



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Xochimilco**

**ESTUDIO DE LA REGULACION DE LOS  
CONTRANSPORTADORES  $K^+$   $CL^-$  (KCCS) POR  
PROTEINAS FOSFATASAS DURANTE EL BALANCE  
ELECTROLITICO**

**INFORME DE CONCLUSION DEL SERVICIO  
SOCIAL**

Licenciatura: Químico Farmacéutico Biológico

Alumna: Maria Fernanda Abigail Gómez Vega

Matricula: 2192034087

## I. INTRODUCCIÓN

Se realizó el servicio social en el laboratorio de Inmunofisiología Celular de la Unidad de Investigación UNAM-Instituto Nacional de Cardiología, dentro del cual se tiene como misión aliviar las enfermedades cardiovasculares mediante la investigación científica trascendente, educación profesional superior y una atención médica moderna con calidad humanitaria. De tal modo se logran formar líderes y referentes de la cardiología, inspirados en una filosofía de renacimiento de la excelencia científica y actitud humanitaria. El compromiso social es formar el mayor número de especialistas cardiovasculares para proveer atención médica de tercer nivel, principalmente a pacientes que carecen de seguridad social.

El tema estudiado durante el servicio social está enfocado al estudio de la regulación de los cotransportadores  $K^+ Cl^-$  (KCCs) por proteínas fosfatasa durante el balance electrolítico, mostrando el papel fundamental de esta investigación para comprender los mecanismos que subyacen a la homeostasis de los iones en el cuerpo que pueden tener implicaciones importantes para el tratamiento de trastornos relacionados con el desequilibrio electrolítico, como la hipertensión, la epilepsia y los trastornos renales. Los estudios sobre la regulación de estos cotransportadores ( $K^+ Cl^-$ ) implican investigaciones a nivel molecular para comprender cómo las proteínas fosfatasa interactúan con los cotransportadores y cómo esta interacción afecta su actividad. Además, también pueden incluir investigaciones a nivel celular y tisular para comprender cómo estas interacciones contribuyen al equilibrio electrolítico en diferentes tejidos y sistemas del cuerpo (Mercado y Melo, 2014; Trejo *et al.*, 2023).

En condiciones normales, el equilibrio de los iones, incluidos el potasio ( $K^+$ ) y el cloruro ( $Cl^-$ ), es esencial para mantener la homeostasis en el cuerpo. Los cotransportadores  $K^+ Cl^-$  contribuyen a este equilibrio al transportar simultáneamente ambos iones a través de la membrana celular, donde la actividad de estos cotransportadores está regulada por una variedad de mecanismos, incluida la fosforilación/de-fosforilación por proteínas cinasas y fosfatasa, respectivamente. Las proteínas fosfatasa son enzimas que catalizan la eliminación de grupos fosfato de proteínas, lo que puede tener un efecto regulador en su actividad, por ejemplo, alterando su función de transporte iónico (Mercado y Melo, 2014; Trejo *et al.*, 2023).

## II. OBJETIVO DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

Estudiar la vía de señalización de los cotransportadores KCCs mediante estimulaciones con buffer de iso e hipotonicidad para conocer sus procesos fisiológicos.

## II.1. Descripción específica de las actividades a desarrollar

Se llevaron a cabo las siguientes actividades dentro del laboratorio de Inmunofisiología Celular, las cuales son descritas en orden para llevar a cabo el experimento total que permite la exposición de la actividad reguladora de los cotransportadores KCCs.

II.1.1. Transformación: Es un proceso fundamental en biología molecular que implica la introducción de material genético (como ADN plasmídico) en una célula receptora, con el fin de modificar su genoma o permitir la expresión de ciertos genes. Usualmente se utiliza en microbiología para introducir genes específicos en bacterias como *Escherichia coli*. La célula receptora toma el material genético y puede expresar los genes insertados, permitiendo la producción de proteínas específicas o la modificación genética de la célula (Carrada, 2016).

II.1.2. Extracción y purificación de ADN: Consiste en el aislamiento de moléculas de ADN basado en las características fisicoquímicas de la molécula. Debido a que el ADN está formado por una doble hélice la estructura es bastante estable, además los grupos fosfato que la componen le confieren carga negativa y alta polaridad, permitiendo que el ADN se disuelva en soluciones acuosa. Estas propiedades permiten que el ADN pueda ser extraído por diversos métodos, sin embargo, los protocolos tradicionales consisten en cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN (Velázquez *et al.*, 2014).

II.1.3. Transfección: Introducción de material genético externo en células eucariotas, ya sea mediante su entrada en poros de la membrana plasmática o bien mediante su incorporación con liposomas que se fusionan con la membrana plasmática permitiendo el depósito del ADN dentro de la célula. La transfección con lípidos catiónicos es uno de los métodos químicos más utilizados, de los cuales, la Lipofectamina es uno de ellos gracias a su capacidad de formar vesículas dentro del citoplasma y evitar la degradación del ADN, siendo capaz de transfectar una amplia gama de células de mamífero (Fus-Kujawa *et al.*, 2021; Soto, 2021; Hjelt, 2023).

II.1.4. Lisis celular: Proceso mediante el cual moléculas que conforman la pared, la membrana celular y nuclear se modifican o destruyen permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen (Ojeda, 2024). Particularmente para el procedimiento de este trabajo se estimularon las células agregando buffer hipotónico e isotónico altos en potasio, dando el estímulo requerido a las células para obtener el ADN que causa la actividad deseada sobre las proteínas fosfatasas.

II.I.V. Cuantificación de proteínas: Consiste en determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica. Existen diversos métodos para cuantificar proteínas, como el método de Bradford, el método de Lowry, el método bicinchonínico (BCA), entre otros. Estos métodos se basan en la interacción de ciertos reactivos con las proteínas presentes en la muestra, lo que permite medir la absorbancia o la fluorescencia y determinar la concentración de proteínas en la muestra (Flores y Ruiz, 2017).

II.I.VI Western Blot: Es una técnica utilizada para detectar y analizar proteínas específicas en una muestra biológica. En este proceso, las proteínas presentes en la muestra se separan por tamaño mediante electroforesis en gel y luego se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o PVDF. Posteriormente, la membrana se incuba con anticuerpos específicos que se unen a las proteínas de interés, permitiendo su detección mediante reacciones químicas o fluorescentes. El Western Blot se utiliza ampliamente en investigación biomédica para estudiar la expresión de proteínas, la identificación de biomarcadores y la caracterización de proteínas en muestras complejas (García y Ortega, 2022).

Se transfectaron células HEK con KCC3 y plásmidos PPI, permitiendo así observar la fosforilación/desfosforilación en respuesta a las condiciones de hipotonicidad, isotonicidad o la simple presencia de PPI. La proteína quinasa (PPI) se ha identificado como un modulador importante de la actividad de WNK3, contrarrestando así la acción de las proteínas quinasa. Esta interacción entre WNK3 y PPI proporciona un mecanismo adicional para controlar la actividad de WNK3 y mantener la homeostasis de los electrolitos.

### III. Resultados y conclusión

**Western Blot:** Se realizó un análisis mediante Western blot de muestras de proteínas de KCC3 expuestas a estímulos con buffers isotónicos e hipotónicos con alta concentración de potasio. Las muestras fueron mutadas con anticuerpos específicos contra WNK3, Spak, pSpak y GADPH para investigar los cambios inducidos por el estímulo y los cambios que pueden producir las isoenzimas PPI (PPIWT y PPIDA) en la cadena de fosforilación.

Se observó que las muestras sometidas al estímulo con buffer isotónico alto en potasio mostraron una expresión aumentada de WNK3 y Spak en comparación con las muestras estimuladas con buffer hipotónico. Se logra conocer que con la expresión aumentada de Spak la vía de señalización está asociada con la regulación de la actividad de KCC3.

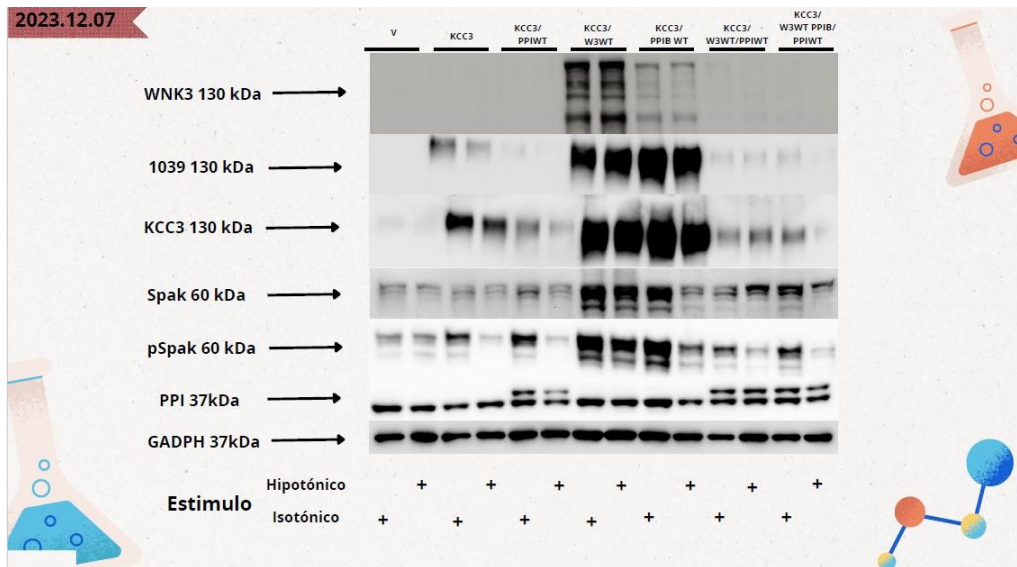


Fig 1. Western Blot de proteína KCC3 estimulada con buffer iso/hipotónico, mutada con PPIW

A pesar de los resultados obtenidos, no se logra observar diferencia significativa en la expresión de la regulación de las muestras, dado que la expresión en las bandas KCC3/W3WT no se distingue a simple vista demostrando la correspondiente fosforilación, por lo tanto, se decidió repetir la lectura del western blot probando ahora con la isoenzima PPIDA.

Con las nuevas muestras se observaron resultados más significativos, pudiendo mostrar la diferencia entre los estímulos de iso e hipotonicidad justo en las bandas que se mutaron con PPIDA.

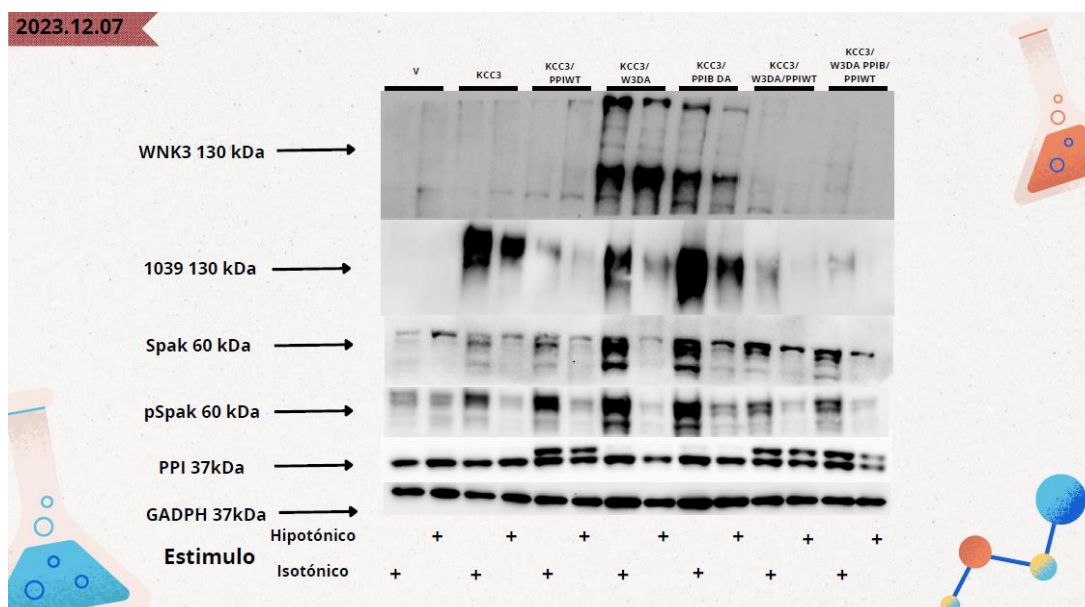


Fig 2. Western Blot de proteína KCC3 estimulada con buffer iso/hipotónico, mutada con PPIDA.

Con el fin de dar veracidad a los resultados, se añade a las imágenes la expresión de PPI, demostrando la existencia de la proteína en las muestras, además se añade la expresión de GADPH que es útil para observar que las muestras fueron cargadas correctamente en el gel de acrilamida, demostrando que no hay alteración en las muestras para obtener los resultados esperados.

En resumen, estos resultados indican que tanto el estímulo con buffer isotónico como hipotónico alto en potasio inducen cambios en la expresión y fosforilación de proteínas asociadas con la regulación de la actividad de KCC3, y que la actividad de las proteínas fosfatasa puede modular estos efectos.

## II.II. Descripción del vínculo de las actividades a desarrollar con los objetivos de formación del plan de estudios

El Instituto Nacional de Cardiología (INC) se encuentra profundamente relacionado con los objetivos de formación de un químico farmacobiólogo, especialmente en el contexto de la investigación y el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Desde el punto de vista de la investigación, uno de los objetivos de formación sería aprender a aplicar técnicas y metodologías para investigar la fisiopatología de estas enfermedades, así como para identificar posibles blancos terapéuticos y desarrollar nuevos fármacos. Además, se llevan a cabo investigaciones en farmacología molecular y celular para entender los efectos de los fármacos a nivel molecular y celular, lo que permite desarrollar habilidades en el estudio de los mecanismos de acción de los fármacos y desarrollar terapias más efectivas.

Adicionalmente, un químico farmacobiólogo se beneficiaría de participar en este tipo de investigaciones para adquirir habilidades en diseño de fármacos, síntesis orgánica, caracterización de compuestos y evaluación de su actividad farmacológica.



---

Firma de asesor interno  
Dra. Maria Elisa Drago Serrano



---

Firma de asesor externo  
Dra. Paola Ana de los Heros Rios

### III. REFERENCIAS

- Carrada-Bravo, T. (2016). Investigación de la transformación de *Streptococcus pneumoniae* en el laboratorio, y el nacimiento de la genética bacteriana y la biología molecular. *Revista chilena de infectología*, 33(1), 61-65.
- Flores Ramos, L., & Ruiz Soto, A. (2017). Implementación de una metodología analítica para la cuantificación de proteínas en la microalga *Arthrospira platensis*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 83(4), 371-381.
- Fus-Kujawa, A., Prus, P., Bajdak-Rusinek, K., Teper, P., Gawron, K., Kowalczyk, A., & Sieroń, A. L. (2021). An overview of methods and tools for transfection of eukaryotic cells in vitro. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 701031.
- García Trejo, J. J., & Ortega, R. (2022). Inmunotransferencia de geles de proteínas de poliacrilamida tipo Western Blot.
- Hjelt, V. (2023). Síntesis y evaluación de nanopartículas como vehículos de transfección de ácidos nucleicos en células de mamíferos.
- Mercado, A., & Melo, Z. (2014). Aspectos fisiopatológicos de los cotransportadores de K<sup>+</sup>: Cl. *Revista de Investigación Clínica*, 66(2), 173-180.
- Ojeda Velandia, N. (2024). Eficiencia de dos protocolos de extracción de ADN para el estudio de la microbiota de la epidermis.
- Soto, R. I. G. (2021). Transfección de una línea celular de mamífero para la co-expresión de genes codificantes de un anticuerpo monoclonal terapéutico en unidades transcripcionales independientes.
- Trejo, F., Elizalde, S., Mercado, A., Gamba, G., & de los Heros, P. (2023). SLC12A cryo-EM: analysis of relevant ion binding sites, structural domains, and amino acids. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 325(4), C921-C939.
- Velázquez, L. P. A., Martínez, M. D. C. A., & Romero, A. C. (2014). Extracción y purificación de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 1, 1-26.