



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**


Informe de Servicio Social  
(Actividades relacionadas con la profesión)

**Expresión de Receptores de Glucocorticoides (GR) en relación  
con el estrés percibido y el inicio de síntomas de ansiedad**

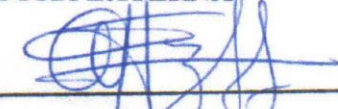
Que para obtener el título de Licenciado en Biología  
Presenta el Alumno

**Luis Angel Lugo Lucio**  
(matrícula: 2163064446)

**ASESORA INTERNA**

  
Dra. María Teresa Núñez Cardona  
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco  
Departamento El Hombre y su Ambiente

**ASESORA EXTERNA**

  
Dra. Gabriela Ariadna Martínez Levy  
Instituto Nacional de Psiquiatría  
Ramón de la Fuente Muñiz

Ciudad de México

Noviembre 18 de 2022

## Contenido

Resumen .....	1
Marco institucional.....	1
Introducción.....	2
Ubicación geográfica.....	2
Objetivo general .....	3
Especificación y fundamento de las actividades .....	3
Impacto de las actividades .....	9
Aprendizaje y habilidades obtenidas .....	9
Fundamento de las actividades .....	9
Referencias bibliográficas .....	10
ANEXOS .....	12

## Resumen

El estrés es la respuesta del organismo frente a estímulos (estresores) que alteran su homeostasis, la medición de este es particularmente compleja dado que implica factores psicológicos, sociales y biológicos, por lo que se requieren de diferentes métodos de medición. Actualmente se reconoce la importancia del uso de biomarcadores para lograr la evaluación integral del estrés. Las teorías actuales sostienen que el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA), es fundamental en la respuesta ante un evento estresante, por lo que su alteración puede repercutir en la condición del paciente. Esto se ha asociado a cambios en la expresión del receptor de glucocorticoides en modelos animales. En el presente trabajo, se procesaron muestras de sangre provenientes de pacientes con estrés, relacionados a la pandemia de COVID-19; se estandarizó el protocolo para la extracción de ARN de alta calidad a partir de Buffy Coat (BC) y muestras provenientes del personal del laboratorio, en las que se evaluó la concentración y calidad; además, se realizó la expresión de GR, con respecto al gen endógeno GAPDH, a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, por sus siglas en inglés). Se estandarizó la extracción de ARN a partir de BC y se procesaron 45 muestras (64.4% de hombres y 35.6% de mujeres) de pacientes del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz y estudiantes de la UAM-Cuajimalpa, se encontraron valores de concentración y calidad (A260/280) superiores a 200 ng/μl y 1.8 respectivamente. Los valores de calidad (A269/230) variaron entre 0.5 y 2.2 por lo que se requiere mejorar la técnica de pipeteo para obtener resultados óptimos.

**Palabras clave:** pandemia, COVID-19, receptores de glucocorticoides, estrés, biomarcadores.

## Marco institucional

El Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM) fue concebido como una institución capaz de transformar la manera de entender la enfermedad mental a partir de la investigación, en la traducción de los hallazgos científicos en programas, en mejores prácticas para la prevención de la enfermedad mental, en la atención de enfermos psiquiátricos del país y en recomendaciones para las políticas públicas; una parte importante de este esfuerzo ha sido la formación de profesionales y técnicos en salud mental, coordinando estas actividades con los esfuerzos de otros organismos públicos y privados de intereses afines, en México y en el mundo (INPRFM, s/f. y Cruz-Fuentes, 2011).

### Misión:

La misión del INPRFM es Mejorar la salud mental de la población mexicana por medio de la investigación multidisciplinaria de excelencia, la atención médica especializada y la formación de recursos humanos basados en los principios de calidad y calidez.

## Visión:

La visión del INPRFM es Consolidarse como centro líder en neurociencias, investigación clínica, epidemiológica y social, de atención y docencia, capaz de dar respuesta a las prioridades nacionales en salud mental, incluyendo las adicciones.

## Introducción

En diciembre de 2019 se originó en Wuhan (China) un brote infeccioso causado por un virus denominado COVID-19, a partir de ese momento empezó su propagación a otros países. El 11 de marzo del 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoció como pandemia los contagios generados por esta enfermedad y ante esto, distintos países, entre ellos México, instauraron cuarentenas como estrategia de actuación inicial y se suspendieron las actividades sociales, económicas y productivas no esenciales. Lo anterior ocasionó un cambio abrupto a la vida cotidiana de toda la humanidad al intentar adaptarse a la situación y, posteriormente, a lo que se llamó la nueva normalidad. Estos cambios tan abruptos y constantes provocaron una fatiga mental entre las poblaciones humanas incrementando el **estrés**, y el desarrollo de síntomas de ansiedad y depresión (Barraza, 2020).

El estrés es la respuesta del organismo frente a estímulos (estresores) que alteran su homeostasis, la medición de este es particularmente compleja, dado que implica factores psicológicos, sociales y biológicos, por lo que, para tener una visión más amplia, se requiere de una evaluación multinivel. Actualmente se reconoce la importancia del uso de biomarcadores para lograr la evaluación integral del estrés (Arias y Velapatiño, 2015; Morera *et al.*, 2019).

Las teorías actuales sostienen que el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) es fundamental en la respuesta ante un evento estresante, por lo que su alteración puede repercutir en la condición del paciente. Esto se explica por la interacción genómica de los receptores de glucocorticoides (GR por sus siglas en inglés) y mineralocorticoides (MR), sobre los cuales actúan los glucocorticoides, como el cortisol. Existen diversas variables que modulan el eje HHA, como pueden ser experiencias previas de maltrato, sexo (hombre o mujer), edad, entre otras (Rodríguez y García, 2010). Por ejemplo, Weaver *et al.* (2004) demostraron que la variación natural en el cuidado materno en ratones (lamer y acariciar a las crías) regula la metilación de la región promotora del gen que codifica para el receptor de glucocorticoides en el hipocampo, provocando una baja expresión de estos receptores, así como una mayor activación del eje HHA ante un estresor agudo, lo que se asoció con un incremento de la ansiedad (Weaver *et al.*, 2006).

## Ubicación geográfica

El Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, se localiza al Sur de la Ciudad de México, a un costado de la zona de hospitales de Tlalpan, ubicada en Calzada

México Xochimilco No. 101, Colonia San Lorenzo Huipulco, Alcaldía Tlalpan, C.P. 14370 (figura 1).

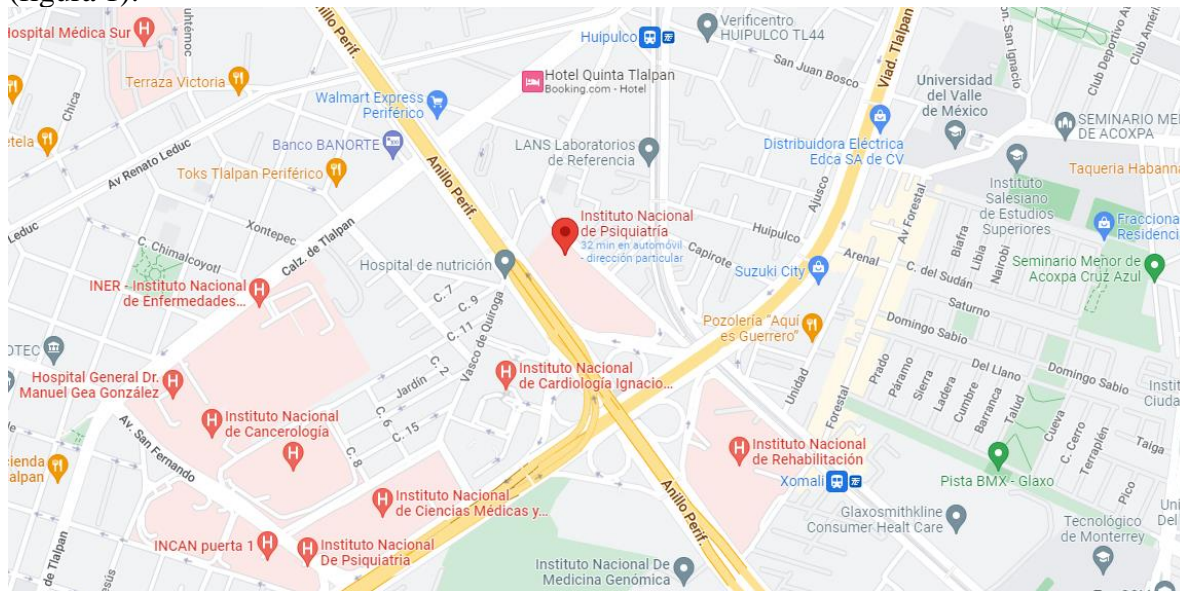


Figura 1. Localización del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramon de la Fuente Muñiz (<https://www.google.com/maps/>)

## Objetivo general

Estudiar la expresión de receptores de glucocorticoides (GR) en relación con el estrés percibido y el inicio de síntomas de ansiedad, consecuencia de la pandemia de COVID-19.

## Especificación y fundamento de las actividades

El área en la que se desarrolló el presente servicio social fue en el Departamento de Genética del INPRFM. En esta fueron recibidas y procesadas muestras sanguíneas provenientes de pacientes del mismo instituto y estudiantes de la UAM-Cuajimalpa, considerando que estos presentarían síntomas de estrés y ansiedad relacionada a la pandemia por COVID-19, los cuales fueron invitados a participar en el estudio. Los individuos que aceptaron participar en el estudio fueron canalizados con un investigador con experiencia clínica en la evaluación y manejo de pacientes expuestos a experiencias estresantes y con trastornos de ansiedad, quién realizó la evaluación clínica. Asimismo, los participantes donaron una muestra de sangre para extraer ácidos nucleicos y plasma.

Las actividades en el laboratorio iniciaron con la recepción de las muestras de sangre (dos tubos con 4-6 ml por paciente), los cuales se registraron en una bitácora (por motivos de confidencialidad no se puede integrar imagen de ella) con los siguientes datos: nomenclatura/folio de la muestra para el estudio (EPPX), el cual se mantendrá durante todo el proyecto, nombre del paciente, fecha y hora de la toma de muestra y en el caso de las muestras tomadas en la UAM-Cuajimalpa se anotó la hora en que se inició a procesar, para considerar el tiempo de transporte de las muestras desde la UAM al Instituto.



Una vez verificados los datos de las muestras en la bitácora, estas fueron centrifugadas para separar el plasma y el Buffy Coat (BC), posteriormente se obtuvo el BC para extracción de ADN y ARN (figura 2). La extracción de ARN de alta calidad a partir de BC con trizol se realizó siguiendo las indicaciones del reactivo, haciendo pequeños ajustes a las condiciones del laboratorio (Thermofisher, 2020 y Kurobo, s/f) (anexo 1). En total se realizó la extracción de ARN de 90 muestras, de las cuales la mitad fueron donadas por los miembros del laboratorio para la estandarización del protocolo y la otra mitad fueron las muestras de los pacientes, de estos últimos, 29 fueron mujeres (64.4%) y 16 fueron hombres (35.6%).

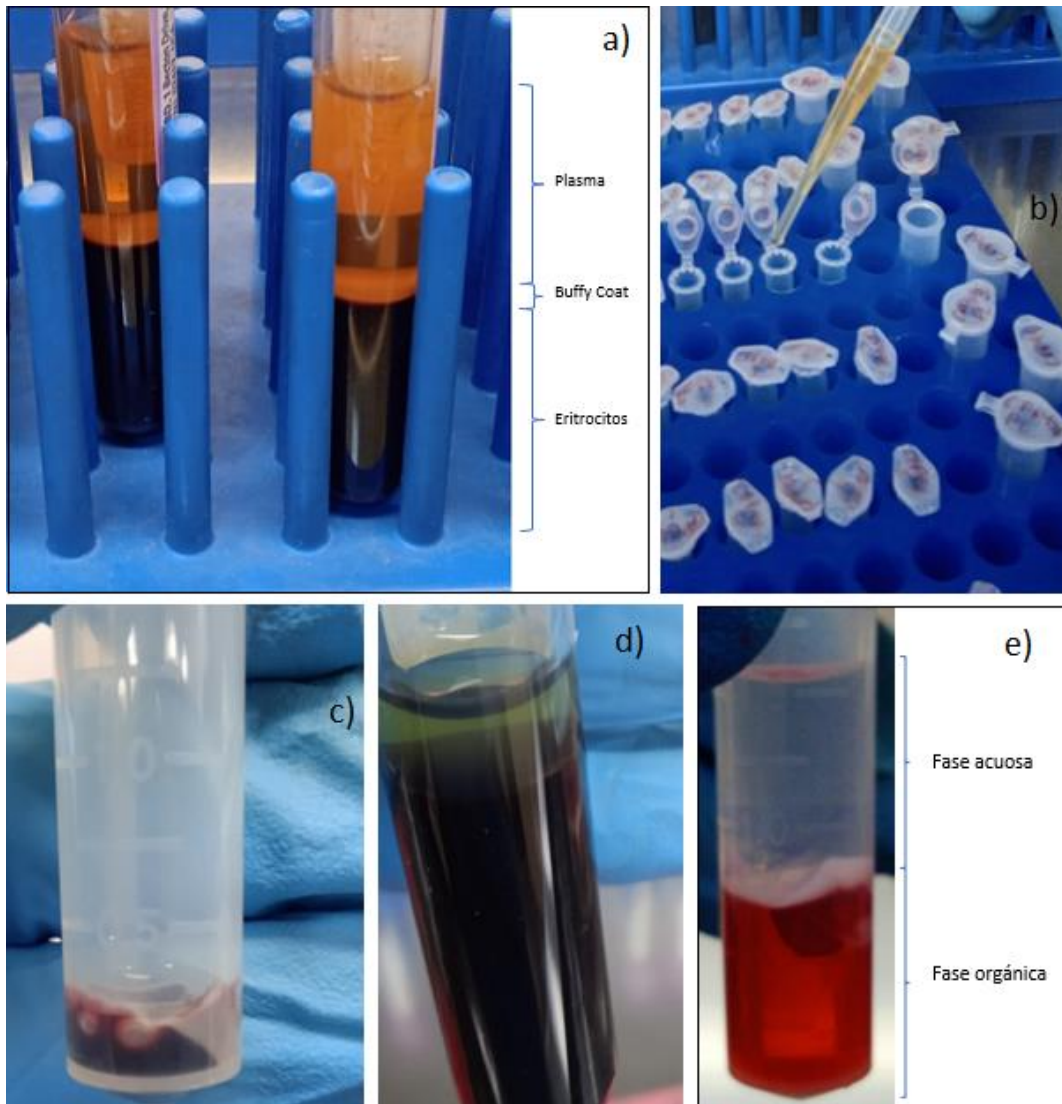


Figura 2. Proceso para la extracción de ARN con trizol: a) muestras de sangre después de la centrifugación, b) se retira el plasma y se coloca en 5 tubos de 0.6 ml por muestra, c) Buffy coat extraído d) Se verifica que se obtuvo todo el buffy coat del tubo de sangre original e) Se observa la separación de las fases después de añadir isopropanol.

Después de terminar de procesar las muestras, se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  por al menos durante 24 horas y posteriormente se evaluó la concentración y pureza de las muestras de ARN por espectrofotometría mediante nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Se obtuvieron las relaciones de absorbancias  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$  nm, los cuales miden la contaminación por compuestos aromáticos y proteínas respectivamente (banco de ADN, 2020 y Michel-López, *et al.*, 2018), con estos datos se realizó posteriormente una base de datos en Excel (tabla 1).

Tabla 1. Ejemplo de los datos arrojados del nanodrop 2000 sobre la cuantificación de ARN

Muestra	Fecha Cuan.	ng/ $\mu\text{l}$		ng/ $\mu\text{l}$	A260/280		A260/280		A260/230		A260/230
EPP1	04/08/2022	317.30	314.30	<b>315.80</b>	1.86	1.88	<b>1.87</b>	1.36	1.35	<b>1.36</b>	
	08/08/2022	307.00	341.80	<b>324.40</b>	1.90	1.90	<b>1.90</b>	1.06	1.06	<b>1.06</b>	
EPP2	04/08/2022	298.80	299.90	<b>299.35</b>	1.87	1.88	<b>1.88</b>	0.90	0.90	<b>0.90</b>	
	08/08/2022	289.50	290.60	<b>290.05</b>	1.91	1.90	<b>1.91</b>	0.55	0.56	<b>0.56</b>	
EPP3	11/08/2022	408.40	412.80	<b>410.60</b>	1.84	1.84	<b>1.84</b>	2.14	2.15	<b>2.15</b>	
	15/08/2022	408.10	410.50	<b>409.30</b>	1.85	1.85	<b>1.85</b>	2.11	2.12	<b>2.12</b>	
EPP4	11/08/2022	321.60	321.20	<b>321.40</b>	1.90	1.90	<b>1.90</b>	0.79	0.78	<b>0.79</b>	
	15/08/2022	313.20	316.10	<b>314.65</b>	1.91	1.91	<b>1.91</b>	0.54	0.54	<b>0.54</b>	
EPP5	11/08/2022	255.50	249.10	<b>252.30</b>	1.77	1.78	<b>1.78</b>	2.30	2.28	<b>2.29</b>	
	15/08/2022	340.70	344.70	<b>342.70</b>	1.73	1.73	<b>1.73</b>	2.25	2.25	<b>2.25</b>	
EPP6	12/08/2022	327.70	331.10	<b>329.40</b>	1.82	1.82	<b>1.82</b>	1.98	1.98	<b>1.98</b>	
	15/08/2022	357.00	356.30	<b>356.65</b>	1.82	1.82	<b>1.82</b>	1.87	1.87	<b>1.87</b>	

Posteriormente se realizó una evaluación de la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.1% (anexo 2). Para ello se calcularon los  $\mu\text{l}$  requeridos de cada muestra para obtener 500 ng/ $\mu\text{l}$  de ARN, utilizando los datos obtenidos del nanodrop, se prepararon las alícuotas y se les agregó  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC hasta obtener un volumen final de 10  $\mu\text{l}$ .

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica muy utilizada para separar moléculas o fragmentos de ácidos nucleicos. Después de la electroforesis, el gel se sumerge en una solución de bromuro de etidio (fluorescente), el cual se intercala entre las bases del ARN y permite visualizarlo (figura 3) al colocarlo en una lámpara con luz UV. La integridad del ARN se evalúa por la detección de bandas del ARNr 18s y 28s, si estas bandas están degradadas y no se llegan a apreciar, las muestras no son aptas para los procedimientos subsecuentes. De las 45 muestras obtenidas para el estudio, por cuestiones de tiempo solo a 30 se les realizó la evaluación de integridad, de las cuales todas resultaron aptas para los procedimientos subsecuentes.

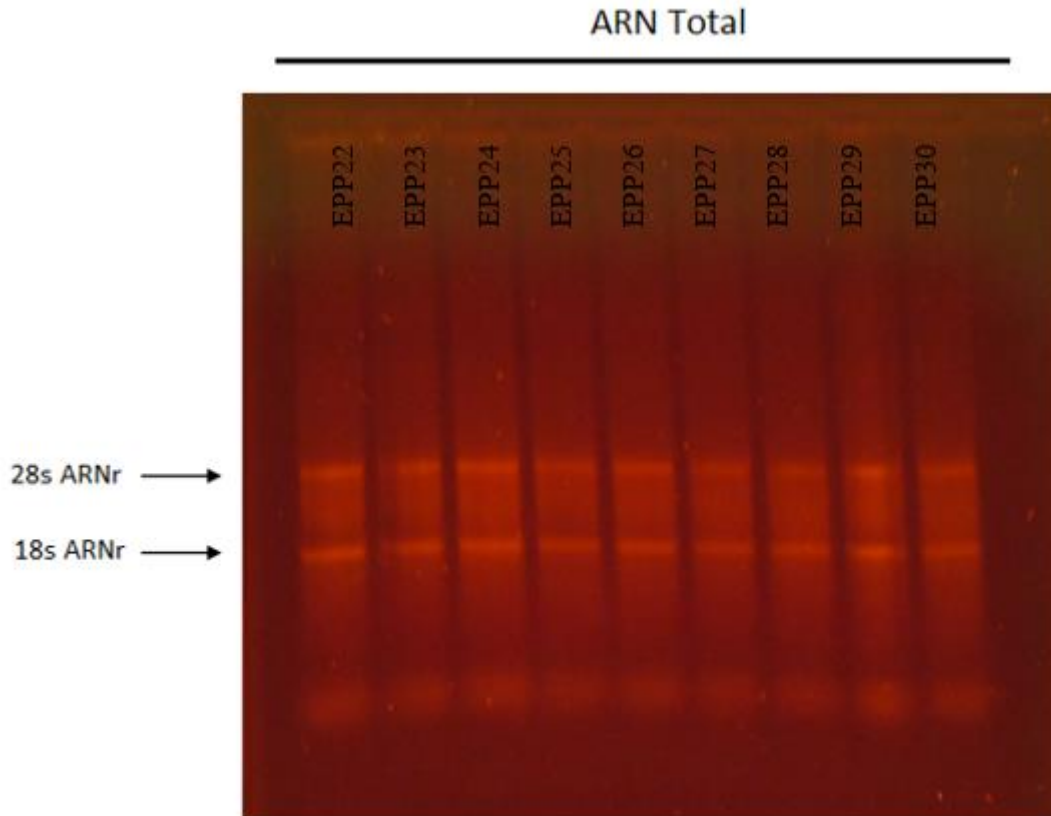


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.1% del ARN total extraído del BC de pacientes. Se observan las bandas que corresponden al ARNr 18S y 28S, lo que indica que el ARN está íntegro.

Asimismo, se prepararon las alícuotas para sintetizar ADN complementario (ADNc) a partir del ARN (Anexo 3). Para las alícuotas, la concentración requerida fue el doble que para el gel de agarosa (1000 ng/ $\mu$ l) y el volumen final fue de 11  $\mu$ l. Estas se utilizaron como sustrato para una reacción de transcripción inversa. Para ello se aprovecha la presencia de las colas de poli[A] que sólo se encuentra en los ARN mensajeros (ARNm) y se utiliza como cebador un oligonucleótido sintético de polideoxitimidina (oligo[dT]). La enzima copiará sólo los ARNm y lo hará en sentido 3'-5' (Hernández *et al.*, 1994). De las 30 muestras a las que se les realizó la electroforesis, solo 24 fueron convertidas a ADNc.

Una vez obtenido el ADNc de al menos cuatro muestras, se podía correr una placa (96 pozo) en la PCR en tiempo real (Anexo 4), con esto se cuantificó la expresión génica de GR y se optimizó la placa para medir otros ocho genes (CREB, 5HTT, GAPDH, TBP, entre otras) por duplicado, los cuales de igual forma están relacionados con la respuesta al estrés y síntomas de ansiedad. Los genes GAPDH y TBP fueron utilizados como genes endógenos, esto quiere decir que mantienen una expresión constitutiva y presentan poco cambio, por lo que se les puede utilizar como referencia/control (Zavaleta *et al.*, 2008).

Para la PCR se utilizó un equipo de Applied Biosystems (7500 Real-Time PCR System), ya que se terminó de cargar las muestras y las sondas en la placa, se prende el equipo y la



computadora con el programa 7500 System SDS software, en el equipo se introduce la placa con las muestras y en el software se capturan los datos de la placa, en las filas se colocan el nombre de la muestra y en las columnas el de la sonda (figura 4), finalmente se captura el protocolo del termociclador (se programó a 40 ciclos).

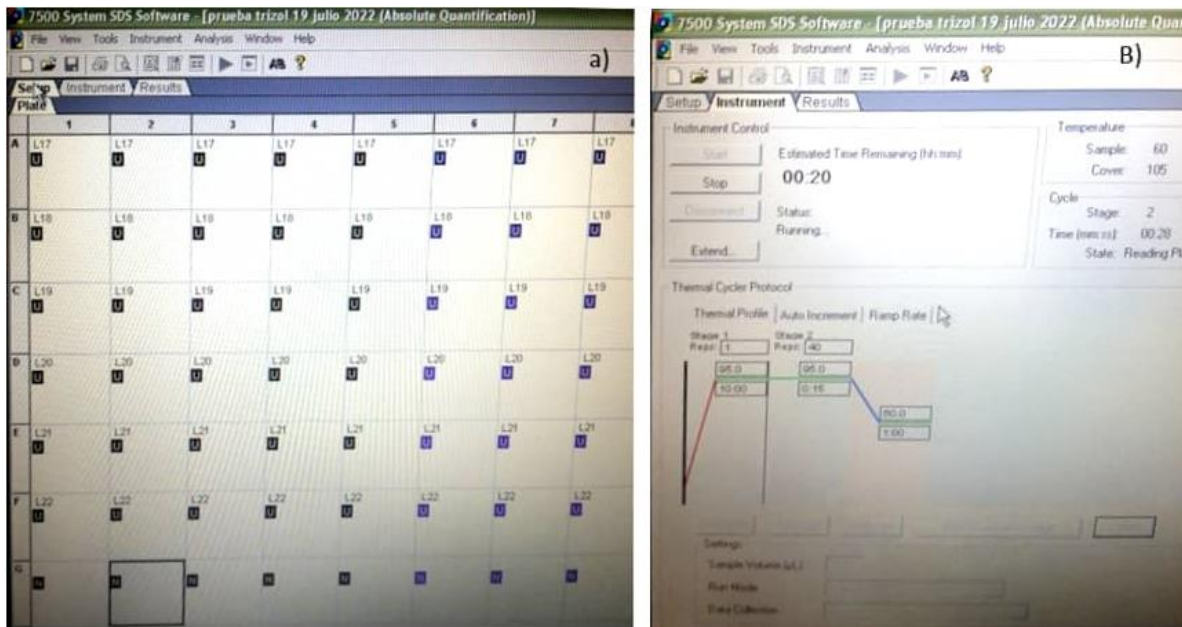


Figura 4. Imágenes de cómo se visualiza el programa 7500 System SDS. a) Se muestra cómo se han capturado los datos de las muestras en la placa b) Se observa el programa que va utilizar el termociclador para correr la PCR.

Una vez que se termina de realizar la PCR se obtienen los datos de expresión de cada gen en forma de tabla que contiene datos como el número de pozo, nombre de muestra, gen a detectar y el ciclo umbral ( $C_T$  por sus siglas en inglés), este último se define como el ciclo de PCR en el que la señal fluorescente cruza un umbral (figura 5a). Además se visualiza la gráfica de salida de PCR en tiempo real (figura 5b), en esta se puede observar la lectura basal que sirve como referencia y se establece en los primeros ciclos (habitualmente entre el 3 y el 15), en los que los cambios de la señal fluorescente suelen ser mínimos y a partir de aquí, se calcula el valor umbral, entendido como el nivel de la señal fluorescente que representa un incremento estadísticamente significativo respecto al nivel basal (Serrano-Cumplido *et al.*, 2021; Schmittgen y Livak, 2008).

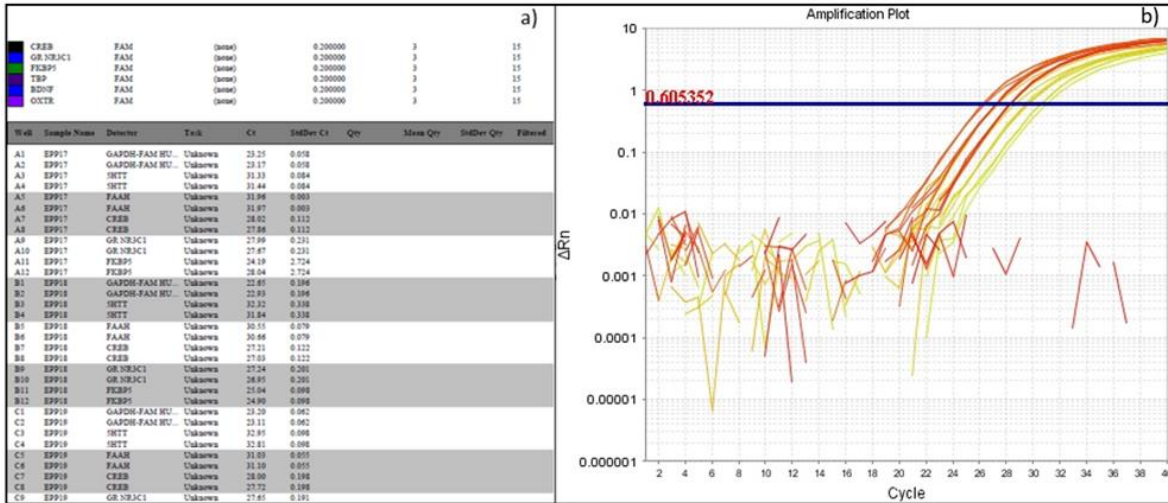


Figura 5. Imágenes de cómo se visualizan los resultados arrojados por el programa 7500 System SDA. a) datos en forma de tabla, se muestran el nombre del pozo, nombre de la muestra, gen detectado y el  $C_T$ . b) gráfica donde se presentan los datos a partir de una salida típica de PCR en tiempo real. El punto en el que cada una de las curvas se cruza con el umbral (línea roja horizontal) es el  $C_T$ .

Después en dos hojas de Excel (una para cada gen endógeno) se capturaron los datos obtenidos de cada muestra, se colocó el nombre de la muestra, fecha en que se realizó la PCR y el gen endógeno con sus respectivos genes blancos, para esto el gen de GAPDH se utilizó como endógeno para los genes de expresión rápida (GR, FKBP5 y CREB) el cual presentó un  $C_T$  de  $22.5 \pm 1.3$ , mientras que TBP se utilizó como control para los genes de expresión tardía (5HTT, FAAH, BDNF y OXTR), este presentó un  $C_T$  de  $28.45 \pm 1.7$ . Primero se obtuvo el promedio de los  $C_T$  de cada gen en cada las muestras y posteriormente, se realizó una cuantificación relativa de cada gen, para ello, se obtuvo el  $\Delta c_t$  de cada gen ( $c_t$  gen blanco -  $c_t$  gen endógeno) y posteriormente se obtuvo el  $2^{-\Delta c_t}$ , utilizando la fórmula  $2^{-\Delta c_t}$  (Schmittgen y Livak, 2008) (tabla 2).

Tabla 2. Ejemplo de base de datos utilizando los experimentos de PCR en tiempo real (muestra, fecha de PCR,  $C_T$  del gen endógeno y sus respectivos genes blanco), promedio de los  $C_T$  por muestra, además de los valores de  $\Delta c_t$  y  $2^{-\Delta c_t}$

muestra	fecha PCR	GAPDH	GAPDH	GR	GR	FKBP5	FKBP5	CREB	CREB	CREB	$\Delta c_t$ GR	$\Delta c_t$ FKBP5	$\Delta c_t$ CREB	2- $\Delta c_t$ GR	2- $\Delta c_t$ FKBP5	2- $\Delta c_t$ CREB			
EPP10	18/10/2022	23.44	22.66	23.05	27.67	27.42	27.55	24.32	24.38	24.35	27.61	27.67	27.64	4.50	1.30	4.59	22.55	2.46	24.08
EPP11	18/10/2022	22.85	22.74	22.80	27.51	27.16	27.34	25.18	25.06	25.12	28.16	27.74	27.95	4.54	2.33	5.16	23.26	5.01	35.63
EPP12	18/10/2022	20.85	21.66	21.26	28.15	28.24	28.20	26.10	25.68	25.89	28.15	28.32	28.24	6.94	4.64	6.98	122.79	24.85	126.24
EPP13	01/11/2022	22.72	22.64	22.68	27.53	26.97	27.25	25.67	25.63	25.65	27.51	27.48	27.50	4.57	2.97	4.82	23.75	7.84	28.15
EPP14	01/11/2022	22.36	22.34	22.35	26.93	26.34	26.64	25.03	24.76	24.90	26.79	26.93	26.86	4.29	2.55	4.51	19.49	5.84	22.78
EPP15	01/11/2022	23.44	23.14	23.29	27.74	27.31	27.53	25.44	25.31	25.38	28.01	28.04	28.03	4.24	2.09	4.74	18.83	4.24	26.63
EPP16	01/11/2022	22.74	22.51	22.63	27.00	26.63	26.82	24.53	24.31	24.42	27.43	27.49	27.46	4.19	1.80	4.84	18.25	3.47	28.54
EPP17	09/11/2022	23.25	23.17	23.21	27.99	27.67	27.83	24.19		24.19	28.02	27.86	27.94	4.62	0.98	4.73	24.59	1.97	26.54
EPP18	09/11/2022	22.65	22.93	22.79	27.24	26.95	27.10	25.04	24.90	24.97	27.21	27.03	27.12	4.31	2.18	4.33	19.77	4.53	20.11
EPP19	09/11/2022	23.20	23.11	23.16	27.65	27.38	27.52	25.28	25.26	25.27	28.00	27.72	27.86	4.36	2.12	4.71	20.53	4.33	26.08
EPP20	09/11/2022	22.54	22.50	22.52	27.12	26.82	26.97	24.44	24.21	24.33	27.14	27.15	27.15	4.45	1.81	4.63	21.86	3.49	24.68
EPP21	15/11/2022	22.96	23.02	22.99	27.20	27.22	27.21	24.09	24.07	24.08	27.11	27.09	27.10	4.22	1.09	4.11	18.64	2.13	17.27
EPP22	15/11/2022	22.43	22.56	22.50	27.05	26.38	26.72	23.63	23.51	23.57	26.90	26.57	26.74	4.22	1.08	4.24	18.64	2.11	18.90
EPP23	15/11/2022	23.34	23.26	23.30	27.29	26.84	27.07	25.13	24.95	25.04	27.35	27.30	27.33	3.77	1.74	4.03	13.59	3.34	16.28
EPP24	15/11/2022	23.18	23.15	23.17	27.12	26.98	27.05	24.89	24.58	24.735	27.04	27.03	27.04	3.89	1.57	3.87	14.77	2.97	14.62

Debido a su sensibilidad, rapidez y exactitud, el método de RT-PCR en tiempo real es uno de los más recomendado para estudiar los ácidos nucleicos, permitiendo medidas cuantitativas de la expresión génica con menos cantidad de muestra (Tamay de Dios *et al.*, 2013; Hernández, *et al.*, 1994).

### **Impacto de las actividades**

La participación en este proyecto permitió la estandarización del protocolo de extracción de ARN en sangre con trizol en el Laboratorio de Genética del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

Asimismo, se realizaron las curvas estándar de PCR para los genes BDNF y OXTR con relación al gen endógeno TBP, permitiendo identificar el volumen óptimo requerido para estudios posteriores, realizados con estos genes. Lo anterior beneficiará a los próximos estudios que se realicen en el laboratorio.

Cuando se tengan los datos clínicos de los participantes del estudio, los resultados de expresión se podrán interpretar y publicar en revistas de impacto.

### **Aprendizaje y habilidades obtenidas**

Las actividades realizadas durante el servicio social permitieron adquirir habilidades, reforzar conocimientos adquiridos como estudiante y aprender otros.

Se aprendieron técnicas de biología molecular, como la extracción y cuantificación de ácidos ribonucleicos y la comprensión e implementación de la técnica de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real, la cual no solo puede ayudar en el ámbito clínico, sino también en ámbitos como la biología de la conservación.

Se obtuvo el conocimiento de cómo se realizan los protocolos de investigación clínicos, además de lo enriquecedor que es trabajar en un equipo multidisciplinario.

### **Fundamento de las actividades**

Los problemas de salud mental son un tema fundamental en el ámbito de la salud pública y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, sin embargo, no se les ha dado la prioridad correspondiente. Aunado a esto, la pandemia por COVID-19, que ha afectado de manera desproporcionada a todo el mundo, ha aumentado la carga de los problemas de salud mental y ha causado interrupciones en los servicios esenciales dirigidos a los trastornos mentales, neurológicos y por consumo de sustancias psicoactivas (OPS, 2023), es por ello que es de suma importancia aumentar el esfuerzo de estudio de estos problemas para obtener un mejor entendimiento de estos y poder tratarlos de manera óptima.

Los conocimientos adquiridos durante la carrera se pusieron en práctica en la elaboración de bases de datos, la adaptación de distintos protocolos/metodologías según los requerimientos del proyecto. Además, se integraron nuevos aprendizajes en la aplicación de la biología a nivel molecular para intentar entender de una mejor manera las enfermedades mentales con la finalidad de conseguir desarrollar evaluaciones integrales de estas.

Lo anterior, fue fundamental para fortalecer las habilidades y conocimientos relacionados con mi profesión. La misión de la licenciatura en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana de la Unidad Xochimilco, es formar biólogos cuyas habilidades, competencias y conocimientos les permitan participar en el diagnóstico, gestión y planeación del uso, conservación y restauración de los recursos naturales (UAM-X, 2020).

### Referencias bibliográficas

- 1) Arias C.N. y Velapatiño, B. (2015). Cortisol como Indicador Fiable del Estrés en Alpacas y Llamas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(1): 1–8. <https://doi.org/10.15381/rivep.v26i1.10915>
- 2) Banco Nacional de ADN Carlos III. (2020). Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Consultado en: <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf> el 10 de noviembre del 2022.
- 3) Barraza-Macias A. (2020). Estrés de pandemia (COVID 19) en población mexicana. Centro de Estudios Clínica e Investigación Psicoanalítica S.C. 6-15. Consultado en: <http://redie.mx/librosyrevistas/libros/estrescovid.pdf> el 10 de junio del 2022.
- 4) Cruz-Fuentes C. S. (2011). Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. *Revista de Investigación Clínica*. 63(3): 219-222.
- 5) Hernández A., Martín P., Torres A. y Salido E. (1994). Análisis del ARN: Estudio de la expresión génica. *Neurología*, 14 (2):145-162
- 6) INPRFM (s/f). Instituto Nacional de Psiquiatría, Antecedentes. Consultado en: <http://inprf.gob.mx/inprfnew/antecedentes.html> el 20 de junio del 2022.
- 7) Kurobo (s/f). Appendix 2 Erythrocyte Lysis. HANDBOOK. Ver.4.2 Consultado en: [https://www.kurabo.co.jp/bio/en/nucleic/assets/pdf/document/QuickGenehandbook/RB-S\\_HB-E\\_Ver.4.2.pdf](https://www.kurabo.co.jp/bio/en/nucleic/assets/pdf/document/QuickGenehandbook/RB-S_HB-E_Ver.4.2.pdf) el 2 de abril del 2022.
- 8) Rodríguez-Fernández J. M. y García-Acero M. (2010). El papel del receptor de glucocorticoide en el estrés temprano, Universidad de Medicina. Bogotá (Colombia), 51 (4): 385-391

- 9) Schmittgen, T. D. y Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
- 10) Serrano-Cumplido A., Ruiz García A., Segura-Fragoso A., Olmo-Quintana V., Micó Pérez R. M., Barquilla-García A., Morán-Bayón A. (2021). Aplicación del valor umbral del número de ciclos (Ct) de PCR en la COVID-19. Consultado en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8156904/#:~:text=El%20umbral%20de%20ciclos%20o,se%20C3%B1al%20fluorescente%20cruza%20este%20umbral.> el 10 de junio del 2022.
- 11) Tamay de Dios L., Ibarra C. y Velasquillo C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real Consultado en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf> el 15 de julio del 2022.
- 12) Thermofisher (2020). Trizol Reagent User Guide. Consultado en: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol\\_reagent.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol_reagent.pdf) el 30 de mayo del 2022.
- 13) Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (UAM-X). (2020). Licenciatura en Biología. Recuperado: 29 de mayo de 2022. Disponible: <http://www2.xoc.uam.mx/oferta-educativa/divisiones/cbs/licenciaturas-posgrados/pplic/biologia/plan/>
- 14) Weaver I, C., Cervoni N., Champagne F, A., D'Alessio A. C., Sharma S., Seckl J. R., Meaney M, J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience*, 7(8): 847-854.
- 15) Weaver IC, Meaney MJ y Szyf M. (2006). Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 103(9):3480-3485. doi:10.1073/pnas.0507526103

## ANEXOS

### **Anexo 1: protocolo para la extracción de RNA con trizol a partir de buffy coat**

1. Colectar de 4-6 ml de sangre total en tubos con anticoagulante EDTA. Inmediatamente a la recolección, invertir cuidadosamente los tubos de 10 a 15 veces para una adecuada homogeneización.
2. Centrifugar las muestras sanguíneas durante 10 minutos a 2,000 x g a 4°C.
3. Con ayuda de una pipeta de transferencia extraer el buffy coat (BC) (aproximadamente 150-250 µl) y depositar en un tubo de Eppendorf de 2 ml.
4. Centrifugar el buffy coat a máxima velocidad durante 30 segundos.
5. Con ayuda de una micropipeta de 200 o 100 µl, retirar lo más posible de plasma.
6. Colocar a la muestra de 750 a 1250 µl de Buffer Hemolítico (HB) (relación 1:5 BC-HB) y mezclarlo con la misma pipeta hasta obtener una suspensión homogénea.
7. Incubar esta suspensión celular durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA) para hemolizar los eritrocitos, mezclar por inversión dos veces (10 vueltas) durante la incubación.
8. Centrifugar el buffy coat a 3000 x g durante 5 minutos a 4°C.
9. Retirar sobrenadante con pipeta de 1000 y 100 µl.

#### **Los pasos subsecuentes realizarlos en campana de extracción.**

10. Adicionar 1300 µl de trizol a la muestra y homogeneizar con la misma pipeta con que se adiciono el reactivo.
11. Incubar durante 5 minutos.

**En este punto del método, la suspensión obtenida se puede almacenar a -20°C hasta por un mes.**

12. Agregar 260 µl de cloroformo cerrar el tubo y agitar vigorosamente (con la mano) hasta homogeneizar, incubar durante 3 minutos (2-3 minutos).
13. Centrifugar durante 30 min a 14,000 x g a 4°C.
14. Transferir la fase acuosa (fase superior 650 µl aprox.) contenedora de RNA a un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
15. Agregar 650 µl de isopropanol, agitar vigorosamente (con la mano) e incubar durante 10 minutos.



16. Centrifugar durante 25 minutos a 14,000 x g a 4°C.
17. El ARN precipita en forma de gel blanquecino (pellet). Descartar el sobrenadante con ayuda de una micropipeta de 1000 y 100 µl.
18. Resuspender el pellet en 1 ml de etanol al 75%.
19. Agitar la muestra con un vortex (nivel 3) brevemente, hasta que el pellet se desprenda, y centrifugar durante 5 minutos a 7500 x g a 4°C.
20. Descartar el sobrenadante con ayuda de una micropipeta de 1000 y 100 µl.
21. Secar al aire durante 10 minutos en la campana de flujo laminar.
22. Rehidratar el pellet en 30 µl (20-50 µl) de agua DEPC.
23. Incubar a 60°C en thermoblock durante 10 minutos.
24. Colocar en hielo, después almacenar a -70°C hasta su uso.

## Anexo 2: Preparación gel de agarosa al 1.1%

60 ml de TAE 1X

X g de agarosa

60ml                      100%

X                              1.1%

$$X = \frac{60 \cdot 1.1}{100} = 6.6$$

- 1) Se coloca un matraz de 100 ml en la báscula y se tara
- 2) Se agregan 60 ml de TAE 1X en el matraz y posteriormente se le agregan 6.6 g de agarosa previamente pesada
- 3) Se registra el peso del TAE 1X y agarosa para posteriormente recuperar el volumen perdido
- 4) El matraz se coloca en un agitador magnético con plancha, se calienta (nivel 3), se mueve constantemente cada cierto tiempo para homogeneizar la mezcla (hasta que se vuelva transparente)
- 5) Se enfría al chorro de agua y posteriormente se coloca en la placa de electroforesis, si se hacen burbujas, quitarlas con una aguja

### Anexo 3: Protocolo ADNc

#### Mix 1:

1  $\mu$ l de Oligo DT

1  $\mu$ l de dNTPs

#### Mix 2:

4  $\mu$ l de buffer

2  $\mu$ l de DTT

- \*Después de preparar los **Mix** vortexearlos y centrifugarlos un short
- \*Mientras se preparan los Mix encender la centrífuga y bajar temperatura hasta 4 °C
- \*Cuando se terminen de preparar los Mix encender el termociclador y programarlo

- 1) Añadir **2  $\mu$ l de Mix1** a cada tubo de RNA y centrifugar a 4°C durante 30 segundos
- 2) Llevar las muestras al termociclador para calentar a 65°C por 5 min y **pausar**, una vez detenido llevar las muestras a la centrifuga a 4°C durante 30 segundos.
- 3) Añadir 6  $\mu$ l de Mix 2 a cada tubo y repipetear, colocarlos en el termociclador a 37°C durante 2 minutos y pausar.
- 4) Añadir a cada tubo 1.0  $\mu$ l de enzima transcriptasa reversa y repipetear, correr el programa a 37°C durante 50 minutos.
- 5) Dejar la última fase de inactivación a 70°C durante 15 minutos.

