

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

“Identificación de la localización de las proteínas WNK, SPAK y KCC
en núcleos hipotalámicos”

Autor

Gianelli Anahí Bonilla García

Asesores

Dra. María de Jesús Chávez Canales



Asesor externo

M. en C. Patricia Martínez Cruz



Asesor interno

Laboratorio de Fisiología Experimental. Instituto de Investigaciones
Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

Índice

Identificación de la localización de las proteínas WNK, SPAK y KCC en núcleos hipotalámicos.	3
Inmunofluorescencias en cortes de cerebro de ratones SPAK T243A/243A con tratamiento de anticuerpos WNK, SPAK, KCC.	5
Identificación de la expresión de la cinasa WNK en núcleos hipotalámicos: PVN y NSQ. Imágenes obtenidas de cortes vistos al microscopio.	6
Identificación de la expresión de la cinasa WNK en núcleos hipotalámicos PVNx, NSQ.	6
Identificación de la expresión de la cinasa WNK3 en núcleos hipotalámicos ARC, PVN, NSQ.	7
Identificación de la expresión de la cinasa WNK4 en núcleos hipotalámicos ARC, DMH, PVN, VMH, NSQ.	7
Identificación de la expresión de la cinasa SPAK en núcleos hipotalámicos ARC, DMH, PVN, VMH, NSQ.	8
Identificación de la expresión de la cinasa KCC2 en núcleos hipotalámicos ARC, DMH, PVN, VMH, NSQ.	9
Conclusiones	10
Perspectivas futuras	11
Bibliografía	11

Identificación de la localización de las proteínas WNK, SPAK y KCC en núcleos hipotalámicos.

Actualmente la obesidad y el sobrepeso son problemas prioritarios de salud pública en México ya que se asocian con el desarrollo de otras patologías. Estas dos enfermedades son producto del desbalance entre la ingesta calórica y el gasto energético y, dado que estas dos funciones emiten señales periféricas que posteriormente percibe el hipotálamo, éste último juega un papel crítico en el control de estas.

El hipotálamo es un área cerebral compleja formada por distintas áreas que a su vez está compuesta por grupos neuronales diferentes que se comunican entre sí para establecer asas de retroalimentación negativas que inhiben o activan la ingesta de alimento o saciedad y la termogénesis dependiendo de este estado nutricional.

La leptina es uno de los principales indicadores del estado metabólico ya que se produce proporcionalmente a la cantidad del tejido adiposo. Así, mientras mayor es el número de adipocitos, más leptina se secreta y más llega al hipotálamo. Éste integra la señal de la leptina como excesiva y reprime el almacenamiento de nutrientes y la ingesta alimenticia, lo que a su vez promueve el gasto energético para lograr el equilibrio.

Paradójicamente, en personas obesas ocurre que, a pesar del gran número de leptina asociada al tejido adiposo, la ingesta calórica es alta y el gasto energético es bajo. Por lo que resulta de sumo interés estudiar los mecanismos por los que la leptina promueve estas funciones para entender y abordar la fisiopatología de la obesidad.

Estudios en roedores han demostrado que modificaciones de la transmisión sináptica GABAérgica inducida por la leptina en el hipotálamo alteran la ingesta o el gasto energético con consecuencias en el peso corporal y que existen grupos neuronales específicos que controlan uno u otro proceso. Particularmente los efectos sobre el gasto energético y la termogénesis en los que este protocolo se enfocará ocurren en varios tipos neuronales como las neuronas MSH y las neuronas RIP del hipotálamo. Las neuronas RIP son neuronas en el núcleo arqueado (ARC) y el núcleo ventromedial (VMH) que

responden a estímulos metabólicos como la leptina y la glucosa y modifican y regulan la termogénesis principalmente en el tejido adiposo pardo , pero también de otros tejidos termogénicos.

En el laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, se cuenta con ratones transgénicos que son resistentes a la obesidad inducida por una dieta alta en grasa ya que muestran un aumento en el gasto energético, pero sin modificaciones en su ingesta calórica. Estos ratones expresan una versión inactiva de la proteína SPAK (ratones SPAK T243A/T243A) que se ha descrito como un elemento importante en el mantenimiento de la concentración intracelular del cloruro por la regulación de la fosforilación y por ende de la actividad de los cotransportadores Na^+ , K^+ y Cl^- SLC12A, N(K)CC, y KCC.

Como mecanismo de prevención de la obesidad ante una dieta alta en grasa de estos ratones, se plantea que la pérdida de la función de SPAK en los ratones SPAK T243A/243A causa la inhibición de NKCC1 y la activación de KCC2 en neuronas del núcleo paraventricular (PVN) en el hipotálamo, lo que hace que la sinapsis GABAérgica proveniente de las neuronas RIP del ARC inducida por la leptina del hipotálamo sea aún más hiperpolarizante y se observe más termogénesis.

Así, el circuito ARC-PVN-Tejido adiposo interpreta la señal de la leptina de manera exagerada y esto aumenta el efecto de esta hormona sobre el gasto energético del tejido adiposo e incluso de otros tejidos. De acuerdo con esta hipótesis, los ratones SPAK T243A/243^a en una dieta alta en grasa son resistentes a la obesidad por tener un mayor gasto energético estimulado por una hipersensibilidad a la leptina en el circuito ARC-PVN-NTS-RPa-Tejido adiposo al tener menores concentraciones de cloruro intracelular en neuronas de este circuito y más sensibles al GABA.

Por ello, el objetivo de este protocolo es identificar la localización de algunos elementos de la vía de la señalización como lo son las cnasas WNK, SPAK y KCC en los núcleos hipotalámicos encargados de la termogénesis y el metabolismo energético bajo la hipótesis de que las proteínas WNK, SPAK y el cotransportador KCC se encuentran localizados en los núcleos

supraquiasmático (NSQ), PVN, ARC, dorsomedial (DMH) y VMH y existe una expresión diferencial de las proteínas WNK y KCC dentro de los mismo núcleos.

Inmunofluorescencias en cortes de cerebro de ratones SPAK T243A/243A con tratamiento de anticuerpos WNK, SPAK, KCC.

Protocolo escrito por Vanessa Romero y María Chávez

Soluciones

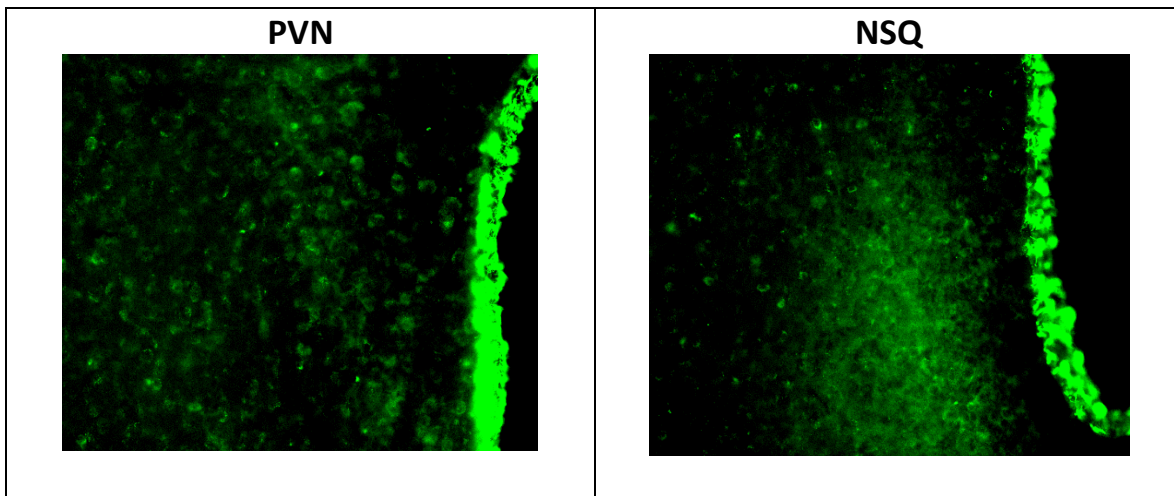
TBS-T		Solución de bloqueo/ diluyente		Solución de DAPI	
TBS 1X	50 ml	TBS-T	10 ml	TBS 1X	2 ml
Tritón	25 ul	3%Donkey Serum	300 ul	DAPI Stock	0.2 ul

Metodología de las inmunofluorescencias.

1. En una placa de 12 pozos, añadir a 1 ml de TBS-T a 3 pozos.
2. Elegir corte de cerebro dependiendo el núcleo por analizar.
3. Transferir el corte con un gancho de vidrio a uno de los pozos que contienen TBS-T.
4. Realizar 3 lavados con TBS-T durante 5 minutos cada uno en agitación.
5. Incubar el corte con la solución de bloqueo durante 1h a temperatura ambiente y en agitación.
6. Preparar los anticuerpos primarios en la solución diluyente (1ug/ml).
7. Después del bloqueo incubar el corte con anticuerpo primario durante dos noches a 4°C y en agitación.
8. Preparar los anticuerpos secundarios en la solución diluyente (1:1000).
9. Incubar el corte con anticuerpo secundario por 2h a temperatura ambiente y en agitación. NOTA: A partir de este paso el corte debe cubrirse con aluminio.
 - a. Si se utiliza un anticuerpo biotinilado, después del paso anterior:
 - i. Realizar 3 lavados con TBS-T durante 5 minutos cada uno en agitación.
 - ii. Preparar la estreptavidina 1:1000 en la solución diluyente.
 - iii. Incubar el corte con estreptavidina por 45 minutos a temperatura ambiente en agitación.

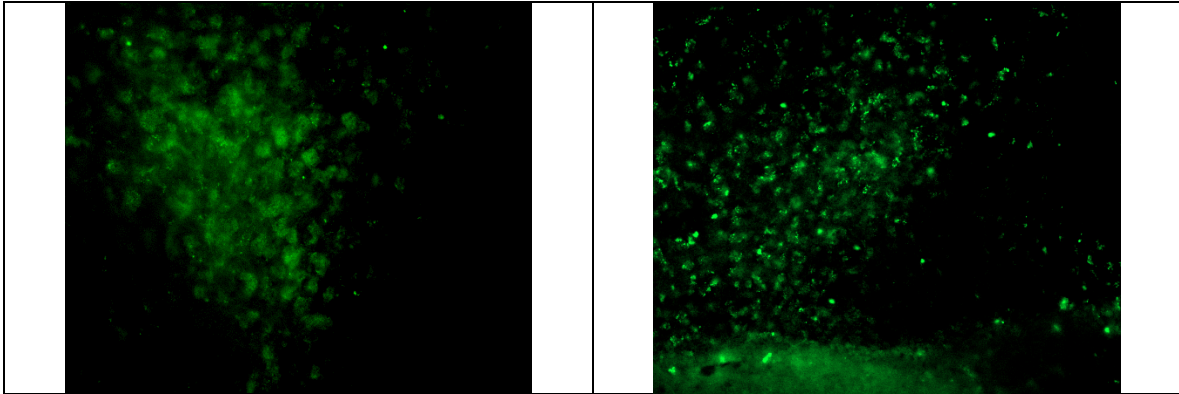
10. Realizar 3 lavados con TBS-T durante 5 minutos cada uno en agitación.
11. Dejar el corte en TBS 1X durante 1 noche a 4°C. Sin agitación y cubierto con aluminio.
12. Al día siguiente, pasar el corte a una laminilla cargada y dejar secar por completo.
13. Colocar la solución de DAPI por 10 minutos.
14. Pasar rápidamente la laminilla a un vaso coplin con agua destilada para quitar el excedente de DAPI.
15. Cubrir la laminilla con medio de montaje (100ul por laminilla (6 cortes)).
16. Ver al microscopio.

Identificación de la expresión de la cinasa WNK en núcleos hipotalámicos: PVN y NSQ. Imágenes obtenidas de cortes vistos al microscopio.

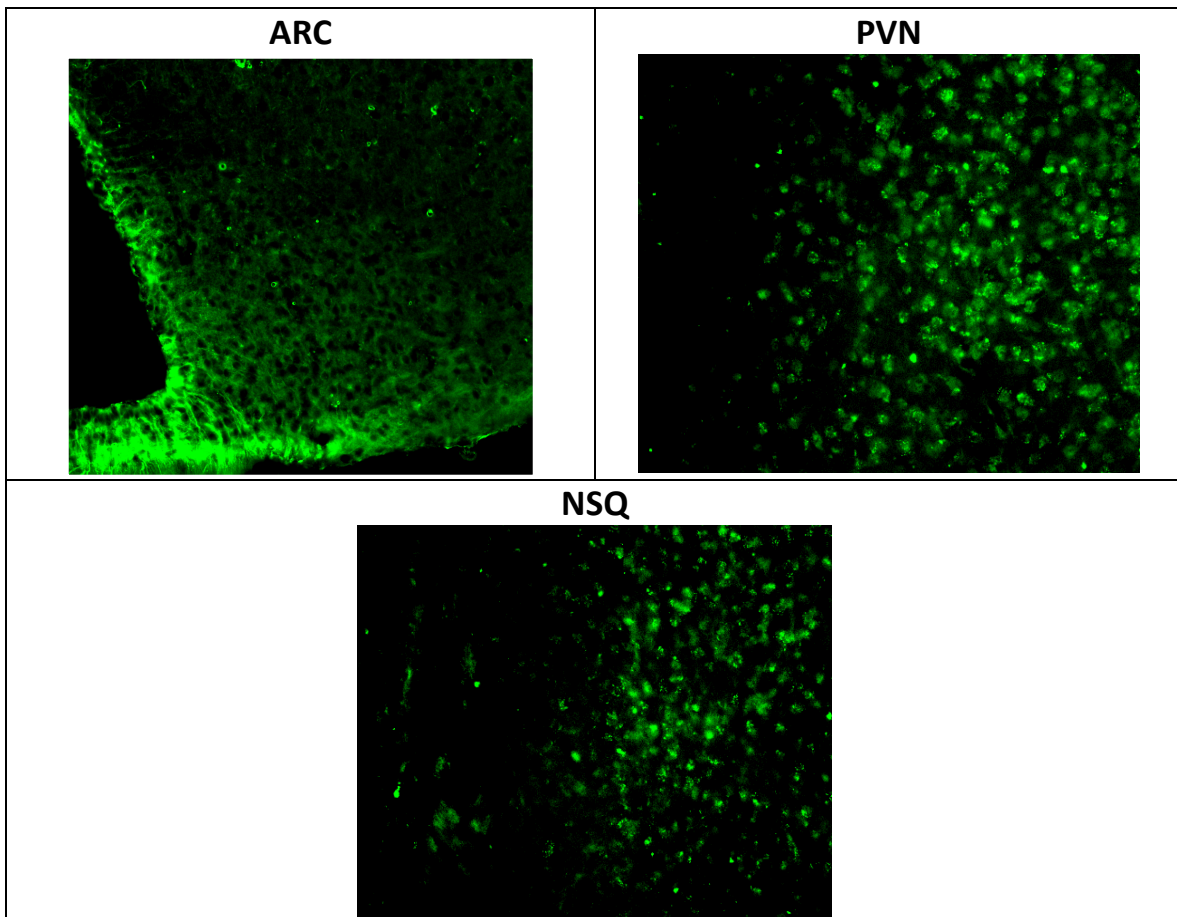


Identificación de la expresión de la cinasa WNK en núcleos hipotalámicos PVNx, NSQ.

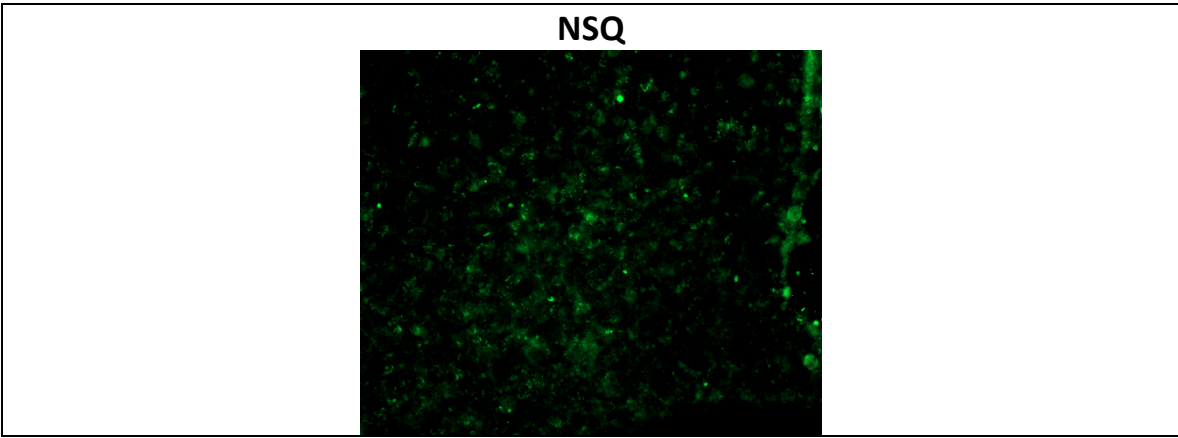
PVN	NSQ
------------	------------



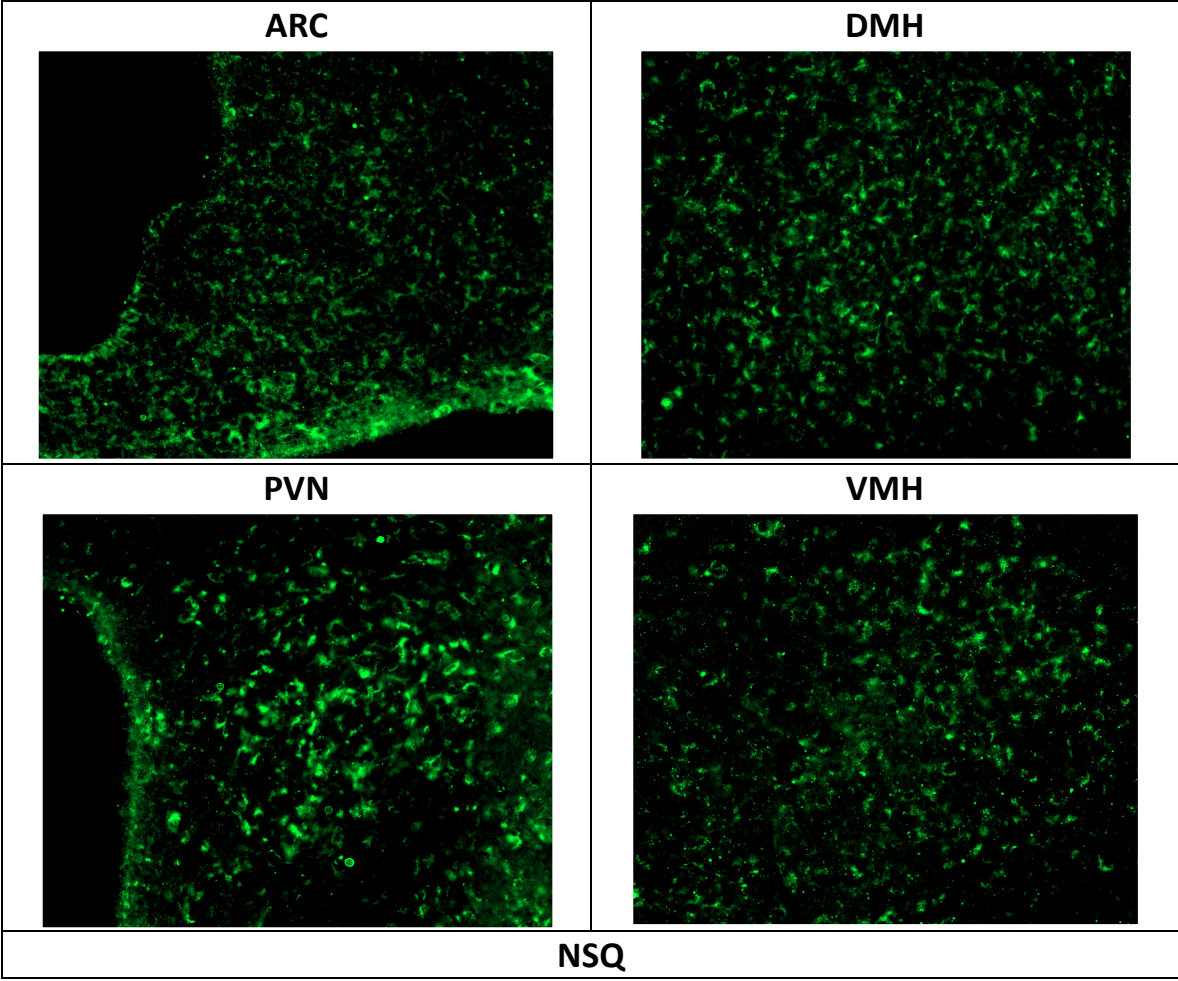
Identificación de la expresión de la cinasa WNK3 en núcleos hipotalámicos ARC, PVN, NSQ.

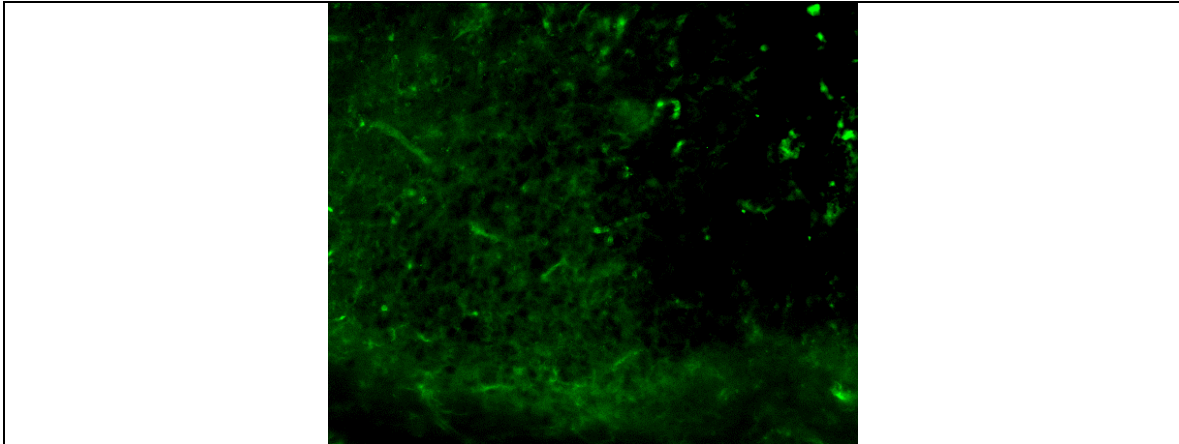


Identificación de la expresión de la cinasa WNK4 en núcleos hipotalámicos ARC, DMH, PVN, VMH, NSQ.

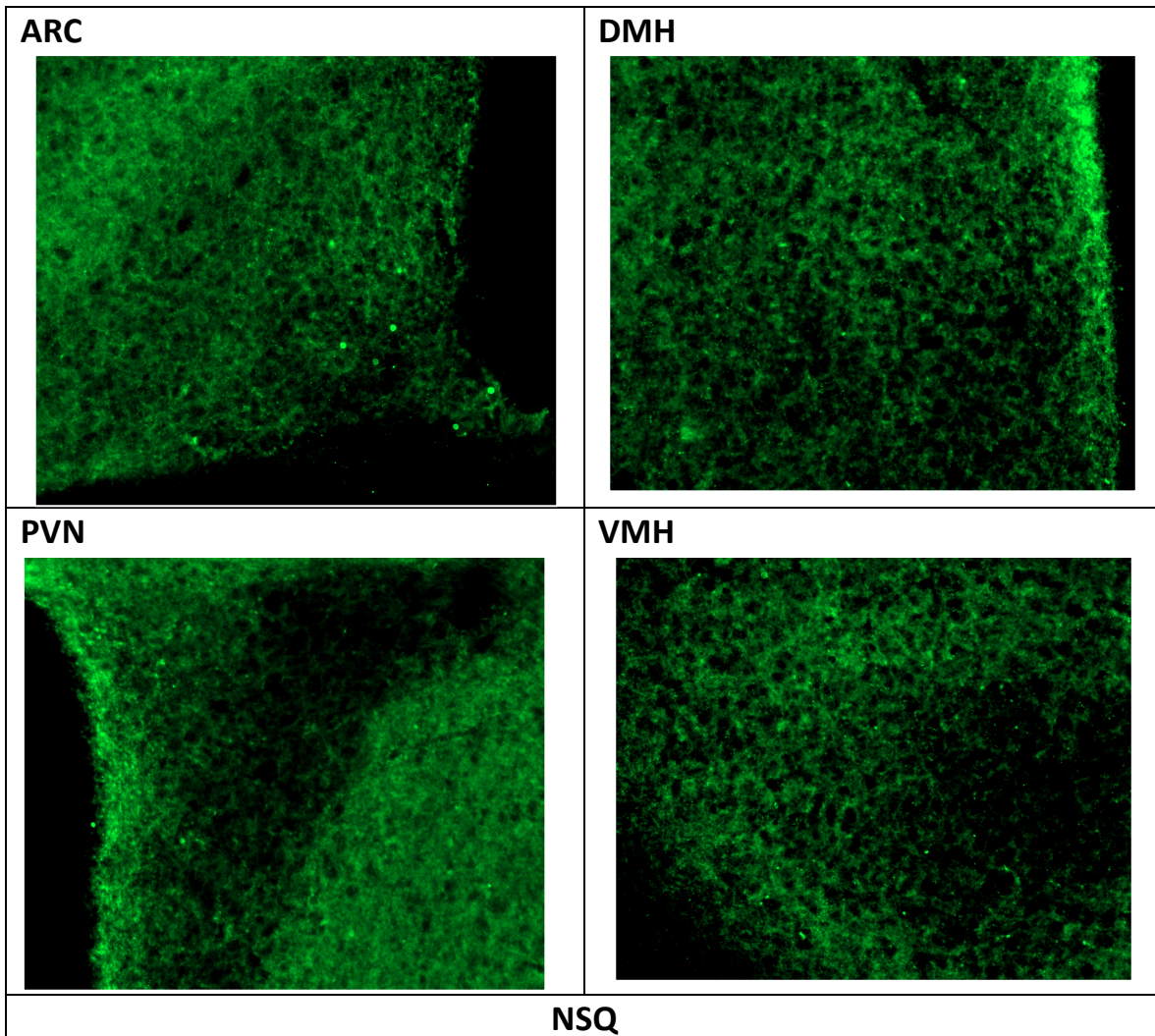


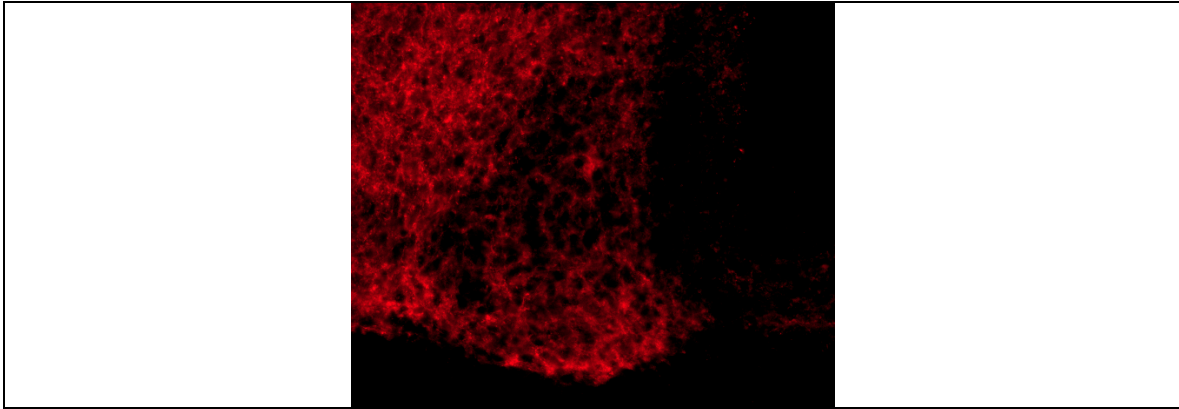
Identificación de la expresión de la cinasa SPAK en núcleos hipotalámicos ARC, DMH, PVN, VMH, NSQ.





Identificación de la expresión de la cinasa KCC2 en núcleos hipotalámicos ARC, DMH, PVN, VMH, NSQ.





Conclusiones

El trabajo realizado ha cumplido con éxito el objetivo principal del servicio social, que es brindar al estudiante la oportunidad de aprender técnicas de biología e investigación en un entorno de laboratorio. A través de este proyecto, el autor ha adquirido habilidades prácticas y conocimientos teóricos que son fundamentales para su formación académica y profesional en el campo de las ciencias biomédicas. El servicio social proporcionó al autor la oportunidad de familiarizarse y adquirir experiencia en el manejo de un laboratorio de investigación. Esto incluye el aprendizaje de protocolos experimentales, técnicas de manipulación de muestras biológicas, uso de equipos de laboratorio y prácticas de seguridad y ética en la investigación biomédica. Estas habilidades son esenciales para cualquier carrera científica y han enriquecido el bagaje académico y profesional del autor.

En cuanto al conocimiento aportado en este servicio social, se logró el análisis de las imágenes de cortes cerebrales ha permitido identificar la expresión de las cinasas WNK, SPAK y KCC en diferentes núcleos hipotalámicos. Este hallazgo sugiere que estas proteínas están ubicuamente presentes en regiones clave para el control del metabolismo, lo que respalda la relevancia de su estudio en el contexto de la regulación del balance energético y la obesidad.

La ubicuidad de las proteínas WNK, SPAK y KCC en el hipotálamo resalta su papel central en la regulación de procesos fisiológicos críticos, como la ingesta de alimentos, el gasto energético y la termorregulación. Comprender la expresión y función de estas proteínas en el contexto de la obesidad y otras enfermedades metabólicas puede abrir nuevas vías de investigación y potenciales estrategias terapéuticas.

Perspectivas futuras

Se abre la posibilidad de explorar más a fondo el papel específico de estas proteínas en la regulación del balance energético y la obesidad, así como su potencial como blancos terapéuticos para el tratamiento de estas condiciones.

Bibliografía

1. Pigeyre, M., Yazdi, F. T., Kaur, Y. & Meyre, D. Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. *Clinical science (London, England:1979)* 130, 943-986, doi:10.1042/CS20160136 (2016).
2. Friedman, J. The long road to leptin. *J Clin Invest* 126, 4727-4734, doi:10.1172/JCI91578 (2016).
3. Vong, L. et al. Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. *Neuron* 71, 142-154, doi:10.1016/j.neuron.2011.05.028 (2011).
4. Tong, Q., Ye, C. P., Jones, J. E., Elmquist, J. K. & Lowell, B. B. Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nature neuroscience* 11, 998-1000, doi:10.1038/nn.2167 (2008).
5. De los Heros, P. et. al. The WNK-regulated SPAK/OSR1 kinases directly phosphorylate and inhibit the K⁺-Cl⁻-co-transporters. *Biochem J* 458, 559-573, doi:10.1042/BJ20131478 (2014).
6. Barquera, S., Campos-Nonato, I. & Hernández-Barrera, L. Prevalencia de obesidad en adultos mexicanos, ENSANUT 2012. *Salud Pública de México* 55, doi:10.21149/spm.v55s2.5111 (2013).