

Terapia génica en enfermedades neurodegenerativas.

Estudiante

Laura Manjarrés Madrid

Director(es)

Juliana María Martínez MsC.

Docente universidad CES.

Melvin Yesid Rincón PhD.

Científico senior en *In Vitro Pharmacology*.

Trabajo de Grado

En la modalidad de *Pasantía*

Programa de Biología

Universidad CES

Medellín

2020

16 de mayo de 2020.

Se informa que el estudiante **Laura Manjarrés Madrid** identificada con cédula: No. 1040183961 ha concluido de manera satisfactoria su trabajo de grado titulado “**terapia génica en enfermedades neurodegenerativas**” en la modalidad de *Pasantía*.

En calidad de **directores** del trabajo de grado en mención, y luego de haber revisado con detalle y alto rigor científico y académico el presente documento final, se aprueba este Trabajo de Grado como requisito parcial para optar al título de **Biólogo**.



Juliana María Martínez Garro
Cédula: 21788692



Melvin Yesid Rincón
Acelas Cédula:
91538412

Tutor

Terapia génica en enfermedades neurodegenerativas.

Laura Manjarrés Madrid

Resumen

La terapia génica es una estrategia con la cual se busca corregir directamente el defecto genético en lugar de tratar las consecuencias de este (1,2). Se empezó a hablar sobre esta técnica entre 1960 y 1970 gracias a los avances en áreas como biología celular y molecular, genética, virología, biología tumoral, ingeniería genética y el proyecto de genoma humano.

Esta terapia busca mejorar, evitar o detener la enfermedad partiendo de la modificación de genes(3,4).

En este momento *VIB – KU Leuven Laboratory of Glia Biology* está investigando esta técnica para tratar el alzhéimer. En este laboratorio están usando métodos como diseño racional y evolución dirigida, generando cápsides y transgenes, con los cuales se está comenzando a estudiar su efecto en el cerebro. Por esto durante el segundo semestre del 2019 realice una pasantía en *VIB – KU Leuven*, con la dirección del Dr. Melvin Yesid Rincón y con el apoyo del Dr. Jordan Koepper. Durante este tiempo tuve la oportunidad de realizar diversos avances en sus investigaciones, lo cual me permitió crecer en mis conocimientos en esta área de interés.

Palabras clave: AAV, transgén, vector viral.

Tabla de contenido

RESUMEN	3
PALABRAS CLAVE:	3
1. PRESENTACIÓN TRABAJO	5
2. RESEÑA DE LA INSTITUCIÓN LUGAR	7
3. OBJETIVOS	8
3.1 OBJETIVO GENERAL	8
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
4. LOGROS ALCANZADOS	8
5. DIFICULTADES	8
6. RESULTADOS	9
6.1 ANÁLISIS DE INHIBICIÓN DE LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE POR EL SOFTWARE <i>IMAGEJ</i> CON LA HERRAMIENTA DE ROI ..9	
6.2 CURSO FELASA TIPO B	13
6.3 TRADUCCIÓN DE PROTOCOLOS USADOS	13
7. CONCLUSIONES	14
8. APÉNDICES	15
8.1 CARTA DE AUTORIZACIÓN	15
8.2 PROTOCOLOS GENERALES PARA LA GENERACIÓN Y EVALUACIÓN DE TRANSGENES.	16
8.3 PROTOCOLOS PARA EL MANEJO DE CÉLULAS HEK293T	26
8.4 PROTOCOLOS DE PRODUCCIÓN AAV	39
8.5 PROTOCOLOS PARA EXPERIMENTACIÓN EN ANIMALES	52
9. BIBLIOGRAFÍA	64

1. Presentación trabajo

La terapia génica es una estrategia con la cual se busca corregir directamente el defecto genético en lugar de tratar las consecuencias de este (1,2). Se empezó a hablar sobre esta técnica entre 1960 y 1970 gracias a los avances en áreas como biología celular y molecular, genética, virología, biología tumoral, ingeniería genética y el proyecto de genoma humano.

Esta terapia busca mejorar, evitar o detener la enfermedad partiendo de la modificación de genes (3,4), se trabaja sobre dos líneas de células, las germinales y las somáticas, la más desarrollada hasta el momento es la terapia génica en células somáticas. Cuando se trabaja sobre este tipo de células, al ingresar la corrección del material genético, se busca controlar, disminuir o detener el desarrollo de la enfermedad. Por otra parte, cuando se trabaja en líneas germinales se afecta no solo al individuo sino a toda su descendencia, pues este cambio en los genes estará presente también en la información genética de su descendencia (1,5,6).

La terapia génica puede darse por la introducción en el individuo de DNA, RNA o células modificadas genéticamente (3,7,8), la transferencia de estos compuestos puede ser: *In vivo*, cuando consiste en la introducción de transgenes por medio de vectores a través del torrente circulatorio o células de la piel; *In situ*, cuando la modificación genética se realiza directamente en el órgano defectuoso; por último, *Ex vivo*, que consiste en la transferencia de genes en células viables que han sido temporalmente removidas del cuerpo, las cuales son reinsertadas en el organismo (1).

La transferencia de estos genes se puede hacer principalmente por 2 métodos:

1. Vectores no virales: La introducción de los transgenes en el individuo se dan por medios físicos o químicos, como lo puede ser la electroporación (1,9) que es un proceso por medio del cual se desestabiliza la membrana celular con pulsos eléctricos, volviéndola permeable al ingreso de moléculas exógenas y de gran tamaño, las cual en el caso de la terapia génica serán transgenes. Debido al lugar en el cual se realiza la descarga positiva y la negativa el transgén puede llegar hasta el núcleo, luego de atravesar la membrana de una forma muy eficaz (10–12). El problema con esta técnica es la necesidad de una alta experiencia en la realización del proceso para conseguir resultados óptimos, por otro lado, según las células diana solo se podrá realizar en momentos específicos del embarazo o de la niñez (12).
2. Vector viral: Este vector se escoge según la enfermedad a tratar, es decir, se escoge un virus que infecten específicamente las células presentes en el tejido blanco, además se tiene que evaluar las ventajas y desventajas que este virus le confiere a la terapia de dicha enfermedad (1,4,9). Por otra parte, también se pueden usar los transposones en conjunto con otros medios físicos, como lo es la electroporación explicada en los vectores no virales. Los transposones, como *missPiggy*, este tipo de vectores, aparte de ser más sencillos en de fabricar permiten el introducción de genes de gran tamaño en el sistema nervioso central (13).

Entre los vectores virales, están los basados en virus Adenoasociados (AAV) los cuales no se integran en el genoma, pueden infectar diferentes tipos de células, y presentan un bajo grado de respuesta inmune (14). Una de sus principales limitaciones es el tamaño del gen que pueden integrar, el cual es muy pequeño en términos de pares de bases (pb) debido al tamaño de la partícula viral. Los vectores AAV

presentan un tropismo específico con diferentes células diana por medio de una interacción entre las proteínas de la cápside y sus receptores celulares afines (5,15,16).

Hay que tener en cuenta que entre las principales desventajas que estos dos tipos de vectores comparten esta la respuesta inmune que se genera, además del hecho que tanto la baja como la alta expresión de ciertos genes puede provocar infección, toxicidad o la expresión de distintas enfermedades (17,18).

En este momento *VIB – KU Leuven Laboratory of Glia Biology* está investigando estas diferentes técnicas de terapia génica para tratar el Alzheimer. En este laboratorio usando métodos como diseño racional y evolución dirigida han podido generar cápsides y transgenes, con los cuales se está comenzando a estudiar su efecto en el cerebro.

La mayor problemática en este momento es conseguir la cantidad correcta de expresión de los genes, es decir, que los transgenes ingresen con el tropismo suficiente como para infectar las células blanco y conseguir que estas expresen los genes necesarios sin generar efectos adversos.

Para conseguir esto, por una parte, se plantea realizar investigaciones de AAV auto-complementarios (sc), los AAV presentan una cadena simple de DNA de aproximadamente 4.8 kilo bases, su genoma está compuesto por 3 genes llamados rep, cap y aap, estos virus presentan baja respuesta inmune, además de tropismo específico con diferentes células diana por medio de una interacción entre las proteínas de la cápside y sus receptores celulares afines, por esto hay diversas cápsides de estos virus, la cápside capaz de pasar la barrera hematoencefálica la cápside 9 y la nueva cápside PHP.B, esta presenta mayor tropismo y mejor transcripción del transgén de interés (5,17,19,20). Por otra parte, los AAVsc son virus compuestos por dos cadenas complementarias de ADN, de esta forma pese a que se reduce el tamaño del transgén usado aumenta la expresión del transgén en el sistema nervioso (17,21).

La otra investigación orientada a este tema es por medio de capsula de los vectores *missPiggy*, un sistema de plásmido diseñado específicamente para la electroporación *in-utero* que permite una detección económica, rápida y flexible de la función génica, a través de diferentes tipos de células del sistema nervioso central en diversas etapas de desarrollo (12,13,22,23).

Teniendo en cuenta la amplia trayectoria del instituto *VIB-KU Leuven*, su experiencia en terapia génica en enfermedades neurodegenerativas y mis metas de formación en el campo de la neurobiología, durante el segundo semestre del 2019 realice una pasantía en *VIB – KU Leuven Laboratory of Glia Biology*, con la dirección del Dr. Melvin Yesid Rincón y con el apoyo del Dr. Jordan Koepper.

Durante la pasantía en *VIB – KU Leuven Laboratory of Glia Biology* desarrolle actividades en una investigación dirigida por el Dr. Melvin Yesid Rincón, cuyo objetivo es maximizar la expresión génica de vectores virales como transportadores en procesos de terapia génica para las enfermedades neurodegenerativas, con esta actividad se fortaleció mi formación profesional como bióloga y desarrolle habilidades y destrezas claves en este campo de la Ciencias.

A pesar de que el tratamiento de enfermedades hereditarias por medio de la terapia génica ha tomado gran fuerza en los últimos años, aun presenta dificultades técnicas, las cuales varían según la enfermedad a tratar, y los métodos de administración. Razón por la cual en el laboratorio de glía busca aumentar la efectividad de esta terapia, como lo son vectores de AAV con mediadores-moduladores para aumentar la expresión del transgén.

En Colombia existen pocos profesionales con experiencia en este tipo de investigaciones, como dijo el Dr. Mauricio Arcos de la Universidad Simón Bolívar de Barranquilla: “Colombia está avanzando muy lentamente en los estudios en la materia y aunque hay algunos grupos con mayor desarrollo, no existe una política científica coherente y planificada a largo plazo para perseguir el ritmo que marcan los laboratorios de investigación en genética del mundo” (24). En la literatura reciente se mencionan pocos desarrollos de terapias génicas para las enfermedades neurodegenerativas en el país, por lo cual un profesional formado en este campo puede contribuir al desarrollo de investigaciones de este tipo en el ámbito nacional.

2. Reseña de la institución lugar

El Instituto flamenco de biotecnología o VIB (*Vlaams Instituut voor Biotechnologie*) está dedicado a la investigación de las ciencias de la vida con sede central en Flandes, Bélgica y cuenta con alrededor de 1.470 científicos de 60 países, este instituto trabaja en estrecha relación con las siguientes universidades belgas: Universidad de Gent, Universidad Católica de Leuven, Universidad de Amberes, Universidad libre de Bruselas y Universidad de Hasselt, siendo el gobierno flamenco el que hace las financiaciones (25).

El laboratorio asociado a la universidad católica de Leuven, es encargado de estudiar el cerebro y sus enfermedades, su nombre es “*VIB-KU Luven center for brain and disease research*”, cuyo objetivo principal es “desentrañar los mecanismos biológicos básicos de la neurobiología y las enfermedades cerebrales y buscar nuevos hallazgos para resolver los principales problemas médicos” (26), a la vez este laboratorio se divide en diversos grupos de investigación, entre ellos se encuentra *VIB – KU Leuven Laboratory of Glia Biology* dirigido por el Dr. Matthew Holt, el cual busca comprender el funcionamiento de las células gliales, estas representan el 60% de las células del cerebro, pero su función aun no es claro. Se cree que estas células están relacionadas con las enfermedades neurodegenerativas, como lo es el Alzheimer que es de alto interés en esta sede (27).

Los trabajos de este laboratorio toman gran relevancia dado que actualmente se conocen muchas enfermedades asociadas a mutaciones genéticas, por lo cual se vuelve una necesidad el poder desarrollar formas de tratarlas y corregir la enfermedad, además, de mejorar la vida de los pacientes.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Consolidar la formación como estudiante de Biología interesada en la aplicación de esta ciencia en el campo de la terapia génica para enfermedades neurodegenerativas por medio de una pasantía académica en *VIB – KU Leuven Laboratory of Glia Biology*.

3.2 Objetivos específicos

- Establecer la diferencia entre los serotipos de vectores AAV, ventajas y desventajas.
- Evaluar el uso de secuencias genéticas *In-Vivo* en modelos animales (*Mus musculus*)
- Conocer los procedimientos básicos y necesarios para la creación de vectores virales basados en virus adeno-asociados (AAV), incluyendo clonación, electroforesis, *maxi-midi prep*, transfección celular, producción, purificación, titulación de vectores AAV, construcción/evaluación de transgenes y manejo de células HEK.
- Adquirir conocimientos en uso de promotores, secuencias reguladores e inhibidores de expresión génica en combinación con vectores AAV.
- Aplicar los conocimientos adquiridos en experimentos *In-Vivo*, como la inyección de vectores, eutanasia en ratones, procesamiento de órganos y análisis de expresión genética.

4. Logros alcanzados

En la pasantía fue posible realizar más actividades de las esperadas en un principio. No acompañe específicamente solo la investigación del Dr. Melvin Yesid Rincón, sino, que tuve la oportunidad de colaborar a otros investigadores como lo fue el Dr. Jordan Koepper. La oportunidad de acompañar a estos dos investigadores me permitió aumentar el número de procedimientos aprendidos, por ejemplo, al trabajar con el Dr. Jordan pude conocer el manejo y mantenimiento del cultivo celular, para luego usar las células con el Dr. Melvin en el desarrollo de vectores de AAV, por lo cual pude aprender a detalle el proceso y manejo de estas técnicas.

Gracias a las bases que me permitieron tener estos dos investigadores fue posible para mi encargarme en su ausencia de diferentes áreas como el análisis de imágenes y el mantenimiento del cultivo celular para apoyar diversas investigaciones del laboratorio.

5. Dificultades

El principal inconveniente durante la pasantía fue el retraso de la investigación principal en la cual iba a participar. Cuando comenzamos a planear la pasantía se esperaba que la investigación del Dr. Melvin, enfocada

en el uso de mediadores-moduladores se encontraría en la fase de inyección y evaluación de los diferentes mediadores. Cuando comenzó mi pasantía en el mes de agosto de 2019, la llegada de los vectores desde Estados Unidos se atrasó un par de meses. Razón por la cual pase a apoyar otras investigaciones, para complementar mi conocimiento.

6. Resultados

6.1 Análisis de inhibición de la proteína verde fluorescente por el software *imagej* con la herramienta de ROI

A continuación, se explica uno de los análisis de imágenes que realizamos durante mi estancia académica. Las imágenes fueron obtenidas de ratones con 20 días de vida, los cuales fueron inyectado por medio de electroporación *in-utero* con un plásmido llamado *miss-piggy TB279*, el cual tiene como objetivo reducir la producción de la proteína verde fluorescente (GFP). Este transgén circular está formado por dos orígenes, un grupo de promotores (GFAP), la proteína de marcaje para el transgén (tdTomato) y el gen de interés mir30 el cual cambia en cada secuencia a evaluar. Exactamente se evaluaron cuatro transgenes, el gen mir30 tiene las siguientes especificaciones en cada uno (Fig.1):

1. Anti-GFP001: Este transgén tiene una modificación en mir30 el cual evita que se genere la proteína GFP.
2. Anti-GFP002: Este transgén tiene una modificación en mir30 el cual evita que la proteína GFP sufra sus transformaciones finales.
3. Anti-GFPtandem: En este caso las modificaciones presentes son la combinación ente Anti-GFP001 y Anti-GFP002.
4. Anti-GFPscramble: Este transgén no presenta el gen mir30, siendo el grupo control.

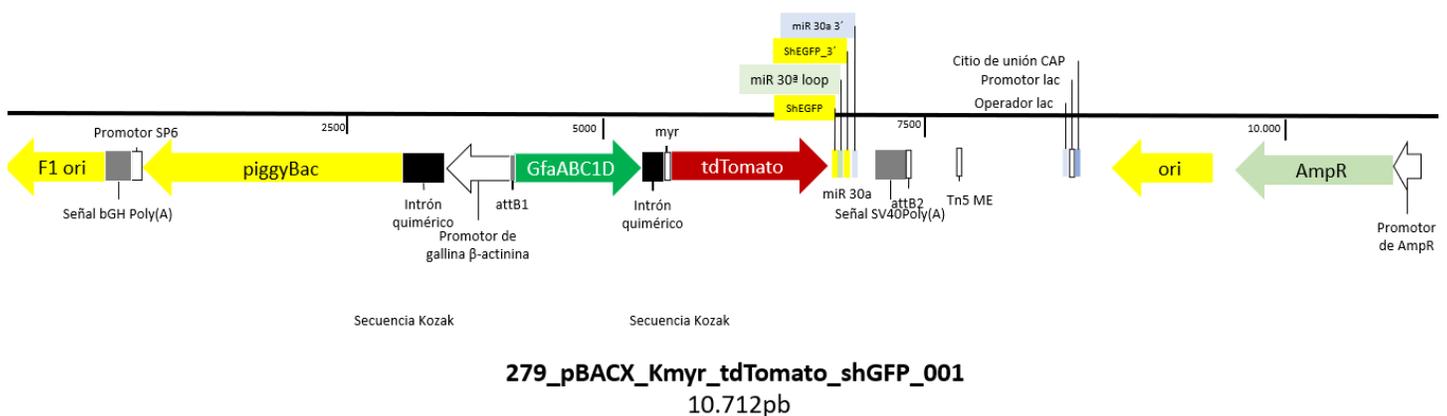


Figura 1. Construcción del plásmido *miss-piggy TB279* en la aplicación *snapgen*, la cual muestra la composición del transgén a usar, este consta del gen de interés (mir30), proteína marcadora del transgén (td-Tomato) y promotores necesarios para la introducción y transcripción del transgén. Este constructo se presenta en forma lineal para su mejor comprensión, pero en realidad es circular. Figura brindada por VIB – KU Leuven Laboratory of Glia Biology.

La GFP es muy usada para la evaluación de diferentes células o compuestos principalmente a nivel cerebral, esta presenta dos picos de excitación uno a 395nm y otro a 475nm, según el grado de excitación presentaran un grado de emisión de 508nm y 503nm respectivamente emitiendo una luz visible de color verdoso (28). Esta proteína fue hallada en un comienzo en la medusa *Aequorea victoria*, luego el gen responsable de esta bioluminiscencia fue insertado unido a marcador inmune aldehído deshidrogenasa-1 (aldh1h), en los *mus musculus* usados, lo cual permite la señalización de esta proteína común en el cerebro (29).

El marcador aldh1h es común en los cerebros que presentan buena respuesta inmune (30), siendo una proteína común en el cerebro de estos *mus musculus* modificados, por lo cual el nivel de inhibición será mayor y más fácil de evidenciar. Luego de evidenciar el porcentaje de inhibición capaz de presentar este transgén, la proteína blanco se cambiará por una proteína que se relaciona con la enfermedad que se desea tratar.

El estudio del transgén se comenzó realizando una operación *in-utero* a la madre el día 14 de preñes, en este proceso se extraen los fetos, se evalúo el útero y se sacó uno de los dos lados de este, se inyectaron los embriones en el lóbulo frontal del lado derecho con el transgén de interés, en este caso *missPiggy TB279*, se esperó el término del desarrollo de feto y al día diez de vida se evalúo el estado del transgén a través de microscopia de fluorescencia, los *mus musculus* que no presenten el transgén fueron descartado, por otro lado los que si lo presentaron (bajo el microscopio de luz fluorescente el cerebro se vera de color rojo) siguieron en el estudio y se dejaron desarrollar hasta el día veinte. Luego de este día se sacrificaron, se extrajo el cerebro, se fijaron y cortaron, para luego realizar un proceso de inmunohistoquímica en ellos, este proceso permitió analizar la presencia del transgén y la disminución de la proteína GFP a través de la herramienta ROI en la aplicación *imagej* (31).

Por cada transgén se evaluaron en total nueve cortes de tres cerebros distintos, siendo tres cortes por cerebro. Lo cual permitió obtener un resultado estadísticamente confiable.

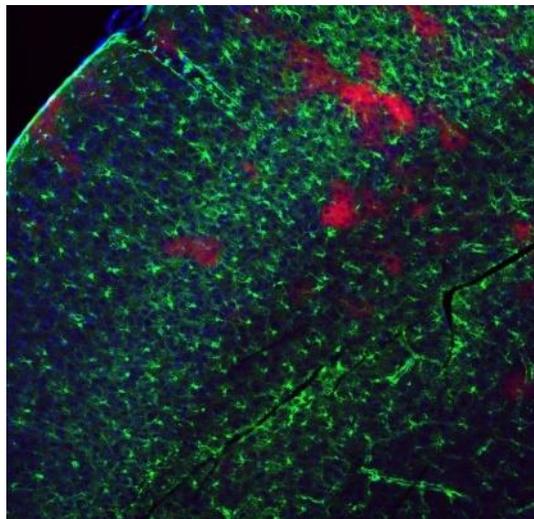


Figura 2. Corte de cerebro evaluado a través de inmunohistoquímica, este proceso es realizado con anticuerpos específicos para cada característica de interés, estos les permitirán iluminarse bajo una onda de luminiscencia específica, la cual emitirá un color específico a la característica en cuestión. En la imagen se pueden evidenciar tres tonalidades de onda, la azul representa los núcleos de las células,

el rojo muestra los lugares donde se encuentra el plásmido *missPiggy TB279* y por último el verde indica la presencia de GFP. Figura brindada por VIB – KU Leuven Laboratory of Glia Biology.

El proceso de inmunohistoquímica tiene como objetivo detectar y amplificar un antígeno específico, como lo pueden ser proteínas, por medio de polímeros conjugados, los cuales bajo una onda específica de luminiscencia emitirá una longitud de luz visible, dado que cada antígeno flúorese bajo diferentes longitudes de onda, la luz emitida será de diferente tonalidad, permitiendo diferenciar las moléculas de interés (32). En este caso, el azul representaba el núcleo de las células, el verde era la proteína GFP y el rojo era el plásmido *missPiggy TB279* marcado con tdTomato presente en el constructo (figura 2).

El proceso de lectura de las muestras se hizo a través de un microscopio de fluorescencia, cuando se logró la nitidez deseada se tomó una foto, la cual fue procesada a través de la aplicación *imagej*, este software separo la muestra según los colores, mediante la herramienta ROI se delinearón las áreas donde se presenta el plásmido *missPiggy*, estas áreas se compararon con la figura en la que se distingue la proteína GFP. El resultado que se esperaba es que las áreas iluminadas en la imagen que muestra el color rojo sean áreas sin iluminación a través del filtro verde (figura 3).

El programa mide el nivel de intensidad de brillo de las áreas en las dos imágenes, para pasar los datos cualitativos a cuantitativo (33). Estos datos luego permiten sacar un promedio de intensidad por imagen, este promedio se divide sobre un área que no presente el transgén (BG).

Por último, se sacó un promedio entre el total de las muestras de cada plásmido *missPiggy TB279*, para definir el nivel de fluorescencia, el cual será inversamente proporcional al grado de inhibición producido por cada transgén (figura 4 y figura 5). Se esperaba que el menor porcentaje de inhibición se de en el grupo control, por otra parte, *missPiggy TB279* con mayor inhibición sería el tándem, pues este une Anti-GFP 001 y Anti-GFP 002. Como se puede ver en la figura 5 el transgén que mejor inhibió la proteína de interés fue Anti-GFP 001.

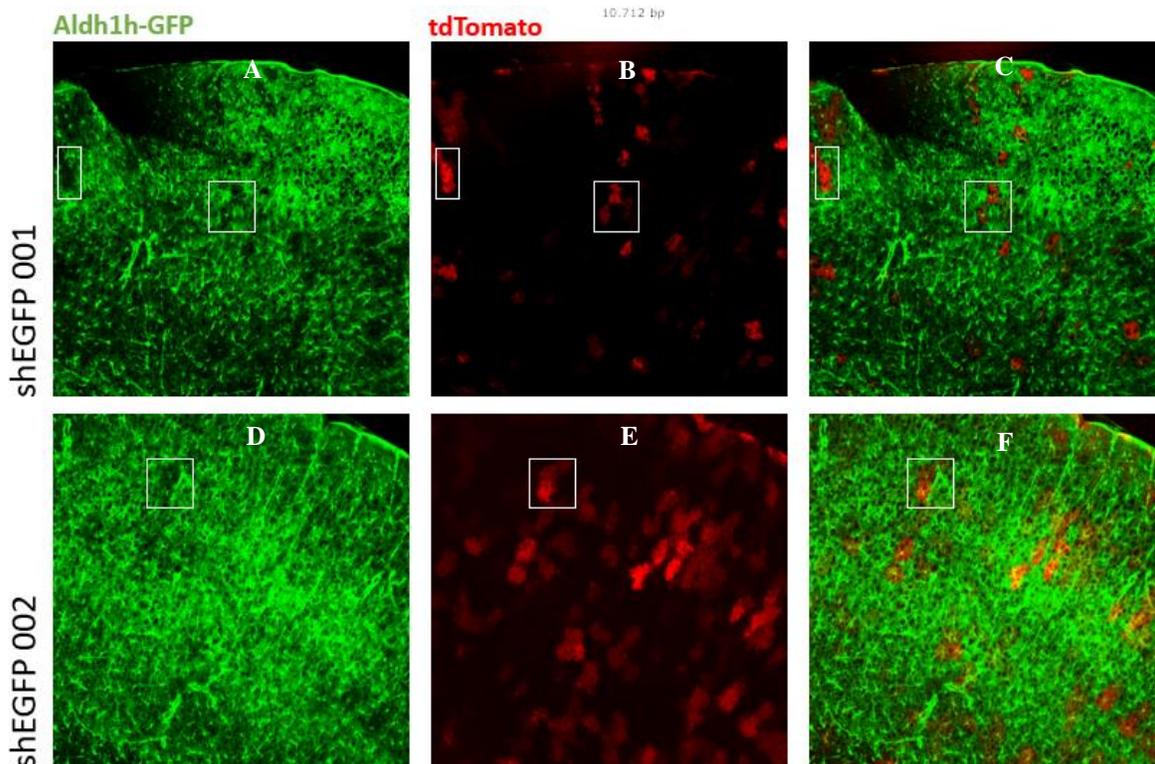


Figura 3. Comparación entre dos constructos del plasmido *miss-piggy TB279*. Las imágenes de la A a la C muestran la evaluación de un corte de cerebro modificado con el transgén *miss-piggy TB279 Anti-GFP001*, mientras que la imagen de la D a la F muestra un corte de cerebro modificado por *miss-piggy TB279 Anti-GFP002*. En las figuras C y F muestran la combinación entre el transgén y la proteína GFP. La imagen B y E muestran solo la presencia del transgén, además, de una célula positiva para el transgén. La imagen A y D muestran la fluorescencia de GFP, el cuadro de estas imágenes representa las células señaladas en la figura B y E, los cuales se encuentran sin fluorescencia debido a la presencia del transgén.

Figura 4. Grafica de resultados.

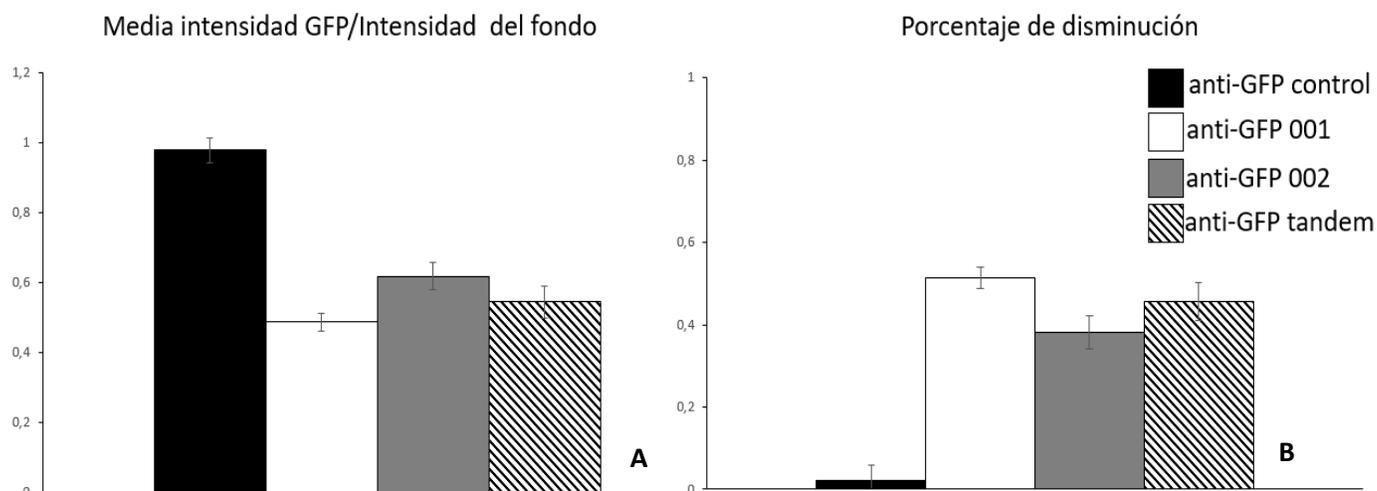


Figura 4. Resultados de inhibición para la proteína GFP por constructo. La grafica A muestra la media de la intensidad de la proteína. La grafica B muestra el promedio de la disminución de fluorescencia en los cortes estudiado por cada constructo de *missPiggy TB279*, o sea de la disminución de la proteína GFP. La gráfica A es inversamente proporcional a la gráfica B, lo cual quiere decir que entre menor sea el valor en la gráfica A será mayor el porcentaje de inhibición en B.

Figura 5. Resumen de los resultados.

Medias por transgén							
AntiGFP001		AntiGFP002		AntiGFPTandem		AntiGFPScramble	
M001	0,46	M001	0,39	M001	0,42	M001	1,02
	0,60		0,74		0,78		0,92
M002	0,45		0,63		0,34		0,99
	0,42	M002	0,70	M002	0,49	M002	0,95
	0,43		0,66		0,66		0,98
M003	0,42	M003	0,65	M003	0,45	M003	1,12
	0,54		0,67		0,63		1,16
	0,58		0,53		0,64		0,85
					0,50		0,82
Resultados							
Promedio	0,49	Promedio	0,62	Promedio	0,54	Promedio	0,98
Error estándar	0,03	Error estándar	0,04	Error estándar	0,05	Error estándar	0,04
Disminución	0,51	Disminución	0,38	Disminución	0,46	Disminución	0,02

6.2 Curso FELASA tipo B

Este curso fue creado por la institución FELASA, “*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*” en el año 1978 (28). Este es un curso obligatorio para los investigadores que realicen experimentación en animales en la unión europea.

Debido a las practicas que iba a realizar durante mi estancia en *VIB – KU Leuven Laboratory of Glia Biology*, fue necesario realizar el curso tipo B. Este curso es para los científicos, que ejecutan los proceso en animales en una investigación mas no planea los experimentos que se realizaran.

Este curso cuenta con 30 horas de teoría y 10 horas práctica, durante estas 40 horas se aprende sobre el manejo, limpieza, precaución y correcta manipulación de todos los tipos de animales de laboratorio.

6.3 Traducción de protocolos usados

Uno de los principales entregables de la pasantía son los protocolos aprendidos en mi estancia en *VIB – KU Leuven Laboratory of Glia Biology*. Los diseños experimentales se enfocarán principalmente en el campo de neurociencias con el uso de transgenes, pero algunos de ellos pueden ser usados en otras áreas. Estos se dividirán en 4 partes según el área en la cual se suele usar. Primero se encuentran los protocolos generales para

la generación y evaluación de transgenes (apéndice 1), estos se pueden usar en diversas ocasiones en el laboratorio; luego están los que involucran el manejo de células *HEK 293T* (apéndice 2); posteriormente se encuentran aquellos que involucran terapia génica con AAV (apéndice 3); y por último se encuentran los protocolos que involucran el uso de animales (apéndice 4).

Estos protocolos se depositarán en el repositorio de la universidad CES, además se podrán encontrar en los anexos de este trabajo.

7. Conclusiones

Durante los cuatro meses que pasé en VIB – KU Leuven Laboratory of Glia Biology mi formación como bióloga se vio altamente beneficiada, debido a que pude reforzar y usar conocimientos adquiridos durante el pregrado, además, de aprender procesos únicos del área de terapia génica enfocada a las enfermedades neurodegenerativas, estas técnicas no se habrían podido aprender en una pasantía en Colombia, dado que esta área de la biología apenas se está comenzando a desarrollar, por esta razón los protocolos usados fueron traducidos y almacenados en el repositorio de la universidad CES para futuras investigaciones.

También durante este tiempo fue posible realizar el curso FELASA tipo B, el cual es reconocido en toda la unión europea, permitiéndome realizar experimentos en animales durante mi estancia y en futuras investigaciones en las cuales participe.

Por último, podemos concluir a partir de los experimentos en los que participe que presenta mejor eficiencia en la inhibición de la proteína GFP es el transgén *Anti-GFP001*. Este no era el resultado esperado, pues se planteaba que el *Anti-GFPtandem*, al presentar dos mecanismos de inhibición de la proteína, hiciera que el porcentaje de GFP fuera menor que en los otros casos, por esto el paso a seguir es investigar como el uso de estos dos mecanismos se inhabilitan entre sí. Paralelo a esto, se cambiará la proteína a silenciar en el constructo *miss-piggy TB279* por una proteína que se conozca esté vinculada a una enfermedad neurodegenerativa de interés, en el caso de este laboratorio sería una proteína asociada a una enfermedad de interés.

8. Apéndices

8.1 Carta de autorización

Leuven, Bélgica

16 de mayo 2020

A quien pueda interesar

Por medio de la presente yo, Melvin Yesid Rincón Acelas, identificado con cc 91538412 de la ciudad de Bucaramanga, certifico la traducción de los protocolos que la bióloga Laura Manjarres aprendió durante su pasantía se en el laboratorio de Biología de la Glía a cargo del Dr. Matthew Holt, en las instalaciones de VIB-KU Leuven Center for Brain and Disease Research, en la ciudad de Leuven, Bélgica, además de la ubicación de estos en el repositorio de la Universidad CES para su futuro uso por parte de la institución.



Melvin Yesid Rincón Acelas. MD. PhD.

Chemin du Foriest, 1420 Braine-l'Alleud, Belgium.

8.2 Protocolos generales para la generación y evaluación de transgenes.

 UNIVERSIDAD CES <i>Un compromiso con la excelencia</i> <small>Resolución del Ministerio de Educación Nacional No. 1371 del 27 de marzo de 2007</small>	PROTOCOLOS GENERALES PARA LA PRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE TRANSGENES	
	Código: PR-XX-XXX	Fecha: XX/XX/XXXX
PROCESO		

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO:

Estos protocolos son usados en diferentes investigaciones, además, en su mayoría son los primeros protocolos para aprender debido a que estos son la base de procedimientos más específicos en las diferentes áreas.

2. ALCANCE:

Pese a que el objetivo de los protocolos es para el trabajo básico en el campo de la terapia génica, también se pueden usar en otras ramas de las ciencias moleculares, como lo puede ser para el crecimiento de bacterias, búsqueda de proteínas blanco en muestras, entre otros.

3. DEFINICIONES:

Incluya las definiciones que sean necesarias para facilitar al lector el entendimiento de este procedimiento A-Z)

- Bacteria competente: Bacteria preparada para recibir DNA exógeno.
- Plásmido: Molécula pequeña de DNA circular capaz de replicarse de forma independiente en una célula huésped.
- Transgén: Material genético modificado y transferido a un organismo.

4. DOCUMENTOS DE REFERENCIA:

- Protocolos de VIB – KU Leuven Laboratory of Glia Biology.
- Primrose SB, Twyman RM, Primrose SB, Primrose SB. Principles of gene manipulation and genomics. 7th ed. Malden, MA; Oxford: Blackwell Pub; 2006. 644 p.
- SnapGene [Internet]. SnapGene. [citado 27 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://www.snapgene.com/>
- Cooper GM, Hausman RE. La Célula. Madrid: Marbán; 2008.

CONTROL	ELABORÓ		REVISÓ	APROBÓ	
Nombre	Melvin Yesid Rincón. Manjarres Madrid.	Laura	Melvin Yesid Rincón.	Juliana María Martínez. Escobar.	Carlos Andrés
Cargo	Investigador. pregrado.	Estudiante	Investigador.	Tutor de enlace. Programa.	Jefe de
Fecha	2019		2020	2020	

Código: PR-XX-XXX

Fecha: XX/XX/XXXX

Versión: 01

PROCESO

5. CONDICIONES GENERALES:

- Condiciones de esterilidad.
- Aire acondicionado.
- Uso de bata y guantes.

6. Protocolos.

6.1 Elaboración del medio Lurina Bertani (LB).

Este protocolo permite realizar un medio necesario para distintos protocolos mencionados en este recopilado.

Nota: se debe preparar siempre un día antes de usar.

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
1	Colocar por cada 50ml de agua 1gr de medio LB.	En un erlenmeyer de 1L se debe colocar 1L de agua y 20 gr de medio LB. Mezclar hasta lograr la disolución de este.	Profesional que desarrollara el protocolo.	Registro del uso de la balanza analítica.
2	Realizar un ciclo de esterilización	Una vez el medio se diluye, se coloca en el autoclave a 121°C, 15lb de presión, durante 20 min, posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente antes de su uso. Nota: revisar que no tenga turbulencia		Registro del uso del autoclave.

6.2 Transformación.

Este protocolo permite almacenar y replicar contenido genético de interés en una bacteria, controlando el crecimiento de la colonia a través de un gen en el transgén de interés, el cual es resistente al antibiótico que se encuentra en el medio de cultivo; lo cual garantiza el crecimiento de las células que contienen el plásmido. Además del proceso de purificación del plásmido obtenido, como resultado esperado del proceso.

Materiales

- Bacteria competente.
- Cajas de Petri LB + antibiótico.
- Centrifuga.
- Incubadora.



Código: PR-XX-XXX

Fecha: XX/XX/XXXX

Versión: 01

PROCESO

- Incubadora con agitación.
- Kit EndoFree plasmid purification (Maxi prep).
- Medio soc.
- Medio LB.

Antibiótico.

- Material genético

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
Día 1				
1	Preparar antes de comenzar	Tener un baño maría 42°C. Colocar el medio soc y las cajas de petri LB + ampicilina en la incubadora a 37°C por 1 hora. Tener un recipiente con hielo y agua, el cual contenga la <i>E.Coli</i> y el plásmido a usar. Nota: El plásmido y las bacterias se deben mantener en el recipiente mencionado anteriormente.	Profesional que desarrollara el protocolo.	Registro de toma de las células competentes y del plásmido.
2	Mezclar el plásmido con las bacterias competentes	En un vial colocar de 2-5µL del plásmido y 50µL de las <i>E.Coli</i> , este proceso se debe realizar con el mechero encendido. Este vial se deja posteriormente por 30 minutos en el recipiente con hielo y agua.		N/A
3	Activación de las bacterias	Depositar por 30 segundos el vial en el baño maría.		N/A
4		Depositar el vial en hielo por 2 minutos.		
5	Cultivo y crecimiento de bacterias	En un tubo de cultivo, cerca del mechero, colocar 950µL del medio soc y 50µL de la mezcla del vial, este tubo de ensayo se debe dejar por 1 hora en la incubadora (37°C, 250 rpm).		Registro de uso en la incubadora.
6		Se toman 2 cajas de Petri. En una se coloca 100µL de la mezcla, en la otra se coloca 50µL y estas se llevan a la incubadora por la noche.		
Día 2				
7		Con el mechero encendido, colocar en un tubo de cultivo 5 mL de medio LB, con 5µL de ampicilina		

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
	Cultivo y crecimiento de bacterias	(Dilución de 1/1000), luego tomar una sola colonia de una de las cajas de Petri y llevar el tubo de ensayo por 8 horas a la incubadora (37°C, 250 rpm).	Profesional que desarrollara el protocolo.	Registro de uso en la incubadora
8		En un Erlenmeyer colocar 250 ml de medio LB + ampicilina y 250µL (Dilución de 1/1000) de la mezcla presente en el tubo de ensayo. Dejar en la incubadora a 37°C, 250 rpm durante la noche.		
Día 3				
9	Medición de la OD (Densidad óptica)	Preparar tres muestras una de 10µL de agua, 1µL de las bacterias y 9µL de agua, la última son 10µL de las bacterias. Luego se ponen en este orden en el espectrofotómetro y se lee en la pantalla este valor. El OD del cultivo debe encontrarse entre 1,5 y 2.	Profesional que desarrollara el protocolo.	Registro del uso en la OD.
10	Precipitación de las bacterias	En un recipiente plástico resistente poner el líquido de los Erlenmeyer, evitando la espuma. Colocar los recipientes en la centrifugadora (6000xg, 4°C) por 15 minutos. Descartar el sobrenadante y dejar el precipitado. Nota: Se puede detener aquí el proceso por unos días llevando el precipitado a la nevera de -20°C		Registro en la centrifuga.
11	Realizar la purificación del plásmido a través del kit <i>maxiprep EndoFree plasmid purification</i>	Abrir el búfer P1 adicionarle la RNasa A, el buffer P3 se debe dejar en hielo o en la nevera de 4°C hasta que se vaya a usar.		Marcar los búferes que se inician (iniciales del nombre y el apellido + fecha)
12		Re suspender el precipitado en 10mL del búfer P1	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
13		Adicionar 10mL del búfer P2 e invertirlo vigorosamente entre 4 y 6 veces, dejar reposar por 5min. Nota: No se debe dejar más tiempo porque puede empezar a dañar el plásmido.		
14		Durante los 5min de incubación se debe tapan el QIAfilter Cartridge.		
15		Añadir 10mL del búfer P3 e invertirlo vigorosamente entre 4 y 6 veces.		
16		En el QIAfilter Cartridge se debe introducir la mezcla, dejarla incubar por 10 min sin poner el émbolo.		
17	Destapar el QIAfilter Cartridge colocar el émbolo y un tubo de 50mL para colocar el líquido celular filtrado.			

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
18	buffer P3 se debe dejar en hielo o en la nevera de 4°C hasta que se vaya a usar.	Al tubo de 50mL se le deben adicionar 2.5mL del búfer ER, mezclar invirtiendo el tubo 10 veces y dejar incubando por 30min.		
19		Equilibrar el QIAGEN-tip 500 adicionando 10mL del búfer QBT y dejar que éste se vacíe por gravedad.		
20		Colocar en el QIAGEN-tip 500 el tubo que se estaba dejando fermentar (paso 4.7), dejar que se filtre por gravedad.		
21		Lavar dos veces el QIAGEN-tip 500 adicionando 30mL del búfer QC por lavada.		
22		Eluir el DNA con 15mL el búfer QN.		
23		Añadir 10.5mL de isopropanol al DNA eluido; mezclarlos y llevarlos a la centrifuga por 1 hora, 5000 x g y 4°C.	Profesional que desarrollara el protocolo.	Registro del uso de la centrifuga.
24		Nota: Medir la concentración del plásmido para poder Re suspender después		
25		Lavar el precipitado de DNA con etanol al 70% y centrifugar por 15min a 5000xg, después colocar el precipitado en un vial, volver a centrifugar por 5min y retirar cuidadosamente el sobrenadante y dejar secar el precipitado.		N/A
26		Por último, se disuelve el DNA en un adecuado volumen de Búfer TE.		Registro de cuantificación de ácidos nucleicos generados por el del nanodrop.
		Antes de guardar el plásmido a -4°C se mide la concentración a 280nm		

6.3 Digestión.

Este protocolo te permite evaluar que el péptido aislado en el protocolo anterior en su forma original y conserve los genes deseados.

Se evalúa a través de la digestión del plásmido por enzimas que cumplan las condiciones de cortar en más de un lugar, además entre las enzimas seleccionadas se debe cortar diferentes partes del radio del plásmido. Por último, como se está trabajando con AAV una de las enzimas debe evaluar los ITRs.

Materiales

- Agarosa.
- Agua.
- Agua doble destilada.
- Buffer TAE.

Código: PR-XX-XXX

Fecha: XX/XX/XXXX

Versión: 01

PROCESO

- Enzimas + Buffers.
- Gel de tinte de carga.
- Marcador de peso molecular 1Kb plus.
- Midori green.
- Termocicladores.
- Plásmido purificado.
- Snapgen.
- Lector especial.

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
1	Cálculos de las sustancias	Antes de ir al laboratorio se recomienda llenar la tabla 1. Nota: El valor a usar en el búfer en y la enzima son valores dados para analizar 500 ng de plásmido	Profesional que desarrollara el protocolo.	Tabla 1.
2	Dilución del plásmido	Llevar el plásmido a la concentración planteada en el paso anterior.		N/A
3	Mezcla de las enzimas	Poner los componentes mencionados en la tabla 1 en el orden que se encuentran. Nota: Las enzimas solo se deben sacar en el momento de usarlas y se deben mantener en un recipiente con hielo y agua.		N/A
4	Activación de enzimas	Llevar las muestras al termociclador por alrededor de 1h a 37°C. Nota: Revisar el tiempo mínimo que se debe dejar las muestras en el termociclador.		Registro de uso del termociclador.
5	Realizar el gel de agarosa al 1%	20mL de TAE 5x.		
6		80mL de agua doble destilada.		
7		1 g de agarosa.		
8		Revolver y llevar al microondas. revisar cada 40seg y volver a mezclar, esto se hace hasta que el líquido vuelva a ser transparente.		
9		Cuando esté menos caliente (que se pueda tomar por unos segundos) se le añade 5µL midori green.		

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
10		Cuando esté lo suficientemente frío como para tomarlo por un rato se vierte en el molde para la electroforesis y se deja ahí por unos 30min.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
11		Cuando esta solido el gel sin estar por completo seco se coloca en el recipiente para la realizar la electroforesis. Este debe estar lleno de TAE 1x y debe tapar el gel por completo.		
12	Añadir las muestras a los pozos.	En el primer pozo va 5µL de un marcador de peso molecular.		
13	Nota: De cada muestra se usan generalmente 20µL.	Luego las muestras que tengan la enzima 1.		
14		Luego las muestras que tengan la enzima 2.		
15		Luego las muestras que tengan la enzima 3.		
16	Electroforesis	Se debe dejar correr mínimo por 45min a 130v.		Registro de uso del equipo de electroforesis.
17	Análisis resultados	Revisar que en los resultados aparezcan las bandas que se plantean con snapgene.		Impresión del gel de corrido esperado

Nota: Las enzimas 1,2,3 son las definidas en snapgen como capaces de cortar el plásmido en diferentes partes, una por cada enzima y en partes relativamente grandes.

6.4 Western blot.

Este método permite detectar una proteína específica en una muestra por medio de electroforesis.

Para su lectura se expone el anticuerpo unido a un tinte fluorescente, que al reaccionar con otros químicos y un típico específico de luz mostrara el resultado.

Esta técnica solo puede determinar la presencia de la proteína, no la concentración de esta.

Materiales.

- Acrilamida.
- Agua doble destilada.
- Búfer de gel.

Nota: *3M tris + 0,3%SDS (w/v) + PBS 1x hasta 500mL. El pH debe ser de 8,45

- Marcador de peso molecular.
- Esponjas.
- Membrana de transferencia.
- Papeles.
- TBST.
- ECL.

Código: PR-XX-XXX

Fecha: XX/XX/XXXX

Versión: 01

PROCESO

Nota: Mezclar

- Buffer de bloqueo.

Nota: Para este buffer se mezclan 2,5gr de leche en polvo con 50mL de TBST.

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
Día 1				
1	Preparar el gel de acrilamida. Nota: Se recomienda preparar con 2 densidades. También se recomienda dejar el gel reposar por una noche, se debe guardar a 4°C envuelto en toallas desechables dentro de una bolsa.	Gel de corrido al 10% a) En un tubo de 50mL mezclar el agua con el búfer de gel. b) En la campana mezclar en el tubo la acrilamida. c) Añadir el glicerol al 50% y mezclar invirtiendo el tubo d) Añadir APS al 10% y el TEMED, luego mezclar suavemente.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
2		Desinfectar el casete y colocar el gel de corrido, adicionar un poco de ddH ₂ O para asentarlo y dejar en la campana por 30min.		
3		Añadir el gel de apilamiento al 10% a) En un tubo de 50mL mezclar el agua con el buffer. b) En la campana mezclar en el tubo la acrilamida. c) Añadir APS al 10% y el TEMED, luego mezclar suavemente.		
4		Colocar el gel de apilamiento, añadir las divisiones y esperar por 30min		
Día 2				
5	Preparación de la muestra	Añadir 20µL de la muestra a evaluar con 20µL de lammeli y hervir por 10min a 96°C.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
6		Dejar en hielo por 2min, luego centrifugar rápidamente.		
7	Añadir las muestras al gel.	En el primer pozo va 5µL del marcador de peso molecular.		
8		Luego en cada pozo se colocan 20µL de la muestra		
9	Electroforesis	Dejar correr el gel por 30min a 40V y luego incrementar a 120V por 1.5h.		Registro en el equipo de electroforesis.

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
10	Transferencia	Cambiar a la cámara de transferencia y dejar por 1.5h a 120V. Nota: Para montar la cámara de transferencia se pone: plataforma, esponja, papel, membrana, gel, papel, esponja, plataforma. Luego de la hora y media se deben haber transferido la información.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
11	Añadir anticuerpo	Llenar la tabla 2 de los anexos. Nota: Dejar durante la noche en el cuarto frio mezclando.		Tabla 2
Día 3				
12	Lavado	Lavar 3 veces con TBST por 10min a 100rpm cada vez.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
13	Anticuerpo secundario	Llenar la tabla 3 de los anexos. Nota: incubar por una hora en el mezclador		Tabla 3
14	Lavado final	Lavar 3 veces con TBST por 10min a 100rpm cada vez		N/A
15		Lavar 1 vez con TBS		
16	Preparación para la lectura	Añadir ECL. Nota: Se deben agregar 3mL de cada botella, a cada papel de transferencia.		N/A
17	Leer en LAS-3000 mini	Primero se debe enfocar, luego se toma la imagen del fondo y por último se procesa la membrana.		Registro en LAS-3000 mini.

7. Anexos

7.1 Tabla 1

En esta tabla se definen los volúmenes necesarios para la digestión de un plásmido por cada enzima. Las enzimas son seleccionadas con la ayuda de snapgen, esta aplicación te permite ver las enzimas que cortan el plásmido y los tamaños que se obtendrán.

	Nombre de las enzimas		
	1.	2.	3.
Agua	20 μ L – (B μ L+P μ L+E μ L)	20 μ L – (B μ L+P μ L+E μ L)	20 μ L – (B μ L+P μ L+E μ L)
Buffer 10x	Nombre -- 2 μ L	Nombre -- 2 μ L	Nombre -- 2 μ L
Plásmido	Valor definido por la dilución del plásmido.	Valor definido por la dilución del plásmido.	Valor definido por la dilución del plásmido.
Enzimas	0.5 μ L	0.5 μ L	0.5 μ L
Total	20 μ L	20 μ L	20 μ L

Código: PR-XX-XXX

Fecha: XX/XX/XXXX

Versión: 01

PROCESO

7.2 Tabla 2

Esta tabla define los volúmenes para el medio con anticuerpo primario.

	Volumen
1xTBS	25mL
Albumina sérica bovina (BSA)	0,25gr
Anticuerpo	Vol. total/denominador de la dilución
Total	25mL

7.3 Tabla 3

Esta tabla define los volúmenes para el medio con anticuerpo secundario.

	Volumen
1xTBS	25mL
BSA	0,25gr
Anticuerpo	Vol. total/denominador de la dilución
Total	25mL

CONTROL DE CAMBIOS		
FECHA DE ACTUALIZACIÓN	CAMBIO REALIZADO	RESPONSABLE DEL CAMBIO
(Incluya la última fecha de actualización del procedimiento.)	(Detalle el cambio propuesto o razón de creación del documento, frente a la pertinencia que se tiene para el cumplimiento del objetivo del proceso)	(incluya en nombre del responsable que creó o modificó el documento por última vez, cargo y Área de trabajo)

8.3 Protocolos para el manejo de células HEK293T

 <p>UNIVERSIDAD CES Un compromiso con la excelencia <small>Resolución del Ministerio de Educación Nacional No. 1371 del 22 de marzo de 2007</small></p>	PROTOCOLOS DE MANEJO CELULAS HEK293T	
Código: PR-XX-XXX	Fecha: XX/XX/XXXX	Versión: 01
PROCESO		

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

Las células HEK, cuyas siglas en inglés significan “Células embrionarias de riñón humano”, sensible a los adenovirus humanos y su DNA, por esta razón se puede usar para la producción de vectores con AAV. Por otra parte, permite replicar y evaluar transgenes sobre esta línea celular.

2. ALCANCE

Pese a que estos protocolos son enfocados a células HEK, varios de ellos se pueden aplicar a distintos cultivos. Por ende, se podrán usar en temas diferentes a los propuestos en el objetivo.

3. DEFINICIONES:

- HEK: Células embrionarias de riñón humano. Estas células son muy sencillas de cultivar y se transfectan fácilmente, por lo que se han usado ampliamente durante muchos años para la investigación en biología celular.
- Poli-lisina: Es un pequeño homopolímero natural del aminoácido esencial L-lisina que se produce por fermentación bacteriana. Se puede usar para fijar células a una base.
- Polietileneimina (PEI): Es el polímero más usado para la transfección de bacterias.

4. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

- Protocols de VIB – KU Leuven Laboratory of Glia Biology.
- Primrose SB, Twyman RM, Primrose SB, Primrose SB. Principles of gene manipulation and genomics. 7th ed. Malden, MA ; Oxford: Blackwell Pub; 2006. 644 p.
- Cooper GM, Hausman RE. La Célula. Madrid: Marbán; 2008.

CONTROL	ELABORÓ		REVISÓ	APROBÓ	
Nombre	Jordan Koepper.	Laura Manjarres Madrid.	Melvin Yesid Rincón.	Juliana María Martínez.	Carlos Andrés Escobar.
Cargo	Investigador.	Estudiante pregrado.	Investigador.	Tutor de enlace.	Jefe de Programa.
Fecha	2019		2020	2020	



Código: PR-XX-XXX

Fecha: XX/XX/XXXX

Versión: 01

PROCESO

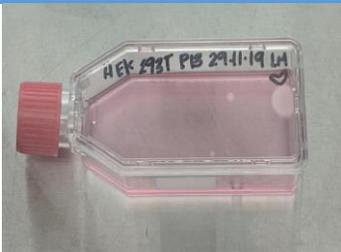
- Díaz-Ariza, I. L., Sierra, C. A. & Pérez-Pérez, L. D. Desarrollo de vectores génicos basados en polímeros sintéticos: PEI y PDMAEMA. Rev. Colomb. Cienc. Quím.-Farm. 47, 350–374 (2018).
- HEK 293T [Internet]. Merck. [citado 6 de febrero de 2020]. Disponible en: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_85120602

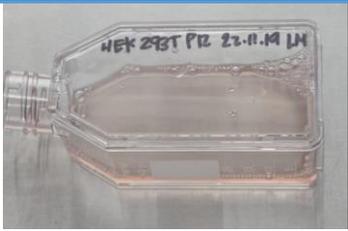
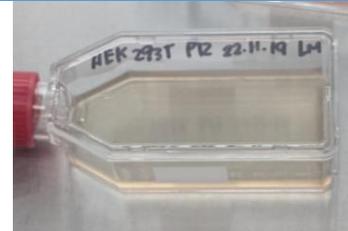
5. CONDICIONES GENERALES

- Condiciones de esterilidad.
- Aire acondicionado.
- Uso de bata y guantes.
- Estos protocolos se deben realizar en una cámara de flujo.
- Realizar el siguiente proceso de desinfección siempre.
 1. Dejar por 15 minutos la cámara de flujo con la luz UV prendida.
 2. Limpiar con etanol al 70% la mesa de la cámara y todos los implementos a usar antes de entrarlos a la cámara.
 3. Al finalizar limpiar nuevamente la mesa con etanol al 70%.
 4. Por último, dejar 10 minutos la luz UV.

6. Mantenimiento de células HEK

El crecimiento de las células HEK es en frascos de 25cm, el medio se debe cambiar cada tres días y en estos días también se debe medir la confluencia celular. El color del medio puede dar indicios sobre el estado de las células.

Medio (DMEM 10%FBS 1% Penn/Strep)		
Nuevo	Rojo	

Para cambiar	Naranjaado	
Infectado	Amarillo	

7. Protocolos.

7.1 Preparación del medio DMEM.

Este proceso permite realizar el medio DMEM 10%FBS 1% Penn/Strep, el cual es usado en la mayoría de los protocolos de las células HEK, además de ser el protocolo base.

Materiales

- 500mL de DMEM.
- 10mL de PIS.
- 50mL de FBS.
- Filtro de 500mL.
- Bomba.

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
1	Activación del filtro.	Se conecta el filtro a la bomba y se activa.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
2	Mezcla de compuestos	Se vierten los diferentes compuestos y se esperan a que se filtren. Nota: Se aconseja filtrar del menor volumen al mayor volumen.		Se marca el medio (Iniciales de nombre y apellido + fecha de preparación)

7.2 Recubrimiento de cubreobjetos con poli lisina.

Este protocolo le brinda a los cubre objetos una fina capa de la proteína, esta capa permite la fijación de las células HEK al porta objetos.

Se recomienda siempre realizar este proceso si se trabaja con cubreobjetos de vidrio y células HEK.

Materiales

- Plato de 6 o 24 pozos.



Código: PR-XX-XXX

Fecha: XX/XX/XXXX

Versión: 01

PROCESO

- Cubre objetos de 30mm o 18mm.
- Poli lisina al 1%.
- 1x DPBS.

Nota: Volúmenes en el anexo 1.

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
1	Ubicación cubreobjetos	Colocar en cada pazo un cubreobjeto.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
2	Limpieza cubreobjetos	Lavar dos veces con 1x DPBS.		
3	Adición poli-lisina	Remover el DPBS y poner la poli-lisina y dejar en la incubadora por 2h.		
4	Almacenamiento	Remover la poli-lisina y poner 2mL frescos de 1x DPBS, sellar con para filme y dejar en la nevera hasta que se necesiten.		

7.3 División de células

Para mantener el cultivo celular existente y evitar la sobrepoblación celular, se debe dividir los frascos de 25mL en 2 cuando la confluencia celular está cerca al 100%.

Materiales

- Pipeta de 1000µL.
- Pipeta de 10µL.
- Tubos cónicos de 15mL.
- Tubo cónico de 50mL.
- Frascos de 25mL para cultivo celular.
- Medio DMEM.
- Centrifugadora.

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
1	Remoción de células	Tomar los frascos donde se encuentran las células y con la ayuda de la pipeta de 1000 µL se deben despegar con cuidado de un lado del frasco.		

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
		Nota: Para despegar más fácil las células se aconseja voltear el frasco y expulsar el líquido con la pipeta de un 1000µL hasta conseguir que solo se vea el plástico limpio.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
2	Separación de células	Tomar el medio donde se encuentran las células re suspendidas y llevarlas a la centrifugadora a por 5 minutos a 2000Xg. Nota: Luego de la incubadora se debe ver un precipitado, si no se deben colocar 5 minutos más en la centrifugadora.		
3	Resuspensión celular	Retirar el sobrenadante, re suspender el precipitado en 2mL de medio fresco.		
4	Reubicación celular	Dividir cada frasco de 25mL en dos nuevos frascos, se debe poner 4mL de medio fresco con 1mL del medio con las células re suspendías.		Se marca el frasco (Iniciales de nombre y apellido + fecha de división)

7.4 Transfección de células HEK con PEI

Este proceso permite introducir material genético en las células eucariotas, el método que se usara es lipofección.

En este método el PEI condensa el ADN en partículas cargadas positivamente que se unen a las superficies celulares aniónicas, permitiendo que las células endociten este complejo DNA/PEI

Materiales

- Pipeta de 1000 µL.
- Pipeta de 10 µL.
- Tubos cónicos de 15mL.
- Tubo cónico de 50mL.
- Plato de 6 o 24 pozos con recubrimiento con poli lisina.
- Medio.
- Centrifugadora.
- Azul de tripano.
- Tubo de 2mL.
- Transgenes.
- PEI.
- 150nM NaCl.

Código: PR-XX-XXX

Fecha: XX/XX/XXXX

Versión: 01

PROCESO

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
Día 1				
Nota: Se recomienda hacer este proceso paralelo al protocolo de división celular.				
1	Remoción de células	Tomar los frascos donde se encuentran las células y con la ayuda de la pipeta de 1000 µL se deben despegar con cuidado de un lado del frasco. Nota: Para despegar más fácil las células se aconseja voltear el frasco y expulsar el líquido con la pipeta de un 1000 µL hasta conseguir que solo se vea el plástico limpio.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
2	Separación de células	Tomar el medio donde se encuentran las células re suspendidas y llevarlas a la centrifugadora a por 5 minutos a 2000Xg. Nota: Luego de la incubadora se debe ver un precipitado, si no se deben colocar 5 minutos más en la centrifugadora.		
3	Resuspensión celular	Retirar el sobrenadante, re suspender el precipitado en 1mL de medio fresco.		
4	Viabilidad celular	En un tubo de 2mL se deben añadir 10µL de azul de tripano y 10µL de las células re suspendidas, tomar 10µL de esta mezcla y después se debe llevar a la contadora de células.		
5	Confluencia celular por pozo.	Colocar en cada pozo el volumen de medio fresco definido en el anexo 1.	Profesional que desarrollara el protocolo.	Se marca el frasco (Iniciales de nombre y apellido + fecha)
6		Llevar el volumen de las células hasta que tenga la confluencia necesaria, definida en la tabla 1 y dejar crecer por dos días.		
Día 2				
Nota: Después del crecimiento celular de dos días.				
7		Preparar dos tubos uno con DNA+150nM NaCl y otro con PEI+150nM NaCl, como se explica en la tabla 2. Nota: El valor se debe multiplicar por el número de pozos que se quiere con cada transgén. Por cada transgén a evaluar se requieren dos tubos		Tabla 2

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
8	Preparación mezcla para transfección	Añadir gota a gota el líquido del tubo con PEI en el tubo con DNA y dejar a temperatura ambiente por 20min.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
9		Llevar el volumen del tubo al valor total de líquido que se requiere en el total de pozos con este transgén, usando medio fresco.		
10	Incubación PIE	Poner 3mL o 0.5mL y dejar en la incubadora por 5 horas.		Registro del uso de la incubadora
11	Incubación celular	Retirar el medio y poner medio fresco. Dejar por 2 días en la incubadora.		N/A

7.5 Fijación cubreobjetos

El proceso de fijación en los cubreobjetos permite inmortalizar las células en un estado deseado, en el cual se encuentre el desarrollo o la incorporación del material necesario para evaluar un nuevo transgén o el proceso de interés.

Materiales

- PBS 1x
- 4% PFA
- Parafilm

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
1	Preparación de cubreobjetos	Dos días después de la transfección se debe remover el medio de cultivo y lavar los pozos con PBS 1x	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
2	Fijación de cubreobjetos	Remover PBS y poner PFA al 4% por 15min		
3	Lavado de cubreobjetos	Remover el PFA y lavar con PBS x1		
4	Almacenaje de cubreobjetos	Cambiar el PBS x1 y cerrar con parafilm. Dejar en la nevera de -4°C para su posterior análisis.		

7.6 Tinción de cubreobjetos por inmunohistoquímica

El proceso de inmunohistoquímica permite por medio de anticuerpos que se señalen antígenos de proteínas o blancos de interés, en este caso en las células HEK.

Para esto se usan 2 anticuerpos, cuando se aplica el segundo anticuerpo tiene una enzima o un tinte fluorescente. Cuando los anticuerpos se unen al antígeno y este se expone a la luz del microscopio, se activa la enzima o el tinte, lo cual ayuda a evaluar la concentración de las proteínas de interés.

Código: PR-XX-XXX

Fecha: XX/XX/XXXX

Versión: 01

PROCESO

Materiales

- Cubre objetos fijados.
- Anticuerpos primarios y secundarios.
- 2% BSA.
- 10% Tritón x.
- PBS 1x.
- PBST 0,1%

Nota: 258µL de tritón x y 25mL de PBS 1x.

- Suero de Burro.
- Portaobjetos.
- Medio de montaje.

Nota: Vectashiel con DPI

- Brillo de uñas.

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
Día 1				
1	Reacomodación cubreobjetos	Mover los cubreobjetos con las células fijadas. Nota: Se debe pasar los cubreobjetos a un nuevo plato de 24 pozos, esto se hace con unas pinzas y un palillo. En caso de que se quiebre se usa la mitad más grande.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
2	Anticuerpos primarios	Definir los anticuerpos primarios. Nota: Si se quiere marcar más de una proteína cada anticuerpo debe provenir de un animal diferente.		
3	Medidas iniciales	Definir el número de pozos en los que se va a trabajar y el volumen de líquido que se desea usar. Nota: Se recomienda usar entre 250µL y 500µL		
4		Preparar buffer de incubación explicado en la tabla 3.		Tabla 3

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
	Incubación en búfer de incubación.	Nota: En la solución el tritón x debe estar a una concentración de 1%	Profesional que desarrollara el protocolo.	
5		Incubar las muestras por 5min a temperatura ambiente a 50rpm.		N/A
6	Incubación en solución de bloqueo	Preparar solución de bloqueo.		Tabla 4
7		Retirar el buffer de incubación e incubar en la solución de bloqueo por una hora a temperatura ambiente a 50rpm.		N/A
8	Incubación con anticuerpo primario	Preparar el medio con el anticuerpo primario según la tabla 5.		Tabla 5
9		Reemplazar la solución de bloqueo por el medio con el anticuerpo primario, dejar incubando a 4°C durante la noche a 50rpm	N/A	
Día 2.				
10	Lavado de muestras	Retirar el medio y lavar las muestras 3 veces con PBST, cada vez por 10min a temperatura ambiente y 50rpm.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
11	Incubación con anticuerpo secundario	Preparación del anticuerpo secundario según la tabla 6.	Profesional que desarrollara el protocolo	Tabla 6
12		Retirar el tercer lavado y aplicar el medio con el anticuerpo secundario por 1 hora a temperatura ambiente a 50rpm.		N/A
13	Lavado de las muestras	Retirar el medio y lavar las muestras 3 veces con PBST, cada vez por 10min a temperatura ambiente y 50rpm.		
14		Retirar el ultimo lavado y lavar una vez con PBS por 10min a temperatura ambiente y 50rpm.		

7.7 Recolección de células para Western Blot

Para ciertas investigaciones se necesita ver el efecto de un transgén en las proteínas a nivel celular. Por lo cual luego de transformar las células estas se preparan y recolocan como se explica en este protocolo. Para luego hacer el protocolo de western blot, el cual esta explicado en el protocolo 6.4 del documento de protocolos generales.

Materiales

- Búfer de lisis RIPA.

Nota: Mezclar el búfer antes de usar.

- Células HEK.

Código: PR-XX-XXX

Fecha: XX/XX/XXXX

Versión: 01

PROCESO

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
1	Preparación de las células	Tomar los frascos donde se encuentran las células y con la ayuda de la pipeta de 1000 µL se deben despegar con cuidado de un lado del frasco.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
2		Tomar el líquido y centrifugar las células por 5min a 1500g.		Registro del uso de la centrifuga.
3	Proceso de lisis	Remover el sobrenadante y agregar 500µL del buffer de lisis	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
4		Dejar las células en el búfer de lisis por 30min agitándose a 4°C		Registro del uso de la centrifuga.
5		Centrifugar por 20min a 12000rpm		
6	Almacenaje de lisado	Dejar en un tubo el sobrenadante y en el otro el precipitado. Guardar a -20°C.		N/A

8. Anexos

8.1 Anexo 1

Tabla de volumen total por pozo, según el plato a usar.

Volumen por pozo	
Plato	Volumen
Plato de 6 pozos	3mL
Plato de 24 pozos	500µL
Frasco de 25cm	5mL



Código: PR-XX-XXX

Fecha: XX/XX/XXXX

Versión: 01

PROCESO

8.2 Tabla 1

Esta tabla muestra el valor máximo de confluencia y densidad celular por pozo.

Plato	Densidad celular	Confluencia celular
6 pozos	0,3X10 ⁶	1,2X10 ⁶
24 pozos	0,05X10 ⁶	0,24X10 ⁶

8.3 Tabla 2

Volúmenes para la transfección. Los valores de la tabla se deben multiplicar por el número de pozos que se quiere. En el caso de usar más de dos transgenes, por cada transgén se necesitan preparar dos tubos.

Tipo de plato	Tubo 1		Tubo 2	
	DNA	150mM NaCl	PEI	150mM NaCl
6 pozos	4 µL	0,5mL	14µL	0,5mL
24 pozos	2,67 µL	0,34mL	9,34µL	0,34mL
Plato	DNA	150mM NaCl	PEI	150mM NaCl

Tabla 3

Proceso para la preparación buffer de incubación.

	Volumen
10% Tritón x	Vol. total/10
PBS 1x	Vol. total – Vol. SB
Total	#pozos x vol. por pozo



Código: PR-XX-XXX

Fecha: XX/XX/XXXX

Versión: 01

PROCESO**8.4 Tabla 4**

Proceso para la preparación buffer de bloqueo.

	Volumen
10% Suero de burro	Vol. total/10
BSA (gr)	Vol. total/100
10% Tritón x	Vol. total/10
PBS 1x	Vol. total – Vol. SB
Total	#pozos x vol. por pozo

8.5 Tabla 5

Proceso para la preparación medio con el anticuerpo primario.

	Volumen
Anticuerpo primario	Volumen total/Denominador de la dilución
Nota: Se debe tener en cuenta el valor de dilución.	
PBS 1x	Volumen total
Total	#pozos x vol. por pozo

8.6 Tabla 5

Proceso para la preparación medio con el anticuerpo secundario.

	Volumen
Anticuerpo secundario	Volumen total/Denominador de la dilución
Nota: Se debe tener en cuenta el valor de dilución.	
PBS 1x	Volumen total
Total	#pozos x vol. por pozo

CONTROL DE CAMBIOS		
FECHA DE ACTUALIZACIÓN	CAMBIO REALIZADO	RESPONSABLE DEL CAMBIO
(Incluya la última fecha de actualización del procedimiento.)	(Detalle el cambio propuesto o razón de creación del documento, frente a la pertinencia que se tiene para el cumplimiento del objetivo del proceso)	(incluya en nombre del responsable que creó o modificó el documento por última vez, cargo y Área de trabajo)

8.4 Protocolos de producción AAV

 UNIVERSIDAD CES <i>Un compromiso con la excelencia</i> <small>Resolución del Ministerio de Educación Nacional No. 1371 del 27 de marzo de 2007</small>	PROTOCOLOS DE PRODUCCIÓN AAV	
	Código: PR-XX-XXX	Fecha: XX/XX/XXXX
PROCESO		

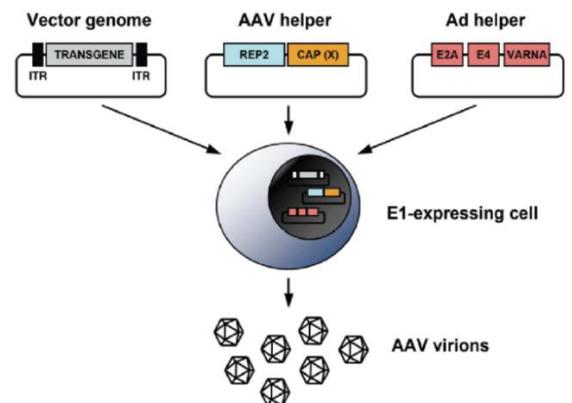
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO:

Los protocolos que se plantean a continuación se realizan utilizando vectores virales, específicamente usando virus adeno-asociados (AAV). En este momento es uno de los principales virus estudiados para usarse en terapia génica, esto debido a sus características únicas.

Los AAV presentan una cadena simple de DNA de aproximadamente 4.8 kilo bases, su genoma está compuesto por 3 genes los cuales son: Rep. (Replicación), Cap. (Cápside) y aap (Assembly), estos producen 7 proteínas encargadas de producir la cápside y la replicación genómica.

Comenzaremos partiendo de péptidos necesarios para el desarrollo de los vectores AAV, estos se forman usando 3 péptidos los cuales se encuentran en la **tabla 1** y la **imagen 1**, el PdeltaF6 presenta los genes de otro virus que el AAV necesita para replicarse, el pRep/Cap es el péptido con el DNA viral que se necesita para la cápside y la replicación, por último está el plásmido pscAAV transgén el cual se compone por el transgén de interés flanqueado por los invertid terminal repeats (ITRs), para luego terminar con los protocolos de experimentación en animales.

Plásmidos usados en la producción de AAV		
Nombre	Tipo	Bacteria
PdeltaF6 (ayudante)	Copia baja	TOP10
pRep/Cap	Copia alta	Células competentes
pscAAV transgén	Copia alta	Células competentes





Código: PR-XX-XXX

Fecha: XX/XX/XXXX

Versión: 01

PROCESO

2. ALCANCE:

Estos protocolos permiten desarrollar vectores AAV para ser usados en terapia génica.

3. DEFINICIONES

- Virus adeno-asociados (AAV): Es un virus muy simple y no autónomo, que contiene ADN lineal de cadena sencilla. En la actualidad es muy usado para la terapia génica gracias a su baja respuesta inmune.

CONTROL	ELABORÓ		REVISÓ	APROBÓ	
Nombre	Melvin Yesid Rincón.	Laura Manjarres Madrid.	Melvin Yesid Rincón.	Juliana María Martínez.	Carlos Andrés Escobar.
Cargo	Investigador.	Estudiante pregrado.	Investigador.	Tutor de enlace.	Jefe de Programa.
Fecha					

- Plásmido: DNA extra cromosómico, generalmente circular, la cual se replica y transmite independientes del DNA cromosómico.
- Bacterias competentes: Bacteria preparada para recibir DNA exógeno.
- Células HEK: Células embrionarias de riñón humano. Estas células son muy sencillas de cultivar y se transfectan fácilmente, por lo que se han usado ampliamente durante muchos años para la investigación en biología celular.

4. DOCUMENTOS DE REFERENCIA:

- Protocolos de VIB – *KU Leuven Laboratory of Glia Biology*.
- Primrose SB, Twyman RM, Primrose SB, Primrose SB. Principles of gene manipulation and genomics. 7th ed. Malden, MA ; Oxford: Blackwell Pub; 2006. 644 p.
- Fripont S, Marneffe C, Marino M, Rincon MY, Holt MG. Production, Purification, and Quality Control for Adeno-associated Virus-based Vectors. *J Vis Exp*. 29 de enero de 2019;(143):58960.
- Mena-Enriquez M, Flores-Contreras L, Armendáriz-Borunda J. Vectores virales adeno-asociados: métodos de producción, purificación y aplicaciones en terapia génica. *Investigación clínica*. 2012;487-94.
- Daya S, Berns KI. Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. *Clin Microbiol Rev*. octubre de 2008;21(4):583-93.
- TaqMan vs SYBR Chemistry - CO [Internet]. Thermofisher. [citado 9 de abril de 2020]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/ht/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html>

5. CONDICIONES GENERALES

- Condiciones de esterilidad.

 UNIVERSIDAD CES <i>Un compromiso con la excelencia</i> <small>Resolución del Ministerio de Educación Nacional No. 1371 del 22 de marzo de 2007</small>	PROTOCOLOS DE PRODUCCIÓN AAV	
Código: PR-XX-XXX	Fecha: XX/XX/XXXX	Versión: 01
PROCESO		

- Aire acondicionado.
- Uso de bata y guantes.
- Estos protocolos se deben realizar en una cámara de flujo.
- Realizar el siguiente proceso de desinfección siempre.
 1. Dejar por 15 minutos la cámara de flujo con la luz UV prendida.
 2. Limpiar con etanol al 70% la mesa de la cámara y todos los implementos a usar antes de entrarlos a la cámara.
 3. Al finalizar limpiar nuevamente la mesa con etanol al 70%.
 4. Por último, dejar 10 minutos la luz UV.

6. Protocolos

6.1 Producción de plásmidos.

Este proceso es similar al proceso de transformación, expuesto en los *protocolos generales para la evaluación y producción de transgenes*, la diferencia es que en este caso se busca producir uno de los plásmidos específicos de para el vector viral de

AAV, expuestos en la introducción. Por otro lado, se suele usar un kit de *Megaprep* en lugar de un kit de *Maxiprep*, este permitirá tener como resultado final una mayor concentración del material genético.

Materiales

- Medio LB.

Nota: Antes de llevar el medio LB al autoclave se le debe añadir 8mL de glicerol.

- Megaprep kit de Qiagen.
- Plásmido AAV.
- Bacteria competente.
- Cajas de petri LB + antibiótico.
- Centrifugadora.
- Incubadora.
- Incubadora con shaker.
- Medio soc.
- Antibiótico.



Código: PR-XX-XXX

Fecha: XX/XX/XXXX

Versión: 01

PROCESO

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
Día 1				
1	Mezclar el plásmido con las proteínas competentes.	En un vial colocar 2-5µL del plásmido y 50µL de las <i>E.Coli</i> , este proceso se debe realizar con el mechero encendido. Este vial se deja posteriormente por 30 minutos en el recipiente con hielo y agua.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
2	Apertura de membrana	Depositar por 30 segundos el vial en el baño maría.		
3		Devolver el vial al hielo por otros 2 minutos.		
4	Cultivo y crecimiento de bacterias	En un tubo de cultivo, cerca del mechero, colocar 950µL del medio soc y 50µL de la mezcla del vial, este tubo de ensayo se debe dejar por 1 hora en la incubadora (37°C, 250 rpm).	Profesional que desarrollara el protocolo.	Registro de uso en la incubadora.
5		Se toman 2 cajas de Petri, en una se coloca 100µL de la mezcla, en la otra se coloca 50µL y estas se llevan a la incubadora por la noche.		
Día 2				
6	Cultivo y crecimiento de bacterias	Con el mechero encendido, colocar en un tubo de cultivo 5mL de medio LB, con 5µL de ampicilina (Dilución de 1/1000), luego tomar una sola colonia de una de las cajas de Petri y llevar el tubo de ensayo por 8 horas a la incubadora (37°C, 250 rpm).	Profesional que desarrollara el protocolo.	Registro de uso en la incubadora.
7		En un Erlenmeyer colocar 250 ml de medio LB + ampicilina y 250µL (Dilución de 1/1000) de la mezcla presente en el tubo de ensayo. Dejar en la incubadora a 37°C, 250 rpm durante la noche. Nota: Para el plásmido pdeltaF6 es se recomienda cultivo bacteriano de 1.5L a 2L. Para los otros plásmidos, cultive 500mL de medio de LB.		
Día 3				
8	Medición de la OD (Densidad óptica)	Preparar tres muestras una de 10µL de agua, 1µL de las bacterias y 9µL de, la última son 10µL de las bacterias. Luego se ponen en este orden en el espectrofotómetro y se lee en la pantalla este		Registro de uso en la OD.

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
		valor. El OD del cultivo debe encontrarse entre 1,8 y 2,2.	Profesional que desarrollara el protocolo.	
9	Precipitación de las bacterias	En un recipiente plástico resistente poner el líquido de los Erlenmeyer, evitando la espuma. Colocar los recipientes en la centrifugadora (6000xg, 4°C) por 15 minutos.		N/A
10	Purificación del plásmido a través del kit Megaprep EndoFree plasmid purification	Los pasos para seguir están descritos dentro del kit, además, de ser similar al protocolo del <i>kit maxiprep</i> explicado en el protocolo 6.2 de los protocolos generales para la generación y evaluación de transgenes	Profesional que desarrollara el protocolo.	Registro de uso del kit
11	Análisis de pureza	Realizar un análisis de digestión y medir la concentración del plásmido.		N/A

6.2 Producción y purificación de AAV.

El proceso de producción es similar al protocolo “*Transfección de células*” presente en los “*protocolos de manejo de células HEK293T*”

HEK con PEI” explicado en el protocolo 7.4 de los *protocolos de manejo de células HEK*, en esta ocasión el resultado final será un vector AAV.

Por otro lado, la purificación es el proceso que permite tener el vector libre de otros compuestos de las células HEK.

Materiales

- Plato de 6 pozos con cubreobjetos de 15cm.
- DMEM.
- FBS.
- L-glutamina o Glutamax a 200mM.
- 10X PBS.
- Tripsina 2,5%
- Iodixanol.
- Solución de rojo de fenol.
- PEI 1ug/ul
- Benzonasa.
- Filtro.
- Jeringa de 5mL
- Microfilm 28g, 67mm
- Microtubo de conexión con diámetro de 1x2.1mm
- Agua libre de endotoxinas.
- 5M NaCl

Nota: Disolver 146,1gr en 500mL de H2O endofree y llevar al autoclave por alrededor de 5h.

- 1M Tris HCl.

 UNIVERSIDAD CES <i>Un compromiso con la excelencia</i> <small>Resolución del Ministerio de Educación Nacional No. 1371 del 22 de marzo de 2007</small>	PROTOCOLOS DE PRODUCCIÓN AAV	
	Código: PR-XX-XXX	Fecha: XX/XX/XXXX
PROCESO		

Nota: Disolver 60.55gr de base Tris en 500mL de H2O endofree. Llevar el pH a 8.5 con HCl y luego ajustar el volumen final a 500mL.

- Búfer de lisis.

Nota: Usar 4.38gr de NaCl o 15 ml de solución 5M, para una concentración final de 150mM. Luego añadir TrisHCl 1M con un pH de 8.5 (25ml) para una concentración final 50mM, por último, llevar con H2O endofree hasta 500 ml.

- 1M MgCl2.
- 1M KCl.
- PBS-MK 5x.

Nota: En un filtro colocar 2,5mL de KCl 1M, 2,5mL de MgCl 1M, 250mL de PBS 10x, por último, llevar a 500mL con H2O endofree. Esta solución se debe almacenar a 4°C.

- PEI 1µgr/µL.

Nota: Disolver 100 µgr de PEI en 80mL de H2O endofree, ajustar el pH a 7, luego llevarla a un volumen final de 100ml. Luego se debe filtrar la solución y guardar a -20°C.

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
Día 1				
1	Procesamiento de las células	Re suspender las células y llevarlas a la centrifugadora a por 5 minutos a 2000Xg.	Profesional que desarrollara el protocolo.	Registro del uso de la centrifuga.
2		Retirar el sobrenadante, Re suspender el precipitado en 1mL de medio fresco.		N/A
3		En un tubo de 2mL se deben añadir 10µL de azul de tripano y 10µL de las células Re suspendidas, tomar 10µL de esta mezcla y después se debe llevar a la contadora de células.		
4	Reubicación celular	En el plato con los cubreobjetos colocar en cada pozo 11mL medio fresco.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
5		Llevar la confluencia celular a 6×10^6 por cada pozo, poner 1mL por pozo y dejar crecer las células por 2 días.		Se marca el plato (Iniciales de nombre y apellido + fecha de división)
Día 2				

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO	
6	Transfección celular	Preparar los dos tubos necesarios para la transfección explicada en la tabla 1.	Profesional que desarrollara el protocolo.	Tabla 1	
7		Añadir gota a gota el líquido del tubo con PEI en el tubo con DNA y dejar a temperatura ambiente por 20min.		N/A	
8		Añadir 2mL de la mezcla PEI/DNA con 12mL de medio fresco.			
9		Poner 14mL de las células y dejar en la incubadora por 5 horas.		Registro de uso de la incubadora.	
10		Retirar el medio y poner 12mL de medio fresco.		N/A	
Día 3					
11	Purificación del plásmido	Re suspender las células y llevarlas a la centrifugadora a por 10 minutos a 1500Xg a 4°C.	Profesional que desarrollara el protocolo.	Registro de uso de la centrifugadora.	
12		Descartar el sobrenadante y Re suspender las células en 2 búfer de lisis.		N/A	
13		Congelar y descongelar 3 veces el lisado de las células. Nota: Las células se deben congelar en hielo seco y se deben descongelar en un baño maría a 37°C			
14		Centrifugar por 15 minutos a 4°C y 2500 rpm.			Registro de uso de la centrifugadora.
15		Transferir el sobrenadante a un tubo 40mL, agregar la benzonasa a una concentración final de 50 U/mL, incubar durante 30 minutos a 37°C.			N/A
16		Centrifugar a 8.500RPM por 20min a temperatura ambiente, luego filtrarlos a través de filtro de 0,45µm.			Registro de uso de la centrifugadora.
17		Luego se colocan las soluciones de iodixanol en capas en un tubo Beckman OptiSeal de 25x77 mm y cerrar el tubo según las instrucciones del fabricante. (Tabla 2)			N/A
18		Centrifugar a 50.000RPM durante 2h a 12°C.			Registro de uso de la centrifugadora.
19		Recoger la fracción transparente entre la capa del 40% y del 60% y almacenar en la nevera durante la noche. Nota: La fracción se recoge con una aguja de microfilm conectada a una jeringa de 5mL y un soporte.			N/A
Día 4					
20		Utilizando Amicon Ultra -15, añadir 5 ml de PBS-MK al filtro y centrifugar durante 15 minutos a 4000g.		Registro de uso de la centrifugadora.	

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
21	Purificación del plásmido	Agregar 5mL de PBS-MK a la fracción AAV y agregar el volumen total al dispositivo de filtro, centrifugar primero a 4000g durante 30 minutos y luego hasta que el volumen se haya reducido a más o menos 0.5 ml.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
22		Agregar 15 ml de PBS-MK al filtro y repetir el centrifugado. Nota: Este paso se debe realizar 2 veces.		Registro de uso de la centrifugadora.
23		Último lavado se debe hacer con PBS + 0.01% Pluronic F68. En este caso se centrifuga hasta tener más o menos 300µL.		Registro de uso de la centrifugadora.
24		Retirar con cuidado lo retenido en el filtro, enjuagar el filtro con 100 µl de PBS-MK.		N/A
25		Guardar en volúmenes de 30-50 µl y almacenar a -80°C.		

6.3 Evaluación de pureza con tinción de plata.

Este protocolo es una técnica histológica que permite modificar selectivamente el color o la apariencia de los AAV.

Los virus centrifugados en gradiente de soluciones de yodixanol son separados dependiendo de su densidad, al conocer la densidad que debería tener el vector se puede determinar un porcentaje de pureza.

Materiales:

- Kit de tinción de plata.
- 5mL de Acrilamida.
- 3mL de ddH2O.
- 3mL de 50% de glicerol.
- 1mL de TEMED.
- 1mL de APS.
- 500mL de buffer gel 10x.

Nota: Anadir 181,7gr de 3M Tris, 1,5gr de 0,3%SDS y llevar a un pH de 8,45.

- 1L de búfer para el ánodo.

Nota: Anadir 242,3gr de 2M Tris, y llevar a un pH de 8,9.

- 1L de búfer para el cátodo 10x.

Nota: Anadir 121,14gr de 1M Tris, 179,2gr de 1M Trisin. No se debe ajustar el pH, pero este debe ser de 8,25.

- 20mL de búfer de muestra 5x.

Nota: Mezclar: 605mgr de 50mM Tris, 4gr de 4% SDS, 10mgr de 0,01% Serva Blue G, 12gr de glicerol al 12%. El pH debe ser llevado a 6,8.

 UNIVERSIDAD CES <i>Un compromiso con la excelencia</i> <small>Resolución del Ministerio de Educación Nacional No. 1371 del 22 de marzo de 2007</small>	PROTOCOLOS DE PRODUCCIÓN AAV	
	Código: PR-XX-XXX	Fecha: XX/XX/XXXX
PROCESO		

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
1	Preparar el gel de acrilamida.	Proceso en tabla 3	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
2	Preparar la muestra.	Se deben realizar 2 tubos de muestras, con distintos volúmenes, como se muestran en la tabla 4.		
3	Electroforesis	Dejar correr el gel al comienzo con 50V por media hora y luego subir a 80V por 90min.		Registro de uso en la máquina de electroforesis.
4	Tinción de plata	Realizar el kit de tinción según el protocolo del fabricante.		Registro de uso en el kit de tinción.

6.4 Valoración de AAV utilizando el ensayo Taqman.

Este ensayo es una versión más específica de una PCR en tiempo real, es decir esta determina un gen específico y permite reconocerlo a medida que se realiza la PCR. En este caso permitirá definir la presencia del transgén y el estado de este en el virus antes de ser inyectado.

Materiales:

- DNAsa.
- Proteinasa K.
- Mezcla de Taqman 2x.
- Plato con 96 pozos.
- Cubreobjetos.
- ddH₂O.
- Sonda.
- eCBA.
- CMV.

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
1		Mezclar 2µL del virus AAV con 198µL de búfer DNAsa 1x.		Registro de uso del kit.
2		Tomar 100µL de la dilución y agregar 1µL DNAsa.		N/A

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
3	Preparación para el ensayo.	Incubar a 37°C por 30min y luego incubar a 95°C por 10min.	Profesional que desarrollara el protocolo.	Registro de uso de la incubadora.
4		Añadir 2µL de proteinasa K e incubar a 50°C por 60min y luego incubar a 95°C por 20min.		
5		Añadir 2µL de proteinasa K e incubar a 50°C por 60min y luego incubar a 95°C por 20min.		
6		Realizar 3 diluciones, según la tabla 5.		
7	Realización curva estándar	Linealizar el plásmido con Stul, como se explica en la tabla 6.		N/A
8		Incubar por 1h a 37°C.		Registro de uso de la incubadora.
9		Para la curva estándar, use 5 µL de las diluciones 10 ⁷ c/µL1 a 10 ¹ c/µL.		Curva estándar.
10	Medición de concentración	Purificar con el kit de purificación de PCR Qiagen y medir la concentración con nanodrop.		Registro de uso del kit.
11		Calcular el número de copias por µL. $\frac{\# \text{ copias}}{\mu\text{L}} = \frac{\text{Concentración plásmido (gr/}\mu\text{L)} \times 6,022^{23}}{\text{Tamaño plásmido (par de bases)} \times 660}$		Número de copias por µL en la base de datos.
12	QPCR	Diluir 1:10 (10ul + 90ul) hasta obtener una concentración de 1x10 ¹ .		N/A
13		Preparar la mezcla qPCR para la muestra y los estándares. Presentes en la tabla 7. Nota: Cada uno debe hacerse por duplicado	Registro del uso de la QPCR.	
14		Colocar 15µL por pozo de mezcla qPCR y 5µL por muestra de la curva estándar	N/A	
15		Dejar correr con <i>Light Cycler Roche</i> como se explica en la tabla 8. Nota: Del ciclo 2 al 4 se deben repetir 45 veces.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A

7. Anexos

7.1 Tabla 1

Volúmenes para la transfección de los plásmidos presentes en el virus AAV.

	Tubo 1		Tubo 2	
	DNA	150mM NaCl	PEI	150mM NaCl
pΔF6	20µL	1mL	140µL	1mL
pAAV2/9	10µL			
pTransgén	10µL			
Total	40µL	1mL	140µL	1mL

7.2 Tabla 2

Volúmenes solución de iodixanol por diferentes concentraciones.

Orden	% solución	Yodixanol	5M NaCl	PBS-MK 5x	Agua	Fenol rojo
1	15	12,5mL	10mL	10mL	17,5mL	
2	25	20,8mL		10mL	19,2mL	100 µL
3	40	33,3mL		10mL	6,7mL	
4	60	50mL				100 µL

7.3 Tabla 3

Volúmenes para la preparación de 2 geles de acrilamida.

	Gel de apilamiento	Gel de separación
Acrilamida	400µL	3,32mL
Buffer gel	750µL	3,35mL
Agua	1,85mL	1,14mL
50% glicerol		2,12mL
TEMED	4µL	6µL
APS	20µL	50µL

7.4 Tabla 4

Volúmenes de la muestra a evaluar.

	Tubo 1	Tubo 2
Stock de AAV	1µL	5µL
Buffer de muestra 5x	3µL	3µL
H2O	11µL	7µL

7.5 Tabla 5

Ecuaciones para hacer las diluciones necesarias.

Numero de dilución	Formula
1	$10 \times 10^{-3} = 10\mu L (sol. 10^{-2}) + 90\mu L H_2O$
2	$10 \times 10^{-4} = 10\mu L (sol. 10^{-3}) + 90\mu L H_2O$
3	$10 \times 10^{-5} = 10\mu L (sol. 10^{-4}) + 90\mu L H_2O$

7.6 Tabla 6

Volúmenes para linealización del plásmido.

	Volumen
Buffer B 10x	5 μ L
Stul	2,5 μ L
DNA plasmático	5 μ gr
Agua	Llevar a 50 μ L

7.7 Tabla 7

Volúmenes para la mezcla de QPCR.

	Volumen
Mezcla maestra 2x	10 μ L
Fd 10μM	1 μ L
RV 10μM	1 μ L
Probe 10μM	0,5 μ L
Agua	2,5 μ L

7.8 Tabla 8

Tabla de ciclos con *Light Cycle Roche*.

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	10min
2	95°C	10seg
3	60°C	40seg
4	75°C	1seg

CONTROL DE CAMBIOS		
FECHA DE ACTUALIZACIÓN	CAMBIO REALIZADO	RESPONSABLE DEL CAMBIO
(Incluya la última fecha de actualización del procedimiento.)	(Detalle el cambio propuesto o razón de creación del documento, frente a la pertinencia que se tiene para el cumplimiento del objetivo del proceso)	(incluya en nombre del responsable que creó o modificó el documento por última vez, cargo y Área de trabajo)

8.5 Protocolos para experimentación en animales

 UNIVERSIDAD CES <i>Un compromiso con la excelencia</i> <small>Resolución del Ministerio de Educación Nacional No. 1371 del 27 de marzo de 2007</small>	PROTOCOLOS DE EXPERIMENTACIÓN EN ANIMALES	
Código: PR-XX-XXX	Fecha: XX/XX/XXXX	Versión: 01
PROCESO		

1. OBJETIVO

Para enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central aún no hay un buen modelo in vitro, por esta razón las investigaciones que involucran este sistema tienen al menos un experimento que implica la presencia de animales.

La principal condición para realizar estos protocolos es la presencia de un certificado de entrenamiento por parte de los involucrados en los experimentos, en este proceso de certificación se enseñan los conceptos básicos, la legislación y los componentes éticos para el trabajo con animales de laboratorio.

2. ALCANCE

Estos protocolos permiten realizar diferentes procedimientos específicamente en ratones, pero pueden ser extrapolados a otros animales de laboratorio. Además, hay protocolos específicos propios de la ingesión de transgenes en el sistema nervioso central.

3. DEFINICIONES

- Electroporación: Aumento significativo de la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática mediante un campo eléctrico aplicado externamente.
- Inmunohistoquímica: Procedimiento histopatológico que se basa en la utilización de anticuerpos que mediante reacciones antígeno-anticuerpo, permite el reconocimiento de las moléculas blanco
- Cirugía *in-útero*: Operación quirúrgica que se realiza al feto mientras todavía está dentro del útero de la madre.

4. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

- Protocolos de VIB – *KU Leuven Laboratory of Glia Biology*.
- Fuentes Paredes F de M, Mendoza Yanavilca RA, Rosales Fernández AL, Cisneros Tarmeño RA, Instituto Nacional de Salud (Perú). Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud; 2008.
- Chang DC, Hunt JR, Zheng Q, Gao P-Q. Electroporation and Electrofusion Using a Pulsed Radio-Frequency Electric Field. En: Guide to Electroporation and Electrofusion [Internet]. Elsevier; 1992 [citado 31 de enero de 2020]. p. 303-26. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080917276500228>



Código: PR-XX-XXX

Fecha: XX/XX/XXXX

Versión: 01

PROCESO

- Matsui A, Yoshida AC, Kubota M, Ogawa M, Shimogori T. Mouse in Utero Electroporation: Controlled Spatiotemporal Gene Transfection. J Vis Exp. 15 de agosto de 2011;(54):3024.

5. CONDICIONES GENERALES

- Condiciones de esterilidad.
- Aire acondicionado.
- Uso de bata, guantes y tapabocas

CONTROL	ELABORÓ		REVISÓ	APROBÓ	
Nombre	Filip De Vin. Manjarres Madrid.	Laura	Melvin Yesid Rincón.	Juliana María Martínez. Andrés Escobar.	Carlos
Cargo	Investigador. pregrado.	Estudiante	Investigador.	Tutor de enlace. Programa.	Jefe de
Fecha	2019		2020	2020	

6. Protocolos

6.1 Electroporación *in útero*

Este protocolo permite la transferencia de transgenes a una región específica del cerebro en desarrollo, a través de una inyección a los fetos. Para poder llevar este proceso a cabo, se requiere extraer los fetos de la madre, estos a estos se les inyecta un transgén, usualmente este presenta un color azul para poder verlo luego de ser inyectado) y luego se pasa al proceso de electroporación de las células.

El proceso de electroporación es la administración de electricidad con el objetivo de generar poros en las células, esto en combinación con la presencia de cargas positivas en la célula permite la entrada del material genético a las células.

Materiales

- Ratones en el día 14 de embarazo.
- DNA (2µg/ml).
- Tinte verde rápido (10mg/ml).
- Anestésico: ketamina y xilazina.
- Ungüento para los ojos.
- Almohadilla térmica.
- Gasas.
- Baño maría a 37°C.

- Solución salina estéril 0.9%
- 100% de etanol.
- 70% de etanol.
- Lámpara calentadora.
- Electroporador.
- Electrodo.
- Tijera estéril.
- Luz.
- Clips quirúrgicos.
- Bisturí estéril.
- Agujas.
- Pinzas.
- Hilo quirúrgico y aguja.
- Ungüento para heridas.

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
1	Acomodación del ratón	Colocar al ratón en la ubicación de operación durante ½ día para que puedan aclimatarse al medio ambiente antes de someterse. Nota: Esto tiende a ayudar en el uso de pequeñas cantidades de anestésico.	Profesional autorizado para el manejo de animales.	N/A
2	Sedación del ratón	En una jeringa se mezclan 100mg de ketamina por cada kg del peso del ratón y 5mg de xilazina por cada kg del peso del ratón. Esta solución se administra en el muslo del ratón y garantiza 30min de sedación. Si se requiere más tiempo se administra ¼ del volumen inicial administrado.		
3	Comprobar el nivel de sedación	Evaluar reflejos, por ejemplo, presionar las patas traseras o la cola, si el animal no responde se puede proceder.		
4	Preparar al ratón	Agregar ungüento o lagrimas falsas.		
5		Colocar el ratón sobre una almohadilla térmica boca arriba.		
6		Quitar el pelaje de la barriga con el bisturí. Nota: Se recomienda empapar el pelaje con etanol al 100%.		
7		Humedecer una gasa en etanol al 100% y limpiar el área afeitada.		
8		Tomar otra gasa y realizar un corte en forma de círculo y colocar en el abdomen del ratón.		
9		Con una tijera, haga una pequeña incisión en la piel externa. Nota: La incisión debe tener entre 1 o 1.5 cm.		

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
10	Cirugía	Separar la piel externa de la interna con un bisturí de aproximadamente 0.5 cm alrededor de la incisión.	Profesional autorizado para el manejo de animales.	N/A
11		Colocar la gasa sobre la panza del ratón con el círculo en el medio de la barriga y humedezca el área con solución salina calentada al 0.9%.		
12		Hacer una pequeña incisión en la piel interna y expanda la incisión y humedezca el área nuevamente con solución salina. Nota: La incisión debe tener entre 1 o 1.5 cm.		
13		Sacar un lado del útero con embriones y rociarlo con solución salina. Nota: Tanto los fetos como la herida debe permanecer húmeda, esto se consigue con la solución salina.		
14		Inyectar la mezcla de DNA + colorante en el cerebro. Nota: Se inyectan entre 1-2µL de la mezcla.		
15		Humedecer los electrodos en solución salina, luego darles descargas a los fetos. Configuración: 37 voltios;5 pulsos; 15ms; espacio 950ms. Colocar la paleta positiva del electrodo al lado del cerebro que desea transfectar y la paleta negativa sobre la inyección.		
16		Hacer suturas en la piel interna y engrapar la piel externa.		
17	Cuidado post operatorio	Agregar antibiótico sobre la herida.	Profesional autorizado para el manejo de animales.	N/A
18		Secar el ratón y luego colocarlo en su jaula debajo de una lámpara de calentamiento hasta que se despierte. Nota: Revisarlos cada 20min, si no se despiertan tratar de poner antídoto. En caso de que no responda se debe sacrificar.		
19		Colocar antiinflamatorio en el agua de la caja para tener una mejor recuperación del ratón.		

Código: PR-XX-XXX

Fecha: XX/XX/XXXX

Versión: 01

PROCESO

6.2 Perfusión con bomba y extracción del cerebro

La mayoría de los experimentos en neurociencias aún se deben hacer in vivo, razón por la cual el proceso de perfusión y extracción de órganos se convierte en algo de suma importancia. En este caso nos enfocaremos en la perfusión con bomba y la extracción específicamente del cerebro, pero tanto la extracción del cerebro como la perfusión se pueden realizar por medio de otros protocolos.

El proceso de perfusión se encarga de sacar la sangre del cuerpo de animal, lo cual evitará que este fluido altere los resultados del experimento. Luego de la extracción de la sangre se puede pasar directamente a la extracción de los órganos (si estos deben ser frescos), o a la fijación del espécimen, luego de la cual se extrae el órgano de interés.

Materiales

- 30mL de PBS 1x. (Por animal)
- 20mL de PFA al 4%. (Por animal)
- Isoflurano.
- Bomba.
- Cabina de flujo.
- Herramientas de cirugía.
- Base icopor.
- Válvula.
- Aguja.
- Catéter.
- Tubo cónico de 15mL con 2mL de 4% PFA (Por animal)
-

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
1	Preparación del área.	En la cabina de flujo colocar la base de icopor con protector y 5 agujas.	Profesional autorizado para el manejo de animales.	Reserva de la sala
2		Instalar la bomba, se debe colocar el PFA y el PBS en hielo durante todo el tiempo, se colocan las tapas conectadas a la bomba bien marcadas con la de PBS abierto. En el extremo opuesto se coloca un catéter nuevo. Nota: Se aconseja tener la bomba con una velocidad de alrededor de 65mL/h.		N/A
3		En una toalla desechable colocar isoflurano, poner está en una caja cerrada. Explicación en la tabla 1.		Registro del uso de isoflurano.

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
4		Colocar un pedazo de toalla con isoflurano en un tubo de ensayo, mantener este cerrado. Explicación en la tabla 1.		
5	Proceso de sedación	Tomar el ratón y dejarlo en la caja cerrada por alrededor de 1min. Nota: Antes de tomarlo asegurarse de que esté recostado y con una respiración lenta.	Profesional autorizado para el manejo de animales.	N/A
6		Evaluar los reflejos de ratón.		
7		Colocarlo en la base de icopor, colocar el hocico en el tubo de ensayo.		
8		Tomar las agujas y colocar una en cada pata.		
9	Perfusión con bomba	Realizar una incisión en la parte superior del abdomen, luego se remueve el costillar para dejar expuesto el corazón.		
10		Realizar una pequeña incisión en el atrio derecho. Nota: Se recomienda tener una toalla desechable para limpiar la sangre.		
11		Perforar el ventrículo izquierdo con el catéter.		
12		Comenzar a bombear el PBS. Nota: A media que se bombea el PBS el hígado debe ponerse de un color piel, por otra parte, si se sigue limpiando con las toallas desechables se espera hasta que el líquido sea casi transparente. Esto sucede alrededor de los 20mL de PBS.		
13		Se cierra el flujo de PBS y se comienza a bombear el PFA. Nota: A medida que se bombea el PFA es posible notar movimientos en el animal, además la cola se vuelve rígida.		
14	Extracción del cerebro	Cortar la cabeza del individuo.		
15		Cortar los lados del cráneo. Nota: La mejor forma para hacer este paso es buscar la parte del cerebro que se conectaba a la columna, colocar aquí las puntas de las tijeras, con ellas se debe buscar tocar el fondo del cráneo de manera gentil, cuando esto suceda se corta a cada lado hasta la altura de las orejas. También es posible realizar un corte vertical para facilitar los pasos posteriores.		

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
16	Nota: Es posible que al comienzo se realicen cortes no deseados sobre el cerebro.	Con unas micro tijeras de debe cortar el cráneo de la parte posterior hasta anterior.	Profesional autorizado para el manejo de animales.	N/A
17		Realizar un corte de la mitad del cerebro a la base con las micro tijeras entre el lóbulo occipital y parietal a cada lado. Nota: Con este corte quedará expuesto el cerebelo, el lóbulo occipital y el lóbulo temporal.		
18		Retirar el resto del cráneo con unas pinzas de disección. Nota: Levantar una esquina del cráneo y continuar introduciendo las pinzas de forma suave y gentil. El cerebro fresco es muy frágil.		
19		Con una espátula despegar gentilmente el cerebro desde la parte anterior a la posterior. Nota: Esto quitará las meninges y el nervio óptico.		
20		Con la espátula o con unas pinzas se toma el cerebro y se colocan en un tubo de 15mL con 2mL de PFA al 4% durante la noche. Nota: El cerebro se debe almacenar a -4°C y debe estar completamente sumergido en el PFA.		
21	Al día siguiente se deben cambiar los 2mL de PFA por PBS y devolver a la nevera hasta que se necesiten analizar.			

6.3 Corte del cerebro.

El corte del cerebro se realiza principalmente en cerebros fijados, se realiza solo en la parte de interés del cerebro, la cual cambia según la investigación. Se realizan cortes de alrededor de 50µm, los cuales se suelen usar para análisis de inmunohistoquímica, entre otros.

Materiales

- Vibratome 1500.
- PBS 1x.
- Plato de 24 pozos.
- Toallas de papel.
- Súper pegamento.
- Cuchillas.
- Pinceles.
- Pinzas.
- Escalpelo.
- Plato de Petri.
- Cerebros fijados.



PROTOCOLOS DE EXPERIMENTACIÓN EN ANIMALES

Código: PR-XX-XXX

Fecha: XX/XX/XXXX

Versión: 01

PROCESO

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO	
1	Preparación del plato.	Colocar 1mL de PBSx1.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A	
2		Marcar el plato de una forma que sepas cual experimento es.			
3	Preparación de cerebro	Colocar el cerebro en la caja de Petri. Según el experimento puede ser necesario cortar una parte no necesaria o solo con la mitad del cerebro puede ser suficiente, la otra mitad se puede usar para otros procesos.			
4	Preparar el <i>vibratome</i> 1500 con el cerebro	Armar el <i>vibratome</i> 15000.		Profesional que desarrollara el protocolo.	Registro del uso del <i>vibratome</i> .
5		Fijar el cerebro en la base del <i>vibratome</i> . Nota: Luego de secar bien la base con una toalla. se debe hacer en la base un cuadrado con el super pegamento. Además, el cerebro se coloca por el lado que no es de interés.			N/A
6		Llenar el <i>vibratome</i> con PBS 1x.			
7		Se establece la altura, la distancia, la velocidad, la frecuencia y por último el grosor de los cortes. Nota: Primero se define la distancia, debe abarcar desde un poco antes el inicio hasta un poco después del final del cerebro. Después se define la altura, se debe definir en la parte alta del cerebro y buscar casi tocar este. Por último, se recomienda una velocidad de 7 y una frecuencia de 8.			
8	Cortar y guardar	Se debe tomar el corte del cerebro con pincel y se coloca en cada pozo, al terminar los 24 pozos se vuelve a comenzar hasta terminar el cerebro. Se debe marcar donde se termina. Nota: Hay otras maneras de distribuir los cortes, esta cambia según el investigador. Esta técnica te permite tener una porción de cada región del cerebro.		Profesional que desarrollara el protocolo.	Marcar el plato (Iniciales del nombre y apellido + fecha en que se cortó)
9		Sellar con film el plato y guardar en la nevera de 4°C.			

Código: PR-XX-XXX

Fecha: XX/XX/XXXX

Versión: 01

PROCESO

6.4 Tinción de muestras cerebrales por inmunohistoquímica.

Este protocolo es igual protocolo 7.6 explicado en “*protocolos para el manejo de células HEK*”, la diferencia que tiene es que en este caso se trabaja sobre tejidos cerebrales.

Materiales

- Cortes de cerebros.
- Anticuerpos primarios y secundarios.
- 2% BSA.
- 10% Triton x.
- PBS 1x.
- PBST 0,1%
- Suero de Burro.
- Plato de Petri.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Medio de montaje.
- Brillo de uñas.

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
Día 1				
1	Definición y cálculos	Definir los anticuerpos primarios y las disoluciones de estos. Nota: Si se quiere marcar más de una proteína cada anticuerpo debe provenir de un animal diferente.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
2		Definir el número de pozos en los que se va a trabajar y el volumen de líquido que se desea usar. Nota: Se recomienda usar entre 250µL y 500µL		
3	Incubar las muestras en el búfer de incubación	Preparar el búfer de incubación, explicado en la tabla 2. Nota: En la solución final tritón x debe estar a una concentración de 1%		

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
4		Dejar en el búfer de incubación por 10min a temperatura ambiente mezclándose a 100rpm.		
5	Incubar las muestras en la solución de bloqueo	Preparar la solución de bloqueo, explicado en la tabla 3.		
6		Retirar el búfer de incubación e incubar en la solución de bloqueo por 1h a temperatura ambiente a 100rpm.		
7	Incubar las muestras en el anticuerpo primario	Preparar el medio con el anticuerpo primario, explicado en la tabla 4. Nota: El volumen de anticuerpo que se usa para este medio es discriminante.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
8		Reemplazar el suero de bloqueo por el medio con el anticuerpo primario, dejar incubando a 4°C durante la noche a 100rpm.		
Día 2				
9	Lavado de muestras	Retirar el medio y lavar las muestras 3 veces con PBST, cada vez por 10min a temperatura ambiente y 100rpm.	Profesional que desarrollara el protocolo.	N/A
10	Incubar las muestras en el anticuerpo secundario	Preparar el medio con el anticuerpo secundario, explicado en la tabla 5. Nota: El volumen de anticuerpo que se usa para este medio es discriminante.		
11		Retirar el tercer lavado y aplicar el medio con el anticuerpo secundario por 1 hora a temperatura ambiente a 100rpm.		
12	Lavado de muestras	Retirar el medio y lavar las muestras 3 veces con PBST, cada vez por 10min a temperatura ambiente y 100rpm.		
13		Retirar el último lavado y lavar una vez con PBS por 10min a temperatura ambiente y 100rpm.		
14	Montaje de muestras	Poner en el plato de Petri 5mL de PBS 1x, poner las primeras muestras en el plato de Petri.		
15		Colocar las 3 muestras en el portaobjetos. Nota: El orden de las muestras depende del investigador.		
16		Aplicar una gota de medio de montaje sobre cada muestra, luego colocar el cubreobjetos, sellar alrededor con esmalte de uñas y dejar secando durante la noche. Nota: Se deben juntar las gotas de medio de montaje entre sí.	Profesional que desarrollara el protocolo.	Marcar en el portaobjetos (Iniciales del nombre y apellido + fecha en la cual se realizó el montaje)

N	ACTIVIDAD	DESCRIPCIÓN	RESPONSABLE	REGISTRO
Día 3				
17	Lectura de muestras	Se llevan las muestras a un cuarto oscuro donde allá un microscopio de fluoroscopia y tomar imágenes según cada anticuerpo de interés.	Profesional que desarrollara el protocolo.	Registro de uso del microscopio.

7. Anexos

7.1 Tabla 1

Volúmenes propuestos para la sedación con isoflurano.

Volumen isoflurano		
	Adultos	Juveniles
Caja	2mL	1mL
Tubo de ensayo	1mL	0.5mL

7.2 Tabla 2

Preparación del buffer de incubación.

	Volumen
10% Tritón x	Vol. total/10
PBS 1x	Vol. total – vol. tritón x
Total	#pozos x vol. por pozo

7.3 Tabla 3

Preparación suero de bloqueo.

	Volumen
10% Suero de burro	Vol. total/10
BSA (gr)	Vol. total/100
PBS 1x	Vol. total – Vol. SB
Total	#pozos x vol. por pozo



Código: PR-XX-XXX

Fecha: XX/XX/XXXX

Versión: 01

PROCESO

7.4 Tabla 4

Preparación medio con anticuerpo primario.

	Volumen
Anticuerpo primario	Vol. total/denominador de la dilución
PBS 1x	Vol. total
Total	#pozos x vol. por pozo

7.5 Tabla 5

Preparación medio con anticuerpo Secundario.

	Volumen
Anticuerpo secundario	Vol. total/denominador de la dilución
PBS 1x	Vol. total
Total	#pozos x vol. por pozo

CONTROL DE CAMBIOS		
FECHA DE ACTUALIZACIÓN	CAMBIO REALIZADO	RESPONSABLE DEL CAMBIO
(Incluya la última fecha de actualización del procedimiento.)	(Detalle el cambio propuesto o razón de creación del documento, frente a la pertinencia que se tiene para el cumplimiento del objetivo del proceso)	(incluya en nombre del responsable que creó o modificó el documento por última vez, cargo y Área de trabajo)

9. Bibliografía

1. Rodríguez Yunta E. Terapia génica y principios éticos. *Acta Bioethica* [Internet]. 2003 [citado 27 de enero de 2020];9(1). Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-569X2003000100007&lng=en&nrm=iso&tlng=en
2. Salva MT. Terapia génica: Diez años de esperanzas. *Editorial*. 1998;13(2):65-6.
3. Fillat C. Perspectivas actuales de la terapia génica. *BSCP Can Ped*. 2004;28:6.
4. Rincon MY. Terapia genica. Asesoría presentado en; 2019 ago; Belgica.
5. Rincon MY. Asesoría terapia genica, AAV y PHP.B. Asesoría presentado en; 2018 oct; Colombia.
6. Austin-Ward ED, Villaseca G C. La terapia génica y sus aplicaciones. *Rev Médica Chile* [Internet]. julio de 1998 [citado 31 de enero de 2020];126(7). Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98871998000700013&lng=en&nrm=iso&tlng=en
7. Deng Y, Wang CC, Choy KW, Du Q, Chen J, Wang Q, et al. Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: Principles, challenges, and new strategies. *Gene*. abril de 2014;538(2):217-27.
8. Koepper J, De Vin F. Use and formation of transgens. Asesoría presentado en; 2019 sep; Belgica.
9. Rincon MY, Koepper J, De Vin F. Itroduction to gene therapy. Asesoría presentado en; 2019 ago; Belgica.
10. Chang DC, Hunt JR, Zheng Q, Gao P-Q. Electroporation and Electrofusion Using a Pulsed Radio-Frequency Electric Field. En: *Guide to Electroporation and Electrofusion* [Internet]. Elsevier; 1992 [citado 31 de enero de 2020]. p. 303-26. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080917276500228>
11. Chang DC. *Guide to electroporation and electrofusion* [Internet]. San Diego: Academic Press; 1992 [citado 31 de enero de 2020]. Disponible en: <http://site.ebrary.com/id/10665570>
12. Koepper J, De Vin F. In-utero electroporation. Asesoría presentado en; 2019 oct; Belgica.
13. Slezak M, Vin F de, Shinmyo Y, Batiuk MY, Rincon MY, Pando CM, et al. Flexible, fast and selective genetic manipulation of the vertebrate CNS with misPiggy. *bioRxiv*. 28 de noviembre de 2018;481580.
14. Sierra-Delgado JA, Bautista-Nino PK, Vargas-Castellanos CI, Serrano Diaz NC, Rincon MY. Immune response and gene therapy with adenoassociated viral vectors. *Medicina (Mex)*. 2019;79(6):493-501.

15. Addgene. AAV Production in HEK293T Cells [Internet]. addgene. 2018 [citado 31 de enero de 2020]. Disponible en: <https://www.addgene.org/protocols/aav-production-hek293-cells/>
16. Fripont S, Marneffe C, Marino M, Rincon MY, Holt MG. Production, Purification, and Quality Control for Adeno-associated Virus-based Vectors. *J Vis Exp*. 29 de enero de 2019;(143):58960.
17. Rincon MY, de Vin F, Duqué SI, Fripont S, Castaldo SA, Bouhuijzen-Wenger J, et al. Widespread transduction of astrocytes and neurons in the mouse central nervous system after systemic delivery of a self-complementary AAV-PHP.B vector. *Gene Ther*. abril de 2018;25(2):83-92.
18. Lykken EA, Shyng C, Edwards RJ, Rozenberg A, Gray SJ. Recent progress and considerations for AAV gene therapies targeting the central nervous system. *J Neurodev Disord*. diciembre de 2018;10(1):16.
19. Shelly Fripont. Development of new systems for enhanced gene therapy in the central nervous system [Investigación]. [Leuven]: Ku Leuven; 2017.
20. Torres Alves Machado ME. Vectored immunoprophylaxis to produce anti-BACE1 nanobodies for treatment of Alzheimer's disease [Investigación]. [Portugal]: Universidade de Lisboa; 2019.
21. Cabrera Pérez R, Martí Seves R, Vila Bover M, Universitat Autònoma de Barcelona, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Terapia génica para el MNGIE: estudio comparativo de diferentes vectores adeno-asociados en el modelo preclínico de la enfermedad [Internet]. España; 2017 [citado 11 de mayo de 2020]. 239 p. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10803/458540>
22. De Vin F. Miss piggy constructs. Asesoría presentado en; 2019 sep; Belgica.
23. Düllmann ChE, Eichler B, Eichler R, Gäggeler HW, Jost DT, Kindler U, et al. Miss Piggy, a californium-252 fission fragment source as a generator of short-lived radionuclides. *Nucl Instrum Methods Phys Res Sect Accel Spectrometers Detect Assoc Equip*. octubre de 2003;512(3):595-605.
24. Alianza universidad Simon Bolivar. La genética, el futuro de la salud de la humanidad. septiembre de 2018 [citado 28 de febrero de 2020]; Disponible en: <https://www.elheraldo.co/barranquilla/la-genetica-el-futuro-de-la-salud-de-la-humanidad-537908>
25. Vlaams Instituut voor Biotechnologie. About us [Internet]. Vlaams Instituut voor Biotechnologie. 2020 [citado 28 de febrero de 2020]. Disponible en: <http://www.vib.be/en/about-vib/organization/Pages/default.aspx>
26. Vlaams Instituut voor Biotechnologie. Research themes [Internet]. VIB. 2020 [citado 28 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://cbd.vib.be/research/research-themes/>

27. Vlaams Instituut voor Biotechnologie. VIB – KU Leuven Laboratory of Glia Biology [Internet]. VIB. 2020 [citado 28 de febrero de 2020]. Disponible en: <http://www.vib.be/en/research/scientists/Pages/Matthew-Holt-Lab.aspx>
28. Franco AY, Longart M. Aplicaciones de la proteína verde fluorescente (GFP) en la biología celular y en la visualización del sistema nervioso. RET. 2009;1:84-96.
29. Wahlfors J, Loimas S, Pasanen T, Hakkarainen T. Green fluorescent protein (GFP) fusion constructs in gene therapy research. Histochem Cell Biol. enero de 2001;115(1):59-65.
30. Alvarez AN. Biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento en cáncer de mama por inmunohistoquímica [Internet] [Investigación]. [España]: Universitat de Lleida; 2014. Disponible en: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/132998/Tana1de2.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
31. ImageJ. Software imageJ [Internet]. Software ImageJ. 2011 [citado 27 de abril de 2020]. Disponible en: <https://imagej.nih.gov/ij/>
32. Fernández PL. Inmunohistoquímica [Internet]. Centro de diagnóstico biomédico. 2020 [citado 11 de mayo de 2020]. Disponible en: [http://cdb.hospitalclinic.org/laboratorios/anatomia patologica/inmunohistoquimica/](http://cdb.hospitalclinic.org/laboratorios/anatomia_patologica/inmunohistoquimica/)
33. ImageJ. Software ROIs [Internet]. ImageJ. 2019 [citado 5 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://imagej.net/ROIs>