



Active Gains in brain Using Exercise During Aging

# Protocolos del proyecto AGUEDA

## Capítulo 11: Muestras biológicas



Promoting Fitness & Health  
through Physical Activity



UNIVERSIDAD  
DE GRANADA

# Índice

<b>11.1 Muestras biológicas. Recogida muestra de heces .....</b>	<b>2</b>
<b>11.2 Muestras biológicas. Recogida muestra de saliva .....</b>	<b>7</b>
<b>11.3 Muestras biológicas. Extracciones sanguíneas .....</b>	<b>12</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>27</b>

## Capítulo 11.1. Recogida muestras de heces

### Índice

<b>1. Introducción .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Material necesario .....</b>	<b>3</b>
<b>3. Procedimiento previo a prueba .....</b>	<b>4</b>
<b>4. Procedimiento día de prueba.....</b>	<b>4</b>
<b>5. Procedimiento posterior a prueba.....</b>	<b>4</b>
<b>5.1. Recogida-entrega de muestras .....</b>	<b>4</b>
<b>5.2. Almacenamiento de información.....</b>	<b>4</b>
<b>6. Índice de anexos .....</b>	<b>5</b>

## 1. Introducción

Evidencia reciente sugiere una interacción entre la microbiota intestinal y la homeostasis cerebral, y las posibles implicaciones posteriores de la interrupción de la microbiota intestinal en la patogénesis de las enfermedades cerebrales (Cryan et al., 2019). Uno de los objetivos planteados en el estudio AGUEDA será el de investigar los efectos que tiene un programa de ejercicio realizado durante 6 meses en la microbiota intestinal y oral, así como examinar si los cambios producidos en microbiota (intestinal y bucal) median los cambios en niveles de beta amiloide cerebral. Para ello obtendremos muestras de heces y saliva. Las muestras de heces serán recolectadas entre la sesión 1 y 2 de evaluación, ambas realizadas en el iMUDS. Al finalizar la sesión 1 será entregado todo el material necesario para la obtención de las muestras fecales a los participantes y en la sesión 2 se recogerán dichas muestras. La recolección de las muestras de saliva se realizará en la sesión 4 de evaluación, junto con la extracción sanguínea antes de realizar la prueba PET, y se explica en extenso en el capítulo **11.3 Extracción de saliva**. Las muestras de heces se tomarán en dos puntos temporales: al inicio (T1), y después de los 6 meses de intervención (T6).

## 2. Material necesario

El material necesario para esta prueba está situado en el laboratorio de fisioterapia del IMUDS, concretamente en los armarios inferiores:

- Kit de heces (ver Figura 1), el cual estará compuesto por los siguientes instrumentos:
  1. Orinal de cartón para depositar las heces
  2. Espátula para cortar un fragmento de las heces
  3. Guantes
  4. Bote esterilizado de 60 ml
  5. Placa de congelación
  6. Nevera isotérmica
  7. Instrucciones para la recogida de heces



Figura 1. Kit de recogida de heces

- Rotuladores

### 3. Procedimiento previo a prueba

La persona encargada de la prueba deberá preparar tantos “kit de heces” como participantes acudan durante esa mañana a las evaluaciones, en función de la organización y cálculos del equipo investigador. Esta persona se tendrá que asegurar que todos los kits contengan todo el material que aparece en el apartado anterior.

Además, esta persona se encargará de rotular en los botes que se incluyen en cada kit de heces el **“ID del participante y el momento temporal”** con la nomenclatura adecuada (ej. Para pre-intervención 101\_1/ para post-intervención 101\_6, en el caso del participante 101), al que será entregado dicho kit. Para ello, utilizará un rotulador permanente y deberá ponerse guantes para evitar poder contaminar cualquier material contenido en el kit del participante.

### 4. Procedimiento día de la prueba

La recolección de heces será realizada por los propios participantes en su casa, por ello, solo deberán de tenerse en cuenta que estos entiendan las instrucciones (Anexo 11.1.1 Instrucciones\_recogida\_heces) a la perfección para que las sigan sin errores.

Estas instrucciones serán entregadas por escrito junto con el kit de recogida correspondiente en la sesión 1 de evaluación. Además, para asegurarnos que siempre tengan acceso a las instrucciones, éstas serán enviadas el día que estos realicen la sesión 1 de evaluación a través de un mensaje WhatsApp. Una vez entregado estos materiales, se debe registrar la información en REDCAP en el formulario “Microbiota Pre”.

### 5. Procedimiento posterior a prueba

#### 5.1. Recogida-entrega de muestras

Las muestras serán entregadas por los participantes en el iMUDS el día de evaluación que corresponde a la sesión 2 en la toma de datos. Cuando la muestra del participante sea entregada, la persona encargada de recibir las muestras verificará la correspondencia de **“ID y momento temporal** (e.g., 100\_1 o 100\_6) que está detallado en el bote, con el ID del participante; y deberá de **rotular** el bote el ID y el tiempo. **Antes de introducir el bote en el congelador, ES NECESARIO REALIZAR LAS PREGUNTAS SOBRE MICROBIOTA, en la plataforma REDCAP**

Posteriormente, las muestras **se almacenarán en el congelador a -80°C, en la caja situada en la mitad del compartimento**, situado en la planta baja del iMUDS, hasta que sean analizadas.

#### 5.2. Almacenamiento de información

Puesto que no se realizarán los análisis de forma inmediata y no habrá datos específicos que podamos obtener tras la recogida las muestras. Lo datos que se deben introducir posteriormente será la información de cumplimiento de

condiciones previas y fecha de recepción en la plataforma REDCAP. Estos datos se deben registrar en el formulario “**Microbiota**”

## 6. Índice de anexos

- Anexo 11.1.1. Instrucciones\_recogida\_heces

### Instrucciones para recogida de heces

Lee detenidamente las instrucciones que aparecen a continuación con el fin de que pueda realizar la recogida de una muestra de heces de manera adecuada.

Deberás recoger una muestra en una deposición **del día anterior o de la misma mañana de la prueba** según las indicaciones ofrecidas a continuación:

- Utiliza guantes durante el proceso de preparación de la muestra.
- Muy importante, **evita la presencia de orina** en la muestra de heces, porque las deteriora. Por esta razón, por favor, trata de orinar en el váter y después **defecar en el orinal de cartón facilitado**.
- **Mezcla** la deposición con ayuda de la **espátula de madera** facilitada.
- **Introduzca una muestra de la deposición** con ayuda de la espátula en el recipiente estéril de plástico de boca ancha y con tapón de rosca que te ha sido facilitado previamente, tomando de referencia las siguientes cantidades y sin llenar demasiado el recipiente:
  - Si las **heces son consistentes**, bastará con un volumen **similar al de una avellana**.
  - Si las **heces son diarreicas**, debe poner unos 20 ml, aproximadamente medio bote.
- **Cierra el bote correctamente** y **guárdalo en el congelador**, junto con el bloque de frío, hasta el momento de llevarlas al centro de investigación.
- El **día de la entrega**, introduzca el **bote de heces** junto con el **bloque de frío dentro de la nevera portátil** para que mantenga sus propiedades
- **Entrégueselo** a la persona responsable **al llegar al centro de investigación**, junto con esta hoja de información.
- Anote **a continuación el día y la hora de la deposición: (Esta información se rellena en REDCAP)**

A RELLENAR POR EL PARTICIPANTE		
Fecha de deposición	Hora deposición	Observaciones
<div> <div>□□</div> <div>□□</div> <div>□□</div> </div> <div> DÍA      MES      AÑO </div>	<div> <div>□□</div> <div>:</div> <div>□□</div> </div> <div> HORAS      MINUTOS </div>	
¿ Ha mantenido su patrón de alimentación habitual <b>las 24 h anteriores</b> a la deposición?	<input type="checkbox"/> No → Anote las variaciones: <input type="checkbox"/> Si	
¿ Ha realizado actividad física intensa <b>las 24 h anteriores</b> a la deposición?	<input type="checkbox"/> Sí → Anote la actividad realizada: <input type="checkbox"/> No	
A RELLENAR POR EL INVESTIGADOR		
Fecha de recogida	Hora de recogida	Observaciones
<div> <div>□□</div> <div>□□</div> <div>□□</div> </div> <div> DÍA      MES      AÑO </div>	<div> <div>□□</div> <div>:</div> <div>□□</div> </div> <div> HORAS      MINUTOS </div>	

Para preguntas no abordadas en estas instrucciones, llame al equipo AGUEDA.



## Capítulo 11.2. Recogida muestras de saliva

### Índice

1. Introducción .....	8
2. Material necesario .....	8
3. Condiciones previas a la prueba.....	9
3.2. Preparación de materiales.....	9
4. Procedimiento día de prueba.....	9
4.1. Instrucciones para obtener la muestra de saliva: .....	10
4.2. Procesamiento de las muestras .....	10
4.3. Transporte de las muestras .....	10
4.4. Almacenamiento de las muestras .....	10
5. Procedimiento post prueba .....	10



## 1. Introducción

Uno de los objetivos planteados en el estudio AGUEDA será investigar los efectos que tiene un programa de ejercicio realizado durante 6 meses en biomarcadores de saliva, así como examinar si los cambios en dichos marcadores median los cambios cerebrales a nivel estructural y funcional. Para ello, prioritariamente se realizará la extracción de saliva en la sesión 4 de evaluación (en la que también se realiza la prueba PET; ver **Capítulo 17. Análisis de PET**). Con este capítulo se quiere garantizar la correcta extracción, procesamiento, envío y almacenamiento central de las muestras de saliva. Si estas muestras no se recogen, procesan, manejan o almacenan correctamente, las extracciones realizadas pueden verse en peligro y considerarse inválidas. Las extracciones de saliva se realizarán en dos puntos temporales: al inicio (T1) y después de los 6 meses de intervención (T6).

La extracción de saliva tendrá lugar en una sala del Hospital Virgen de las Nieves o en el IMUDS, habilitada para tal uso y será llevada a cabo por un investigador/a y/o odontólogo/a asociado del proyecto.

## 2. Material necesario



Tubos BD Falcon de 15 mL de polipirileno



Etiquetas de impresora ZEBRA



Bolígrafos y rotuladores para etiquetado



Eppendorfs de 1.5 mL



Pipeta de 1 mL



Puntas para pipeta



Gradilla 9x9 para eppendorfs



Gradilla para tubos



Centrifugadora



Bata de laboratorio



Congelador -80°C

### 3. Procedimiento previo a la prueba

Los participantes deben cumplir las condiciones previas descritas en el **Anexo 2.6. Condiciones previas Sesión4**, las cuales se les entregará de forma física en la sesión 3 y se recordarán por WhatsApp a lo largo de la semana de prueba.

#### 3.2. Preparación de materiales

La persona encargada de la prueba deberá preparar tantos tubos falcon como participantes acudan durante esa mañana a las evaluaciones (preparar alguno de repuesto) y 3 eppendorf por cada participante, en función de la organización y cálculos del equipo investigador. El número de participantes puede variar dependiendo de si la evaluación se realiza el día de sangre o en el PET. Esta persona tendrá que asegurar que todo el material se encuentra disponible para la prueba. Además, esta persona se encargará de imprimir/rotular las etiquetas que se pegarán en los eppendorf del participante en el formato “ID del participante, el momento temporal y el número del eppendorf (1,2 o 3)” con la nomenclatura adecuada (ej. Para pre- intervención 100\_1\_X/ para post-intervención 100\_6\_X). Para ello, utilizará un rotulador permanente y deberá ponerse guantes para evitar poder contaminar cualquier material contenido en el kit del participante.

### 4. Procedimiento día de prueba

La persona encargada de realizar las extracciones de muestras de saliva tendrá habilitada una sala del Hospital Virgen de las Nieves.

1. Antes de la recogida, el investigadrx deberá tener los tubos etiquetados y el material necesario listo en el laboratorio.
2. Los tubos deberán estar colocados en el orden por el que serán utilizados.
3. Cada recogida de saliva requerirá que la persona encargada tenga la Check-list del proyecto AGUEDA, para asegurarnos que se realizan de forma correcta.
4. Será recogido 1 tubo de saliva por participante.
5. El total de saliva recolectado en cada momento temporal será de aproximadamente 3 ml, solo contando con el líquido y no con la espuma.

6. El lugar donde se realizará la recogida de muestra bucal deberá estar limpio y desinfectado después de cada uso.
7. Los contenedores para los restos biológicos deben estar situados en la misma sala para poder tirar los restos y puntillas.

#### **4.1. Instrucciones para obtener la muestra de saliva:**

Se le pide al sujeto que deje que la saliva se acumule en la boca durante al menos 1 minuto (Jo et al., 2019). Luego se le pide al sujeto que babe en el tubo de recolección de 15 ml etiquetado (Falcon, tubo de polipropileno cónico estéril con tapón de rosca plano). Este proceso puede ser repetido varias veces para recolectar grandes volúmenes de saliva (2-5 ml).

#### **4.2. Procesamiento de las muestras**

1. Coloque el falcon con la muestra del participante en una gradilla de plástico y manténgalo a 4°C. Cuando haya un volumen de tubos recogidos, pasarlos por la centrifugadora para diferenciar la muestra de saliva de posibles restos sólidos.

2. Los valores a introducir en la centrifugadora son los siguientes:

RCF → 1600,

Tiempo → 10 minutos,

Temperatura → ambiente o 4°

3. Una vez centrifugada la muestra, el contenido de la misma debe ser repartida en 3 eppendorf. **Cada alícuota tiene que ser de 0.5 mL.** Una vez rellenados los tres eppendorf, guardarlos en la gradilla correspondiente a 4°C.

#### **4.3. Transporte de las muestras**

La gradilla con todas las muestras de ese día se transportará mediante el investigadrx a cargo vía metro/coche hasta el IMUDS, manteniendo las muestras lo más aisladas posibles.






#### **4.4. Almacenamiento de las muestras**

Las muestras obtenidas del día de recogida se almacenarán en el congelador de -80°C en la gradilla correspondiente.

### **5. Procedimiento post prueba**

Una vez finalizado todo el proceso de recogida, transporte y almacenamiento de las muestras nos redirigiremos a la plataforma REDCAP. Dentro de REDCAP seleccionaremos el participante del que deseamos introducir datos y nos dirigiremos al instrumento “*blood and saliva sample*”

A continuación, para confirmar que el/la participante ha completado la prueba de saliva, introduciremos la fecha en el siguiente apartado y **daremos por finalizado el proceso.**

Date of Blood Collection	<input type="text"/>  Today D-M-Y
Date of Saliva Collection	<input type="text"/>  Today D-M-Y
Was Blood Draw Attempted?	<input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No
Arrival time of blood to lab	<input type="text"/>  Now D-M-Y H:M
Time of the last (Yellow serum) sample carried to freezer (-80)	<input type="text"/>  Now D-M-Y H:M
Sample position in box of freezer	<input type="text"/>
Were the data received from the hospital?	<input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No
How many defrosting cycles?	<input type="text"/> 

## Capítulo 11.3. Extracciones sanguíneas

### Índice

<b>1. Introducción .....</b>	<b>13</b>
<b>2. Material necesario .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1. Material para extracción.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2. Material para el alicuotado .....</b>	<b>14</b>
<b>3. Procedimiento previo a prueba .....</b>	<b>14</b>
<b>4. Procedimiento día de prueba.....</b>	<b>14</b>
<b>5. Procedimiento posterior a prueba.....</b>	<b>14</b>
<b>5.1. Centrifugado.....</b>	<b>14</b>
<b>5.2. Alicuotado .....</b>	<b>15</b>
<b>5.3. Almacenamiento.....</b>	<b>15</b>
<b>6. Índice de Anexos .....</b>	<b>15</b>

## 1. Introducción

Uno de los objetivos planteados en el estudio AGUEDA es investigar los efectos que tiene un programa de ejercicio realizado durante 6 meses en biomarcadores sanguíneos, así como examinar si los cambios en dichos marcadores median los cambios cerebrales a nivel estructural y funcional. Para ello se realizará la extracción de sangre en la sesión 4 de evaluación (en la que también se podría realizar la prueba PET; ver **Capítulo 18. Análisis de PET**). Con este capítulo se quiere garantizar la correcta extracción, procesamiento, envío y almacenamiento central de las muestras de sangre. Si estas muestras no se recogen, procesan, manejan o almacenan correctamente, las extracciones realizadas pueden verse en peligro y considerarse inválidas. Las extracciones de sangre se realizarán en tres puntos temporales: al inicio (T1), a los 3 meses de intervención (T3) y después de los 6 meses de intervención (T6).

La extracción sanguínea tendrá lugar en una sala del Hospital Virgen de las Nieves, habilitada para tal uso y será llevada a cabo por una enfermera. Es imperativo seguir estrictamente el protocolo de rotulado, centrifugado y alicuotado para asegurar que todas las muestras reciben un tratamiento similar, asegurar un transporte y conservación óptimo de las mismas.

## 2. Material necesario

### 2.1. Material para extracción

- Guantes
- Rotuladores permanentes y bolígrafos
- Bata de laboratorio
- En caso de necesitar algún vacutainer adicional específico, estos son los que serán usados (ver Figura 1):
  - Vacutainers amarillos: SUERO, volumen 5mL. Al menos 1 caja de vacutainers amarillos disponibles.
  - Vacutainers morados: EDTA K3, volumen 4mL. Al menos 1 caja de vacutainers morados disponible.
  - Vacutainers azules: CITRATO, volumen 4.5mL. Al menos 1 caja de vacutainers azules disponibles.
  - Eppendorf AM7022, solución de estabilización RNA-later, volumen 1.5mL. Al menos 1 caja de 50 disponible.



Figura 2. Vacutainers necesario para el proyecto AGUEDA

## 2.2. Material para el alicuotado

- Tubos Eppendorfs de 1,5 mL ya rotulados.
- Pipetas de 200 y 1000 uL (sólo las habilitadas para sangre y tejidos).
- Cajas de puntas de 200 uL: una bolsa completa de puntas extra.
- Cajas de puntas de 1000 uL: una bolsa completa de puntas extra.
- Gradilla para tubos de sangre para almacenamiento en cámara fría/frigorífico/congelador.
- Cajas para los tubos Eppendorf: cajas de plástico del proyecto, con el número de caja en cada caso (Caja 1, 2...) que se encuentran dentro del congelador. Será necesario tener abierto el documento “gestión de muestras de sangre” que se encuentra en la carpeta 11.3. Muestras de sangre para ver en qué posición se encuentra cada caja.

## 3. Procedimiento previo a prueba

Los participantes deben cumplir las condiciones previas descritas en el **Anexo 2.5. Condiciones previas Sesión 4** las cuales se les entregará de forma física en la sesión 3 y se les avisará con un mínimo de un día de antelación.

Las extracciones sanguíneas las realizará una enfermera del Hospital Virgen de las Nieves. El material necesario será el relativo al rotulado y transporte de las muestras citado en el apartado anterior.

## 4. Procedimiento día de prueba

La enfermera encargada de realizar las extracciones sanguíneas tendrá habilitada una sala en la Unidad de Medicina Nuclear del Hospital Virgen de las Nieves, y se seguirán las consideraciones citadas a continuación:

1. Antes de la extracción, la enfermera deberá tener los 11 vacutainers (3 azules, 2 amarillos, 5 morados, 1 PAXgene), y el material necesario listo.
2. Adicionalmente, la enfermera recolectará la sangre correspondiente a los análisis de rutina que se realizarán en el hospital (1 azul, 2 amarillos y 1 morado)
3. El total de sangre recolectado en cada momento temporal será de aproximadamente 50 ml.
4. El evaluador del proyecto debe completar el **Anexo 11.3 Gestión muestras de sangre**
5. **Los 10 vacutainers restantes** se procesarán en el laboratorio habilitado en el hospital y las muestras serán transportadas en condiciones óptimas de temperatura hasta el iMUDS.

## 5. Procedimiento posterior a prueba

Las muestras se realizarán en el Hospital Virgen de las Nieves y serán almacenadas en el iMUDS. De la sangre extraída de los participantes, 4 vacutainer morados, 3 azules y 2 amarillos (Después de que la sangre se haya coagulado) se centrifugarán.

### 5.1. Centrifugado

Se utilizará la centrifugadora que se encuentra en el laboratorio contiguo a las extracciones sanguíneas en la Unidad de Medicina Nuclear. Si al encenderla existe

algún problema de electricidad será necesario revisar los plomos que se encuentran en el mismo laboratorio. Si el problema persiste contactar con el responsable de ÁGUEDA en la extracción o con colaborador

La centrifugadora se colocará a 2000g a 4° y con un total de tiempo de 10 minutos para el centrifugado de los vacutainers seleccionados.

## 5.2. Alicuotado

Se deben alicuotar los **botes amarillos (suero)**, los **botes azules (plasma)** y los **botes morados (plasma)** en EPPENDORFS. Para ello, se utilizará un ordenador portátil con acceso a la carpeta compartida del proyecto para acceder al **Anexo 11.3 Gestión muestras de sangre** donde se introducirá la hora a la que los eppendorf de cada bote entran en el congelador y si alguno de ellos está hemolizado o está rellenado de forma parcial.

Para obtener una información más extensa acerca de estos procedimientos revisar los **Anexo 11.3 Procesamiento y 11.3 de vacutainers específicos**.

## 5.3. Almacenamiento

Los eppendorfs serán almacenados en uno de los congeladores del iMUDS. Cada eppendorf etiquetado tiene una ubicación dentro del congelador en una determinada caja. Para ver qué caja le corresponde según su etiqueta, revisar en el **Anexo 11.3 Gestión muestras de sangre** la ubicación de la caja en el congelador.

Para cada participante del proyecto AGUEDA, por cada momento temporal, tendremos almacenado en el congelador los siguientes ítems:

1. **40 eppendorfs básicos de 1ml.**
2. **1 vacutainer PAXgene**

Es imperativo que el Excel (**Anexo 11.3. Gestión muestras de sangre**), esté completamente **actualizado** al finalizar la prueba.

En el **Anexo 11A.3.Biomarcadores** se ven los biomarcadores elegidos para el estudio AGUEDA y es importante tenerlo en cuenta para el tratamiento posterior de las muestras. La lista de analitos anterior es una propuesta de "lista de deseos". Los ítems en esta lista pueden actualizarse, cambiarse o eliminarse dependiendo de la cantidad de sangre almacenada o de los avances científicos en el área.

## 6. Índice de Anexos

- Anexo 11.3.1. Procesamiento
- Anexo 11.3.2. Vacutainer Morado
- Anexo 11.3.3. Vacutainer Azul
- Anexo 11.3.4. Vacutainer Amarillo
- Anexo 11.3.5. Vacutainer PAXgene



### Anexo 11.3. Procesamiento muestras sanguíneas

#### Consideraciones importantes:

1. **Registre la hora** a la que los tubos de sangre llegan al laboratorio y cuando son introducidos en el congelador.
2. **Registre si alguno de los eppendorf** es una muestra parcial o se encuentra hemolizado su contenido.
3. Los tubos amarillos deben dejarse a temperatura ambiente hasta que se coagule su interior (30-45 minutos)
4. Procese la sangre de los tubos de tapa azul, morado y PAX GENE dentro de las 2 horas siguientes a la extracción de sangre.
5. Coloque un tubo morado y PAXgene en la mesa de trabajo a temperatura ambiente. ¡No en el agitador!
6. Si la centrífuga está en uso, coloque los tubos morado y en el agitador, mientras que el de tapa azul en el refrigerador.
7. El tiempo total del procesado de sangre durará aproximadamente 2 horas por participante.

#### Procesamiento vacutainers morados

##### Paso 1: Procesamiento de 4 vacutainers morados de 4 ml

1. Coloque el tubo en la centrifuga durante 10 minutos a 2000 g a 4°.
2. Mientras las muestras se centrifugan, preparar los 23 eppendorf (previamente etiquetados) en las gradillas para el posterior pipeteo.
3. Retire los tubos de la centrífuga. **NOTA: NO ALTERE LA CAPA BUFFY COAT** (la capa celular blanquecina / turbia debajo del plasma que contiene las PBMC (linfocitos y monocitos) durante este proceso.
4. Todo el material de este tubo será alicuotado de la siguiente manera:
  - a. Plasma:
    - i. Coloque alícuotas de **500 µL de plasma** en los **12 eppendorf** con etiquetas color púrpura (ej. 101\_1\_PP1, del participante 101, el tiempo 1 Purple plasma, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 6, ej. 101\_6\_PP1) y colóquelos inmediatamente en la caja para su inmediata refrigeración. La ubicación de cada eppendorf en la caja transparente quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.
  - b. Linfocitos (BUFFY COAT)
    - i. Coloque cuidadosamente en **un único eppendorf** (con etiqueta de color verde, ej. 101\_1\_PL de Purple lymphocytes) la capa de linfocitos (buffy coat) de los 4 vacutainer morados centrifugados. La ubicación de cada eppendorf en la caja transparente quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.
  - c. Eritrocitos
    - i. Coloque alícuotas de **1000 µL** de eritrocitos en los **4 eppendorf** con etiquetas color naranja (ej. 101\_1\_PE1, del participante 101,

el tiempo 1 Purple erythrocytes, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 6, ej. 101\_6\_PE1) y colóquelos inmediatamente en la caja para su inmediata refrigeración. La ubicación de cada eppendorf en la caja transparente quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.

### **Paso 3: Procesamiento del vacutainer morado de 4 ml restante. NO CENTRIFUGAR!!**

1. Coloque alícuotas de 500  $\mu$ L de sangre completa en los **6 eppendorf** con etiquetas de color rojo (ej. 101\_1\_PB1, del participante 101, el tiempo 1 Purple blood, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 6, ej. 101\_6\_PB1) y colóquelos inmediatamente en la caja para su inmediata refrigeración. La ubicación de cada eppendorf en la caja transparente quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.

### **Procesamiento vacutainers azules**

#### **Consideraciones importantes:**

1. **Registre la hora** a la que los tubos de sangre llegan al laboratorio.
2. Existirán 4 tubos azules de 2.7 ml que se utilizan para plasma.
3. Estos son los vacutainer que se procesarán en segundo lugar, posterior a los vacutainer morados.

### **Paso 1: Procesamiento de 4 vacutainers azules de 2.7 ml (plasma)**

4. Coloque el tubo en la centrifuga durante 10 minutos a 2000 g a 4°.
5. Mientras las muestras se centrifugan, preparar los **6 eppendorf** (previamente etiquetados) en las gradillas para el posterior pipeteo.
6. Retire los tubos de la centrífuga. **NOTA: NO ALTERE LA CAPA BUFFY COAT** (la capa celular blanquecina / turbia debajo del plasma que contiene las PBMC (linfocitos y monocitos) durante este proceso.
7. El material de este tubo será alícuotado de la siguiente manera:
  - d. Plasma:
    - i. Coloque alícuotas de **500  $\mu$ L de plasma en los 6 eppendorf** con etiquetas color azul (ej. 101\_1\_BP1, del participante 101, el tiempo 1 Blue plasma, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 6, ej. 101\_6\_BP1) y colóquelos inmediatamente en la caja verde para su congelación a -80°. La ubicación de cada eppendorf en la caja verde quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.

### **Procesamiento vacutainers amarillos**

#### **Consideraciones importantes:**

1. **Registre la hora** a la que los tubos de sangre llegan al laboratorio.

2. Existirán 2 tubos amarillos de 5 ml que se utilizan para suero.
3. Estos vacutainer se debe dejar reposar a temperatura ambiente durante 30-45 minutos (para permitir que el gel separador actúe).
4. Estos vacutainers se procesarán en tercer lugar, posterior al procesamiento de los vacutainer azules.

### **Paso 1: Procesamiento de 2 vacutainers amarillos de 5 ml (Suero)**

5. Coloque el tubo en la centrifuga durante 10 minutos a 2000 g a 4°.
6. Mientras las muestras se centrifugan, preparar los 10 eppendorf (previamente etiquetados) en las gradillas para el posterior pipeteo.
7. Retire los tubos de la centrífuga.
8. El material de este tubo será alicuotado de la siguiente manera:
  - a. Suero:
    - i. Coloque alícuotas de 500 µL de plasma en los 10 eppendorf con etiquetas color amarilla (ej. 101\_1\_YS1, del participante 101, el tiempo 1 yellow serum, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 6, ej. 101\_6\_YS1) y colóquelos inmediatamente en la caja (Amarilla) para su congelación a -80°. La ubicación de cada eppendorf en la caja amarilla quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.

### **Procesamiento vacutainer PAXgene**

#### **Consideraciones importantes:**

1. **Registre la hora** a la que los vacutainer llegan al laboratorio.
2. Coloque el vacutainer PAXgene en la mesa de trabajo a temperatura ambiente. ¡No en el agitador! Los tubos PAXgene deben **estar exactamente 2 horas a temperatura ambiente**.
3. Este es el último de los vacutainer que se procesará.

### **Paso 1: Procesamiento del vacutainer PAXgene: NO CENTRIFUGAR!!**

4. Pegar la etiqueta correspondiente al vacutainer del participante. Esta etiqueta será de color blanca tendrá el formato según el siguiente ejemplo:
  - e. **101\_1\_PAX**, del participante 101, el tiempo 1, PAXgene, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 6, ej. 101\_6\_PAX).
5. Coloque los tubos verticales en una rejilla de alambre (no poliestireno) en el congelador a -20°C durante 24 horas.
6. Después de 24 horas, mueva a -80° para almacenamiento. Colóquelo en la caja en el congelador -80, es una caja de espuma de polietileno (corcho) (ver figura 1). La ubicación de cada vacutainer en la caja de corcho quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.



Figura 1. Ejemplo almacenamiento vacutainer PAXgene

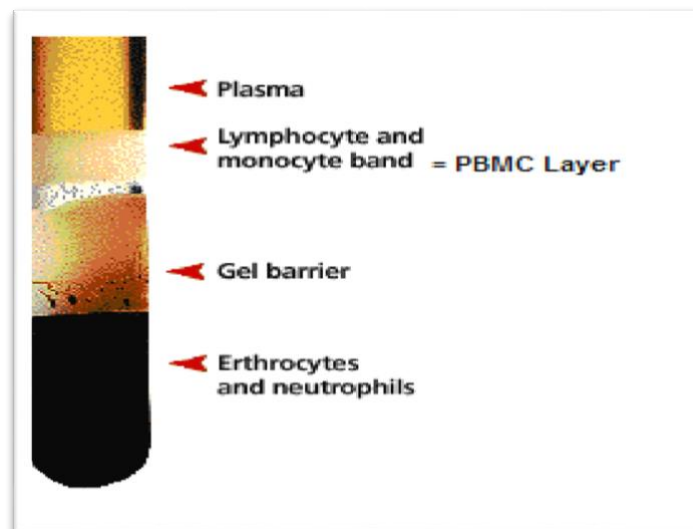


Figura 2. Ejemplo de capas del tubo azul/morado centrifugado

### Importante: problemas que pueden surgir

- **Volumen de muestra bajo:** si no hay suficiente muestra de un tipo de muestra en particular para llenar el conjunto completo de alícuotas, llene tantos eppendorf como sea posible. Si alguna alícuota es menor que el volumen especificado, anótelos como un volumen parcial (P) en el formulario de procesamiento de sangre. Además, marque la parte superior del eppendorf con una P utilizando un marcador negro.
- **Muestra hemolizada:** si algo del suero o plasma está hemolizado (de color rosa o rojo debido a la alteración de los glóbulos rojos), anótelos como muestra hemolizada (H) en el formulario de procesamiento de sangre.
- **Tiempo de procesamiento:** si, por alguna razón inesperada, el centrifugado no se realiza dentro del tiempo requerido, intente procesar las muestras lo antes posible. Tenga en cuenta el retraso en los comentarios del formulario de procesamiento de sangre.

## Procesamiento Vacutainer Morados

### Consideraciones importantes:

1. **Registre la hora** a la que los vacutainer llegan al laboratorio.
2. Existirán 5 vacutainer morados de 4 ml.
3. Estos vacutainer son los que se deberán procesar en primer lugar.

### Paso 1: Procesamiento de 4 vacutainers morados de 4 ml

7. Coloque el tubo en la centrifuga durante 10 minutos a 2000 g a 4°.
8. Mientras las muestras se centrifugan, preparar los 23 eppendorf (previamente etiquetados) en las gradillas para el posterior pipeteo.
9. Retire los tubos de la centrífuga. **NOTA: NO ALTERE LA CAPA BUFFY COAT** (la capa celular blanquecina / turbia debajo del plasma que contiene las PBMC (linfocitos y monocitos) durante este proceso.
10. Todo el material de este tubo será alicuotado de la siguiente manera:
  - a. Plasma:
    - i. Coloque alícuotas de **500 µL de plasma** en los **12 eppendorf** con etiquetas color púrpura (ej. 101\_1\_PP1, del participante 101, el tiempo 1 Purple plasma, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 6, ej. 101\_6\_PP) y colóquelos inmediatamente en la caja para su inmediata refrigeración. La ubicación de cada eppendorf en la caja transparente quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.
  - b. Linfocitos (BUFFY COAT)
    - i. Coloque cuidadosamente en **un único eppendorf** (con etiqueta de color verde, ej. 101\_1\_PL de Purple lymphocytes) la capa de linfocitos (buffy coat) de los 4 vacutainer morados centrifugados. La ubicación de cada eppendorf en la caja transparente quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.
  - c. Eritrocitos
    - i. Coloque alícuotas de **1000 µL** de eritrocitos en los **4 eppendorf** con etiquetas color naranja (ej. 101\_1\_PE1, del participante 101, el tiempo 1 Purple erythrocytes, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 6, ej. 101\_6\_PE) y colóquelos inmediatamente en la caja para su inmediata refrigeración. La ubicación de cada eppendorf en la caja transparente quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.

### Paso 3: Procesamiento del vacutainer morado de 4 ml restante. **NO CENTRIFUGAR!!**

2. Coloque alícuotas de 500 µL de sangre completa en los **6 eppendorf** con etiquetas de color rojo (ej. 101\_1\_PB, del participante 101, el tiempo 1 Purple blood, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 6, ej. 101\_6\_PB1) y colóquelos inmediatamente en la caja para su inmediata



refrigeración. La ubicación de cada eppendorf en la caja transparente quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.

**Importante: problemas que pueden surgir**

- **Volumen de muestra bajo:** si no hay suficiente muestra de un tipo de muestra en particular para llenar el conjunto completo de alícuotas, llene tantos eppendorf como sea posible. Si alguna alícuota es menor que el volumen especificado, anótelo como un volumen parcial (P). en el Excel de gestión de muestras de sangre
- **Muestra hemolizada:** si algo del suero o plasma está hemolizado (de color rosa o rojo debido a la alteración de los glóbulos rojos), anótelo como muestra hemolizada (H) en el Excel de gestión de muestras de sangre.

## Procesamiento Vacutainer Azules

### Consideraciones importantes:

1. **Registre la hora** a la que los tubos de sangre llegan al laboratorio.
2. Existirán 4 tubos azules de 2.7 ml que se utilizan para plasma.
3. Estos son los vacutainer que se procesarán en segundo lugar, posterior a los vacutainer morados.

### Paso 1: Procesamiento de 3 vacutainers azules de 2.7 ml (plasma)

11. Coloque el tubo en la centrífuga durante 10 minutos a 2000 g a 4°.
12. Mientras las muestras se centrifugan, preparar los **6 eppendorf** (previamente etiquetados) en las gradillas para el posterior pipeteo.
13. Retire los tubos de la centrífuga. **NOTA: NO ALTERE LA CAPA BUFFY COAT** (la capa celular blanquecina / turbia debajo del plasma que contiene las PBMC (linfocitos y monocitos) durante este proceso.
14. El material de este tubo será alícuotado de la siguiente manera:
  - a. Plasma:
    - i. Coloque alícuotas de **500 µL de plasma en los 6 eppendorf** con etiquetas color azul (ej. 101\_1\_BP1, del participante 101, el tiempo 1 Blue plasma, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 6, ej. 101\_6\_BP) y colóquelos inmediatamente en la caja verde para su congelación a -80°. La ubicación de cada eppendorf en la caja verde quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.

### Importante: problemas que pueden surgir

- **Volumen de muestra bajo:** si no hay suficiente muestra de un tipo de muestra en particular para llenar el conjunto completo de alícuotas, llene tantos eppendorf como sea posible. Si alguna alícuota es menor que el volumen especificado, anótelo como un volumen parcial (P). en el Excel de gestión de muestras de sangre
- **Muestra hemolizada:** si algo del suero o plasma está hemolizado (de color rosa o rojo debido a la alteración de los glóbulos rojos), anótelo como muestra hemolizada (H) en el Excel de gestión de muestras de sangre.



## Procesamiento Vacutainer Amarillos

### Consideraciones importantes:

1. **Registre la hora** a la que los tubos de sangre llegan al laboratorio.
2. Existirán 2 tubos amarillos de 5 ml que se utilizan para suero.
3. Estos vacutainer se debe dejar reposar a temperatura ambiente durante 30-45 minutos (para permitir que el gel separador actúe).
4. Estos vacutainers se procesarán en tercer lugar, posterior al procesamiento de los vacutainer azules.

### Paso 1: Procesamiento de 2 vacutainers amarillos de 5 ml (Suero)

15. Coloque el tubo en la centrifuga durante 10 minutos a 2000 g a 4°.
16. Mientras las muestras se centrifugan, preparar los 10 eppendorf (previamente etiquetados) en las gradillas para el posterior pipeteo.
17. Retire los tubos de la centrifuga.
18. El material de este tubo será alicuotado de la siguiente manera:
  - a. Suero:
    - i. Coloque alícuotas de 500 µL de plasma en los 10 eppendorf con etiquetas color amarilla (ej. 101\_1\_YS1, del participante 101, el tiempo 1 yellow serum, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 6, ej. 101\_6\_YS) y colóquelos inmediatamente en la caja (Amarilla) para su congelación a -80°. La ubicación de cada eppendorf en la caja amarilla quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.

### Importante: problemas que pueden surgir

- **Volumen de muestra bajo:** si no hay suficiente muestra de un tipo de muestra en particular para llenar el conjunto completo de alícuotas, llene tantos eppendorf como sea posible. Si alguna alícuota es menor que el volumen especificado, anótelo como un volumen parcial (P). en el Excel de gestión de muestras de sangre
- **Muestra hemolizada:** si algo del suero o plasma está hemolizado (de color rosa o rojo debido a la alteración de los glóbulos rojos), anótelo como muestra hemolizada (H) en el Excel de gestión de muestras de sangre.



## Procesamiento Vacutainer PAXgene

### Consideraciones importantes:

1. **Registre la hora** a la que los vacutainer llegan al laboratorio.
2. Coloque el vacutainer PAXgene en la mesa de trabajo a temperatura ambiente. ¡No en el agitador! Los tubos PAXgene deben **estar exactamente 2 horas a temperatura ambiente**.
3. Este es el último de los vacutainer que se procesará.

### Paso 1: Procesamiento del vacutainer PAXgene: NO CENTRIFUGAR!!

19. Pegar la etiqueta correspondiente al vacutainer del participante. Esta etiqueta será de color blanca tendrá el formato según el siguiente ejemplo:
  - a. **101\_1\_PAX**, del participante 101, el tiempo 1, PAXgene, en el caso del tiempo post intervención se debe etiquetar con el número 6, ej. **101\_6\_PAX**).
20. Coloque los tubos verticales en una rejilla de alambre (no poliestireno) en el congelador a -20°C durante 24 horas.
21. Después de 24 horas, mueva a -80° para almacenamiento. Colóquelo en la caja en el congelador -80, es una caja de espuma de polietileno (corcho) (ver figura 1). La ubicación de cada vacutainer en la caja de corcho quedará registrada en el Excel de gestión de muestras de sangre.



Figura 1. Ejemplo almacenamiento vacutainer PAXgene

### Importante: problemas que pueden surgir

- **Volumen de muestra bajo:** si no hay suficiente muestra de un tipo de muestra en particular para llenar el conjunto completo de alícuotas, llene tantos eppendorf como sea posible. Si alguna alícuota es menor que el volumen especificado, anótelos como un volumen parcial (P). en el Excel de gestión de muestras de sangre
- **Muestra hemolizada:** si algo del suero o plasma está hemolizado (de color rosa o rojo debido a la alteración de los glóbulos rojos), anótelos como muestra hemolizada (H) en el Excel de gestión de muestras de sangre.



Active Gains in brain Using Exercise During Aging



UNIVERSIDAD  
DE GRANADA

Los protocolos incluidos en esta propiedad intelectual del procesamiento de las muestras sanguíneas han sido adaptados del proyecto IGNITE (Erickson, 2019).

## Referencias

1. Cryan, J. F., O’Riordan, K. J., Cowan, C. S. M., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T. F. S., Boehme, M., Codagnone, M. G., Cussotto, S., Fulling, C., Golubeva, A. V., Guzzetta, K. E., Jaggar, M., Long-Smith, C. M., Lyte, J. M., Martin, J. A., Molinero-Perez, A., Moloney, G., Morelli, E., Morillas, E., ... Dinan, T. G. (2019). The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiological Reviews*, 99(4), 1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>
2. Erickson, K. I., Grove, G. A., Burns, J. M., Hillman, C. H., Kramer, A. F., McAuley, E., Vidoni, E. D., Becker, J. T., Butters, M. A., Gray, K., Huang, H., Jakicic, J. M., Kamboh, M. I., Kang, C., Klunk, W. E., Lee, P., Marsland, A. L., Mettenberg, J., Rogers, R. J., ... Wollam, M. E. (2019). Investigating Gains in Neurocognition in an Intervention Trial of Exercise (IGNITE): Protocol. *Contemporary Clinical Trials*, 85, 105832. <https://doi.org/10.1016/j.cct.2019.105832>
3. Jo, R., Nishimoto, Y., Umezawa, K., Yama, K., Aita, Y., Ichiba, Y., Murakami, S., Kakizawa, Y., Kumagai, T., Yamada, T., & Fukuda, S. (2019). Comparison of oral microbiome profiles in stimulated and unstimulated saliva, tongue, and mouth-rinsed water. *Scientific Reports*, 9(1), 16124. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52445-6>