



Capítulo 1

El laboratorio

Autores: María Catalina Arias Londoño,
Carolina Mesa Pineda y Diana Maritza Echeverry Berrío.

En un laboratorio, para fines de cultivo de células reproductivas y de producción de embriones, es indispensable realizar una evaluación inicial de los posibles riesgos (tanto para los cultivos como para los operarios) que pueden presentarse durante la ejecución de los procedimientos.

Es importante resaltar que cada laboratorio es diferente, y por tanto los sistemas de bioseguridad y asepsia deben estar diseñados de acuerdo a las especificaciones de cada uno y de los procesos que se lleve a cabo. Sin embargo, se pueden seguir algunas pautas generales, que buscan disminuir los riesgos y optimizar los procesos, y que pueden ser aplicadas en cualquier laboratorio, así como el manejo de equipos y materiales necesarios en cada una de las actividades.

Pautas básicas de bioseguridad y asepsia

Manejo adecuado de elementos potencialmente peligrosos

Todo el personal que manipule reactivos y agentes químicos peligrosos, o que de alguna forma tenga acceso a ellos, debe estar plenamente informado de la manera correcta de manipular y almacenar estos agentes (ver Anexo 1).

Manejo adecuado de los equipos

Para el manejo de los equipos de laboratorio se deben seguir estrictamente las recomendaciones del fabricante. Más adelante en este capítulo se encuentra una sección donde se describe el manejo adecuado de los equipos más utilizados en el cultivo de células reproductivas y en la producción de embriones bovinos *in vitro*.

Técnica aséptica

La técnica aséptica es la principal medida preventiva para disminuir riesgos de contaminación. En este sentido, es importante tener en cuenta los siguientes aspectos:

- a) *Flujo de personal*: Debe ser restringido y claramente señalizado (ver figura 1.1). Usualmente las áreas de acceso común están a la entrada, y el nivel de restricción se incrementa mientras más interno sea el lugar en el laboratorio. Los cuartos de cultivo deben ubicarse en la zona de mayor restricción, la cual corresponde a la de menor flujo de personal.



Figura 1.1. Señalización para informar acerca del flujo de personal.



- b) *Programa de limpieza, aseo y desinfección (LAD)*: El laboratorio debe contar con un programa LAD, el cual permite reducir la carga microbiológica ambiental y mantenerla en niveles mínimos para reducir el riesgo de contaminación en los procesos realizados. El programa LAD es aplicable tanto a superficies como a equipos, y se debe realizar teniendo en cuenta las fases descritas en la figura 1.2. Se recomienda la aplicación del LAD al menos una vez al mes, pero es de aclarar que esto depende de los procesos y flujo de trabajo en cada laboratorio en particular.

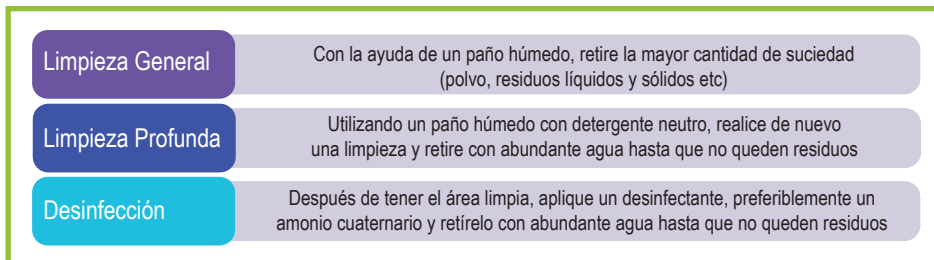


Figura 1.2. Fases para el programa de limpieza, aseo y desinfección (LAD).

Nota: Seguir estrictamente las indicaciones sugeridas por los fabricantes de los productos que se vayan a utilizar.

- c) *Aseo personal*: Todo el personal debe estar aseado, con el cabello recogido, no debe utilizar accesorios (aretes, anillos, cadenas), esmaltes ni perfumes. Una de las mayores fuentes de contaminación para los cultivos celulares son las manos de los operarios, por lo tanto es indispensable una adecuada limpieza para la aplicación de una buena técnica aséptica. Para realizar el lavado de manos, se debe utilizar un jabón antiséptico de uso externo no perfumado y seguir unos pasos sencillos que garantizan una adecuada técnica aséptica (ver Anexo 2).
- d) *Delimitación y manejo del área de trabajo*: Con el fin de optimizar la realización de los procesos y evitar la contaminación cruzada, es necesario delimitar áreas de trabajo. Debe existir un *área sucia*, destinada para el descarte y lavado de material contaminado y de material biológico, antes de su ingreso al *área limpia*, donde permanecen los implementos estériles y equipos en condiciones asépticas, y donde se realiza la manipulación de tejidos biológicos y demás procesos que no requieren un alto grado de esterilidad. Finalmente, es importante establecer un *área de cultivo*, donde se realizan todos los procesos que implican manipulación directa de las células y embriones.
- e) *Mantenimiento de la esterilidad de implementos y medios para cultivo celular*: Es necesario asegurarse de la esterilidad del material del laboratorio (cajas, puntas, filtros, etc.) y de los medios de cultivo que tendrán contacto directo con las células. Para esto, existen

diferentes métodos de esterilización, tanto físicos como químicos, sin embargo los más utilizados en laboratorios de embriones y cultivo celular por su relativa baja toxicidad son los que se describen en las tablas 1.1 y 1.2. Además, en cada protocolo para la preparación de los medios de cultivo celular y producción de embriones se debe contemplar la inclusión de productos antibióticos, que permitan disminuir el riesgo de contaminación. Por otro lado, se debe tener especial cuidado con el uso de agentes químicos, pues existen productos como el hipoclorito que pueden causar deterioro progresivo de los equipos.

Tabla 1.1. Aplicación de agentes físicos para el control de microorganismos

Método	Usos recomendados	Limitaciones
Calor húmedo con autoclave	Esterilización de instrumentos, ropa blanca, utensilios, medios y otros líquidos.	Ineficaz contra microorganismos que estén en materiales impermeables al vapor, y no puede usarse para materiales sensibles al calor.
Calor seco con horno de aire caliente	Esterilización de materiales impermeables (como el vidrio) o que se dañen con la humedad (como los instrumentos cortantes y los metales).	Es destructivo de los materiales que no puedan resistir altas temperaturas durante largos periodos de tiempo.
Radiación con luz ultravioleta	Desinfección de superficies y materiales sensibles al calor (por ejemplo, materiales plásticos).	Para ser eficaz, la luz debe ser absorbida. No pasa a través de vidrio transparente u objetos opacos. Irrita los ojos y la piel, y tiene poco poder de penetración.
Filtración (la forma de uso se amplía más adelante)	Esterilización de fluidos biológicos sensibles al calor (por ejemplo, suero, enzimas, algunas vitaminas, hormonas y antibióticos, entre otros termolábiles). Los filtros son elementos cuyo principio de acción se basa en una membrana que tiene un diámetro de poro de 0,2 μm , que retiene bacterias y hongos de tamaños mayores, pero no virus. Debido a que la contaminación con virus es relativamente inusual, el sistema de filtración es suficiente para asegurar la esterilidad de medios líquidos.	El fluido debe estar relativamente libre de material particulado.

Fuente: Adaptada de Montoya H., 2000.



Tabla 1.2 Aplicación de agentes químicos para el control de microorganismos

Grupo principal	Características adicionales	Modo de acción	Compuestos específicos	Uso recomendado	Limitaciones
Alcoholes	Desnaturalizan las proteínas. Son agentes deshidratantes con acción detergente.	Cuanto más carbonos tiene el alcohol, más germicida es.	El alcohol metílico es menos bactericida y más tóxico; el alcohol etílico, usado a concentraciones de 70%, es el menos tóxico. Otros alcoholes, como el propílico, el butírico y el amílico, son de uso menos frecuente.	Antisepsia para la piel. A una concentración del 60% matan los virus si no hay materia orgánica extraña.	Antiséptico
Compuestos de amonio cuaternario	Desnaturalizan las proteínas y dañan la membrana celular.	Actúan contra bacterias gram positivas y son fungicidas.	Cloruro de benzalconio, Cloruro de benzetonio y Cloruro de cetilpiridinio.	Son agentes higienizantes.	No son esporicidas.

Fuente: Adaptada de Montoya H., 2000.

Control microbiológico

El control microbiológico es fundamental para el éxito de un cultivo celular, ya que las contaminaciones constituyen el principal factor de pérdida de muestras y cultivos. La prevención es la mejor manera de control, y se puede lograr de tres formas:

- **Prevención de la contaminación:** Evitando que los microorganismos lleguen a los medios de cultivo, los equipos y los materiales.
- **Prevención de la transmisión:** Impidiendo el traspaso de infecciones entre equipos y medios, o de cultivos contaminados a aquellos que no tienen contaminación.
- **Prevención del deterioro:** El deterioro de materiales y equipos, como oxidaciones, humedades u otros daños, puede ser fuente de microorganismos que pueden contaminar los procedimientos que se realizan.

Es de vital importancia seguir estrictamente los pasos mencionados en la figura 1.2 ya que cualquier material orgánico que se encuentre en las superficies, equipos o materiales puede inactivar los agentes químicos para el control de microorganismos, reduciendo su efectividad.

Cuando se presentan contaminaciones en los procesos de cultivo celular o de embriones es recomendable realizar cultivos microbiológicos para la detección del agente causal y de esa manera poder elegir el método o producto adecuado para el tratamiento del problema.

La figura 1.3 muestra los principales riesgos para los cultivos celulares.

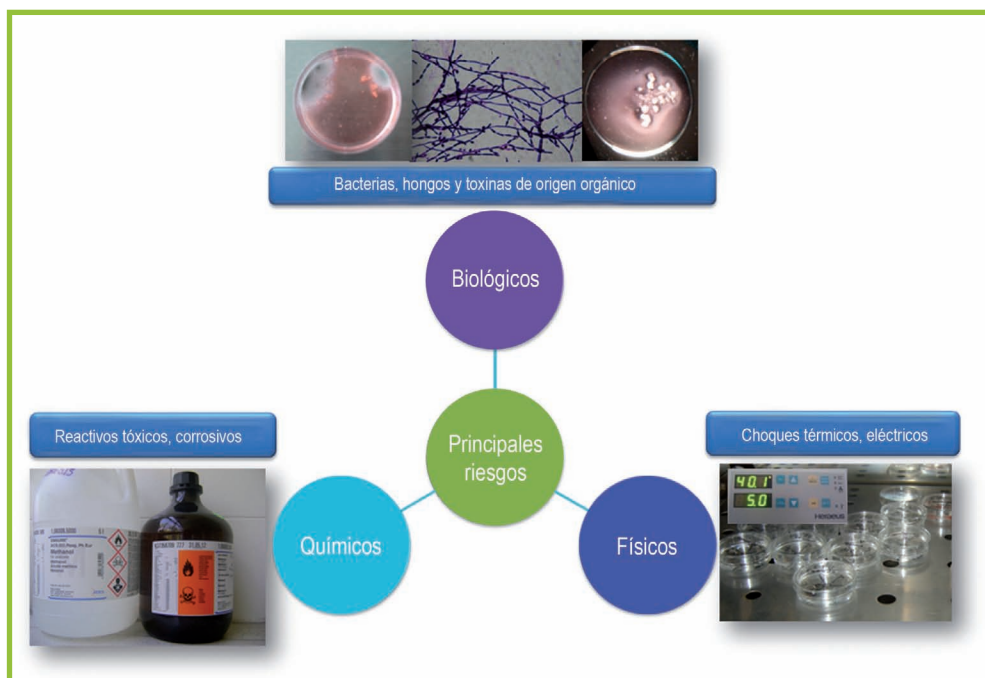


Figura 1.3. Principales riesgos para los cultivos celulares.

Manejo adecuado de residuos en el laboratorio

- a) *Disposición de residuos sólidos:* Los residuos sólidos, como vidrio, plástico o papel, que no presenten ningún tipo de riesgo biológico, químico o físico, deben ser separados de la siguiente manera: en bolsa gris, aquellos que sean reciclables, y en bolsa verde, aquellos que no sean reciclables. Ambos, a su vez, deben ser separados en recipientes de plástico rotulado para este tipo de desechos.

Los residuos sólidos contaminados con residuos biológicos, como muestras de sangre, tejidos, etc., deben ser descartados en bolsas rojas. Los recipientes para la



disposición de estos desechos deben tener el rótulo de “riesgo biológico” o “residuos peligrosos”, deben ser de plástico resistente, de color rojo y tener tapa de seguridad, siempre deben ser manipulados con guantes. Los residuos sólidos como agujas, vidrios, cuchillas y demás objetos cortopunzantes contaminados o no, deben ser descartados en un recipiente conocido como “guardián” (más pequeños, con tapa de seguridad y dispositivos para el descarte de agujas y cuchillas), debidamente rotulado como “riesgo físico y biológico” (ver figura 1.4).



Figura 1.4. Bolsas y recipientes para residuos sólidos en el laboratorio.

- b) *Disposición de residuos líquidos:* Los residuos líquidos hidrosolubles que no presenten ningún tipo de riesgo (como PBS, solución salina, algunos medios de cultivo o alcohol antiséptico) pueden inactivarse por esterilización por calor y descartarse directamente en los sifones del área sucia o de lavado.

Los residuos líquidos liposolubles, como grasas y aceites, deben disponerse en recipientes destinados para tal fin; en caso de presentar algún tipo de riesgo, deben inactivarse esterilizándose por calor.

Los residuos líquidos que sean corrosivos, que contengan metales o cianuro, o que puedan generar sólidos precipitables, no se pueden descartar por el sistema de alcantarillado. De acuerdo al tipo de residuo que se descarte, se deposita en un recipiente específico y descartarlo a través de la recolección de residuos peligrosos (radiactivos, corrosivos, volátiles, etc.)

La disposición final de todos los residuos del laboratorio debe realizarla una entidad especializada en el manejo de residuos de laboratorio; todas las bolsas, guardianes y recipientes de disposición deben estar debidamente rotulados para facilitar su labor.

Equipos básicos para el cultivo celular y de embriones

Los equipos deben usarse tal y como viene indicado en los manuales de los fabricantes. El mantenimiento se debe realizar de manera periódica, preferiblemente de carácter preventivo, con el fin de asegurar un buen funcionamiento de los equipos en todo momento y para cada equipo se debe tener un registro escrito, cerca al equipo, con la fecha y el responsable de uso.

Cámara de bioseguridad (cabina de flujo laminar)

La cámara de bioseguridad actúa como barrera primaria para evitar el riesgo de infecciones transmitidas por agentes que se encuentran en el aire, impidiendo la salida de estos a la atmósfera y, por consiguiente, su inhalación por el personal.

Estas cabinas poseen filtros de alta eficiencia de partículas de aire (High-Efficiency Particulate Air, HEPA), los cuales atrapan el 99,97% de las partículas de 0,3 μm de diámetro y el 99,99% de las partículas de mayor tamaño. La filtración de aire en estas cabinas en el área de trabajo proporciona protección del material, lo cual evita su contaminación; su eficacia depende de aspectos como el sistema de ventilación, la ubicación con relación a las corrientes y al movimiento del aire y la integridad de los filtros HEPA. Es importante hacer mantenimiento de estos equipos por lo menos una vez año.

Tipos de cámaras de bioseguridad utilizadas en el cultivo de células reproductivas y en la producción de embriones

- **Clase I:** Es una cámara de manipulación abierta, ventilada y provista de un sistema de protección para el material. El aire fluye desde la parte frontal sobre el material. Esta cámara posee un sistema de *flujo horizontal*, que protege toda la zona de manipulación. Una cabina de flujo horizontal proporciona adecuada protección estéril para los cultivos, siendo muy conveniente para preparar medios y otros reactivos (ver figura 1.5).

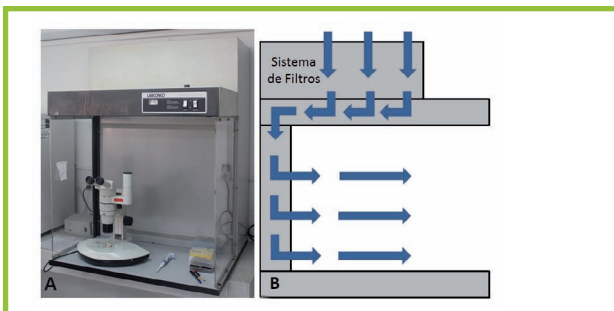


Figura 1.5. Cabina de flujo laminar horizontal. A. Vista frontal, B. Vista lateral.



- Clase II:** Esta cámara presenta un sistema de *flujo vertical*: el aire entra atravesando el techo de la cabina, desciende sobre el material y recorre la zona inferior del área de trabajo (ver figura 1.6). Protege así al manipulador, el material y el medio ambiente. Está dotada de un sistema de flujo vertical que previene la posible exposición a los aerosoles y las salpicaduras, las cuales pueden ser generadas cuando se realizan los procesos. (Freshney, 2005).

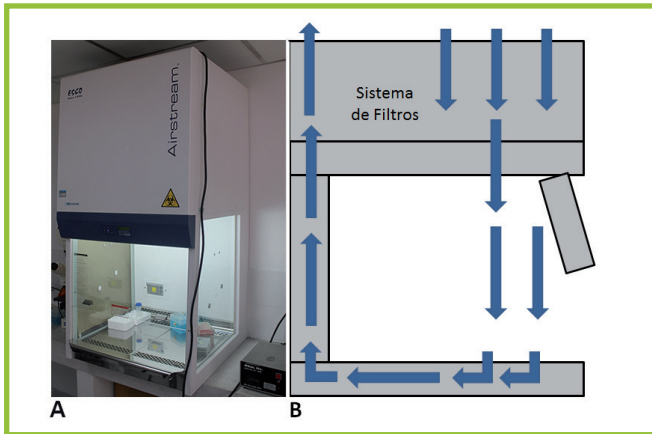


Figura 1.6. Cabina de flujo laminar vertical. A. Vista frontal; B. Diagrama con vista lateral.

Recomendaciones de uso:

- Limpiar y desinfectar con alcohol las superficies de la cabina, y encender el flujo de aire por lo menos 15 minutos antes de comenzar el trabajo.
- Ubicar los materiales necesarios de la mitad hacia el fondo de la cámara, cuidando que los elementos grandes no les tapen el flujo de aire a los elementos más pequeños.
- El panel de vidrio para visualización dentro de la cámara no debe ser abierto mientras esta esté en funcionamiento.
- No se deben usar mecheros ni vórtex dentro de la cabina. El calor y la vibración pueden producir disturbios en el flujo de aire, y en general en el funcionamiento de la cámara.
- Se debe minimizar al máximo la circulación de personas detrás del operador.
- La rejilla por donde circula el aire no debe ser bloqueada, ya que puede ocasionar contaminación del material.
- El trabajo en la cabina debe realizarse con movimientos cuidadosos y pausados y desde la mitad hacia el fondo de la superficie de trabajo.

- Al finalizar el trabajo, retirar todos los materiales de la cámara y limpiarla con alcohol al 70%.
- Encender la lámpara de luz UV por lo menos 12 horas una vez a la semana o a criterio profesional de acuerdo al volumen de trabajo.

Incubadora de CO₂

La incubadora de CO₂ es un equipo que permite mantener condiciones de temperatura y humedad, así como porcentajes de gases apropiados y constantes para el crecimiento celular.

En una incubadora de células, la constancia de la temperatura (invariabilidad durante prolongados periodos de tiempo, con oscilaciones inferiores a 0,5°C) es más importante que su precisión, pues una temperatura constante mantiene las células en condiciones en las que las tasas de crecimiento son homogéneas. Los valores de temperatura dependerán de la especie, y siempre se debe tratar de mantener la temperatura normal corporal del animal. Dado que el CO₂ afecta el pH de los medios, esto se debe tener en cuenta según el tipo de cultivo celular que se vaya a desarrollar. El balance de gases dependerá del órgano del cual proviene el tejido de cultivo. Finalmente, es necesario tener en cuenta que la humedad para todos los cultivos de células de vertebrados debe ser máxima.

Las incubadoras de CO₂ cuentan con un sistema de circulación de aire y un termostato seguro que reduce un posible sobrecalentamiento y fallas generales en el control de la temperatura. También es importante que esté elaborada en materiales resistentes a la corrosión y que sus piezas sean fácil y completamente desmontables para permitir las labores de limpieza y desinfección (Freshney, 2005).

Recomendaciones de uso:

- Graduar la temperatura y el porcentaje de CO₂ requerido de acuerdo a las necesidades del cultivo (ver figura 1.7).
- Dejar que la incubadora se estabilice, hay algunas que cuentan con ciclos de esterilización y las temperaturas a las cuales se deben mantener en cada ciclo están especificadas en los manuales de los fabricantes).
- Medir el CO₂ con un equipo especializado (indicador de CO₂) y ajustarla al valor real, para asegurar que la cantidad de CO₂ establecido en el visualizador de la incubadora es realmente la que se encuentra en el interior (ver figura 1.8).
- Llenar los reservorios de agua siempre con agua destilada estéril.
- Abrir la incubadora con poca frecuencia y en tiempos breves, para evitar el desbalance de gases.



- Llevar registro diario de los valores de temperatura y CO_2 para garantizar que permanezcan constantes.



Figura 1.7. Funciones básicas para la graduación de la incubadora de CO_2 .

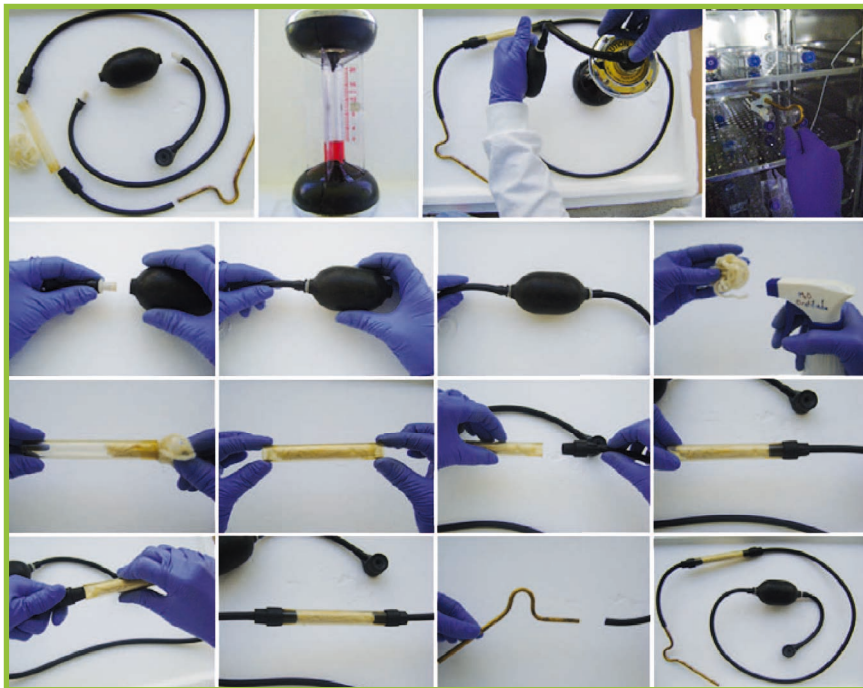


Figura 1.8. Medición del CO_2 de la incubadora, con el indicador de CO_2 .

Estereoscopio

Es un instrumento óptico que permite la observación y manipulación de una muestra que es demasiado pequeña para ser estudiada a simple vista, pero demasiado grande para ser estudiada bajo el microscopio compuesto (ver figura 1.9). Su magnificación va desde cerca de 5X hasta más de 60X. Es un equipo indispensable para los procesos de producción de embriones *in vitro*.



Figura 1.9. Estereoscopio



Figura 1.10. Microscopio invertido de contraste de fases.

Recomendaciones de uso:

- Antes de conectarlo, se debe verificar que el interruptor esté apagado, de lo contrario, la lámpara se podría fundir.
- Mantenerlo siempre limpio y desinfectarlo periódicamente para evitar el crecimiento de hongos en los lentes.
- Evaluar los cultivos en campo oscuro y campo brillante, pues de esta manera se pueden hacer evidentes algunas contaminaciones que no son visibles en luz blanca.
- Al terminar la observación, es importante bajar completamente la intensidad lumínica, apagar, desconectar y cubrir el equipo (Freshney, 2005).

Microscopio invertido de contraste de fases

Este equipo permite observar los cultivos celulares directamente en las cajas de Petri o botellas de cultivo, lo que facilita enormemente la evaluación de la morfología celular y la detección temprana de contaminaciones; además, en este equipo se realizan las diferentes evaluaciones espermáticas. (Ver figura 1.10)

Recomendaciones de uso:

- La muestra debe enfocarse con el menor aumento y luego aumentarlo moviendo los objetivos del revólver.
- Estandarizar el sistema de iluminación que se adapte mejor a las células y métodos de cultivo que se empleen.
- (Ver recomendaciones para el estereoscopio).



Figura 1.11. Centrifuga

Centrífuga

En este equipo se pone en rotación una muestra, para separar, por fuerza centrífuga, sus componentes o fases, en función de su densidad (ver figura 1.11). Básicamente, las centrifugas se utilizan para concentrar o lavar células, las cuales pueden sedimentarse satisfactoriamente entre 80 y 100 gravedades, ya que altas gravedades pueden causar daño celular y promover la aglutinación en el pellet (Freshney, 2005). Además se requieren para realizar el gradiente de Percoll.

Existen muchos tipos de centrifugas, y por tanto se debe escoger la que más se ajuste a las necesidades del laboratorio.

Recomendaciones de uso:

- Calibrar siempre el peso de las muestras, de tal manera que la centrifuga quede balanceada en todos sus extremos.
- Asegurarse de cerrar perfectamente los tubos que contienen las muestras y la tapa de la centrifuga.
- Si se utilizan temperaturas de centrifugación bajas, asegurarse de secar bien la centrifuga o dejarla abierta después del proceso para evitar su deterioro por humedad y posible crecimiento de hongos.

- Esperar siempre que la centrifuga se detenga por completo antes de sacar las muestras.
- No detener nunca la centrifugación por la fuerza, pues se puede dañar el equipo.

Refrigeradores y congeladores

Los reactivos y medios de cultivo poseen diferentes temperaturas de almacenamiento (la información correspondiente está disponible en los insertos técnicos y en las etiquetas del producto). Aunque muchos de ellos pueden permanecer a temperatura ambiente, algunos requieren temperaturas de refrigeración (2-4°C) o de congelación (-20°C); para temperaturas menores se requiere de congeladores especializados de hasta -70°C o termos de nitrógeno de -196°C.

Recomendaciones de uso:

- Disponer los reactivos y medios de tal manera que el frío circule libremente entre ellos y que sean fáciles de tomar cuando se necesiten.
- Mantener en la puerta de la nevera el inventario de reactivos y medios que contiene, y su ubicación.
- No permitir el crecimiento de escarcha sobre los frascos almacenados.
- Abrir la nevera solamente cuando sea necesario y por periodos de tiempo breves, para evitar los cambios drásticos de temperatura interna, que pueden alterar los reactivos y medios almacenados.
- Realizar control de temperatura y llevar registro sobre ella.

Equipos utilizados en la preparación de medios

Purificador de agua

El agua purificada se emplea para protocolos de lavado de material y para preparación de medios. El primer propósito puede cumplirse con agua simplemente destilada o desionizada, mientras que el segundo requiere agua ultrapura de grado reactivo.

Recomendaciones de uso:

- El equipo de purificación debe escogerse de acuerdo a la calidad del agua con la cual se cuenta en el laboratorio.
- El agua ultrapura debe utilizarse inmediatamente y nunca debe ser almacenada.
- Los equipos de purificación deben mantenerse perfectamente limpios y de manera periódica se debe realizar desinfección de aquellas partes que se pueda (para ello, ver los manuales de los equipos).
- Se deben realizar análisis microbiológicos periódicamente para garantizar la calidad del agua.

Balanza analítica

La balanza analítica es útil para pesar cantidades pequeñas de reactivos necesarios para la preparación de medios o suplementos para cultivo.

Recomendaciones de uso:

- Seleccionar un lugar para mantener la balanza; debe ser un mesón firme, lejos de vibraciones (de la centrífuga o el vórtex), corrientes de aire y flujo de personas.



- La balanza debe estar perfectamente equilibrada (usualmente tiene una burbuja de nivelación en un costado).
- Utilizar recipientes especiales para pesar reactivos. Se puede utilizar papel pergamino o de aluminio.



Figura 1.12. Agitador magnético

Agitador magnético

Los agitadores magnéticos son útiles para disolver medios en polvo u homogenizar ciertas sustancias. En algunos casos pueden utilizarse para realizar disgregación o resuspensión de células, en este caso debe utilizarse un agitador que sea capaz de mantener una temperatura de entre 37 y 39°C (ver figura 1.12).

Recomendaciones de uso:

- Mantener magnetos estériles de varios tamaños.
- Chequear la temperatura y la velocidad antes de poner el medio o las células sobre la plancha caliente.

Potenciómetro

Este equipo se utiliza para medir el potencial de hidrógeno, o pH, de una sustancia (ver figura 1.13), y la escala de medición va desde 0 a 14. Para la mayoría de las células, el pH óptimo está entre 6,6 y 7,4; en el caso de los embriones y las células de la granulosa, el pH debe estar entre 7,3 y 7,4.



Figura 1.13. Potenciómetro.

Recomendaciones de uso:

- Estandarizar la curva de pH diariamente, utilizando por lo menos dos referentes comerciales (usualmente se utilizan pH 4, pH 7 y pH 10).
- Lavar con abundante agua destilada la parte inferior del electrodo de pH, antes y después de introducirlo en una muestra. Los electrodos nunca se deben limpiar con toallas ni otros objetos, ni se debe tocar su punta.
- El electrodo siempre debe conservarse inmerso en una solución de KCl 3M.

Equipos para lavado y esterilización de material

Autoclave



Figura 1.14. Autoclave

La autoclave es un instrumento que permite la esterilización por calor húmedo (ver figura 1.14). Usualmente se utiliza para esterilizar objetos de vidrio, metal y plástico (puntas, filtros y otros no sensibles a esta temperatura). La esterilización se realiza habitualmente a 121°C, a 1 atmósfera de sobrepresión, durante un tiempo de entre 20 a 30 minutos.

Recomendaciones de uso:

Colocar cinta sensible a la presión, pues esta ayuda a identificar el material ya esterilizado.

- El material al interior de la autoclave debe quedar con espacios para permitir el flujo de vapor caliente.
- La válvula se debe mantener abierta por lo menos diez minutos después de encendida la autoclave, para permitir que el vapor frío no cree presión interna. Posteriormente, la válvula se pone en posición horizontal.
- Mantener en observación periódicamente, mientras el equipo está encendido, hasta que la aguja del manómetro indique la presión de esterilización.
- Nunca abrir la autoclave a la fuerza; se debe esperar a que el equipo disminuya su temperatura después de la esterilización, para evitar quemaduras del operario.
- Secar el equipo y dejar la autoclave destapado para permitir evitar su deterioro.



Figura 1.15. Horno convencional

Horno

El horno es un equipo con circulación de aire caliente que permite secar rápidamente el material esterilizado. Se puede utilizar un horno convencional (ver figura 1.15), o bien un horno microondas.

Recomendaciones de uso del horno convencional:

- Determinar adecuadamente la temperatura de secado, generalmente no debe ser superior a 90°C.
- Los materiales deben disponerse en el interior del horno dejando espacio, de tal manera que se permita el flujo de aire entre ellos.
- Recomendaciones de uso del horno microondas:
Tener presente que en este horno no se pueden introducir objetos metálicos.

Realizar diez ciclos de 30 segundos cada uno, con intervalos de diez minutos entre ciclo y ciclo para evitar que se quemé el material.

Durante el periodo de esterilización no se debe abrir la puerta del microondas para evitar contaminación.



Figura 1.16. Termo de nitrógeno líquido.

Equipos auxiliares

Termo de nitrógeno

El termo de nitrógeno es un recipiente que consta de un tanque externo metálico que sirve de protector, en cuyo interior se encuentra otro tanque, que contiene el nitrógeno líquido a -196°C. Entre el tanque interno y el externo existe un espacio sin aire que contiene un material aislante. El cuello del tanque se tapa sin hermetismo para permitir la salida de los vapores de nitrógeno (Trujillo y Henao, 2000) (ver figura 1.16).

El nitrógeno es un gas incoloro, inodoro e insípido. Es apenas soluble en agua. En el termo de nitrógeno se almacena el semen para la fertilización *in vitro*, así como embriones y células congeladas para cultivos celulares y cocultivo de embriones.

Recomendaciones de uso:

- Guardar y usar el nitrógeno líquido únicamente en lugares frescos y ventilados, ya que si se evapora suficiente gas del líquido en un ambiente cerrado, el porcentaje de oxígeno puede llegar a ser tóxico.
- Evitar todo contacto con la piel. Como medida de precaución, se deben emplear guantes y, en lo posible, máscaras de protección facial, ya que la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C) puede ocasionar quemaduras en la piel.
- Si por algún motivo no se localiza la muestra requerida o no se puede extraer, se debe bajar la canastilla que hay en el interior del termo y esperar 15 segundos para que esta se enfríe nuevamente y se pueda repetir la operación.
- Las pajillas y los crioviales que no van a ser utilizados no se deben exponer a cambios continuos de temperatura, ya que esto reduce la viabilidad de las células.
- Elaborar un registro semanal del nivel de nitrógeno en el termo. Nunca se debe permitir que el nitrógeno descienda por debajo de su nivel mínimo ya que la conservación de la viabilidad de las células en el termo depende de la constancia de la temperatura de almacenamiento.
- Marcar correctamente las canastillas y escalerillas para facilitar la búsqueda de las muestras; es importante llevar un inventario y no cambiar las canastillas de su sitio o traspasarlas a otro termo.



Figura 1.17. Baño serológico

Baños serológicos y otros dispositivos de calefacción

Son dispositivos que permiten calentar las muestras de forma indirecta, mediante su suspensión en agua atemperada. La temperatura del agua se controla mediante un sensor y un programador (ver figura 1.17)

Los principales riesgos que pueden presentarse al usar este tipo de equipos son: quemaduras, rotura de recipientes de vidrio, derrames, generación de calor y humedad ambiental y contacto eléctrico indirecto por envejecimiento del material.

Medidas preventivas:

- Asegurar el equipo con ayuda de soportes.
- Disponer de un termostato de seguridad para limitar la temperatura.
- No llenar completamente el equipo con agua.



- No introducir recipientes de vidrio ordinario, pues este no soporta la temperatura o puede presentar filtraciones.



Figura 1.18. Micropipetas de diferentes volúmenes.

Micropipetas

Una micropipeta permite tomar con exactitud volúmenes pequeños de sustancias líquidas. Posee puntas específicas para cada volumen, las cuales son descartables entre cada medición (ver figura 1.18). La micropipeta ideal es la que más se acerca al volumen que se necesita (es decir, si requiere un volumen de 40 μl es preferible pipetear con la micropipeta de 5-50 μl que con una de 10-100 μl).

Recomendaciones de uso:

- No exceder nunca la capacidad de volumen de la micropipeta.
- No sacar nunca la micropipeta antes de subir todo el émbolo, y asegurarse de que en la punta no se formen burbujas, de lo contrario, se deberá pipetear nuevamente.
- Guardar la micropipeta en el volumen máximo de su rango, para evitar que se descalibre.
- Limpiarla con cuidado, tratar de no golpearla y ubicarla en el soporte de la manera indicada.
- Evitar que el líquido entre en contacto con la micropipeta.
- Realizar mantenimiento de las pipetas al menos cada 6 meses.

Vórtex

Los vórtex son instrumentos que permiten mezclar soluciones mediante un dispositivo que gira en un solo punto, a determinadas revoluciones por minuto. Para su uso se debe tener en cuenta no apoyar en exceso el tubo o elemento que está agitando, pues esto, sumado al movimiento normal del equipo, genera un desgaste rápido de la parte mecánica del equipo. Además, aunque el equipo esté en velocidad cero, es recomendable dejarlo apagado, ya que aun así consume energía (ver figura 1.19).



Figura 1.19. Vórtex.

Equipos usados en biología molecular



Figura 1.20. Termociclador.

Termociclador PTC 200

Es un equipo que permite realizar los ciclos de temperatura necesarios para amplificar el ADN (ver figura 1.20). Este dispositivo viene equipado con bloques, en los cuales se ubican los tubos de PCR; cada uno de ellos consta de espacio para 96 tubos aproximadamente y una tapa con rueda para asegurarlos.

Panel de control: Se encuentra en la parte frontal del termociclador. Este panel contiene los controles necesarios para programar los ciclos para la amplificación.

Recomendaciones de uso:

- Antes de utilizar el termociclador, asegurarse de que el bloque no esté en uso.
- Usar el termociclador con la tapa caliente para evitar la condensación en la parte superior del tubo que contiene la muestra.
- Al introducir los tubos en el termociclador, hacerlo con guantes para evitar contaminaciones.

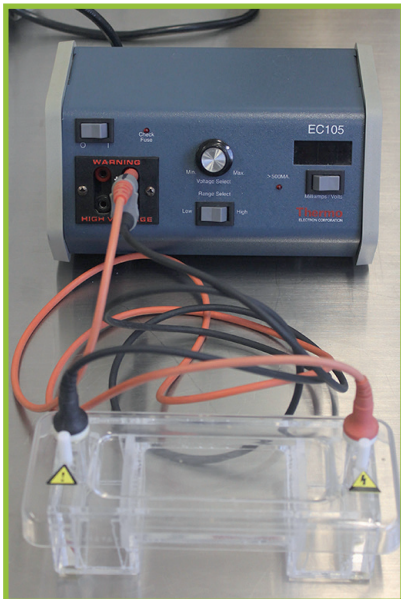


Figura 1.21. Cámara de electroforesis

Cámara de electroforesis

Equipo que permite determinar el peso molecular de productos de PCR o moléculas grandes de DNA (ver figura 1.21).

Recomendaciones de uso:

- Al conectar los electrodos, conectar negro con negro y rojo con rojo.
- Observar si al conectar los electrodos hay presencia de burbujas; estas indican que la cámara quedó correctamente conectada.
- Terminado el corrido, vaciar el buffer de corrido y guardarlo para una próxima electroforesis.
- Verificar que el voltaje de trabajo del equipo sea el indicado de acuerdo al protocolo de proceso que se esté realizando.

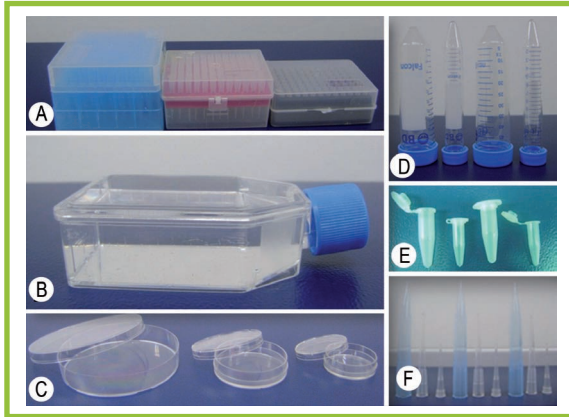


Figura 1.22. Materiales de uso frecuente en un laboratorio de cultivo de células y embriones. A: gradilla de micropuntas, B: botellas de cultivo, C: cajas de Petri, D: tubos cónicos, E: microtubos cónicos, F: micropuntas (tips).

Materiales

Los materiales más comúnmente utilizados en un laboratorio de cultivo de células son de plástico, preferiblemente de poliestireno. En la mayoría de los casos, dichos materiales se utilizan una sola vez. En caso de poderse reutilizar, se deben lavar con un protocolo que garantice que después de completarlo el material quede totalmente limpio y libre de agentes biológicos o químicos que puedan afectar los cultivos (ver figura 1.22).

Preparación de filtros autoclavables

- **Propósito:** Indicar la forma adecuada para preparar filtros utilizados como método de esterilización de medios de cultivo para células y embriones *in vitro*.
- **Materiales:** Filtros autoclavables, membranas de 0,2 μm , caja de Petri de 60 mm.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, pinzas estériles.
- **Medios:** Agua destilada desionizada estéril.



Figura 1.23 Partes de un filtro autoclavable. 1) Cuerpo, 2) tapa de cierre, 3) empaque, 4) soporte de la membrana, 5) tapa de la membrana.

Procedimiento:

Una vez los filtros hayan sido sometidos al proceso de lavado, desinfección y secado, se debe realizar el siguiente procedimiento en la cabina de flujo laminar, utilizando guantes:

- Distribuir las partes del filtro en la cabina (ver figura 1.23).
- Verter 6 ml de agua destilada desionizada estéril en una caja de Petri de 60 mm y colocar allí la membrana de 0,2 μm para que se hidrate.
- Colocar el empaque en la ranura de la tapa para la membrana, ejerciendo presión (ver figura 1.24 – recuadro 1).

- d) El soporte para la membrana presenta dos lados: identificar la rejilla y colocarla sobre el cuerpo del filtro hacia arriba (ver figuras 1.24 – recuadros 2 y 3).
- e) Con las pinzas, colocar la membrana hidratada sobre el soporte y ubicarla en el centro, teniendo cuidado para no romperla (ver figuras 1.24 – recuadros 4 y 5).
- f) Colocar la tapa de la membrana previamente ensamblada con el empaque sobre la membrana, ejerciendo presión suave y asegurándose de que las guías se ubiquen en las ranuras del cuerpo (ver figuras 1.24 – recuadros 6 y 7).
- g) Colocar la tapa de cierre sobre el cuerpo y ajustar bien (ver figuras 1.24 – recuadros 8 y 9).
- h) Empacar los filtros en papel craft y llevarlos a ciclo de esterilización en autoclave (ver figura 1.24 – recuadro 10).

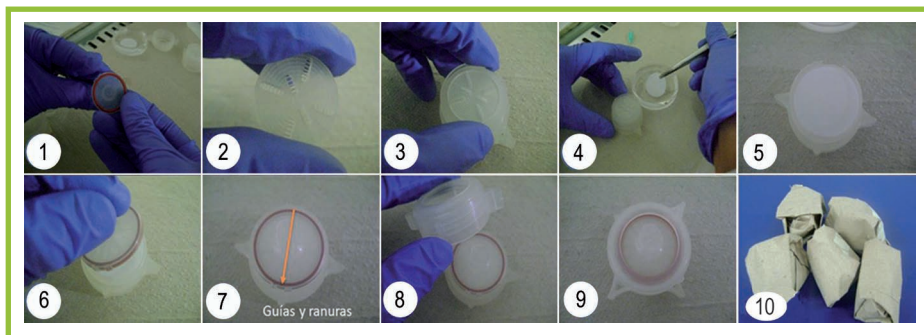


Figura 1.24. Preparación de filtros autoclavables.

Anexo 1. Manipulación segura de reactivos

La adecuada manipulación de los reactivos y su correcto almacenamiento disminuyen las posibilidades de accidentes comunes en un laboratorio, como derrame de líquidos, rompimiento de envases, entre otros. Es importante siempre revisar la etiqueta del producto para identificar el riesgo que puede generar a la salud, su reactividad con otras sustancias, la forma adecuada de almacenarse y la manera de proceder ante un incidente inesperado con determinado químico o reactivo. Existen dos sistemas de clasificación importantes, que se pueden implementar adecuadamente en la mayoría de los laboratorios de investigación. El primer sistema de clasificación es el de las Naciones Unidas (UN), conocido como el *Libro Naranja*, en el cual las sustancias químicas están clasificadas en nueve categorías, que a su vez se pueden dividir en subcategorías o subclases (ver figura 1.25). El segundo sistema de clasificación es el de la NFPA (National Fire Protection Association), conocido comúnmente como Norma NFPA 704, y que se representa por un diamante de fuego (ver figura 1.25).

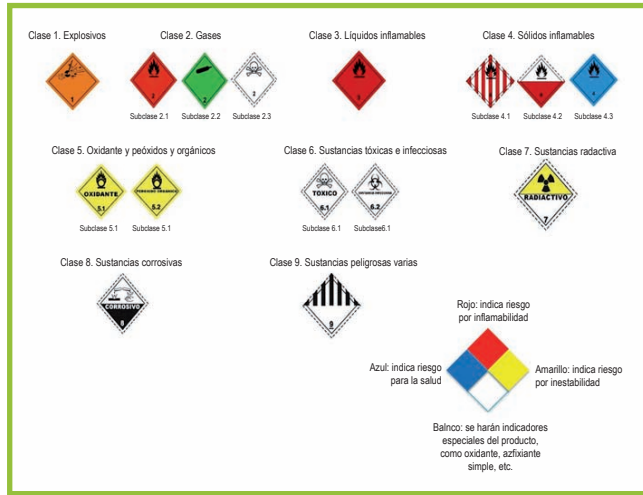


Figura 1.25. Sistemas de clasificación de las Naciones Unidas y la Asociación Nacional para la Prevención del Fuego (NFPA).

En el sistema de clasificación de la NFPA (Norma NFPA 704), cada color tiene un significado especial dentro del rombo. Adicionalmente, los primeros tres colores: azul, rojo y amarillo cuentan con una escala numérica entre 0 y 4, indicando el grado de peligrosidad de la sustancia química, siendo 0 el de menor riesgo y 4 el de mayor riesgo. El color blanco es un espacio para consideraciones especiales del reactivo, por ejemplo, si reacciona al contacto con el agua o con el aire.



Figura 1.26. Pictograma Merck

Con estos sistemas de clasificación de sustancias químicas se elaboran tablas que permiten determinar cómo almacenar correctamente los reactivos. La tabla o guía de mayor uso es la de los pictogramas de Merck (ver figura 1.26), que indica de forma gráfica y sencilla cuáles reactivos pueden o no almacenarse

juntos. Por ejemplo, los inflamables pueden ser almacenados en el mismo estante, pero no deben guardarse junto a los explosivos, comburentes o peligrosos.

Nota: Se aconseja almacenar las sustancias inflamables en la parte inferior de los estantes, en lugares frescos, en envases color ámbar y alejados del calor y del sol. Las sales deben ser almacenadas en lugares frescos y libres de humedad. El estante de los reactivos debe ubicarse en un lugar lejos de equipos que generen vibración, calor o que puedan afectar la calidad de los reactivos, o viceversa.

Anexo 2

Técnica de higiene de las manos

Para laboratorio de cultivos celulares y embriones
Grupo de investigación Biogénesis



Tiempo estimado de 40" a 60"



1
Humedezca las manos con agua



2
Aplique suficiente jabón para cubrir toda la superficie



3
Frótese sus manos palma contra palma



4
Frótese la palma de la mano derecha contra el dorso de la mano izquierda y viceversa.



5
Frótese las palmas de las manos entre sí con los dedos entrelazados



6
Frótese el dorso de los dedos de una mano con la palma de la mano opuesta



7
Frótese con movimiento de rotación ambos pulgares



8
Frótese la punta de los dedos en forma circular contra la palma de la otra mano y viceversa



9
Frótese cada muñeca con la mano opuesta



10
Enjuague con abundante agua



11
Séquelas con una toalla de un solo uso



12
20" a 30" de secado y sus manos son seguras



Realizado según directrices de la Organización Mundial de la Salud



Anexo 3. Indumentaria

Para trabajo en el laboratorio

En todos los procedimientos en un laboratorio de producción de embriones *in vitro* y cultivo de tejidos reproductivos es necesario utilizar una bata blanca de manga larga, polainas o zapatos especiales para laboratorio, gorro y tapabocas. Todas estas medidas son necesarias para evitar contaminaciones en los cultivos.

Cuando se va a llevar a cabo la preparación de fluorocromos o se va a trabajar con estos, es necesario usar guantes y tapabocas en todo momento, ya que todos son potencialmente carcinogénicos. Además, se deben manipular sin exponerlos a la luz directa porque son altamente sensibles a esta. Los fluorocromos se almacenan en alícuotas y se envuelven en papel aluminio para evitar la exposición a la luz.

Para colección de muestras en la planta de beneficio

Para recolectar material biológico en la planta de beneficio se deben utilizar los siguientes elementos:

- Overol de manga larga blanco
- Gorro
- Casco blanco
- Botas de caña alta blancas
- Guantes de nitrilo



Bibliografía recomendada

- Freshney, R.I. (2005), *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 5ª ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Montoya, H. (2000), *Microbiología básica para el área de la salud y afines*, Medellín: Editorial Universidad de Antioquia.
- NFPA (2002), *National Fire Codes, NFPA 704*, Edición electrónica.
- Servicio Nacional de Aprendizaje, SENA (2010). Manipulación segura de sustancias químicas. Documento de estudio para curso virtual.
- Trujillo, L.E y Henao, G. (1987), Normas para el manejo de termos de almacenamiento de semen. *Despertar Lechero*. Colanta. Vol. 2, pp. 64-72.

