilizan nanotecnología plantea para la Agencia nuevos desafíos en el futuro. Estos incluyen debates sobre si el marco regulatorio actual es apropiado para estos medicamentos y si las directrices y requisitos existentes de los medicamentos, en específico su evaluación y monitorización, son adecuados. (Tabla V) (<http://www.ema.europa.eu/>).

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA)

En marzo de 2009, el Comité Científico de la EFSA, que incluye a los presidentes de todos los paneles de la agencia, publicó un dictamen científico sobre la nanociencia y la nanotecnología en relación con la alimentación y la seguridad de los piensos para la industria ganadera. En 2011, se publicó un documento de orientación sobre la forma de evaluar los riesgos potenciales relacionados a productos de nanotecnología para la alimentación. En esta guía, se hacen recomendaciones prácticas sobre la manera de evaluar las solicitudes de la industria para utilizar nanomateriales artificiales en aditivos, suplementos alimentarios, enzimas, aromas, materiales en contacto con alimentos (recubiertas) para piensos y plaguicidas. Ambas publicaciones siguieron las solicitudes de asesoramiento de la Comisión Europea. Además, la EFSA tuvo en cuenta la información recibida de las consultas públicas. Los paneles de la EFSA también consideran la seguridad de los nanomateriales específicos, por ejemplo en las áreas de los aditivos alimentarios y los materiales en contacto con alimentos (<http://www.efsa.europa.eu/>). Un punto importante se presenta cuando un aditivo alimentario ya incluido en una lista común ha sufrido algún cambio significativo, ya sea en su método de producción, en las materias primas utilizadas o hay un cambio en el tamaño de las partículas obtenidas mediante nanotecnología, el aditivo alimentario preparado con estos nuevos métodos o materiales será considerado como un aditivo diferente y deberá cumplir con todas las especificaciones requeridas para aditivos antes de su colocación en el mercado (Maurits-Jan, 2014).

Comité científico de los productos de consumo (SCCP)

Este Comité Europeo emite dictámenes sobre los riesgos de salud y seguridad (incluyendo riesgos químicos, físicos, biológicos, mecánicos y otros), de los productos de consumo no alimentarios (por ejemplo, los productos cosméticos y sus ingredientes, juguetes, textiles, ropa, cuidado personal y productos para el hogar) y servicios (por ejemplo, tatuajes, bronceado artificial). En los productos cosméticos, la referencia a "nanotecnología" por lo general se refiere al uso de nanopartículas insolubles como ingredientes en productos cosméticos generalmente liposomas. En este sentido, la Legislación de la UE proporciona un alto nivel de protección a la salud humana.

Algunos nanomateriales, se utilizan esencialmente como filtros UV. Hasta ahora, la Comisión ha permitido el dióxido de titanio como filtro UV que proporciona protección solar. Sin embargo, se sugirió una reevaluación de este mineral para tratar enfermedades de pieles anormales, así como el posible impacto de los efectos mecánicos y de penetración en la piel. Esta opinión está siendo objeto de seguimiento por la Comisión como gestor de riesgos. Otra sustancia a nanoescala muy empleada, es el óxido de zinc. Sin embargo, ha sido evaluada y se llegó a la conclusión de que la seguridad del óxido de zinc como filtro UV no se había demostrado suficientemente y por lo tanto no se ha permitido para su uso (<http://ec.europa.eu/>). De acuerdo con el marco legal en la UE, si el producto cosmético contiene nanomateriales, éstos deberán mostrar seguridad y un perfil toxicológico y cualquier uso tiene que ser apoyado por un archivo de información del producto con los datos de seguridad de acuerdo a la autoridad competente en el mercado (<http://ec.europa.eu/>).

Sociedad Americana de Pruebas y Materiales (ASTM)

La ASTM es una organización de normas internacionales que desarrolla y publica, acuerdos voluntarios de normas técnicas para una amplia gama de materiales, productos, sistemas y servicios. Existen alrededor de 12,575 acuerdos voluntarios de normas de aplicación mundial. Las normas de la ASTM han servido como referencia para la solicitud de registros sanitarios. Las normas ASTM para la nanotecnología ofrecen orientación para la nanotecnología y los nanomateriales, así como la terminología de la nanotecnología, la prueba de propiedad y las cuestiones de salud y seguridad (Tabla V) (<http://www.astm.org/>).

Organización Internacional de Normalización (ISO)

Es una organización de membresía no gubernamental, independiente y el mayor desarrollador mundial de Normas Internacionales. La red ISO está compuesta por representantes de los Organismos de Normalización (ON) nacionales de cada país miembro, que produce diferentes normas internacionales industriales y comerciales. Dichas normas se conocen como «Normas ISO» y su finalidad es la coordinación de las normas nacionales, que constan en el Acta Final de la Organización Mundial del Comercio con el propósito de facilitar tanto el comercio, como el intercambio de información y además, contribuir con normas comunes al desarrollo y a la transferencia de tecnologías. Esta red está conformada por 162 países miembros, con una Secretaría Central con sede en Ginebra, Suiza que coordina el sistema. Las normas desarrolladas por ISO son voluntarias, comprendiendo que ISO es un organismo no gubernamental y no depende de ningún otro organismo internacional por lo tanto, no tiene autoridad para imponer sus normas a ningún país. El contenido de los estándares ISO está protegido por derechos de copyright y para acceder a ellos el público en general debe comprar cada documento. Actualmente, ISO ha publicado más de 19,500 Normas Internacionales, cubriendo casi todas las industrias, desde la tecnología hasta la seguridad alimentaria, la agricultura y la salud (<http://www.iso.org/>). A pesar de que las Normas ISO no son obligatorias, realmente ofrecen una ayuda indiscutible y si se cumplen con ellas, es muy fácil cumplir con las Normativas Oficiales (para obtención de Registro Sanitario) del país al que se desea comercializar el producto.

La Norma ISO/TC 229-Nanotechnologies incluye uno o ambos de los siguientes tópicos (Tabla V) (Catálogo de Estándares <http://www.iso.org/>):

- a) Comprensión y control de la materia y los procesos a escala nanométrica, pero no exclusivamente, por debajo de 100 nanómetros de una o más dimensiones, donde la aparición de fenómenos dependientes del tamaño por lo general permite aplicaciones novedosas y,
- b) Propiedades de los materiales a nanoescala que difieren de las propiedades de los átomos individuales, moléculas y materia a granel, para crear materiales mejorados, dispositivos y sistemas que explotan estas nuevas propiedades.

Las tareas específicas incluyen el desarrollo de normas para: terminología y nomenclatura; metrología e instrumentación, incluidas las especificaciones para los materiales de referencia; metodologías de prueba; modelado y simulaciones; y la salud basada en la ciencia, la seguridad y prácticas ambientales.

Organización Mundial de la Salud (WHO)

En la Declaración de Parma 2010 sobre el Medio Ambiente y la Salud, los ministros de salud y de medio ambiente de los 53 Estados miembros de la Oficina Regional de la OMS para Europa discutieron el tema de la Nanotecnología. Dadas las innumerables aplicaciones de los nanomateriales, inclusive en la salud y la medicina, existen preocupaciones sobre las consecuencias perjudiciales para la salud sobre la exposición involuntaria a los nanomateriales por lo que surgen grandes desafíos ambientales, de salud y legislación en este tema. Por lo que la Oficina Regional de la OMS para Europa, llevó a cabo una evaluación crítica del estado actual del conocimiento y la evidencia clave sobre las posibles consecuencias para la salud de los nanomateriales, con miras a identificar las opciones para la evaluación de riesgos y la formulación de políticas, y convocó una reunión de expertos para abordar la cuestión (Tabla V) (<http://www.who.int/>).

Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y WHO

Tanto la FAO como la WHO han trabajado en conjunto en temas sobre la seguridad y los riesgos de la nanotecnología tanto en alimentos como en agricultura. Ambas instituciones en conjunto tienen las siguientes publicaciones relevantes:

- a) FAO/WHO Paper: State of the art on the initiatives and activities relevant to risk assessment and risk management of nanotechnologies in the food and agriculture sectors (2013) (FAO/WHO NanoPaper, 2012).
- b) FAO/WHO Expert Meeting on the Application of Nanotechnologies in the Food and Agriculture Sectors: Potential Food Safety Implications (2010) (FAO/WHO Meeting Report, 2010).

Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA)

El PNUMA, con sede en Nairobi, Kenia, es un programa de las Naciones Unidas que coordina las actividades relacionadas con el medio ambiente, asistiendo a los países en la implementación de políticas medioambientales adecuadas así como a fomentar el desarrollo sostenible. Fue creado por recomendación de la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo Humano (Estocolmo, 1972). Su misión es proporcionar liderazgo y promover los esfuerzos conjuntos para el cuidado del medio ambiente, alentando, informando y capacitando a las naciones y a los pueblos para que mejoren su vida sin comprometer el bienestar de generaciones futuras. En el tercer encuentro de la Comisión Coordinadora de América Latina y el Caribe, se planteó un Plan Estratégico para el uso de la Nanotecnología en esta región, esto se hizo en conjunto con el Comité Preparatorio para el desarrollo de un Enfoque Estratégico para el Manejo Internacional de las Sustancias Químicas (SAICM, por sus siglas en inglés). El reporte resume de manera global que la nanotecnología en la región debe ser bien planificada, que existe una necesidad de aportación científica adicional por parte de investigadores de la región, que se debe sensibilizar a la población sobre la nanotecnología y los nanomateriales, así como de los problemas que pueda generar el uso de los nanomateriales a la salud y el medio ambiente (<http://sd.iisd.org/>).

Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE)

El OCDE es un organismo de cooperación internacional, compuesto por 34 países, cuyo objetivo es coordinar sus políticas económicas y sociales. La OCDE fue fundada en 1960 y su sede central se encuentra en el Château de la Muette, en París (Francia). En 2010, el

Grupo de Trabajo sobre Nanotecnología (WPN, por sus siglas en inglés <http://www.oecd.org/sti/nano/>) comenzó un proyecto, cuyo objetivo era proporcionar un inventario, resumen y una visión general de los enfoques regulatorios, regímenes legislativos y reglamentarios patrocinados por el gobierno de 12 países (Australia, Canadá, Comunidad Europea, Francia, Alemania, Japón, Corea, Holanda, Noruega, Polonia, Rusia y EE. UU.). Así como de la investigación científica de productos de nanotecnología en alimentos y medicina.

En respuesta a esto, se generaron los siguientes documentos:

- a) Policy Environments and Governance for Innovation and Sustainable Growth through Nanotechnology (2014)
- b) Nanotechnology in the Context of Technology Convergence (2014)
- c) Nanotechnology and Tyres: Greening Industry and Transport (2014)
- d) Considerations in Moving toward a Statistical Framework for Nanotechnology: Findings from a Working Party on Nanotechnology Pilot Survey of Business Activity in Nanotechnology (2014)
- e) Responsible Development of Nanotechnology: Results of a Survey Activity (2013)
- f) Report of the International Symposium on Assessing the Economic Impact of Nanotechnology (2013)
- g) Regulatory Frameworks for Nanotechnology in Foods and Medical Products: Summary Results of a Survey Activity (2013)
- h) Planning Guide for Public Engagement and Outreach in Nanotechnology (2012)
- i) Fostering Nanotechnology to Address Global Challenges: Water (2011)
- j) The Impacts of Nanotechnology on Companies: Policy Insights from Case Studies (2010)
- k) Nanotechnology: An Overview Based on Indicators and Statistics (STI Working Paper) (2009)
- l) Inventory of National Science, Technology and Innovation Policies for Nanotechnology 2008 (2008) (Working Party on Nanotechnology: Reports – OECD).

Además, la OECD ofrece una serie de documentos sobre la seguridad de los nanomateriales manufacturados proporcionando información actualizada sobre las diversas actividades de la OCDE relacionadas con la salud humana y la seguridad ambiental (Tabla V) (Seguridad de Nanomateriales, OECD <http://www.oecd.org/>).

Tabla V. Regulaciones para Nanotecnología

Jurisdicción	Organismo	Documentos relacionados a Nanotecnología
México	COFEPRIS	No contempla normativas. Existe un comunicado donde se plantea que México tenga un Plan Estratégico y Económico en Tema de Nanotecnología. http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/competitividad/lineamientos_regulaciones_nanotecnologias_261112.pdf
EE. UU.	FDA	No contempla normativas, pero si tiene guías de apoyo para la regulación de los Nanomateriales para productos de uso humano y veterinario (medicamentos, alimentos y cosméticos): <ul style="list-style-type: none"> • Implicación de la nanotecnología en productos regulados por la FDA: • Final Guidance for Industry: Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology • Federal Registernotice: 79 FR 36534 (June 27, 2014) • Seguridad de los Nanomateriales en Cosméticos: • Final Guidance for Industry: Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products • Federal registernotice: 79 FR 36532 (June 27, 2014)

		<ul style="list-style-type: none"> Evaluación de los efectos de cambios en los procesos de fabricación, incluyendo significativo Tecnologías Emergentes Final Guidance for Industry: Assessing the Effects of Significant Manufacturing Process Changes, Including Emerging Technologies, on the Safety and Regulatory Status of Food Ingredients and Food Contact Substances, Including Food Ingredients that Are Color Additives Federal Register notice: 79 FR 36533 (June 27, 2014) <p>http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/Nanotechnology/ucm301093.htm</p>
Europa	EU Policy EMA EFSA SCCP (Cosmetics)	<p>No contempla normativas, pero si tiene Plan Estratégico, revisiones y guías de apoyo sobre la regulación de los Nanomateriales para productos de uso humano y veterinario (medicamentos, alimentos y cosméticos):</p> <ul style="list-style-type: none"> COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT, THE COUNCIL AND THE EUROPEAN ECONOMIC AND SOCIAL COMMITTEE. Second Regulatory Review on Nanomaterials <p>http://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/pdf/policy/communication-from-the-commission-second-regulatory-review-on-nanomaterials_en.pdf</p> <ul style="list-style-type: none"> COMMISSION STAFF WORKING PAPER. Types and uses of nanomaterials, including safety aspects. Accompanying the Communication from the Commission to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee on the Second Regulatory Review on Nanomaterials <p>http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=SWD:2012:0288:FIN:EN:PDF</p> <ul style="list-style-type: none"> Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. EFSA Scientific Committee <p>http://www.efsa.europa.eu/it/search/doc/2140.pdf</p> <ul style="list-style-type: none"> Annual report of the EFSA Scientific Network of Risk Assessment of Nanotechnologies in Food and Feed1 for 2013. <p>http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/531e.pdf</p> <ul style="list-style-type: none"> GUIDANCE ON THE SAFETY ASSESSMENT OF NANOMATERIALS IN COSMETICS <p>http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_005.pdf</p>
Internacional	ASTM	<p>Las Normas ASTM para nanotecnología ofrecen orientación sobre terminología, cuestiones de salud y seguridad de los nanomateriales.</p> <ul style="list-style-type: none"> E2456-06(2102) Standard Terminology Relating to Nanotechnology E2490-09 Standard Guide for Measurement of Particle Size Distribution of Nanomaterials in Suspension by Photon Correlation Spectroscopy (PCS) E2578-07(2012) Standard Practice for Calculation of Mean Sizes/Diameters and Standard Deviations of Particle Size Distributions E2834-2012 Standard Guide for Measurement of Particle Size Distribution of Nanomaterials in Suspension by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) E2859-2011 Standard Guide for Size Measurement of Nanoparticles Using Atomic Force Microscopy E2864-2013 Test Method for Measurement of Airborne Metal and Metal Oxide Nanoparticle Surface Area Concentration in Inhalation Exposure Chambers using Krypton Gas Adsorption E2865-2012 Standard Guide for Measurement of Electrophoretic Mobility and Zeta Potential of Nanosized Biological Materials E2909-2013 Standard Guide for Investigation/Study/Assay Tab-Delimited Format for Nanotechnologies (ISA-TAB-Nano): Standard Field Format for the Submission and Exchange of Data on Nanomaterials and Characterizations E2996 - 15 Standard Guide for Workforce Education in Nanotechnology Health and Safety E3001 - 15 Standard Practice for Workforce Education in Nanotechnology Characterization E2524 - 08(2013) Standard Test Method for Analysis of Hemolytic Properties of Nanoparticles E2525 - 08(2013) Standard Test Method for Evaluation of the Effect of Nanoparticulate Materials on the Formation of Mouse Granulocyte-Macrophage Colonies E2526 - 08(2013) Standard Test Method for Evaluation of Cytotoxicity of Nanoparticulate Materials in Porcine Kidney Cells and Human Hepatocarcinoma Cells E2535 - 07(2013) Standard Guide for Handling Unbound Engineered Nanoscale Particles in Occupational Settings E2834 - 12 Standard Guide for Measurement of Particle Size Distribution of Nanomaterials in Suspension by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) E2859 - 11 Standard Guide for Size Measurement of Nanoparticles Using Atomic Force Microscopy E2864 - 13 Standard Test Method for Measurement of Airborne Metal and Metal Oxide Nanoparticle Surface Area Concentration in Inhalation Exposure Chambers using Krypton Gas Adsorption E2865 - 12 Standard Guide for Measurement of Electrophoretic Mobility and Zeta Potential of Nanosized Biological Materials

		http://www.astm.org/Standards/nanotechnology-standards.html
Internacional	ISO TC/229	<p>Guías voluntarias, pero contemplan muchos de los puntos importantes a tomar en cuenta sobre Nanotecnología, en especial sobre su manufactura y caracterización. Generalmente si se cumplen estas Normas se cumplen con las normativas oficiales de los países que forman parte de ISO.</p> <ul style="list-style-type: none"> • ISO/TS 10797:2012: Nanotechnologies -- Characterization of single-wall carbon nanotubes using transmission electron microscopy • ISO/TS 10798:2011: Nanotechnologies -- Characterization of single-wall carbon nanotubes using scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray spectrometry analysis • ISO 10801:2010: Nanotechnologies -- Generation of metal nanoparticles for inhalation toxicity testing using the evaporation/condensation method • ISO 10808:2010: Nanotechnologies -- Characterization of nanoparticles in inhalation exposure chambers for inhalation toxicity testing. • ISO/TS 10867:2010: Nanotechnologies -- Characterization of single-wall carbon nanotubes using near infrared photoluminescence spectroscopy • ISO/TS 10868:2011: Nanotechnologies -- Characterization of single-wall carbon nanotubes using ultraviolet-visible-near infrared (UV-Vis-NIR) absorption spectroscopy • ISO/TR 10929:2012: Nanotechnologies -- Characterization of multiwall carbon nanotube (MWCNT) samples • ISO/TS 11251:2010: Nanotechnologies -- Characterization of volatile components in single-wall carbon nanotube samples using evolved gas analysis/gas chromatograph-mass spectrometry • ISO/TS 11308:2011: Nanotechnologies -- Characterization of single-wall carbon nanotubes using thermogravimetric analysis. • ISO/TR 11360:2010: Nanotechnologies -- Methodology for the classification and categorization of nanomaterials. • ISO/TR 11811:2012: Nanotechnologies -- Guidance on methods for nano- and microtribology measurements • ISO/TS 11888:2011: Nanotechnologies -- Characterization of multiwall carbon nanotubes -- Mesoscopic shape factors • ISO/TS 11931:2012: Nanotechnologies -- Nanoscale calcium carbonate in powder form - - Characteristics and measurement • ISO/TS 11937:2012: Nanotechnologies -- Nanoscale titanium dioxide in powder form -- Characteristics and measurement • ISO/TS 12025:2012: Nanomaterials -- Quantification of nano-object release from powders by generation of aerosols • ISO/TR 12802:2010: Nanotechnologies -- Model taxonomic framework for use in developing vocabularies -- Core concepts • ISO/TS 12805:2011: Nanotechnologies -- Materials specifications -- Guidance on specifying nano-objects • ISO/TR 12885:2008: Nanotechnologies -- Health and safety practices in occupational settings relevant to nanotechnologies • ISO/TS 12901-1:2012: Nanotechnologies -- Occupational risk management applied to engineered nanomaterials -- Part 1: Principles and approaches • ISO/TS 12901-2:2014: Nanotechnologies -- Occupational risk management applied to engineered nanomaterials -- Part 2: Use of the control banding approach • ISO/TR 13014:2012: Nanotechnologies -- Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment • ISO/TR 13014:2012/Cor 1:2012 • ISO/TR 13121:2011: Nanotechnologies -- Nanomaterial risk evaluation • ISO/TS 13278:2011: Nanotechnologies -- Determination of elemental impurities in samples of carbon nanotubes using inductively coupled plasma mass spectrometry • ISO/TR 13329:2012: Nanomaterials -- Preparation of material safety data sheet (MSDS) • ISO/TS 13830:2013: Nanotechnologies -- Guidance on voluntary labelling for consumer products containing manufactured nano-objects • ISO/TS 14101:2012: Surface characterization of gold nanoparticles for nanomaterial specific toxicity screening: FT-IR method • ISO/TR 14786:2014: Nanotechnologies -- Considerations for the development of chemical nomenclature for selected nano-objects • ISO/TS 16195:2013: Nanotechnologies -- Guidance for developing representative test materials consisting of nano-objects in dry powder form • ISO/TR 16197:2014: Nanotechnologies -- Compilation and description of toxicological screening methods for manufactured nanomaterials • ISO/TS 16550:2014: Nanotechnologies -- Determination of silver nanoparticles potency by release of muramic acid from Staphylococcus aureus • ISO/TS 17200:2013: Nanotechnology -- Nanoparticles in powder form -- Characteristics and measurements

		<ul style="list-style-type: none"> • ISO 29701:2010: Nanotechnologies -- Endotoxin test on nanomaterial samples for in vitro systems -- Limulus amoebocyte lysate (LAL) test • IEC/TS 62607-2-1:2015: Nanomanufacturing - key control characteristics for CNT film applications – Resistivity • IEC/TS 62622:2012: Artificial gratings used in nanotechnology -- Description and measurement of dimensional quality parameters • ISO/TS 80004-1:2010: Nanotechnologies -- Vocabulary -- Part 1: Core terms • ISO/TS 80004-2:2015: Nanotechnologies -- Vocabulary -- Part 2: Nano-objects • ISO/TS 80004-3:2010: Nanotechnologies -- Vocabulary -- Part 3: Carbon nano-objects • ISO/TS 80004-4:2011: Nanotechnologies -- Vocabulary -- Part 4: Nanostructured materials • ISO/TS 80004-5:2011: Nanotechnologies -- Vocabulary -- Part 5: Nano/bio interface • ISO/TS 80004-6:2013: Nanotechnologies -- Vocabulary -- Part 6: Nano-object characterization • ISO/TS 80004-7:2011: Nanotechnologies -- Vocabulary -- Part 7: Diagnostics and therapeutics for healthcare • ISO/TS 80004-8:2013: Nanotechnologies -- Vocabulary -- Part 8: Nanomanufacturing processes <p>http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_tc_browse.htm?commid=381983&published=on&includesc=true</p>
Internacional	WHO	<ul style="list-style-type: none"> • Nanotechnology and human health: Scientific evidence and risk governance. Report of the WHO expert meeting 10–11 December 2012, Bonn, Germany. http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0018/233154/e96927.pdf?ua=1
Internacional	FAO WHO	<ul style="list-style-type: none"> • State of the art on the initiatives and activities relevant to risk assessment and risk management of nanotechnologies in the food and agriculture sectors. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/topics/FAO_WHO_Nano_Paper_Public_Review_20120608.pdf • Expert meeting on the application of nanotechnologies in the food and agriculture sectors: potential food safety implications http://www.fao.org/docrep/012/i1434e/i1434e00.pdf
Internacional	UNEP	<ul style="list-style-type: none"> • Third Meeting of the Latin American and Caribbean Regional Coordinating Committee on the Strategic Approach to International Chemicals Management Kingston, 7 March 2010 Report of the third meeting of the Latin American and Caribbean Regional Coordination Committee on the Strategic Approach to International Chemicals Management http://www.saicm.org/images/saicm_documents/meeting/grulac/Jamaica%202010/LAC%20RCC3%20final%20report.pdf
Internacional	WHO OECD	<p>Guías voluntarias, pero contemplan muchos de los puntos importantes a tomar en cuenta sobre Nanotecnología, en especial sobre su manufactura y caracterización.</p> <ul style="list-style-type: none"> • No. 57 - ENV/JM/MONO(2015)30: Guidance Manual towards the Integration of Risk Assessment into Life Cycle Assessment of Nano-Enabled Applications • No. 56 - ENV/JM/MONO(2015)20: Analysis of the Survey on Available Methods and Models for Assessing Exposure to Manufactured Nanomaterials • No. 55 - ENV/JM/MONO(2015)19: Harmonized Tiered Approach to Measure and Assess the Potential Exposure to Airborne Emissions of Engineered Nano-Objects and their Agglomerates and Aggregates at Workplaces • Nos. 44-54 - These items are the dossiers derived from the Testing Programme on Manufactured Nanomaterials which are located at: http://www.oecd.org/chemicalsafety/nanosafety/testing-programme-manufactured-nanomaterials.htm • No. 43 - ENV/JM/MONO(2014)34: Genotoxicity of Manufactured Nanomaterials : Report of the OECD expert meeting • No. 42 - ENV/JM/MONO(2014)28: Report of the questionnaire on regulatory regimes for manufactured nanomaterials 2010-2011 • No. 41 - ENV/JM/MONO(2014)15 - ENV/JM/MONO(2014)15/ADD: Report of the OECD expert meeting on the physical chemical properties of manufactured nanomaterials and test guidelines • No. 40 - ENV/JM/MONO(2014)1 - ENV/JM/MONO(2014)1/ADD: Ecotoxicology and Environmental Fate of Manufactured Nanomaterials: Test Guidelines • No. 39 - ENV/JM/MONO(2013)17: Environmentally Sustainable Use of Manufactured Nanomaterials - Workshop held on 14 September 2011 in Rome, Italy • No. 38 - ENV/JM/MONO(2013)18: Co-Operation on Risk Assessment: Prioritisation of Important Issues on Risk Assessment of Manufactured Nanomaterials - Final Report • No. 37 - ENV/JM/MONO(2013)2: Current Developments on the Safety of Manufactured Nanomaterials - Tour de Table at the 10th Meeting of the Working Party on Manufactured Nanomaterials

- No. 36 - ENV/JM/MONO(2012)40: Guidance on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of Manufactured Nanomaterials
- No. 35 - ENV/JM/MONO(2012)14: Inhalation Toxicity Testing: Expert Meeting on Potential Revisions to OECD Test Guidelines and Guidance Document
- No. 34 - ENV/JM/MONO(2012)13: Current Developments on the Safety of Manufactured Nanomaterials - Tour de Table at the 9th Meeting of the Working Party on Manufactured Nanomaterials
- No. 33 - ENV/JM/MONO(2012)8: Important Issues on Risk Assessment of Manufactured Nanomaterials
- No. 32 - ENV/JM/MONO(2011)54: National Activities on Life Cycle Assessment of Nanomaterials
- No. 31 - ENV/JM/MONO(2011)53: Information Gathering Schemes on Nanomaterials: Lessons Learned and Reported Information
- No. 30 - ENV/JM/MONO(2011)52: Regulated Nanomaterials: 2006-2009
- No. 29 - ENV/JM/MONO(2011)12: Current Developments/Activities on the Safety of Manufactured Nanomaterials - Tour de Table at the 8th Meeting of the Working Party on Manufactured Nanomaterials
- No. 28 - ENV/JM/MONO(2010)47: Compilation and Comparison of Guidelines Related to Exposure to Nanomaterials in Laboratories
- No. 27 - ENV/JM/MONO(2010)46: List of Manufactured Nanomaterials and List of Endpoints for Phase One of the Sponsorship Programme for the Testing of Manufactured Nanomaterials: Revision
- No. 26 - ENV/JM/MONO(2010)42: Current Developments/Activities on the Safety of Manufactured Nanomaterials, Tour de Table at the 7th Meeting of the Working Party on Manufactured Nanomaterials
- No. 25 - ENV/JM/MONO(2009)20/REV: Guidance Manual for the Testing of Manufactured Nanomaterials: OECD Sponsorship Programme: First Revision
- No. 24 - ENV/JM/MONO(2010)25 : Preliminary Guidance Notes on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of Manufactured Nanomaterials
- No. 23 - ENV/JM/MONO(2010)12: Report of the Questionnaire on Regulatory Regimes for Manufactured Nanomaterials (2010)
- No. 22 - ENV/JM/MONO(2010)11: OECD Programme on the Safety of Manufactured Nanomaterials 2009-2012 Operational Plans of the Projects
- No. 21 - ENV/JM/MONO (2010)10: Report of the Workshop on Risk Assessment of Manufactured Nanomaterials in a regulatory context, held on 16-18 September 2009, in Washington D.C., United States.
- No. 20 - ENV/JM/MONO(2010)4: Current Developments/Activities on the Safety of Manufactured Nanomaterials: Tour de Table at the 6th Meeting of the Working Party on Manufactured Nanomaterials, 28-30 October 2009
- No. 19 - ENV/JM/MONO(2009)45: Analysis of Information Gathering Initiatives on Manufactured Nanomaterials
- No. 18 - ENV/JM/MONO(2009)24: Manufactured Nanomaterials: Roadmap for Activities during 2009 and 2010
- No. 17 - ENV/JM/MONO(2009)23: Current Developments in Delegations and other International Organisations on the Safety of Manufactured Nanomaterials- Tour de Table
- No. 16 - ENV/JM/MONO(2009)22: Manufactured Nanomaterials: Work Programme 2009- 2012
- No. 15 - ENV/JM/MONO(2009)21: Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials
- No. 14 - ENV/JM/MONO(2009)20 (This document has been updated): Guidance Manual for the Testing of Manufactured Nanomaterials: OECD's Sponsorship Programme
- No. 13 - ENV/JM/MONO(2009)18: Report of an OECD Workshop on Exposure Assessment and Exposure Mitigation: Manufactured Nanomaterials
- No. 12 - ENV/JM/MONO(2009)17: Comparison of Guidance on Selection of Skin Protective Equipment and Respirators for Use in the Workplace: Manufactured Nanomaterials
- No. 11 - ENV/JM/MONO(2009)16: Emission Assessment for Identification of Sources and Release of Airborne Manufactured Nanomaterials in the Workplace: Compilation of Existing Guidance
- No. 10 - ENV/JM/MONO(2009)15: Identification, Compilation and Analysis of Guidance Information for Exposure Measurement and Exposure Mitigation: Manufactured Nanomaterials
- No. 10 - ENV/JM/MONO(2009)15: Identification, compilation et analyse de documents d'orientation pour la mesure de l'exposition et la limitation de l'exposition : les nanomatériaux manufacturés
- No. 9 - ENV/JM/MONO(2009)10: EHS Research Strategies on Manufactured Nanomaterials: Compilation of Outputs
- No. 8 - ENV/JM/MONO(2009)6: Preliminary Analysis of Exposure Measurement and Exposure Mitigation in Occupational Settings: Manufactured Nanomaterials
- No. 7 - ENV/JM/MONO(2008)29: Current Developments/ Activities on the Safety of Manufactured Nanomaterials: Tour de Table at the 4th Meeting of the Working Party on Manufactured Nanomaterials, 11-13 June 2008
- No. 6 - ENV/JM/MONO(2008)13/REV (This document has been updated): List of Manufactured Nanomaterials and List of Endpoints for Phase One of the OECD Testing Programme

	<ul style="list-style-type: none"> • No. 5 - ENV/JM/MONO(2008)7: Current Developments/ Activities on the Safety of Manufactured Nanomaterials: Tour de Table at the 3rd Meeting of the Working Party on Manufactured Nanomaterials, 28-30 November 2007 • No. 4 - ENV/JM/MONO(2008)2: Manufactured Nanomaterials: Programme of Work 2006-2008 • No. 3 - ENV/JM/MONO(2007)16: Current Developments/ Activities on the Safety of Manufactured Nanomaterials: Tour de table at the 2nd Meeting of the Working Party on Manufactured Nanomaterials, 25-27 April 2007 • No. 2 - ENV/JM/MONO(2006)35: Current Developments/ Activities on the Safety of Manufactured Nanomaterials: Tour de table at the 1st Meeting of the Working Party on Manufactured Nanomaterials, 26-27 October 2006 • No.1 - ENV/JM/MONO(2006)19: Report of the OECD Workshop on the Safety of Manufactured Nanomaterials: Building Co-operation, Co-ordination and Communication, 7-8 December 2005 http://www.oecd.org/env/ehs/nanosafety/publicationsintheseriesonthesafetyofmanufacturednanomaterials.htm
--	--

CONCLUSIONES

La Nanotecnología asumirá en años venideros un lugar esencial en la administración de fármacos y en la terapéutica humana. Su rol en el ámbito de la administración de fármacos sugiere un futuro prometedor. La Nanotecnología ofrece oportunidades para desarrollar sistemas sofisticados e inteligentes de liberación de fármacos, que continuamente son mejorados con el propósito de maximizar su actividad terapéutica y de reducir al mínimo los efectos secundarios indeseables. Los principales sistemas de liberación de fármacos basados en nanotecnología en su gran mayoría son liposomas, nanopartículas poliméricas y metálicas.

Son muchos los retos que enfrenta el campo de la Nanomedicina aplicada a la clínica, aun cuando en el mercado existen medicamentos basados en escala nanométrica. Algunos de estos retos incluyen la funcionalización de las nanopartículas, la capacidad para controlar las interacciones de los nanomateriales con células, con tejido específico, la toxicidad y la bioacumulación en órganos como el hígado.

La puesta en marcha de un laboratorio de nanomateriales debe abarcar las normas básicas de seguridad y deberá cumplir con las buenas prácticas de laboratorio, debido a que existen riesgos de exposición del personal durante la síntesis y manipulación de los nanomateriales. Idealmente, se tendrían que evaluar los riesgos asociados para cada nanomaterial y uso, ya que no existe una guía orientativa al respecto. Esto representa una ventana de oportunidad para generar conocimiento y sentar las bases de guías orientativas que pueden incluir el desarrollo de nanotecnologías verdes,

Los materiales diseñados con dimensiones a escala nanométrica tienen características fisicoquímicas únicas, las cuales difieren de sus homólogos a escala micrométrica. Estas características únicas son factores críticos y relevantes que determinarán las interacciones fisiológicas y por ende, su efecto terapéutico. Debido a esto, es necesario contar con una caracterización fisicoquímica completa que ayude a comprender y correlacionar las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales con las propiedades fisiológicas. Esto se puede lograr gracias al trabajo en equipo y a la colaboración multidisciplinaria (gobierno, industrias, científicos, académicos, público en general, etc).

Respecto a las condiciones óptimas que permitan a nuestro país competir a nivel mundial en los ámbitos de la nanomedicina, es necesario que el gobierno y el sector privado inviertan en infraestructura adecuada y en investigaciones científicas de ciencia de frontera.

Además, se debe hacer un esfuerzo extra que promueva el acercamiento y concientización del público en general respecto a la nanotecnología y del impacto de esta en los sectores productivos. Es importante que México cuente con un marco regulatorio orientativo para productos a escala nanométrica y así favorecer el crecimiento y desarrollo de la Nanotecnología y la aplicación de la Nanomedicina en nuestro país.

REFERENCIAS

- Ai J, Biazar E, Jafarpour M, Montazeri M, Majdi A, Aminifard S, Zafari M, Akbari HR, Rad GH. (2011) Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *International Journal of Nanomedicine*. 6: 1117–1127.
- Bagchi D, Bagchi M, Moriyama H, Shahidi F. (2013). FDA and Nanotech: baby steps lead to regulatory uncertainty. *bio-nanotechnology: a revolution in food, biomedical and health sciences*. Primera edición. John Wiley & Sons. (disponible: [http://bawabiotech.com/uploads/Dr. Bawa - FDA and Nanotech 2013 .pdf](http://bawabiotech.com/uploads/Dr._Bawa_-_FDA_and_Nanotech_2013_.pdf)).
- Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol*. 13: 238-252.
- Bawa, R. (2013). FDA and Nanotech: Baby Steps Lead to Regulatory Uncertainty, in *Bio-Nanotechnology: A Revolution in Food, Biomedical and Health Sciences* (eds D. Bagchi, M. Bagchi, H. Moriyama and F. Shahidi), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. doi: 10.1002/9781118451915.ch41.
- Bhushan B., Luo D. Schircker S.R., Sigmund W., Zauscher S. (2014). *Handbook of Nanomaterials Properties*. Springer. 1-1467. ISBN 978-3-642-31107-9.
- Boissezon R. Muller J, Beaugeard V, Monge S. Robin J-J. (2014). Organophosphonates as anchoring agents onto metal oxide-based materials: synthesis and applications. *RSC.Adv*. 4, 35690-35707-.
- Bozzuto G, Molinari A. (2015) Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*. 10: 975–999.
- Coelho, J.F., Ferreira, P.C., Alves, P., Cordeiro, R., Fonseca, A. C., Góis, J. R., Gil, M.H. (2010). Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *The EPMA Journal*. 1(1), 164–209.
- Colorado-Soriano M, Gálvez- Pérez, Sánchez-Cabo M. (2013). Evaluación del riesgo por exposición a nanopartículas mediante el uso de metodologías simplificadas. *Método Stoffenmanager nano 1.0*. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Madrid, España.
- Dellinger A, Zhou Z, Connor J, Madhankumar AB, Pamujula S, Sayes CM, Kepley CL. (2013). Application of fullerenes in nanomedicine: an update. *Nanomedicine*. 8(7):1191-208.
- Dutta S., Pati S.K., Novel properties of graphene nanoribbons: a review (2010). *J. Mater. Chem*. 20, 8207-8223.
- FDA and Nanotech: Baby Steps Lead to Regulatory Uncertainty. *Bio-Nanotechnology: A Revolution in Food, Biomedical and Health Sciences*, First Edition. Edited by Debasis Bagchi, Manashi Bagchi.
- Ferrari M., Onuoha SC, Pitzalis C. (2015). Trojan horses and guided missiles: targeted therapies in the war on arthritis. *Nature Reviews/Rheumatology*. Advance online publication 1-10.
- Fluri F., Grünstein D., Cam E., Ungethüm U., Hatz F., Schäfer J., Samnick S., Israel I., Kleinschnitz Ch., Orts-Gil G., Moch H., Zeis Th., Schaeren-Wiemers N., Seevberger P. (2015). Fullerenols and glucosamine fullerenes reduce infarct volume and cerebral inflammation after ischemic stroke in normotensive and hypertensive rat. *Experimental neurology*. 265, 142-151.
- Hosta-Rigau L., Shimoni O., Städler B., Caruso F. (2013). Advanced Subcompartmentalized Microreactors: Polymer Hydrogel Carriers Encapsulating Polymer Capsules and Liposomes. *Small*. 9(21) 3573-3583.
- Hubbs AF, Sargent LM, Porter DL, Sager TM, Chen BT, Frazer DG, Castranova V, Sriram K, Nurliewicz TR, Reynolds SH, Batelli LA, Schwegler-Berry D, McKinney W, Fluharty KL, Mercer RR. (2013). Nanotechnology: Toxicologic Pathology. *Toxicologic Pathology*. 41: 395-409.

Lavicoli I, Leso V, Ricciardi W, Hodson LL, Hoover MD. (2014). Opportunities and challenges of nanotechnology in the green economy. *EnvironHealth*. 7; 13:78.

Llinskaya AN, Dobrovolskaia MA. (2013). Nanoparticles and the blood coagulation system. Part II: safety concerns. *Nanomedicine*. 8(6):969-981.

Johari-Ahar M., Barar J., Alizadeh A.M., Davaran S., Omid Y., Rashidi M.R. (2015). Methotrexate-conjugated quantum dots: synthesis, characterisation and cytotoxicity in drug resistant cancer cell. *J. Drug Target*. 15, 1-14.

Kaufman P.A., Awada A., Twelves Ch. Yelle L., Perez E.A. Velikova G., Olivo M.S., He Y., Dutcus C.E., Cortes J. (2013). Phase III Open-Label Randomized Study of Eribulin Mesylate Versus Capecitabine in Patients with Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer Previously Treated With an Anthracycline and a Taxane. *Journal of Clinical Oncology*.

Kaur IP, Kakkar V, Deol PK, Yadav M, Singh M, Sharma I. (2014). Issues and concerns in nanotech product development and its commercialization. *J Control Release*. 193: 51-62.

Kunugi S., Yamaoka T. 2012. *Polymers in Nanomedicine. Advances in Polymer Science 247*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI 10.100/978-3-642-27856-3. 1-290.

Lan B.Y., Gao X., Zhu Huaiyong., Zheng Z., Yan T., Wu F., Ringer S.P., Song D. (2005). *Adv. Funct. Mater*. 15, 1310-1318.

Larson DR., Zipfel WR, Williams RM., Clark SW., Bruchez MP, Wise FW. (2003). Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo. *Science*. 300:1434-6.

Liang X-J, Chen C, Zhao Y, Jia L, Wang PC. 2008. Biopharmaceutics and Therapeutic Potential of Engineered Nanomaterials. *Current drug metabolism*. 9(8):697-709.

Lin Ch-Ch, Ki Ch S, Shih H. (2015). Thiol-Norbornene Photoclick Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *J. Appl. Polym. Sci*.

Lin PCh, Lin S., Wang P.C., Sridhar R. (2013). Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances*. 32: 711–726.

28. Mantovani E., Porcari A., Meili C., Widmer M. (2009). Mapping study on regulation on regulation and governance of Nanotechnologies. FramingNano project. (http://innovationsgesellschaft.ch/wp-content/uploads/2013/07/FramingNano_MappingStudy.pdf).

Maurits-Jan Prinz, (2014). *Workshop TransparencyNano_01_Introduction-LegislativeFramework.pdf*. Current legislative framework for nanomaterials & Introduction to the impact assessment on transparency measure. European Commission. DG Enterprise & Industry.

Mecke A, Uppuluri S, Sassanella TM, Lee DK, Ramamoorthy A, Baker Jr JR. (2004). Direct observation of lipid bilayer disruption by poly (amidoamine) dendrimers. *Chem Phys Lipids*. 132: 3-14.

Musyanovych A. Lendfester K. (2014). Polymer Micro-and Nanocapsules as Biological Carriers with Multifunctional Properties. *Macromol. Bioci*. 14, 458-477.

O'Regan C, Biswas S., Petkov N, Holmes J.D. (2014). Recent advances in the growth of germanium nanowires synthesis, growth dynamics and morphology control. *J. Mater Chem. C*. 2-14.

Oberdörster G. (2009). Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of Internal Medicine*. 267; 89-105.

Oberdörster G, Elder A, Rinderknecht A. (2009). Nanoparticles and the brain: cause for concern. *J Nanosci Nanotechnol*. 9(8):4996-5007.

- Onoue S, Yamada S, Chan H-K. (2014). Nanodrugs: pharmacokinetics and safety. *International Journal of Nanomedicine*. 9: 1025-1037.
- Paddock, S.W. (2000). Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. *Molec Biotechnol* 16(2):127-149.
- Pal SL, Jana U, Manna PK, Mohanta GP, Manavalan R. (2011). Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01(06); 228-234.
- Parida P, Behera A, Mishra SCh. (2012). Classification of Biomaterials used in Medicine. *International Journal of Advances in Applied Science IJAAS*. 1 (3): 31-35.
- Pavlukhina S, Sukhishvili S. (2011). Polymer assemblies for controlled delivery of bioactive molecules from surface. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 63, 822-836.
- Piazza L, Lummen TTA, Quiñonez E, Murooka Y, Reed BW, Berwick B., 2015. Simultaneous observation of the quantization and the interference pattern of a plasmonic near-field. *Nature communications*. 1-7. DOI:10.1038/ncomms7407.
- Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WAH, Seaton A, Stone V, Brown S, MacNee W, Donaldson K. (2008). Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature Nanotechnology*. 3: 423 – 428.
- Preethu Rose, Smita Ghaisas, Anand Gole (2011). A semantic regulatory framework for nanotechnology application in agri-food domain. CONFERENCE PAPER · SEPTEMBER. doi: 10.1109/RELAW.2011.6050269.
- Pygall, SR, Whetstone J., Timmins P., Melia CD. (2007). Pharmaceutical applications of confocal laser scanning microscopy: the physical characterization of pharmaceutical systems. *Adv Drug Deli Rev*. 59:1434-1452.
- Rai M., Ingle A.P., Birla S., Yadav A. Dos Santos C.A. (2015). Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. *Critical Reviews in Microbiology*.
- Rao C.N.R., Biswas K. (2009). Nanomaterials by Physical Methods. *Annu. Rev. Anal. Chem*. 2, 435-462.
- Ryman-Rasmussen JP, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. (2006). Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. *Toxicol Sci*. 91(1):159-65.
- Shi J, Votruba AR, Farokhzad OC, Langer R. (2010). Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano Lett*. 10:3223–3230.
- Sirivisoot S., Harrison B. S. (2015). Magnetically stimulated ciprofloxacin release from polymeric microspheres entrapping iron oxide nanoparticles. *International journal of Nanomedicine*. 10, 4447-4458.
- Teo B.M., GHosta-Rigau L., Lynge M.E., Ständler B. (2014). Liposome-containing polymer films and colloidal assemblies towards biomedical applications. *Nanoscale*. 6, 6426-2433.
- Tinkle SS, Antonini JM, Rich BA, Roberts JR, Salmen R, DePree K, Adkins EJ. (2003). Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect*. 111(9): 1202–1208.
- Vishwakarma V, Samal SS, Manoharan N. (2010). Safety and risk associated with nanoparticles; a review. *Journal of Minerals and Materials Characterization and Engineering*. 9(5): 455-459.
- Weissig, V., Pettinger, T.K., Murdock, N. (2014). Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *International Journal of Nanomedicine*. 9, 4357–4373.
- Weijun T., Song X, Gao Ch. (2012). Layer-by-layer assembly of microcapsules and their biomedical applications. *Chem. Soc. Rev*. 41, 6103-6124.
- Williams D.F. (2009). On the nature of biomaterials. *Biomaterials*. 30. 5897-5909.

Záyago-Lau, Edgar; Foladori, Guillermo (2010). La nanotecnología en México: un desarrollo incierto. Economía, Sociedad y Territorio, X, 143-178.

Zhang X-X, Eden H, Chen X. (2012). Peptides in cancer nanomedicine: drug carriers, targeting ligands and protease substrates. Journal of Controlled Release 159: 2–13

Fuentes electrónicas

About ISO – ISO. (<http://www.iso.org/iso/home/about.htm>)

Approaches to Safe Nanotechnology (2009) DHHS (NIOSH) Publicación No. 2009–125 (<http://www.cdc.gov/niosh/docs/2009-125/pdfs/2009-125.pdf>)

Centros para el control y la prevención de Enfermedades/Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (<http://www.cdc.gov/niosh/>)

Cosmetic Product Notification Portal-European Commission. (http://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/cnp/index_en.htm)

Diagnóstico y Prospectiva de la Nanotecnología en México. Red de Nanotecnología y Nanociencias. (<http://www.nanored.org.mx/documentos/diagnostico%20y%20prospectiva%20nanotecnologia%20en%20mexico.pdf>)

ESFA Topic: Nanotechnology. <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/nanotechnology.htm>

European Medicine Agency. Human regulatory Medicines and emerging science Nanotechnology. (http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/special_topics/general/general_content_000345.jsp&mid=WC0b01ac05800baed9)

European Commission. Cosmetic Product Notification Portal. (http://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/cnp/index_en.htm)

FAO/WHO NanoPaper, (2012). “State of the art on the initiatives and activities relevant to risk assessment of nanotechnologies in the food and agriculture sectors”. FAO/WHO. (http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/topics/FAO_WHO_Nano_Paper_Public_Review_20120608.pdf)

FAO/WHO Meeting Report (2010). Expert meeting on the application of nanotechnologies in the food and agriculture sectors: potential food safety implications. (<http://www.fao.org/docrep/012/i1434e/i1434e00.pdf>)

FDA Issues Three Final Guidances Related to Nanotechnology Applications in Regulated Products, Including Cosmetics and Food Substances. (<http://www.fda.gov/scienceresearch/specialtopics/nanotechnology/ucm301093.htm>)

Forfás. Ireland's Nanotechnology Commercialisation Framework (2010-2014). (<http://www.forfas.ie/publications/2010/title.6710.en.php>)

Moriyama H., Shahidi, F. (2013). John Wiley & Sons: ([http://bawabiotech.com/uploads/Dr. Bawa - FDA and Nanotech 2013 .pdf](http://bawabiotech.com/uploads/Dr._Bawa_-_FDA_and_Nanotech_2013_.pdf))

Informe de Rendición de Cuentas de la Administración Pública Federal 2000-2006. CENAM. (http://www.cenam.mx/transparencia/Archivos/CENAM-Libro_Blanco.pdf)

ISO - ISO Standards - ISO/TC 229 - Nanotechnologies
(http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_tc_browse.htm?commid=381983&published=on&includesc=true)

Lineamientos regulaciones nanotecnología, Secretaría de Economía, 2012. Lineamientos para regulaciones sobre nanotecnologías para impulsar la competitividad y proteger al medio ambiente, la salud y la seguridad de los consumidores.
(http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/competitividad/lineamientos_regulaciones_nanotecnologias_261112.pdf)

Mapping Study on Regulation and Governance of Nanotechnologies, 2013. FramingNano Project: A multistakeholder dialogue platform framing the responsible development of Nanosciences & Nanotechnologies.
(http://innovationsgesellschaft.ch/wpcontent/uploads/2013/07/FramingNano_MappingStudy.pdf)

Muñoz E. 2012. Nanotecnología en Proteómica: microarrays de proteínas y nuevos sistemas de detección
(http://instituto-roche.es/nuevasVias/69/Nanotecnologia_en_Proteomica_microarrays_de_proteinas_y_nuevos_sistemas_de_deteccion#).

Nanotechnology and human health: Scientific evidence and risk governance. Report of the WHO expert meeting 10–11 December 2012, Bonn, Germany.
(http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0018/233154/e96927.pdf?ua=1)

Nanotechnology-European Medicine Agency. Human regulatory Medicines and emerging science Nanotechnology.
(http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/special_topics/general/general_content_000345.jsp&mid=WC0b01ac05800baed9)

Nanomaterials-European Commission.
(http://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/products/nanomaterials/index_en.htm)

Nanotechnology Standards - ASTM International.
(<http://www.astm.org/Standards/nanotechnology-standards.html>)

OECD Working Party on Nanotechnology: Reports. (<http://www.oecd.org/sti/nano/reports.htm>)

Publications in the Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials. [Internet] Disponible en:
(<http://www.oecd.org/env/ehs/nanosafety/publicationsintheseriesonthesafetyofmanufacturednanomaterials.htm>)

Red Nanotecnología y Nanociencias-Conacyt, 2008. Diagnóstico y Prospectiva de la Nanotecnología en México. Internet. Diagnóstico y Prospectiva de la Nanotecnología en México.
(<http://www.nanored.org.mx/documentos/diagnostico%20y%20prospectiva%20nanotecnologia%20en%20mexico.pdf>)

Safety of Manufactured Nanomaterials – OECD. [Internet] Disponible en:
(<http://www.oecd.org/env/ehs/nanosafety/publicationsintheseriesonthesafetyofmanufacturednanomaterials.htm>)

The Policy-Policy Issues-Research and Innovation-Key Enabling Technologies-European Commission.
(http://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/the-policy_en.html)

Third Meeting of the Latin American and Caribbean-SAICM, 2010. Third Meeting of the Latin American and Caribbean Regional Coordinating Committee on the Strategic Approach to International Chemicals Management Kingston. 2010. Report of the third meeting of the Latin American and Caribbean Regional Coordination Committee on the Strategic Approach to International Chemicals Management.
(http://www.saicm.org/images/saicm_documents/meeting/grulac/Jamaica%202010/LAC%20RCC3%20final%20report.pdf)

Workshop TransparencyNano_01_Introduction-LegislativeFramework.pdf. Current legislative framework for nanomaterials & Introduction to the impact assessment on transparency measures. 2014. Maurits-Jan Prinz. European Commission. DG Enterprise & Industry. (http://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/products/nanomaterials/index_en.htm)

LISTADO DE ACRONIMOS

AFM	Microscopia de fuerza atómica
ATR-FTIR	Reflectancia totalmente atenuada-espectroscopia de infrarrojo
AUC	Ultracentrifugación analítica
CD	Dicroísmo circular
CD-ELISA	Discroísmo circular-inmunoensayo ligado a enzima
CE	Electroforesis capilar
CLSM	Microscopía confocal láser de barrido
DLS	Dispersión dinámica de luz
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
EELS	Espectroscopia electrónica de pérdida de electrón
ESEM	Microscopia electrónica de barrido ambiental
FCS	Espectroscopia de fluorescencia de correlación
FFF	Fraccionamiento por campo-flujo
FS	Espectrometría de fluorescencia
GE	Electroforesis en gel
HDC	Cromatografía hidrodinámica
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ITC	Calorimetría isoterma de titulación
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas/masas
MS	Espectrometría de masas
NMR	Resonancia magnética nuclear
NSOM	Microscopia de barrido de campo cercano
RS	Espectroscopia Raman
SAXS	Dispersión de rayos X en ángulo pequeño
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturizante de poliacrilamida
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SPR	Resonancia de plasmones de superficie
STM	Microscopia de efecto túnel
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TERS	Aumento de espectroscopía de Raman por punta
TGA	Termogravimetría
TOF-MS	Espectrometría de masas acoplada a tiempo de vuelo
UV-Vis	Ultravioleta-visible
XPS	Espectroscopia de Fotoelectrones emitidos por Rayos X
XRD	Difracción de rayos X

Capítulo VI

Definición de las condiciones necesarias para la investigación en el Sistema Nervioso Central

*Yanet K. Gutiérrez, Sergio Sandoval, Alfredo Feria,
Ulises Gómez, Alejandro Canales & Emmanuel Díaz*

INTRODUCCIÓN

La neurociencia, es una disciplina del conocimiento humano que se encarga de estudiar el funcionamiento y la estructura del sistema nervioso con el fin de conocernos mejor y acercarnos cada día más a la creciente posibilidad de comprender como funciona nuestro cerebro humano, ya sea para tratar de obtener un diagnóstico exitoso sobre las enfermedades que lo afectan o bien para tratar de revertir los procesos neurodegenerativos. Recientemente la investigación en el área de las neurociencias ha generado descubrimientos cada día más importantes, hechos que han modificado nuestra manera de comprender y entender la percepción de la actividad cerebral, aunado a la convergencia de distintas disciplinas biológicas y de la salud, nos ha permitido abordar cuestiones fundamentales para el conocimiento de nuestra interacción con el entorno, las sensaciones, el comportamiento, los recuerdos, las emociones, la interacción con otros organismos y el pensamiento humano.

El interés fundamental de un laboratorio de neurociencias es el estudio de todas aquellas determinantes que influyen en el funcionamiento cognitivo, espacial y de reconocimiento que diariamente nos afectan e influyen en nuestro comportamiento, ya que al estudiar las interacciones y la comunicación entre las diferentes células neuronales estaremos progresando hacia nuevas estrategias terapéuticas, en respuesta a un creciente número de personas con alteraciones de la memoria, enfermedades cerebro-vasculares, neoplasias, enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Parkinson, entre otras. Un laboratorio de neurociencias deberá estar integrado por un grupo multi-disciplinario en diferentes áreas afines. Una de ellas la biofísica, destaca principalmente por la aproximación que tiene con el objeto de estudio y la unidad fundamental del cerebro; la neurona.

La Biofísica dentro del área de neurociencias

La biofísica puede definirse en dos áreas de la ciencia; la biología que estudia la vida en su gran variedad y la física que busca el saber científico mediante leyes matemáticas que rigen la naturaleza (Glaser, 2005; Gratzner, 2011; Zhou, 2011). Desde mucho antes del siglo XIX los científicos utilizaban ambas ramas de la ciencia para describir procesos biológicos tal como lo hizo Hooke con demostraciones fisiológicas, por su parte Newton desarrolló una teoría de la conducción nerviosa y Faraday midió las propiedades magnéticas de un corte muscular. Muchos autores han descrito miles de ejemplos en donde se ha tratado de interpretar los procesos biológicos en términos de leyes físicas, sin embargo en la actualidad los avances científicos han perfeccionado el estudio de la biofísica siendo reflejado en la electrofisiología, la hidrodinámica, la espectroscopia, la microscopía, el modelado y la termodinámica.

Especificaciones del laboratorio

Un laboratorio que se dedique al estudio de las neurociencias deberá contar con un área prevista para la actividad docente y otra para la investigación que podrá ser dividida esquemáticamente para las diferentes funciones que se desarrollaran en él; en la práctica

sin embargo, algunas de las actividades podrán desarrollarse en la misma zona, sin embargo las secciones principales podrán ser las siguientes; una área de biomecánica que estudiará la dinámica del movimiento de los seres vivos (la locomoción, el vuelo, la natación, el equilibrio anatómico y proteínas móviles); un área de bioelectricidad en la cual se estudiarán los procesos electromagnéticos y electroquímicos que ocurren en los organismos vivos a nivel celular, así como los efectos de los procesos electromagnéticos de tipo abiótico, la transmisión de los impulsos neuroeléctricos, el intercambio iónico a través de las biomembranas, la electrofisiología neuronal y la generación biológica de la electricidad; una área de bioenergética que estudiará la captura de energía por los biosistemas, la transferencia y el almacenamiento de energía en la célula; un área de bioacústica en la cual se investigará la transmisión, la captación y la emisión de ondas sonoras por los biosistemas; un área de biofotónica en donde se estudiará las interacciones de los biosistemas con los fotones (optogenética) y un área de radiobiología la cual estudiará los efectos biológicos de la radiación ionizante y la de tipo no ionizante así como sus aplicaciones en organismos celulares. Deberá contar además con un quirófano para la realización de procedimientos estereotáxicos en modelos animales, salas para evaluar pruebas conductuales de tipo farmacológico y no farmacológico, un área para el monitoreo, registro, procesamiento y análisis de datos, sin embargo también existen áreas en común como son la de microscopia y el almacén para el resguardo del material y el equipo de instrumentación. Es importante destacar que cada una de estas zonas deberá contar con un espacio suficiente para que la movilidad sea ágil y no exista la posibilidad de algún tropiezo. En la construcción del laboratorio se deberán utilizar materiales lavables y que además resistan los desinfectantes que normalmente se utilizarán. Los muebles y equipos deberán ser acomodados de manera que se permita su limpieza continua y las superficies de trabajo no deberán ser porosas para permitir una desinfección fácil.

El objetivo del trabajo a desarrollar

Dentro del laboratorio de neurociencias, el principal objetivo será investigar las propiedades físicas y biológicas que intervienen en los procesos funcionales de la célula en el sistema nervioso de los seres vivos. De los cuales podemos citar algunos ejemplos:

1. El cultivo y aislamiento de neuronas; las neuronas podrán ser aisladas de la mayoría de regiones cerebrales cuando son preparadas correctamente, estas tienen la peculiaridad de visualizarse directamente en el microscopio además de poseer una sencilla manipulación, el otro gran modelo que se utiliza es la rebanada completa de cerebro desarrollada por el grupo de Gähwiler en 1989, en donde recientes técnicas han perfeccionado el cultivo con la ayuda de bioreactores y sistemas que facilitan el mantenimiento de estos tejidos, además de que la información obtenida en el cultivo en rebanada es mayor en comparación a la obtenida en un grupo de células, ya que nos permite monitorear la actividad eléctrica por periodos de tiempo más largos y los efectos de las drogas pueden ser inmediatamente monitoreados. Los neurocientíficos han aplicado con éxito el cultivo de neuronas para aumentar el conocimiento de la actividad funcional de los circuitos neuronales (Hamill, 1981; Izquierdo-Serra, 2013).

2. La electrofisiología, es el enfoque predominante de la medición y la manipulación de la actividad neuronal (Salah, 2011), con ella podemos medir la resistencia específica de un estímulo eléctrico de voltaje y una corriente tolerable para producir excitación o inhibición a nivel tisular o celular, esto mediante el flujo iónico de los canales encontrados en las membranas celulares o el traspaso de energía eléctrica directamente por contacto de membranas neuronales, generando el conocimiento de cómo las neuronas se comunican entre sí mediante un flujo de iones de sodio potasio en fracciones de milisegundos, algunos

de los experimentos electrofisiológicos pueden combinar datos de múltiples electrodos (Xu, 2012), integrar electrodos en un cultivo neuronal para mediciones prolongadas (Regehr, 1989) e incluso combinar la técnica de electrofisiología con optofisiología (Bender, 2009). Una de las técnicas electrofisiológicas más utilizadas es el “Patch clamp”, el cual es considerado como el estándar de oro ya que, es una herramienta que permite conocer la electrofisiología del sistema nervioso en tiempo real y correlacionar su funcionalidad. A nivel molecular, muchas de las investigaciones en neurociencias están dirigidas a conocer; cómo actúan las proteínas de los canales iónicos; en como modificar las proteínas implicadas y como es su estructura de estos, con el fin de conocer como las señales eléctricas controlan lo que pensamos y como nos movemos.

3. La optogenética; es una técnica que recientemente ha cobrado mayor interés dentro del campo de la biofísica (óptica) y la ingeniería genética, implementa sistemas de realidad virtual para el estudio de las respuestas fisiológicas, tanto en células, como en modelos animales (Pastrana, 2011; Deisseroth, 2011). El concepto, incluye el uso de una variedad de sondas codificadas genéticamente para determinar parámetros fisiológicos como son; el determinar el voltaje de la membrana o la concentración de calcio en el metabolismo celular; el control de los receptores nicotínicos (Bartels, 1971); de los receptores de glutamato ionotrópicos (Volgraf, 2006); de los canales de potasio (Banghart, 2004; Chambers, 2006) y recientemente un receptor selectivo quimérico de glutamato de potasio denominado HyLighter (Janovjak, 2010). Esta técnica se ha utilizado en accidentes cerebrovasculares para controlar convulsiones e influye en el flujo de proteínas y diversas moléculas. Con la ayuda de la estimulación óptica también se ha podido obtener un indicador de la actividad neuronal pre y post-sináptica, con indicadores de calcio codificados genéticamente para el seguimiento de la actividad neuronal (Airan, 2009; Ackman, 2012, Akerboom, 2012).

5. La estimulación con campos electromagnéticos (CEM) es otra de las técnicas utilizadas dentro de la biofísica en neurociencias, la cual consiste en la aplicación de CEM de muy baja frecuencia para estudiar el efecto dentro del cerebro en condiciones normales, patológicas o para modificar la fisiología del mismo (Rosch, 2004; Markov, 2015). Las CEM son una combinación de Ondas Eléctricas y Ondas Magnéticas que se desplazan simultáneamente, estas se propagan a la velocidad de la luz y se caracterizan por una frecuencia y una longitud de onda que determinan otra característica importante de los CEM (Barnes, 2007; Rosch, 2004). Ya que las ondas electromagnéticas son transportadas por partículas llamadas *cuantos de luz*, estos transportan más energía con frecuencias más altas (longitudes de onda más cortas) que los de las ondas de frecuencia menor (longitudes de onda más larga) (Barnes, 2007). Algunas ondas electromagnéticas transportan tanta energía por cuanto de luz, que son capaces de romper los enlaces entre las moléculas y se conocen como: *radiaciones ionizantes* (rayos gamma, los rayos cósmicos, los rayos X y con menor potencia la radiación UV) (Markov, 2015). Por otra parte, las radiaciones compuestas por cuantos de luz sin energía suficiente para romper los enlaces moleculares se conocen como: *radiaciones no ionizantes* (ICNIRP, 1998; Engström, 2004).

Equipos del laboratorio de neurociencias; Área de cirugía y equipo estereotáxico

Muchos de los experimentos realizados en el laboratorio de neurociencias efectúan manipulaciones in vivo utilizando cirugía estereotáxica, en concreto, sobre áreas específicas del sistema nervioso central (Cleary, 2012). La técnica estereotáxica se utilizó por primera vez por Dittmar durante su trabajo experimental en ratones en 1873. Posteriormente, Zernov en 1889 probó su papel en los estudios de localización intracraneal. A principios del siglo XX, Robert Henry Clarke y Victor Horsley desarrollaron el marco estereotáxico basado en coordenadas cartesianas (X, Y y Z) para uso en experimentación

(Ersahin, 2011). El marco estereotáxico permite estabilizar el cráneo del animal mediante barras colocadas en el conducto auditivo durante el procedimiento de micro neurocirugía (Stoica, 2013), el dispositivo consta de dos secciones una fija y otra móvil donde se realizan movimientos con una precisión de 0.1 mm, figura 1A (Jozwiak, 2014). El marco estereotáxico es particularmente útil en investigación del cerebro en el área de neurofisiología, neuroanatomía, neurocirugía y campos importantes de la neurofarmacología; así como, para localizar estructuras internas y realizar acciones tales como: extirpación, inyección, lesión, estimulación, daño, implantación de dispositivos, etc. Todas estas acciones se realizan mediante la localización de las regiones neuroanatómicas descritas en un atlas estereotáxico (atlas de Paxinos & Franklin), conformado por series de secciones anatómicas representadas en base a coordenadas (Purger, 2009).

Vibratomo

La capacidad de detectar antígenos celulares en tejidos frescos ha jugado un papel importante en la comprensión de los eventos celulares y moleculares que se llevan a cabo en los seres vivos (Abdelaal, 2015). El vibratomo es un equipo que permite hacer cortes en tejidos fresco de un grosor de 200-500 μm (Bannerman, 2007) y en tejidos fijados usualmente de 20-50 μm (Skinner, 2002), Figura 1B (Staffend, 2011). El mecanismo de acción provisto por el equipo consiste de una plataforma sobre la cual se adhiere la muestra normalmente mediante pegamento de contacto, esta puede regularse en altura y permite seleccionar el grosor del corte, asimismo está equipado con una cuchilla de borde muy afilado que se desplaza horizontalmente para realizar los cortes. Además, posee un movimiento de vibración lateral a modo de sierra que facilita el corte y evita arrastrar el tejido; todo el proceso se realiza bajo una solución acuosa que normalmente es una solución tamponada (PBS 25 mM) o una solución salina. Para ello, tanto la muestra como el borde de la cuchilla han de estar sumergidos y los cortes que se obtienen se denominan en flotación, es decir, no sujetos a ningún soporte (Staffend 2011; Cleary, 2012; Clerin, 2014; Abdelaal, 2015). Los tejidos se pueden procesar flotando o adherirlos a un portaobjetos para su posterior procesamiento. Sin embargo, el proceso de secado necesario para la adhesión al portaobjetos suele conllevar alteraciones en la calidad del tejido. Así, los cortes se suelen procesar durante toda la técnica en flotación y posteriormente se montan sobre portaobjetos para su observación en el microscopio óptico.

Criostato

En el laboratorio de neurociencias un componente básico en el flujo de trabajo experimental es el procesamiento histológico eficiente y fiable de las estructuras neuroanatómicas en estudio; ya que para su posterior análisis y correcta interpretación de los resultados experimentales dependerán en gran medida de las secciones histológicas de alta calidad que logremos obtener. El seccionamiento del tejido en criostato es un medio popular para cortar el tejido cerebral para su posterior procesamiento, adquisición de imágenes y análisis (Pinskiy, 2015). Un criostato es un equipo utilizado para obtener secciones por congelación de 1 a 600 μm de diámetro. En este aparato todo el sistema de corte se encuentra encerrado en una cámara refrigerada cuya temperatura se puede regular desde 0°C a -35 °C, Figura 1C (Biosystems, 2015). Antes de realizar el seccionamiento de la muestra se debe embeber en una resina especial que tiene la característica de ser líquida a temperatura ambiente y sólida cuando se congela, esto permite manipular la muestra y adherirla a un soporte porta-muestras en el cual se fijará a un eje que avanza sobre la cuchilla (Sturm, 2013). Las secciones que se van obteniendo se transfieren a portaobjetos con superficies adhesivas (por ejemplo gelatina, poly-L-lysina, etc.) o cargados electromagnéticamente con la ayuda de un pincel fino para facilitar su traslado (Sturm, 2013; Witherspoon, 2014). Las secciones se descongelan rápidamente en este proceso de pegado puesto que los portaobjetos están

a temperatura ambiente y una vez secas las muestras se pueden guardar a 4 °C o inmediatamente procesarse por inmunohistoquímica.

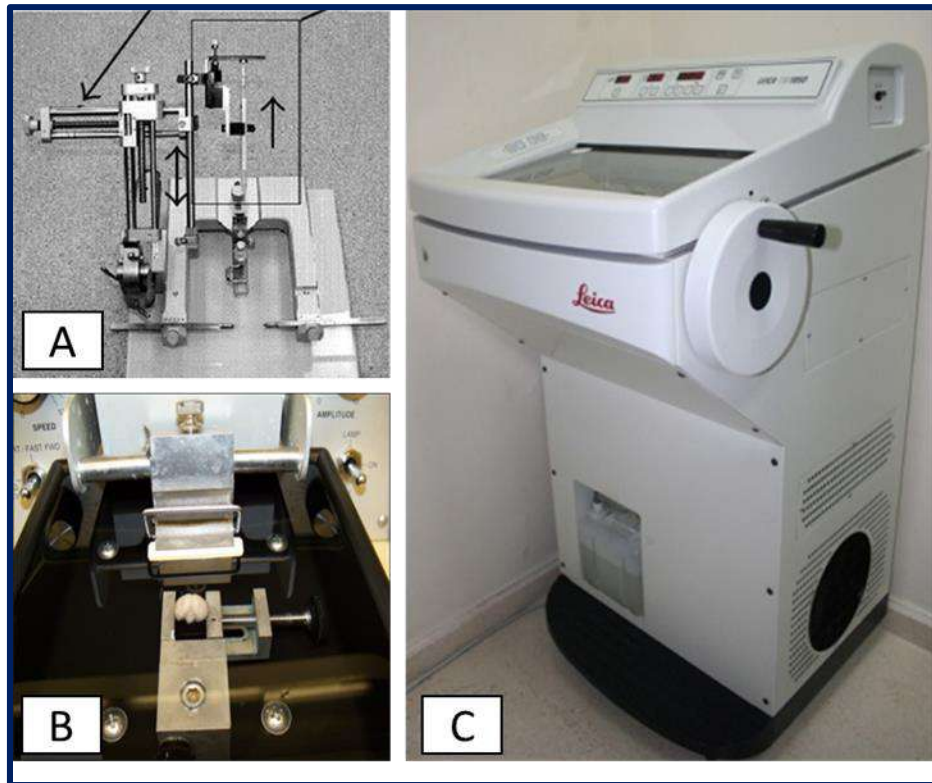


Figura 1. Fotografías del equipo comúnmente utilizado en el laboratorio de neurociencias. A) Equipo estereotáxico para cirugía en ratas y ratones (tomado de Jozwiak, 2014), B) ejemplo de un vibratomo (tomado de Staffend, 2011) C) criostato utilizado para cortes de cerebro en frío (tomado de leica-biosystems, 2015).

Área de pruebas conductuales; Cámara de condicionamiento operante o caja de Skinner

La cámara de condicionamiento operante es un instrumento de laboratorio que permite evaluar el aprendizaje y la memoria, el cual está relacionado con la atención y capacidad de retención inmediata (Sameshima, 2013). El aparato consiste en una caja simple de acrílico transparente (32 cm de largo x 25 cm de ancho x 33 cm de altura) o con la pared trasera y delantera elaborada en acero inoxidable, al igual que el piso y la parrilla que se coloca por encima del suelo. En la pared frontal posee una taza para el alimento y dependiendo del ensayo la caja puede poseer una o dos palancas, por encima de ellas se encuentra una señal luminosa (lámpara de led); la cámara deberá aislar al mínimo los estímulos ambientales externos (Thanos, 2011; Chang, 2012), figura 2B (Sameshima, 2013). La prueba inicia en un periodo de adaptación y entrenamiento de dos semanas, posteriormente las ratas deben presionar cualquiera de las dos palancas en sus dos niveles (arriba o abajo), al accionar la palanca correcta hacia arriba la lámpara de señal se ilumina y un dispensador de comida lanza una recompensa, en esta prueba se evalúa la activación de las palancas; de manera correcta e incorrecta (Thanos, 2011; Sameshima, 2013).

Laberinto de Barnes

El laberinto de Barnes es un instrumento que se basa en las capacidades intrínsecas de los roedores para explorar y escapar a través de los agujeros (Van Meer, 2005). El laberinto consiste en una tabla circular con 20 agujeros circulares de 5 cm alrededor del perímetro y

elevada a un metro del piso. Bajo cada agujero está una ranura para colocar una caja removible llamada “caja de escape”, además detrás de este agujero se coloca un objeto coloreado de referencia, por lo que es el único lugar disponible donde el animal en experimentación puede esconderse, figura 2C (Van Meer, 2005; Navarrete, 2008; Lalkovicova, 2015). Esta prueba permite estudiar el aprendizaje y la memoria espacial, la memoria de trabajo y de referencia, la memoria a corto y largo plazo. Además permite evaluar el estrés mediante estímulos aversivos con un foco de luz (de unos 150 W) y un generador de ruido (80 dB) (Navarrete, 2008; Cohan, 2015). El procedimiento comienza con un entrenamiento que consiste en colocar el animal en la caja de escape y dejarlo allí durante un minuto. Las sesiones empiezan colocando el animal en el centro de la plataforma en el interior de un cilindro opaco o “cámara de inicio” (20 cm de diámetro y 17 cm de altura), posteriormente se retira la cámara de inicio, se conectan la luz y el zumbido, y se deja que el animal explore el laberinto. La sesión termina cuando el animal encuentra el túnel de escape o cuando transcurren cinco minutos, momento en el que se le introduciría manualmente en dicho túnel. Cuando el animal entra en la cámara de escape, los estímulos aversivos cesan y se le deja en la oscuridad un minuto antes de devolverlo a su jaula. Se considerará un error cada vez que intente introducirse en un agujero que no es el correcto. Los intentos sucesivos en un mismo agujero equivocado se consideran el mismo error. Se puede video grabar cada ensayo para su posterior análisis (Navarrete, 2008; Locklear, 2014; Cohan, 2015).

Laberinto radial

El laberinto radial consiste en un equipo de ocho brazos equidistantes de aproximadamente 80 centímetros de longitud por 10 de ancho colocados radialmente en torno a una zona central circular de 30 cm de diámetro y elevado a una altura mínima de 50 cm sobre el nivel del suelo, cuenta con un recipiente pequeño al final de cada brazo de 3 cm de diámetro y 1 cm de profundidad, donde se coloca comida o agua como recompensa (Arias, 2012; Ji, 2015), figura 2A (Schwartzing, 2012). Con esta prueba se puede evaluar las alteraciones en el aprendizaje, capacidad de memoria espacial (Ji, 2015), memoria de trabajo y referencia (Spieker, 2012), la coordinación motora, así como la ansiedad (Schwartzing, 2012). Al final de cada brazo puede colocarse comida o agua sin que ésta sea visible desde el centro del laberinto. Lo más habitual es introducir el laberinto en un tanque circular de agua y emplear una plataforma como estímulo reforzador en la prueba. La tarea del laberinto radial clásico sirve para evaluar dos tipos de memoria: memoria de referencia y memoria de trabajo. La memoria de referencia se considera disminuida cuando el roedor entra en un brazo que nunca fue recompensado, mientras que la memoria de trabajo se evalúa negativamente si el roedor entra más de una vez en cada brazo (Spieker, 2012).

Laberinto acuático de Morris

Desarrollado por Richard G. Morris en 1984, esta prueba se ha convertido en el "estándar de oro" de la neurociencia conductual (Nunez, 2008). Mediante este ensayo se evalúa la memoria espacial y el aprendizaje (Van Meer, 2005; Nunez, 2008; Arias, 2012; Weitzner, 2015), memoria de referencia (Van Meer, 2005), memoria a corto plazo (Saadati, 2015), memoria de trabajo (Bohbot, 1996) y memoria a largo plazo (Salari, 2015). El laberinto acuático de Morris consiste en un recipiente redondo de polipropileno de 150 cm de diámetro con paredes de 40 cm de altura. El laberinto se coloca en el centro de una habitación iluminada, rodeada de paneles en los que se colocan las pistas espaciales. La piscina se divide en cuatro cuadrantes imaginarios (A, B, C y D) (Arias, 2012) figura 2D (Van Meer, 2005). La prueba consiste en colocar agua atemperada (22 ± 2 ° C) hasta los 30 cm (Arias, 2012), esta puede estar pintada de color blanco (leche o pintura no toxica) (Nunez, 2008). La plataforma corresponde a un cuadro de 10 cm de diámetro y colocada

en el centro de un cuadrante (Salari, 2015). Dependiendo del parámetro a evaluar se establecen las condiciones del ensayo como por ejemplo: 1) Utilizar una plataforma de color blanco sumergida en una ubicación fija al inicio y después en posiciones aleatorias en cada prueba. 2) Emplear una plataforma de color negro por encima del agua acompañada de una señal, primeramente en una posición fija y después en posiciones aleatorias. 3) Usar una plataforma negra visible más una señal, pero con posiciones aleatorias en cada ensayo. 4) Colocar una plataforma de color blanco sumergida con posiciones aleatorias en cada prueba (Vorhees, 2014). Las pruebas por ensayo se deciden de acuerdo al parámetro en evaluación y a decisión del investigador o de acuerdo a otras investigaciones, por ejemplo, las ratas se video graban por 60 segundos y si estas encuentran la plataforma antes en ese momento se termina el ensayo y solamente se evalúa tiempo en encontrar la plataforma y distancia recorrida (Motaghinejad, 2015).

Laberinto en cruz

El laberinto en cruz elevado permite evaluar la conducta de ansiedad en roedores. Este laberinto contiene brazos abiertos (50 cm de largo por 10 cm de ancho), por tanto, desprotegidos ante una caída desde la plataforma al suelo y brazos cerrados (50 cm de largo por 10 cm de ancho y paredes de 40 cm de altura) que resguardan al animal ante el peligro percibido, el techo se encuentra abierto (Tripathi, 2010), el aparato se encuentra elevado a 50 cm del suelo, en una habitación iluminada (Aranda, 2006), figura 2E (Walf, 2007). Esta prueba se basa en el principio de que la exposición de un animal en un brazo elevado y abierto conduce a una experiencia aversiva, porque las roedores muestran miedo innato a lo elevado, la tarea del roedor es ir de un brazo abierto a un brazo cerrado en un lapso de 30 segundos (Aranda, 2006; Blanco, 2009), o también la prueba se realiza durante 5 minutos donde se evalúa el número de entradas y salidas del roedor del área cerrada, además puede capturarse el ensayo mediante un sistema de video para su posterior análisis (Walf, 2007; Tripathi, 2010).

Tablero de agujeros

El tablero de agujeros consiste en un espacio abierto cuadrado (40 x 40 cm) cerrado transparente de 25 cm de altura, cuyo suelo cuenta con 16 orificios de 3.5 cm de diámetro, con un patrón de distribución homogéneo (Blanco, 2009), figura 2F (Tanaka, 2012). Esta prueba valorar el aprendizaje del roedor y simultáneamente se evalúa la memoria de trabajo y referencia espacial (Blanco, 2009), así como, la capacidad exploratoria del animal en un entorno desconocido (neofilia) (Brown 2008). La prueba consiste, en que el roedor primero tiene que encontrar cuatro hoyos con comida y posteriormente recordar las localizaciones que contienen la comida en los posibles 16 hoyos (Blanco, 2009), este ensayo se realiza una vez al día con dos repeticiones y por un lapso de 5 días, cada repetición consta de un tiempo de 10 min. Entre cada prueba se limpia el suelo y las paredes con alcohol al 70% (Brown, 2008)

Laberinto de campo abierto

La prueba de campo abierto consiste en una zona amplia abierta limitada por paredes puede ser circular (70 cm de diámetro y 28 cm de altura) o cuadrada (80 cm de largo, 80 cm de ancho y 50 cm de altura), donde el espacio se divide virtualmente en cuadrantes o algún otro patrón de interés, figura 2G (Tripathi, 2010; Hajali, 2012). Esta prueba permite evaluar la memoria espacial y de trabajo (Aranda, 2006), actividad locomotora (Can, 2011), el comportamiento exploratorio y la ansiedad del animal cuando se coloca en una nueva situación (campo abierto) (Hajali, 2012). El campo abierto permite obtener una medida cuantitativa y cualitativa de numerosos aspectos de la conducta, como el tiempo que emplea el animal en cada zona, el número de veces que se coloca sobre las patas traseras

para intentar salir, la distancia recorrida, etc. La prueba consiste en colocar gentilmente el roedor en el centro de la arena y grabar su comportamiento durante 3 o 5 min para su posterior análisis (Can, 2011; Hajali, 2012).

Test de nado forzado

El ensayo de nado forzado es uno de los más utilizados para evaluar el comportamiento depresivo en roedores (Can, 2011; Yankelevitch-Yahav, 2015), por lo que esta prueba suele utilizarse como un test del potencial que poseen los fármacos antidepresivos. La prueba consiste en la utilización de un cilindro de plástico transparente con una altura promedio de 40-50 cm y 20 cm de diámetro, el cual se llena de agua (25 °C) hasta una altura de aproximadamente 30 cm, de modo que la rata no puede tocar el fondo con la cola o las patas por lo que tendrá un comportamiento activo, el nado se realiza durante 5 o 6 min el cual es video grabado para su posterior análisis (Bogdanova, 2013; Vega-Rivera, 2015; Yankelevitch-Yahav, 2015). Por otro lado, en el caso de ratones se utiliza un cilindro de 30 cm de altura por 20 cm de diámetro y se lleva a 15 cm de agua (23-25 °C), la prueba se realiza por un periodo de 4 min (Can, 2012), figura 2H (Weiss, 2009). En este ensayo se utilizan tres códigos de evaluación: 1) inmovilidad se define como: si el ratón está flotando con la ausencia de cualquier movimiento a excepción de las necesarias para mantener la nariz fuera del agua. 2) Lucha o escalamiento: si se observan los movimientos rápidos de las extremidades anteriores de manera que las patas delanteras romper la superficie del agua. 3) Nado: movimiento de las extremidades anteriores o las extremidades traseras de una manera pasiva (Yankelevitch-Yahav, 2015).

Prueba Rota-rod

Esta prueba permite evaluar la coordinación motora y el equilibrio (Kim, 2013). La prueba consiste en colocar la rata en un compartimento separado en la varilla giratoria de 7 cm de diámetro (Figura 2I, (Kilts, 2009)), puede haber un día de entrenamiento a 4 rpm o a una velocidad constante a 15 rpm, en algunos casos se puede empezar con 4 rpm e ir incrementando hasta llegar a 40 rpm. El tiempo de latencia hasta la caída se registra automáticamente por placas de viaje magnéticos. Para eliminar la tensión y la fatiga en las ratas se les da una latencia máxima de corte de 180 o 300 segundos (Kim, 2013; Richter, 2014; Ji, 2015).

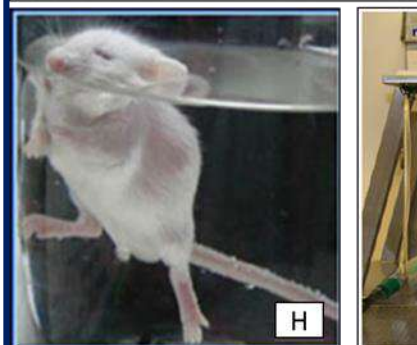
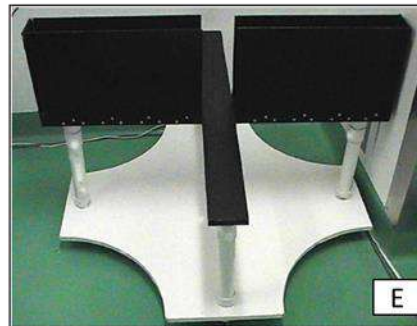
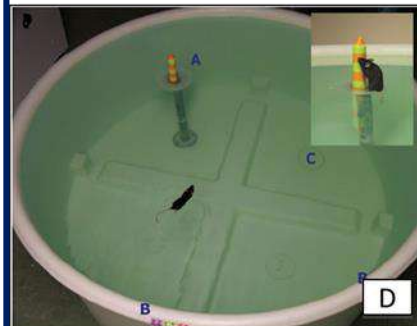
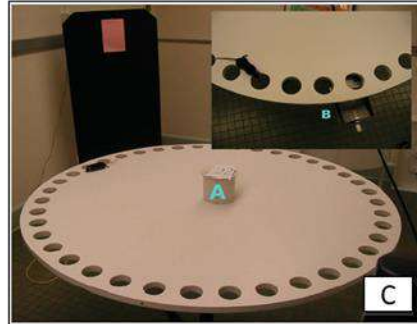


Figura 2. Ejemplos de pruebas conductuales en el laboratorio de neurociencias. En A) se puede observar el laberinto radial que consiste de ocho brazos y cámaras de video para monitorear la trayectoria de la rata, tomado de Schwarting, 2012. En B) se observa el dispositivo o caja de Skinner, mediante un accionamiento de la palanca recibe un estímulo visual, tomado de Sameshima, 2013. En C) se observa el laberinto de Barnes en A es la caja de inicio de la prueba y en el recuadro superior letra B es la caja de escape, tomado de Van Meer, 2005. En D) se observa el laberinto acuático de Morris en donde A corresponde a la plataforma identificada con una señal, en B se aprecia un cuadrante en donde se deposita al animal para el inicio de las pruebas y en C se ejemplifica otro cuadrante de la tina, tomado de Van Meer, 2005. En E) se observa el laberinto en cruz elevado del piso y con dos brazos sin paredes, tomado de Walf, 2007. En F) se ejemplifica el tablero de agujeros con la cámara en donde se contabilizará el número de intentos, tomado de Tanaka, 2012. En G) se aprecia el laberinto de campo abierto con el piso dividido por cuadrantes, tomado de Tripathi, 2010. En H) se aprecia un ratón realizando la prueba de nado forzado, tomado de Weiss, 2009; y en I) se aprecian 3 ratones en la prueba del Rota-rod, tomado de Kilts, 2009.

Campos electromagnéticos; Bobinas Helmholtz

Uno de los equipos más utilizados y que puede generar un CEM es la bobina Helmholtz (Figura 3 A, B). Este equipo genera un CEM con una frecuencia de 120 Hz de ondas armónicas, en donde se trabaja con 82 voltios en la bobina y 72% de voltaje en línea y con una inductancia de 5.61 mH. Las bobinas tienen un diámetro interno de 31.5 cm, con un espacio entre cada una de 15.75 cm, en donde se pueden colocar roedores para realizar los experimentos. Una modificación de ésta, es colocada de manera horizontal en lugar de vertical para poder poner medios de cultivos en el centro de los CEM entre las dos bobinas. (Cañedo-Dorantes, 2002; Vinit, 2014; Voigt, 2015).

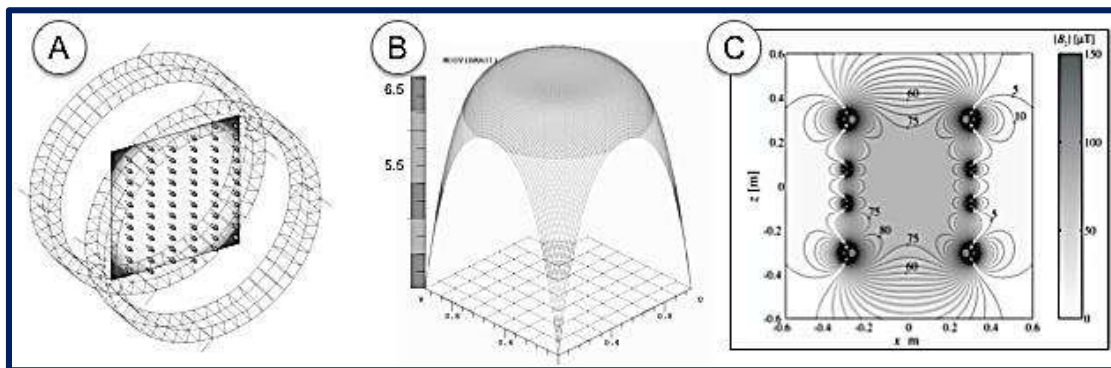


Figura 3. Diagramas de la densidad de flujo de las bobinas. En la figura (A) se observa la densidad del CEM en el plano y, z, mientras que en la Figura (B) se muestra la densidad de flujo en el plano x, y, z. En la figura (C) un ejemplo de cómo funcionan los CEM en la bobina Marritt. (Tomado de Gutiérrez-Mercado, 2013 y Herceng, 2009).

Las bobinas Marritt

Convencionalmente esta bobina consta de tres, cuatro o cinco piezas tipo Helmholtz alineadas una sobre otra con un grado de separación tal, que la primera, la segunda, tercera o cuarta derivada espacial del campo aplicado sea cero en el punto central del sistema de bobinas, esto para lograr una uniformidad de espectro en la porción central y así lograr colocar cualquier espécimen dentro del equipo y que reciba de forma uniforme el CEM (Figura 3C). Las bobinas pueden ser circulares o cuadrangulares; de la dimensión deseada de acuerdo al experimento al que se desea investigar, desde células en cultivo hasta humanos (Wilson 1994; Miller 1998; Kurokawa, 2003).

Prácticas generales en el laboratorio; fijación y corte de cerebro de rata

La fijación es un procedimiento histológico, que tiene como finalidad conservar de manera permanente una estructura lo más semejante al estado que tenía *in vivo*, por lo que una fijación inadecuada impide cualquier resultado fiable (Gage, 2012). Existen diferentes formas de fijar los tejidos dependiendo del tipo de fijador, de la estructura a fijar y de lo que queremos observar. Los métodos de fijación se pueden clasificar en dos tipos: físicos y químicos. Los fijadores físicos se basan en una congelación muy rápida del tejido (criodesecación o liofilización y la criosustitución) o en la aplicación de calor elevado (Paniagua, 1997; Ross, 2005). Se utilizan cuando los fijadores químicos alteran las estructuras que queremos observar, cuando necesitamos una fijación muy rápida o cuando el tipo de tejido y la técnica que usaremos lo requiera. La congelación rápida es un buen método de preservación de las características moleculares y es conveniente que sea rápida puesto que así se impide la formación de grandes cristales de hielo que nos destruirían la estructura del tejido (Hackett, 2013). Los métodos químicos utilizan soluciones acuosas compuestas por moléculas que establecen puentes entre el tejido, manteniendo la integridad y uniformidad (Paniagua, 1997; Ross, 2005). Hay dos métodos básicos de fijación líquida: la inmersión y la perfusión.

Método de inmersión; en este procedimiento las piezas del tejido se sumergen en la solución fijadora, para obtener cortes histológicos de alta calidad por este método se debe retirar el órgano de interés cuidadosamente para mantener su integridad estructural y sumergir rápidamente hasta el fondo del recipiente en la solución fijadora (formaldehído 4%), especialmente cuando se trata del cerebro para evitar la formación de artefactos en las neuronas (Jordan, 2011). El tejido a sumergir no deberá superar los 0.5 cm de espesor para que la solución alcance el interior de la pieza antes de que comience a deteriorarse. Por otra parte, el volumen recomendado de fijador deberá ser 20 veces superior al volumen de la pieza. La osmolaridad del tejido y la de la solución fijadora a usar deben estar equilibradas, además el pH del fijador debe ser próximo al fisiológico. Finalmente, el tiempo de fijación depende de cada tipo de fijador y muestra, sin embargo una agitación suave durante la fijación ayudará a que el fijador penetre mejor en la muestra y que el tiempo de fijación sea más corto (Paniagua, 1997; Ross, 2005; Pollard, 2008; Alberts, 2002).

Método de perfusión; el método de fijación por perfusión es mucho más efectivo que el de inmersión ya que la solución fijadora llega a todas las células del animal en perfusión (Ross, 2005), en este procedimiento la solución fijadora se introduce a través del sistema circulatorio a través del ventrículo izquierdo del corazón (Jalili, 2014; Schlosser, 2015). Una vez colocada la cánula se drena la sangre del sistema circulatorio con solución salina fisiológica y la solución se extrae al hacer una incisión en la aurícula derecha. Posteriormente se hace pasar la solución fijadora por la cánula durante un periodo de 20 minutos (Jalili, Salahshoor et al. 2014). Algunos ejemplos de fijadores son: el alcohol etílico, el ácido acético, el ácido pícrico, el paraformaldehído al 4%, entre otros. También se podrá fijar un órgano en el caso de introducir la solución fijadora en la arteria principal que irrigue dicho órgano. La perfusión no siempre es posible en algunos casos como en tejido obtenido a partir de biopsias. Es importante cuidar la osmolaridad, el pH y la presión que ejercerá la solución de lavado y de fijación mediante bombas peristálticas, este es un punto importante a considerar debido a que una presión baja podría impedir que la solución alcanzara todas las partes de la estructura y una presión muy alta podría provocar extravasación de líquido por los vasos sanguíneos y por la propia estructura tisular (Paniagua 1997; Ross 2005).

Protocolo para la fijación del cerebro de rata por perfusión de acuerdo a Carter, 2015 y Smith, 2014.

- 1) Las ratas deberán ser anestesiadas previamente, hasta obtener un plano quirúrgico profundo.
- 2) Posteriormente se fija al animal a un soporte que sostenga todas sus extremidades.
- 3) Se realiza una incisión medial sobre la piel para exponer la caja torácica y se incide por línea media hasta exponer el corazón.
- 4) Se localiza el ventrículo izquierdo y se realiza un pequeño corte con el bisturí, seguidamente se introducirá la cánula para comunicar la arteria aorta craneal.
- 5) Posteriormente se liga la cánula a la aorta en forma cuidadosa y se comienza a pasar la solución fisiológica (solución salina al 0.9%) a través de ella, simultáneo a este paso, se debe hacer un pequeño corte en el ventrículo derecho del animal, para extraer por completo la sangre del animal.
- 6) Cuando finalice la administración de la solución fisiológica, inmediatamente se debe iniciar la perfusión con el líquido fijador (buffer de paraformaldehído al 4%). En el momento en que el fijador penetre en el torrente circulatorio se observará que el animal comienza a presentar fibrilaciones musculares, lo que indica que el fijador está pasando en forma adecuada.
- 7) Finalizado el tiempo, se desmontará la rata y se apreciará la rigidez en todo el cuerpo.
- 8) El cerebro una vez perfundido se extrae de la bóveda craneana y se almacena a 4 °C en buffer de fosfatos y en pasajes de sacarosa a 4°C, hasta su procesamiento.

Cortes histológicos

El análisis histológico requiere cortes precisos y en la región de interés, esto es un paso importante en la preparación de la muestra, ya que para observar las características internas de las neuronas se utilizan microscopios de epifluorescencia o confocales, sin embargo, para obtener la mejor imagen con estos equipos es necesario obtener cortes con un grosor muy fino (Molist, 2011; Pinskiy, 2015).

Protocolo para realizar cortes de cerebro en un vibratomo de acuerdo a la metodología utilizada por Carter, 2015.

- 1) Colocar el cerebro en un rebanador de cerebros y cortar sobre la región a estudiar de acuerdo a las coordenadas descritas en el atlas anatómico de Paxinos.
- 2) Colocar la muestra sobre la platina del vibratomo y fijarla con el pegamento de contacto.
- 3) Realizar cortes coronales o sagitales de 50 μm de grosor.
- 4) Recuperar los tejidos flotantes para la realización de inmunohistoquímica en flotación o fijar los cortes en portaobjetos previamente cargados con Poli-L-lisina (Carter, 2015).

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica de inmuno-marcaje que se basa en la utilización de anticuerpos que se unen específicamente a los antígenos correspondientes y permiten demostrar una variedad de proteínas presentes en el sistema nervioso central. Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo secundario está marcado con una sustancia que absorbe la luz, emita energía o produzca coloración (Moral, 1993). Existen diferentes variantes de la técnica de inmunohistoquímica de acuerdo al compuesto marcador como: la inmunofluorescencia directa (Bushlin, 2012) e indirecta (Reyes, 2015), inmunoperoxidasa

(Kaya, 2013; Carter, 2015) y el sistema avidina-biotina-peroxidasa (Sesack, 1998; Vaquero, 2007).

A continuación se describe el protocolo para la visualización de tirosina hidroxilasa en flotación mediante la técnica de inmunoperoxidasa de acuerdo a la metodología de Carter, 2015.

- 1) Lavar tres veces por cinco minutos los cortes con una solución buffer.
- 2) Bloquear la actividad de las peroxidases endógenas con peróxido de hidrogeno en metanol durante 20 minutos.
- 3) Lavar por tres ocasiones de cinco minutos los cortes con la solución buffer.
- 4) Los cortes se bloquean por una hora con Albumina Sérica Bovina, con el propósito de reducir los sitios inespecíficos.
- 5) Enseguida incubar toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario anti-TH a la concentración deseada.
- 6) Posteriormente se lava tres veces durante cinco minutos con la solución buffer.
- 7) Incubar con el anticuerpo secundario biotinilado en contra del anticuerpo primario por 30 minutos a 37 °C.
- 8) Incubar por otros 30 minutos con estreptavidina peroxidasa.
- 9) Lavar los cortes nuevamente por tres ocasiones de 5 minutos.
- 10) Para la reacción se utilizará una solución de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorada durante 10 minutos.

Protocolo para la inducción de un modelo de ratas hemiparkinsonianas a través de la microinyección de 6-hidroxidopamina de acuerdo a Torres, 2000 y Pyter, 2013.

Para este procedimiento se utilizarán ratas con un peso de entre 180-240g, previo al procedimiento se realizará la inducción de la anestesia hasta conseguir un plano quirúrgico, este se comprobará mediante la ausencia del reflejo corneano-palpebral y de la respuesta nociceptiva flexora al presionar firmemente la planta del pie del animal. (Serrano, 2014; Xiao, 2015,).

- 1) Una vez alcanzado el plano anestésico quirúrgico, se procederá a fijar la cabeza de la rata en el marco estereotáxico, colocando los incisivos superiores del animal dentro del adaptador en proyección frontal, de manera que quede completamente horizontal con respecto al piso del equipo, figura 4A.
- 2) El siguiente paso deberá fijar el cráneo lateralmente con ayuda de las barras auditivas colocadas en el oído interno de la rata.
- 2) Para el comienzo de la cirugía, se deberá rasurar al animal y embrocar quirúrgicamente con yodo povidona.
- 3) Se realizará la incisión en piel y tejido subcutáneo para exponer la superficie del cráneo.
- 4) Una vez conseguido esto, se identificará la sutura Bregma, la cual se define por la unión de la sutura sagital con la coronal, figura 4B.
- 5) A continuación se procederá a medir las coordenadas estereotáxicas de acuerdo al atlas de Paxinos, con el objeto de realizar una pequeña trepanación en el cráneo.
- 6) Se realizará la microinyección de la neurotóxina con la ayuda de una microbomba de infusión para controlar el volumen y la velocidad de administración.
- 7) Finalizado esto, se procederá a tapar la trepanación con cemento óseo.
- 8) Es importante verificar que no exista sangrado evidente en el sitio de la trepanación antes del cierre quirúrgico.
- 9) La aproximación de la herida será realizada con grapas quirúrgicas.

10) Finalmente se retirará al animal con delicadeza del equipo estereotáxico para comenzar con los cuidados posoperatorios acordes a las normatividad vigente respecto al uso y cuidado de los animales de laboratorio (ver capítulo VII)

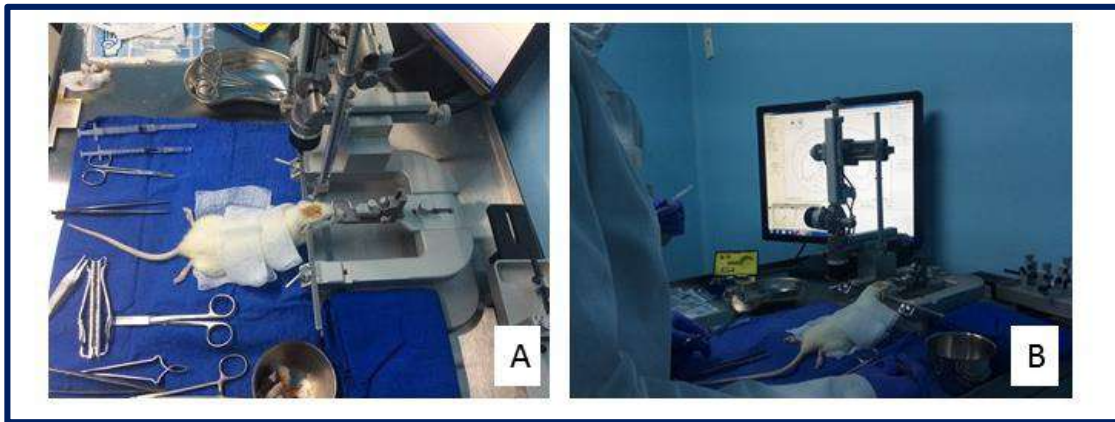


Figura 4. Técnica estereotáxica. A) Una vez anestesiado el animal es colocado en decúbito esternal para iniciar el procedimiento quirúrgico, en B) se puede observar la localización de la sutura Bregma guiada por el atlas de coordenadas.

Electrofisiología

Para el estudio de un sólo o múltiples canales iónicos en la célula se podrá realizar grabando las corrientes eléctricas conocidas como potenciales de acción, principalmente en células excitables como neuronas, cardiomiocitos y fibras musculares. Dependiendo del interés de la investigación existen diferentes configuraciones para el registro de actividad. Los experimentos podrán ser realizados en cultivo celulares, células disociadas o en rebanadas de cerebro, lo cual nos permite investigar las propiedades electrofisiológicas en su ambiente natural, sin embargo, dependiendo del tipo de muestra se necesitará un microscopio invertido o vertical con una plataforma estable para la correcta visualización de las células. Dentro de las características de la microscopia será recomendable contar con una iluminación óptica de tipo Nomarski (NIC) para poder visualizar correctamente la membrana neuronal.

El microscopio deberá contar con una mesa anti-vibración con sistema de suspensión neumática que reduzca las vibraciones a unos cuantos Hertz, lo cual será suficiente para desarrollar los estudios, esta mesa debe ser colocada de preferencia en una esquina o cercana a una pared para evitar el tránsito y disminuir las vibraciones al máximo. Es necesario contar con controladores y un micromanipulador motorizado para el movimiento preciso de la pipeta, ya que en promedio el diámetro de la punta de la pipeta oscilará entre 1-2µm para un canal, debido a que la posición de la pipeta deberá ser fija y estable después de la formación del sello para poder mantener una grabación por varios minutos, los tipos de micromanipuladores pueden ser de movimiento mecánico, hidráulico, motorizado o piezoeléctricos. Estos deberán de ser pequeños y operacionalmente rígidos con movimientos largos y rápidos así como suaves desplazamientos a nivel de submicras. Se deberá contar con una jaula de Faraday para delimitar la zona y proteger el pre-amplificador del posible ruido secundario eléctrico y que ayude a disminuir la entrada de luz ambiental. Además se contará con un osciloscopio, un amplificador de corriente para patch-clamp, un generador de pulso y computadoras para la interpretación y el almacenamiento de datos, cámaras de video unidas al microscopio para obtener una imagen más definida en tiempo

real y monitorear cualquier cambio morfológico de la célula, además de tener una visión más fácil sobre la pipeta y el cambio en la resistencia de la membrana.

Patch clamp

Esta técnica implica poner en contacto una sola célula con una pipeta de vidrio llena de una solución fisiológica, con el fin de aislar una pequeña porción de la membrana con la punta de la pipeta, posteriormente un electrodo es insertado dentro de la pipeta para capturar la actividad de los canales iónicos en la membrana celular, o bien cuando se adentra el electrodo al interior de la célula. Este método expresa señales fidedignas para reportar una sinapsis o bien potenciales de membrana mediados por canales iónicos para comprobar la funcionalidad del cerebro (Py, 2012; Kodandaramaiah, 2012).

Una mejora en la técnica clásica de patch-clamp es el “patch-clamp-recording” *in vivo* (Tao, 2015). Esta técnica maneja el mismo principio biofísico sin embargo, se puede realizar tanto en células aisladas, rebanadas de tejido, así como en animales, anestesiados o despiertos (Tao, 2015), debido a que muchas de las funciones cerebrales superiores, tales como la cognición, sólo pueden ser estudiados en animales despiertos o incluso en movimiento libre.

Existen diversas formas de identificar a la célula las cuales pueden ser de acuerdo a la respuesta electrofisiológica registrada (método a “ciegas”) (Margrie, 2002), mediante la ayuda de métodos transgénicos o virales para marcar con fluorescencia la membrana celular (Häusser, 2014; Tao, 2015) o simplemente hacer un sombreado marcando el espacio extracelular (Kitamura, 2008; Horton, 2013). Con el uso de “patch-clamp-recording” *in vivo*, se puede separar las señales de excitación y las de inhibición sináptica directamente en tiempo real, manteniendo el potencial de membrana a -70 mV que es el potencial de inversión de las corrientes inhibitorias (canales de iones Cl⁻) y en 0 mV que es el potencial de inversión de las corrientes excitatorias (Na⁺ y los canales de iones de K⁺) (Wu, 2006). Esta técnica puede ser utilizada en conjunto con otras técnicas que han estado surgiendo como la optogenética para obtener resultados fidedignos del cerebro (Mansor, 2015).

Técnica optogenética

La optogenética comprende una familia creciente de técnicas en las que las células modificadas genéticamente son estimuladas por un haz de luz con el fin de influir en los comportamientos celulares. Las células diana deben ser diseñadas para expresar proteínas fotosensibles exógenas que alteran el potencial de membrana en respuesta a la iluminación (Miesenböck, 2009; Miesenböck, 2011). Los efectos de la despolarización de la membrana (o con menor frecuencia hiperpolarización) se pueden monitorear a nivel celular individual, en grupos o circuitos neuronales y en todo el organismo. Por lo tanto, la optogenética incluirá varios componentes; la producción de proteínas fotosensibles y la optimización de su aplicación; las técnicas para la orientación de los genes que codifican estas proteínas a tipos de células específicos y la tecnología para la iluminación dirigida *in vivo*. La optogenética es un método idóneo para la observación de la electrofisiología funcional y cambios de comportamiento celular, resultado de la fotoestimulación (Fehrentz, 2011; Dugué, 2012).

Para realizar esta técnica se requieren de varios componentes, por ejemplo: el fotosensor instrumento que detecta cambios en la fluorescencia, o en la luminiscencia, etc., después de obtener la respuesta a la composición química, el entorno mecánico o eléctrico y nos proporciona un informe óptico de dicho cambio (Jerome, 2011). El diseño de las sondas a

utilizar dependerá de la actividad que se desee monitorear (Miesenböck, 2009; Miesenböck, 2011)

Se requiere también de “foto-actuadores”, en los primeros experimentos sobre la foto-activación de las neuronas se utilizó un componente genético con una gran especificidad celular, los componentes están unidos a un fluoroforo que al momento en que llevan a cabo su función emiten una fluorescencia que se puede detectar, sin embargo, no todos se pueden modular, se tienen que conjugar con otras moléculas, las cuales no siempre dan estabilidad o no permiten una fisiología normal de dicha molécula en el sistema (Zemelman, 2002). Sin embargo, se han hecho avances muy importantes en la mejora de las sondas a utilizar. Por ejemplo, los foto-actuadores actuales derivados de las opsinas incluyen, aquellos capaces de llevar a cabo la transducción de las señales de alta frecuencia, e ir incrementando su actividad conforme se vayan estimulando (Nagel, 2003; Gunaydin, 2010) o alternar la actividad como un interruptor donde el activador se puede encender y apagar (Berndt, 2009; Zhang, 2007; Smedemark-Margulies, 2013) (Tabla 1).

Tabla 1: Ejemplos de moléculas “foto-actuadores” optogenéticas				
Moléculas “Fotoactuators”	Organismo de origen	Pico de excitación (nm)	Parámetros que afectan	Propósito funcional en neurociencias
Opsinas funcionales	C. reinhardtii	470 “on” 530 “off”	conductancia de cationes	Cambio de potencial de membrana
VChR1	V. carteri	589	conductancia de cationes	despolarización del potencial de membrana
Bacterio-rhodopsina	halobacteria	568	Bomba de protones	hiperpolarización del potencial de membrana
ChR2	C. reinhardtii	470	conductancia de cationes	despolarización del potencial de membrana
ChETA	C. reinhardtii	470	conductancia de cationes	despolarización de alta frecuencia
LiGluR	Vertebrados	380	conductancia de cationes	despolarización del potencial de membrana
chARGe	D. melanogaster	430-550	conductancia de cationes mediada a la PCL	despolarización del potencial de membrana
NpHR (halorodopsina)	N. pharaonis	570	Conductancia de cloruro	hiperpolarización del potencial de membrana
Opto-α1AR	Chimeric B. primigenius and H. sapiens	504	IP3, DAG generation	Señal de paso para la subunidad Gq-Fosfolipasa C
Opto-β2AR	Chimeric B. primigenius and M. auratus	504	cAMP generation	Señal de paso de la subunidad Gs-adenilciclase

VChR: Proteína canalrodopsina derivada de V. carteri; ChR2: Canalrodopsina-2; ChETA: Gen Diseñado de opsinas como control; LiGluR: Receptor ionotropico a glutamato ligado a un activador de luz; chARGe: Molécula de acoplamiento de la Rodopsina-2 a la proteína G transmembranal; NpHR: N. pharaonis halorodopsina; Opto- α 1AR: receptor optogénico α 1-adrenergico; Opto- β 2AR: receptor optogénico β 2-adrenergico; PCL, Fosfolipasa-C, IP3; 1,4,5-triphosphato de inositol; DAG, diacilglicerol; cAMP, adenosine de trifosfato cíclico (Modificado de: Smedemark-Margulies, 2013).

Entrenamiento requerido para trabajar en el laboratorio de neurociencias

El personal que labore en el laboratorio de neurociencias deberá contar con el entrenamiento específico en los procedimientos que se llevan a cabo en él y deberá ser supervisado por científicos especializados en el área. El proceso empieza con la capacitación básica en las buenas prácticas de laboratorio, técnicas correctas y el

entrenamiento en el uso del equipo de protección personal, la utilización apropiada del equipo especial de confinamiento, desinfección, descontaminación y pasos a seguir en caso de incidentes o accidentes entre otros aspectos. El personal deberá recibir un entrenamiento teórico-práctico en las técnicas, normas y bioseguridad del laboratorio. En el caso de que se autorice la entrada de personal externo, el trabajo será llevado a cabo únicamente por el personal autorizado del laboratorio y el solicitante entrara en calidad de “persona en entrenamiento” o “candidato”, lo cual implica que esta persona estará bajo supervisión previa en el trabajo dentro del área y únicamente se les permitirá entrar acompañadas con el personal autorizado. Solo las personas que hayan adquirido los conocimientos, el entrenamiento y la experiencia suficiente para trabajar en un laboratorio de neurociencias serán autorizadas (Camacho, 2010).

Bitácoras del laboratorio

La bitácora de laboratorio es un instrumento de recolección de datos, cuya principal finalidad es el registro cronológico de actividades y el documentar los experimentos, avances y resultados en la investigación neurocientífica cotidiana. La libreta destinada al uso como bitácora de laboratorio deberá ser de pasta dura, con un número suficiente de hojas y deberán ser foliadas, no se deberá emplear libretas de espiral u hojas sueltas como bitácora. En la portada se escribirá el nombre del autor o autores (equipo de trabajo), nombre del laboratorio, fecha de inicio y proyecto (opcional). Además se recomienda adicionar algún dato de utilidad en el caso de extravió, como correo electrónico o algún número telefónico de contacto (Martínez LM). Todo investigador, estudiante y visitante deberá mantener un registro por escrito de sus actividades en una bitácora preferentemente llenada con bolígrafo de tinta azul. La bitácora al ser un documento académico y legal, quedará estrictamente prohibido arrancar las hojas o sustraerlas ya que estas permanecerán en el laboratorio en todo momento y no podrán ser sustraídas del mismo sin autorización del supervisor. Las bitácoras se consideran propiedad intelectual del laboratorio durante y al término de los estudios, quedará estrictamente prohibido distribuir el contenido de las bitácoras a personas ajenas al laboratorio sin autorización. De particular importancia para los estudiantes e investigadores, cada experimento deberá ser claramente identificable a través de un identificador único, debiendo poseer título, objetivo o razón por la cual se realiza el experimento. (Christian A. García CA, 2012).

REFERENCIAS

- Ackman, J. B., Burbridge, T. J., & Crair, M. C. (2012). Retinal waves coordinate patterned activity throughout the developing visual system. *Nature*, 490:219–225.
- Airan, R. D., Thompson, K. R., Fenno, L. E., Bernstein, H., & Deisseroth, K. (2009). Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature*, 458:1025–1029.
- Akerboom, J., Carreras Calderón, N., Tian, L., Wabnig, S., Prigge, M., Tolö, J., Gordus, A., Orger, M.B., Severi, K.E., Macklin, J.J., Patel, R., Pulver, S.R., Wardill, T.J., Fischer, E., Schüler, C., Chen, T.W., Sarkisyan, K.S., Marvin, J.S., Bargmann, C.I., Kim, D.S., Kügler, S., Lagnado, L., Hegemann, P., Gottschalk, A., Schreiter, E.R., Looger, L.L. (2013). Genetically encoded calcium indicators for multicolor neural activity imaging and combination with optogenetics. *Front Mol Neurosci*, 6:2.
- Banghart, M., Borges, K., Isacoff, E., Trauner, D. & Kramer, R.H. (2004). Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. *Nature Neuroscience*, 7(12):1381–1386.
- Barnes, F.S. & Greenebaum, B. (2007). Bioengineering and Biophysical aspect of electromagnetic fields, CRC press, Taylor and Francis Group, Boca Raton
- Bartels, E., Wassermann, N. H., Erlanger, B.F., (1971). Photochromic activators of the acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(8):1820–1823.
- Bender, K.J., & Trussell, L.O. (2009). Axon initial segment Ca²⁺ channels influence action potential generation and timing. *Neuron* 61, 259–271.
- Berndt, A., Yizhar, O., Gunaydin, L. A., Hegemann, P., & Deisseroth, K. (2009). Bistable neural state switches. *Nat. Neurosci*, 12:229234.
- Cañedo-Dorantes, L., García-Cantú, R., Barrera, R., Méndez-Ramírez, I., Navarro, V.H., Serrano, G. (2002) Healing of Chronic Arterial and Venous Leg Ulcers With Systemic Electromagnetic Fields, *Arch Med Res*. 33(3):281-9
- Chambers, J. J., Banghart, M.R., Trauner, D. & Kramer, R.H., (2006). Light induced depolarization of neurons using a modified Shaker K(b) channel and a molecular photoswitch. *Journal of Neurophysiology*, 96(5):2792–2796.
- Deisseroth, K. (2011). Optogenetics. *Nature Methods*, 8:26-29.
- Dugué, G.P., Akemann, W. & Knöpfel, T. (2012). A comprehensive concept of optogenetics. Knöpfel, T. & Boyden, E. (Eds). *Progress in Brain Research, Optogenetics: Tools for Controlling and Monitoring Neuronal Activity*, 196: 1-28. Elsevier B.V.
- Engström, S. (2004) Magnetic Field Generation and Dosimetry. En: Rosch, P. & Markov M. (Eds.), *Bioelectromagnetic Medicine*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, pp. 39-49.
- Fehrentz, T., Schönberger, M. and Trauner, D., (2011). Optochemical genetics. *Angew Chem Int Ed Engl*, 50(51):12156–12182.
- Glaser, R., (2005). *Biophysics*. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.
- Gutiérrez-Mercado, Y.K., Cañedo-Dorantes, L., Gómez-Pinedo, U., Serrano-Luna, G., Bañuelos-Pineda, J. & Feria-Velasco A. (2013) Increased vascular permeability in the circumventricular organs of adult rat brain due to stimulation by extremely low frequency magnetic fields. *Bioelectromagnetics*. 34(2):145-55
- Gratzer, W.B., (2011). Biophysics - whence, whither, wherefore - or Hold that hyphen. *BMC Biology*, 9:12.
- Gunaydin, L. A., Yizhar, O., Berndt, A., Sohal, V. S., Deisseroth, K., and Hegemann, P. (2010). Ultrafast optogenetic control. *Nat. Neurosci*, 13:387–392.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391, 85–100.

Häusser, M., & Margrie, T.W. (2014). Two-photon targeted patching and electroporation in vivo. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2014(1):78-85

Horton, N. G., Wang, K., Kobat, D., Clark, C. G., Wise, F. W., Schaffer, C. B., Xu, C., (2013). In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain. *Nat. Photonics* 7:205–209.

International-Commission-on-Non-Ionizing-Radiation-Protection, (ICNIRP), (1998). Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz). *Health Phys* 74(4): 494-522

Izquierdo-Serra, M., Trauner, D., Llobet, A. and Gorostiza, P. (2013). Optical modulation of neurotransmission using calcium photocurrents through the ion channel LiGluR. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 6:3.

Janovjak, H., Szobota, S., Wyart, C., Trauner, D. & Isacoff, E.Y., (2010). A light-gated, potassium selective glutamate receptor for the optical inhibition of neuronal firing. *Nature Neuroscience*, 13(8):1027-1032.

Jerome, J., Foehring, R. C., Armstrong, W.E., Spain, W.J., Heck, D.H. (2011). Parallel optical control of spatiotemporal neuronal spike activity using high-speed digital light processing. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5:70.

Kurokawa, Y., Nitta, H., Imai, H. & Kabuto, M. (2003). Acute Exposure to 50 Hz Magnetic Fields With Harmonics and Transient Components: Lack of Effects on Nighttime Hormonal Secretion in Men. *Bioelectromagnetics* 24:12-20.

Kitamura, K., Judkewitz, B., Kano, M., Denk, W., & Häusser, M. (2008). Targeted patch-clamp recordings and single-cell electroporation of unlabeled neurons in vivo. *Nat. Methods*, 5:61–67

Kodandaramaiah, S.B., Franzesi, G.T., Chow, B.Y., Boyden, E.S. & Forest, C.R. (2012). Automated whole-cell patch-clamp electrophysiology of neurons in vivo. *Nat Methods*. 9(6):585-7.

Mansor, M.A. & Ahmad, M.R., (2015). Single Cell Electrical Characterization Techniques. *Int J Mol Sci.* 16(6):12686-12712.

Margrie, T. W., Brecht, M., & Sakmann, B. (2002). In vivo, low-resistance, whole-cell recordings from neurons in the anaesthetized and awake mammalian brain. *Pflugers Arch*, 444:491–498.

Markov, M.S. (2015). *Electromagnetic fields in biology and medicine*. Boca Raton, FL., CRC Press, Taylor and Francis Group.

Miesenböck, G. (2009). The optogenetic catechism. *Science*, 326(5951):395–399.

Miesenböck, G. (2011). Optogenetic control of cells and circuits. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27:731–758.

Miller, S.C., & Furniss, M.J. (1998). Bruton's Tyrosine Kinase Activity and Inositol 1,4,5-Trisphosphate Production Are Not Altered in DT40 Lymphoma B Cells Exposed to Power Line Frequency Magnetic Fields. *J Biol Chem.* 4:273(49):32618-26.

Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P. & Bamberg, E. (2003). Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:13940–13945.

Pastrana, E. (2011). Optogenetics: controlling cell function with light. *Nature Methods*, 8:24–25.

Py, C., Martina, M., Monette, R., Comas, T., Denhoff, M.W., Luk, C., Syed, N.I., Mealing, G. (2012). Culturing and electrophysiology of cells on NRCC patch-clamp chips. *J Vis Exp*, 7(60):3288.

Regehr, W.G., Pine, J., Cohan, C.S., Mischke, M.D., & Tank, D.W. (1989). Sealing cultured invertebrate neurons to embedded dish electrodes facilitates long-term stimulation and recording. *J. Neurosci. Methods*, 30:91–106.

- Rosch, P.J. & Markov, M.S. (2004). *Bioelectromagnetic Medicine*, Marcel Dekker, Inc, New York, NY.
- Salah, A., & Perkins, K. L. (2011). Persistent ictal-like activity in rat entorhinal/perirhinal cortex following washout of 4-aminopyridine. *Epilepsy Res*, 94:163–176.
- Smedemark-Margulies, N. & Trapani, J.G. (2013). Tools, methods, and applications for optophysiology in neuroscience. *Front Mol Neurosci*. 6:18.
- Tao, C., Zhang, G., Xiong, Y., Zhou, Y., (2015). Functional dissection of synaptic circuits: in vivo patch-clamp recording in neuroscience. *Front Neural Circuits*. 9:23.
- Vinit, S., Keomani, E, Deramaudt, T.B., Spruance, V.M., Bezdudnaya, T., Lane, M.A., Bonay, M. & Petitjean, M. (2014) Interdisciplinary Approaches of Transcranial Magnetic Stimulation Applied to a Respiratory Neuronal Circuitry Model. *PLoS One*. 18;9(11):e113251.
- Voigt, J., Knappe-Grüneberg, S., Gutkelch, D., Haueisen, J., Neuber, S., Schnabel, A. & Burghoff, M. (2015). Development of a vector-tensor system to measure the absolute magnetic flux density and its gradient in magnetically shielded rooms. *Rev Sci Instrum*. 86(5):055109
- Volgraf, M., Gorostiza, P., Numano, R., Kramer, R. H., Isacoff, E. Y., & Trauner, D. (2006). Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. *Nat. Chem. Biol*, 2:47–52.
- Wilson, B.W., Caputa, K., Stuchly, M.A., Saffer, J.D., Davis, K.C., Washam, C.E., Washam, L.G., Washam, G.R., Wilson, M.A. (1994) Design and fabrication of well confined uniform magnetic field exposure systems. *Bioelectromagnetics*.15(6):563-77.
- Wu, D.M., Minami, M., Kawamura H. & Puro, D.G. (2006). Electrotonic transmission within pericyte-containing retinal microvessels. *Microcirculation* 13:353-363.
- Xu, S., Jiang, W., Poo, M.-M., and Dan, Y. (2012). Activity recall in a visual cortical ensemble. *Nat. Neurosci*. 15:449–55, S1–S2.
- Zemelman, B. V., Lee, G. A., Ng, M., and Miesenböck, G. (2002). Selective photostimulation of genetically chARGed neurons. *Neuron*, 33:15–22.
- Zhang, F., Wang, L.-P., Brauner, M., Liewald, J. F., Kay, K., Watzke, N., Wood, P.G., Bamberg, E., Nagel, G., Gottschalk, A., Deisseroth, K. (2007). Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*, 446:633–639.
- Zhou, H.X., (2011). What is biophysics? *BMC Biology*, 9:13.
- Gähwiler, B.H., Llano, I. (1989). Sodium and potassium conductances in somatic membranes of rat Purkinje cells from organotypic cerebellar cultures. *J Physiol (Lond)*. 417:105-122.
- Paxinos G, Franklin KBJ. (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2. San Diego: Academic Press;10.1111/j.1469-7580.2004.00264.x.
- Cleary, D. R., R. S. Phillips, et al. (2012). "A novel, non-invasive method of respiratory monitoring for use with stereotactic procedures." *J Neurosci Methods* 209(2): 337-343.
- Ersahin, M., N. Karaaslan, et al. (2011). "The safety and diagnostic value of frame-based and CT-guided stereotactic brain biopsy technique." *Turk Neurosurg* 21(4): 582-590.
- Stoica, L., S. S. Ahmed, et al. (2013). "Gene transfer to the CNS using recombinant adeno-associated virus." *Curr Protoc Microbiol Chapter 14: Unit14D 15*.
- Jozwiak, A., Y. Liu, et al. (2014). "Development of a stereotaxic device for low impact implantation of neural constructs or pieces of neural tissues into the mammalian brain." *Biomed Res Int* 2014: 651236.
- Purger, D., T. McNutt, et al. (2009). "A histology-based atlas of the C57BL/6J mouse brain deformably registered to in vivo MRI for localized radiation and surgical targeting." *Phys Med Biol* 54(24): 7315-7327.

- Abdelaal, H. M., H. O. Kim, et al. (2015). "Comparison of Vibratome and Compresstome sectioning of fresh primate lymphoid and genital tissues for in situ MHC-tetramer and immunofluorescence staining." *Biol Proced Online* 17(1): 2.
- Bannerman, P. G. and A. Hahn (2007). "Enhanced visualization of axonopathy in EAE using thy1-YFP transgenic mice." *J Neurol Sci* 260(1-2): 23-32.
- Skinner, P. J., C. A. Vierra-Green, et al. (2002). "Amino acids in a region of ataxin-1 outside of the polyglutamine tract influence the course of disease in SCA1 transgenic mice." *Neuromolecular Med* 1(1): 33-42.
- Staffend, N. A. and R. L. Meisel (2011). "DiOlistic labeling in fixed brain slices: phenotype, morphology, and dendritic spines." *Curr Protoc Neurosci* Chapter 2: Unit 2 13.
- Clerin, E., Y. Yang, et al. (2014). "Vibratome sectioning mouse retina to prepare photoreceptor cultures." *J Vis Exp*(94).
- Pinskiy, V., J. Jones, et al. (2015). "High-Throughput Method of Whole-Brain Sectioning, Using the Tape-Transfer Technique." *PLoS One* 10(7): e0102363.
- Biosystems, L. (2015). Retrieved 04 agosto 2015, 2015, from <http://www.leicabiosystems.com/es/preparacion-de-muestras/seccionado/seccionado-en-frio/detalles/product/leica-cm1520/>.
- Sturm, D., L. Marselli, et al. (2013). "Improved protocol for laser microdissection of human pancreatic islets from surgical specimens." *J Vis Exp*(71).
- Witherspoon, J. W., I. V. Smirnova, et al. (2014). "Improved gold chloride staining method for anatomical analysis of sensory nerve endings in the shoulder capsule and labrum as examples of loose and dense fibrous tissues." *Biotech Histochem* 89(5): 355-370.
- Sameshima, H. and T. Ikenoue (2013). "Hypoxic-ischemic neonatal encephalopathy: animal experiments for neuroprotective therapies." *Stroke Res Treat* 2013: 659374.
- Thanos, P. K., J. Cho, et al. (2011). "Bromocriptine increased operant responding for high fat food but decreased chow intake in both obesity-prone and resistant rats." *Behav Brain Res* 217(1): 165-170.
- Chang, S. E., D. S. Wheeler, et al. (2012). "Effects of lesions of the amygdala central nucleus on autoshaped lever pressing." *Brain Res* 1450: 49-56.
- Arias, N., M. Mendez, et al. (2012). "Brain metabolism and spatial memory are affected by portal hypertension." *Metab Brain Dis* 27(2): 183-191.
- Kim, J. E., M. S. Shin, et al. (2013). "Treadmill exercise ameliorates motor disturbance through inhibition of apoptosis in the cerebellum of valproic acid-induced autistic rat pups." *Mol Med Rep* 8(2): 327-334.
- Schwarting, R. K. and M. Wöhr (2012). "On the relationships between ultrasonic calling and anxiety-related behavior in rats." *Braz J Med Biol Res* 45(4): 337-348.
- Spieker, E. A., R. S. Astur, et al. (2012). "Spatial memory deficits in a virtual reality eight-arm radial maze in schizophrenia." *Schizophr Res* 135(1-3): 84-89.
- Van Meer, P. and J. Raber (2005). "Mouse behavioural analysis in systems biology." *Biochem J* 389(Pt 3): 593-610.
- Navarrete, F., J. M. Perez-Ortiz, et al. (2008). "[Methods to evaluate cognitive disorders in animal models]." *Rev Neurol* 47(3): 137-145.
- Lalkovicova, M., P. Bonova, et al. (2015). "Effect of Bradykinin Postconditioning on Ischemic and Toxic Brain Damage." *Neurochem Res* 40(8): 1728-1738.
- Cohan, C. H., J. T. Neumann, et al. (2015). "Effect of cardiac arrest on cognitive impairment and hippocampal plasticity in middle-aged rats." *PLoS One* 10(5): e0124918.

- Locklear, M. N. and M. F. Kritzer (2014). "Assessment of the effects of sex and sex hormones on spatial cognition in adult rats using the Barnes maze." *Horm Behav* 66(2): 298-308.
- Nunez, J. (2008). "Morris Water Maze Experiment." *J Vis Exp*(19).
- Weitzner, D. S., E. B. Engler-Chiurazzi, et al. (2015). "Morris Water Maze Test: Optimization for Mouse Strain and Testing Environment." *J Vis Exp*(100): e52706.
- Saadati, H., S. Esmaeili-Mahani, et al. (2015). "Exercise improves learning and memory impairments in sleep deprived female rats." *Physiol Behav* 138: 285-291.
- Bohbot, V., P. Otahal, et al. (1996). "Electroconvulsive shock and lidocaine reveal rapid consolidation of spatial working memory in the water maze." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9): 4016-4019.
- Salari, M., V. Sheibani, et al. (2015). "The compensatory effect of regular exercise on long-term memory impairment in sleep deprived female rats." *Behav Processes* 119: 50-57.
- Vorhees, C. V. and M. T. Williams (2014). "Value of water mazes for assessing spatial and egocentric learning and memory in rodent basic research and regulatory studies." *Neurotoxicol Teratol* 45: 75-90.
- Motaghinejad, M., M. Motevalian, et al. (2015). "Protective effects of forced exercise against methylphenidate-induced anxiety, depression and cognition impairment in rat." *Adv Biomed Res* 4: 134.
- Tripathi, A. K. and R. H. Singh (2010). "Experimental evaluation of antidepressant effect of Vacha (*Acorus calamus*) in animal models of depression." *Ayu* 31(2): 153-158.
- Aranda, L., L. J. Santin, et al. (2006). "Supramammillary and adjacent nuclei lesions impair spatial working memory and induce anxiolytic-like behavior." *Behav Brain Res* 167(1): 156-164.
- Walf, A. A. and C. A. Frye (2007). "The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents." *Nat Protoc* 2(2): 322-328.
- Blanco, E., E. Castilla-Ortega, et al. (2009). "Effects of medial prefrontal cortex lesions on anxiety-like behaviour in restrained and non-restrained rats." *Behav Brain Res* 201(2): 338-342.
- Tanaka, S., J. W. Young, et al. (2012). "Four factors underlying mouse behavior in an open field." *Behav Brain Res* 233(1): 55-61.
- Brown, G. R. and C. Nemes (2008). "The exploratory behaviour of rats in the hole-board apparatus: is head-dipping a valid measure of neophilia?" *Behav Processes* 78(3): 442-448.
- Hajali, V., V. Sheibani, et al. (2012). "Female rats are more susceptible to the deleterious effects of paradoxical sleep deprivation on cognitive performance." *Behav Brain Res* 228(2): 311-318.
- Can, A., R. A. Blackwell, et al. (2011). "Antidepressant-like responses to lithium in genetically diverse mouse strains." *Genes Brain Behav* 10(4): 434-443.
- Yankelevitch-Yahav, R., M. Franko, et al. (2015). "The forced swim test as a model of depressive-like behavior." *J Vis Exp*(97).
- Bogdanova, O. V., S. Kanekar, et al. (2013). "Factors influencing behavior in the forced swim test." *Physiol Behav* 118: 227-239.
- Vega-Rivera, N. M., A. Fernandez-Guasti, et al. (2015). "Effect of sub-optimal doses of fluoxetine plus estradiol on antidepressant-like behavior and hippocampal neurogenesis in ovariectomized rats." *Psychoneuroendocrinology* 57: 113-124.
- Can, A., D. T. Dao, et al. (2012). "The mouse forced swim test." *J Vis Exp*(59): e3638.
- Weiss, B. (2009). "The first 83 and the next 83: perspectives on neurotoxicology." *Neurotoxicology* 30(5): 832-850.

- Kilts, T., L. Ameye, et al. (2009). "Potential roles for the small leucine-rich proteoglycans biglycan and fibromodulin in ectopic ossification of tendon induced by exercise and in modulating rotarod performance." *Scand J Med Sci Sports* 19(4): 536-546.
- Richter, M., A. Mewes, et al. (2014). "Doubly Phosphorylated Peptide Vaccines to Protect Transgenic P301S Mice against Alzheimer's Disease Like Tau Aggregation." *Vaccines (Basel)* 2(3): 601-623.
- Ji, E. S., Y. M. Kim, et al. (2015). "Treadmill exercise enhances spatial learning ability through suppressing hippocampal apoptosis in Huntington's disease rats." *J Exerc Rehabil* 11(3): 133-139.
- Pollard TD, Earnshaw, W.C., Lippincott-Schwartz, J. (2008) *Cell biology*. Saunders, Elsevier. 2nd Edición.
- Alberts B, Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) *Molecular biology of the cell.*; 4th Edicion.
- Molist M, Megias M. (2011) *ATLAS de HISTOLOGIA VEGETAL y ANIMAL*.
- Vaquero M. (2007) *Manual de Calidad Inmunohistiquímica en Anatomía Patológica*:34.
- Serrano MG, Gargiulo P. (2014) *Técnica neuroquirúrgica de estereotaxia en ratas para colocación de canulas intracerebrales*. Neurología Veterinaria.
- Xiao JJ, Yin M, Wang ZJ, Wang XP. (2015) Transplanted Neural Stem Cells: Playing a Neuroprotective Role by Ceruloplasmin in the Substantia Nigra of PD Model Rats? *Oxid Med Cell Longev*;2015:618631.
- Gage, G. J., D. R. Kipke, et al. (2012). "Whole animal perfusion fixation for rodents." *J Vis Exp* (65).
- Ross, M. H., Kaye, G.I., Pawlina, W. (2005). "Histología. Texto y atlas color con biología celular y molecular." Editorial Médica Panamericana. Madrid.
- Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Álvarez-Uría, M., Fraile, B., Anadón, R., Sáez, F.S., de Miguel, M.P. (1997). "Citología e histología vegetal y animal." Editorial McGraw-Hill-Interamericana de España S.A. Madrid.
- Hackett, M. J., F. Borondics, et al. (2013). "Subcellular biochemical investigation of purkinje neurons using synchrotron radiation fourier transform infrared spectroscopic imaging with a focal plane array detector." *ACS Chem Neurosci* 4(7): 1071-1080.
- Jordan, W. H., J. K. Young, et al. (2011). "Preparation and analysis of the central nervous system." *Toxicol Pathol* 39(1): 58-65.
- Moral, R. G. D. (1993). *MANUAL DE LABORATORIO DE ANATOMIA PATOLOGICA, S.A. MCGRAW-HILL / INTERAMERICANA DE ESPAÑA*.
- Bushlin, I., A. Gupta, et al. (2012). "Dimerization with cannabinoid receptors allosterically modulates delta opioid receptor activity during neuropathic pain." *PLoS One* 7(12): e49789.
- Reyes, B. A., N. A. Heldt, et al. (2015). "Ultrastructural evidence for synaptic contacts between cortical noradrenergic afferents and endocannabinoid-synthesizing post-synaptic neurons." *Neuroscience* 303: 323-337.
- Kaya, L., B. Meissner, et al. (2013). "Direct association of the reticulon protein RTN1A with the ryanodine receptor 2 in neurons." *Biochim Biophys Acta* 1833(6): 1421-1433.
- Carter, S. D., K. R. Mifsud, et al. (2015). "Distinct epigenetic and gene expression changes in rat hippocampal neurons after Morris water maze training." *Front Behav Neurosci* 9: 156.
- Sesack, S. R., V. A. Hawrylak, et al. (1998). "Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter." *J Neurosci* 18(7): 2697-2708.
- Torres, M. V. (2000). "Canales de potasio sensibles a glucosa en neuronas cultivadas".

Pyter, L. M. and B. J. Prendergast (2013). "Individual differences in pre-carcinogen cytokine and corticosterone concentrations and depressive-like behavior predict tumor onset in rats exposed to a carcinogen." *Psychoneuroendocrinology* 38(6): 800-807.

Christian A. García Sepúlveda, D. E. N. C. y. J. R. A. A. (2012). "Manual de Bioseguridad Para laboratorios de investigación biomédica." 5 Edición.

Martínez, L. M. "La Bitácora de Laboratorio: Instrumento de Investigación y Trabajo." Departamento de Ingeniería, Coordinación de Ingeniería Electrónica y de Comunicaciones Universidad Iberoamericana, Ciudad de México.: 4.

Camacho C, Mancilla RJ, Segura E, Castellanos CB. (2010) Manual de Procedimientos de Bioseguridad. Instituto de investigaciones biomédicas.

García CA, Sepúlveda. (2012) Manual de Bioseguridad Para laboratorios de investigación biomédica; 5 Edición.

Capítulo VII

Consideraciones para el desarrollo de una investigación con modelos animales

*Ana L. Márquez, Eduardo Padilla,
Yanet Gutiérrez, Héctor Rico & Emmanuel Díaz*

INTRODUCCIÓN

Un bioterio es el conjunto de instalaciones, muebles e inmuebles destinados al alojamiento y manutención de animales de laboratorio durante una o varias de las fases de su ciclo vital. Su diseño estará basado en la(s) especie(s) que se pretenda alojar, la calidad microbiológica de los mismos y la naturaleza de la investigación que se va a realizar, además de tomar en cuenta el número de animales que se contemple albergar en la instalación.

El cuidado y uso de animales de laboratorio en la investigación, en los procesos y procedimientos, la enseñanza y la producción adecuada, requieren juicio profesional científico basado en las necesidades de salud y bienestar los animales. El personal que trabaja en un bioterio de producción o bien de experimentación, debe demostrar la suficiente competencia, de acuerdo con las características de las instalaciones, número de animales y la naturaleza de la investigación.

De tal manera que el uso de animales para fines de investigación, enseñanza o constatación sólo se justifica cuando contribuye al desarrollo de conocimientos que beneficien a los seres humanos o a los mismos animales. Aunque la comunidad científica reconoce la necesidad de contar con investigación hecha en animales, siempre debe seguirse el principio básico resumido en la regla de las 3R's: **Reducir**, al máximo el número de ellos y, por ende, el total de animales utilizados en investigación, **Reemplazar**, siempre que sea posible el animal de experimentación por otro modelo experimental y **Refinar**, los métodos y técnicas utilizados de modo que produzcan al animal el menor sufrimiento posible.

Existen tres aspectos que desde el punto de vista ético deben ser considerados durante el cuidado y uso de los animales de laboratorio:

1. El cuidado del dolor y del sufrimiento
2. El cuidado del bienestar general del animal
3. Un Comité de cuidado y uso de los animales de laboratorio

Estas consideraciones responden a lineamientos establecidos internacionalmente por la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, del Instituto de Investigación de Animales de Laboratorio del *National Research Council*, de la Academia Nacional de Ciencias de E.U. A nivel nacional, en diciembre de 1999, el gobierno federal publicó en el Diario Oficial la Norma Oficial Mexicana sobre Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Puntos a considerar cuando se inicia con un bioterio: tipo de bioterio

Un bioterio es el conjunto de instalaciones, muebles e inmuebles destinados al alojamiento y manutención de animales de laboratorio durante una o varias de las fases de su ciclo vital; esto es, nacimiento, desarrollo, reproducción y muerte (NOM-062-ZOO-1999). Aunque existen tres tipos de bioterio: 1) Producción, 2) Experimentación y 3) Mixtos, su diseño

deberá estar basado en el número de animales albergados y la naturaleza de la investigación que se va a realizar.

Normatividad y reglamentación

El uso de los animales de laboratorio se rige por un sistema interrelacionado de reglamentos, políticas, guías y procedimientos, sin embargo, los siguientes principios se consideran fundamentales para cualquier investigación que involucre el uso de animales de experimentación (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010):

- Consideración de alternativas (sistema *in vitro*, simulación computarizada (*in-silico*), y/o modelos matemáticos) para reducir o reemplazar el uso de animales.
- Diseño y mejoramiento de los procedimientos relevantes para la salud animal y/o humana.
- Uso de especies apropiadas y número de animales.
- Reducción del malestar, estrés y dolor.
- Uso apropiado de sedación, analgesia y anestesia.
- Provisión de cuidados médicos veterinarios.
- Provisión de un transporte apropiado para los animales.
- El manejo en la experimentación en animales vivos es exclusivamente regida bajo supervisión de la calidad y la experiencia del personal.

En México, la NOM-062-ZOO-1990 establece que todas las instituciones y organizaciones que mantengan, reproduzcan o utilicen animales con fines de investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza deben hacerlo conforme a (NOM-062-ZOO-1999):

- Un programa interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Un Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de carácter institucional.
- Procedimientos de verificación, cuidado médico veterinario apropiado, prácticas aceptables de crianza animal y mantenimiento adecuado de las instalaciones que alojan animales.
- Apego a las leyes, reglamentos y normas aplicables vigentes en la localidad en donde se realicen estas actividades.

Los Comités Internos para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio tienen el propósito de promover, verificar y asegurar el cuidado humanitario de los animales utilizados en cada institución, son, por lo tanto el mecanismo institucional encargado de revisar y dictaminar todos los aspectos relativos al uso racional y al cuidado de los animales de laboratorio con fines de investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación y enseñanza, así como verificar y asegurar que las condiciones medioambientales de alojamiento se cumplan; a fin de proteger la salud y bienestar de éstos y fomentar el buen uso de los mismos (NOM-062-ZOO-1999, artículo 4.2.2).

Todos los bioterios independientemente de su tipo tienen que designar como personas encargadas a: a) Un Médico Veterinario responsable, que estará adscrito tiempo completo o tiempo parcial dependiendo del tamaño y las necesidades del bioterio y b) Un responsable administrativo que será el director o la persona que éste designe para estos fines (NOM-062-ZOO-1999).

Ética en el manejo de animales

El tema ético compete a todos los individuos pero, con mayor razón, a los involucrados en la investigación biológica, desde el auxiliar a cargo de los animales hasta el directivo de la institución productora o usuaria.

La decisión de utilizar animales en la investigación requiere de un pensamiento crítico, juicio y análisis. El uso de los animales en la investigación es un privilegio otorgado por la sociedad a la comunidad científica con la expectativa de que tal utilización proporcionará nuevos conocimientos, ya sean importantes o que conduzcan a la mejora en el bienestar humano y/o animal. La guía hace suyas las responsabilidades de los investigadores para la utilización y el cuidado de los animales vertebrados utilizados en las pruebas, investigaciones y capacitaciones. Estos principios dirigen a la comunidad investigadora a aceptar la responsabilidad por el cuidado y uso de los animales durante todas las fases de la investigación (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

Siempre que se usen animales en investigación, se debe considerar que un objetivo tan importante como el de obtener resultados experimentales, sea el de minimizar cualquier dolor o angustia que dichos animales puedan sufrir. El refinamiento de los procedimientos para conseguir que estos no causen sufrimiento debe ser parte integrante de toda investigación científica. Esto es importante tanto desde el punto de vista de la preocupación humanitaria como para cumplir con los requisitos de la legislación sobre animales de investigación. Se deberán adoptar medidas para garantizar que los animales de laboratorio sean tratados con ética y alta calidad científica de acuerdo a programas con atención humanitaria; y con la creación de un entorno de laboratorio en el que se valoran los cuidados humanos y el respeto por los animales (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

Los investigadores que trabajen y experimenten con animales están moralmente obligados a manifestarles tres tipos de actitudes: *respeto*, *afecto* y *gratitud* (Fuentes F.M., 2008).

Respeto: por tratarse de seres vivos sensibles, que podrían experimentar sufrimiento e incluso terminar perdiendo la vida, por lo que debe tratárseles con todas las consideraciones que el caso merece.

Afecto: considerándolos partícipes con nosotros, del misterio de la vida.

Gratitud: reconocimiento por la importante ayuda al constituirse nuestros más íntimos colaboradores.

Así mismo, se puede decir que la investigación biomédica en animales es éticamente aceptable, si se sigue el principio de las tres R de la experimentación humanizada para con los animales, propuesta por William Russell (zoólogo y psicólogo) y Rex Burch (microbiólogo) en 1959: *Reducir*, *Reemplazar* y *Refinar* (Fuentes F.M., 2008).

El principio de las Tres "R" representa un método práctico para la aplicación de los principios para los investigadores, se aplican cuando se considera la Reducción a que se refiere Refinamiento y estrategia práctica de Reemplazo experimental con los animales de laboratorio (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

Reducir, al máximo el número de ellos y, por ende, el total de animales utilizados en investigación (Fuentes F.M., 2008). Reducción implica estrategias para el uso de menos

animales y/o maximizar la información obtenida a partir de un determinado número de animales (sin aumentar el dolor) para que a largo plazo se necesiten menos animales para la misma información científica. Este enfoque se basa en un análisis cuidadoso del diseño experimental, de las aplicaciones de las nuevas tecnologías, el uso de área de vivienda y de estudios estadísticos apropiados, a la variabilidad en los métodos relacionados con los animales y el control del medio ambiente (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

Reemplazar, siempre que sea posible el animal de experimentación por otro modelo experimental, cuando no resulte imprescindible el uso de animales (Fuentes F.M., 2008). Reemplazar se refiere al método que evite el uso de los animales. El término incluye reemplazos absolutos (es decir, sustitución de los animales con los sistemas inanimados tales como programas de ordenador); así como reemplazos relativos (es decir, sustitución de los animales vertebrados por animales con escala filogénica más baja) (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

Refinar, los métodos y técnicas utilizados de modo que produzcan al animal el menor sufrimiento posible (Fuentes F.M., 2008). Refinamiento se refiere a las modificaciones de la cría o procedimientos experimentales que nos ayuden a mejorar el bienestar animal y minimizar o eliminar el dolor y la angustia. Las instituciones y los investigadores deben de tomar todas las medidas razonables posibles para eliminar el dolor y la angustia a través del refinamiento; también deben de entender que algunos tipos de estudios pueden producir dolor. Estos estudios experimentales previstos o no, pueden ser eliminados con base a los objetivos del estudio (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

El refinamiento y la reducción de metas deben de ser equilibrados. Los investigadores principales son fuertemente desalentados en la reutilización de los animales como una estrategia de reducción, y la reducción no debe ser opcional en la experimentación para la reutilización de un animal o animales que ya han sufrido especialmente si el bienestar de los animales está comprometido en los procedimientos. Los estudios que pueden resultar en dolor o alteraciones significativamente graves o crónicas en las capacidades de los animales para mantener su fisiología normal, o adecuadamente responden a factores de estrés, deben incluir una descripción de los puntos finales humanos adecuados a proporcionar una justificación basada en la ciencia para no usarse en el humano. La consulta veterinaria debe ocurrir cuando el dolor o la angustia está más allá del nivel previsto en el protocolo de descripción o cuando el control del intervencionista es posible (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

En la práctica, el cuidado de los animales de laboratorio recae en varias personas, pero legalmente y dependiendo de las leyes del país donde se lleve a cabo el estudio, la responsabilidad final con frecuencia recae en el investigador principal que esté realizando el procedimiento científico (Fuentes F.M., 2008).

Diseño del bioterio: localización y ubicación

Las instalaciones destinadas para el alojamiento de animales de laboratorio, serán diseñadas de acuerdo con las necesidades de los sujetos experimentales, de los usuarios y del personal que interviene en su cuidado diario. El diseño deberá facilitar su limpieza, mantenimiento y evitar la entrada de fauna nociva. A su vez, no debe existir comunicación directa con casa habitación u otro tipo de establecimiento.

Los criterios de diseño de las instalaciones para animales de laboratorio deberán ser sancionados mediante la opinión calificada de un Médico Veterinario, a fin de asegurar y favorecer niveles satisfactorios de cuidado animal (NOM-062-ZOO-1999).

Los bioterios que se encuentran en recintos interiores, independientemente de su uso, función y especies animales que alojen, podrán ser construidos en un segmento, ala, nivel o espacio físico del edificio o terreno de la institución responsable de su funcionamiento, con la previsión de que éstos mantengan una independencia física efectiva que asegure tanto una operación eficiente como libre de variaciones indeseables que afecten la respuesta experimental del sujeto. Por lo que las áreas destinadas al alojamiento animal deberán ubicarse en forma independiente a las de ocupación humana, con el fin de asegurar una operación higiénica y favorecer la salud y el confort de ambos (NOM-062-ZOO-1999).

Independientemente del tipo de bioterio, su localización y diseño, El monitoreo de las condiciones ambientales en los espacios de los animales y otras áreas ambientalmente sensibles en la instalación deberán estar consideradas. Son aconsejables los sistemas de monitoreo automatizados que notifican al personal responsable a distancia y en tiempo real, de las condiciones ambientales prioritarias como temperatura, humedad, inyección y extracción de aire, etc., incluso incendio o ruido excesivo, para evitar la pérdida de animales o cambios fisiológicos radicales, como resultado de un mal funcionamiento del sistema. La función y la precisión de tales sistemas deben ser verificadas periódicamente (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

Especificaciones de diseño y acabados sanitarios

Los bioterios deberán estar provistos con acabados sanitarios que primariamente favorezcan la higiene como medio de prevención o diseminación de enfermedad, de acuerdo con el criterio veterinario.

Pisos: Los pisos deberán ser resistentes a la humedad, al impacto, no absorbentes, y relativamente suaves. Ser fáciles de reparar y resistentes tanto a la acción de la orina y otros materiales biológicos y los efectos adversos de agua y agentes de limpieza calientes. Deberán ser capaces de permitir y soportar el paso de anaqueles y equipos sin agrietarse. Dependiendo de su uso, los pisos deberán ser monolíticos o tener un número mínimo de juntas. Algunos de los materiales que pueden ser utilizados son las resinas epóxicas, el concreto de superficie dura sellada, el metacrilato de metilo, poliuretano, y agregados especiales a base de caucho. Estos últimos son útiles en áreas donde la reducción de ruido es importante. La instalación correcta es esencial para garantizar la estabilidad a largo plazo de la superficie (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010). Deberán poseer una pendiente apropiada cercana al 2% y una superficie lisa, que evite la formación de charcos de agua u orina. Los encuentros de pared-piso deberán contar con un zoclo sanitario que evite la anidación de insectos y basura (NOM-062-ZOO-1999).

Paredes y techos: Las paredes y los techos deberán ser lisos, resistentes a la humedad, no absorbentes, resistente al daño por impacto y libres de grietas. Los materiales de superficie de deberán ser capaces de resistirla limpieza con detergentes y desinfectantes además del impacto del agua a alta presión (por ejemplo con agregados de tipo epóxico de colores claros). El uso de bordillos, barandillas o parachoques y protectores para las esquinas se pueden considerar para proteger las paredes y las esquinas de los daños, pero tales artículos deben ser sólidos y sellados para impedir el acceso o refugio de fauna nociva. Los techos formados por la losa de concreto son satisfactorios si son de superficie lisa,

están sellados y pintados. Los techos falsos (plafones) son generalmente indeseables en locales de alojamiento de los animales a menos que estén sellados desde el espacio por encima de las juntas y los clips. Cuando se usan, deberán estar fabricados de materiales impermeables, tener una superficie lavable, y estar libre de uniones imperfectas. La plomería expuesta, conductos, y artefactos de iluminación son indeseables a menos que las superficies se puedan limpiar fácilmente. En cuanto a las lámparas se recomiendan modelos herméticos para evitar acumulen polvo o albergue de insectos. (NOM 062-ZOO-1999 y Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

Puertas y ventanas: Las puertas deberán ser lo suficientemente grandes (aproximadamente 1.06 m x 2.13 m) para permitir el paso fácil de los anaqueles y equipos, además de encajar perfectamente en sus marcos para evitar la entrada de fauna nociva, así como como la fuga de animales al exterior. Las puertas deberán estar construidas o recubiertas con materiales que resistan la corrosión (ver figura 1a). Son preferibles las puertas de cierre automático equipadas con asas empotradas o blindadas, barridos y rodapiés. Por razones de seguridad, las puertas deberán ser diseñadas para abrir desde el interior sin llave. Los recintos interiores para el alojamiento de animales de laboratorio no podrán tener ventanas colindando con el exterior, dado que ello impacta desfavorablemente en la definición ambiental o en las condiciones medio ambientales que pueden afectar los experimentos. Si se considera importante contar con puertas con ventanas de visualización para la seguridad y otras razones (monitor de calidad), se podrá considerar la posibilidad de cubrir estas ventanas (en el caso de colinden con un pasillo de iluminado permanentemente) para no perturbar el ritmo circadiano de los animales (NOM-062-ZOO-1999 y Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

Pasillos: Los pasillos deberán comunicar de manera eficiente con las diferentes secciones del bioterio. La altura y el ancho deberán permitir el paso holgado del equipo y del personal; una anchura de 1.8 a 2.4 m puede adaptarse a las necesidades de la mayoría de las instalaciones. Las uniones piso-pared deberán estar diseñadas para facilitar la limpieza y sanitización regular. Los corredores que conduzcan a zonas de gran ruido (secciones de lavado, alojamiento de perros o primates u otros) deberán contar con trampas de ruido (por ejemplo vestíbulos de entrada de doble puerta) que procuren la estabilidad ambiental. Estos vestíbulos de entrada de doble puertas (o esclusas) permiten también bolsas de aire en éstas y otras áreas en las que el flujo de aire direccional es fundamental para la contención o protección microbiológica. Se recomienda que los pasillos permanezcan libres de insumos, artículos diversos, etc. por razones de seguridad en caso de evacuación. Siempre que sea posible, las tuberías de agua, desagües, bobinas de recalentamiento y válvulas, conexiones de servicios eléctricos, y otros servicios públicos deberán ser accesibles a través del espacio intersticial o por medio de paneles de acceso y persecuciones en los pasillos fuera de los cuartos de los animales. Las alarmas de incendio, extintores, y los teléfonos deberán estar empotradas, instalados lo suficientemente altos, o protegidos por guardias de protección para evitar daños por el movimiento de los equipos grandes (NOM-062-ZOO-1999) (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

Tubería y maquinaria: Las tuberías de las instalaciones deberán identificarse de acuerdo con el material que transporten, de conformidad con los códigos de colores estipulados en la NOM-026-STPS-2008. Las líneas correspondientes a servicios diversos, eléctricos o hidráulicos deberán colocarse en los corredores de circulación, para evitar que sean atendidos en el interior de los cuartos o salas. Las líneas de desagüe deben contar con hasta 18 cm de diámetro. Cada cuarto de animales deberán contar con instalaciones de luz eléctrica y contactos que cumplan con lo dispuesto en el Reglamento de la Ley de la

Comisión Federal de Electricidad. Los contactos eléctricos no deben ser colocados en sitios donde puedan ser salpicados por líquidos de cualquier origen, debiendo colocarse a 1.20 m de altura del nivel del piso, o estar suspendidos del techo. En caso de que las instalaciones cuenten con una sala de máquinas, ésta deberá estar independiente de las áreas de alojamiento animal, evitando con ello que las vibraciones o ruidos indeseables pudiesen afectar la definición ambiental del bioterio (NOM-062-ZOO-1999).

Control del medio ambiente

La temperatura, la humedad, la ventilación, la intensidad de la luz, el ruido y otras variables del cuarto de los animales es el llamado macroambiente.

El medio ambiente deberá ser objeto de máxima atención para el animal de laboratorio, a fin de evitar que aun pequeñas variaciones de éste afecten negativamente la respuesta experimental. Dichas condiciones deberán ser registradas en una bitácora o formato destinado para ello. A continuación se describen las recomendaciones para el control del medio ambiente en las áreas de animales.

Temperatura y humedad relativa: El mantenimiento de la temperatura corporal dentro de la variación circadiana normal es necesario para el bienestar animal. Ésta deberá ser controlada y monitoreada permanentemente (ver figura 1b). Los animales deberán estar alojados dentro de los rangos de temperatura y humedad adecuadas para la especie, para garantizar un mínimo de estrés y alteración fisiológica. La exposición a fluctuaciones de temperatura y humedad extremos de pueden resultar en cambios en el comportamiento o alteraciones fisiológicas que podrían afectar negativamente el bienestar animal así como los resultados de los protocolos de investigación (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010). Las instalaciones de animales de laboratorio ya sean para reproducción o experimentación, deberán mantener una temperatura estable dentro de los cuartos, misma que oscilará de acuerdo a lo establecido para la especie animal (ver tabla 1) (NOM-062-ZOO-1999) y proveer una humedad relativa entre el 40 y 70% el cual se considera un rango aceptable para la mayoría de especies de mamíferos.

Tabla 1. Temperatura y humedad para los cuartos de animales

Animal	Temperatura (°C)	Humedad Relativa (%)
Ratón, rata, hámster, jerbo, cobayo y conejo	18-26	40-70
Perro, gato, primates no humanos	18-29	40-70
Porcinos	16-27	40-70

Ventilación: El propósito principal de la ventilación es proporcionar la calidad del aire adecuada y un entorno estable. En concreto, la ventilación proporciona un suministro adecuado de oxígeno; reduce olores, elimina cargas térmicas causadas por los animales, el personal, las luces y los equipos; diluye los contaminantes gaseosos, partículas incluyendo alérgenos y patógenos en el aire; ajusta el contenido de humedad y la temperatura del aire de la habitación (ver figura 1c). El suministro de 10 a 15 cambios de aire fresco en los cuartos de animales es una guía aceptable para mantener la calidad del aire en las condiciones macro y micro ambientales (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010). Sin embargo, este rango no toma en cuenta las posibles cargas de calor, la especie, el tamaño y el número de animales implicados, el tipo de recinto, la frecuencia de cambio de las jaulas, las dimensiones de la sala, o la eficiencia de la distribución del aire tanto en el macro y micro ambiente por lo que se recomienda que los recambios de aire ambiental cubran un rango mínimo de 15 a 18 recambios de aire por hora. Este sistema debe funcionar ininterrumpidamente las 24 horas del día, a fin de favorecer

una definición ambiental aceptable que no afecte negativamente la salud animal y la respuesta experimental (NOM-062-ZOO-1999).

Iluminación: En general, la iluminación deberá ser difundida a lo largo de las áreas de confinamiento de los animales y proporcionar iluminación suficiente para el bienestar de los animales, al tiempo que permite buenas prácticas de limpieza, una adecuada inspección de animales e incluso condiciones de trabajo seguras para el personal. La luz en las áreas de alojamiento de los animales se debe prever una adecuada visión y regulación neuroendocrina de los ciclos diurnos y circadianos. El fotoperiodo es un regulador crítico de la conducta reproductiva de muchas especies animales por lo que la exposición a la luz durante el ciclo de oscuridad deberá ser minimizado o evitado (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

Las instalaciones estarán iluminadas mediante luz artificial tipo luz de día usando lámparas fluorescentes o de tipo LED (ver figura 1d y f). Mientras que el control de los ciclos de luz se efectuará por medio del uso de relojes interruptores automáticos (ver figura 1 c), ajustados de acuerdo con las necesidades de los animales en cuestión. La intensidad lumínica no deberá exceder de 1,345 lúmenes para el desarrollo de tareas generales de limpieza, observación y registro dentro de los locales. Sin embargo, deberá considerarse la recomendación de mantener 300 lúmenes de intensidad lumínica, para áreas de alojamiento de roedores. (NOM-062-ZOO-1999). Una luz demasiado intensa puede ocasionar degeneración en la retina de especies albinas (ALAT, 1999).

Ruido: Los efectos del ruido en los animales dependerán de la intensidad, la frecuencia, la rapidez de inicio, duración, y el potencial de las vibraciones del sonido y el rango de audición de los animales albergados. Es por ello que las instalaciones deberán contar con dispositivos de contención y control de ruido en equipos rodables, carros de servicio y en áreas que generan ruidos excesivos (por ejemplo el área de lavado). Se recomienda que la intensidad de ruido no sea mayor a 85 dB. Si bien este control puede ser alcanzado mediante buenas prácticas de cuidado animal y la orientación del personal de apoyo el ruido producido por los animales y las actividades de cuidado de los animales es inherente a la operación de una instalación para animales por lo que el control de ruido deben ser considerados desde el diseño de instalaciones. Para ello se podrán colocar aislantes sonoros entre los muros que separan los cuartos de animales, separar las áreas humanas y animales para minimizar las perturbaciones a los ocupantes de la instalación, y que espacios para animales ruidosos como perros, cerdos o primates no humanos, se encuentren lejos de los animales más tranquilos, como los roedores, conejos y gatos (NOM-062-ZOO-1999) (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010). Además es importante considerar que algunas especies vocalizan sonidos de alta o baja frecuencia, y por lo tanto pueden comunicar estímulos a otros animales que se encuentran en otras áreas ocasionando estrés innecesario (Turner, 2007).

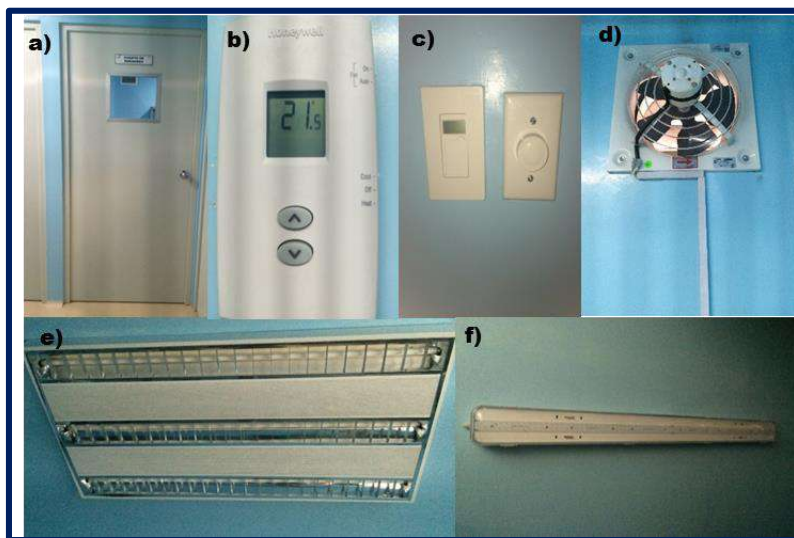


Figura 1. Especificaciones de diseño para el control del medio ambiente. Donde se muestran imágenes representativas para el diseño de espacios y el control del medio ambiente. Puerta para el cuarto de roedores (a), termómetro para el registro de la temperatura (b), reguladores de la intensidad de la luz y un programador automático para el fotoperiodo (c), ventilador para el recambio de aire (d), lámpara fluorescente para el cuarto de procedimientos (e) y lámpara LED para el cuarto de los animales (f).

Áreas para animales

En general todo bioterio deberá contar con algunos sectores básicos, que aseguren el alojamiento animal, la separación física de especies o su aislamiento y la experimentación. A continuación se enlistan las principales áreas para animales (NOM-062-ZOO-1999):

Recepción de animales: Este sector deberá constituir un espacio independiente del resto de las áreas de animales y será destinado a dar alojamiento a aquellos sujetos de nueva adquisición, evitando así el contacto de éstos con los de colonias ya establecidas y la posible transmisión de enfermedades. En sus dimensiones se deberá contemplar las acciones inherentes al manejo, acomodo y control de los sujetos involucrados, así como para permitir una operación higiénica e independiente para cada especie animal alojada. Todos los animales deberán tener su información que describa el estatus microbiológico y genético que poseen. (NOM-062-ZOO-1999).

Esto quiere decir que todos los animales adquiridos por compra o donación y que serán utilizados como animal de laboratorio, deberán ir acompañados de este documento que certifica las condiciones de salud y calidad en que se produjeron, criaron y mantuvieron hasta antes de su salida del lugar de origen. Este documento se conoce como “certificado de salud y calidad animal” y es el documento que acredita la calidad sanitaria de los animales, producidos o adquiridos, mediante estudios adecuados que certifiquen la ausencia de enfermedades que puedan interferir con los resultados experimentales. En éste sentido siempre se desalentará el recibir donaciones de animales de otras instalaciones que su finalidad no sea la producción de animales de alta calidad, ya que es sumamente difícil que tengan dicha información.

Cuarentena y acondicionamiento

El período de cuarentena es un período de aislamiento y evaluación intensiva de la salud de los animales. Puede variar de algunos días o semanas hasta meses dependiendo de la especie. Durante éste periodo no se deberán aplicar procedimientos experimentales en los

animales. Es importante considerar que como no se sabe con certeza la salud de los animales, primero se deberán atender a los animales residentes y al final a los de cuarentena.

El espacio físico para tal fin deberá ser un sector específico e independiente para este propósito, el cual debe evitar el contacto con colonias ya establecidas y la posible transmisión de enfermedades. Sus dimensiones dependerán de la cantidad y variedad de animales adquiridos de fuentes externas. Este cuarto deberá permitir la separación física de especies y la realización de evaluaciones y tratamientos cuarentenarios, indispensables para favorecer un periodo de acondicionamiento óptimo en los animales, previo a su uso experimental, durante el cual se logra su estabilización y se familiarizan con sus nuevas instalaciones (NOM-062-ZOO-1999).

Este periodo no es menor de 15 días. Todos los días se deberán observar a los animales, para detectar cambios de comportamiento, enfermedades, heridas o muerte.

Cuartos para mantenimiento de animales: Se considerarán cuartos de mantenimiento a aquellos espacios en los que los animales de laboratorio se alojen por 24 horas o más (NOM-062-ZOO-1999). Las diferentes especies de animales de laboratorio deberán ser alojadas en cuartos independientes (por ejemplo: cuarto de ratones, ratas y conejos) (ver figura 2a y b). Cada área deberá estar acondicionada de acuerdo a los requerimientos de humedad y temperatura por especie, tamaño, etc. y además dependerá de las necesidades de cada bioterio. No es recomendable realizar la manipulación experimental de los animales, recolección de fluidos corporales o necropsias, identificación, preparación quirúrgica u otras actividades que alteren el bienestar de otros sujetos alojados en este espacio. Para estos fines, los animales deberán ser trasladados a un área específica del bioterio y en la medida de lo posible lo más alejada de los otros cuartos de albergue (ver “cuarto de procedimientos diversos”).

En algunos bioterios se podrá considerar con adicionar cuartos de mantenimiento especiales para el alojamiento y/o aislamiento de sujetos inoculados con radioisótopos, agentes infecciosos, sustancias tóxicas o bien animales inmunocomprometidos, éstos deberán ser manipulados en áreas acondicionadas para éstos fines (ver “Áreas especializadas>Bioseguridad”).

Cuarto para procedimientos diversos: Es un área destinada para la manipulación experimental de animales como identificación, pesaje, administración de sustancias, recolección de fluidos, eutanasia, necropsias, preparación quirúrgica u otros. Deberá contar con el equipamiento necesario de acuerdo a los procedimientos que así lo requieran como mesetas, tarja, balanza, etc. (ver figura 2c).

Áreas de apoyo

La naturaleza de la actividad y las necesidades de la institución, definirán las áreas específicas de apoyo a la operación que éstos deberán poseer. Es importante considerar que todo bioterio deberá contar además de las instalaciones para animales descritas anteriormente, con sectores básicos de apoyo a la operación. A continuación se enlistan las principales áreas de apoyo (NOM-062-ZOO-1999):

Área de administración y control del bioterio: Es el sector de control de la operación, que permitirá el espacio donde se procesarán y tomarán decisiones de todos los aspectos relacionados con el trabajo diario del bioterio. En este espacio se archivarán todos los registros y formatos referentes a los procesos y procedimientos relacionados con las

actividades que se efectúen en la instalación como por ejemplo, certificados de salud, los registros de las condiciones ambientales, la relación de equipo, la relación de personal involucrado en el manejo de los animales, así como también el registro de animales en cuarentena y en experimentación, así como la relación de procedimientos experimentales que se efectúen en el bioterio (NOM-062-ZOO-1999).

Áreas de descanso y vestidores para el personal: Es un sector independiente que permitirá al personal descansar y tomar sus alimentos. Deberá contar con regaderas provistas de agua corriente fría y caliente, así como sanitarios que permitan una operación de máxima higiene y seguridad en el trabajo según lo dispuesto en la NOM-018-STPS-2000. Las instalaciones contarán con lavabos provistos de agua corriente, jabón, toallas desechables o secadores de aire y un bote de basura. De existir más de siete trabajadores en el establecimiento, se deberá contar con un mínimo de dos excusados. En el caso de servicios sanitarios que carezcan de ventilación natural, se proveerán de extractores de aire (NOM-062-ZOO-1999).

Depósito y eliminación de desechos: Esta área deberá estar localizada de manera independiente a las áreas de alojamiento animal y estar equipada con refrigeradores y/o congeladores y otros equipos, de acuerdo con la necesidad de mantener un manejo higiénico de la misma. Los desechos tales como cadáveres, órganos o sus partes, tejidos, líquidos corporales, materiales punzocortantes, jeringas y agujas hipodérmicas, entre otros, considerados residuos peligrosos biológico-infecciosos, serán manejados y eliminados de acuerdo con la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Los desechos de los bioterios que no son contaminantes o biológicos infecciosos, podrán depositarse en los contenedores de basura municipal (NOM-062-ZOO-1999).

Área de lavado: Deberá estar localizada de forma independiente a las áreas de alojamiento animal, evitando que el ruido generado en ésta disturbe secciones de ocupación animal o humana. Contará con el equipo necesario para satisfacer los requerimientos de limpieza y desinfección del bioterio (tarja para el lavado de jaulas, filtro de agua, material para la sanitización, accesorios de limpieza, etc.) (ver figura 2d).

Almacén de equipo y accesorios: Es un espacio destinado para el almacenamiento de jaulas, bebederos y accesorios de uso rutinario por ejemplo, guantes, tubos para muestras biológicas, jeringas, cubrebocas, etc.

Almacén de consumibles: es un almacén para guardar el material de cama limpia, como viruta de madera u otros de los animales de bioterio. Este depósito pudiera ser utilizado conjuntamente para el almacenamiento del alimento siempre que se mantenga una independencia efectiva (a prueba de fauna nociva y contaminación) a fin de evitar la infestación con roedores silvestres.

El alimento para todas las especies deberá estar libre de aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes (excepción de que el diseño experimental lo requiera). Deberá estar dentro de su periodo de caducidad y ser almacenado en un área seca sobre tarimas o en contenedores. El espacio destinado para tal fin también deberá de carecer de ventanas.



Figura 2. Cuartos para el mantenimiento de animales y de apoyo. En la imagen se muestra un cuarto para el mantenimiento de conejos con (a), un cuarto para el mantenimiento de ratones con cajas para el confinamiento primario de los animales (b), y dos áreas de apoyo: el cuarto de procedimientos generales (c), y el cuarto de lavado con una tarja para el lavado de las cajas y materiales (d).

Áreas especializadas

De manera adicional a las áreas descritas anteriormente, un bioterio podrá contar con diversas áreas especializadas de acuerdo a su naturaleza y carga de trabajo. Es recomendable que estas áreas hayan sido contempladas en el diseño inicial del bioterio para evitar modificaciones mayores en la infraestructura que pudieran poner en riesgo la ejecución de que estudios que están en curso. En el caso de crecimiento no programado, se deberá contar con un plan de contingencias para asegurar el bienestar animal. A continuación se describen tres principales áreas especializadas con las que podrá contar un bioterio:

Cirugía: es un sector del bioterio destinado y equipado para el empleo de técnicas quirúrgicas con sobrevivencia del animal en condiciones asépticas. Sus dimensiones y equipamiento estarán en función de las necesidades de la institución. Si se realiza cirugía mayor con supervivencia del animal, se recomienda la existencia de un quirófano bajo la NOM-016-SSA3-2012. Otras cirugías sólo requieren técnicas asépticas. Si no hay sobrevivencia sólo se sugieren técnicas “limpias” (NOM-062-ZOO-1999).

Ésta área requiere además dos espacios complementarios, uno destinado a la preparación quirúrgica (ver “cuarto de procedimientos diversos”), la cual deberá contar con por ejemplo, mesa de cirugía (acorde a la especie), máquina de anestesia inhalada, vitrina con llave para el resguardo de anestésicos y analgésicos, tapetes térmicos, etc. y otro para los cuidados post-operatorios (o recuperación) destinada y equipada de acuerdo con las necesidades de atención de sujetos sometidos a procedimientos invasivos, de conformidad con el criterio veterinario.

Histopatología: Esta es un área con la que podrá contar un bioterio, sus dimensiones y equipamiento dependerá de la carga de pruebas o análisis que realice. Usualmente el proceso de estudio histopatológico en estudios que requieren el uso de animales de experimentación, consta de un análisis macroscópico de tejidos durante la necropsia, la selección y procesamiento de muestras (proceso histotécnico) y un análisis microscópico de los tejidos. Esta área podrá estar equipada con aquellos equipos e instrumentos que faciliten tanto el procesamiento como en análisis de tejidos, como por ejemplo: baño de flotación con fondo negro con temperatura mínima de 37°C, campana de extracción, histoquinete y/o recipientes para procesamiento manual de tejidos, microscopio binocular

con objetivos: seco débil, seco fuerte, microscopio estereoscópico, micrótomo con accesorios, platina caliente, surtidor de parafina y/o recipiente para fundición de parafina, entre otros.

Prácticas generales en la experimentación animal: confinamiento primario

El confinamiento primario o microambiente, es el ambiente físico inmediato que rodea al animal, está limitado por el perímetro de la jaula o caja, el confinamiento primario debe garantizar la salud y bienestar de los animales, permitirles movimientos y adopciones de posturas normales, así como condiciones de higiene y de protección contra insectos, roedores silvestres y otras plagas.

El microambiente lo conforman la caja o jaula, el alimento, el agua, así como el mantenimiento de las condiciones de higiene de cada uno de ellos. Específicamente en ratas y ratones, estos se alojan en cajas o jaulas especialmente diseñadas para facilitar su bienestar, que en la gran mayoría son de plástico (polipropileno, policarbonato, poliestireno y polisulfonato), provistas de tapas de acero inoxidable con o sin filtro (ver figura 3).

La principal ventaja de las jaulas de policarbonato es que resisten la esterilización en autoclave y a la mayoría de desinfectantes, otra ventaja del policarbonato es que son transparentes y permiten observar a los animales más fácilmente, sus desventajas es que son relativamente más caras y además el material es muy rígido, por lo que no resiste golpes o caídas accidentales.

Para el caso del polisulfonato las ventajas son que también es un material para autoclavar, y son muy flexibles y resisten caídas y golpes fuertes, sus principales desventajas es que son relativamente caras, el material es opaco y no permite visualizar fácilmente a los animales.

El poliestireno y el polipropileno son materiales más o menos económicos, aunque poco resistentes al manejo continuo, además de que no se pueden esterilizar en autoclave.

La altura de las paredes de las cajas para roedores no debe ser menor de 12,7 cm. (Gordon., 1993).

Las jaulas deberán tener las siguientes características:

- Proporcionar espacio adecuado, ser cerrado, seguro y protegerlo de las amenazas externas.
- Ser adecuado en ventilación.
- Ser resistente al lavado, desinfección y esterilización frecuente.
- Permitir la observación del animal.
- Tener pisos y paredes fáciles de limpiar (superficies lisas) y con tapa removible de rejillas o perforada.
- Mantenerse en buenas condiciones de uso.
- Facilitar el acceso de los animales al agua y alimento.
- No presentar bordes cortantes o proyecciones que puedan causar lesiones.

En los encierros primarios por lo general la temperatura, humedad y concentración de gases y partículas a menudo son más altas que en el macroambiente (Gamble y Clough, 1976). Las condiciones microambientales pueden inducir cambios en los procesos metabólicos y fisiológicos o alteraciones en la susceptibilidad a enfermedades (Fullerton, 1982).

Los encierros primarios aceptables deben permitir:

- Satisfacer las necesidades fisiológicas y de conducta de los animales incluyendo la micción y la defecación, el mantenimiento de la temperatura corporal, los movimientos normales y postura, y cuando esté indicado la reproducción.
- Las interacciones sociales entre individuos de la misma especie y el establecimiento de jerarquía dentro del encierro o entre encierros.
- Que los animales permanezcan limpios y secos (de acuerdo con los requerimientos de las especies).
- Una ventilación adecuada.
- El acceso de los animales al agua y alimento, y también brindar facilidades para el lleno, relleno, cambio, servicio y limpieza de los utensilios con los cuales se proporcione el agua y el alimento.
- Tener un medio ambiente seguro, que impida el escape de los animales o el entrapamiento de sus apéndices entre superficies opuestas o en aberturas estructurales.
- La ausencia de bordes cortantes o proyecciones que puedan causar lesiones a los animales.
- Permitir la observación de los animales con la mínima molestia para ellos.

Los encierros primarios deberán construirse con materiales que permitan una fácil limpieza. Deberán tener superficies lisas, impermeables, con el mínimo de rebordes o sobresalientes, ángulos, esquinas y superficies que se traslapen, de tal manera que la acumulación de suciedad, desechos y humedad se reduzcan al mínimo y sea posible una limpieza y desinfección satisfactoria. Deberán estar contruidos con materiales durables que resistan la corrosión y que soporten la manipulación ruda sin desportillarse, cuartearse u oxidarse (Institute of Laboratory Animal Resources, 2010; Van Zutphen, 2001).

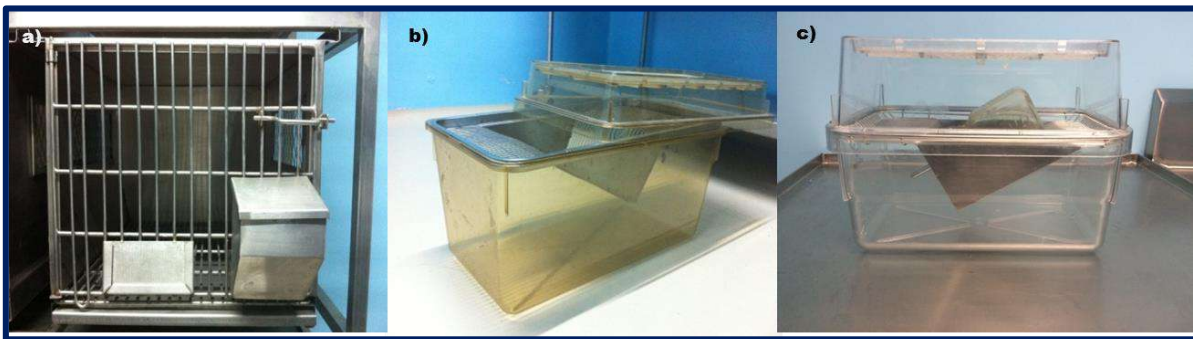


Figura 3. Confinamiento primario de animales de laboratorio. En la imagen se muestra una jaula representativa para el confinamiento primario de conejos (a), ratas (b) y ratones (c) las cuales cumplen con las especificaciones de área de acuerdo a la tabla 2.

Recomendaciones de espacio (densidad animal). El número de animales por jaula estará en relación con el tamaño corporal del animal (edad del, estado pre y postnatal) (ver tabla 2) evitándose la sobrecarga. El tamaño de las jaulas o cajas deberá ser el apropiado; por ejemplo, en el caso de ratones adultos, se requiere una superficie mínima de 80 cm por animal. El requerimiento mínimo es que el animal disponga de espacio suficiente para moverse, para expresar las posturas normales de conducta y sociabilidad, el animal deberá tener fácil acceso al agua y alimento y deberá tener un área suficiente con material de cama limpio y sin obstáculos para moverse y descansar. En el siguiente cuadro tabla se presentan las recomendaciones del espacio asignado a roedores.

Tabla 2. Espacio mínimo para roedores de laboratorio mantenidos en jaula o caja

ANIMAL	PESO EN GRAMOS	ÁREA DE PISO POR ANIMAL EN cm ²	ALTURA EN cm DEL PISO AL TECHO DE LA JAULA O CAJA
Rata	< 100	110	18
	100 – 300	187	20
	300 – 400	258	20
	400 – 500	387	20
	>500	452	20
Ratón	<10	39	12
	10 - 15	52	12
	15- 25	78	12
	>25	97	12
Hámster	<60	65	18
	60 – 80	84	18
	80 – 100	103	18
	>100	123	18
Cobayo	<350	387	18
	>350	652	18

Modificado de NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Lecho o cama. La selección de la caja adecuada y del material de cama dependerá de los objetivos del estudio, la disponibilidad y el costo (Zuñiga y Miloco, 2001). Se deberá contar con las especificaciones de calidad de la viruta para su adquisición.

Los lechos serán de material absorbente tal como la viruta de madera o algún otro material inerte (ver figura 4a). La viruta más adecuada es la que contenga concentraciones mínimas de resinas o aceites, ya que esto evita irritación crónica de las vías respiratorias altas en los animales (no se recomienda el uso de viruta procedente de cedro, caoba o pino) y que provea una capacidad de absorción adecuada, aunque el material de cama podrá ser de viruta de madera o tiras de papel, es recomendable que este material sea previamente esterilizado. En ocasiones se utiliza un inserto sobre el material de cama, en el piso de la caja, evitando la acumulación de amoníaco (Raynor, 1983).

Se recomienda que ésta se adquiera en empresas con certificaciones de calidad comprobada. Por lo contrario siempre se desalentará el adquirir cama procedente de madererías o carpinterías, ya que son una fuente potencial de ingreso de patógenos a la instalación.

Agua de Bebida. El agua deberá ser potable y suministrarse libremente durante toda la vida del animal y podrá ser dispensada en frascos bebederos de vidrio o de policarbonato. Preferentemente el agua deberá ser esterilizada mediante autoclave o por métodos de filtración. El agua deberá ser renovada en forma total, diariamente o cada dos días, eliminando todo contenido residual del frasco de bebida. Los frascos de bebida deberán ser lavados y desinfectados por lo menos una vez por semana, los pipetores o bebederos serán lavados con cepillo periódicamente para evitar el taponamiento. Deberán contener un pipetor de acero inoxidable con balín y cerciorarse de que se encuentre en buenas condiciones para evitar que se derrame el agua en la caja (ver figura 4b). Se recomienda la realización de análisis microbiológicos de manera periódica, para asegurar que la calidad del agua sea aceptable y no influya en los resultados experimentales. El personal encargado de los animales deberá estar consciente en todo momento de una disminución en el consumo de agua, que puede evidenciar junto con la condición corporal de los animales, signos de enfermedad o de un suministro de agua defectuoso.

Alimento: Dietas y Requerimientos. La nutrición es determinante en los estados sucesivos de crecimiento y producción de los animales, de ahí que haya alimentos específicos para cada especie y hasta para cada etapa de su vida (ver tabla 3). Durante el transporte, almacenamiento y manipulación del alimento se deberá reducir al mínimo la introducción de enfermedades, parásitos y vectores potenciales de enfermedades (por ejemplo insectos y otras plagas) y contaminantes químicos.

Tabla 3. Composición bromatológica requerida para un alimento de roedores de laboratorio

ANIMAL	PROTEÍNA CRUDA %	GRASA CRUDA %	FIBRA CRUDA %	CENIZAS	CONSUMO DIARIO DE ALIMENTO	CONSUMO DIARIO DE AGUA	VITAMINA C
Cobayo	17-25	4-11	12-16	7-9	25-30 g	12-15 ml/100g	0.25-1 mg/g
Jerbo	15-24	4-11	4-6	10-15 g	10-15 g	3-4 ml	-
Hámster	16-24	4-11	3-6	7-18 g	7-18 g	8-12 ml	-
Rata	12-24	4-11	3-6	10-20 g	10-20 g	20-45 ml	-
Ratón	17-24	4-11	3-6	3-6 g	3-6 g	3-7 ml	-

Tomado de NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

El alimento deberá cumplir con los siguientes requisitos:

- Composición, que deberá cubrir las necesidades de crecimiento, gestación, lactancia y mantenimiento de los animales.
- Deberá ser agradable al paladar (palatable) y digestible.
- Tener fecha de elaboración y caducidad.
- Certificado de análisis químico proximal y microbiológico por cada lote.
- Estar libre de harina de pescado, aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes patógenos.

El alimento en forma de pellet deberá tener la consistencia requerida, para evitar pérdida del alimento y el animal pueda consumirlo (ver figura 4c y d) (Olfert, 1993).

Los animales deberán recibir alimento en cantidad y calidad suficiente para sus necesidades y para conservar la salud. El alimento se suministrará diariamente; se incrementará los días que se considere necesario. El alimento deberá almacenarse en cuartos o almacenes limpios, sanitizados, secos y ventilados, aislado del piso, sobre parihuelas de preferencia de plástico. Podrá considerarse la irradiación del alimento como una opción frente a la esterilización por autoclave, si se cuenta con las facilidades para tal fin (Fuentes, 2008). Como en el caso del agua, con el alimento el personal encargado de los animales deberá estar consciente en todo momento de una disminución en el consumo, que pueden evidenciar junto con la condición corporal de los animales signos de enfermedad.



Figura 4. Recomendaciones de cama, agua y alimento para el confinamiento primario. En la imagen se muestra un lecho de viruta de madera (a), un bebedero de ratón con boquilla de acero inoxidable y balín (b), así como imágenes representativas del alimento (c) y (d).

Técnicas de sujeción

Durante el manejo de los animales se deberá considerar el evitar dañar y ocasionar sufrimiento innecesario o estrés, para lo cual es necesaria la utilización de técnicas de sujeción específicas para cada especie animal. Así, para el traslado de rata y ratón para cambiarlos de jaula, se recomienda tomarlos de la parte media o base de la cola, con gentileza y firmeza, de preferencia utilizando guantes. La piel de la punta de la cola es susceptible de desprenderse por lo que deberá evitarse sujetarlos de esa zona (ver figura 5).

Los cobayos y conejos deberán tomarse de la piel del lomo y rápidamente proporcionarles una superficie de apoyo para las patas, de preferencia con el antebrazo de la persona, se deberá evitar tomarlos de las orejas ya que puede lesionar al animal y se corre el riesgo de que pueda patear y rasguñar con sus extremidades.

Manejo para administración de sustancias

Saque el ratón de la jaula tomándolo de la zona media de la cola, y apóyelo (sin soltarlo) sobre una superficie rugosa o rejilla contra la que pueda ejercer resistencia (ver figura 5a). Coloque la cola del ratón entre sus dedos anular y meñique, dejando libre sus dedos pulgar e índice. Con el dedo pulgar e índice, apriete suave pero firmemente, la piel de la parte superior de cuello y hombros, teniendo especial cuidado con los ratones agresivos. Levante al animal. Mientras que la rata debe tomarse deslizando la mano sobre el lomo y colocando los dedos medio e índice alrededor del cuello, haciendo una ligera presión (ver figura 5e y b).

Sujetadores mecánicos (cepos)

Existen varios tipos de sujetadores (cepos) para roedores elaborados de acrílico o plexiglas. La ventaja de los cepos es que el usuario podrá tener las dos manos libres para la manipulación. Dependiendo del tipo de dispositivo de retención, el roedor se coloca en el inmovilizador ya sea introduciendo primero la cola o la cabeza. Si el cepo tiene un dispositivo de fijación, fije con firmeza para evitar que el roedor salga del instrumento. Se

debe tener cuidado al colocar el dispositivo de seguridad para evitar lesiones o la restricción de la respiración del animal (ver figura 5c). Monitorear la frecuencia respiratoria y el color de las orejas y la nariz durante la duración de la restricción. Los cepos donde se introduce primero la cola del roedor, son adecuados para tomar muestra de sangre.

Los sujetadores de bolsa de plástico son otra opción para inmovilizar a roedores por un periodo corto de tiempo (ver figura 5d). Se introduce la cabeza del animal hasta el final de la bolsa asegurando que la nariz se coloque en la abertura del extremo de la bolsa. Cierre el otro extremo de la bolsa con un alambre plastificado. Las bolsas están disponibles en dos tamaños para roedores, dependiendo del peso del animal (Wolfensohn y Lloyd, 2003).

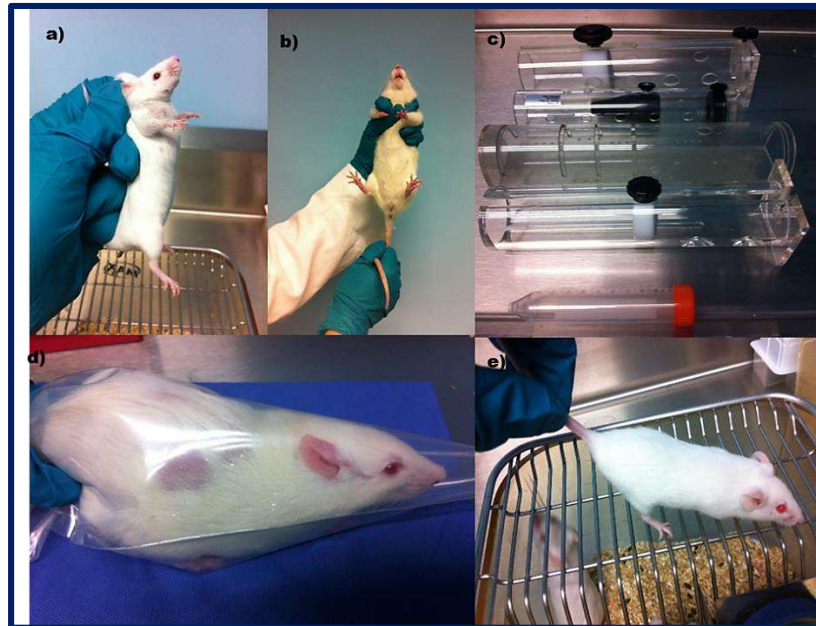


Figura 5. Técnicas de sujeción. En la imagen se muestra la inmovilización del ratón para la administración de algún fármaco o cualquier otro procedimiento a realizar (a), la inmovilización correcta de la rata (b), diferentes tipos de cepos o sujetadores para ratón y/o rata para una contención mecánica (c), rata en una bolsa de plástico como método de contención (d), y ratón siendo sujetado de la cola para realizar la inmovilización del ejemplar (e).

Métodos de identificación

La identificación de las jaulas de los animales que ingresan al bioterio deberá realizarse inmediatamente después de la eliminación de su caja de embalaje. La identificación de los animales individuales para estudios de corta duración (dos o tres semanas) podrá realizarse mediante marcas de color en la cola. Para estudios de más tiempo se pueden considerar sistemas permanentes como perforación y muescas en orejas o tatuajes (ver figura 6a y b).

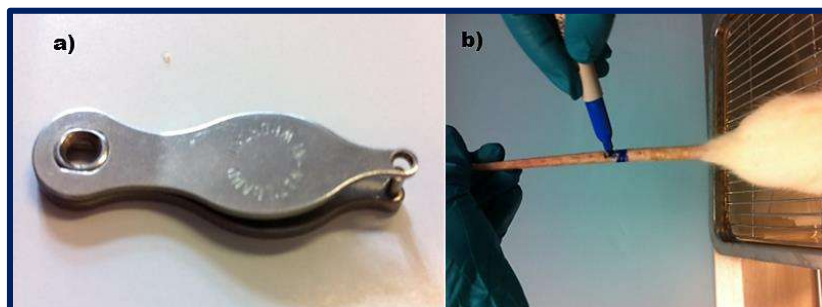


Figura 6. Métodos de identificación. En la imagen se muestra el instrumento requerido para la realización de las perforaciones o muescas en la oreja del ratón y rata (a) marcaje en la cola de un roedor mediante un colorante permanente (b).

La importancia de una identificación individual adecuada y su registro es un componente esencial de las Buenas Prácticas de Laboratorio requeridos por agencias reguladoras de varios países (New, 1978). En la actualidad es posible utilizar microchips para la identificación de los animales.

Limpieza y sanitización

La limpieza y sanitización son importantes para mantener la salud de los animales, incluyen la eliminación de cantidades excesivas de desperdicios y mugre, así como el cambio de material de cama o lecho. La sanitización o desinfección reduce o elimina las concentraciones inaceptables de microorganismos respectivamente. La frecuencia e intensidad de la limpieza dependerán de las necesidades para brindar al animal un medio ambiente saludable, de acuerdo a sus características fisiológicas y conducta normal, así como tamaño, tipo y propiedades físicas de las jaulas; el tipo, número, tamaño, edad y la condición reproductiva de los animales; el tipo y uso de los materiales de cama; la temperatura y humedad relativa del cuarto de alojamiento. Así mismo es recomendable la implementación de un calendario de sanitización y desinfección, de acuerdo a las actividades propias de la instalación y tomando en cuenta la rotación de productos

Cambio de lecho o cama

La cama sucia deberá retirarse y reemplazarse por material limpio, tan frecuente como sea necesario para mantener a los animales limpios y secos. No existe de manera absoluta una frecuencia mínima de cambio de lecho, pero típicamente varía desde diario hasta una vez por semana. En algunos casos está contraindicado el cambio frecuente de cama, como en los períodos inmediatamente anteriores y posteriores al parto, cuando las feromonas son esenciales para el éxito de la reproducción o bien cuando los objetivos de la investigación no lo permitan (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010). En cada cambio de lecho, las jaulas deberán lavarse utilizando detergente, esponja o escobilla, luego desinfectar con soluciones como: cloruro de benzalconio al 5% o Hipoclorito al 0,5% (revisar en la concentración comercial si es 5 o 5.25% para hacer el ajuste de concentración). Si el material de la jaula es autoclaveable, se podrá esterilizar la jaula. Los frascos bebederos serán lavados y desinfectados cada vez que se suministre agua de bebida. Se lavarán con agua, escobilla y detergente toda la superficie interna del frasco, igual proceder con los pipetores para lo cual se usa un cepillo especial. Luego, desinfectar con agua caliente o con algún desinfectante como hipoclorito de sodio sumergiendo el bebedero durante una hora.

Técnicas experimentales: analgesia y anestesia

La analgesia es un procedimiento que deberá realizarse en situaciones donde haya que reducir o eliminar el dolor, como resultado de algún procedimiento como cirugías, inyecciones intravasculares, cateterización de vasos sanguíneos o penetración de sondas. Los métodos más utilizados de analgesia son los que emplean fármacos analgésicos, que producen una ausencia total de sensibilidad, incluida la dolorosa.

Trabajos recientes indican que la administración de analgésicos reduce considerablemente las consecuencias de la cirugía, retornándose mucho antes a la situación pre-quirúrgica; las alteraciones hormonales e inmunitarias se reducen o normalizan, la ingesta del animal se recupera y la cicatrización de las heridas es más rápida. Se acepta que la analgesia actúa como mecanismos protectores frente a la agresión quirúrgica o la manipulación intensa (Gargiulo, 2012).

Técnicas de analgesia: El empleo de fármacos analgésicos es la técnica más difundida para reducir o eliminar la percepción del dolor en los animales. Existen dos grupos principales de fármacos, los derivados del opio o la morfina y denominados opiáceos (ver tabla 4), y los antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

Otros analgésicos incluyen agonistas de los receptores adrenérgicos alfa-2, anestésicos como la ketamina, y anestésicos locales como la bupivacaína, mepivacaína o lidocaína (Alvarez y Tendillo, 2001).

Tabla 4. Fármacos analgésicos para reducir o eliminar la percepción del dolor en los animales.

Analgésicos opiáceos	Dosis (mg/kg)	Duración (h)	Vía	Uso
Morfina	0.5-1	4	IM	Pre y postoperatorio
Petidina	01-feb	02-abr	IM	Pre, intra y postoperatorio
Metadona	0.1	4	IM / IV	Pre y Postoperatorio
Fentanilo	0.001-0.007	20-30 min	IV	Pre y intraoperatorio
Buprenorfina	0.01-0.02	06-ago	IM / IV	Pre y postoperatorio

Aplicación, duración media y dosis de los opiáceos más comunes. Las dosis indicadas son adecuadas para el perro y deben ajustarse a cada especie. Modificado de Álvarez y Tendillo, 2001.

Por otra parte, la anestesia en animales de laboratorio es un estado de inconsciencia, analgesia, relajación muscular y ausencia de cualquier tipo de percepción sensorial, ya sea dolorosa o no. Los procedimientos anestésicos pueden ser de dos tipos: inyectables o inhalados, de acuerdo con la naturaleza de los fármacos administrados (Gargiulo, 2012; Hau and Van Hoosier, 2002).

La administración de estos fármacos, bien sea uno solo o la combinación de varios, normalmente produce un estado de depresión de la corteza cerebral que impide la llegada o reconocimiento de cualquier estímulo sensorial.

En estudios con animales la anestesia deberá cumplir los siguientes objetivos:

- Facilitar la manipulación del animal y/o la realización de procedimientos quirúrgicos o dolorosos.

- Proporcionar un trato humanitario a los animales, reduciendo al mínimo el sufrimiento asociado a dicha manipulación, evitando situaciones dolorosas, de angustia o ansiedad.
- Reducir al mínimo las consecuencias negativas de la cirugía sobre la fisiología del animal.
- Permitir la realización de investigaciones imposibles de hacer con el animal consciente.

Los anestésicos más utilizados en ratones incluyen los agentes inyectables Avertin, pentobarbital, y la ketamina, que a menudo se combinan con otros agentes tales como acepromacina, xilazina, diazepam, varios analgésicos narcóticos, y los agentes inhalatorios halotano, isoflurano y sevoflurano. En comparación con las técnicas de inyectables, la anestesia de inhalación proporciona mayor seguridad, sobre todo para los procedimientos prolongados.

Aunque la mayoría de los anestésicos pueden utilizarse en casi todas las especies con resultados similares, la dosis administrada varía considerablemente si utilizamos la referencia del peso (ver tabla 5). Normalmente, cuando menor es la especie, mayor es la dosis en mg/kg de peso corporal a utilizar; por ejemplo, mientras la ketamina se administra a una dosis aproximada de 1 mg/kg en la vaca o el caballo, en el ratón es de 200 mg/kg. La causa radica en que a medida que un animal es más pequeño su metabolismo es más elevado (Institute for Laboratory Animal Research, 2000; Álvarez y Tendillo, 2001). Es importante tomar en cuenta que si utilizamos un anestésico en el cual no estemos familiarizados, deberemos efectuar un pequeño estudio de efectividad anestésica específico para la población de animales que normalmente usamos, ya que las dosis y efectos pueden variar dependiendo la colonia de que se trate.

Tabla 5. Dosis de anestésicos utilizados en roedores y conejos (mg/kg).

	Ratón	Rata	Conejo
Premedicación			
Atropina SC	0,05	0,05	0,05
Anestesia de corta duración			
Propofol IV (5-10 min)	15-26	10	10
TiopentalNa IV (20-25 min)	30-40	30	30
Anestesia de media duración			
Fentanilo/Etomidato IP	0,08/18	-	0,03/2
Fentanilo+Fluanisona (ml/kg)/Diacepan IP	0,4/5	-	0.3 IM
Ketamina/Diacepan IP	100/5	80/10	25/5
Ketamina/Xilacina IP	100/10	80/10	35/5 IM
Ketamina/Medetomidina IP	75/1	75/0,5	25/0,5 IM
Tiletamina+Zolacepan (Zoletil®) IP	80*	-	-
Pentobarbital IP	50-70	30-40	45 IV
Anestesia de larga duración			
Alfa-cloralosa IP	110	130	80-100 IV

Uretano (g/kg) IP	-	1-2	1-2 IP, IV
-------------------	---	-----	------------

* Inmovilización solamente (falta donde va el asterisco en la tabla). SC Subcutáneo, IV Intravenoso, IP Intraperitoneal, Modificado de Álvarez y Tendillo, 2001.

Administración de fluidos y sustancias

Cuando se administra una sustancia a un animal por cualquier vía, el objetivo debe ser conseguir la mejor práctica, puesto que los errores en cualquier fase del proceso pueden provocar un sufrimiento innecesario o la utilización de animales sin objeto. La mejor práctica se basa en minimizar o evitar efectos adversos, disminuir cuanto se pueda el número de animales utilizados y maximizar la calidad y aplicabilidad de los resultados. Todas las técnicas deberán de estar manejadas bajo normas oficiales de acuerdo al lugar en que se llevaran a cabo, en el caso de México todos los procedimientos deben seguir la NOM-062-ZOO-1999 (Olivares, 1996; NOM-062-ZOO-1999; Falconi de La Fuente; 2010).

Se deberá de planificar perfectamente la experimentación, plantear claramente los objetivos científicos y lograr que se cumplan dichos objetivos con la vía y el régimen de administración seleccionado. La elección de la vía viene determinada por el propósito del experimento, las especies animales, los posibles efectos de la técnica de administración sobre el animal y la frecuencia de dosificación esperada. La sustancia en ocasiones restringe algunas vías de administración, tanto la sustancia como el vehículo deben ser apropiados para la vía elegida, la especie y el propósito del experimento (Olivares, 1996; Falconi de La Fuente; 2010). La administración de fármacos u otro tipo de sustancias se realiza por diferentes vías, que se clasifican en enteral, parenteral, tópica e inhalada (ver tabla 6).

Vía Enteral: Utiliza la forma natural de absorción del intestino, aunque dichas sustancias no solo se ingieren por la boca, sino que incluso se pueden depositar directamente en otros tramos del intestino como el recto. La sustancia puede suministrarse en el alimento, en el agua de bebida, o bien mediante la administración forzada utilizando una sonda (Morton, *et al.*, 2001; Zúñiga & Miloco 2001, Falconi de La Fuente; 2010; Machholz, 2012).

Vía parenteral: Esta vía implica la ruptura de las barreras del animal, la piel y las mucosas para depositar las sustancias en tejidos o cavidades internas del organismo, como la abdominal.

El método más común es la inyección con depósitos de sustancias dentro de la piel (vía intradérmica ID), o debajo de ella en el tejido subcutáneo (vía subcutánea SC) en los músculos (vía intramuscular IM), en venas (vía intravenosa IV), o en cavidades como la pleura (vía intrapleural) o peritoneal (vía intraperitoneal IP) (Morton, *et al.*, 2001; Zúñiga & Miloco 2001, Falconi de La Fuente; 2010; Machholz, 2012). Para cada vía y para cada animal de experimentación tiene que manejarse una dosis específica para cada procedimiento (Tabla 5), (Diehl, 2001).

Características de la sustancia a inocular

- Propiedades físico-químicas: formulación, pureza, pH, solubilidad, viscosidad, biodisponibilidad.
- Soluciones y disolventes.
- Tasa de absorción.
- Características del modelo animal seleccionado
- Especie, razas y cepas seleccionadas.
- Sexo.
- Entrenamiento y habituación de los animales (Falconi de La Fuente; 2010).

La técnica de administración seleccionada

Deberán hacerse las siguientes consideraciones:

- Si la técnica, y no la sustancia, es la que tiene algún efecto adverso sobre el animal.
- Si el equipo a utilizar es el más apropiado.
- Si la frecuencia de administración puede ser reducida.
- Personal y formación
- Manipulación, sujeción e inmovilización de los animales.
- Utilización de recursos para el aprendizaje y entrenamiento permanente.
- Práctica con objetos inanimados.
- Observación de personal experimentado.
- Supervisión.
- Concientización (Falconi de La Fuente; 2010).

Consideraciones básicas en la administración de sustancias por inyección

- Recuerde siempre utilizar antisépticos en cada uno de los procedimientos de administración de sustancias.
- Utilice las agujas más adecuadas. La inserción de grandes agujas puede ser dolorosa y produce un excesivo daño tisular. Las de pequeño calibre dificultan el pasaje del inóculo. El calibre de la aguja depende de la resistencia de los tejidos que tiene que penetrar lo cual, a su vez, depende de la especie animal y del lugar de inyección.
- No recicle el material, cambie de aguja con cada animal. Las agujas se desafilan y la punción se hace más dolorosa.
- Busque alternativas, si el procedimiento debe repetirse frecuentemente, considere la posibilidad de cateterizar la vena por ejemplo.
- Ingrese en la vía seleccionada, ingresar en una vía no buscada puede acarrear serias secuelas, incluso fatales.
- Aspire, retraiga el émbolo antes de administrar la sustancia excepto para la vía intraperitoneal.
- Logre precisión, puede lograr mayor precisión sobre la profundidad de inserción mediante el uso de topes o marcas en las agujas y sondas.
- Introduzca la aguja/sonda firme pero suavemente y presione el émbolo con suavidad. Después de la inyección saque la aguja lenta pero firmemente.
- Los fluidos pueden salirse a través del punto de inoculación reduciendo la precisión de la dosis. Desplace la piel y/o puede aplicar un poco de presión en la zona de punción para dispersar el sustrato (Olfert, 1993; Diehl, 2001; Falconi de La Fuente; 2010).

Tabla 6. Volumen máximo de sustancia a administrar

Volúmenes administrados, considerados como buenas prácticas (posibles volúmenes en la dosis máxima)						
	Ruta de administración (ml/kg)					
	Oral	s.c.	i.p.	i.m.	i.v. (en bolo)	i.v.(administración lenta)
Ratón	10 (50)	10 (40)	20 (80)	0.05 (0.1)	5	(25)
Rata	10 (40)	5 (10)	10 (20)	0.1 (0.2)	5	(20)
Conejo	10 (15)	1 (2)	5 (20)	0.25 (0.5)	2	(10)

Volumen máximo de sustancia a administrar y número de dosificaciones que se pueden emplear dependiendo de la vía de administración (Diehl, 2001).

Vías de administración

Intramuscular: se utiliza como una vía de administración sistémica, en estudios de liberación lenta (formulaciones oleosas) y en valoración de vacunas (ver figura 7a) (Olivares, 1996).

Características de la técnica

En lo posible, se necesita de dos personas.

- La inyección debe hacerse en una masa apropiada (grande, alejada de vasos sanguíneos y nervios mayores).
- Se hará entre la cara lateral y la craneal de los músculos del muslo debe sujetarse la pata del animal firmemente, introduciendo la aguja cuidadosa y decididamente.
- Tire del émbolo antes de inyectar.
- Inyecte lentamente, retire la aguja y aplique un poco de presión en la zona.

Posibles problemas a considerar en la técnica

- Cojera temporal (técnica bastante dolorosa mayormente cuando se administran sustancias oleosas).
- Mayor posibilidad de dañar los troncos nerviosos mayores o los nervios intramusculares (Ej.: nervio isquiático).
- Daño del tejido muscular debido a la distensión del compartimiento facial cercano.
- No use sustancias irritantes, la necrosis tisular que se produce en el lugar de inyección será muy doloroso.
- El uso de adyuvantes por esta vía es inaceptable.
- Si la reacción al dolor llega a ser violenta, retire la aguja para evitar dolor innecesario o daño físico.
- La inyección se completará en otro lugar cuando la reacción haya disminuido y el animal se haya calmado.
- Evite usar esta técnica en animales pequeños (Ej.: rata, ratón o hámster) a menos que sea necesario.
- Puede resultar conveniente dividir los volúmenes grandes entre diversos puntos.
- Puede utilizar cánulas mariposa (grandes animales) (Morton, *et al.*, 2001; Zúñiga & Miloco 2001, Machholz, 2012).

Intradérmica: es una técnica utilizada frecuentemente en estudios de: inflamación, sensibilización, diagnóstico de flujo sanguíneo cutáneo y en inmunología (Olivares, 1996).

Características de la técnica

- Se practica entre las capas exteriores de la piel (lomo).
- Debe afeitarse la zona de punción al menos 1 hora antes.
- Debe situarse la aguja casi en paralelo a la superficie de la piel y se introduce cuidadosamente unos pocos milímetros.
- Pérdida de resistencia = inoculación subcutánea.
- Rote la aguja, el bisel debe quedar hacia abajo.

Posibles problemas a considerar en la técnica

- El volumen a inyectar no debe superar los 100 µl por punto.
- Es fácil por error inyectar la sustancia subcutáneamente.
- La densidad de la piel puede hacer difícil insertar la aguja.
- Utilice la aguja más pequeña y aguda que pueda.
- La inyección es dolorosa. Utilice anestésicos locales.
- Minimice las reacciones adversas utilizando varios puntos.

- No inyecte en un mismo lugar más de una vez (Olfert, et al., 1993; Diehl, *et al.*, 2001).

Subcutánea: esta vía puede ser utilizada como alternativa a la intramuscular en los animales. Se prefieren los sitios en que abunde tejido conjuntivo, en el dorso a nivel del cuello o los flancos. La aguja se inserta en la piel paralela a la columna vertebral. Se utiliza agujas de 25 a 27 G, $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ pulgada con jeringas de tuberculina (ver figura 7b). Los volúmenes varían dependiendo la especie, edad, etc. Para el caso del ratón adulto el volumen será de 2 a 3 ml (Olfert, et al., 1993; Diehl, 2001).

Intraperitoneal: se utiliza para administrar volúmenes relativamente grandes de sustancias solubles. Se usa jeringas y aguja calibre 25 – 27 G $\frac{1}{2}$ a 1 pulgada, de bisel pequeño. Aplicando la sujeción con una mano e inmovilizando la pata izquierda del animal, con una inclinación hacia craneal para producir un desplazamiento de las vísceras con el fin de no lesionarlas.

Se inserta la aguja en la piel en el cuadrante izquierdo inferior del abdomen, luego se lleva hacia craneal y se introduce en la cavidad peritoneal, levantando la aguja en contra de la pared abdominal para evitar la punción en el interior del intestino; la jeringa con aguja debe estar paralela a la columna vertebral (ver figura 7c). Se puede administrar hasta 3 ml. Una rápida administración del fluido puede causar daños en el tejido y hemorragia debido a la presión interna (Olfert, 1993; Diehl, 2001).

Características de la técnica

- La penetración debe cesar tan pronto como el fluido inyectado comience a fluir libremente en la cavidad abdominal.
- Se debe medir la profundidad de penetración de la aguja.
- Introduzca la aguja con un ángulo de 30°, ligeramente a la izquierda de la línea media del ombligo, a medio camino de la sínfisis pubiana y el apéndice xifoides del esternón.

Posibles problemas a considerar en la técnica

- Las sustancias irritantes pueden resultar fatales.
- Producen dolor, fibrosis y adherencias.
- Algunos disolventes acuosos pueden producir inflamación de los bordes de los lóbulos hepáticos.
- No se puede asegurar que la dosis se esté administrando en la cavidad en lugar del intestino, vejiga, músculo u otro órgano.
- Pueden dañarse vasos sanguíneos (Morton, 2001; Zúñiga & Miloco 2001, Machholz, 2012).

Intravenosa: La vía intravenosa se usa con frecuencia en experimentos farmacológicos y toxicológicos de biodisponibilidad inmediata. Se utiliza agujas de 27 - 30 G y jeringas tuberculina de 1 ml. Teniendo el ratón inmovilizado dentro de un cepo (sujetador para ratón), se utilizan las venas laterales de la cola (ver figura 7d), estas se dilatan con alcohol o con calor.

El volumen a inocular es de 0,2 a 0,5 ml como máximo. Se logran mejores resultados realizando vasodilatación como por ejemplo, introduciendo la cola en agua medianamente caliente, utilizando xilol o elevando la temperatura del ratón mediante una lámpara. Las venas se observan cuando la cola es levantada y girada lentamente en cualquier dirección.

No se debe utilizar para medicamentos con vehículo oleoso o sustancias irritantes (Olfert, 1993; Diehl, 2001).

Características de la técnica

- Tricotomía de la zona.
- Realice una correcta vasodilatación.
- Antisepsia.
- Utilice un anestésico local.
- Ingrese casi paralelo al recorrido del vaso, con el bisel hacia arriba.
- Asegúrese de haber ingresado en la vena (aspire) antes de inocular la sustancia.
- Retire la aguja.
- Hemostasia.

Posibles problemas a considerar en la técnica

- No administre sustancias irritantes.
- Asegúrese de que en la sustancia no haya presencia de precipitados (realice en ese caso un prefiltrado).
- Formación de émbolos (Ej.: fragmentos de piel).
- Se deben rotar los lugares de venopunción.
- Contemple la posibilidad de recurrir a la cateterización cuando se administren sustancias irritantes o necrosantes (Morton, 2001; Zúñiga & Miloco 2001, Machholz, 2012).

Administración oral: Comúnmente usada para la administración de compuestos irritantes o imposibles de ser administrados por otras vías. Se puede usar en el alimento, el agua, en volumen máximo de 1 ml de solución por cada 100 g de peso del animal cuando es vehículo oleoso. Se utiliza 2 ml de solución cuando es solución acuosa; lo ideal es mediante sonda orogástrica y teniendo un buen conocimiento de la anatomía de la zona orofaríngea (ver figura 7e y f), los pasos a seguir son los siguientes:

Inmovilizar al animal en forma correcta e introducir la sonda hacia la izquierda en forma lenta y suave a lo largo de la rama mandibular derecha, aquí el ratón comienza a tragar y la sonda se inserta dentro del esófago (Olfert, 1993; Diehl, 2001).

Características de la técnica por sonda orogástrica

- Debe asegurarse en todo momento de no ingresar en la vía respiratoria.
- Busque el mejor ángulo de la cabeza y el cuerpo para facilitar la administración. Esto se puede obtener con una buena inmovilización.
- Mida el tamaño de la sonda. Realice marcas orientadoras. Tome puntos de referencia.
- Los catéteres flexibles son preferibles a los rígidos.
- Lubrique las sondas con vaselina o parafina médico.
- Observe el reflejo gastroesofágico o deglutorio y en ese momento introduzca la sonda.

Posibles problemas a considerar en la técnica

- **INGRESO EN LAS VIAS RESPIRATORIAS.**
- Esté atento a “gorjeos” o “carraspeos”.
- Realice eutanasia al animal en caso de haber ingresado a la vía respiratoria.
- La sonda no debería tocar las paredes del esófago ni la mucosa gástrica.
- No progresa la sonda si hay “resistencia”. Vuelva a intentarlo (Morton, 2001; Zúñiga & Miloco 2001, Machholz, 2012).

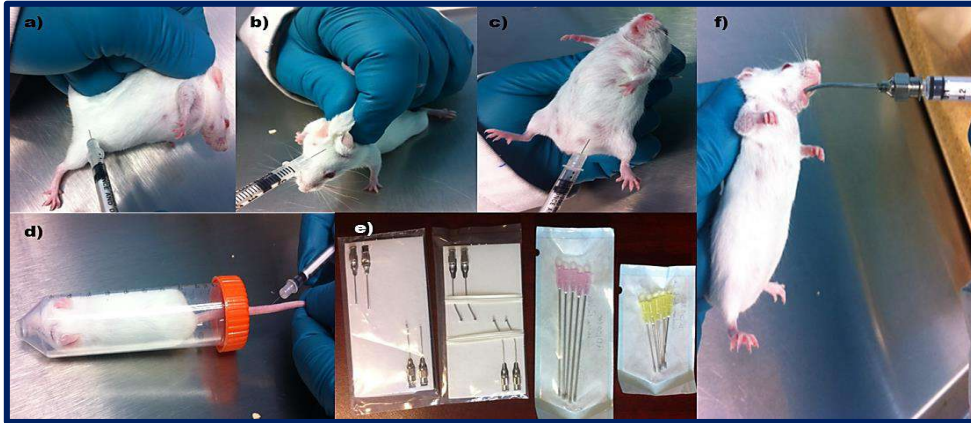


Figura 7. Administración de fluidos y sustancias en el ratón. En la imagen se muestran diferentes vías de administración en ratón, sujeción de ratón para realizar una medicación por vía intramuscular (a), administración subcutánea (b), administración intraperitoneal (c), administración en venas laterales de la cola (d), diferentes tipos de cánula para administración orogástrica en ratón y/o rata y calibres de agujas para los diferentes procesos (e) y administración orogástrica en ratón (f).

Toma de muestras

La administración de sustancias y la toma de muestras sanguíneas son procedimientos rutinarios en el manejo, cuidado y uso de modelos animales con fines científicos. Una buena y exitosa práctica deberá garantizar una observación del efecto deseado asociado a la sustancia expuesta o inoculada. El desarrollo de una buena técnica debe disminuir el dolor y malestar percibidos por el animal durante el procedimiento (Olivares, 1996).

Condiciones generales

Estos procedimientos deberán ser llevados a cabo por personal entrenado en la ejecución de los mismos. Este procedimiento solo podrá llevarse a cabo en áreas o laboratorios asociados a la unidad de bioetiquetas. Para la toma de muestra de sangre en roedores de laboratorio, se deberá tener en cuenta los volúmenes permitidos según la especie seleccionada. Dependiendo del volumen de extracción deberán establecerse tiempos base de recuperación para que la hemodinámica del animal vuelva a niveles normales.

La toma de muestras sanguíneas por la vena lateral de la cola puede desarrollarse en ratas y ratones, pueden tomarse múltiples muestras en el tiempo que deben desarrollarse de distal a proximal para no perder la integridad del vaso sanguíneo. Los volúmenes de extracción puede ser de 0,1-0,15 mililitros en el ratón y 0,5-1 mililitro en la rata (Krinke, 2000).

Mientras que la toma de muestras sanguíneas por las venas safenas pueden desarrollarse en ratas, ratones, hámster, jerbo y cobayos. Por este método pueden obtenerse volúmenes hasta del 5% del volumen sanguíneo circulante. La punción cardíaca siempre deberá realizarse bajo anestesia general y como procedimiento terminal para luego efectuar la eutanasia. No se debe permitir la supervivencia de los animales ya que pueden generarse sangrado pericárdico o taponamiento cardíaco.

La amputación de porciones distales de la cola solo podrá utilizarse cuando se hayan descartado todas vías citadas. Esta técnica permite obtener volúmenes de extracción de 0.1-0.2 mililitros. Durante el procedimiento debe removerse un máximo de 5 mm y los animales deben estar sometidos a un plano anestésico (Olfert, 1993; Diehl, 2001).

Volumen sanguíneo circulante: es el volumen total que tiene un modelo animal expresado en mililitros por kilogramo de peso. Existen variaciones leves asociadas al linaje y sexo, dependiendo de la especie el volumen varía considerablemente. Los volúmenes se presentan como medias, por ejemplo en la especie conejo el volumen medio es 56 ml/kg con un rango de 44 a 70 ml/kg (ver tabla 7), (Olfert, 1993; Diehl, 2001).

Tabla 7. Volumen sanguíneo circulante

Volumen sanguíneo circulante		
Especie	Volumen sanguíneo (ml/kg)	
	Volumen promedio	Rango promedio
Ratón	72	63-80
Rata	64	58-70
Conejo	56	44-70

Volumen de extracción: con base al volumen total sanguíneo, el volumen de extracción es la cantidad máxima de sangre que puede tolerar un modelo animal en un procedimiento determinado. Este factor debe calcularse teniendo en cuenta si la extracción es en toma única o en tomas progresivas en tiempos determinados; por ejemplo la extracción máxima del 7,5 % del volumen sanguíneo varía las respuestas de recuperación (1 a 2 semanas) dependiendo del tiempo de extracción (1 minuto o 1 día) (ver tabla 8), (Olfert, 1993; Diehl, 2001).

Tabla 8. Volumen máximo sanguíneo por muestra y periodo de recuperación

Máximo volumen sanguíneo por muestra					
Especie (peso)	Volumen sanguíneo (ml)	7.5% (ml)	10% (ml)	15% (ml)	20% (ml)
Ratón (25 g)	1.8	0.1	0.2	0.3	0.4
Rata (250 g)	1.6	1.2	1.6	2.4	3.2
Conejo (4 kg)	224	17	22	34	45
Periodo recuperación (semanas)		1	2	3	3

Elementos básicos para la toma de muestras sanguíneas

Para realizar una punción sanguínea por lo general se va a requerir:

- El animal para la toma de muestra
- Aguja calibre 24 o 22
- Recipiente de recolección (tubos capilares o microvacutainer)
- Cuchillas minora
- Alcohol 70%
- Vaselina estéril
- Gaza
- Elementos de protección personal asociados al personal
- Cepo de inmovilización (opcional)
- Anestésico

Extracción de sangre de las venas laterales de la cola en roedores

La técnica inicia con la preparación de todos los materiales a utilizar para realizar la técnica. Después se comienza con la inmovilización del animal, en caso de ratones y ratas el animal debe ser inmovilizado por medio de un cepo específico de especie (ver figura 8a) (Krinke, 2000). Se debe colocar una banda de oclusión en el mango de la cola o contar con apoyo

de una persona que ocluya con los dedos índice y pulgar. Al hacer esta oclusión se debe girar levemente la mano para mejorar la exposición de la vena. Posteriormente la cola es inmersa en agua tibia para mejorar la vasodilatación por 30 segundos aproximadamente. Luego se pasa una gaza con alcohol al 70% sobre la zona de punción y el observador identifica la ubicación de la vena que discurre sobre los aspectos laterales de la cola de forma paralela (no confundir con la arteria que discurre por el aspecto medial y se observa más profunda) Se debe tener en cuenta que por esta vía se pueden obtener hasta 0,15 ml en ratones y 1ml en ratas (Krinke, 2000).

En general las venas discurren superficiales lo que lleva a que solo se debe introducir la aguja unos mm, la aguja es ubicada con el embolo hacia arriba en ángulo 10 grados aproximadamente, esto es posible por el leve dobles de la cola que se hace con la mano que la sujeta cuando se asegura la ubicación en el lumen de la vena se debe iniciar la extracción lentamente para evitar colapsar el vaso sanguíneo. Una vez se termine la extracción, el instrumento debe ser retirado del animal, Esto no suele presentar complicaciones. En algunas ocasiones debe hacerse presión en la zona para evitar un leve sangrado (Olfert, 1993; Diehl, 2001).

Extracción de sangre de las venas sanguíneas por las venas safenas y cefálicas

Para esta técnica se comienza con la sujeción o inmovilización del animal. En el caso de ratones, ratas y cobayos animal debe sujetarse con las dos manos, con una mano se sujeta la zona caudal del animal y con la otra se sujeta el miembro anterior o posterior ocluyendo a la altura de la articulación humero radio-cubital o fémur tibia-peroné.

Las venas safenas se ubican como una proyección lateral de la vena tarsal. En la observación la vena discurre desde el aspecto lateral del corvejón a través de la tibia hasta el aspecto proximal de los metatarsos. Cuando el personal de apoyo hace la oclusión es palpable la ubicación de la vena, en tal caso se realiza una leve depilación de la zona con ayuda de una cuchilla y jabón hipo alergénico. Luego se aplica una gaza con alcohol al 70% para mejorar la dilatación del vaso sanguíneo. Se pone vaselina estéril en la zona de punción para evitar que se peque la sangre a la piel. La punción debe realizarse en ángulo de 90°, esto llevara a una salida de gotas gruesas de sangre que pueden ser recolectadas con un capilar o microvacutainer. Una vez se termine la extracción se debe hacer presión de la zona para detener el sangrado (Olfert, 1993; Diehl, 2001).

Extracción de muestras sanguíneas por punción cardiaca

Para esta técnica se deberá realizar una anestesia general en el animal de experimentación y se tomaría dicha muestra al terminar el proyecto ya que no es conveniente dejarlo vivo después de esta punción debido a que presentará complicaciones cardiacas severas.

El animal deberá ubicarse en decúbito supino y deberemos asegurarnos de ausencia de reflejos (corneal y podal). Se debe palpar la zona externa con los dedos índice y pulgar a nivel de la 4 costilla aproximadamente. El dedo pulgar se ubica en el costado lateral izquierdo y el anular en el derecho. Lentamente se ubica el punto de mayor intensidad cardiaca (PMI) y el dedo pulgar se coloca caudal a este. Con la otra mano se sostiene la jeringa y se ubica la aguja en ángulo de 45% directamente sobre el PMI. Lentamente se introduce la aguja un centímetro aproximadamente y se observa si hay salida de sangre a través de la aguja por capilaridad (ver figura 8b). En caso negativo se puede reubicar la aguja con muy leves movimientos, direccionando la aguja hacia craneal y caudal. Con una adecuada ubicación, lentamente se empieza a succionar la sangre con el dedo pulgar, la mano debe estar fija y solo debe moverse el dedo para evitar malas reubicaciones. Una vez

se termine la extracción se debe garantizar la eutanasia del animal y confirmar la muerte por los medios respectivos del proyecto (Olfert, 1993; Diehl, 2001).

Extracción de muestras sanguíneas por venas laterales y arteria central de la oreja en cobayos

Primero se deberá inmovilizar al animal, el cobayo o conejo puede ser inmovilizado con un cepo o con un campo, envolviendo el cuerpo del animal y dejando expuesta la cabeza o con la ayuda de dos personas, una persona lo abraza y la otra persona hace la maniobra de extracción sanguínea. La oreja se depila con una cuchilla sobre la zona adyacente a los márgenes laterales y distales, se anestesia de forma local con atomizador o con pomada y se deja actuar por 20 minutos. Se aplica una gasa con alcohol y se hacen movimientos de la oreja para favorecer la vasodilatación. Se prepara el material necesario para la punción, su ubica la vena en su porción latero-distal y se realiza la punción introduciendo la aguja en un ángulo de 45 grados. Se observa salida de sangre y ésta debe ser recolectada con un tubo, capilar o microvacutainer. En algunas ocasiones se puede instalar y fijar un catéter intravenoso para tomas de sangre recurrentes (Olfert, 1993; Diehl, 2001).

Extracción de muestras sanguíneas del seno venoso orbital

Esta técnica implica pinchar el seno venoso detrás del globo del ojo y se conoce de diferentes maneras como retro-orbital, peri-orbital, orbital posterior y sangrado del plexo venoso orbital (ver figura 8c). En manos expertas, el sangrado del seno venoso orbital puede ser un método útil para obtener buenas muestras de animales sin cola, como el hámster, o de ratones en los que se requieren volúmenes mayores de los que se pueden recoger de la vena de la cola. Sin embargo, es una técnica que puede tener severas consecuencias para el animal y por lo tanto, no recomendamos el uso del sangrado retro-orbital con recuperación del animal más que en circunstancias excepcionales cuando no haya ningún otro método disponible. Siempre debe realizarse bajo anestesia y debe utilizarse una sola órbita. Puesto que la técnica acarrea un potencial considerable de daño inadvertido y efectos adversos consecuentes, solo debe ser ejecutada por personal entrenado.

También debe advertirse que algunas personas encuentran este procedimiento desagradable y por lo tanto no debe pedírseles que lo realicen (Olfert, 1993; Diehl, 2001).



Figura 8. Tomas de muestra en el ratón. En la imagen se muestran diferentes técnicas para la toma de muestras sanguíneas en ratón considerando el volumen sanguíneo máximo por muestra de acuerdo a la tabla 8; extracción de sangre de las venas laterales de la cola (a), de punción cardíaca (b) y del seno venoso orbital (c).

Colección de muestras de orina y/o heces

La recolección de orina y heces fecales representa una parte esencial tanto de la práctica veterinaria, para comprobar la salud de los animales, como de las investigaciones

científicas, para evaluar los resultados de procedimientos experimentales. La recolección de orina no contaminada en animales representa un reto, en especial con los roedores pequeños, y resulta una tarea prácticamente imposible bajo condiciones de microgravedad.

Los aspectos fundamentales de la recolección de orina y heces fecales son:

- Facilidad de recolección
- Calidad de la muestra
- Prevención de la contaminación
- Rigor de los procedimientos empleados
- Grado de dolor causado al animal

Aunque se ha prestado especial atención a los roedores, canes y primates no humanos, ya que son los animales preferidos para la investigación, la recolección de orina en otras especies como conejos, felinos, especies aviarias, etc., también deberá realizarse teniendo en mente el bienestar animal. (Kurien, 2004). Se han estudiado la micción y defecación voluntaria, métodos con escasa intervención, métodos quirúrgicos, limitaciones modificadas, y métodos y jaulas para requerimientos especiales, conocidas comúnmente como jaulas o cajas metabólicas (ver figura 9a y b). Es necesario esforzarse en criar a los animales de forma adecuada y en un entorno lo más natural posible, ya que los resultados experimentales que se obtengan dependerán, en gran medida, de su bienestar. La forma más eficiente de proceder consistirá en una continua mejora de los procedimientos de recolección de orina y heces para obtener muestras puras que lleven a datos de investigación fiables (Kurien, 2004).

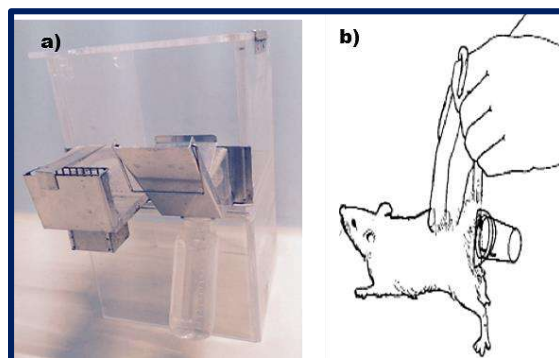


Figura 9. Colección de muestras de orina y heces. En la imagen se muestra una caja metabólica para la colecta de orina y heces fecales (a), y la técnica de colección por micción y defecación voluntaria (b).

La recolección de estas muestras es un requerimiento básico dentro de los estudios bioquímicos, nutricionales, urológicos, metabólicos, toxicológicos, fisiológicos y de comportamiento general. Ratones y ratas son dos de las especies de mamíferos más utilizadas en la evaluación de toxicidad crónica y aguda, metabólica, biodisponibilidad y metabolismo en la evaluación preclínica de fármacos. Se ha probado su utilidad con base a su fácil manejo, linaje genético definido, alta fertilidad y fecundidad, bajo coste, vida relativamente corta y mínimo espacio requerido para su alojamiento. Los ratones representan la mayoría de todos los mamíferos de entre todos los animales utilizados para la investigación, docencia y ensayos (Kurien, 2004).

Cuidados pre y post-quirúrgicos

Se recomienda que el desarrollo de los cuidados pre-operatorios, de las técnicas operatorias y de los cuidados postoperatorios se haga en consulta con un veterinario. Además, deberá de consultarse a un veterinario especializado en animales de experimentación para asegurarse de que haya un cuidado adecuado, incluyendo la analgesia y la anestesia apropiadas. Se deberán utilizar únicamente animales saludables y libres de enfermedades en un programa experimental de cirugía. Para esto, existen lugares en donde se pueden conseguir animales de experimentación con certificados de salud. Los animales de origen desconocido deben completar un período de acondicionamiento establecido por el médico veterinario responsable del laboratorio. Es muy importante proveer un período de aclimatación, durante el cual, el animal puede ajustarse a nuevos ambientes, a un alojamiento especial, a las ataduras, a las tablillas o a otras formas de inmovilización o manipulación frecuentes. Esto disminuirá mucho el nivel de estrés o la desorientación que vive el animal y asegurará la validez de los resultados experimentales (Olfert, 1993; Birchard, 1994).

Se deben mantener registros quirúrgicos para todos los animales experimentales. La cantidad de detalles registrados variará con el procedimiento y las especies. Por ejemplo, no se registrará la misma cantidad de información para un ternero que experimenta un trasplante de corazón, que para un grupo de ratas que experimentan una suprarrenalectomía. El período de ayuno antes de la cirugía varía con las especies animales: No es necesario hacer ayunar a los roedores y conejos, con excepción de circunstancias especiales tales como cirugías del intestino grueso. Si el ayuno es necesario, se puede hacer de noche en roedores grandes, o hasta 24 horas en conejos, porque retienen sus alimentos más tiempo. Los ratones o los otros roedores pequeños con metabolismo alto similares no deberían ayunar por más de tres o cuatro horas (véase también Anestesia) (Olfert, 1993; Birchard, 1994; Olivares, 1996).

Procedimientos quirúrgicos y cuidados durante la cirugía

Los métodos para inmovilizar los animales para las inyecciones o la toma de fluidos corporales se describen anteriormente en este mismo capítulo. Todas las cirugías con supervivencia, en todas las especies animales, se deberán realizar utilizando técnicas asépticas. Los instrumentos quirúrgicos deberán esterilizarse. Así como los objetos introducidos en los animales, tales como: implantes de telemetría, mini-bombas osmóticas, vías de acceso vascular, cánulas y cualquier otro dispositivo biomédico. Una preparación apropiada del cirujano incluirá: el cepillado quirúrgico de manos, el uso de ropa estéril tales como: un gorro, una máscara, una blusa de cirugía y guantes. Para cirugías menores en roedores, se requiere por lo menos del cirujano que tenga una bata de laboratorio limpia, una máscara y guantes quirúrgicos estériles y realizando un cepillado de manos adecuado. La cirugía en condiciones de campo debería desempeñarse en un ambiente tan limpio como sea posible, con instrumentos estériles, guantes quirúrgicos estériles y técnica aséptica. Se deben hacer todos los esfuerzos posibles para minimizar la posibilidad de infección (Olfert, 1993; Birchard, 1994; Olivares, 1996).

Durante la cirugía es importante que la condición fisiológica del animal sea controlada y mantenida lo más estable posible. El nivel de vigilancia dependerá del equipamiento disponible. El monitoreo básico de los sistemas cardiovascular y respiratorio, y de la temperatura corporal requiere muy poco equipamiento. Estas observaciones se deberán anotar en el registro de cirugía del animal. Es esencial que el animal sea examinado clínicamente por lo menos dos veces por día durante el período postoperatorio inmediato, en animales pequeños. Se deberán cuidar las necesidades de los animales en fluidos. En

el transcurso de la cirugía, se deberá vigilar la hemostasia para evitar los choques hipovolémicos, especialmente en los pequeños animales. Habrá que considerar que en las intervenciones prolongadas o aquellas en las que hay pérdida importante de sangre, se puede requerir el reemplazo intravenoso de electrolitos y/o una transfusión de sangre (Olfert, 1993; Birchard, 1994; Olivares, 1996).

La recuperación de la anestesia es un proceso delicado que requiere una vigilancia frecuente, a veces continua, poniendo especial énfasis en el cuidado de la temperatura corporal, ya que los efectos post-anestésicos provocan hipotermia que en ocasiones puede ser mortal. Dependiendo de la anestesia, la recuperación puede variar de pocos minutos hasta varias horas. Deber haber personal calificado disponible para vigilar el animal a lo largo del período entero de recuperación. En el caso de roedores recién nacidos en período de recuperación, se deberán tomar precauciones para impedir el canibalismo materno.

Bajo ninguna circunstancia, se deberá dejar a un animal sin vigilancia hasta que se haya recuperado totalmente. Hay que cumplir con numerosas actividades de cuidados durante el período postoperatorio inmediato, tales como: remover el tubo endotraqueal (si fue utilizado), mantener o remover las cánulas intravenosas, dar frecuentes cambios de posición al animal para evitar contusiones y problemas vasculares y respiratorios, además de registrar los parámetros fisiológicos generales. Todo eso se deberá realizar en un lugar designado y apropiado para los cuidados intensivos. Una vez que el animal come y bebe normalmente, y los parámetros fisiológicos estén estables o dentro de límites normales, se pueden dejar de proporcionar los cuidados intensivos para volver a un manejo normal. Sin embargo, se deberá continuar la vigilancia cuidadosa de los animales; si existen heridas o remoción de suturas éstas necesitarán cuidados posteriores dependiendo del modelo establecido, los cuidados postoperatorios de largo plazo pudieran involucrar dietas especiales, una medicación diaria, fisioterapia o cualquier otra forma de tratamiento. Se deberán monitorear todos los animales para señales de infección postquirúrgicas u otras complicaciones. Una de las metas del equipo de cirugía debe ser siempre la de minimizar cualquier dolor o angustia en los animales. (Olfert, 1993; Birchard, 1994; Olivares, 1996).

Eutanasia

La eutanasia se refiere a los procedimientos empleados para inducir de manera humanitaria la muerte de los animales empleados en la investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza; con el propósito de eliminar o disminuir al mínimo el dolor y el estrés previo y durante el procedimiento; para lograrlo cualquier técnica aplicada deberá causar en el animal: rápida inconsciencia, paro cardíaco y/o respiratorio y pérdida de la función cerebral. Además, deberá reducir al mínimo la perturbación emocional, la incomodidad y/o el sufrimiento experimentado por la persona que lleve a cabo el procedimiento (Close, 1996, Close,., 1997; NOM-062-ZOO-1999; Álvarez Gómez de Segura & Tendillo Cortijo 2001; Overmyer, 2015)

No existe un solo método de eutanasia que se aplique a todas las especies y a todas las circunstancias. El método seleccionado para la eutanasia dependerá de varios factores, entre los que se destacan la naturaleza del estudio, la especie animal involucrada y su número. Dependiendo de la especie, el procedimiento debe ser individual. Sin embargo, existen criterios para la elección del método de eutanasia:

- a) Una muerte sin señales de pánico, dolor o desamparo
- b) Manejar un tiempo mínimo para llegar a la inconsciencia, es decir, casi inmediato; confiable y reproducible

- c) Seguridad para el personal involucrado
- d) Mínimo de efectos fisiológicos y psicológicos indeseables sobre el animal
- e) Compatibilidad con los requerimientos y propósitos del estudio científico Efectos emocionales mínimos o nulos sobre el observador y el operador
- f) Impacto mínimo sobre el medio ambiente o la ecología
- g) Equipo mecánico sencillo, barato y de fácil mantenimiento
- h) El local deberá estar lo más lejos posible y separado de las salas donde se alojan los animales

Métodos químicos:

- a) *Agentes inhalatorios*: gases anestésicos, gases no anestésicos.
- b) *Agentes no inhalatorios*: tranquilizantes

a) Vía inhalatoria: Para efectos de los agentes inhalatorios, los animales son conducidos a cámaras o bien mediante mascarillas que deben estar diseñadas adecuadamente, asegurando la distribución uniforme del gas y la rápida exposición de los animales a una concentración alta del agente. Hay que considerar que en el caso de los animales recién nacidos, éstos son más resistentes a la hipoxia y tardan más tiempo en morir; por ello hay que utilizar otros métodos (Pritchett, 2005).

Es importante seleccionar agentes que no sean desagradables al ser inhalados, porque algunos pueden ser irritantes y por ello estresantes. Cuando se administren agentes inhalatorios hay que tomar precauciones de seguridad, utilizando un equipo adecuado de recogida de gases y se debe confirmar la muerte. Se deberán reducir al mínimo los riesgos que representan para la salud del hombre la exposición aguda y/o crónica a la mayoría de estas sustancias, por ejemplo, el éter: explosiones, el halotano: narcosis, el nitrógeno y el monóxido de carbono: hipoxemia y el óxido nitroso: adicción.

El más utilizado en la vía inhalatoria es el dióxido de carbono (CO₂) en concentraciones superiores al 60%, el dióxido de carbono (anhídrido carbónico) actúa como un agente anestésico y produce rápidamente la pérdida de conciencia, es barato, no explosivo, no se acumula en los tejidos y no ocasiona cambios en la arquitectura celular (Conlee, 2005). El CO₂ es muy eficaz y humanitario para la eutanasia de la mayoría de los animales pequeños utilizándolo por encima del 70% de concentración (Close, 1996, Close, 1997; Álvarez Gómez de Segura & Tendillo Cortijo 2001; Overmyer, 2015).

b) Vía no inhalatoria: La administración intravenosa de fármacos que causan la muerte es el método más rápido y confiable de llevar a cabo la eutanasia. Es aceptable la administración intraperitoneal cuando la vía intravenosa resulte impráctica o imposible, por ejemplo, animales que pesan 7 kg o menos, siempre y cuando el fármaco no sea irritante ni contenga bloqueadores neuromusculares. La velocidad de acción de los barbitúricos dependerá de la dosis, la concentración, velocidad y vía de administración, las cuales deberán combinarse para inducir la eutanasia suavemente y con una mínima incomodidad para el animal. Los más utilizados son los barbitúricos, la dosis de pentobarbital sódico administrado por vía intravenosa es de 90 a 210 mg/kg, para la mayoría de las especies; ratas y ratones requieren una dosis mayor (120 a 210 mg/kg).

Los agentes paralizantes (p. ej., agentes como el curare, la succinilcolina, la gallamina, el sulfato de nicotina, las sales de magnesio o de potasio, y otros agentes bloqueadores neuromusculares) Nunca deben ser utilizados solos para realizar la eutanasia en animales (Close, 1997; Álvarez Gómez de Segura & Tendillo Cortijo 2001; Overmyer, 2015).

Métodos físicos

Los métodos incluyen la irradiación por microondas, dislocación cervical (ver figura 10), decapitación, perno cautivo penetrante, electrocución. Los métodos físicos se restringen normalmente a los animales que se manejan fácilmente, tales como ratón, rata, conejo menor de 1 kg. Si el protocolo de investigación requiere un método físico de eutanasia porque otros métodos podrían invalidar los resultados del estudio científico, el uso de tales métodos debe ser justificado por el científico y aprobado por que el comité de protección de los animales.



Figura 10. Eutanasia. En la imagen se muestra dislocación cervical en ratón.

Personal involucrado: funciones y responsabilidades del responsable del bioterio

Es el veterinario el responsable de la salud y el bienestar de todos los animales de laboratorio utilizados en la institución. La institución le provee la suficiente autoridad para el acceso de todos animales y el manejo del programa del cuidado veterinario, así como otros aspectos de cuidado y uso animal, asegurando que el programa cumpla con las disposiciones oficiales (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

Debe ser un médico veterinario titulado con experiencia comprobable en la medicina y ciencia de los animales de laboratorio. Además de ser el responsable administrativo, deberá poseer destreza para desarrollar conceptos, habilidades para el manejo de personal, habilidad técnica, pensamiento crítico y tener la capacidad para identificar y resolver problemas. Realiza actividades como: supervisión de todas las actividades del personal técnico, suministro de dietas, limpieza y uso de equipo especial, manejo de técnicas experimentales y tratamientos especiales, entrenamiento de auxiliares y técnicos, control de insumos, entrega de animales y equipo, entre otras (NOM-062-ZOO-1999).

Personal técnico

Auxiliar de técnico de bioterio: Personal capacitado y preferentemente certificado para realizar los procesos de atención diaria de los animales de laboratorio (alimentación, limpieza, inmovilización física) con capacidad para comprender su responsabilidad en el equipo de investigación, así como los aspectos éticos y legales relacionados con el uso de los animales de laboratorio. Asimismo, deberá ser capaz de identificar signos de enfermedad, conducta anormal, dolor y sufrimiento. Efectúa actividades como: limpieza de los animales, limpieza y descontaminación de cuartos, equipo y materiales del bioterio, proporciona alimento, registra las condiciones ambientales, sujeta y sexa animales, identifica y anota datos básicos en los registros, entre otras (NOM-062-ZOO-1999).

Técnico de bioterio: Personal capacitado y preferentemente certificado para realizar además de los procesos del auxiliar técnico los relacionados con el cuidado, producción y manejo experimental básico de los animales de laboratorio. Deberá contar con

conocimientos de anatomía y fisiología de los animales de laboratorio, así como principios básicos de anestesia y analgesia. Efectúa actividades de esterilización de equipo y materiales, inmoviliza, toma muestras biológicas y administra sustancias y tratamientos bajo indicación del médico veterinario o del investigador, registra los datos reproductivos de la colonia y revisa las actividades del auxiliar técnico (NOM-062-ZOO-1999).

Tecnólogo o supervisor técnico: Personal capacitado y preferentemente certificado para realizar procesos descritos anteriormente (auxiliar y técnico), además de procesos administrativos y de supervisión media relacionados con la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Usuarios

Son los investigadores y estudiantes involucrados en el manejo de animales de experimentación, los cuales deberán poseer experiencia comprobable para realizar procedimientos con animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Entrenamiento y capacitación

Todo el personal involucrado con el cuidado y uso de los animales deberá estar adecuadamente educado, entrenado y/o calificado en los principios básicos de la ciencia de los animales de laboratorio, todo ello para garantizar mejores resultados experimentales y asegurando además el bienestar de los animales. Un tipo de entrenamiento indispensable para todos aquéllos que trabajen con animales, es el de reconocer objetivamente las expresiones o signos de dolor y estrés en ellos y como aliviarlas o reducirlas (Langford, 2010). El número del personal calificado para llevar a cabo un proyecto dependerá de varios factores, incluyendo el tipo y el tamaño de la institución, la estructura administrativa para la prestación adecuada de los animales (con las características físicas, el número y la especie) y la naturaleza de la investigación (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

Las instituciones son responsables de proporcionar la enseñanza, los recursos adecuados para apoyar la capacitación del personal; así como de la supervisión y evaluación efectiva de los programas de formación. Todo programa de capacitación del personal deberá estar documentado y realizarse de manera regular (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010). El personal deberá recibir la capacitación y/o tener la experiencia para completar las tareas para las cuales según el programa, el personal con experiencia es responsable (por ejemplo la cría de animales, la administración y uso de la tecnología médica) (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010). Existe una serie de opciones para los técnicos y personal encargado del mantenimiento de los animales de laboratorio; programas de certificación para técnicos y tecnólogos en animales de laboratorio, y hay varios materiales de capacitación disponibles. También deberán de participar en las actividades de educación continua y ser animados a participar en las reuniones de ciencia de animales de laboratorio tanto locales como nacionales y en otras organizaciones profesionales (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

La institución estará encargada de proveer una apropiada educación y entrenamiento para los miembros de la investigación; incluyendo investigadores principales, directores de estudios, técnicos de investigación, becarios, estudiantes e investigadores visitantes, para asegurar el conocimiento necesario y la experiencia para el manejo de los animales (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

La capacitación deberá preferentemente adaptarse a las necesidades específicas de cada investigación, sin embargo, todos los grupos de investigación deben de recibir una

capacitación básica y general en el cuidado y uso de los animales y su legislación; así como su función, y los conceptos de las tres “R”, salud ocupacional y los problemas de seguridad relacionados con el uso de los animales, manejo de los animales, la técnica quirúrgica aséptica, la anestesia y la analgesia, la eutanasia entre otros temas, como lo requiere la ley (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

El personal deberá estar capacitado en: (Fuentes F.M., 2008):

- Identificar las principales enfermedades zoonóticas que afectan a los animales de laboratorio.
- Manejo de animales de laboratorio, según las buenas prácticas de crianza.
- Peligros microbiológicos y físicos (incluyendo aquellos relacionados con la radiación y las alergias).
- Limpieza y sanitización de ambientes y materiales.
- Higiene personal.
- Salud y seguridad ocupacional.
- Manejo de materiales de desecho.
- Seguridad química e industrial.
- Manejo de equipos utilizados en la producción: autoclaves, hornos, caldero, ablandador de agua, cabinas de seguridad biológica y otros.

Programa interno de cuidado y uso de los animales

Un programa efectivo de manejo deberá tener claramente definidos los roles en cuanto a las responsabilidades, reguladas y dirigidas por una autoridad. Los roles definidos nos ayudan a tener una buena organización estructural en cuanto a las relaciones interpersonales y además ayudan a delimitar clara y transparentemente las responsabilidades de cada quien. Debemos de asegurarnos de que todo el personal involucrado conozca y entienda las políticas y procedimientos establecidos para la calidad y el buen manejo de la salud animal (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

El programa interno de cuidado y uso de los animales deberá abarcar todas las actividades llevadas a cabo por una institución que tienen impacto directo en el bienestar de los animales, incluidas las políticas, procedimientos veterinarios y del personal para el cuidado de los animales (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010). La atención médico-veterinaria es un aspecto de gran importancia dentro del programa de cuidado y uso de los animales. Una adecuada atención debe contener programas eficaces de: medicina preventiva; vigilancia, diagnóstico, manejo, tratamiento y control de enfermedades; evaluación de la salud y bienestar animal y métodos de eutanasia adecuados (Fuentes F.M., 2008). El mantenimiento de los animales en buen estado de salud, depende en mayor parte de que el personal adopte ciertas normas y formas de trabajo para mantener las barreras sanitarias con continuidad en el tiempo. Un buen programa de cuidado y manejo ofrece el ambiente y alimentación que permite a los animales crecer, reproducirse y mantener una buena salud (Fuentes F.M., 2008).

Subprograma de evaluación médica y medicina preventiva

Se recomienda la implementación de un programa de evaluación médica y medicina preventiva; el cual deberá ser realizado por personal certificado en el área. La implementación de la valoración de salud y/o historial médico se realizará individualmente a cada empleado para la valoración de potenciales riesgos. Se deberá de realizar una valoración médica periódica en el personal; el personal que requiera de protección

respiratoria deberá ser evaluado periódicamente por un médico para asegurar que se encuentre física y psicológicamente estable; estableciendo una inmunización apropiada (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

Se recomienda elaborar una historia clínica y la realización de evaluaciones médicas periódicas, debiendo implementarse un plan de inmunización antitetánica, para personal que cuida de los animales (Fuentes F.M., 2008). Asimismo, deberá realizarse vigilancia microbiológica, como análisis nasofaríngeos y análisis coproparasitoscópico (dos veces por año) (Fuentes F.M., 2008).

Subprograma de salud y seguridad ocupacional

Cada institución deberá de mantener un programa de salud y seguridad ocupacional, como parte esencial del programa general en el cuidado y uso de los animales de laboratorio. Este programa deberá de ser consistente con las relaciones locales, estatales y federales, centrándose en el mantenimiento de un lugar de trabajo seguro y saludable. El programa de salud y seguridad dependerá de las instalaciones, las actividades de investigación, los peligros y las especies animales en cuestión (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010).

La institución deberá de contar con un comité de seguridad que facilite la comunicación y promueva la evaluación de la salud y la seguridad en el lugar de trabajo. De esta manera se asegura que los riesgos asociados con el uso experimental de los animales sean identificados y reducidos al mínimo aceptable (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010). Y por otro lado, el bioterio deberá contar con las medidas sanitarias y de control que asegure el control absoluto de los animales en experimentación (escape, contacto con roedores silvestres, eliminación de cadáveres u otros), así como protección del personal en contacto con los animales, sus partes o sus desechos (NOM-062-ZOO-1999).

Los peligros potenciales incluyen agentes biológicos, agentes químicos, radiación y peligros físicos (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010). Por lo que el personal deberá ser capaz de identificar y evaluar los peligros y riesgos que son propios cuando se trabaja con ratones (mordidas, alérgenos y zoonosis) y de los materiales utilizados en el bioterio de producción y/o de experimentación (agentes químicos de limpieza y biológicos peligrosos) en la intensidad de la exposición, su duración y frecuencia de uso, así como si la susceptibilidad del personal (Fuentes F.M., 2008).

El personal deberá adoptar normas y formas de protección, para brindar buenas condiciones de mantenimiento y salud a los animales de laboratorio. Para ello deberá contar con procedimientos e instrucciones normalizados como:

- Procedimiento de higiene de personal.
- Uso de la vestimenta completa.
- Procedimiento de ingreso al bioterio de producción o bioterio de experimentación.
- Procedimientos de limpieza de ambientes, con programas de limpieza y rotación de desinfectantes, efectivo.
- Procedimientos de limpieza y desinfección de materiales.
- Procedimiento de eliminación de desechos.
- Programa de control de plagas.
- Programa de capacitación al personal.

- Flujo de personal y materiales por las zonas indicadas, para evitar diseminación de material contaminado en zonas limpias.

Prácticas de seguridad e higiene: El uso de los elementos de protección del personal (mascarilla, guantes, cofias, zapatones, batas, etc.), plasmados en los procedimientos normalizados de limpieza y desinfección de materiales e instalaciones conjuntamente con los flujos adecuados de personal y material, constituyen una verdadera barrera sanitaria, que se recomienda mantenerla vigente a pesar de las limitaciones en equipamiento e infraestructura (Fuentes F.M., 2008).

El personal deberá mantenerse limpio, utilizando ropa apropiada dentro de los ambientes del bioterio de producción o de experimentación, deberá lavarse las manos y cambiarse de ropa con la frecuencia necesaria para mantener la higiene personal. Esta ropa no deberá utilizarse fuera de las instalaciones (Fuentes F.M., 2008). Incluso se considera apropiado que el personal se duche cuando vaya a tener contacto o manejo con los animales (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010). Entre las prácticas de higiene y de seguridad más importantes se encuentran:

- a) Uso de una vestimenta completa y de uso exclusivo en el bioterio.
- b) Todo animal encontrado en la sala, libre, debe ser eliminado y no devuelto a la colonia.
- c) Se debe trabajar con el menor ruido posible y en forma de reducir el estrés ocasionado a los animales.
- d) Uso de gafas de seguridad cuando el procedimiento de investigación lo requiera.
- e) Tener conocimiento de la localización del botiquín de primeros auxilios y rutas de evacuación ante una emergencia.
- f) Utilizar guantes quirúrgicos para el manejo de los animales.
- g) No llevar nada a la boca mientras se esté en el bioterio.
- h) Mantener el área limpia.
- i) Uso de equipos en buenas condiciones.
- j) Eliminación de desechos en la forma correcta. Uso de bolsas rojas para material biológico contaminado y bolsas de color negro para material sucio o desechos no contaminados.
- k) Rotular correctamente las jaulas, especialmente en las salas de reproductores monogámicos.
- l) Restringir el acceso a personal extraño, permitir sólo el acceso a personas autorizadas.
- m) Informar inmediatamente al jefe o coordinador, cualquier accidente.
- n) Si tiene problemas respiratorios (asma), neurológicos o alergias infórmelo por escrito a su jefe inmediato.
- o) No debe permitirse al personal comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos en las salas de animales.
- p) Desecho adecuado de los residuos biológicos infecciosos (NOM-087-ECOL-SSA1-2002).

Limpieza y desinfección: Toda área de trabajo deberá de contar con un control (agenda) donde podamos programar las actividades de acuerdo a las necesidades específicas de cada bioterio, todo ello para ser eficientes, designando tareas específicas a cada miembro del personal involucrado, evitando confusiones y el entorpecimiento del trabajo. . En dicho documento podemos poner actividades como:

- Lavado de cajas, rejas y bebederos de los animales de acuerdo a nuestro número de población y necesidades.
- Lavado diario de jaulas y desinfección del cuarto de animales.
- Limpieza programada con el personal del aseo o persona encargada.
- Manejo, recolección y disposición de los RPBI.
- Programas de fumigación en caso de ser requerido.
- Desinfección de los cuartos de animales y otras áreas que lo requieran

Las cajas y jaulas se mantendrán limpias, secas y en condiciones ambientales aceptables. Todos los días se observarán los animales para detectar cambios de comportamiento, enfermedades, heridas o muerte. El agua suministrada a los animales deberá ser potable y a libre acceso. Cada una de las especies se alojará en cuartos separados de otras especies o de animales con diferente condición microbiológica. Cuando se cuente con sistema de aislamiento, podrán alojarse en el mismo cuarto (NOM-062-ZOO-1999).

Se recomienda cambiar el material del lecho de dos a tres veces por semana para evitar concentraciones altas de amoníaco que son perjudiciales para los animales, sin embargo, esta frecuencia también dependerá del peso y cantidad animales albergados así como de la ventilación del ambiente. Se recomienda tener un orden como empezar por la primera jaula de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo. Usar ese orden para cambiar el lecho, dar la comida y el agua. De esa forma se evita que por distracción, alguna jaula quede sin cambiar o sin alimento o agua. En cada cambio de lecho, se deberán lavar las jaulas utilizando detergente, esponja o escobilla, luego desinfectar con soluciones como hipoclorito de sodio 0.5% o benzalconio al 5%. En el caso de jaulas de material autoclaveable, se puede esterilizar la jaula (Fuentes F.M., 2008).

En el caso de los frascos bebederos éstos deberán ser lavados y desinfectados cada vez que se suministre agua de bebida. Se lavarán con agua, escobilla y detergente toda la superficie interna del frasco, igual proceder con los goteros para lo cual se usa un cepillo especial. Luego, desinfectar con agua caliente o con algún desinfectante como hipoclorito de sodio sumergiendo el bebedero durante una hora o bien esterilizarlos en autoclave (Fuentes F.M., 2008).

Control de plagas: Si bien es cierto que un edificio adecuadamente planificado y construido debería ser a prueba de las plagas, no está necesariamente libre de ellas. Las plagas entran mediante los alimentos, la cama, la gente y los animales. Los insectos y los artrópodos llevados así en una instalación, pueden actuar como los anfitriones intermediarios de ciertos parásitos, y también pueden transmitir mecánicamente bacterias y otros agentes patógenos (Ernest D., 1998)

Es importante llevar el registro o documento donde se especifiquen las fechas de fumigación en caso de ser requerido, control de plagas o cualquier evento presentado de acuerdo a su necesidades y hábitat que los rodea. Los planes de control deberán ajustarse a las necesidades correspondientes.

Las barreras sanitarias son un sistema que combina instalaciones físicas, equipamiento y procedimientos operacionales, que separan una zona limpia de una zona sucia o de un lugar menos limpio de otra más limpia, minimizando la probabilidad de que organismos patógenos se pongan en contacto con la población animal del bioterio. Algunos ejemplos de barreras sanitarias son (Ernest D., 1998):

- Instalaciones físicas: esclusas, vestidores, con presión diferencial de aire, renovación de aire/hora, filtración y tratamiento de agua.
- Equipamiento: implementos de protección personal, como vestimenta, mascarilla, gorro y guantes. Uso de pediluvios con desinfectante de una sala a otra sala, barreras anti roedores y anti insectos.
- Procedimientos operacionales; de ingreso de personal, de materiales, de limpieza y desinfección de ambientes y de materiales.

REFERENCIAS

Training Manual ALAT, (1999), American Association for Laboratory Animal Science (AALAS).

Álvarez Gómez de Segura I, Tendillo Cortijo F.J. (2001). Métodos de anestesia, analgesia y eutanasia. En: Zúñiga J M, J A Tur, N Milocco, R Piñeiro. Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal, McGraw-Hill/Interamericana, España, Pp 385-418.

Birchard. S. J. 1994. Manual clínico de pequeñas especies. Ed Mc Graw-Hill. pp. 1491-1686.

Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, et al: Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. Lab Anim 30; 293-316, 1996.

Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C. (1997). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission. Lab Anim. 31(1):1-32.

Conlee, K.M., Stephens, M.L., Rowan, A.N., King, L.A., (2005). Carbon dioxide for euthanasia: concerns regarding pain and distress, with special reference to mice and rats. Lab Anim. 39(2):137-61.

Diehl, K.H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.M. & van de Vorstenbosch, C. (2001). A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. J. Appl. Toxicol. 21:15–23.

Ernest D. Olfert, DMV; Brenda M. Cross et.al. (1998) Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación. Cap. V, CCPA Manual, vol. 1 (2da edición).

Falconi de La Fuente, E., García Magaña, L., Marín Reyes, O., PadrónLópez, R.M., Rivas Acuña M. G. & Vargas Simón, G. (Eds.) (2010). Manual para el manejo de animales con fines de experimentación y enseñanza. Universidad JuárezAutónoma de Tabasco.

Fuentes F.M., Mendoza R.A., Rosales A.L., Cisneros R.A. (2008). Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Instituto Nacional de Salud (Perú). Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Lima.

Fullerton F, Greenman D, Kendall D. (1982). Effects of storage conditions on nutritional qualities of semipurified (AIN-76) and natural ingredient (NIH-07) diets. J. Nutr. 112(3):567-473.

Gamble M. R., Clough G. (1976). Ammonia build-up in animal boxes and its effect on rat tracheal epithelium. Lab. Anim. (London) 10(2):93-104.

Gargiulo S., Greco A., Gramanzini M. (2012). Mice anesthesia, analgesia, and care, Part I: anesthetic considerations in preclinical research." ILAR Journal, 53 (1):E55–E69.

Gordon, C. J. (1993). Temperature regulation in laboratory rodents. Cambridge University Press. New York.

Hau, J. and Van Hoosier, G.L. (2002). Handbook of Laboratory Animal Science, Volume I: Essential Principles and Practices, CRC Press, London.

Guide for the care and use of laboratory animals (2010). Institute of Laboratory Animal Resources. Committee on Care, Use of Laboratory Animals, & National Institutes of Health (US). Division of Research Resources. National Academies.

Institute for Laboratory Animal Research (2010). Humane Endpoints for Animals Used in Biomedical Research and Testing. ILAR Journal, 41(2).

Krinke, G.J. (Ed.) (2000): The laboratory rat. Academic Press. London.

Kurien, B.T., Everds, N.E. & Scofield, H. (2004) Recolección experimental de orina en animales: Revisión. Laboratory Animals, 38: 333-361.

Langford, D.; Bailey, A.; Chanda, M.; Clarke, S.; Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse; (2010), Nature Methods, Vol. 7, No. 6, June, 447-452.

Machholz E1, Mulder G, Ruiz C, Corning BF, Pritchett-Corning KR. (2012) Manual restraint and common compound administration routes in mice and rats. *J Vis Exp.* 26:2771. doi: 10.3791/2771.

Ministerio de salud del Perú. (2008). Instituto Nacional de salud. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. LIMA

Morton, D.B. Jennings, M., Buckwell, A., Ewbank R. Godfrey, C., Holgate, B., Inglis, I., James, R., Page, C., Sharman, I., Verschoyle, R., Westall, L., Wilson A.B. (2001). Refining procedures for the administration of substances. *Laboratory Animals* 35: 1:41.

New A. E. (1978). Identification of Small Animals—Procedures and Problems. *Clinical toxicology*, 13(5), 601-610.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Artículo 2.2. 14 de diciembre de 2009.

Olfert, E.D., Cross, B.M., & McWilliam, A.A. (1993). Guide to the care and use of experimental animals. Ottawa, Canada, Canadian Council on Animal Care. Vol. 1.

Olivares G. A. 1996. Manual para el manejo de animales de laboratorio. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Overmyer K.A., Thonusin C, Qi NR, Burant CF, Evans CR. (2015) Impact of anesthesia and euthanasia on metabolomics of mammalian tissues: studies in a C57BL/6J mouse model. *PLoS One.* 10(2):e0117232.

Pritchett, K., Corrow, D., Stockwell, J., Smith, A. (2005). Euthanasia of neonatal mice with carbon dioxide. *Comp Med.* 55(3):275-81.

Raynor T.H., Steinhagen W.H., Hamm, T.E. (1983) Differences in the microenvironment of a polycarbonate caging system: bedding vs raised wire floors. *Lab. Anim.* 17: 85.

Turner JG., Bauer CA., Rybak LP., (2007); Noise in animal facilities: Why it matters; *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*; Jan; 46 (1): 10-3.

Van Zutphen, L.F.M., Baumans, V., Beynen, A.C. (2001). Principles of Laboratory Animal Science, second edition, Elsevier Science, Amsterdam.

Wolfensohn, S., Lloyd, M. (2003). Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, third edition, Blackwell Science Ltd. Oxford.

Zúñiga J.M. & Miloco, S.N. (2001). Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal. Madrid, España. Mc Graw Hill-Interamericana.

Capítulo VIII

Diseño de un laboratorio de investigación para vectores transmisores de enfermedades (insectario)

Darwin Elizondo, Armando Elizondo

INTRODUCCIÓN

Los insectarios son la base para el funcionamiento de diferentes grupos de investigación y principalmente son destinados a investigaciones en el campo de salud pública, entre otros. En el presente capítulo se habla de insectarios donde se trabaja con especies de insectos de importancia en salud pública (mosquitos), sin embargo por la infraestructura básica de este, podría ser utilizado para la cría de otros artrópodos.

De manera importante las buenas prácticas de laboratorio, siempre deberán estar presentes en cada uno de los integrantes del mismo, por lo que para trabajar en un insectario, es responsabilidad del Investigador principal, la capacitación del personal, primero en las buenas prácticas de laboratorio, y después en relación a la bionomía de la especie que se va a trabajar, siendo que cada una de ellas tendrá requerimientos específicos en su manejo.

En México por parte de los sistemas de salud gubernamentales se cuentan con 11 unidades de investigación entomológica (insectarios), mas no se conoce el número exacto de los mismos en instituciones de educación superior, institutos de investigación, o incluso en empresas. Si bien el espacio físico de construcción pudiera ser de gran magnitud, en muchas ocasiones los insectarios son establecidos en base a espacios ya construidos los cuales se suelen adecuar para el diseño del mismo, sin embargo indiscutiblemente en la puesta en marcha de un insectario, se requieren al menos tres áreas básicas para el manejo de los mosquitos: un larvario, un área de mosquitos adultos y un área de experimentación o bioensayos.

Puntos a considerar en la puesta en marcha de un insectario. Objetivo(s) del trabajo a desarrollar

Primordialmente se deberán establecer cuáles serán los objetivos del trabajo a desarrollar en el insectario, esto es en cuanto a la experimentación final que será realizada con los artrópodos que se manejarán en él.

En el caso de insectarios dentro de la rama de salud pública, la finalidad comúnmente va en el sentido de realizar bioensayos en larvas y/o adultos de insectos, implementando experimentos con insecticidas, para determinar su resistencia o susceptibilidad a los mismos. Además de esto, también se pueden realizar pruebas que van mas en el sentido de la incriminación vectorial, en donde ya se contemplan insectarios con bioseguridad nivel 3.

Sin embargo, no solo existen este tipo de insectarios, también se encuentran en los que se trabaja con insectos modificados genéticamente, además de en los que realizan ensayos de repelencia, entre otros.

Sin importar la finalidad de los estudios que se realizan en los insectos, lo que debe quedar implícito es el hecho que se requiere una gran cantidad de los mismos para todas las

repeticiones de cada experimento, por lo tanto la necesidad de un insectario, es imperativa dentro de los diversos grupos de investigación.

Normatividad y reglamentación

Antes de la creación del insectario, se debe de tomar en cuenta la reglamentación y las recomendaciones que son emanadas por los organismos rectores, por lo que se debe de conocer y acatar su contenido. En general se deben de tomar muchas precauciones para evitar el escape de los insectos y artrópodos al ambiente, que en algunos de los casos no se encuentran distribuidos en las zonas donde está el insectario ubicado, y con mayor razón, si la investigación es acerca de los patógenos que transmiten.

Ley General de Salud

La creación de un insectario para la cría de insectos o artrópodos de importancia médica, veterinaria y económica, viene de la necesidad de obtener crías masivas de estos, con la finalidad de la generación de nuevo conocimiento científico, por lo que se encuentra en concordancia con la Ley General de Salud, donde en su artículo segundo menciona que una de las finalidades del derecho en la protección en salud, es el desarrollo de la enseñanza y la investigación científica y tecnológica para la salud.

En el artículo 139° en materia de enfermedades transmisibles, se menciona entre ellas a las enfermedades transmitidas por vectores, en donde las medidas que se requieran para la prevención y control de estas, deberán ser observadas por los particulares, además, para esta acción se pueden tomar algunas medidas, una de ellas, es la destrucción o control de vectores y reservorios o de las fuentes de infección naturales o artificiales, siempre que representen peligro para la salud. Por lo que en el caso de trabajar con patógenos infecciosos en los especímenes de insectario, se deben de extremar las precauciones.

1. Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores.

Derivado del quehacer típico de un insectario, se debe de tomar en cuenta esta Norma Oficial Mexicana en cuanto al manejo de las enfermedades transmitidas por vector, listados de insecticidas recomendados, descripción de pruebas de susceptibilidad, manejo del equipamiento para su aplicación y medidas de seguridad, ya que todo lo anterior esta normado en ella.

2. Manual para la colecta, cría e instalación de insectario para *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762).

Para la generación de nuevos insectarios, se deben de seguir las recomendaciones del manual para la colecta, cría e instalación de insectario para *Aedes aegypti* emanado del Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades (CENAPRECE), ya que en él se enlista y se describe el funcionamiento de los insectarios que son utilizados por las autoridades de salud en México.

3. Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.

Se debe de seguir esta norma, en el caso de tener algún convenio con los bancos de sangre, esto cuando se obtiene de ellos unidades para la manutención de las colonias de mosquitos adultos, considerando que la mayoría de las especies de la familia Culicidae presentan hábitos hematófagos antropofílicos.

4. Norma Oficial Mexicana NOM-029-ZOO-1995, características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoonosanitaria.

En caso de utilizar animales para la alimentación de las colonias y se pretenda construir un bioterio para su manejo, se debe de tomar en cuenta esta norma, ya que hace referencia a especificaciones de construcción de estos.

5. Norma Oficial Mexicana NOM-232-SSA1-2009, plaguicidas: que establece los requisitos del envase, embalaje y etiquetado de productos grado técnico y para uso agrícola, forestal, pecuario, jardinería, urbano, industrial y doméstico.

Esta Norma se debe de seguir, si el tipo de investigación que se pretende hacer con los artrópodos, es referente a ensayos para su control por medio de plaguicidas (Insecticidas, acaricidas, etc.).

6. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Si el tipo de estudio que se va a realizar es referente a la inoculación de agentes patógeno-infecciosos en artrópodos por cualquier método, se debe de seguir esta norma. En esta se menciona sus clasificaciones, manejo de animales de bioterio con infección, así como la disposición final de los residuos peligrosos biológicos infecciosos, por tanto para la destrucción de cualquier colonia de insectos de laboratorio, se debe de seguir lo citado en ella.

7. Reglamento de la ley de bioseguridad de organismos genéticamente modificados. Nuevo reglamento publicado en el Diario Oficial de la Federación el 19 de marzo de 2008 texto vigente. Última reforma publicada DOF 06-03-2009.

Si el tipo de investigación a realizar es para la obtención, pruebas de laboratorio, semicampo o liberación de artrópodos o mosquitos genéticamente modificados, se debe de utilizar este reglamento, además de seguir los protocolos internacionales tales como:

- A. Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología del convenio sobre la diversidad biológica. Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2000.
- B. The Guidance Framework for testing genetically modified mosquitoes WHO, 2014.

Diseño del insectario: especificaciones

De manera general, un insectario debe de contar con al menos tres áreas o cuartos específicos para la crianza de mosquitos u otros artrópodos, pero es recomendable contemplar un área más, como espacio de cuarentena de insectos provenientes de campo. Primeramente, se requiere de un área o cuarto diseñado para mantener los contenedores con agua (charolas), que contienen los estadios larvales o inmaduros de los mosquitos, los cuales deben estar colocados sobre superficies o mesetas de trabajo no móviles, para evitar el derrame de líquidos. Otra área sería la destinada para el acomodo de las jaulas de mosquitos adultos u otros artrópodos que no requieran de fase acuática en su ciclo de vida, y finalmente un área de laboratorio, donde se realicen los bioensayos con larvas o adultos. Las áreas descritas aquí para la crianza de larvas y adultos, deberán tener el fotoperiodo controlado, así como la temperatura y humedad relativa. El área de laboratorio es deseable que cuente con climatización de confort para el personal que realiza labores allí, además que esta climatización, permite generar una barrera amortiguadora entre la temperatura ambiental y la que debe prevalecer en el área de crianza.

Ahora bien un insectario como tal, debe de tener las características al menos de un laboratorio de bioseguridad nivel 1 y en lo posible ser una área separada de otros laboratorios, sin embargo, resulta común, el habilitar espacios dentro de laboratorios para este fin, o incluso existen cámaras bioclimáticas comerciales con las condiciones adecuadas para la crianza de insectos, que se pueden adquirir para implementar su uso dentro de los laboratorios, donde no únicamente se trabaja con insectos. De lo más rudimentario a lo más sofisticado, se pueden encontrar cuartos dentro de casas habitación u otras instalaciones usadas para el almacenaje de equipos de autoridades de salud, los cuales han sido adecuados con equipos tan simples como un temporizador para el control de la iluminación, calentadores de uso doméstico, y en los casos más elaborados, utilizando humidificadores de ambiente domésticos.

Si se va a adecuar o remodelar un área o laboratorio a fin de usarlo de insectario, o se va a construir de Novo, es recomendable seguir especificaciones con acabados de laboratorio, los cuales incluyen, paredes pintadas con pinturas lavables y a prueba de agua, de preferencia de color blanco o claros (pinturas epóxicas o de látex); los pisos en este caso no son requeridos con cubiertas plastificadas o curvas sanitarias como otro tipo de laboratorio, aquí lo más importante es que no existan grietas y que sean superficies a prueba de agua y fáciles de limpiar, dado que derrames de agua son muy comunes en estas áreas, por tanto es deseable contar con un drenaje del piso, o la facilidad de poder retirar el agua derramada de manera sencilla.

El agua es la parte más importante para la vida y más para insectos con fases acuáticas, por lo que es indispensable que el insectario cuente con una fuente de agua y drenaje de la misma, así como un lugar donde lavar materiales, además de un espacio para tener un tanque para el reposo de agua (decloración).

Por otra parte, ya que el fotoperiodo debe de ser controlado por medio de un temporizador, un insectario debe de ser un área sin ventanas o en caso de que el área cuente con ellas, estas deben de estar cubiertas minimizando la entrada de luz del exterior, e incluso trabadas para no ser abiertas, esto para evitar potenciales escapes de mosquitos liberados accidentalmente.

En cuanto a los accesos, es recomendable tener una esclusa de doble puerta bien iluminada entre el área de insectario y el exterior a fin de evitar el escape de mosquitos. Para este fin se pueden utilizar esclusas diseñadas en material mosquitero y aluminio o incluso de puertas de cristal o plástico preferentemente opaco, que cuenten con sellado hermético y de preferencia con cierre automático; no es recomendable el uso de puertas de madera a fin de evitar hongos e hinchazón de las mismas, a causa de la humedad propia del insectario, por tanto materiales como aluminio y acero deberán ser utilizados en los insectarios.

Temperatura

Existen temperaturas óptimas específicas en diferentes casos de artrópodos a criar en un insectario y estas se encuentran en un rango de entre 20 a 30°C; en el caso de crianza de mosquitos, una temperatura de 28°C es la indicada para un crecimiento óptimo tanto para larvas como de adultos de muchas especies, ya que variaciones en esto puede disminuir el número de huevos ovipositados, así como la supervivencia; en el caso de larvas puede retrasar el tiempo para llegar a la pupación o aumentar la mortalidad en esta fase. (Pérez, et al, 2004).

Para mantener la temperatura constante en el área de crianza, se debe de contar con algún tipo de unidad manejadora de la misma; para este fin se pueden utilizar calentadores eléctricos domésticos, en regiones o épocas del año de baja temperatura ambiental, pero también se debe de contar con unidades de aire acondicionado para mantener esta temperatura en épocas más cálidas del año. Las unidades de aire acondicionado duales son la mejor opción para este fin, ya que proveen aire frío o caliente según se requiera, basado en el ajuste de la temperatura deseada.

Humedad Relativa

La humedad relativa en el ambiente es el siguiente factor determinante en la vida de los mosquitos y de la mayoría de artrópodos, ya que al igual que en la temperatura, se han encontrado rangos para una crianza óptima. A una humedad mayor al 95 % (llegando al punto de saturación de humedad) se ha observado en especies del género *Culex*, que estos evitan estar en contacto con estas áreas, al igual que a una humedad relativa menor al 40% (Muirhead Thomson, 1938), además que se ha observado que a humedades relativas mayores al 54%, el número de mosquitos colectados dentro de casas habitación aumenta (Willem, 1925); es por esto, que adecuar el rango de temperatura alrededor de un 70 y 80%, provee una humedad óptima para muchas especies.

Cuando se adecuan áreas como insectarios, se pueden utilizar humidificadores ambientales de uso doméstico dependiendo de la superficie a cubrir, pero es deseable cuando se construyen o se remodelan áreas para este fin, que se incorporen humidificadores mecánicos, o incluso esto se pueden colocar directamente en los ductos de unidades manejadoras de aire acondicionado.

Fotoperiodo

Al igual que las variables anteriores, el período lumínico es de los factores más importantes en la crianza de mosquitos dentro del insectario, ya que es determinante de diferentes comportamientos específicos en los insectos, por ejemplo alimentación, cópula, entre otros. Emulando las condiciones naturales, se ha propuesto que periodos de 10 horas luz y 14 oscuridad son adecuados para mosquitos (Perez, et al, 2004), sin embargo otros investigadores proponen periodos lumínicos más largos de hasta de 16 horas luz, considerando a los mosquitos que se encuentran en latitudes con esos fotoperiodos naturales (Alto y Juliano, 2014). En nuestra experiencia fotoperiodos de 12 horas luz-oscuridad, han generado condiciones óptimas para la crianza de mosquitos en México.

Para este fin se pueden utilizar temporizadores de venta en ferreterías para áreas o cuartos pequeños, o bien en cuartos más grandes o laboratorios, también se pueden implementar temporizadores industriales que van adosados al circuito maestro y tienen la misma finalidad.

Equipo y mobiliario en las diferentes áreas de un insectario: área de larvas

En el área de crianza de larvas, no se requieren equipos de laboratorios específicos o sofisticados. Para el crecimiento larval, se utilizan preferentemente charolas o contenedores de plástico o incluso lo más común es encontrar recipientes plásticos utilizados para almacenamiento de alimentos en casa, los cuales son de venta en cualquier supermercado. Dichos contenedores se deben colocar en estantería metálica o mesetas, las cuales deben estar sujetas para evitar movimientos que pongan en riesgo la caída de las mismas.

Para la manipulación individual de larvas o pupas, se recomienda el uso de goteros plásticos o pipetas de transferencia de 3ml (Sigma-Aldrich Cat. Z350796), y para manipular una mayor cantidad de larvas de un lugar a otro, se pueden utilizar goteros graduados, con bulbo plástico para transferencia de líquidos o sifones (turkey basters).

Área de Adultos

En el área de mantenimiento de mosquitos adultos, los materiales utilizados son jaulas de diferentes medidas las cuales están fabricadas mayormente de aluminio para dar la forma de cubo, y materiales mosquiteros plásticos o incluso de metal, que hacen las paredes de la jaula (BioQuip Products Cat. 1450A). También existen jaulas hechas en su totalidad de plástico, las cuales tienen la ventaja de ser livianas, además que son desarmables todos los lados de la jaula para su almacenaje (BioQuip Products Cat. 1452).

Realmente existen muchos tipos de jaulas comerciales de diversas marcas y tamaños, además, en muchos insectarios se utilizan jaulas diseñadas en alguna carpintería o negocio de fabricación de ventanas domésticas, en donde se utilizan materiales mosquiteros y aluminio, o madera y tul; el tipo de jaula en muchas de las ocasiones, dependerá de los recursos del laboratorio, sin embargo la recomendación es que si se van a utilizar jaulas fabricadas localmente o que no sean comerciales, se revisen muy minuciosamente las juntas de los materiales mosquiteros, a fin de evitar el problema más común en un insectario, la fuga o escape de mosquitos.

Para este punto anterior es común introducir a esta área, dispositivos de electrocución con luz blanca u oscura como atrayente, ejemplo: Stinger® Nosquito® Indoor Mosquito Trap (MA06), además del uso de raquetas de electrocución de insectos voladores de venta al público, las cuales son el arma más útil del personal del insectario.

Para la manipulación de mosquitos adultos, se utilizan aspiradores mecánicos de pilas (BioQuip Products Cat. 2809C y 2820B). En muchos insectarios se suelen hacer manualmente aspiradores donde el método de succión es mediante succión bucal (aspirador bucal), y esto es utilizando una manguera de goma o látex flexible, la cual se adhiere en una pipeta de laboratorio serológica desechable de 10ml, o un tubo plástico o de vidrio con las mismas características, bloqueando la parte de la unión con un pedazo de material de tela mosquitero, o tul flexible, a fin de retener los mosquitos en ese punto y poder trasladarlos; se recomienda que esta unión sea con una luz de malla lo más fina posible, para así evitar la pérdida de escamas o partes de los individuos succionados.

Otro punto de especial atención en el área de crianza o de almacenamiento de huevos, es el cuidado que se debe de tener en cuanto a las plagas depredadoras que puedan infestar los insectarios, por ejemplo las hormigas, considerando que no está permitido la aplicación de plaguicidas en el insectario; la solución más utilizada en este problema, es la colocación de charolas con aceite automotriz sobre las patas de los estantes, anaqueles, y mesas, revisando que los objetos en ellos no entren en contacto con las paredes de alrededor, ya que esto sirve de puente a las hormigas. También se debe de tener cuidado con arañas ya que estas se alimentan de los mosquitos y pueden acabar fácilmente con la colonia.

Prácticas en el tema de alimentación sanguínea de insectos (hematofagia)

Uno de los temas más importantes en la crianza de insectos, va en el sentido de la manera en que se va a alimentar a dicha población y se remarca esto, dado a que la mayoría de las especies a trabajar en insectarios de salud pública, requieren de sangre animal para la ovogénesis, por lo tanto, especies de mosquitos antropofágicos recaen dentro de un tema

éticamente complicado e incluso tabú. La mayoría de insectarios mencionan la alimentación de las especies hematófagas usando animales como ratones, cobayos, conejos, gallinas, etc, ya sea inmovilizados o anestesiados. También esta, se puede realizar por medio de alimentadores de cristal con membrana (Chemglass Cat. CG-1835-70), para esto se requiere de un baño María a una temperatura de 37°C, así como una bomba para la recirculación del agua que entra del baño maría a los alimentadores de cristal. La membrana que soporta la alimentación sanguínea puede ser de intestino de cerdo, res, piel de pollo o papel parafilm. La sangre puede ser obtenida de animales, y se conserva en congelación a -80°C, y se descongela y homogeniza cuando se vaya a utilizar. También puede ser utilizada la sangre desfibrinada que se consigue para cultivos celulares, o se puede hacer algún convenio con los bancos de sangre locales. Sin embargo, una de las prácticas más comunes para la alimentación de mosquitos en laboratorio es la introducción del brazo de una persona dentro de la jaula que se requiere alimentar, pero en la actualidad, además de los riesgos inherentes del acto, quebranta los reglamentos establecidos por los comités de ética y bioseguridad de las instituciones.

Área de Cuarentena

Es altamente recomendable tener una zona de cuarentena, para así evitar la introducción al insectario de mosquitos que puedan contener patógenos. En esta área se deben de mantener todos los huevos y adultos colectados en campo. Es usual que aquí se eclosionen los huevos, se críen los inmaduros y se lleven a adultos, de los cuales se toma una muestra representativa para analizar que no presenten hongos (Ej. *Nosema* spp) u otros parásitos en sus tejidos; además por técnicas moleculares se hace tamizaje en la búsqueda de arbovirus. Si la colecta fue de mosquitos adultos se sigue el mismo protocolo. Finalmente, en esta área es donde se realiza la separación e identificación de las especies que se van a introducir al insectario para el trabajo. Otro procedimiento utilizado para poner en cuarentena a una especie, es reproducirla por una generación en esta área, y trabajar con la generación posterior, considerando que disminuye el riesgo por infección de algunos patógenos.

Área de Bioensayos

El área de bioensayos, es básicamente un laboratorio el cual debe de contar con mesetas lavables y tarja para el lavado de materiales. En este espacio es donde se realizarán los bioensayos tanto en larvas como en adultos. Para bioensayos de estadios inmaduros, se requiere la utilización de pipetas de transferencia desechables, las cuales deben estar etiquetadas en el caso de que se manipulen individuos en recipientes que contengan algún tipo de insecticida y solo se podrá utilizar ese gotero para ese insecticida y esa dilución en específico.

NOTA: La utilización de un gotero contaminado con insecticida en el área de larvas, puede llevar a la pérdida de una colonia de mosquitos; de igual forma un aspirador utilizado en bioensayos con insecticidas, nunca deberá ser utilizado para la transferencia de mosquitos dentro del insectario, por lo tanto, los artículos usados en el laboratorio para experimentación, no deberán ser usados en el área de crianza.

En cuanto a equipos de laboratorio dentro del área de bioensayos del insectario, se debe de contar con una cabina o campana de manipulación de solventes, ya que la mayoría de las diluciones de insecticidas, se realizan en acetona u otros solventes tóxicos para el operario. Dentro de esta cabina otro equipo necesario, es un rotador de botellas (bottle roller, Wheaton Cat. W348923-A), el cual sirve para mantener girando las botellas utilizadas en un bioensayo, las cuales en su interior contienen mezclas de insecticida con solvente,

así de esta forma, se impregnan de manera uniforme por toda la superficie de la botella, mientras se evapora dicho solvente. Para bioensayos de botella y de larvas se pueden consultar los manuales del CDC, RELCOV o WHO (CDC, 2010; RELCOV, 2005; WHO, 1998).

Área de Bioensayos para infección con patógenos u organismos modificados genéticamente

Si el tipo de estudio que se va a realizar requiere de infectar mosquitos con patógenos (ej. Dengue, Virus del Oeste del Nilo, Paludismo, etc), el área de bioensayos debe de tener un nivel de bioseguridad 3 (Bsl 3), y se deben de seguir todos los procedimientos estandarizados de operación de este nivel, entre ellos utilizar todo el equipo de protección personal adecuado (doble guante, respirador N95, bata y gafas de seguridad). Las formas más comunes para infectar a los especímenes son con microinyección intratorácica o por medio del sistema de recirculación de agua temperada en baño maría y los alimentadores de cristal, todos los materiales utilizados deben de colocarse en contenedores con cloro al 10% para su desinfección, además de tener bolsas que soporten esterilización por autoclave para los desechos. El material utilizado también debe esterilizarse por autoclave, incluyendo los alimentadores de cristal.

Los contenedores de los mosquitos infectados deben de colocarse dentro de otro contenedor de mayor tamaño y cubierto en la parte superior con tul, en caso de tenerlo que mover a otra área dentro del Bsl3, y esto debe hacerse dentro del contenedor con su tapa de plástico, no solamente el tul.

Para disponer de todo el material utilizado (adultos, contenedor de oviposición, etc), en caso que haya existido oviposición en el experimento, el material debe de pasar a un congelador de -20°C/ 24 horas. Después todo se introduce en bolsas de desecho para su esterilización por autoclave y posterior incineración. El agua donde se criaron las larvas, debe de juntarse y esterilizarse antes de disponer de ella, para eliminar la posibilidad de desechar algún huevo que pudiera estar viable.

Si lo que se pretende investigar son mosquitos modificados genéticamente realizando pruebas de laboratorio y semicampo, se deben de tener las mismas medidas de seguridad para su contención debido a que se requiere presentar los estudios de riesgo, impacto al ambiente, etc, ante las instancias gubernamentales de salud y ambiente, para que otorguen los permisos para su liberación. La disposición de sus residuos es similar a la de infección de mosquitos con agentes patógenos.

Área de Almacenamiento

Preferentemente se requiere de dos áreas básicas de almacenaje de materiales en un insectario, esto es, el lugar donde se colocan las jaulas y contenedores plásticos para larvas que no están en uso y las cuales preferentemente se pliegan o se estiban dentro del insectario, y se pueden colocar en un anaquel dentro del mismo. El otro sitio de almacenaje es en el área de bioensayos, donde se debe de contar con el espacio suficiente para almacenar, consumibles plásticos y vidriería de laboratorio como, vasos desechables y botellas de diferentes medidas, las cuales se utilizan tanto en la preparación de soluciones para pruebas enzimáticas, como para realizar bioensayos con mosquitos adultos, pipetas, puntas para micropipetas, matraces, etc.

Consumibles básicos en un insectario

De manera general se enlistan los materiales consumibles requeridos en un insectario y en su área de bioensayos (Tabla 1).

Tabla 1. Consumibles básicos en un insectario.

Área de larvas	Área de Adultos	Área de bioensayos
Charolas para larvas	Jaulas de Mosquitos	Botellas diferentes medidas
Pipetas de transferencia de 3ml	Aspiradores mecánicos	Pipetas de transferencia de 3ml
Sifones grandes (turkey basters)	Aspiradores Bucales	Aspiradores
Cámaras de emergencia (BioQuip Products Cat. 1425)	Raquetas de electrocución	Vasos desechables
Tul	Contenedores de pupas	Sifones grandes (turkey basters)
Ligas o elástico	Aceite de motor	Charolitas de pesado

Prácticas generales en insectarios

Las prácticas generales que deben aplicar en un insectario, siempre van de la mano al nivel de bioseguridad asignado al mismo, por ejemplo en el caso de trabajar con infecciones de mosquitos con algún virus como dengue o chikungunya, el nivel de bioseguridad de ese insectario debe de ser 3; si el trabajo a desarrollar en él va en el sentido de ensayos bioquímicos o pruebas de susceptibilidad a insecticidas, el nivel de bioseguridad es 2, por lo que aplican las practicas estandarizadas para ese nivel.

Del campo al insectario, generación de colonias artrópodos de importancia médica: generalidades

Lo primero que se debe de considerar para hacer la colonización en laboratorio de insectos u otros artrópodos (pie de cría), incluso antes de comenzar la recolección de los especímenes en el campo, es conocer la biología y los hábitos de cada tipo de insecto que se pretende estudiar o examinar, esto para saber dónde buscarlo, además de entender las condiciones que se necesitan para el mantenimiento en el laboratorio.

Colecta de mosquitos (Díptera: Culicidae)

La manera más utilizada para la colecta de mosquitos y hacer un pie de cría, es durante su fase juvenil o inmadura (larvas y pupas). Esto se realiza desde sus criaderos acuáticos. Existe una gran diversidad de hábitats larvales: *Ae. aegypti*, se puede encontrar en el área alrededor de las casas (peridomicilio), en criaderos artificiales, como contenedores de 200 litros, cubetas, vasos, cacharros, etc., y dentro de las casas (intradomicilio) en floreros con plantas acuáticas, piletas para lavar recipientes, entre otros. En nuestra experiencia, para el éxito de una colecta con gran cantidad de individuos de estadios inmaduros de esta especie, se puede enfocar hacia floreros o piletas de cementerios, así como en vulcanizadoras o tiraderos de llantas; es por esto que las autoridades sanitarias dirigen muchas acciones de control sobre estas zonas. En algunos lugares, también puede presentarse *Ae. albopictus* (Skuse, 1894) en los mismos criaderos. Otras especies del genero *Culex* también pueden estar en el peridomicilio, pero comúnmente en aguas sucias, con mayor cantidad de materia orgánica (eutroficadas).

Otros ejemplos de criaderos naturales o artificiales utilizados por los mosquitos, son los lagos o lagunas, donde usualmente se pueden encontrar especies de los géneros: *Anopheles*, *Uranotaenia*, *Culex*, *Aedeomyia*, *Culiseta*, *Mansonia*. En charcas, huellas de animales y bosque inundado, pueden encontrarse especies de *Psorophora* y *Aedes*, además, en donde se presentan encharcamientos semipermanentes, se pueden encontrar

algunos de los géneros mencionados para lagos y lagunas. De igual forma en arroyos, se pueden encontrar mismos géneros que en lagos, pero aquí se pueden encontrar especies del género *Chagasia*.

Existen también otro tipo de criaderos menos pensados como son las cuevas de cangrejos, en donde se encuentra a especies del género *Deinocerites*; en las oquedades de rocas puede encontrarse a especies de *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Uranotaenia*, *Culiseta* y *Haemagogus*. En huecos de árboles suele encontrarse a *Toxorhynchites*, *Orthopodomyia*, *Sabethes*, *Wyeomyia*, e incluso la subespecie *formosus* de *Ae. aegypti*. Otros criaderos son: manantiales, pozos, drenajes, alcantarillas, tocones de bambú, axilas y brácteas de plantas, e incluso corcholatas (Belkin 1967 y McClelland 1974). Por lo tanto como se puede observar, la materia prima de un insectario de salud pública, puede ser fácil de encontrar, lo importante es saber dónde buscar.

Métodos de colecta de fases inmaduras de mosquitos

La mayoría de las fases inmaduras de los géneros de mosquitos, se encuentran reposando bajo la superficie del agua, esto debido a que obtienen el oxígeno del aire por medio de un sifón respiratorio en estadio larval y trompetas respiratorias en estadio pupal. La colecta se realiza directamente de la superficie del agua, utilizando alguna de las siguientes herramientas: pipetas de transferencia, sifones (turkey baster), coladores y redes; o por medio de una muestra de agua tomada con un cucharón larval (larval dipper: BioQuip Product Cat. 1132). Las muestras se transfieren a bolsas de plástico para muestras tipo Whirl-pak® (Sigma- Aldrich Cat. Z527009) o a frascos con tapa (los contenedores se deben de llenar de ½ hasta ¾ partes de su capacidad con agua de los criaderos, para dejar suficiente cantidad de aire para que puedan respirar los juveniles mientras son transportados). Se deben de lavar con agua los utensilios utilizados, esto para prevenir que el material se mezcle con las colectas posteriores (Belkin, 1967, WRBU, 1997, nosotros).

Algunas especies de *Anopheles*, *Mansonia* y *Coquilletidia*, se encuentran entre vegetación acuática o subacuática, la técnica de colecta a emplear, es colocar el cucharón cerca del borde de la vegetación y sumergirlo, haciendo que el agua entre a él, mientras crea una corriente que arrastra las larvas de la vegetación al interior del cucharón (se puede sustituir el cucharón por un balde o palangana, el cual se sumerge por debajo de la vegetación y solo se levanta). También se puede utilizar una red para esto y se vacía sobre la palangana con agua; o se coloca sobre la palangana pedazos de la vegetación y se agita vigorosamente para que se desprendan los estadios inmaduros (Gaffigan and Pecor, 1997 y Belkin et al, 1967).

Transportación de las fases inmaduras de mosquitos

Durante la transportación, los frascos o bolsas de plástico Whirl-pak® deben de colocarse en posición vertical y a su vez es recomendable que se coloquen dentro de hieleras o termos con el objetivo de mantenerlos frescos; estos pueden tener agua y se puede usar hielo para bajar la temperatura, pero el hielo no debe estar en contacto con los contenedores de las muestras; otra recomendación es que las bolsas con larvas y los contenedores, nunca deben de colocarse directamente al sol.

Una vez en el insectario, se abren los contenedores y se les deja hasta que alcancen la temperatura ambiente. Si el viaje de colecta no se completa en un día, se deben de abrir los contenedores al final del día, para que se renueve el oxígeno, y se recomienda pasar el material a una cámara de emergencia, para que emerjan los mosquitos adultos y no sean liberados directamente al ambiente (Gaffigan and Pecor, 1997, Belkin et al, 1967).

Recolección de huevos de mosquito

En los géneros *Aedes* y *Psorophora*, los huevos pueden mantener su viabilidad en condiciones de desecación, por lo que los huevos se obtienen de áreas secas que estuvieron inundadas o fueron charcas temporales, tomando muestras de suelo de 2 a 3 cm de profundidad a varios niveles de la pendiente donde estuvo la charca y posteriormente colocándolas en un recipiente con agua para esperar la eclosión. Por otro lado se puede muestrear en oquedades de árboles y rocas, en las cuales se deben enjuagar las paredes con agua, para obtener los huevos que pudieran estar pegados a ella y posteriormente se succiona el agua y se almacena en bolsas Whirl Pak® u otros recipientes. Lo mismo puede hacerse en recipientes artificiales o cacharros donde se observa la presencia de huevos de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. Para estos últimos, también se pueden colocar ovitrampas para coleccionar los huevos, las cuales son contenedores cilíndricos de plástico de color negro, llenados con agua de $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad, recubiertos en su interior con una papeleta de papel filtro o papel pellón. El monitoreo de las ovitrampas debe ser semanal.

Las barquillas de huevos de las especies de *Culex*, ejemplo *Cx. quinquefasciatus* Say, 1823, se encuentran flotando sobre la superficie del agua en sus criaderos; estos pueden coleccionarse por medio de papel filtro, y se transportan manteniéndolas húmedas en cajas Petri. La misma técnica puede usarse para obtener los huevos depositados individualmente de especies de *Anopheles*, pero lo primero que hay que hacer es observarlos físicamente. En *Mansonia*, los cuales pegan tiras de huevos a la vegetación, se debe de coleccionar todo el pedazo de materia vegetal con los huevos adheridos y transportarlo en condiciones de humedad para su posterior eclosión en el laboratorio.

Recolección de mosquitos adultos

La recolección de mosquitos adultos en campo para el inicio de una colonia, es un método poco utilizado y no es recomendable emplearlo, debido que aumenta la probabilidad de que sean portadores de enfermedades transmitidas por ellos, probabilidad que disminuye en los estadios inmaduros o huevos. De cualquier manera, se debe de revisar la literatura de cada especie, para saber las tasas de transmisión transovárica de las enfermedades que potencialmente transmiten.

Algunas de las técnicas que se utilizan para este tipo de colecta son: El aspirador bucal (tubo de captura) y el moto aspirador tipo CDC modificado (J.W. Hock Mod. 1412), estos se usan para capturar a los mosquitos en los sitios de reposo, ya sea en paredes de casas, corrales, vegetación, cuevas, etc. En el primero se van a utilizar contenedores para los mosquitos que se vayan capturando, dicho contenedor puede ser un vaso de cartón cubierto con una malla (tul), sujeta con una banda de caucho (liga) en la parte superior, teniendo un orificio lateral del tamaño del tubo de captura, que se puede tapar con una torunda de algodón. El aspirador motorizado utiliza contenedores plásticos, con malla metálica en uno de los extremos y tapa de rosca en el otro. En ambos tipos de aspiradores, pero sobre todo en el segundo, se deben de tomar precauciones para no maltratar a los especímenes.

La Red entomológica es otro método para capturar mosquitos en vuelo, pero también se requiere el tubo de captura para extraerlos de la red, lo cual debe de hacerse con mucho cuidado para no maltratar a los mosquitos al transferirlos a los contenedores o vasos de captura.

Tipos de trampas de colecta

Existen muchos métodos de trampeo y captura de mosquitos y aquí se mencionan algunos:

Las mini trampas de luz CDC [luz clara y oscura (ultravioleta), con abanico de succión] funcionan para atraer muchas especies de culícidos y se recomienda el uso en conjunto con otros atrayentes secundarios como Octenol, liberación de dióxido de carbono (CO₂), Lurex3™, etc., dependiendo la especie de mosquito requerida. Estas trampas se operan en horario nocturno (J:W. Hock products, 2015).

Trampas de gravidez, estas constan de un recipiente con agua en la parte inferior para simular un criadero de mosquito, y un abanico de succión, para capturar a las hembras grávidas que lleguen a examinar el medio acuático para la oviposición. (J:W. Hock products, 2015).

Trampa doble pabellón (BioDiVector Tent Trap); esta consta de dos compartimentos rectangulares de malla fina, uno encima del otro donde se pone un cebo humano o animal como atrayente en el compartimento interior, esto para evitar que los mosquitos alcancen al cebo; cuando los mosquitos estén reposando en la parte externa del compartimento interior, se deja caer el pabellón exterior, quedando atrapados entre ambos pabellones; estos mosquitos se extraen con tubos de captura bucales, aspirador motorizado tipo CDC o redes. Su utilización es en horario crepuscular y nocturno (Casas-Martínez *et al*, 2013).

La transportación de los contenedores de mosquitos o vasos, se hace comúnmente dentro de hieleras que pueden llevar geles refrigerantes en la parte inferior, cubiertos por una hoja de papel estraza; o se les coloca a los contenedores en la parte superior (sobre la malla) un algodón humedecido. Lo anterior para evitar mortalidad por deshidratación ante las condiciones ambientales externas.

Protocolos básicos de laboratorio para establecer las colonias de Artrópodos.

En esta sección se presentaran ejemplos de las condiciones específicas de laboratorio que requieren los grupos de artrópodos, con mayor relevancia médica o económica.

Condiciones de colonia de Aedinos (Subfamilia Culicinae: Aedini)

El Aedino del cual se han realizado infinidad de investigaciones es *Ae. aegypti*, el cual es el vector de virus como el Dengue, Chikungunya, Fiebre Amarilla y Zika. Además, existen otras especies de esta tribu en el mundo, que son vectores de otras enfermedades arbovirales como el Virus del Oeste del Nilo (WNV), Encefalitis Japonesa (JE), Encefalitis Equina del Este (EEE), Encefalitis de San Luis (SLE), El virus La Crosse (LCV), Virus del Rio Ross (RR) y Virus del Bosque Barmah (BFV) (Watson et al 2000; Hoshino et al, 2010, OPS, 2015).

Descripción de las condiciones de la colonia de *Ae. Aegypti*: huevo

Considerando los hábitos de oviposición de esta especie (deposición de los huevos individualmente en la superficie del agua o cerca de ella), el procedimiento es recolectar los huevos sobre un papel (papeleta) húmedo, el cual se coloca de tal forma que recubra las paredes de un vaso o contenedor (preferentemente de forma redondeada), lleno a la mitad de su capacidad con agua limpia, reposada (declorinada) al menos 24 horas para la disipación del cloro que pueda contener. Los materiales de la papeleta puede ser papel filtro o cualquier otro papel rugoso que facilite la adherencia de los huevos. Se debe de tener especial precaución de no dejarla saliendo o colgando del contenedor, para evitar que el agua salga por capilaridad.

Una vez fijada la papeleta, el vaso se debe colocar dentro de la jaula donde se tiene la colonia de mosquitos adultos previamente alimentados con sangre (48 horas previas) y de los cuales se espera la obtención de huevos. Los huevos ovipositados en las papeletas, deben de completar su desarrollo embrionario en los mismos contenedores, solo que se debe retirar el exceso de agua con una pipeta de transferencia, dejando el nivel por debajo de la línea de oviposición, de lo contrario los huevos pueden eclosionar. El tiempo para que se desarrolle el embrión es de 48 horas. Posterior a esto se deja secar la papeleta a temperatura ambiente y se guarda en sobres o bolsas plásticas con cremallera, las cuales se deben almacenar en contenedores de plástico. Las condiciones de almacenaje son 28°C y 80% de humedad relativa, en donde pueden soportar fácilmente la desecación de seis meses hasta un año. Al etiquetar los sobres, no se debe olvidar poner la fecha de obtención, para tener la idea de su viabilidad.

Los huevos se eclosionan en agua con baja tensión de oxígeno (desoxigenada), para esto, se lleva a ebullición agua limpia y se deja enfriar hasta 27°C, en este momento se sumerge la papeleta de huevos. Otro método es diluir 0.1 gramos de levadura de cerveza en 1 litro de agua reposada (dechlorinada) dejándola reposar por 24 horas antes de sumergir la papeleta. Los huevos comienzan a eclosionar a pocos minutos de su inmersión en el agua.

Larva

Después de la eclosión del huevo, pasaran por cuatro estadios larvales, en los cuales las larvas comienzan a alimentarse para crecer y alcanzar cada uno de estos estadios y llegar al estadio pupal, del cual emergerá el mosquito adulto.

Se debe de tener cuidado de no sobre poblar la charola con larvas, ya que esto impedirá su correcto desarrollo, derivando en un retraso temporal del desarrollo larvario, además que los mosquitos adultos provenientes de ellas, serán de tamaño reducido. Hay diversas opiniones de grupos de investigadores en cuanto a la densidad de larvas a criarse por charola, dependiendo su tamaño. Se ha mencionado que esta densidad debe ser de 0.67 larvas/cm², pero también se pueden criar satisfactoriamente 15,000 larvas en charolas de 138x76x5 cm (área: 10,488 cm²), siendo esta una proporción de 1.4 larvas/cm². Una medida alternativa es de 1 larva/mililitro, por lo que se necesita tener esa charola llena de agua hasta 1.43 cm de profundidad, para tener 15 litros para esa cantidad de larvas (Gerberg en 1970). También se menciona el uso de charolas de 25x25 cm (625 cm²) con 2 litros de agua, por lo que su llenado es de 3.2 cm de altura, esto para criar de 500 a 700 larvas, equivaliendo esto de 0.8 a 1.2 larvas/cm² (Pérez et al en 2004).

Otros autores mencionan que para evitar la competencia larval en estudios de competencia vectorial, la proporción debe de ser de 150 larvas por litro de agua (Poole-Smith et al en 2015). Nuestra recomendación es que la densidad larvaria es directamente proporcional con el desarrollo larvario, por lo que las charolas grandes son una buena opción, pero se deben extremar precauciones en su manipulación para no derramar agua, además que se debe de tener una área para contenedores de mayor tamaño.

La alimentación debe de cumplir con todos los requerimientos nutricionales de las larvas, llevando proteínas, minerales, carbohidratos y vitaminas. Lo más empleado para este fin es utilizar alimento finamente molido de perro, gato, ratón, peces, así como hígado de res deshidratado, levadura, harinas de pescado, migajas de pan, etc. Pero todos los alimentos antes citados deben ser bajos en grasas, para evitar que se forme una capa superficial oleosa, la cual impide la respiración de las larvas. Es recomendable esterilizar el alimento en la autoclave.

En cuanto a la dosificación del alimento, es dependiendo del estadio en que se encuentre y la cantidad de larvas que tenemos en los contenedores (Tabla 2) (Gerberg, 1970).

Tabla 2. Dosificación del alimento para *Ae. aegypti*.

Día	Dosificación
0 - 1	0.2 mg/larva
2	0.3 mg/larva
3	0.4 mg/larva + 0.45 mg de levadura molida/ 1000 larvas
4	0.6 mg/larva
5	0.6 mg/larva
6	0.6 mg/larva (pupación comienza) depende del número de larvas que permanecen
7	0.6 mg/larva dependiendo número de larvas que permanecen

La duración del desarrollo larval lo hemos observado entre 6 a 7 días bajo condiciones óptimas de densidad, alimentación, temperatura de 28°C y humedad relativa del 80%. En condiciones de hacinamiento y/o temperaturas inferiores, este tiempo puede ser mayor a 3 semanas (Tabla 3).

Pupa

En esta fase de la metamorfosis ya no se alimentan, y es cuando comienza internamente el desarrollo para la emergencia del adulto. Su duración es de 2 días en las condiciones óptimas de temperatura y humedad previamente mencionadas. Las pupas se deben separar de las charolas por medio de las pipetas de transferencia, sifones, bomba de vacío, etc., y colocarse en cámaras de emergencia, o directamente en contenedores con agua dentro de las jaulas; estos contenedores deben tener un cono en la tapa, con un orificio de 2.5 cm en la parte superior para que salgan los adultos, y evita que sirva como recipiente de oviposición. Se puede separar machos y hembras en esta etapa de manera empírica, basándose en el tamaño de la pupa, las más grandes son hembras y las más pequeñas machos, también es común que las primeras pupas en emerger de las larvas, son machos.

Adulto

El fotoperiodo para criar esta especie en el insectario puede ser de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad con una temperatura de 28°C y humedad relativa de 70-80% (Tabla 4). Las jaulas para contener los adultos más utilizadas son las de 30x30x30cm (1 pie cúbico), la cantidad de mosquitos que se debe albergar en esta jaula es alrededor de 500 mosquitos, con una proporción 1:1 de hembras y machos, para mantener las condiciones óptimas de reproducción (Pérez *et al*, 2004), pero también se ha mencionado que puede soportar hasta 2000 especímenes, con proporción 3:1, hembras: machos (Gerberg, 1970). Se ha observado que las densidades de mosquitos son directamente proporcionales con mortalidad, e inversamente proporcionales con fertilización de las hembras.

Como se menciona anteriormente dentro de la jaula se debe de colocar el contenedor con las pupas para la emergencia de adultos; al tener los primeros adultos se debe de proporcionar una fuente de alimentación de carbohidratos, para lo cual se colocan torundas (bolitas) de algodón humedecidas con solución de sacarosa o azúcar al 10%, o también puede ser miel, néctar para colibrí o pasas, entre otros, esta se debe de cambiar diariamente, para evitar la proliferación de hongos. 48 horas posteriores a la alimentación con sangre se debe de colocar el contenedor con la papeleta, previamente descrito.

La alimentación sanguínea se debe realizar con animales anestesiados o inmovilizados como ratas, ratones, conejos, conejillos de indias, o por medio de la técnica de alimentación

con alimentadores de cristal y membrana. La sangre para alimentar con el método de membrana puede ser de alguno de los animales mencionados, o la de venta para cultivo celular, además, puede ser ovina (borregos) o bovina (res) (Tabla 4).

Como ya se mencionó, alimentar con sangre humana, es un método que aún se practica, pero no es recomendable, ni ético, aun cuando se trabaja con poblaciones de laboratorio ya establecidas. Para asegurar que se alimenten la mayor proporción de hembras contenidas en la jaula, se recomienda retirar las torundas de algodón con solución azucarada 24 horas antes de la alimentación y en caso de estar presente el recipiente de oviposición o algún otro contenedor con agua, se debe de retirar de 6-8 horas previas a la misma.

Tabla 3. Parámetros y condiciones generales para el mantenimiento de colonias de algunas especies de mosquitos Aedinos (Fase Inmadura).

Especie	Densidad larvaria larvas/Litro (larvas/cm ²)	T en °C	Alimento	Desarrollo larvario	Desarrollo de Pupa
<i>Ae. albifasciatus</i> (Macquart,1838)	10/1 L (0.05/cm ²)	22°	Alimento para peces/levadura y pasto/ materia orgánica	7-8 días	2-3 días
<i>Ae. albopictus</i>	150/ 1L (0.67-1.2/cm ²)	25°	Alimento para peces, levadura	6-7 días	2 días
<i>Ae. japonicus</i> (Theobald,1901)	100/L(0.15/cm ²)	25°	Alimento para peces	3-4 días	3 días
<i>Ae. mediovittatus</i> (Coquillett,1906)	150/ 1L(0.67/cm ²)	25-27°	Alimento para conejo	6-8 días	2 días
<i>Ae. notoscriptus</i> (Skuse,1889)	50/1L (0.15/cm ²)	28°	Alimento para peces, hígado10%,levadura10%	6 días	2 días
<i>Ae. atropalpus</i> (Coquillett,1902)	250/1L(0.57/cm ²)	27°	50%Higado y 50% alimento para perro	5-6 días	2-3 días
<i>Ae. taeniorhynchus</i> (Wiedemann,1821)	120/1L [infusión pasto de marisma] (0.15/cm ²)	28°	Alimento para perro	5-6 días	2 días
<i>Ae. togoi</i> (Theobald,1907)	100/1L, 50% agua de mar (0.88/cm ²)	20°	Comida para peces	15-18 días	4-5 días
<i>Ae. triseriatus</i> (Say, 1823)	500/1L(1.5/cm ²)	27°	Polvo de hígado	7-8 días	2 días

Tabla 4. Parámetros y condiciones generales para el mantenimiento de colonias de algunas especies de mosquitos Aedinos (Fase Adulta).

Especie	T °C y H.R.	Sustrato de Oviposición	Alimento carbohidratos	Alimentación sanguínea	Foto-Periodo en horas	Viabilidad de Huevos
<i>Ae. albifasciatus</i>	22°, 70%	Papel húmedo	Solución sacarosa 10%	Conejillo de indias	12:12	5-6 semanas
<i>Ae. albopictus</i>	26°, 80%	Papel húmedo	Solución sacarosa 10%	Ratón, conejo	12:12, 16:8	6-8 meses
<i>Ae. japonicus</i>	25°, 70%	Papel húmedo	Solución sacarosa 3%	Ratón, conejo	16:8	8 semanas
<i>Ae. mediovittatus</i>	25-27°,70%	Papel húmedo	Solución sacarosa 10%	Ratón, conejo	12:12	3 meses

<i>Ae. notoscriptus</i>	28°, 70%	Papel húmedo, sobre recipiente con bromelia	Solución sacarosa 10%,	Conejillo de indias	11:11 + 1:1 crepúsculo	8 semanas
<i>Ae. atropalpus</i>	27°, 80%	Papel estraza	Solución sacarosa 10%	Ratón, conejo.	12:12	Varias semanas
<i>Ae. taeniorhynchus</i>	26-28°, 70%	Musgo <i>Sphagnum</i> sp húmedo	Miel	Ratón, conejo	11:11 + 1:1 crepúsculo	2-3 semanas
<i>Ae. togoi</i>	25°, 60%	Papel húmedo	Sacarosa seca	Conejillo de indias	17.5:6.5	4 semanas
<i>Ae. triseriatus</i>	27°, 80%	Papel húmedo	Solución sacarosa 10%	Conejo, pollo	13:9+ 1:1 crepúsculo	6 meses

Referencias de tablas 3 y 4: Alto y Juliano, 2001; Gerberg, 1970; Hoshino, 2010; Koou, 2012; Leon Rosen, 2003; Nelson Davis, 1958; Poole-Smith, 2015; Sy y Campos, 2008; Trimble y Wellington, 1979; Uitregt, 2012; Watson, 2000.

Condiciones de colonia Anofelinos (Subfamilia Anophelinae)

La importancia de los mosquitos de esta subfamilia de Culicidae (Anophelinae) radica en el hecho que son los vectores de las especies de protozoarios del genero *Plasmodium*, agentes causales del paludismo (Malaria).

Anopheles pseudopunctipennis Theobald, 1901, se encuentra distribuido en América tanto en el área biogeográfica Neartica como Neotropical (WRBU, 2015) y ha sido incriminado como vector del paludismo (Villarreal et al, 1998).

Descripción de las condiciones de la colonia de An. Pseudopunctipennis: huevo

Los huevos se colectan en contenedores de 15 a 20 cm de diámetro, conteniendo de 500 a 600 ml de agua forrados con una tira de papel filtro, los huevos se obtienen del contenedor pegados al papel filtro o flotando en el agua (Villarreal et al, 1998). Los huevos eclosionan en 2 días. Se deben de reemplazar el contenedor diariamente si se observan huevos en él. Se ha reportado que los huevos de algunas especies de *Anopheles* pueden ser envueltos en papel filtro húmedo y almacenado en un refrigerador hasta 14 días (Gahan en 1967). La cantidad de huevos depositados por una hembra es de 100 a 150.

Larva

Las larvas que eclosionan o son colectadas en campo son transferidas a contenedores en una proporción de 0.33 a 0.50 larvas/cm², a una temperatura de 27°C (Gerberg, 1970). En otros estudios se han colocado a la proporción de 0.43 a 63 larvas/cm², es decir, de 700 a 1000 larvas en contenedores de (43x43X7cm), con una profundidad de llenado de 1,5 a 2 cm. El agua potable utilizada fue filtrada, y el alimento suministrado fue comida de ratón molida (Villarreal et al, 1998). En otro estudio la dieta consistió de 2 partes de polvo de hígado, 2 partes de levadura molida y 1 parte de un suplemento para puerco, preparado en una suspensión (Darsie and Lopez, 1980). Esta fase dura de 6 a 10 días (Tabla 5).

Pupa

Las pupas se extraen de los contenedores larvarios y se colocan en el contenedor de emergencia con tapa cónica (con orificio de salida), y se introducen a la jaula. Este periodo dura 2 días.

Adulto

Los adultos emergen en las jaulas. En jaulas de 1 pie cúbico, se puede criar de 500 a 750 mosquitos; en jaulas de 2 pies cúbicos (BioQuip Product Cat. 1450D) se pueden mantener de 1000 a 3000. Dentro de ellas se colocan torundas humedecidas con solución de sacarosa al 10%. Las condiciones van de 27 a 29°C de día y descendiendo de 24-25°C en la noche, 70 a 90% de humedad relativa. Fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. En estas condiciones, el apareamiento puede ser inducido cuando empieza el periodo de oscuridad, por medio de una linterna con un foco incandescente de 1.2 watts, dirigiendo el haz de luz por 30 minutos sobre la jaula. Después de la quinta generación en el laboratorio se ha observado que empiezan a aparearse naturalmente, sin necesidad de utilizar la linterna (Villarreal et al, 1998). La alimentación sanguínea se hace por medio de conejos (Tabla 6).

Tabla 5. Parámetros y condiciones generales para el mantenimiento de colonias de algunas especies de mosquitos Anofelinos (Fase Inmadura).

Especie	Densidad larvaria larvas/Litro (larva/cm ²)	Temp en °C	Alimento	Desarrollo larvario (días)	Desarrollo de Pupa (días)
<i>An albimanus</i> Wiedemann, 1820	130-160/1L (0.36-0.45/cm ²)	27°	alimento para perro, levadura en polvo	7-14	2
<i>An. aquasalis</i> Curry, 1932	100/1L [10% agua de mar] (0.20/cm ²)	27°	Comida para peces	10-12	2
<i>An. aztecus</i> Hoffmann, 1935	100/L (0.2/cm ²)	27°	Alimento para perro, polvo de hígado de res	8-12	2
<i>An. crucians</i> Wiedemann, 1828	100/L (0.2/cm ²)	27°	Alimento para perro, polvo de hígado de res	8-12	2
<i>An. darlingi</i> Root, 1926	50/1 L (0.15/cm ²)	27°	Levadura en polvo,	6-12	2
<i>An. freeborni</i> Aitken, 1939	85/L (0.2/cm ²)	23°	Harina de pescado con 10% levadura	11-19	3
<i>An. punctipennis</i> (Say, 1823)	100/L (0.2/cm ²)	27°	Alimento para perro, polvo de hígado de res	8-12	2
<i>An. quadrimaculatus</i> Say, 1824	100/L (0.2/cm ²)	27°	Alimento para perro, polvo de hígado de res	8-12	2

Tabla 6. Parámetros y condiciones generales para el mantenimiento de colonias de algunas especies de mosquitos Anofelinos (Fase Adulta).

Especie	T °C y H.R.	Sustrato de Oviposición	Alimento carbohidratos	Alimentación sanguínea	Foto-periodo en horas	Eclosión de Huevos (días)
<i>An albimanus</i>	27°, 70%	Agua potable, papel filtro	Sacarosa 10%	Ratón, conejo.	10:14	2
<i>An. aquasalis</i>	27°, 80-85%	Agua potable, papel filtro	Solución sacarosa 10%	Ratón, conejo	12:12	2
<i>An. aztecus</i>	25-28°, 80%	Agua potable, papel filtro	Solución sacarosa 10%	Ratón, conejo.	12:12	2
<i>An. crucians</i>	25-28°, 80%	Agua potable, papel filtro	Solución sacarosa 10%	Ratón, conejo.	12:12	2
<i>An. darlingi</i>	26-28°, 80-90%	Papel filtro húmedo	Miel sobre algodón	Ratón, conejo	12:12	1-2

<i>An. freeborni</i>	22-24°, 70%	Agua potable, papel filtro	Solución sacarosa 10%	Ratón, conejo	14:10	3
<i>An. punctipennis</i>	25-28°, 80%	Agua potable, papel filtro	Solución sacarosa 10%	Ratón, conejo.	12:12	2
<i>An. quadrimaculatus</i>	25-28°, 80%	Agua potable, papel filtro	Solución sacarosa 10%	Ratón, conejo.	12:12	2

Referencias de tablas 5 y 6: Bailey et al, 1980; Dennett y Meisch, 2000; Depner y Harwood, 1966; Gerberg, 1970; Oliveira Resende, 2013; Pollard, 1960; Ríos-Velásquez, 2013.

Condiciones de colonia de Culicini (Subfamilia Culicinae: Culicini)

Este género contiene especies que son vectores de algunos arbovirus, los cuáles producen diversas encefalitis como la EEE, equina del oeste (WEE), equina venezolana (VEE), JE, SLE, y el WNV. Además de transmitir la filariasis linfática humana y la malaria aviar.

Descripción de las condiciones de la colonia de Cx. quinquefasciatus

Cx. quinquefasciatus es una especie de este grupo que se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, presenta una gran importancia médica y veterinaria, ya que es el transmisor de varias de las enfermedades mencionadas en el párrafo previo. El fotoperiodo usual para esta especie es de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, con las condiciones de Temperatura de 28°C y 70-80% de humedad relativa.

Huevo

Sus huevos son depositados en conjuntos llamados barquillas sobre la superficie del agua. Dichas barquillas están compuestas de 100 a 150 huevos. Los contenedores para la oviposición en esta especie son de color oscuro y deben de contener agua, al menos en 2.5 cm de profundidad, estos se colocan dentro de las jaulas de 48 a 72 horas posteriores a la alimentación sanguínea, considerando su ciclo gonotrófico (Elizondo-Quiroga et al, 2006a). Se recomienda que se agreguen algunas larvas y pupas de la misma especie en el contenedor para estimular la oviposición (Service, 1995). Se debe de contemplar que los huevos eclosionan entre las 24 y 30 horas posteriores, por lo que se deben de transferir a la charolas de crianza de las larvas.

Larva

Las barquillas deben de transferirse a las charolas con agua reposada (declorinada), la temperatura a la que debe estar el agua es entre 27-28°C (Tabla 7). Considerando que cada barquilla puede llegar a tener hasta 150 huevos, se debe de calcular la densidad larvaria para cada charola para evitar la sobrepoblación. Se puede utilizar las mismas densidades mencionadas para *Ae. aegypti*, pero se ha mencionado que se pueden tener de 0.6-3 larvas/cm² (Gerberg en 1970).

En cuanto a la alimentación, esta puede ser comida para perro finamente molida. Para una bandeja de 750 larvas se agrega 1 gr de comida al día, esto hasta el quinto día. También se ha mencionado que se puede utilizar el mismo esquema de alimentación que en *Ae. aegypti*, pero a partir del segundo estadio, se debe duplicar la cantidad de alimento (Pérez et al 2004). El periodo de desarrollo larva es de 5-7 días a 28°C.

Pupa

Este periodo tiene una duración de 36-48 horas a 28°C. Las pupas se colocan dentro de las jaulas siguiendo el procedimiento descrito para aedinos (Tabla 7).

Adulto

Las jaulas de 1 pie cubico son suficientes para albergar de 500 a 750 mosquitos. Se debe de agregar como fuente de carbohidratos, torundas con 10% de solución de sacarosa, pasas o miel. La alimentación sanguínea debe hacerse entre el tercero y cuarto día posteriores a la emergencia del adulto, lo más usual es utilizar un pollo inmovilizado, considerando que este género tiene hábitos ornitofílicos, pero ya que esta especie es oportunista se pueden utilizar algunos mamíferos (Elizondo-Quiroga et al, 2006b). Es recomendable extraer la fuente de carbohidratos 24 horas previas a la alimentación (Tabla 8).

Tabla 7. Parámetros y condiciones generales para el mantenimiento de colonias de algunas especies de mosquitos del género *Culex* (Fase Inmadura).

Especie	Densidad larvaria larvas/Litro (larva/cm ²)	Temp en °C	Alimento	Desarrollo larvario (días)	Desarrollo de Pupa (días)
<i>Cx. erythrothorax</i> Dyar, 1907	75-100/1L (0.2/cm ²)	28°	polvo de hígado alimento para perro	10-13	2
<i>Cx. nigripalpus</i> Theobald, 1901	125/1L [5% agua de mar] (0.35/cm ²)	27°	Levadura y polvo de hígado	5	2-4
<i>Cx. pipiens</i> Linnaeus, 1758	250-350/1L (0.6-3/cm ²)	28°	Alimento para peces, comida para perro	5-7	2
<i>Cx. portesi</i> Senevet & Abonnenc, 1941	250/L agua con hojas de bambú (0.5/cm ²)	20-31°	Levadura	14	3
<i>Cx. salinarius</i> Coquillett, 1904	75-100/1 L (0.24/cm ²)	27°	Alimento para conejo	10-15	2
<i>Cx. Stigmatosoma</i> Dyar, 1907	75-100/L (0.2/cm ²)	22°	Alimento para conejo	14-16	3
<i>Cx. tarsalis</i> Coquillett, 1896	170-280/1L (0.21-0.35/cm ²)	22°	Alimento para peces, alimento para perro	8-13	3
<i>Cx. thriambus</i> Dyar, 1921	75-100/L (0.2/cm ²)	21°	Alimento para conejo	14-16	3

Tabla 8. Parámetros y condiciones generales para el mantenimiento de colonias de algunas especies de mosquitos del género *Culex* (Fase Adulta).

Especie	T °C y H.R.	Sustrato de Oviposición	Alimento carbohidratos	Alimentación sanguínea	Foto-periodo en horas	Eclosión de Huevos (días)
<i>Cx. erythrothorax</i>	24°, 80%	Agua	Sacarosa 10%, manzana, pasas	Ratón, conejo.	14:10	1-2
<i>Cx. nigripalpus</i>	24°, 80%	Agua con infusión de pasto u hojas de roble	Solución sacarosa 2.5%	Pollo	12:12	1-2
<i>Cx. pipiens</i>	28°, 70-80%	Agua potable	Solución sacarosa 10%	Pollo	12:12	1-2
<i>Cx. portesi</i>	26-28°, 70%	Agua de lluvia	Solución sacarosa 2.5%	Ratón, conejo	12:11 + 1 anoche	2
<i>Cx. salinarius</i>	27-28°, 80%	Agua potable	manzana, solución sacarosa 10%	Ratón, conejo, pollo	14:10	2-3

Cx. Stigmatosoma	22-25°, 70%	Agua potable	Solución sacarosa 10%	Ave	16:6.5 + 1:0.5 Crepúsculo en F1	2
Cx. tarsalis	24-27°, 40%	Agua potable	Solución sacarosa 10%	Ratón, conejo, pollos	16:6 + 1:1 Crepúsculo en F1	3
Cx. thriambus	25°, 70%	Agua potable	Solución sacarosa 10%	Pollo	16:6.5 + 1:0.5 Crepúsculo en F1	2

Referencias de Tablas 7 y 8: Ball y Chao, 1956; Blakeslee, 1962; Brennan y Harwood, 1953; Gerberg, 1970; Knight y Nayar, 1999; Krishnan, 1964; Peloquin y Asman, 1988; Takahashi, 1968; Wallis y Withman, 1968.

Condiciones de colonia de Toxorhynchitinae (Subfamilia: Toxorhynchitinae)

La importancia de esta subfamilia yace en que sus larvas son depredadores de otras larvas de la familia Culicidae, por lo que se han hecho muchos estudios para utilizarlos como un método de control biológico, además, no presentan hematofagia en su fase adulta, por lo que son inocuos para el humano (Focks, 2007).

Huevo

Los huevos de este género son ovales con apariencia granular, de color blanco a amarillento, y no resisten la desecación. Estos son depositados individualmente por las hembras mientras hace un vuelo vertical sobre el sitio de oviposición, haciendo movimientos de arriba a abajo de manera elíptica sin tocar la el agua, hasta que deposita el huevo en el contenedor. Los contenedores de oviposición que se colocan dentro de la jaula son de color oscuro conteniendo agua de 100 a 150 ml. Dependiendo la especie, los huevos eclosionan de 24 a 72 horas. La manipulación del huevo se puede hacer por medio de pincel de pelo de camello (Gerberg, 1970; Focks, 2007).

Larva

Todas las fases larvales de esta subfamilia son depredadores y caníbales en ausencia de presas, o si los contenedores son pequeños. En ausencia de presas, la larva no se desarrolla y muere. La duración de esta fase puede ser de 15-19 días, consumiendo cerca de 250 larvas. En el 4° estadio antes de pupar, presenta un comportamiento compulsivo asesino prepupal, donde mata muchas presas pero no las come o no por completo. Puede resistir inanición por varias semanas en el último estadio larval. Se ha reportado que algunas veces se crían en pequeños contenedores de manera individual, pero en crías masivas, se han cultivado en densidad larvaria de 50-100 larvas / Litro de agua (0.16 a 0.20larvas/cm²) y de alimento 4000 larvas de *Ae. aegypti* diarias; el tamaño de las larvas que servirán de alimento, debe de ir aumentando en función del crecimiento de las larvas a alimentar (Focks, 2007; Flores-Leal,1993).

Pupa

La pupa puede ser colectada del contenedor con larvas por medio de sifones grandes o cucharones, y colocada sobre papel filtro humedecido o contenedores con agua para emerger el adulto, pero no debe de haber más de 3 pupas/cm², debido a que se incrementa la mortalidad por ahogamiento de los adultos al emerger; Esta fase requiere de 4 -6 días (Focks, 2007).

Adulto

Los adultos de este género se crían mejor en jaulas grandes de al menos 60cm³ (dos pies cúbicos), en jaulas pequeñas puede haber ausencia de oviposición. Las jaulas pueden albergar hasta 500 especímenes. Las condiciones requeridas para su crianza son de 24-27°C y de 75 a 85% de humedad relativa, el fotoperiodo puede ser de 14 horas luz y 10 de oscuridad. Se les debe de administrar rebanadas de piña, plátano, manzana o solución azucarada al 10%, como dieta de carbohidratos (Focks and Hall, 1977).

REFERENCIAS.

- Alto, B.W. and S.A. Juliano. (2001). Temperature effects on the dynamics of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations in the laboratory. *J Med Entomol.*, 38(4): 548–556.
- Ball, G.H. and J. Chao. (1956). Laboratory colonization of *Culex stigmatosoma*. *Mosq. News*, 16(4): 306.
- Bailey, D.L., R.E. Lowe and P.E. Kaiser. (1980). A reliable technique for rapid colonization of *Anopheles albimanus* Wiedemann. *Mosq. News*, 40(3): 410-412.
- Belkin, J.N., C.L. Hogue, P. Galindo, T. H. Aitken, R. X. Schick y W. A. Powder. (1967). Estudios sobre mosquitos (Diptera: Culicidae). Ila. Metodos para coleccionar, criar y preserver mosquito. *Contrib. Amer. Ent. Inst.*, 1(2):24-89.
- Blakeslee, T. E., P. T. Rigby, J.V. Roque, E.H. Wilson, and J. Hall. (1962). Observations of a laboratory colony of *Culex erythrorax*. *Mosq. News*, 22: 160-161.
- Brennan, J.M. and R.F. Harwood. (1953). A preliminary report on the laboratory colonization of the mosquito, *Culex tarsalis* Coquillett. *Mosq. News*, 13(2): 153-157.
- Casas-Martínez, M., A. Orozco-Bonilla, M. Muñoz-Reyes, A. Ulloa-García, J. G. Bond, J. Valle-Mora, M. Weber, J. C. Rojas. (2013). A new tent trap for monitoring the daily activity of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *J Vector Ecol.*, Vol. 38, Nom. 2, Pags. 277- 288.
- Darsie jr, R.F. and G.A. López. (1980). Studies of colonization of El Salvador strains of *Anopheles pseudopunctipennis pseudopunctipennis*. *Mosq. News*, 40(2): 194-199.
- Deng, L., S.Y. Koou, A.B. Png, L.C. Ng, and S.G. Lam-Phua. (2012). A novel mosquito feeding system for routine blood-feeding of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Tropical Biomedicine*, 29(1): 169–174.
- Dennett, J.A. and M.V. Meisch. (2000). A simple technique for rapid colonization of *Anopheles quadrimaculatus* using adults aspirated from livestock barns. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 16(3): 268-270.
- Depner, K. R., and R.F. Harwood. (1966). Photoperiodic responses of two latitudinally diverse groups of *Anopheles freeborni* (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol., Soc. Am.*, 59: 7-11.
- Elizondo-Quiroga, A., A. Flores-Suarez, D. Elizondo-Quiroga, G. Ponce-Garcia, B.J. Blitvich, J.F. Contreras-Cordero, J.I. Gonzalez-Rojas, R. Mercado-Hernandez, B.J. Beaty and I. Fernandez-Salas. (2006a).
- Gonotrophic cycle and survivorship of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) using sticky ovitraps in Monterrey, northeastern, Mexico. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 22(1): 10-14.
- Elizondo-Quiroga, A., A. Flores-Suarez, D. Elizondo-Quiroga, G. Ponce-Garcia, B.J. Blitvich, J.F. Contreras-Cordero, J.I. Gonzalez-Rojas, R. Mercado-Hernandez, B.J. Beaty and I. Fernandez-Salas. (2006b). Host-feeding preference of *Culex quinquefasciatus* in Monterrey, northeastern, Mexico. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 22(4): 654-661.
- Focks, D.A. (2007). *Toxorhynchites* as biocontrol agents. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, Bull. No. 7. Vol. 23 (2): 118-127.
- Focks, D.A., and D.W. Hall. (1977). Laboratory colonization and biological observations of *Toxorhynchites rutilus rutilus*. *Mosq. News*, 37(4): 751-755.
- Flores-Leal, J.A. (1993). Respuesta funcional de *Toxorhynchites theobaldi* (Dyar y Knab) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linn.) vector del dengue. Tesis de Maestría en Entomología Médica. Universidad Autónoma de Nuevo León. <http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080072476.PDF>.
- Gaffigan, T and J. Pecor. (1997). Collecting, rearing, mounting and shipping mosquitoes. Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU). <http://www.wrbu.org/Techniques.html>. Revisado el 10 de julio de 2015.
- Gahan, J. B. (1967). *Anopheles quadrimaculatus* Say. In Smith, C. N. Insect colonization and mass production. Academic Press, N.Y. 85-100.

Gerberg, E.J. (1970). Manual for mosquito rearing and experimental techniques. Bull. No. 5. Am. Mosq. Control Assoc., 109.

Hoshino, K, H. Isawa, Y. Tsuda and M. Kobayashi. (2010). Laboratory colonization of *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) collected in Narita, Japan and the biological properties of the established colony. Jpn. J. Infect. Dis., 63: 401-404.

Knight, J.W. and J.K. Nayar. (1999). Colonization of *Culex nigripalpus* Theobald (Diptera: Culicidae) by stimulation of mating using males of other mosquito species. J. Am. Mosq. Control Assoc., 15(1): 72-73.

Krishnan, K.S. (1964). A note of colonization of *Culex*. Bull. Wld. Hlth. Org., 31: 455-456.

Leon Rosen, M.V., L. Mousson and A.B. Failloux. (2003). Low oral receptivity for Dengue type 2 viruses of *Aedes albopictus* from southeast Asia compared with that of *Aedes aegypti*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 68(2): 203–208.

Ley General de Salud http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/legis/lgs/LEY_GENERAL_DE_SALUD.pdf. Revisado el 21 de Julio de 2015.

Manual para la colecta, cría e instalación de insectario para *Aedes aegypti*, Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/quia_pruebas_biologicas.pdf. Revisado el 21 de julio de 2015.

McClelland, G.A.H. 1974. A worldwide survey of variation in scale pattern of the abdominal tergum of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Trans. R. Ent. Soc. Lond., 126, (2): 239-259.

Muirhead Thomson, R.C. (1938). The Reactions of Mosquitoes to Temperature and Humidity. Bulletin of Entomological Research, 29(2): 125-140. doi:10.1017/S0007485300026158.

Nelson Davis, A. (1958). Colonization of *Aedes taeniorhynchus*. Mosq. News, 18(1):4-5.

Norma Oficial Mexicana NOM-029-ZOO-1995, Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoonosanitaria. http://www.vertic.org/media/National%20Legislation/Mexico/MX_NOM-029-ZOO-1995.pdf. Revisado el 21 de julio de 2015.

Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5389045&fecha=16/04/2015. Revisado el 21 de julio de 2015.

Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>. Revisado el 21 de Julio de 2015.

Norma Oficial Mexicana NOM-232-SSA1-2009, Plaguicidas: que establece los requisitos del envase, embalaje y etiquetado de productos grado técnico y para uso agrícola, forestal, pecuario, jardinería, urbano, industrial y doméstico. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5139018&fecha=13/04/2010. Revisado el 21 de Julio de 2015.

Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5275587&fecha=26/10/2012. Revisado el 21 de Julio de 2015.

Oliveira Rezende, F. (2013). *Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis*, Curry 1932: estudo de contaminação por baciloentomopatogênico em colônias mantidas em insetários. Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós -Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias. Belo Horizonte. www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/D_95.pdf. Revisado el 15 de Julio de 2015.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2015.

Chikungunya:

http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=343&Itemid=40931&lang=es Revisado el 18 de Julio de 2015.

Dengue: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=1&Itemid=40734&lang=es Revisado el 18 de Julio de 2015.

Fiebre amarilla:

http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=69&Itemid=40784&lang=es Revisado el 18 de Julio de 2015.

Zika: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=427&Itemid=41484&lang=es Revisado el 18 de Julio de 2015.

Peloquin, J.J. and S.M. Asman. (1988). Use of a modified marchand cage to study mating and swarming behavior in *Culex tarsalis*, with reference to colonization. J. Am. Mosq. Control Assoc., 4(4): 516-519.

Pérez, O., J. Rodríguez, J.A. Bisset, M. Leyva, M. Díaz, O. Fuentes, F. Ramos, R. González y I. García. (2004). Manual de indicaciones técnicas para insectarios. Ed. Ciencias Médicas, La Habana, Cuba 60 p.

Pollard, D.G. (1960). An improved diet for insectary rearing of *Anopheles quadrimaculatus* Say. Mosq. News, 20(1): 57-58.

Poole-Smith, B.K., R.R. Hemme, M. Delorey, G. Felix, A.L. Gonzalez, M. Amador, E.A. Hunsperger and R. Barrera. (2015). Comparison of Vector Competence of *Aedes mediiovittatus* and *Aedes aegypti* for Dengue Virus: Implications for Dengue Control in the Caribbean. PLoS Negl Trop Dis, 9(2): e0003462. doi:10.1371/journal.pntd.0003462.

Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología del convenio sobre la diversidad biológica. Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. <http://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/comunicacion/publicaciones/cartagena-protocol-es.pdf>. Revisado el 21 de Julio de 2015.

Reglamento de la ley de bioseguridad de organismos genéticamente modificados. Nuevo Reglamento publicado en el Diario Oficial de la Federación el 19 de marzo de 2008 TEXTO VIGENTE Última reforma publicada DOF 06-03-2009. http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/regley/Reg_LBOGM.pdf. Revisado el 21 de Julio de 2015.

Rios-Velásquez, C.M., K.M. Martins-Campos, R.C. Simões, T. Izzo, E.V. dos Santos, F.A.C. Pessoa, J.B.P. Lima, W.M. Monteiro, N.F.C. Secundino, M.V.G. Lacerda, W.P. Tadei and P.F.P. Pimenta. (2013). Experimental *Plasmodium vivax* infection of key *Anopheles* species from the Brazilian Amazon. Malaria Journal, 2013, 12:460 <http://www.malariajournal.com/content/12/1/460>.

Service, M.W. (1995). Mosquito ecology field sampling methods. Vol 1. 2nd edition. Springer Science + Bussines Media Dordrecht. p. 59.

Sy, V.E. and R.E. Campos. (2008). Effect of diet composition on the development of the floodwater mosquito *Ochlerotatus (Ochletotatus) albifasciatus* (Macquart) (Diptera: Culicidae). Neotropical Entomology, 37(6):729-732.

Takahashi, M. (1968). Laboratory rearing of *Culex (Melanoconion) portesi* Senevet and Abonnenc. Mosq. News, 28:82-84.

The Guidance Framework for testing genetically modified mosquitoes. WHO, (2014). <http://www.who.int/tdr/publications/year/2014/guide-fmrk-gm-mosquit/en/>. Revisado el 21 de Julio de 2015.

Trimble, R.M. and W.G. Wellington. (1979). Colonization of North American *Aedes togoi*. Mosq. News, 39(1):18-20.

Van Uitregt, V.O., T. P. Hurst and R.S. Wilson. (2012). Reduced size and starvation resistance in adult mosquitoes, *Aedes notoscriptus*, exposed to predation cues as larvae. Journal of Animal Ecology, 2012, 81, 108–115. doi: 10.1111/j.1365-2656.2011.01880.x.

Villarreal, C., J.I. Arredondo-Jiménez, M.H. Rodríguez and A. Ulloa. (1998). Colonization of *Anopheles pseudopunctipennis* from Mexico. J. Am. Mosq. Control Assoc., 14(4):369-372.

Wallis, R.C. and L. Whitman. (1968). Colonization of *Culex salinarius* in the laboratory. Mosq. News, 28(3): 366-368.

Watson, T.M., K.L. Marshall, and B.H. Kay. (2000). Colonization and laboratory biology of *Aedes notoscriptus* from Brisbane, Australia. J. Am. Mosq. Control. Assoc., 16(2):138-142.

Willem, R. (1925). Relation between temperature, humidity and activity of house mosquitoes. Journal of the New York Entomological Society, 33(3): 163-169.

Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU). (2005). Systematic catalog of Culicidae: *Anopheles pseudopunctipennis*. http://www.mosquitocatalog.org/taxon_descr.aspx?ID=18300. Revisado el 12 de julio de 2015.