



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

REGISTRO DE SERVICIO SOCIAL POR ACTIVIDADES RELACIONADAS CON LA PROFESIÓN

**“Técnicas de biología molecular aplicadas en ratones
transgénicos”**

OSVALDO RICARDO JUÁREZ MONROY
MATRICULA 2172031295

ASESOR EXTERNO: MARÍA DE JESÚS CHÁVEZ CANALES
ASESOR INTERNO: RAFAEL BOJALIL PARRA

Vo.Bo. ASESOR EXTERNO: MARÍA DE JESÚS CHÁVEZ CANALES

Vo.Bo. ASESOR INTERNO: RAFAEL BOJALIL PARRA

ALUMNO: OSVALDO RICARDO JUÁREZ MONROY

Lugar de realización del SS .- El servicio social se llevará a cabo en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" en el laboratorio de fisiología experimental de la unidad de investigación UNAM ubicado en :Juan Badiano 1, Belisario Domínguez Sección 16, Tlalpan, 14080 Ciudad de México, CDMX.



Marco Institucional:

Misión

Aliviar las enfermedades cardiovasculares mediante la investigación científica trascendente, educación profesional superior y una atención médica moderna con calidad humanitaria.

Visión

Ser líderes y referentes de la cardiología, inspirados en una filosofía de renacimiento de la excelencia científica y la actitud humanitaria. 1

Justificación:

Trimestre VII: Los fármacos como modificadores de funciones biológicas

En este trimestre manejamos animales de laboratorio para experimentos de farmacocinética, lo que me ayudó a tener las bases para el servicio social y ser aceptado en la institución donde emplee las técnicas aprendidas en la UAM- X en procedimientos de anestesia y eutanasia de animales de laboratorio. Gracias a ello he podido perfeccionar mi técnica en el manejo y sustento de animales de laboratorio además de aprender cómo se manejan los bioterios a gran escala, la selección de animales de acuerdo a los experimentos y el uso de bases de datos.

Trimestre XII : Tecnologías moleculares para el diagnóstico y la terapéutica.

Durante el trimestre XII nos encontrábamos en clases en línea debido al COVID-19 por lo que no tuve practicas de laboratorio y todo mi aprendizaje fue teórico, debido a esto para mi fue fundamental ser aceptado en el laboratorio de fisiología experimental en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chavez” ya que pude llevar a la práctica los conocimientos adquiridos durante el curso logrando uno de los objetivos pendientes es aplicar las técnicas de biología molecular en investigación biomédica tales como:

- Separación de moléculas por electroforesis
- Tecnología de amplificación de ácidos nucleicos (PCR)
- Tecnología basada en patrones de hibridación molecular (Western Blot)
- Además de trabajar con material y equipos de laboratorio nuevos para mi como el Termociclador o el Chemidoc y el uso de micropipetas.

Aporte a la sociedad:

Decidí realizar mi SS en una institución pública como el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” debido a que tiene un gran impacto en la sociedad mexicana ya que tiene una gran demanda de pacientes.

Además poder colaborar en el departamento de investigación supone una contribución social no solo para el instituto sino para la investigación biomédica a nivel nacional. Algunos de los experimentos llevan años de investigación y está reflejado en ellos el trabajo de muchos estudiantes como yo que dejaron su granito de arena como colaboradores, espero también poder aportar de forma positiva y que mi trabajo ayude al avance de la investigación biomédica.

Objetivo general:

Colaborar en el laboratorio de fisiología experimental en los experimentos que ahí se llevan a cabo con la finalidad de conocer, aplicar y analizar las técnicas de biología molecular empleadas.

Objetivos particulares:

- Conocer los fundamentos y llevar a cabo la separación de moléculas mediante electroforesis en muestras de ratones transgénicos.
- Conocer los fundamentos y llevar a cabo la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR en muestras de ratones transgénicos.
- Conocer los fundamentos y llevar a cabo la técnica analítica Western Blot en muestras de ratones transgénicos.

Duración del servicio social: Tendrá una duración de 6 meses de lunes a viernes de 10:00 a 14:00 o el equivalente a 480 h.

MARCO TEÓRICO:

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células.

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y H₂O. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión.

Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa.

El elemento principal en la PCR es el ADN, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación. El ADN se estructura en una doble hélice. La complementariedad entre las bases está dada por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, generando estabilidad a la doble hélice, la carga eléctrica del ADN es negativa y está dada por los grupos fosfatos.

En la PCR, el templado son las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés. Por su parte, la ADN polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco. La enzima más usada con frecuencia se llama Taq ADN polimerasa, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*. El rasgo que distingue a esta enzima bacteriana de otras ADN polimerasas de otros organismos es su capacidad para mantener su funcionalidad a temperaturas altas, por lo que se le considera una enzima termoestable.

Para que la enzima funcione con alta especificidad y la reacción transcurra exitosamente, también se necesita de los elementos ya mencionados como primers, dNTPs, Mg⁺, buffer y H₂O.

Los primers son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta.

Generalmente su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia. Si no se respetan estas reglas, existe la posibilidad de la formación de dímeros de primers, es decir, de productos inespecíficos. Esto repercutirá en el rendimiento de la reacción, así como en la especificidad del producto esperado.

Por su parte, los dNTP's son los "ladrillos" o bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN. Son factores importantes que contribuyen a la especificidad de la reacción, por ello es importante que su concentración sea la adecuada ya que de lo contrario pueden afectar la función de la Taq polimerasa. Normalmente, se utilizan a una concentración que oscila entre 0.2 a 1.0 mM.

El buffer es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8) .

El magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, por eso se debe tener una concentración adecuada para que no afecte el rendimiento de la Taq polimerasa; regularmente su concentración oscila entre 0.5 y 2.5 mM. En ocasiones ya viene incluido en el buffer, pero en otras se le tiene que agregar.

El agua es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas,enzimas que degradan a los ácidos nucleicos.

Cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión. 2

Durante la desnaturalización, el ADN se calienta a 95 °C para separar sus cadenas, siendo las secuencias ricas en G-C más resistentes debido a su tercer enlace. En la hibridación, los primers se alinean al extremo 3' del ADN y se unen a su secuencia complementaria a una temperatura óptima de 50-60 °C, asegurando una unión específica y estable. En la extensión, la Taq polimerasa cataliza la adición de dNTPs para completar la cadena de ADN en dirección 5' a 3', funcionando óptimamente a 72 °C. Al concluir, se obtienen amplicones del tamaño específico determinado por los pares de bases.

Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los productos son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa.

La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo con su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo un buffer TAE.

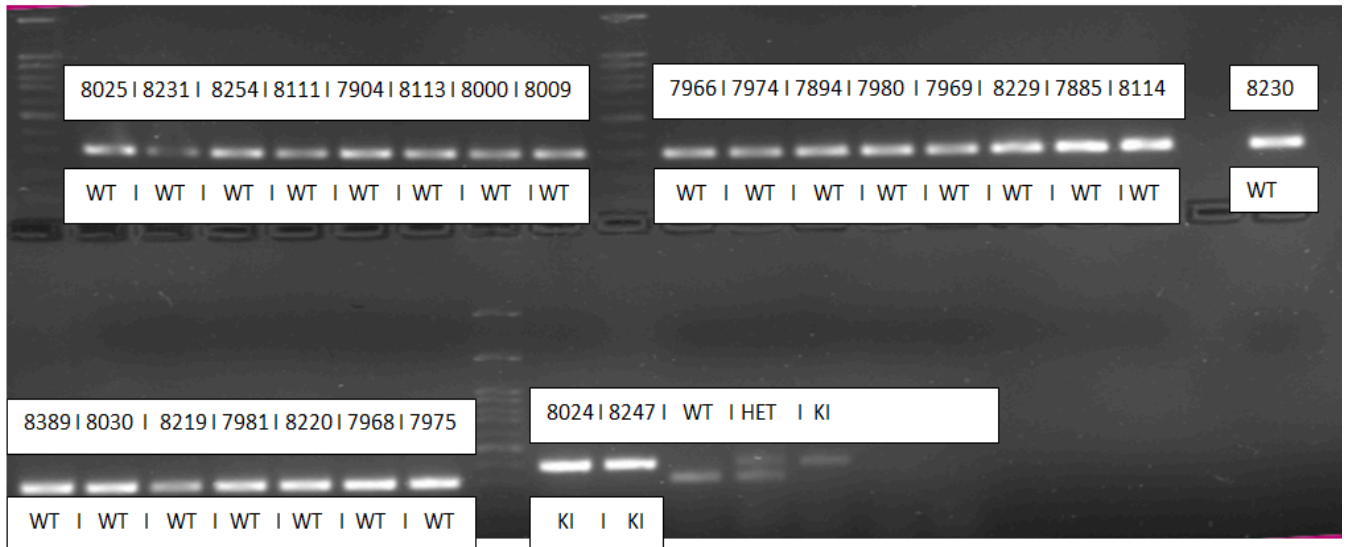
En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo. Para ello, se prepara un gel diluyendo una cantidad de agarosa en el buffer, se calienta hasta que la agarosa hierva hasta crear una solución homogénea y posteriormente se vacía a un recipiente que sirve de base para que solidifique. El porcentaje al que se prepara el gel depende del tamaño de las moléculas, puede ser de hasta el 2%. 3

Otro ingrediente que se agrega al gel es un compuesto conocido como bromuro de etidio, una molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena. Cuando es excitado con luz UV emite una señal que permite la visualización de los productos en forma de bandas. En el laboratorio usamos MIDORI Green Advance es una alternativa segura a la tinción tradicional de ácido nucleico con bromuro de etidio 4

Cuando los productos son corridos en el gel, éstos deben ser cargados junto con un marcador de peso molecular que contenga un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo que facilita la identificación de los productos y si su tamaño corresponde con el esperado. El tamaño está dado por el número de pares de bases del producto. 2

A continuación pongo algunos ejemplos de los genotipados por PCR que realicé en el laboratorio:

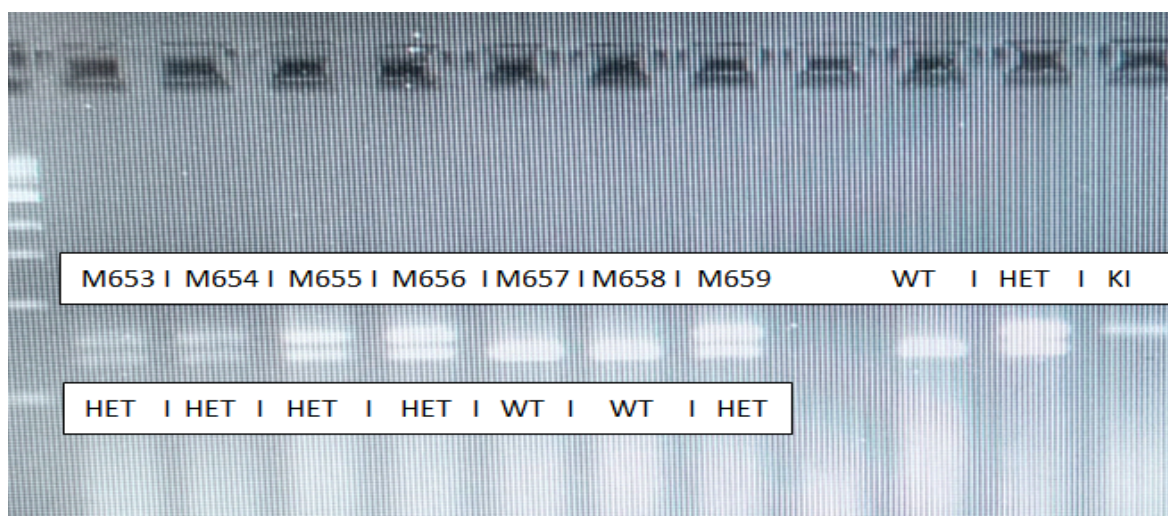
KLHL (R528H)	
Genotipo	Tamaño de banda
WT	308 pb
KI	383 pb
HET	308 y 383 pb



En la imagen se ejemplifica el resultado de la PCR en biopsias de colas de ratones. Se observa una sola banda de 308 pb en los carriles 2-9 ,11-18, 20-27 que nos indica que los individuos son homocigotos al tener dos alelos silvestres o wild type (WT)

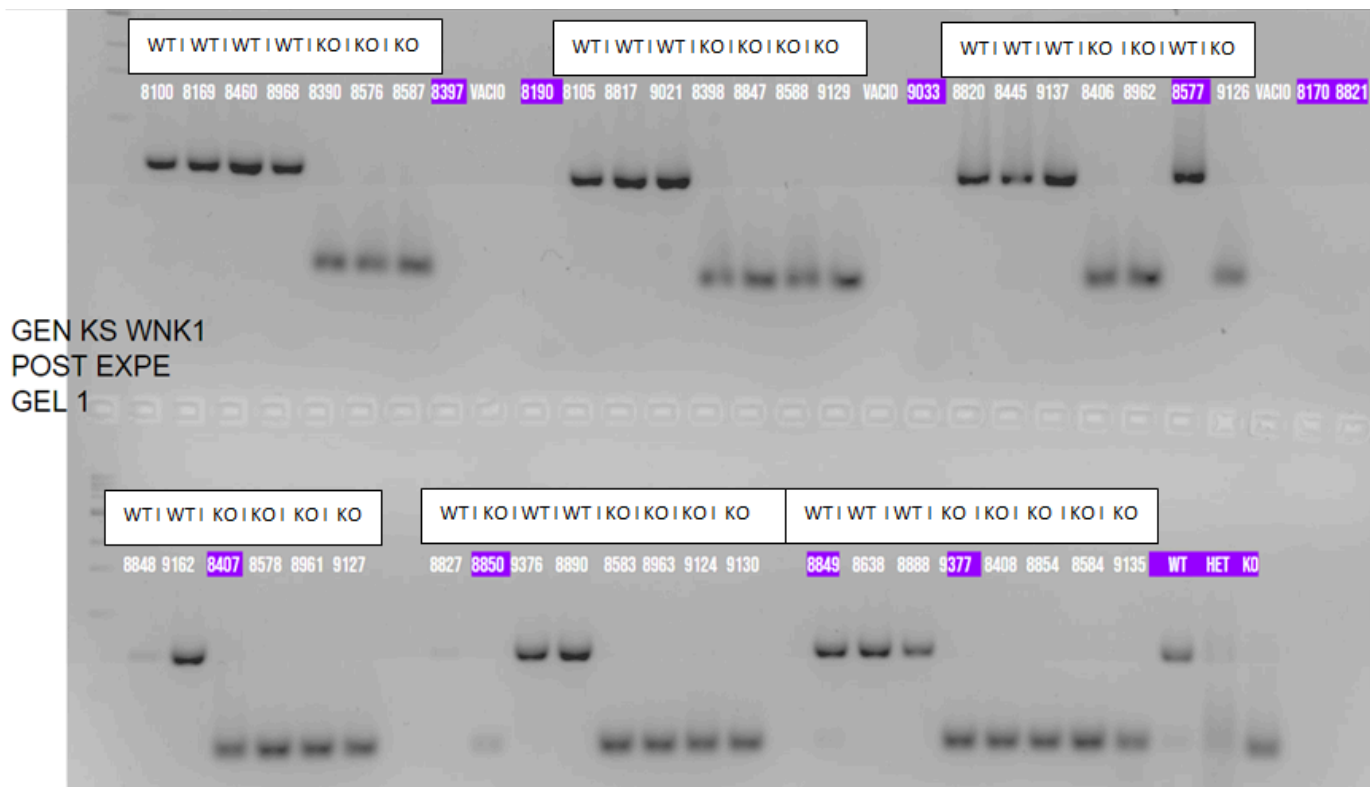
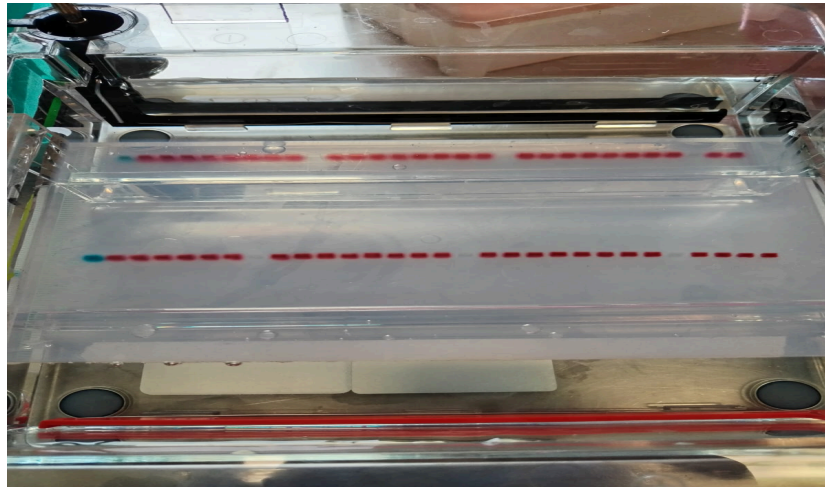
Los carriles 1,10,19,28 fueron cargados con un marcador de peso molecular. Se observa una sola banda de 383 pb en los carriles 29 y 30 que corresponden a los controles positivos , es decir homocigotos para el alelo mutante o Knock-in (KI) Los carriles 31,32 y 33 corresponden a los controles WT, Heterocigoto (Het) que presenta ambas bandas 308 pb,383 pb y KI respectivamente

En el laboratorio disponemos de diversas colonias de ratones transgénicos. Un ejemplo destacado es la colonia "Spak". En esta, los ratones poseen una mutación en la tirosina 243, un sitio de fosforilación. Debido a esta mutación, expresan una versión inactiva de la cinasa. A continuación se observan los resultados de una PCR para este gen.

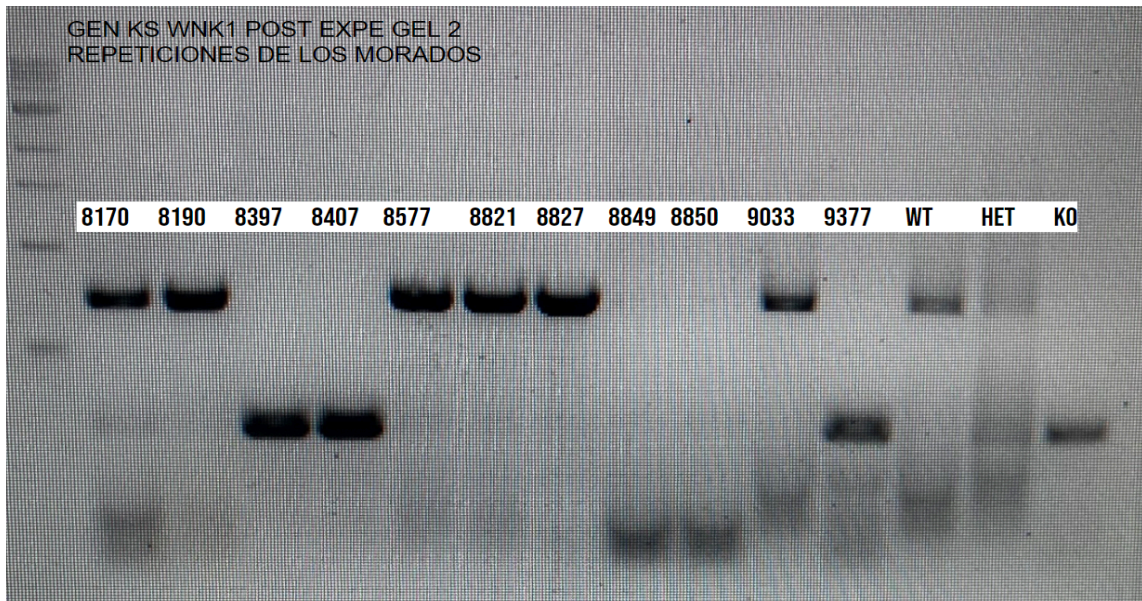


WT = silvestre o wild type
 Het= Heterocigoto
 KI= Homocigoto para el alelo mutante SPAK

Otra de las líneas de ratones que contamos es la de KS-WNK1 a continuación se observa un foto de la electroforesis en gel de agarosa de los productos de las biopsias y los resultados de la PCR.



*Los carriles en morado se repitieron debido a bandas inespecíficas, los resultados fueron los siguientes :



Western Blot

Es una técnica de laboratorio importante utilizada en biología celular y molecular. Mediante el uso de esta técnica los investigadores pueden identificar proteínas específicas de una mezcla compleja de proteínas extraídas de las células o tejidos.

La técnica utiliza tres elementos para realizar esta tarea: (1) separación por tamaño, (2) transferencia a un soporte sólido y (3) marcado de la proteína objetivo utilizando un anticuerpo primario y secundario adecuado para visualizar **5**

El método implica el uso de electroforesis en gel para separar las proteínas de la muestra. Las proteínas separadas se transfieren del gel a la superficie de una membrana. La membrana se expone a un anticuerpo específico contra la proteína en estudio. La unión del anticuerpo se detecta usando un marcador radiactivo o químico. **6**

Las proteínas presentan una carga eléctrica neta si se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoelectrico y por eso tienen la propiedad de desplazarse cuando se someten a un campo eléctrico. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa más rápida será la migración. Es decir, la velocidad de migración electroforética depende de la densidad de la carga de la molécula

(relación carga/masa), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis.

El voltaje no se puede incrementar indiscriminadamente porque se genera un excesivo calor. En contraste, al aplicar bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación, por causa de la difusión por un tiempo muy prolongado de corrida electroforética.

En el caso de la electroforesis de proteínas, el proceso se diferencia en función de los electrodos, el tampón de electroforesis y el soporte que utiliza.

Electrodos.

Habitualmente se utilizan los de platino de alta calidad.

Tampón de electroforesis.

El tampón de electroforesis (electrolito) debe cumplir los siguientes requisitos:

- Mantener el pH constante: ha de tener una alta capacidad de tamponación, ya que las partículas que se separan (en nuestro caso, las proteínas) ven afectadas sus cargas en función del pH y las reacciones en los electrodos ocasionan cambios en el pH.
- Mantener la corriente eléctrica.
- No debe haber interacciones con las partículas que se desea separar.
- El rango de pH debe estar entre 4 y 9.
- La fuerza iónica del tampón de electroforesis (electrolito) debe estar controlada; si la fuerza es muy alta, el proceso es lento, la movilidad disminuye, puede aumentar la temperatura y puede producirse la desnaturalización de las macromoléculas.

Soportes.

Los primeros soportes empleados en los procesos de electroforesis fueron el papel (acetato de celulosa, Whatman 3MM, etc.), más tarde se desarrollaron estructuras en tres dimensiones en forma de geles.

Los primeros geles utilizados fueron los de almidón, que mejoraron la resolución con respecto al papel, pero no permitían controlar las dimensiones del poro. Así pues, se desarrollaron los dos tipos de geles más utilizados en las electroforesis, que son los geles de acrilamida para las electroforesis de proteínas y los geles de agarosa para las electroforesis de ácidos nucleicos.

Geles de acrilamida. Ofrecen las siguientes ventajas:

- Se puede controlar los tamaños de poro.
- Se pueden polimerizar con la forma que convenga: de tubo, de lámina para intercalar entre dos placas, de diferentes espesores, etc.
- Soportan una amplia gama de tampones
- Permite separaciones rápidas
- Permiten una amplia gama de tinciones.

Los cuatro componentes fundamentales para la polimerización de un gel de acrilamida con estructura tridimensional porosa son:

- Acrilamida.
- Bisacrilamida.
- TEMED (tetraetilenmetilendiamina).
- APS (persulfato amónico).

La molécula de APS es la iniciadora de la reacción y en disolución se encuentra en forma de radical libre, es muy activa y actúa sobre una molécula de acrilamida. Así transmite su capacidad de radical libre a esta molécula, que a su vez actúa sobre otras moléculas de acrilamida y da lugar a un polímero lineal.

Estas reacciones de polimerización son catalizadas por el TEMED.

La bisacrilamida actúa como agente enlazante.

El poro tiene un tamaño medio que se controla por el porcentaje de acrilamida que utilizamos al preparar el gel. Este porcentaje iría desde el 4 hasta el 30%. Por encima o por debajo de este rango los geles no son utilizables, puesto que se vuelven demasiado consistentes y frágiles o demasiado líquidos, respectivamente. Cuanto mayor es el porcentaje de acrilamida menor es el tamaño del poro.

Electroforesis en condiciones desnaturizantes

Puesto que se trabaja con tampones que tienen diferentes pH y las proteínas ven afectada su carga en función de este parámetro, en principio el efecto que tendría el pH en la carga de las proteínas de una mezcla compleja de macromoléculas sería desconocido. Por esta razón, la mayoría de las electroforesis actuales se realizan en condiciones desnaturizantes (SDSPAGE).

Este tipo de electroforesis se basa en la desnaturización de las proteínas. Para ello se utiliza el denominado tampón de muestra o sample buffer (SB). La composición de este tampón es la siguiente: SDS, betamercaptoetanol, glicerol, Tris/HCl (pH 6,8) y azul de bromofenol.

El SDS es una sal sódica, un detergente de carga negativa. Este compuesto es capaz de unirse a las proteínas y conferirles carga negativa debido a que «enmascara» la propia carga de las proteínas. La unión del SDS con las proteínas se produce en una proporción constante, es decir, cada gramo de proteína es capaz de unirse a 1,4 g de SDS.

La relación carga/masa de la proteína, por lo tanto, va a ser constante para todas las proteínas de una mezcla compleja.

El betamercaptoetanol reduce cualquier puente disulfuro de la proteína.

El glicerol aumenta la densidad y asegura que la muestra tenga en el pocillo una densidad superior que la del electrolito y la muestra permanezca estable.

El azul de bromofenol tiene una movilidad electroforética superior a la de las proteínas que se tienen en la muestra. Se utiliza como marcador del frente de electroforesis e indica cuándo se debe interrumpir la electroforesis

Al ser constante la relación entre la carga y la masa de las proteínas, éstas se van a mover a través del gel por su tamaño y por la mayor o menor posibilidad de atravesar los poros. Al representar el logaritmo del peso molecular de las moléculas con respecto a la movilidad electroforética, hay linealidad. Por esta razón, y como

referencia para poder obtener el peso molecular de una proteína o para identificar una proteína en concreto en el gel, se hace pasar por el gel una muestra de marcador de peso molecular. Estos marcadores son moléculas purificadas conocidas con distintos valores de peso molecular.

Inmunotransferencia

La técnica de inmunotransferencia (immunoblotting o Western blot) es un sistema rápido y muy sensible para la detección y caracterización de proteínas que se basa en la especificidad de reconocimiento entre antígeno y anticuerpo. Implica la separación por electroforesis por el sistema SDS-PAGE y una transferencia cuantitativa e irreversible a una membrana de PVDF o nitrocelulosa de las proteínas de una mezcla compleja (lisado total celular). Los antígenos que se han transferido a la membrana son reconocidos por anticuerpos monoclonales o policlonales específicos de ellos.

Sistemas de transferencia

Transferencia semiseca

Se realiza en horizontal y entre papeles de filtro saturados en tampón de transferencia (usamos el Extra Thick Blot Paper de Bio-Rad). Este sistema reduce la cantidad de tampón necesario y además permite transferencias más rápidas, debido a que los electrodos se encuentran más próximos. Para la transferencia, se utiliza el Trans Blot SD semi-dry cell, y como fuente de alimentación, la Power Pac HC, de Bio-Rad. La transferencia se realiza en 40 min a un voltaje constante de 20 V.

Transferencia húmeda o en tanque

El sistema es vertical y completamente sumergido entre dos paneles conectados a electrodos. Es especialmente recomendable para proteínas difíciles de transferir (> 100 kDa o hidrófugas), aunque como es necesario que las transferencias se realicen durante más tiempo, se requiere un sistema que mantenga la temperatura constante. Suelen llevar entre 30 min y 1 h si se realizan a 100 V, o se pueden realizar durante toda la noche en cámara fría a 14 V.

Membranas

Las membranas más utilizadas actualmente son las de PVDF (fluoruro de polivideno) que son hidrófugas, por lo que es muy importante sumergirlas en metanol, después en agua y otra vez en metanol, 5 min cada una de las inmersiones y por ese orden, para posteriormente tenerlas 15 min sumergidas en tampón de transferencia a una temperatura de 4 °C. Estas membranas tienen la ventaja frente a otras (nitrocelulosa o nailon) de una alta capacidad para unir biomoléculas, además de que son más manejables y permiten una amplia gama de tinciones reversibles y métodos de detección.

Tinción reversible

La solución rojo Ponceau (0,5% Ponceau-S red, 1% ácido acético) permite una tinción reversible, fácilmente eliminable, que provee importante información. La membrana se mantiene unos minutos en la solución y, a continuación, se destiñe en agua destilada, lo que permite visualizar los marcadores de peso molecular y cada uno de los carriles transferidos; se puede marcar sobre la membrana con lápiz antes de proceder al desteñido total de la membrana con agua, lo cual es necesario para continuar con el proceso de la membrana.

Bloqueo

Las membranas con el material transferido se bloquean para impedir uniones inespecíficas del anticuerpo que se utiliza en la técnica. Este proceso se realiza mediante la incubación de la membrana en una solución de bloqueo, compuesta, por lo general, por proteínas que no reaccionan después con el anticuerpo.

Se suele utilizar como disolvente para la solución de bloqueo tampón de lavado TBS-t (Tween 20 en TBS).

Para el bloqueo utilizamos leche al 10% diluida en TBS-t 0.2%

Anticuerpos

Las proteínas inmovilizadas en la membrana se incuban con anticuerpos primarios específicos que permiten identificar y cuantificar proteínas concretas de una mezcla compleja de proteínas.

En la actualidad se usan fundamentalmente dos tipos de preparaciones de anticuerpos para Western blot:

anticuerpos policlonales, cuyas preparaciones incluyen múltiples moléculas de anticuerpo que se unen a un antígeno concreto.

anticuerpos monoclonales que poseen la ventaja de ser específicos en sus interacciones porque únicamente se unen a un epítipo en particular, es decir a una única región del antígeno.

Detección.

Se realiza a partir de la incubación de la membrana con anticuerpos secundarios con una actividad enzimática. Estos anticuerpos se unen específicamente a las regiones de los anticuerpos primarios que no se unen a los antígenos.

Cuando utilizamos un anticuerpo primario que se obtuvo de un animal (p. ej., de ratón), tenemos que usar como anticuerpo secundario uno que se haya producido en otro animal (p. ej., conejo o cabra) y que sea capaz de reconocer el anticuerpo primario en las regiones que no se unen al antígeno.

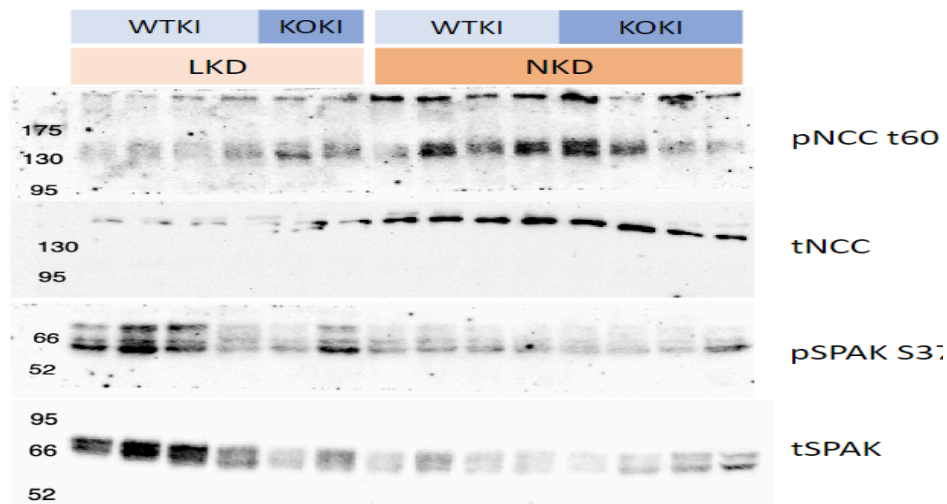
Las actividades enzimáticas que se suelen utilizar conjugadas con anticuerpos secundarios son la fosfatasa alcalina (AP) y la peroxidasa horseadish (HRPO), ya que permiten la detección de la unión antígeno-anticuerpo mediante sustratos luminiscentes. También se pueden usar sustratos cromogénicos, pero la detección de los sustratos luminiscentes es mucho más rápida y más sensible. Nosotros

usamos un kit comercial llamado ECL Western Blotting, Amersham, que se basa en la acción de la actividad enzimática HRPO o AP sobre compuestos (como el luminol). Esta reacción luminosa será la que impresione una película autorradiográfica. Este método es muy útil, porque permite conseguir una mayor sensibilidad variando el tiempo de exposición de la película autorradiográfica y porque el resultado obtenido puede ser fácilmente fotografiado o digitalizado, lo cual permite cuantificación por densitometría.

Aplicaciones del Western Blot

Sus aplicaciones son muy numerosas. Dentro del campo de la biomedicina, para englobarlas por grupos, diremos que tiene aplicaciones diagnósticas en enfermedades infecciosas, enfermedades hereditarias y congénitas, enfermedades autoinmunitarias, y un extenso y cada vez más amplio papel en el cáncer, tanto para el diagnóstico precoz y el tratamiento como en investigación básica y aplicada. Otros campos en los que se utiliza esta técnica son la inmunología y áreas relacionadas con ésta, como la inflamación y el envejecimiento celular, y por supuesto en el ámbito de las enfermedades infecciosas y la microbiología, la genética y es una herramienta más de la genómica. 7

Un ejemplo de lo realizado durante mi servicio social en cuanto a WB se ejemplifica en las siguientes imágenes donde el objetivo fue analizar la fosforilación de las muestras de NCC, por que se se realizó un WB contra NCC, pNCC y SPAK, pSPAK.



Ejemplo de un Western Blot en el que se realizó el análisis de la expresión (tNCC) y la fosforilación (pNCC) del cotransportador de sal NCC y de sus cinasa reguladora SPAK .

Manejo y mantenimiento de animales de laboratorio

El uso de animales de laboratorio en estudios de investigación biomédica y producción de reactivos biológicos en general, requiere que éstos sean los apropiados para que proporcionen la seguridad en los resultados esperados, para ello, es necesario contar con bioterios que brinden animales de calidad microbiológica y genéticamente definidos mantenidos bajo condiciones estandarizadas y de acuerdo con normas internacionales establecidas.

El **animal de laboratorio** es aquel que:

- Es engendrado y producido en condiciones controladas.
- Mantenido en un entorno controlado.
- Posee claros antecedentes genéticos y microbiológicos.
- Existe una comprobación sistemática de estos antecedentes.

También es definido como cualquier especie animal que, mantenido bajo determinadas condiciones controladas es utilizado como instrumento de medida en experimentación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y docencia, para la generación de datos, los cuales son utilizados como información. Ejemplo de estas especies son: el ratón, la rata, el hámster, el conejo, el perro, el mono etc.⁸

Protocolos para el cuidado y uso de animales

Deben tomarse en cuenta los siguientes tópicos en la preparación y revisión de los protocolos para el cuidado y uso de los animales:

- Razón y objetivos propuestos para el uso de los animales. Justificación de la especie y número de animales requeridos.
- Justificación de la especie y número de animales requeridos. Siempre que sea posible, el número debe justificarse estadísticamente.
- Disponibilidad y conveniencia del uso de procedimientos menos invasivos, otras especies, preparación de órgano aislado, cultivo de células o tejidos o simulación por computadora.
- Calidad de entrenamiento y experiencia del personal en los procedimientos usados.
- Requerimientos de crianza y albergue.
- Sedación, analgesia y anestesia apropiadas. Las escalas de dolor o invasividad pueden ayudar en la preparación y revisión de los protocolos.
- Duplicación innecesaria de experimentos.
- Realización de múltiples procedimientos operativos.
- Se deben considerar los siguientes puntos para la elaboración y revisión de los protocolos para el cuidado y uso de los animales.
- La realización de varias intervenciones quirúrgicas mayores, en el mismo animal

- Criterios y mecanismos para la intervención oportuna, retiro de los animales del experimento o eutanasia, en caso de prever la ocurrencia de dolor o estrés grave.
- Cuidados después del procedimiento
- Métodos de eutanasia y eliminación de los cadáveres.
- Ambiente laboralseguro para el personal.⁹

Las responsabilidades del investigador, tal como están enunciadas en los "US Government Principles for Utilization and Care of Vertebrate Animals Used in Testing, Research and Training" (IRAC 1985; vea Apéndice D). La interpretación y aplicación de estos principios requieren de conocimientos profesionales.

Los principios que promueve son, en resumen:

- El diseño y realización de los procedimientos con base en su relevancia para la salud humana y animal, el avance del conocimiento y el bien de la sociedad
- El uso de las especies, calidad y número apropiados de animales
- El evitar o reducir al mínimo la incomodidad, estrés y dolor, siempre y cuando sea compatible con una buena ciencia.
- El uso apropiado de sedación, analgesia y anestesia
- El establecimiento de metas y objetivos en el experimento
- Brindar un manejo apropiado a los animales, dirigido y realizado por personas calificadas
- La conducción de experimentos en animales vivos sólo por, o bajo la, estricta supervisión de personas calificadas y con experiencia.

En general, dichos principios establecen responsabilidades para los investigadores, cuyas actividades relacionadas con el empleo de animales está sujeta a vigilancia por un comité institucional para el cuidado y uso de animales (CICUAL).¹⁰

REFERENCIAS:

1. *Presentación*. (s. f.). Instituto Nacional de Cardiología - Ignacio Chávez.
2. Leblabor. (2020). PCR o reacción en cadena de la polimerasa. *LEB Laboratorios*. <https://leblaboratorios.com.ar/pcr/%7D>
3. De Dios L, T., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
<https://biblat.unam.mx/es/revista/investigacion-en-discapacidad/articulo/funda>

mentos-de-la-reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa-pcr-y-de-la-pcr-en-tiempo
-real

4. Nippon Genetics Europe GmbH. (2023, 12 Junio). *Midori Green Advance - Nucleic Acid Stain* | NIPPON Genetics EUROPE. NIPPON Genetics EUROPE.
<https://www.nippongenetics.eu/en/products/electrophoresis-dna-rna/nucleic-acid-stains/midori-green-advance/>
5. Mahmood, T., & Yang, P. (2012). Western Blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429.
<https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
6. *Western Blot* | NHGRI. (s. f.). Genome.gov.
<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Western-Blot#:~:text=%E2%80%8BWestern%20Blot&text=El%20m%C3%A9todo%20implica%20el%20uso,contra%20la%20prote%C3%ADna%20en%20estudio>
7. González, A., Lozano, J. R., & Fonseca, E. (2007). Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western Blot). *Piel*, 22(5), 252-258. [https://doi.org/10.1016/s0213-9251\(07\)73064-2](https://doi.org/10.1016/s0213-9251(07)73064-2)
8. Fuentes, F., Mendoza R., Rosales, A., Cisneros, R., (2008) Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón. Ministerio de salud. Instituto Nacional de Salud. Centro Nacional de Productos Biológicos Instituto Nacional de Salud LIMA.
9. Universidad de Costa Rica :guía para el manejo de animales de laboratorio adaptada a partir de los siguientes documentos por Jorge Granados Zúñiga, ACCMAL, Costa Rica: 1. Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals. Vol 1. Ottawa. 1980. 106 p.p. 2. National

Research Council: Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington. 1996. 125 p.p. Comité Revisor: Liliana Pazos Sanou, ACCMAL, Costa Rica. Gerardo Huertas, WSPA, Costa Rica. Patricia Arguedas, WSPA, Costa Rica. Rubén Arjona, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Costa Rica.

10. Copyright National Academy Press, Washington, D.C. (1996) Changes and suggestions made by Drs. Manuel J. Jayo and F. Javier Cisneros. Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences National Research Council Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional De Medicina. 1999.