

---

---

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

PROTOCOLO PARA EL REGISTRO DEL SERVICIO SOCIAL  
POR ACTIVIDADES RELACIONADAS A LA PROFESIÓN

**"EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA EN  
NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS UTILIZANDO  
TÉCNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA"**

QUE PRESENTA LA ALUMNA:  
**Claudia Guerrero Lazcano**

**Matrícula:  
2192034578**

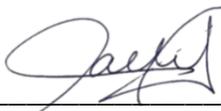
**Asesores:**

Asesor interno: Rafael Bojalil Parra (No. Económico: 24073).  
Dirección de Apoyo a la Investigación. UAM.



\_\_\_\_\_  
Firma

Asesor externo: María de Jesús Chávez Canales. (No. Cédula: 6925078).  
Laboratorio de Fisiología Experimental, Unidad de Investigación UNAM-INCICH,  
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez e Instituto de Investigaciones  
Biomédicas, UNAM.



\_\_\_\_\_  
Firma

# ÍNDICE

---

1	UBICACIÓN GEOGRÁFICA .....	3
2	MARCO INSTITUCIONAL.....	3
3	JUSTIFICACION.....	3
4	APORTE A LA SOCIEDAD .....	4
5	OBJETIVO GENERAL .....	4
5.1	OBJETIVOS PARTICULARES .....	4
6	NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS.....	5
6.1	COTRANSPORTADORES .....	5
7	METODOLOGIA.....	6
7.1	FIJACION DE TEJIDOS.....	6
7.1.1	PERFUSIÓN CARDIACA.....	6
7.2	PROCESAMIENTO DE TEJIDOS .....	7
7.2.1	TÉCNICA CRIOSTATO .....	7
7.2.2	TÉCNICA DE INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA .....	8
7.3	ANÁLISIS MOLECULAR .....	9
7.3.1	MICROSCOPIO DE EPIFLUORESCENCIA .....	9
8	RESULTADOS .....	9
9	FUTURAS PERSPECTIVAS .....	12
10	BIBLIOGRAFIA.....	12

# 1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

---

El servicio social se llevará a cabo en el laboratorio de fisiología experimental de la Unidad de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, ubicado en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” en Juan Badiano 1, Belisario Domínguez Secc 16, Tlalpan, 14080 Ciudad de México, CDMX.

## 2 MARCO INSTITUCIONAL

---

- **Objetivo institucional:** Servir de enlace entre la comunidad académica del Instituto y el sector productivo y social a través de diferentes mecanismos enfocados a transferir los conocimientos, tecnologías y productos desarrollados en el IIBO para contribuir al beneficio social del país.
- **Misión:** La Misión del Instituto es el estudio de fenómenos biológicos y biomédicos en los niveles molecular, bioquímico, celular, organísmico y poblacional, para contribuir con este conocimiento al desarrollo científico, y a la enseñanza y difusión de la ciencia en nuestro país con miras a un desarrollo mundial saludable.
- **Visión:** Una institución que no solo realice investigación de excelencia y forme a los investigadores del futuro, sino que tenga un compromiso social en el mejoramiento en la educación y las condiciones de salud de los mexicanos.

## 3 JUSTIFICACION

---

Las actividades que desarrollare en el Instituto se relacionan con los módulos: II (Procesos celulares fundamentales), III (Energía y consumo de sustancias), V (Historias de vida), VII (Ciclos biogeoquímicos), IX (Producción secundaria). Me podré desempeñar en el sector público, privado y social; en actividades de asesoría y consultoría, así como en investigación y docencia.

Es por esta razón que decidí asistir al laboratorio de la Dra. Chávez a realizar distintas técnicas y no un proyecto de investigación como tal. La ventaja de asistir a este laboratorio es que a pesar de no tener asignado un proyecto de investigación, asistiré a los seminarios semanales del laboratorio. El cual constan de dos partes, la parte bibliográfica (45 min) en la que se discuten artículos recientes de interés para el grupo y la parte experimental en la que alguno de los estudiantes de licenciatura o de posgrado presentan su proyecto de investigación (60min). Así, se me permitirá aprender distintas técnicas que se realizan en el laboratorio y además estar en contacto con la investigación experimental.

## **4 APOORTE A LA SOCIEDAD**

---

Las actividades en los laboratorios y sus prácticas ofrecen a las personas la oportunidad de comprender cómo se construye el conocimiento en una comunidad científica, cómo trabajan los científicos, cómo se alcanzan acuerdos y cómo pueden desconocerse. Estas dinámicas también se entrelazan con la sociedad y la cultura. En particular, las actividades que realizare en el laboratorio de fisiología proporcionarán información detallada sobre la expresión de proteínas en el hipotálamo, contribuyendo al entendimiento de enfermedades y trastornos neurológicos asociados con este importante centro regulador del sistema nervioso central. Una vez identificado la expresión de proteínas relacionados con la expresión proteica en el hipotálamo, puede ser utilizado para el desarrollo de terapias personalizadas y tratamientos más efectivos para trastornos neurológicos y endocrinos.

Por lo que, la evaluación de la expresión proteica en núcleos hipotalámicos no solo contribuye al conocimiento científico, sino que también tiene implicaciones directas en la mejora de la salud y el bienestar de la sociedad a través de avances en la investigación médica y terapéutica.

## **5 OBJETIVO GENERAL**

---

Desarrollar habilidades para el manejo de la expresión proteica utilizando técnicas de inmunofluorescencia en núcleos del hipotálamo.

### **5.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Realizar la preparación de muestras de tejido hipotalámico para su posterior análisis mediante técnicas de inmunofluorescencia, asegurando la integridad y preservación de las proteínas de interés.
- Optimizar las condiciones de fijación en el proceso de inmunofluorescencia para mejorar la detección y cuantificación de la expresión proteica en los núcleos hipotalámicos.
- Validar la especificidad de los anticuerpos utilizados en la técnica de inmunofluorescencia para garantizar resultados precisos y confiables en la evaluación de la expresión proteica en los núcleos hipotalámicos.

## 6 NÚCLEOS HIPOTALÁMICOS

El hipotálamo es una estructura pequeña pero compleja del cerebro, responsable de regular muchas funciones cruciales para la supervivencia y el equilibrio interno del cuerpo (Reguero y Raimundo, 2012; Saper, 2014; Höcht, 2018). Algunos de los núcleos que lo conforman son los siguientes:

- **Núcleo dorsomedial (DMH):** Este núcleo está involucrado en la regulación del comportamiento alimentario, el control del peso corporal y el ritmo circadiano. Influye en la respuesta al estrés y en la regulación del sistema nervioso autónomo, afectando funciones como la frecuencia cardíaca y la presión arterial.
- **Núcleo ventromedial (VMH):** Conocido como el centro de sociedad, desempeña un papel fundamental en la regulación del apetito y el comportamiento alimentario. La estimulación del VMH puede producir una sensación de saciedad y disminuir la ingesta de alimentos, mientras que su lesión puede llevar a la hiperfagia y la obesidad.
- **Núcleo arcuato (ARC):** Es una estructura crucial del hipotálamo que desempeña un papel fundamental en la regulación del apetito, el metabolismo y la secreción hormonal. Ubicado en la base del hipotálamo, cerca del tercer ventrículo, el ARC es un sitio principal de acción para las hormonas leptina e insulina, que inhiben las neuronas AgRP/NPY y activan las neuronas POMC/CART para reducir el apetito. Las disfunciones en el ARC pueden llevar a trastornos como la obesidad, la anorexia, la caquexia y la diabetes tipo 2.

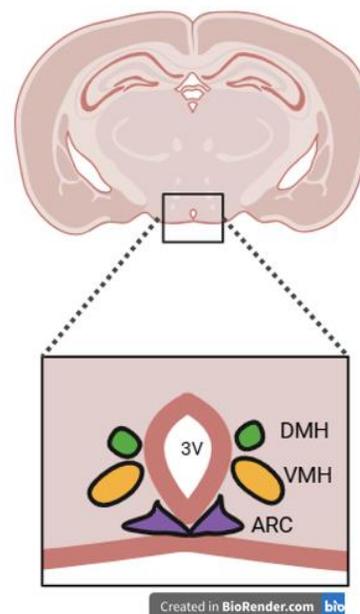


Figura 1. Localización de los núcleos hipotalámicos.

### 6.1 COTRANSPORTADORES

El NKCC1 y el KCC2 son transportadores de cloro que desempeñan roles complementarios en la regulación del equilibrio iónico dentro de las neuronas y en el sistema nervioso central (Murillo *et al.*, 2020).

- **NKCC1 (cotransportador Na-K-2Cl tipo 1):** Es un cotransportador que transporta sodio (Na<sup>+</sup>), potasio (K<sup>+</sup>) y cloro (Cl<sup>-</sup>) al interior de la célula en una proporción de 1:1:2. Este transporte es esencial para mantener el equilibrio iónico dentro de las células y en el líquido extracelular.
- **KCC2 (cotransportador K-Cl tipo 2):** Es un cotransportador que transporta potasio (K<sup>+</sup>) y cloro (Cl<sup>-</sup>) fuera de la célula en una proporción de 1:1. Este transporte es crucial para mantener el equilibrio de cloro dentro de las neuronas.

El equilibrio entre NKCC1 y KCC2 es crucial para mantener el potencial de cloro intracelular, que influye en la neurotransmisión inhibitoria mediada por GABA.

## 7 METODOLOGIA

Para la evaluación de la expresión proteica en núcleos hipotalámicos se utilizaron ratones silvestres machos (C57BLACK6), además, de varias técnicas en el laboratorio de fisiología experimental que a continuación se presentan (Fig. 2).

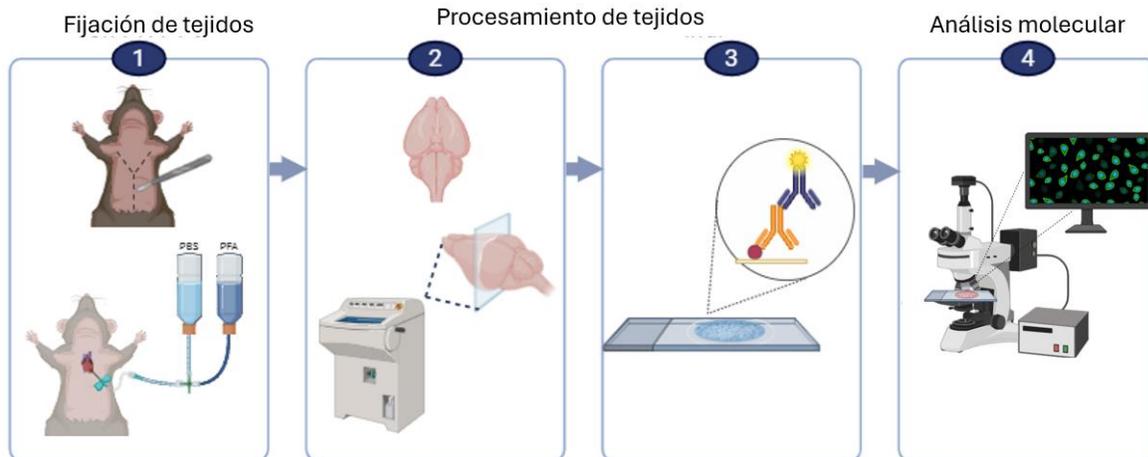


Figura 2. Metodología general para la evaluación de núcleos hipotalámicos.

### 7.1 FIJACION DE TEJIDOS

#### 7.1.1 PERFUSIÓN CARDIACA

La perfusión es el método más comúnmente empleado en animales de experimentación. Este enfoque introduce el fijador directamente en el sistema circulatorio del espécimen, permitiendo la fijación de los órganos desde el interior hacia el exterior. En laboratorios de fisiología experimental, se utiliza para extraer el cerebro de ratones y prevenir modificaciones post mortem en las células, manteniendo la estructura morfológica de células y tejidos sin cambios notables. Para llevar a cabo este procedimiento, se utilizó la técnica empleada por Dalvi y Belsham (2021):

1. Anestesia: Anestesiarse al ratón con pentobarbital, administrándolo por vía intraperitoneal (usar 100  $\mu$ l de anestesia por cada 10 g de peso del ratón). Esperar 5 minutos para asegurar la completa anestesia, posteriormente se realiza una incisión en la cavidad torácica para exponer el corazón e identificar los ventrículos y la aorta.
2. Canulación: Insertar una cánula en el ventrículo izquierdo del corazón, ya que la aorta ascendente, que transporta la sangre oxigenada desde el corazón al resto del cuerpo, se conecta a este ventrículo. La inserción de la cánula permite que la solución de perfusión fluya directamente al sistema arterial. Luego, cortar la aurícula derecha para permitir el drenaje de la solución de perfusión.
3. Perfusión inicial: Comenzar la perfusión con solución salina o PBS 1x para eliminar la sangre del sistema circulatorio. Esto ayuda a prevenir la coagulación y permite una mejor penetración del fijador.

4. Perfusión final: Cambiar a la solución fijadora (PFA 4%) y continuar la perfusión hasta que el ratón se torne rígido, lo que indica una buena fijación de los tejidos.
5. Una vez completada la perfusión, se puede proceder a la extracción del cerebro y al procesamiento (Fig.3).

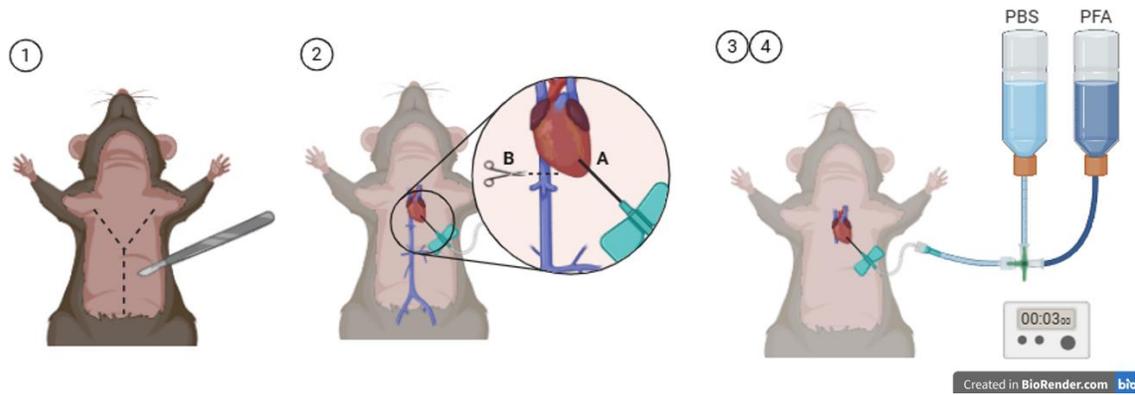


Figura 3. Fijación del cerebro mediante perfusión cardíaca con 4% PFA.

## 7.2 PROCESAMIENTO DE TEJIDOS

### 7.2.1 TÉCNICA CRIOSTATO

Un criostato es un dispositivo utilizado para mantener las muestras a temperaturas muy bajas, generalmente en el rango de temperaturas criogénicas. Para llevar a cabo este procedimiento, se utilizó la técnica empleada por Dalvi y Belsham (2021):

1. Ajuste del criostato: Ajustar la temperatura según el tipo de tejido y el grosor deseado de las secciones (espesor de 20-30  $\mu\text{m}$ ).
2. Preparación de tejido: Extraer el cerebro de los ratones previamente fijados.
3. Montaje: Montar el cerebro fijado en un monde con un medio de montaje que permita su congelación. El monde se congela y se coloca en el cabezal del criostato.
4. Corte de secciones: Colocar el monde de tejido en el cabezal del criostato y comenzar a cortar secciones delgadas de cerebro coronalmente.
5. Recogida de secciones: Con un pincel fino, las secciones cortadas del cerebro congelado se transfieren a una placa con pocillos llena de solución crio preservación, sin embargo, algunos cortes se seleccionan y se montan en portaobjetos limpios para corroborar en el microscopio los cortes alineados y la sección deseada.
6. Almacenamiento y análisis: Almacenar los cortes en un congelador a 4°C si no se van a utilizar de inmediato (Fig.4).

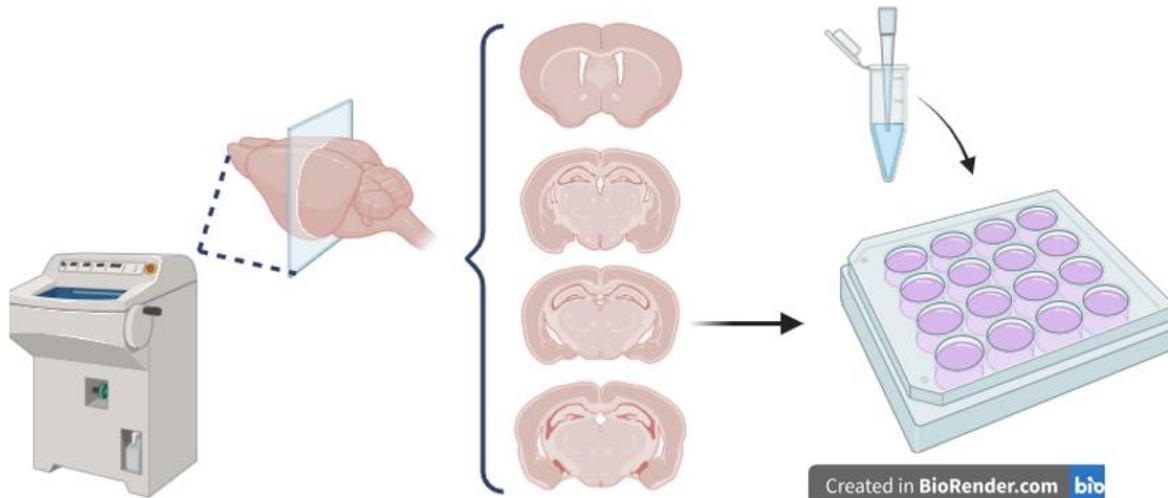


Figura 4. Corte coronal de cerebro por medio del criostato.

### 7.2.2 TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

La inmunofluorescencia es una técnica utilizada para visualizar y detectar la presencia de proteínas específicas en muestras biológicas. Este método se basa en la capacidad de los anticuerpos para unirse de manera específica a las proteínas de interés. Para llevar a cabo este procedimiento, se utilizó la técnica empleada por Dalvi y Belsham (2021):

1. Selección de muestra y lavados: Se selecciona la muestra y se le realizan 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBS 1X+ 0.5% tritón, para eliminar residuos de la solución preservadora.
2. Bloqueo: Se bloquean los sitios no específicos de unión con sustancias como suero bovino o albúmina de suero bovino para reducir la unión no específica de los anticuerpos, durante 1 hora.
3. Incubación con anticuerpos primarios: Se añaden anticuerpos primarios específicos para la proteína de interés. Estos anticuerpos se unirán a la proteína en la muestra.
4. Lavado: Se vuelven a realizar 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBS 1X+ 0.5% tritón para eliminar los anticuerpos no unidos y reducir el fondo de fluorescencia.  
Incubación con anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos: Se añaden anticuerpos secundarios con fluoróforos. Estos se unen a los anticuerpos primarios y emiten fluorescencia. Cabe mencionar, que a partir de este paso se debe de cubrir en su totalidad la muestra para evitar la oxidación del fluoróforo.
5. Lavado adicional: Se realiza otros 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBS 1X+ 0.5% tritón para eliminar los anticuerpos secundarios no unidos.
6. Montaje y observación: La muestra se monta en un medio adecuado y se observa bajo un microscopio de fluorescencia para visualizar las proteínas de interés que emiten luz fluorescente (Fig.5).

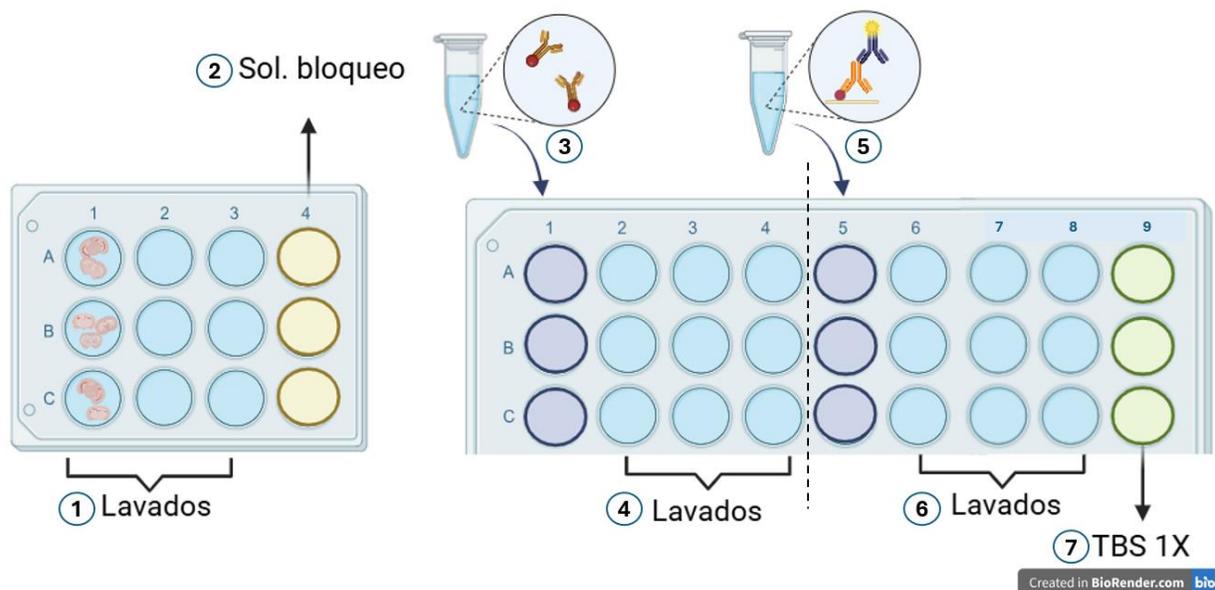


Figura 5. Procedimiento de inmunofluorescencia indirecta en flotación.

## 7.3 ANÁLISIS MOLECULAR

### 7.3.1 MICROSCOPIO DE EPIFLUORESCENCIA

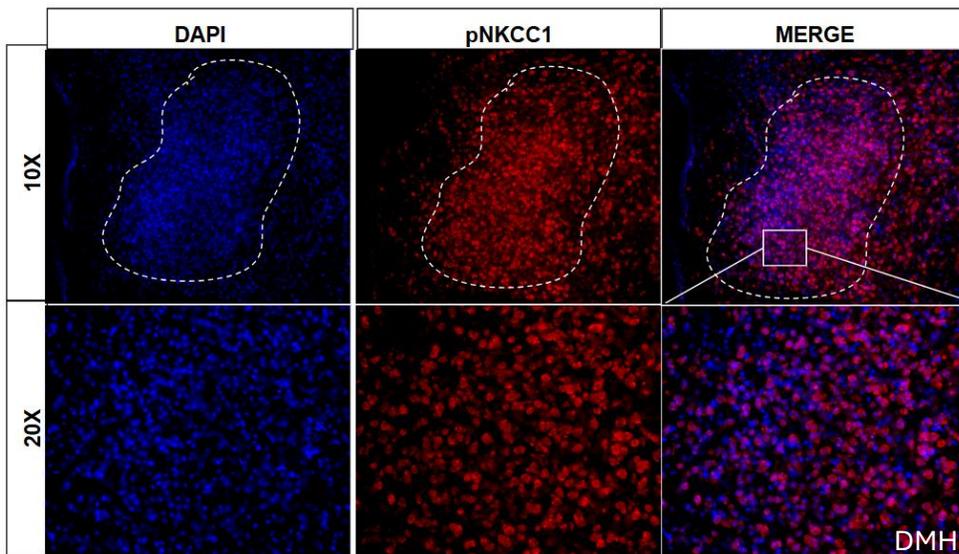
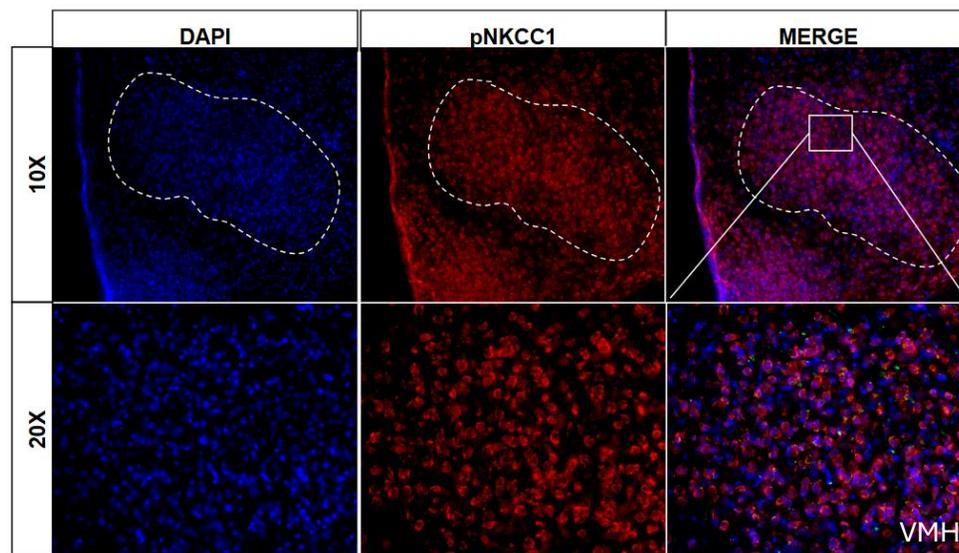
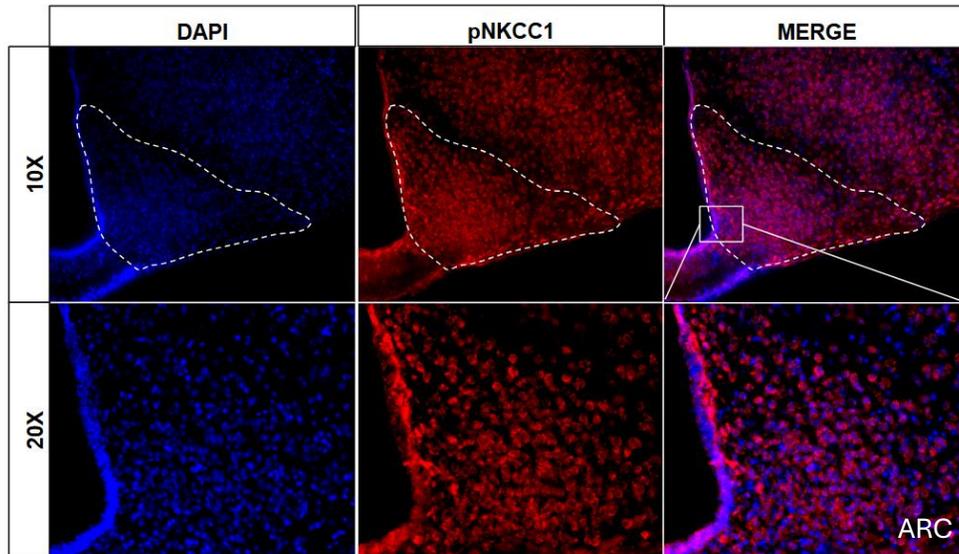
El microscopio de epifluorescencia se utiliza para visualizar moléculas fluorescentes dentro de células y tejidos. Esta técnica permite la observación de procesos biológicos en tiempo real con gran precisión. Utiliza una lámpara de mercurio, xenón o LED's que emite luz de alta intensidad en un rango amplio de longitudes de onda.

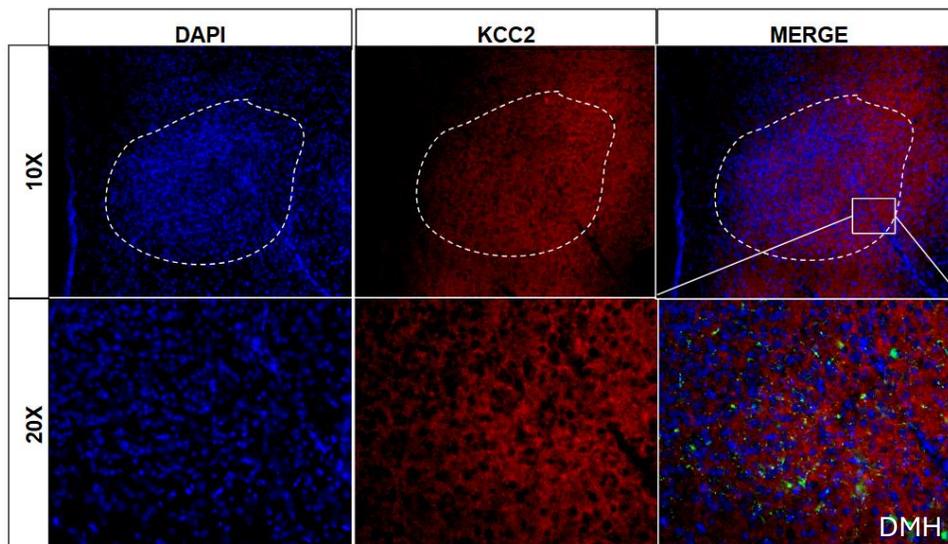
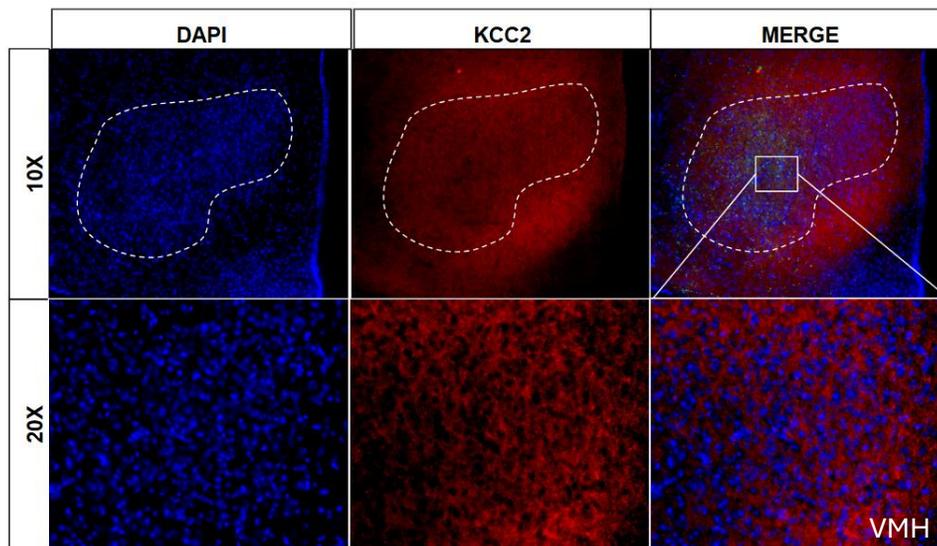
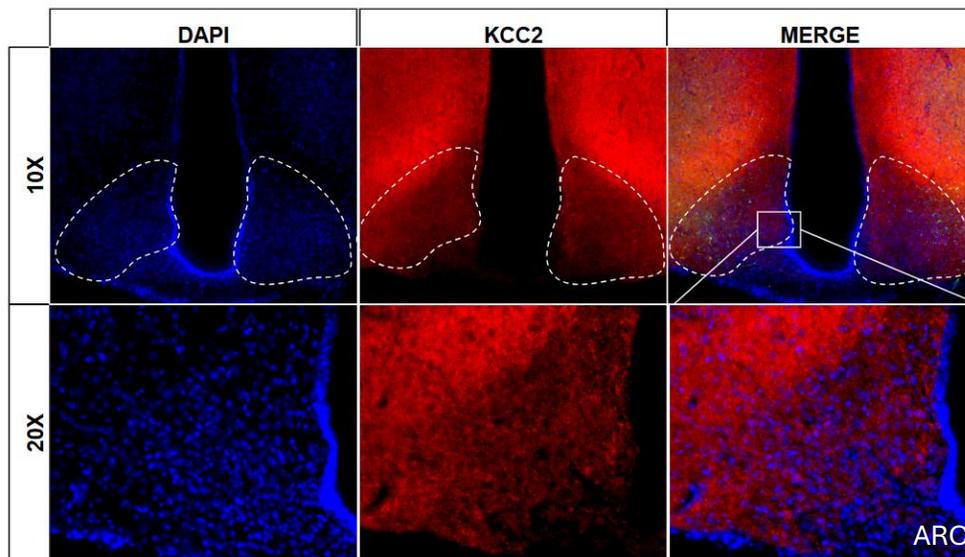
## 8 RESULTADOS

Se observó que en los núcleos hipotalámicos se expresan los cotransportadores NKCC1 y KCC2. Sin embargo, NKCC1 probablemente se exprese en el soma de las neuronas, mientras que KCC2 se localice en las fibras. Estos cotransportadores son esenciales para mantener el equilibrio iónico y el volumen celular. La presencia de ambos cotransportadores sugiere una posible activación de la vía WNK-SPAK-CCCs.

Esta vía regula varios procesos fisiológicos, incluyendo el balance de iones y agua en las células. Investigaciones recientes destacan la importancia de la vía WNK-SPAK en la osmosensibilidad y la osmorregulación, ya que las quinasas WNK son sensibles a los niveles de cloruro y la osmolaridad intracelular. Esta sensibilidad permite que regulen los cotransportadores acoplados a cloruro (CCC) para mantener el equilibrio celular.

Dado estos hallazgos, es crucial continuar con la caracterización y el análisis de la expresión de la vía WNK-SPAK-CCCs en los núcleos hipotalámicos para comprender mejor cómo esta vía influye en el equilibrio iónico.





## 9 FUTURAS PERSPECTIVAS

---

- Tomar las fotos de los tejidos seleccionados en el microscopio confocal para mayor precisión.
- Cuantificar las imágenes y determinar con precisión su localización, así como las áreas de ecolocalización.
- Llevar a cabo experimentos bajo condiciones de dietas altas y bajas en grasa.
- Realizar experimentos en los núcleos hipotalámicos faltantes con proteínas fosforiladas para evaluar la activación de la vía WNK-SPAK-CCCs.

## 10 BIBLIOGRAFIA

---

- Dalvi, P. S., y Belsham, D. D. (2021). Inmunofluorescencia de GFAP y TNF- $\alpha$  en el hipotálamo de ratón. *Bioprotocol*, 11(13), e4078-e4078.
- Höcht, C., y Bertera, F. M. (2018). Control hipotalámico de la función cardiovascular. *Neurocardiología: Aspectos fisiopatológicos e implicaciones clínicas*, 37.
- Murillo-de-Ozores, A. R., Chávez-Canales, M., de Los Heros, P., Gamba, G., y Castañeda-Bueno, M. (2020). Procesos fisiológicos modulados por la vía de señalización de la quinasa WNK-SPAK/OSR1 sensible al cloruro y los cotransportadores de cloruro acoplados a cationes. *Fronteras de la Fisiología*, 11, 585907.
- Raimundo, D. A. V. (2012). *Nuevas acciones de p53: Homeostasis metabólica y efecto orexigénico de ghrelin* (Doctoral dissertation, Universidade de Santiago de Compostela).
- Reguero Acebal, L. (2012). *Arquitectura subcelular del sistema endocannabinoide en el núcleo ventromedial del hipotálamo de ratón* (Doctoral dissertation, Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea).
- Saper, C. B., y Lowell, B. B. (2014). The hypothalamus. *Current Biology*, 24(23), R1111-R1116.