

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

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

INFORME FINAL
POR ACTIVIDADES RELACIONADAS A LA PROFESIÓN

**Aplicación de técnicas de biología molecular e
inmunofluorescencia en el laboratorio
para el estudio de la fisiología en ratones transgénicos**

QUE PRESENTA EL ALUMNO (A)

Annel Calderon Villaseñor

Matrícula
2172031222

ASESORES



Dra. María de Jesús Chávez Canales
6925078
Instituto de Investigaciones Biomédicas IIB, UNAM



M.M.S. Ruth Soto Castor
24789
UAM-Xochimilco

Resumen

El informe describe un servicio social realizado en el laboratorio de Fisiología experimental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, donde el principal tema de investigación está enfocado en estudiar y comprender la proteína SPAK que controla la actividad de los cotransportadores catión-cloruro y que puede tener un impacto en la hipertensión y la obesidad, relacionado con el hipotálamo ya que este es el encargado de controlar el apetito, la saciedad y la actividad metabólica. Para apoyar con estas investigaciones por medio de actividades relacionadas con la profesión realicé algunas técnicas de biología molecular como lisis, PCR, electroforesis de DNA, geles de agarosa; y otras actividades como el manejo de ratones el bioterio, preparación de soluciones, algunas inmunofluorescencias, toma de imágenes en microscopio de fluorescencia y organización de estas imágenes.

Índice

1. MARCO INSTITUCIONAL	4
2. INTRODUCCIÓN	4
3. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LA INSTITUCIÓN.....	6
4. OBJETIVOS	6
5. ACTIVIDADES DESARROLLADAS.....	7
6. APRENDIZAJE Y HABILIDADES	15
7. REFERENCIAS	16

1. MARCO INSTITUCIONAL

El Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) es una dependencia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) que pertenece al Subsistema de la Investigación Científica. 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. Su visión es ser líderes en la generación de conocimiento en el área de su competencia dentro y fuera de la UNAM, a nivel nacional e internacional. La construcción de un estrecho vínculo entre la investigación científica de alta calidad y la atención a la salud en los institutos nacionales de salud, universidades y centros de desarrollo industrial y tecnológico del país vinculada con el sector. La formación de nuevos investigadores de primer nivel en el área biomédica.

2. INTRODUCCIÓN

El servicio social se realizó en el laboratorio de Fisiología Experimental de la Unidad del IIB-UNAM, dentro del cual se estudian los mecanismos de homeostasis de líquidos y electrolitos, así como la regulación de la presión arterial por mecanismos renales y extrarrenales

Actualmente se estudia a la proteína SPAK, esta proteína controla la actividad de los cotransportadores electroneutrales de catión-cloruro y, por tanto, procesos fisiológicos como la modulación del volumen celular, la concentración de cloruro intracelular y transporte transepitelial de sal, por ellos la modulación de la actividad de la quinasa SPAK puede tener un impacto en la hipertensión y la obesidad (Torre-Villalvazo *et al.*, 2018).

Para ello, se explora la función de la proteína SPAK en núcleos del hipotálamo que controlan la termogénesis. El hipotálamo es un área cerebral compleja formada por distintas áreas que a su vez están compuestas por grupos neuronales diferentes que se comunican entre sí para controlar el apetito, la saciedad y la actividad metabólica (Araujo-Castro *et al.*, 2020).

Debido a esta relación del hipotálamo con la actividad metabólica y la proteína SPAK, se realizan inmunofluorescencias utilizando diferentes anticuerpos para comprender la vía en ratones transgénicos. Y para eso es necesario realizar otras técnicas de biología molecular como PCR y electroforesis, actividades en las que apoye para el seguimientos de los temas

que se trabajan dentro del laboratorio. Estos estudios contribuyen a comprender mejor la vía de SPAK y proporcionar información relevante para futuras investigaciones y aplicaciones clínicas.

Las técnicas de biología molecular sirven para analizar ácidos nucleicos, estas técnicas necesitan un paso previo de extracción de ADN o ARN. Se deben realizar en muestras totalmente puras, para obtener resultados correctos (Medallo, 2020). Por lo que son utilizadas para identificación de los ratones transgénicos en el laboratorio.

Los ratones modificados genéticamente son portadores de un transgén (material genético externo) integrado al azar en su genoma con el fin de conducir a la expresión de un nuevo gen o a la sobre-expresión de un gen ya existente. Generalmente se utilizan construcciones transgénicas compuestas por un promotor eucariótico y la secuencia codificante del gen de interés para expresar dicho gen, o sobreexpresarlo, en todas las células del ratón o en un tejido concreto. Los ratones transgénicos son herramientas clave para el estudio de la función génica y de las bases genéticas de las enfermedades (Ortega, 2009).

Los de ratones transgénicos que usa en el laboratorio son SPAK-KI, que tienen una mutación puntual en el codón que codifica una treonina de la posición 243 por una alanina y esto impide que SPAK tenga actividad cinasa y por lo tanto ya no fosforila los cotransportadores (Rafiqi *et al.*, 2010).

3. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LA INSTITUCIÓN

El servicio social se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBO) de la UNAM, que se encuentra dentro del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, ubicado Juan Badiano 1, Belisario Domínguez Secc 16, Tlalpan, 14080 Ciudad de México, CDMX (Fig. 1).



Figura 1. - Ubicación geográfica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM

4. OBJETIVOS

General

Apoyar en las actividades del laboratorio con técnicas de biología molecular para el estudio de la fisiología en ratones transgénicos.

Específicos

- Conocer las técnicas de biología molecular utilizadas en el laboratorio
- Desarrollar las habilidades necesaria para la ejecución de las técnica de biología molecular
- Contribuir en el desarrollo de las actividades que se realizan en el laboratorio

5. ACTIVIDADES DESARROLLADAS

Pipeteo

Se trata de una técnica de laboratorio en la que consta de medir y transferir de manera exacta y reproducible volúmenes muy pequeños de líquidos, en donde se utiliza una micropipeta. Las pipetas de desplazamiento de aire permiten aspirar el líquido gracias al vacío parcial que se genera cuando el pistón se desplaza hacia arriba en el cuerpo de la pipeta. Al poner la punta, hay que asegurar que sea del tipo correcto y que esté correctamente ajustada (Araiza, 2021).

Meta: Aprender a utilizar correctamente las pipetas

Especificaciones: En el laboratorio se utilizan pipetas donde se puede ajustar el volumen dentro de un rango; por ejemplo, entre 1-10 μL , 2-20 μL , 20-200 μL y 100-1000 μL . Con cada una de ellas se realizó una evaluación, en el cual se tomó un volumen indicado, en cada repetición se pesaba dicho volumen para obtener datos y poder tener una variación mínima de los volúmenes tomados.

Preparación de soluciones

La concentración de una solución nos da información acerca de la cantidad de soluto disuelto en un volumen unitario de solución. Preparar soluciones por el método de dilución consiste en preparar soluciones diluyendo a la que se le llama solución patrón o estándar, a la cual se le conoce su concentración exacta. Para calcular el volumen de solución patrón de concentración conocida necesaria se utiliza la siguiente expresión conocida como Ley de la Volumetría: $V_1C_1 = V_2C_2$ (García *et al.*, 2010).

Meta: Conocer y preparar las soluciones comunes utilizadas en el laboratorio.

Especificaciones: Preparé soluciones de TBS (disolución salina tamponada con Tris) en concentración 1X utilizada para las inmunofluorescencias, soluciones de PBS 1X (Buffer de Fosfatos) para el lavado de tejidos y con CaCl_2 para las perfusiones de los ratones; PFA 4% (Paraformaldehído) de igual manera utilizada para las perfusiones y TAE 1X (Tris acetato EDTA) para realizar la electroforesis. En general todas estas soluciones, hacía los cálculos correspondientes de acuerdo con la formula $V_1C_1 = V_2C_2$, las preparaba con agua destilada, las filtraba, etiquetaba y almacenaba. (Fig. 2)



Figura 2. – Preparación de soluciones (PBS 1X con Ca^{2+} y sin Ca^{2+})

Manejo de animales de laboratorio

Al manipular y sujetar a los ratones de experimentación hay que tener en cuenta que por ser de tamaño pequeño pueden lesionarse con facilidad si no se toman correctamente. El manejo debe realizarse con firmeza, pero a la vez con suavidad, y sobre todo con confianza. La forma más utilizada para manipulación de ratones adultos y crías a partir del destete es levantar al animal tomándolo desde la base de la cola, lo más distalmente posible del punto medio con los dedos pulgar e índice, sin ejercer demasiada presión; hay que colocarlo de inmediato en la superficie deseada, o bien darle apoyo en la palma de nuestra mano hasta trasladarlo al lugar definitivo. Una vez sujeto el animal por la parte proximal de la cola, se debe colocar sobre una superficie rugosa donde se pueda sujetar con sus patas delanteras. Este proceso se realiza con la mano diestra. A su vez, con la otra mano se toma la piel del dorso inmediatamente detrás de las orejas con los dedos índice y pulgar, sin ejercer demasiada presión. Se toma suficiente piel de manera firme para inmovilizar al animal (Mourelle, 2013).

Meta: Conocer las reglas de ingreso y uso del bioterio, así como la correcta manipulación de los ratones

Especificaciones:

- En el bioterio se realizaba la limpieza de los ratones dos veces por semana de acuerdo con un calendario para que todos apoyaran, yo realizaba la limpieza los viernes junto con otras compañeras, se cambiaba el aserrín de las cajas y se verificaba que los ratones contarán con alimento y agua suficiente.
- Cuando los ratones tenían crías, se tenía que esperar tres semanas para destetarlos, yo realizaba el sexado de estos ratones, les colocaba un arete con su

número de identificación, les cortaba una ligera parte de su cola para después realizar la identificación de mutaciones mediante una PCR.

- Apoye en la colocación de unos sensores en los ratones para monitorear su ritmo cardiaco, temperatura y actividad.
- Participé en un curso virtual de “Inducción” a las políticas de ingreso y uso al Bioterio”.

Lisado de colitas

Se refiere al deterioro de una célula debido a una lesión en su membrana plasmática. En los métodos químicos se usan un compuesto disolvente orgánico; el rompimiento de las membranas celulares permite la interacción de la proteína de interés con proteínas de la misma célula que tienen la capacidad de romper los enlaces peptídicos, es fundamental añadir en el amortiguador inhibidores de proteasas, para mantener la integridad de las proteínas (Ramírez-Carret *et al.*, 2021).

Meta: Realizar la manipulación correcta de los ratones para poder obtener una muestra de colita y realizar con éxito la lisis

Especificaciones: Realizaba la lisis de las colitas de los ratones, después de cortar cuidadosamente un poco de su colita y llevaba a cabo el siguiente procedimiento:

1. Prender el Thermolyne 15min antes de empezar
2. Agregar 150 μ L de NaOH para romper el tejido
3. Calentar a 90°C durante 40min
4. Sacar las colitas en una gradilla y dejar enfriar por 5min
5. Vortexear y centrifugar a 20°C a 10000 rpm durante 2min
6. Agregaban 150 μ L de Tris-HCl, esto neutraliza la base
7. Vortexear y centrifugar a 20°C a 10000 rpm durante 2min

Reacción en cadena de la Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es utilizada para el estudio de los ácidos nucleicos. La misión de la PCR es copiar millones de veces una secuencia específica de ADN blanco mediante una catálisis llevada a cabo por una enzima conocida como ADN polimerasa, de tal manera que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y

copiadas para analizarse (Tamay *et al.*, 2013). Los cambios de temperatura constituyen la base para que se completen los pasos necesarios; si se utiliza Taq polimerasa la temperatura de elongación suele ser de 72°C (Pérez, 2011).

Meta: Realizar el mastermix correctamente y conocer las fases de la PCR

Especificaciones: Después del lisados, preparaba el mastermix para la PCR, esta consta de agua destilada, buffer 5X, MgCl₂, dNTP's, primers y Taq polimerasa, reactivos que ya se encontraban listos en el laboratorio. Las cantidades de cada reactivo para preparar el mastermix dependían del número de muestras, solo se tenían que hacer los cálculos correspondientes. Una vez preparados el mastermix, en otros tubos eppendorf agregaba 23 µL más 2 µL de la muestra, hasta tener todas mis muestras completas (Fig. 3) y eran llevadas al termociclador, el cual realizaba las siguientes fases:

- En primer lugar, es necesario que el DNA se desnaturalice, esta primera fase se lleva a cabo elevando la temperatura a 95°C.
- El siguiente paso consiste en un descenso de la temperatura 55°C, para llevar a cabo la fase de alineamiento.
- La extensión o elongación, en temperaturas que oscilan entre 40°C - 72°C, la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores.

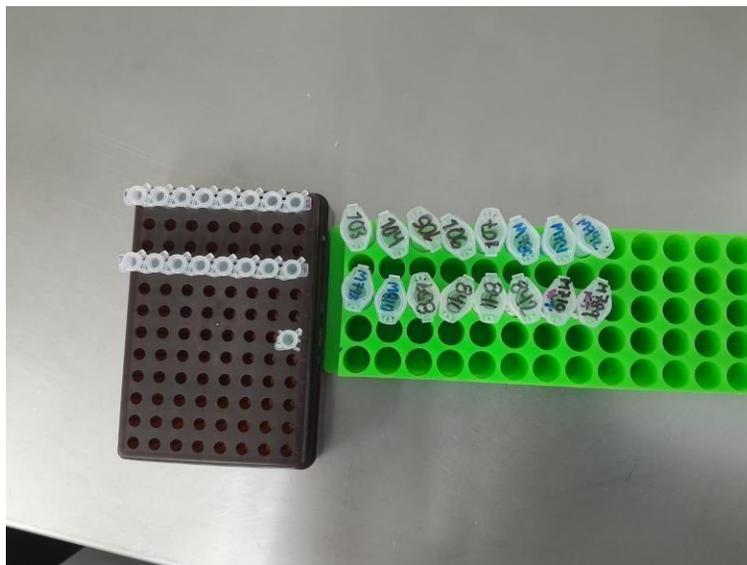


Figura 3. – Muestras lisadas listas para iniciar la PCR.

Electroforesis de DNA

La electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es una de las metodologías más utilizadas para el trabajo con ácidos nucleicos. Mediante la electroforesis se separan fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra. Es una combinación de fuerzas eléctricas y de fricción que permiten el desplazamiento y separación en función del tamaño o topología de diferentes moléculas de ADN (Fierro, 2014).

Meta: Realizar geles de agarosa y aprender a interpretar los resultados

Especificaciones: Una vez concluida la PCR, preparaba geles de agarosa para correr las muestras e identificar el genotipo del ratón (Fig. 4). Los geles eran preparados con 40 mL de TAE 1X, 0.8 g de agarosa y 1.6 μ L de Midori. El procedimientos lo realizaba de la siguiente manera:

1. Acomodar la cámara antes de iniciar
2. Pesar la agarosa y medir el volumen indicado de TAE 1X
3. Calentar para disolver completamente y añadir enseguida el midori (Para el marcaje de ácidos nucleicos)
4. Verter el líquido en la cámara y esperar a que gelifique
5. Colocar el gel en la caja y cubrir con TAE 1X, hay que colocar el gel de manera correcta, el ADN tiene carga negativa, por lo tanto, el gel siempre corre de negativo a positivo
6. Añadir el marcador y las muestras en los pozos
7. Correr el gel a 70V durante 45min
8. Esperar y revelar en el ChemiDoc (Fig.5)

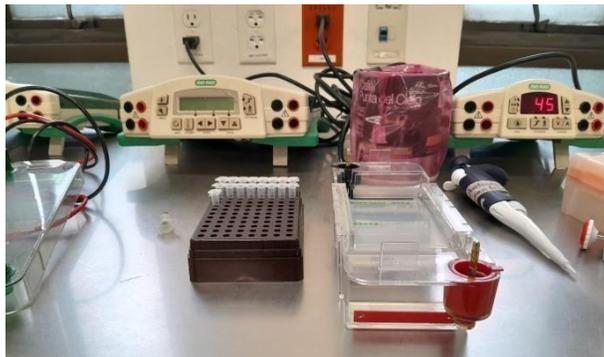


Figura 4. – Gel de agarosa con las muestras, iniciando la electroforesis.

La forma correcta para interpretar los resultados es de acuerdo con el tamaño de la banda que se genera en el gel (Tabla 1). Se utiliza un marcador de peso molecular (MPM) de 100 pares de bases (pb) como indicador, para poder medir las demás bandas que se generan.

Tabla 1. – Genotipo de acuerdo con el tamaño de la banda: WT= ratón silvestre; KI= ratón transgénico HET= ratón heterocigoto.

Genotipo	Tamaño de banda
WT	680 pb
KI	780 pb
HET	680 y 780 pb

Los resultados del genotipaje se guardan en una base de datos con el numero de ratón, la imagen del gel, el experimentador, el tamaño del gel y el tipo de genotipo de cada ratón, como se muestra a continuación:

Experimentador	Annel
Fecha	14/08/24
gen	SPAK

Número de ratón	Genotipo
1469	WT
1473	HET
1474	WT
1479	WT
M833	KI
M836	KI
M838	KI
M846	HET
M847	WT
M837	HET
M832	WT
M836	KI

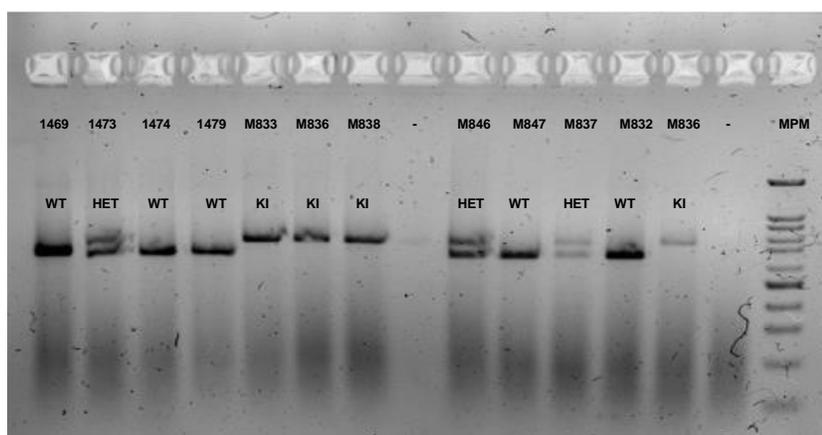


Figura 5. – Resultado de un gel de agarosa

Inmunofluorescencia

Tiene como objetivo localizar antígenos a través de la unión antígeno-anticuerpo. Donde el anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo reconoce el anticuerpo primario. Para que exista una mejor especificidad en el reconocimiento del anticuerpo primario con el secundario se han implementado técnicas como la unión de proteínas como la biotina y la avidina (Parra-Medina y Polo, 2017). Los resultados del reconocimiento de los antígenos por los autoanticuerpos presentes en el suero, plasma o cualquier otro líquido, se evalúan en un microscopio de fluorescencia (Pérez-Campos, 2022).

Meta: Apoyar en la realización de inmunofluorescencia y comprender como actúan los anticuerpos

Especificaciones: Los ratones transgénicos, se les realizaba una perfusión para poder extraer el cerebro y se hacían cortes en el criostato. Cada corte era seleccionado de acuerdo con lo cada núcleo a trabajar, como SCN (núcleo supraquiasmático), PVN (núcleo paraventricular), OVLT (Órgano vascular de la lámina terminal) y arqueado. A los cortes se les realizaban lavados con TBS 1X + 0.05% Tritón para quitar el exceso de sacarosa donde se almacenaban. Después los cortes eran incubados en solución bloqueo (3% Donkey serum en TBS 1X + Tritón 0.15%) para evitar uniones no específicas de los anticuerpos. A continuación, se añadían los anticuerpos primarios y se incubaban durante dos noches a temperatura ambiente y en agitación. Pasado las dos noches se volvían a realizar lavados, y se añadían los anticuerpos secundarios, se incubaban durante dos horas, para después volver a realizar lavados. Finalmente se dejaban incubando una noche cubiertos con aluminio (Fig. 6)



Figura 6. – Inmunofluorescencias, realizando los lavados para poner los anticuerpos secundarios.

Al día siguiente se realizaba el montaje de los cortes en laminillas (Fig. 7), donde se le ponía DAPI, una tinción fluorescente, que se utiliza en microscopía de fluorescencia. para marcar núcleos celulares, se quitaba el exceso y finalmente se cubrían con medios de montaje, con fluoromount. Para observar la laminilla se usaba un microscopio de fluorescencia.

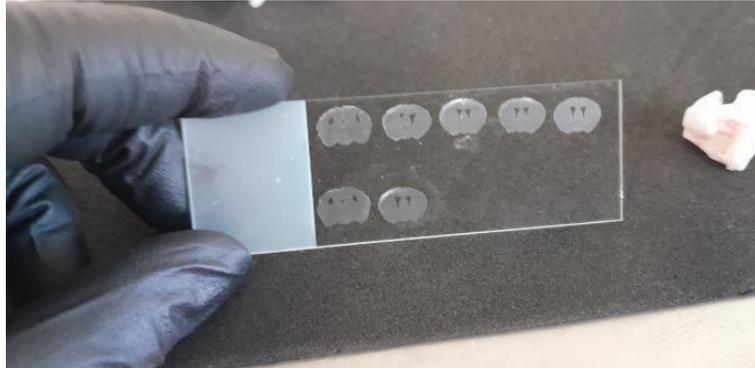


Figura 7. – Montaje de los cortes para observar al microscopio de fluorescencia.

En el microscopio de fluorescencia, las imágenes se tomaban utilizando el software de microscopía ZEN, se ubicaban las regiones de interés del cerebro como el SCN, PVN, OVLT, DMH, VMH y arqueado (Fig. 8). Las imágenes eran organizadas en presentaciones para su posterior análisis.

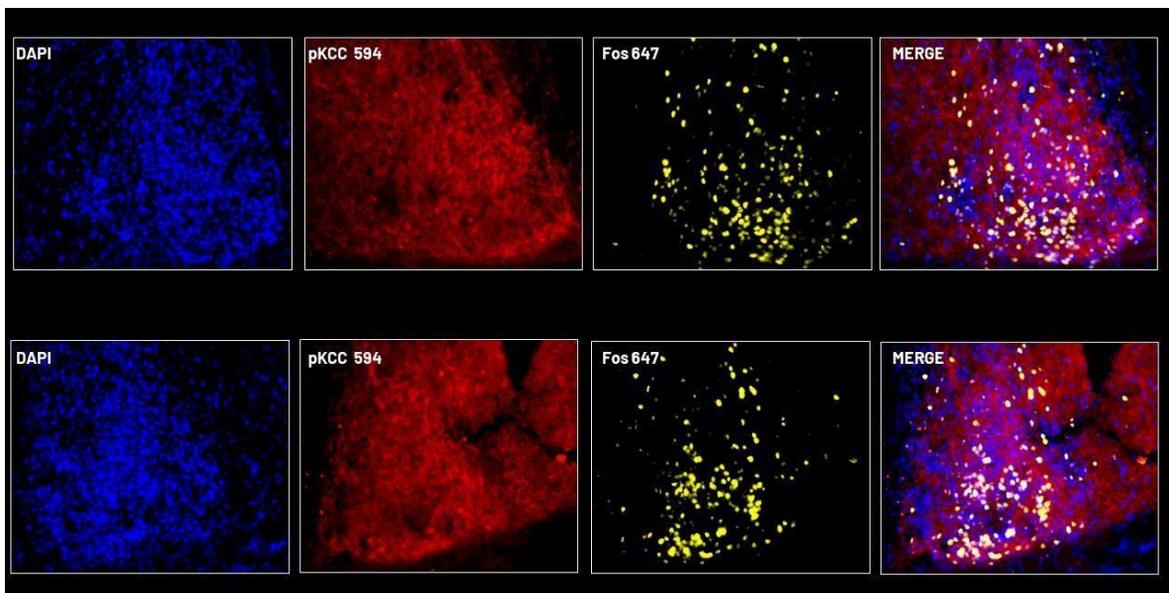


Figura 8. – Ejemplo una inmunofluorescencia, imágenes tomadas con microscopio de fluorescencia en 40x.

6. APRENDIZAJE Y HABILIDADES

Durante el desarrollo de mí de servicio social realicé varias actividades relacionadas con biología molecular, comprendí los fundamentos y las técnicas adecuadas para tener buenas prácticas y resultados. También tuve la oportunidad de asistir a algunos seminarios para comprender mejor los temas que de investigación que se abordan en esta institución. En general se cumplió con los objetivos planteado, pero sobre todo descubrí que me gusta estar en el laboratorio y me impulso a querer seguir formándome en el ámbito de la investigación científica.

7. REFERENCIAS

- Araiza Alvarez Jorge Alberto (2021). Manual De Procedimientos Para El Uso Correcto De Micropipetas. Unidad De Investigación Médica En Nutriciónhospital De Pediatría Cmn Siglo Xxi. 24 p. en <https://es.scribd.com/document/601844322/Manual-de-Procedimientos-Pipeteo>
- Araujo-Castro, M., Pascual-Corrales, E., Ortiz-Flores, A. E., & Escobar-Morreale, H. F. (2020). Eje hipotálamo hipofisario. Fisiología y patología. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(15), 846-855.
- Fierro, F. F. (2014). Electroforesis de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 27.
- García Amelia; Jiménez Julia; Eladia Colón; Maritza Martínez (2010). MANUAL DE PRACTICAS DE LABORATORIO DE QUIMICA GENERAL II.UNAPEC 3ra ed. 96p
- Mellado, O. M. D. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *NPunto*, 3(30), 88-111.
- Mourelle, A. C., Herrero, E., & Ricca, M. (2013). Recomendaciones para manipulación y sujeción de ratas y ratones de laboratorio.
- Ortega, L. G. (2009). LA CIENCIA AL ALCANCE DE LA MANO. *CUADERNOS DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA SEBBM" RINCÓN DEL PROFESOR DE CIENCIAS 2009-2011*, 9.
- Parra-Medina, R., & Polo, J. F. (2017). Inmunofluorescencia en tejidos fijados y preservados en parafina (IF-P). Una mirada desde la patología quirúrgica. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 26(4), 202-207.
- Pérez-Campos Mayoral, L., Pérez-Campos, E., & Hernández-Huerta, M. (2022). Anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia indirecta.
- Pérez-Campos Mayoral, L., Pérez-Campos, E., & Hernández-Huerta, M. (2022). Anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia indirecta.
- Rafiqi, F. H., Zuber, A. M., Glover, M., Richardson, C., Fleming, S., Jovanovi, S., ... & Alessi, D. R. (2010). Role of the WNK-activated SPAK kinase in regulating blood pressure. *EMBO molecular medicine*, 2(2), 63-75.
- Ramírez-Carretero, S., Miranda-Zaragoza, B., & Rodríguez-Almazán, C. (2021). Purificación de proteínas. *Mensaje bioquímico*, 45(1), 35-47.

- Tamay de Dios, L., 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.
- Torre-Villalvazo, I., Cervantes-Pérez, L. G., Noriega, L. G., Jiménez, J. V., Uribe, N., Chávez-Canales, M., ... & Gamba, G. (2018). Inactivation of SPAK kinase reduces body weight gain in mice fed a high-fat diet by improving energy expenditure and insulin sensitivity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 314(1), E53-E65.