

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

**INFORME DE CONCLUSIÓN DEL SERVICIO SOCIAL
POR ACTIVIDADES RELACIONADAS A LA PROFESIÓN**

**Aplicación de técnicas de biología molecular en el Laboratorio de Fisiología
Experimental de la Unidad de Investigación del
Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM**

QUE PRESENTA LA ALUMNA:

Berenice Espinosa Tlacuapa

**Matrícula
2173067431**

ASESORES

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



Firma

**Asesor externo: Dra. María de Jesús Chávez Canales (No. Cédula: 6925078).
Instituto de investigaciones biomédicas (INC-UNAM). Laboratorio de
Fisiología Experimental.**



Firma

Contenido

INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVO GENERAL	5
ACTIVIDADES REALIZADAS	5
FUNDAMENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS	5
Entrenamiento técnico de laboratorio	5
Preparación de soluciones y diluciones	6
Genotipificación de ratones por técnica de PCR	6
<i>Western Blot</i>	10
Preparación de las muestras	10
Cuantificación de proteínas totales: ensayo del ácido bicinconínico (BCA)	11
Electroforesis de proteínas: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)	12
Transferencia electroforética (<i>Blotting</i>)	14
Bloqueo	16
El uso de anticuerpos para la detección de las proteínas	16
DESCRIPCIÓN DEL VÍNCULO DE LAS ACTIVIDADES DESARROLLADAS CON LOS OBJETIVOS DE FORMACIÓN DEL PLAN DE ESTUDIOS	20
METODOLOGÍA	20
METAS ALCANZADAS	21
RESULTADOS Y CONCLUSIONES	21
REFERENCIAS	23

RESUMEN

El presente reporte de servicio social describe las actividades realizadas en el Laboratorio de Fisiología Experimental de la Unidad de Investigación del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM ubicado dentro de las instalaciones del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez durante el periodo del 13 de marzo al 13 de septiembre del 2023. Las actividades realizadas comprenden la genotipificación de ratones por medio de PCR de punto final, la electroforesis de ADN en geles de agarosa, la electroforesis de proteínas en SDS-PAGE y la cuantificación de proteínas totales de distintos tejidos de ratones por el método BCA. Así mismo se realizó la técnica de *Western Blot* tanto para probar distintos anticuerpos, así como para el estudio de la expresión relativa de proteínas de interés para dicho laboratorio, por lo que la labor de la alumna fue procesar y aplicar esta técnica a las muestras provenientes de diferentes experimentos llevados a cabo dentro del laboratorio en ratones transgénicos y silvestres sometidos a diferentes regímenes dietéticos. Al finalizar el periodo de servicio social, se logró integrar, aplicar y reforzar los conocimientos adquiridos durante la licenciatura en Química Farmacéutica Biológica como las características de las proteínas y del ADN, así como la aplicación práctica de técnicas como la electroforesis de proteínas y ADN, el *Western Blot* y la PCR.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo describe las actividades que se realizaron durante el servicio social por prácticas relacionadas con la profesión durante el periodo de 13 de marzo al 13 de septiembre del 2023, cubriendo un total de 480 dentro de las instalaciones del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez ubicado en Juan Badiano 1, Belisario Domínguez Sec 16, Tlalpan, 14080 Ciudad de México, en el Laboratorio de Fisiología Experimental de la Unidad de Investigación del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

El Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, inaugurado el 18 de abril de 1994, ha tenido como misión “Aliviar las enfermedades cardiovasculares mediante la investigación científica trascendente, educación profesional superior y una atención médica moderna con calidad humanitaria” mientras que su visión ha sido “ser líderes y referentes de la cardiología, inspirados en una filosofía de renacimiento de la excelencia científica y la actitud humanitaria”. Esta institución tiene el compromiso social de brindar a la población que carece de seguridad social una atención de alta calidad, así como el desarrollo de investigación vanguardista y la formación de especialistas con el objetivo de prevenir afecciones cardiacas y proporcionar la rehabilitación de los enfermos.

Las actividades desarrolladas en este instituto se centraron principalmente en la técnica de PCR de punto final y la técnica de *Western Blot*, en un contexto de investigación. Al llegar al laboratorio, recibí un entrenamiento técnico inicial para garantizar el manejo adecuado de los equipos básicos, con el propósito de minimizar errores y evitar cualquier práctica que pudiera afectar el funcionamiento de los equipos. Asimismo, me dediqué a la preparación de soluciones y disoluciones comúnmente utilizadas en el laboratorio.

Después de completar este entrenamiento, llevé a cabo varias genotipificaciones de ratones utilizando la técnica de PCR de punto final. Esto implicó la lisis de colas de ratones transgénicos y de tipo silvestre, seguida de la amplificación de los alelos de interés y la posterior separación de los fragmentos de ADN amplificados mediante electroforesis en geles de agarosa.

Además, realicé la técnica de *Western Blot* en repetidas ocasiones, enfocándome en diferentes proteínas, principalmente cotransportadores de iones relacionados con el metabolismo energético. Con este fin, procesé los tejidos de ratones provenientes de diversos experimentos, llevando a cabo tanto la lisis química como la lisis mecánica para extraer las proteínas. Posteriormente, cuantifiqué las proteínas totales utilizando el método BCA, para poder homogeneizar la concentración en cada muestra antes de cargarlas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio. Finalmente, transferí las proteínas separadas por electroforesis a una membrana y detecté a las proteínas diana utilizando anticuerpos específicos.

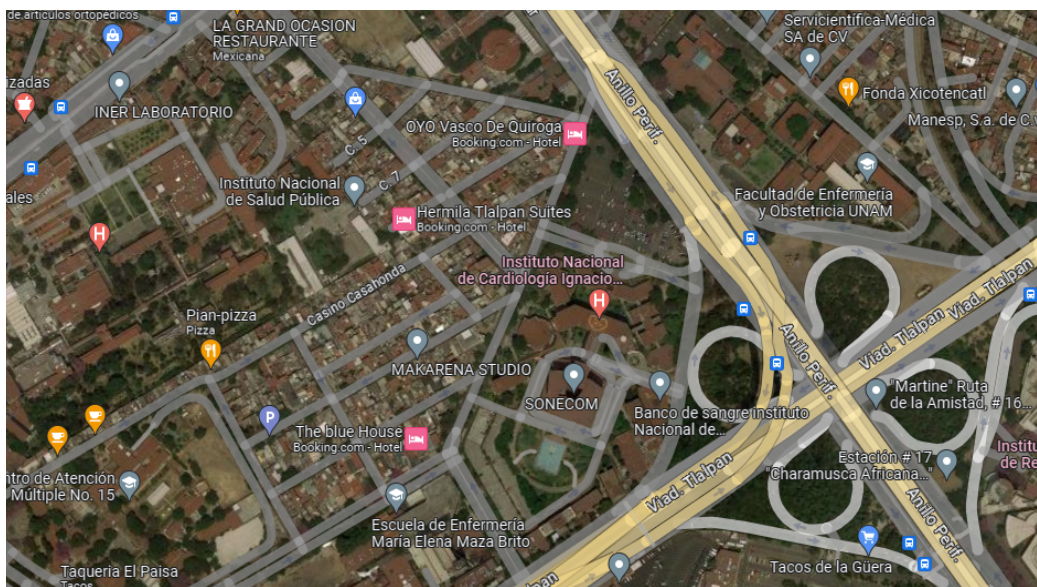


Figura 1. Ubicación del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, imagen tomada de *Google Maps* (2023).

OBJETIVO GENERAL

Aplicar y consolidar los conocimientos adquiridos en la licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, así como desarrollar habilidades en el empleo de diferentes técnicas de biología molecular.

ACTIVIDADES REALIZADAS

Durante mi estancia en el Laboratorio de Fisiología Experimental, llevé a cabo diversas actividades en las que pude realizar ciertas técnicas de biología molecular. Las actividades efectuadas durante el servicio social se enlistan a continuación.

- Entrenamiento técnico para utilizar los equipos básicos de laboratorio: balanza, potenciómetro, centrifuga y micropipetas.
- Preparación de soluciones y diluciones.
- Genotipificación de modelos murinos. Realicé la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final.
- Electroforesis de ADN en geles de agarosa.
- Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.
- Cuantificación de proteínas totales por el método BCA.
- *Western Blot* o inmunoblot.

FUNDAMENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

Entrenamiento técnico de laboratorio

Esta actividad fue fundamental para utilizar adecuadamente los equipos básicos de un laboratorio, así como practicar habilidades como el pipeteo. Estas actividades me permitieron utilizar estos equipos de manera segura, disminuir errores de medición, así como mantener el equipo en buenas condiciones.

- **Balanza:** Es uno de los instrumentos de medición más importantes en el laboratorio ya que en casi todos los procedimientos realizados se utiliza, por ejemplo, para preparar soluciones es necesario determinar el peso de los reactivos. La balanza analítica es un instrumento de precisión delicado que no funcionará correctamente si no se usa adecuadamente por lo tanto se deben tener en cuenta varios puntos como evitar vibraciones en la superficie sobre la que se disponga este instrumento, también hay que cerrar la caja de

la balanza antes de tomar la lectura debido a que las corrientes de aire podrían afectar la medición y siempre se debe utilizar algún contenedor para no poner ningún producto químico directamente sobre la charola, etc (Turgeon, 2012).

- **Centrífuga:** Es un instrumento empleado para la separación de partículas que se encuentran suspendidas en un fluido por medio del aumento de la fuerza gravitacional mediante una rotación rápida. Como resultado, en el fondo del tubo queda empaquetado el material sólido llamado sedimento y sobre éste queda el líquido al cual se le denomina sobrenadante. Lo más importante al manejar este equipo es mantener el balance de los tubos dispuestos en la centrífuga para evitar que el motor se dañe. Por lo tanto, los tubos deben poseer mismo tamaño, forma y volumen de líquido entre sí (Turgeon, 2012; Matzumura *et al.*, 2013).
- **Micropipetas:** Son instrumentos empleados para medir volúmenes pequeños de líquidos en rangos establecidos que usualmente van de 0.5 a 10, 2 a 20, 10 a 100 y 100 a 1000 μL (Matzumura *et al.*, 2013). El uso correcto de estos instrumentos permite pipetear volúmenes con exactitud y precisión, para esto hay que evitar, por ejemplo, que al momento de tomar cierto volumen de un líquido se aspire aire o que queden gotas en la punta antes de dispensar el líquido en otro contenedor (Thermo Fisher Scientific, s.f.). Utilizar adecuadamente las micropipetas permite que se mantengan en buen estado ya que, por ejemplo, pueden descomponerse si ajustamos el volumen por arriba o por debajo del rango de la micropipeta o si el líquido que se encuentra en la punta entra a su sistema. Otra consideración es cambiar siempre la punta para evitar contaminar soluciones (Matzumura *et al.*, 2013).

Preparación de soluciones y diluciones

Una vez sabiendo utilizar adecuadamente los instrumentos de medición como la balanza y el potenciómetro, pude preparar distintas soluciones de acuerdo a las necesidades del laboratorio. Para este fin debí tener presente conceptos como disolución, porcentaje peso/volumen (% p/v), concentración molar (M) y concentración normal (N).

Genotipificación de ratones por técnica de PCR

En el laboratorio de fisiología experimental se trabaja con ratones transgénicos y silvestres, por lo tanto, es importante saber su genotipo para planificar los experimentos que se realizarán. Para genotipificar a los ratones realicé la técnica

de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final la cual permite amplificar el fragmento de ADN de interés. Para efectuar esta técnica es necesario el empleo de los siguientes elementos:

- **DNA polimerasa termoestable:** Las DNA polimerasas son enzimas que permiten la síntesis de una nueva cadena de ADN a partir de una cadena molde. Para la PCR debe utilizarse DNA polimerasas que sean estables hasta 95°C y enzimáticamente activas a temperaturas en torno a 75°C. La más utilizada es la Taq polimerasa, llamada así por haberse encontrado en la bacteria *Thermus aquaticus* (Herráez, 2012).
- **dNTPs:** Funcionan como sustrato de la polimerasa para la síntesis de los amplicones (Herráez, 2012).
- **Primers:** También llamados cebadores u oligonucleótidos, son fragmentos monocatenarios de 18 a 30 nucleótidos que se unen por complementariedad a los extremos 3' del fragmento que se quiere amplificar. Se deben utilizar dos *primers* para delimitar el fragmento diana (Herráez, 2012).
- **MgCl₂:** Tiene dos funciones, por un lado, permite el reconocimiento de los dNTPs por parte de la polimerasa, y por otro, actúa como coenzima para permitir que dicha enzima lleve a cabo la amplificación (Herráez, 2012).

El proceso para la amplificación ocurre en 3 etapas y se lleva a cabo en un termociclador:

- **Desnaturalización:** Etapa donde hay un calentamiento (68- 97°C) para poder separar las cadenas de ADN (Herráez, 2012).
- **Hibridación:** Se induce un enfriamiento rápido que permite la unión de los cebadores al ADN monocatenario (Herráez, 2012).
- **Replicación:** En esta etapa la polimerasa elonga los cebadores utilizando como molde las 2 cadenas originales (Herráez, 2012).

Para la genotipificación de ratones mediante PCR de punto final en el Laboratorio de Fisiología Experimental primero se deben lisar las colas de los ratones que se requieren tipificar. Para tal fin se utilizó la metodología siguiente:

1. Una vez recibidas las biopsias de las colas del bioterio, cada una se dispone en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se añaden 125 µL de NaOH 100 mM.
2. Se incuban por 30 minutos a 85-95°C.
3. Retirar y dejar enfriar un poco sobre la mesa.
4. Agitar los tubos en vórtex por unos segundos hasta que la cola se deshaga.

5. Centrifugar por 1 o 2 minutos a máxima velocidad.
6. Agregar a cada tubo 150 μ L de Tris HCl 0.17 M pH 8.0 y agitar en vórtex.
7. Centrifugar por 5 minutos a máxima velocidad.

Una vez que se hayan lisado las colas de los ratones se procede a realizar la PCR de punto final, para ello se debe preparar el *mastermix* que consiste en la mezcla de $MgCl_2$, los dNTP's, los *primers* correspondientes y la Taq polimerasa. Después se mezclan 2 μ L de la lisis con el *mastermix*. Las condiciones a las cuales se someten las muestras en el termociclador dependen del fragmento de DNA que se desea amplificar. Al finalizar los ciclos en el termociclador se realiza una electroforesis de los amplicones en un gel de agarosa.

El gel de agarosa se prepara a cierto porcentaje el cual depende del tamaño del fragmento de DNA de interés. Para poder visualizar las bandas de DNA en el gel se añade *MIDORI Green Advance DNA stain* (por cada 100 mL de gel de agarosa se añaden 4 μ L del colorante). Para la realización de la electroforesis, se emplea una solución de TAE 1X junto con un marcador de peso molecular apropiado, además de controles positivos y negativos. Posteriormente, al terminar la electroforesis se visualiza el gel utilizando el sistema de imágenes ChemiDoc™ de Bio-Rad. La interpretación de los resultados se basa en el número y el peso molecular de las bandas obtenidas, lo que permite determinar si los ratones son homocigotos o heterocigotos para los alelos de tipo salvaje o mutantes.

A continuación, se presentan ejemplos de algunas genotipificaciones que realicé utilizando el ADN de biopsias de colas de ratones transgénicos. Las amplificaciones incluyeron genes como *STK39* que codifica para la proteína SPAK (STE20/SPS1-related proline-alanine-rich protein kinase), y *SLC32A1*, que codifica para VGAT (vesicular GABA transporter). A lo largo de mi estancia, realicé numerosas genotipificaciones similares, de las cuales se presentan sólo algunos ejemplos en las **figuras 2 y 3**.

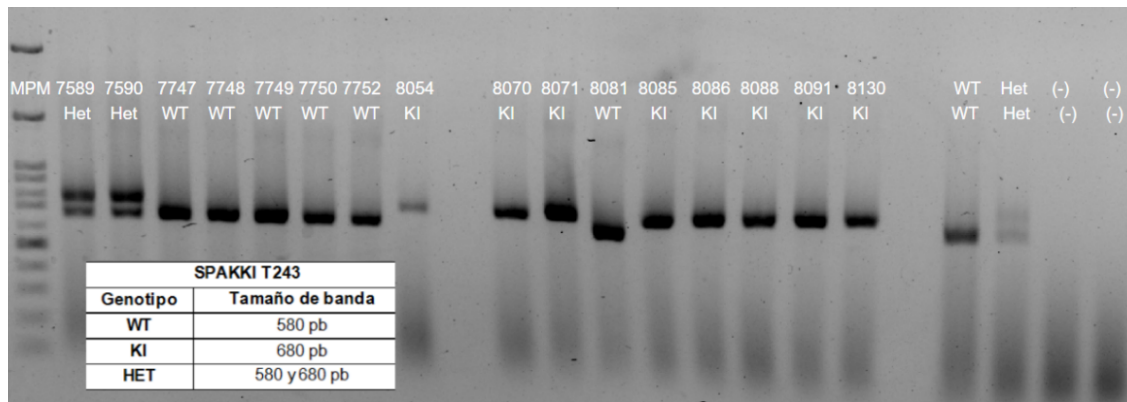


Figura 2. Ejemplo de un gel de agarosa con bandas de productos amplificados por PCR del gen que codifica para la proteína SPAK. Cada carril representa un ratón que puede ser homocigoto *wild type* (WT) si se presenta una sola banda de 680 pb, heterocigoto (Het) con bandas de 680 y 780 pb u homocigoto transgénico si presenta dos alelos mutantes (KI) exhibiendo una única banda de 780 pb. Los últimos cuatro carriles muestran: un ratón homocigoto *wild type* (WT), un ratón heterocigoto (Het) así como dos carriles con controles negativos (-) sin amplificación.

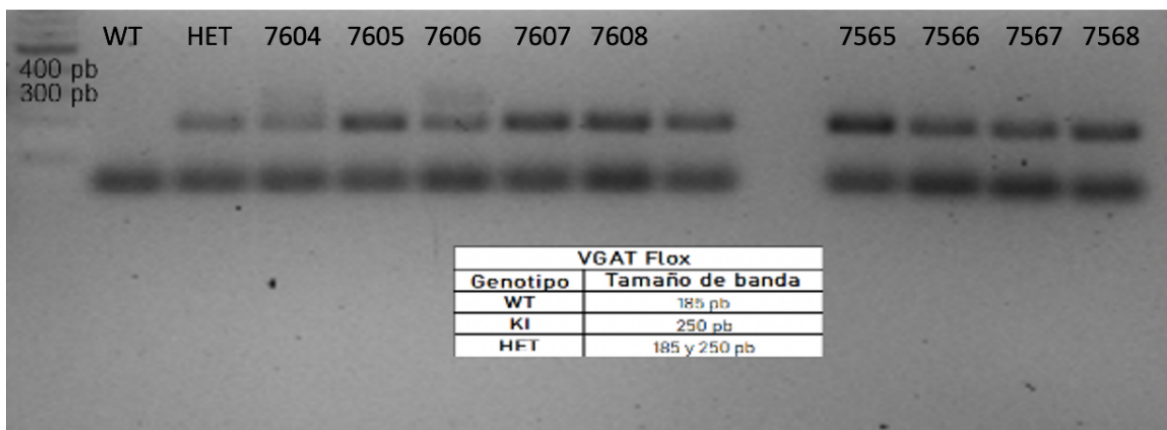


Figura 3. Gel de agarosa con las bandas correspondientes a productos amplificados por PCR del gen que codifica para la proteína VGAT. Cada carril representa un ratón en la genotipificación. En el primer carril, después del marcador de peso molecular, se encuentra un control positivo para el tipo silvestre (WT), identificable por una única banda a 185 pb. En el segundo carril, se observa un control positivo heterocigoto (Het) con dos bandas a 185 (alelo WT) y 250 pb (alelo mutante). Los carriles restantes revelan que todos los ratones presentan un genotipo heterocigoto.

Western Blot

En el laboratorio de Fisiología Experimental se emplea la técnica de *Western blot* para examinar la expresión relativa de ciertas proteínas específicas. Durante mi estancia en este laboratorio procesé muestras provenientes de diversos experimentos realizados en ratones transgénicos y de tipo silvestre sometidos a diferentes regímenes dietéticos. Los resultados obtenidos fueron utilizados para analizar la actividad y expresión relativa de cotransportadores iónicos, tales como NCC, KCC, NKCCs, α -ENaC, δ -ENaC, y otras proteínas relevantes.

Esta técnica implica la separación de proteínas de una muestra según su peso molecular mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Posteriormente, las proteínas separadas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno (PVDF), la cual se incuba con antisueros para detectar las proteínas de interés (MacPhee, 2010). El *Western Blot* se emplea, entre otras aplicaciones, para estudiar la presencia y la abundancia relativa de proteínas en una muestra (MacPhee, 2010). A continuación, se detallan los diferentes pasos implicados en esta técnica.

Preparación de las muestras

Antes de realizar la inmunotransferencia se deben preparar adecuadamente las muestras debido a que una extracción y purificación de proteínas eficientes tienen un impacto importante en los resultados (Mishra & Gomes, 2017).

- **Homogeneización:** El objetivo de este paso es romper las membranas celulares para liberar el contenido intracelular de las células. Existen métodos de homogeneización como la ultrasonificación, la prensa francesa, la molienda con perlas de vidrio y la molienda con mortero, entre otros. Para la elección de la técnica que se utilizará se debe tomar en cuenta si se homogeneizarán células o tejidos. En este último caso también hay que considerar el tipo de tejido (Sule *et al.*, 2023).
- **Lisis:** Se emplea una solución amortiguadora que facilite la solubilización de las proteínas y que evite su degradación para obtener mayor rendimiento de las proteínas de interés (Mishra & Gomes, 2017). Existen diferentes tipos de soluciones y su elección depende de las proteínas diana, de su capacidad de extracción, de su capacidad para mantener la integridad de las proteínas, así como su capacidad de mantener los sitios antigénicos para que las proteínas sean reconocidas por los anticuerpos (MacPhee, 2010; Mishra & Gomes,

2017). Para lograr la extracción y solubilización de las proteínas se emplean detergentes los cuales deben ser compatibles con la electroforesis en el gel de poli(acrilamida) (MacPhee, 2010). Cuando se emplean agentes reductores para mejorar la solubilización de las proteínas o para mantener su estado activo hay que considerar que éstos pueden interferir con los métodos de cuantificación de proteínas (Mishra & Gomes, 2017). Por otro lado, la solución amortiguadora de lisis debe contener inhibidores de fosfatasa y proteasas pues estas enzimas se liberan durante las lisis y pueden actuar sobre las proteínas diana (MacPhee, 2010).

Durante mi servicio social extraje proteínas totales de tejidos de músculo y riñón por lo que utilicé un *buffer* de lisis y el *Polytron* para homogeneizar los tejidos de la siguiente manera:

1. Para preparar el *buffer* de lisis se calcula el volumen requerido y se prepara un excedente. Para ello se debe considerar que se añade 100 μL de *buffer* de lisis por cada 10 mg de tejido a un tubo previamente enfriado por cada muestra.
2. Una vez calculado el volumen que se va a emplear se añaden los inhibidores de proteasas y el β -mercaptoetanol.
3. Se añade el *buffer* de lisis en los tubitos que contienen el tejido y se procede a homogeneizar con el *Polytron* a 30,000 rpm durante 30 segundos cuidando que no se genere mucha espuma y no se caliente la muestra. Antes y después de homogeneizar cada muestra se limpia el *Polytron* con alcohol seguido de agua destilada y se seca el pistilo.
4. Se dejan los lisados 30 min en hielo para que ocurra la lisis química.
5. Los lisados se centrifugan a 15,000 rpm por 10 min a 4°C.
6. Se hacen alícuotas de los lisados y se guardan a -80°C.

Cuantificación de proteínas totales: ensayo del ácido bicinónico (BCA)

Aunque existen varios métodos para cuantificar las proteínas obtenidas durante la extracción, durante mi servicio social realicé el ensayo del ácido bicinónico (BCA). Este método se realiza antes de la electroforesis para ajustar la concentración de proteínas que se cargarán en los geles de poli(acrilamida) y para determinar el volumen que se empleará de *buffer* de carga Laemmli que se describirá más adelante. El ensayo del ácido bicinónico (BCA) se basa en la combinación de la reacción de Biuret seguida de una detección colorimétrica. La reacción de Biuret es aquella en la que en un medio alcalino los péptidos con 3 o más aminoácidos quelan iones cúpricos (Cu^{2+}) que se reducen a iones cuprosos

(Cu⁺) y con lo cual se forma un complejo tetradentado de color azul. Posteriormente dos moléculas de ácido bicinconínico quelan un ion cúprico (Cu⁺) dando como resultado un producto de color púrpura (Thermo Fisher Scientific, s.f.). En el mercado se encuentran disponibles diversos *kits* con los que solo es necesario preparar una “solución de trabajo” y una serie de diluciones de una proteína estándar de concentración conocida que suele ser la albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés). Tanto las muestras como la serie de diluciones se mezclan con la solución de trabajo en una microplaca de 96 pozos y se utiliza un espectrofotómetro para obtener sus absorbancias. Posteriormente, se realiza una curva estándar con las absorbancias de las diluciones de la BSA y se extrapolan los valores de absorbancia de las muestras con la curva para determinar su concentración de proteínas (Thermo Fisher Scientific, s.f.).

Para realizar este ensayo en el laboratorio utilicé el *kit* de ABP Biosciences, el espectrofotómetro BioTek y el *software* Gen 5 de BioTek.

Electroforesis de proteínas: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

El siguiente paso implica llevar a cabo una electroforesis, una técnica utilizada para separar las proteínas de una muestra en función de su relación carga/masa. Este proceso consiste en aplicar una corriente eléctrica a través de una solución amortiguadora que contiene el gel con las muestras (Montes *et al.*, 2013). Aunque hay diferentes tipos de electroforesis en gel de poliacrilamida, la SDS-PAGE permite la separación de las proteínas solamente en función de su peso molecular siendo el método empleado para analizar mezclas complejas de proteínas (Sule *et al.*, 2023).

A continuación, se describen los elementos necesarios para realizar la electroforesis SDS-PAGE:

- **Buffer de carga:** Confiere a la muestra peso, densidad y color. Además, si es requerido se pueden añadir agentes desnaturalizantes y agentes reductores (Montes *et al.*, 2013). Para el *Western Blot* se utiliza el *buffer* Laemmli cuyos componentes proporcionan a las muestras las características necesarias para la electroforesis SDS-PAGE:
 - **Tris-HCl 60 mM pH 6.8:** Funciona como el sistema de amortiguamiento (Gavini & Parameshwaran, 2023).
 - **Glicerol:** Provee densidad a las muestras permitiendo que se desplacen hacia el fondo de los pozos del gel (Gavini & Parameshwaran, 2023).

- **Azul de bromofenol:** Es un colorante no reactivo que permite monitorear la corrida de la muestra a través del gel (Montes *et al.*, 2013; Gavini & Parameshwaran, 2023).
- **Dodecil sulfato de sodio (SDS):** Se trata de un tensoactivo fuertemente aniónico que se une a las regiones hidrofóbicas de las proteínas. Esta unión ocasiona que las proteínas queden cargadas negativamente por lo cual durante la electroforesis migran solamente hacia el ánodo (Alberts, 2015). Además, es un agente desnaturizante que permite la ruptura de interacciones hidrofóbicas, enlaces iónicos y puentes de hidrógeno (Hou & Wang, 2020). De esta manera, al enmascarar la carga e influir en la forma y el tamaño de las proteínas permite que en la electroforesis puedan migrar solamente en función de su peso molecular (Gavini & Parameshwaran, 2023).
- **β -Mercaptoetanol:** Es un agente reductor que rompe enlaces disulfuro los cuales contribuyen en la forma de la proteína por lo que también evita que la forma influya durante la electroforesis (Gavini & Parameshwaran, 2023).
- **Marcador de peso molecular:** Contiene moléculas de proteínas de peso conocido (de 10 hasta 300 kDa) que pueden estar teñidas. Permiten determinar el tamaño de las proteínas contenidas en las muestras mediante comparación (Montes *et al.*, 2013).
- **Gel de poliacrilamida:** Es una matriz semisólida resultado de la polimerización de la acrilamida y la bisacrilamida. Se utiliza como soporte de la muestra para evitar las perturbaciones mecánicas durante la electroforesis. Así mismo, el gel funciona como un tamiz que permite separar a las proteínas por su tamaño ya que se enredan en sus poros al pasar a través de él. Cuanto mayor tamaño tenga la proteína más se enredará en estos poros. La concentración de la acrilamida determina el tamaño del poro, a mayor concentración el poro será más pequeño y viceversa. Entonces, la concentración de acrilamida en un gel influirá en qué tan rápido migrarán las proteínas ya que a menor concentración menor será el enlazamiento del gel y por lo tanto más rápidamente migrará una proteína a través de él (Montes *et al.*, 2013; Thieman & Palladino, 2015).
Para hacer un gel de poliacrilamida se utilizan soluciones amortiguadoras cuyo pH y fuerza iónica influyen en la resolución de las proteínas. Para esto suele recomendarse el uso de Tris base. También se emplea persulfato de amonio (APS) que genera radicales libres para iniciar la polimerización, así como un polimerizador llamado N, N, N', N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED) (Montes *et al.*, 2013; MacPhee, 2010).
Los geles para la electroforesis de proteínas consisten en 2 geles con diferente concentración de poliacrilamida:

- **Gel concentrador:** Tiene un tamaño de poro grande lo cual permite que las proteínas se concentren y puedan entrar al gel separador al mismo tiempo. Se prepara con una solución amortiguadora de Tris-HCl con pH 6.8 (Sule *et al.*, 2023; Gavini & Parameshwaran, 2023).
- **Gel separador:** Está constituido por poros pequeños. Se elaboran con Tris-HCl con pH 8.8 y pueden emplearse diferentes porcentajes de acrilamida (Sule *et al.*, 2023; Montes *et al.*, 2013).
- **Solución amortiguadora de corrida:** Permite que se conduzca la corriente eléctrica debido a su alto contenido de electrolitos y mantiene estable el pH durante la corrida. El *buffer* utilizado en la electroforesis de proteínas es el TGS 1X que está compuesto por Tris base, glicina y SDS (Montes *et al.*, 2013).
- **Cámara de electroforesis:** Es un dispositivo que genera un campo eléctrico en una solución amortiguadora en la que se encuentra el gel que contiene las muestras. Esta cámara tiene dos polos (positivo y negativo) conectados a una fuente de energía (Montes *et al.*, 2013).

En el laboratorio de Fisiología Experimental los geles de poliacrilamida se preparan a distintos porcentajes dependiendo del tamaño de las proteínas diana. Los reactivos utilizados para elaborar los geles de poliacrilamida fueron: agua destilada, acrilamida/bisacrilamida 30%, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 (para el gel separador), Tris-HCl pH 6.8 (para el gel concentrador) APS 10% y TEMED, mientras que el *buffer* de corrida utilizado fue TGS 1X.

Transferencia electroforética (*Blotting*)

Una vez concluida la electroforesis se procede a transferir las proteínas que se separaron en el gel a una membrana de nitrocelulosa o polivinilideno (PVDF). La transferencia puede ser húmeda o semiseca, pero en cualquier caso se ensambla un sándwich en el que se coloca en orden un papel filtro, el gel de poliacrilamida, la membrana y otro papel filtro. Al ensamblar el sándwich es importante evitar burbujas ya que impiden que la transferencia se efectúe adecuadamente. Esta técnica se basa en que las proteínas cargadas negativamente migran del cátodo hacia el ánodo al igual que en la electroforesis por lo que se hace pasar una corriente eléctrica perpendicular al sándwich para impulsar a las proteínas del gel hacia la membrana (MacPhee, 2010; Gavini & Parameshwaran, 2023).

- **Transferencia húmeda:** en este caso se colocan esponjas en cada lado del sándwich. Requiere de un gran volumen de buffer de transferencia (Gavini & Parameshwaran, 2023).

- **Transferencia semiseca:** no requiere gran cantidad de *buffer* de transferencia, solo lo necesario para humedecer al sándwich. Es más rápida en comparación con la húmeda ya que generalmente se necesita una hora para finalizar la transferencia, pero es posible que no se transfieran eficazmente las proteínas con alto peso molecular a diferencia de la transferencia húmeda (MacPhee, 2010; Gavini & Parameshwaran, 2023).

Por otro lado, se suelen utilizar *buffers* de transferencia basados en el *buffer* Towbin compuesto por Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20 % con pH 8.3. El uso de metanol ayuda a mejorar la adsorción de proteínas en la membrana, previene el aumento de tamaño del gel debido al aumento de temperatura por el voltaje y también previene la distorsión de las proteínas durante la transferencia (MacPhee, 2010; Gavini & Parameshwaran, 2023).

Las membranas son soportes a los que se unen las proteínas a través de interacciones principalmente hidrofóbicas. Las membranas más utilizadas son de nitrocelulosa y polivinilideno (PVDF). Cada una tiene cierta capacidad para unirse a la proteína, así que hay que considerar el volumen del lisado que se cargará en los carriles del gel. La capacidad de la membrana de nitrocelulosa es de 80-250 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ mientras que la de PVDF 170 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (MacPhee, 2010). Estas últimas tienen mayor resistencia química y se puede mejorar su eficiencia de transferencia si se añade SDS al *buffer* de transferencia. Sin embargo, en estas membranas puede aumentar la señal de fondo (Gavini & Parameshwaran, 2023).

Al finalizar la transferencia se puede hacer una tinción reversible, por ejemplo, con Ponceau S, para corroborar que se haya realizado adecuadamente y haya sido homogénea. Así mismo, con la tinción se puede verificar si se cargó adecuadamente las muestras en los carriles y se puede aprovechar para cortar las partes no deseadas de la membrana para minimizar su tamaño y con ello minimizar los volúmenes de las soluciones que se ocuparán en pasos posteriores (MacPhee, 2010).

En el laboratorio de Fisiología Experimental se utiliza la siguiente metodología:

1. Los geles se sacan y se incubaban en el *buffer* de transferencia por al menos 5-10 minutos.
2. Se hidrata la membrana de nitrocelulosa con agua destilada por 5 min. Para la membrana de PVDF se debe dejar en metanol por 5 minutos y después se enjuaga con agua.
3. La membrana se pone en el *buffer* de transferencia mientras se monta la transferencia.
4. Se transfiere en cámara húmeda por 1.5 h a 90 V constantes, mientras que en cámara semiseca a 10 V por 1.5 h.

5. Para verificar la transferencia de las proteínas se pone la membrana en rojo de Ponceau 1:5 por 5 minutos. Después se enjuaga con agua destilada hasta que se vean bien las proteínas y el fondo blanco para poder fotografiar la membrana y utilizar las imágenes para la normalización de las proteínas.
6. Se enjuagan las membranas con TBS 1X para quitar el rojo de Ponceau y se etiquetan las membranas con lápiz o un color o crayola. Se puede usar pluma sólo en las membranas de nitrocelulosa, no en PVDF.
7. Si se utilizan las membranas inmediatamente, se bloquean con leche, pero en caso contrario se dejan secar y se almacenan a 4°C con papel filtro y en plástico para evitar la humedad.

Bloqueo

Este paso tiene como objetivo enmascarar los sitios de unión no específicos de la membrana y puede promover la renaturalización de sitios antigénicos. Se puede utilizar un *buffer* de bloqueo con leche en polvo sin grasa al 5% en TBS-T (solución salina con *tween* 20 amortiguada con Tris) o BSA al 5% con algún *buffer* similar (MacPhee, 2010). En ambos casos, tanto la caseína de la leche como la BSA permiten el bloqueo ya que tienen una pobre unión a las proteínas de interés y al anticuerpo. Dependiendo de la proteína diana, se puede usar la leche o la BSA. La leche tiene la ventaja de ser económica, pero en caso de que las proteínas de interés estén fosforiladas es recomendable utilizar la BSA. Después del bloqueo hay que lavar la membrana con TBS-T (Gavini & Parameshwaran, 2023).

Durante el servicio social se utilizó leche al 10% en TBS-T 0.2% durante 10 a 30 minutos a temperatura ambiente para bloquear las membranas.

Anticuerpos para la detección de las proteínas

Las proteínas diana pueden ser detectadas en la membrana utilizando dos anticuerpos. Primeramente, un anticuerpo primario debe reconocer y unirse a un sitio específico de la proteína diana para que, posteriormente, un anticuerpo secundario reconozca indirectamente a la proteína al unirse al anticuerpo primario (Gavini & Parameshwaran, 2023). El anticuerpo secundario puede estar conjugado con enzimas que se pueden utilizar en métodos quimioluminiscentes de detección como la peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés) (Thermo Fisher Scientific, s.f.).

El método más popular para la detección de proteínas en el *Western Blot* y que permite la cuantificación de la abundancia relativa de una proteína es la quimioluminiscencia mejorada (ECL, por sus siglas en inglés). Este método se fundamenta en una reacción de oxidación en la que la peroxidasa de rábano picante cataliza al peróxido de hidrógeno y con ello se promueve la oxidación del luminol, generando así una emisión de luz detectable. Para aumentar la emisión de luz también se añaden compuestos fenólicos con sustitución como potenciadores que sustituyen al luminol (MacPhee, 2010).

A continuación, se presenta la metodología empleada durante mi estancia de servicio social para la detección de proteínas:

1. Después del bloqueo, se incuban las membranas con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C en agitación suave.
2. Al día siguiente se recupera el anticuerpo primario.
3. Se lavan las membranas 4 veces con TBS-t 0.2% durante 5 minutos.
4. Se incuban con el anticuerpo secundario durante 1.5 h a temperatura ambiente.
5. Se lavan las membranas 8 veces con TBS-T 0.2% por 5 minutos en agitación vigorosa.
6. Se prepara la solución de peróxido y luminol 1:1 del *kit Immobilon® ECL Ultra Western HRP Substrat* o el *kit Clarity™ Western ECL Substrate* y se colocan las membranas en esta solución.
7. Revelar en el sistema de imágenes *ChemiDoc™* de Bio-Rad.

A continuación, se muestran algunos de los resultados obtenidos de la técnica de *Western Blot*.

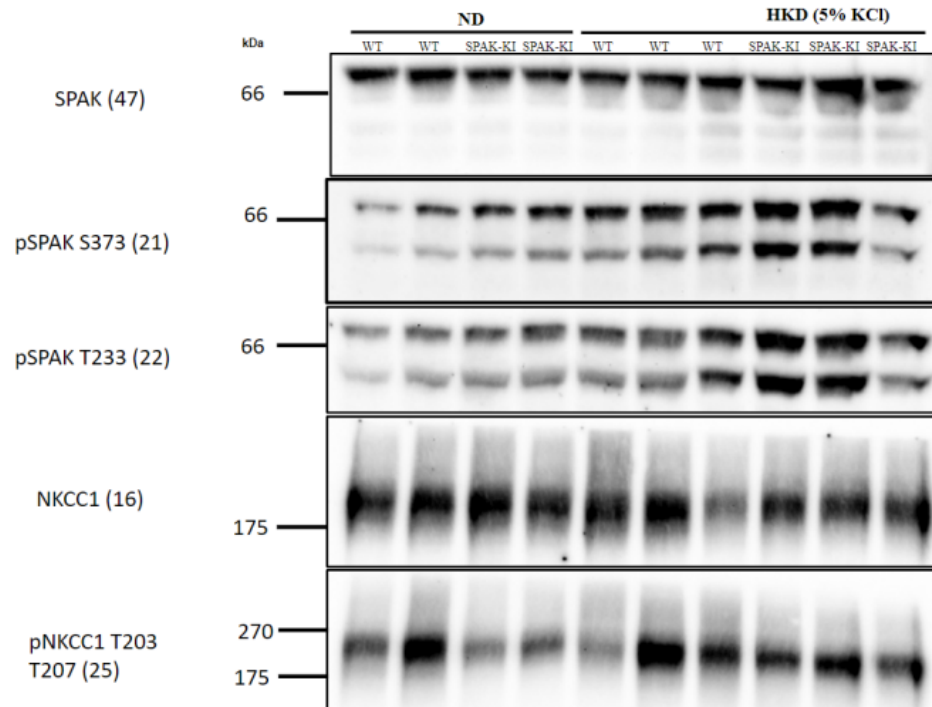


Figura 4. Esta imagen representa un Western Blot (WB) que incluyó diferentes muestras de ratones con distintos genotipos y dietas. El objetivo fue evaluar la expresión y la actividad de la proteína SPAK utilizando tres anticuerpos diferentes: uno dirigido a la proteína SPAK en su totalidad (47), y otros dos que detectan su fosforilación en los residuos de serina 373 (21) y treonina 233 (22). Además, se realizó la detección de la proteína NKCC1 en su totalidad (16) y su fosforilación en los residuos de treonina 203 y treonina 207 (25). Las bandas correspondientes al peso molecular de las proteínas se encuentran indicadas en la imagen.

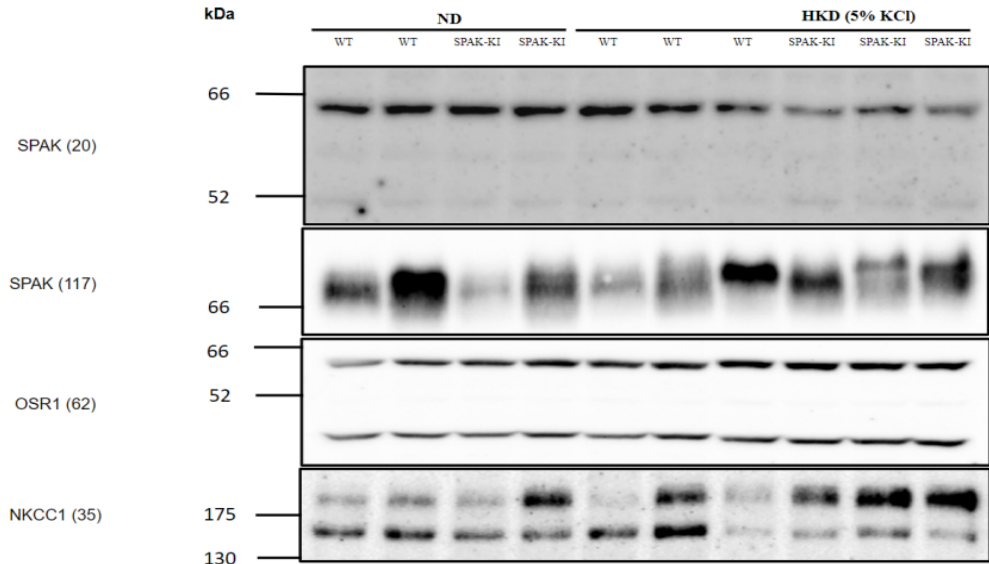


Figura 5. En esta imagen representa el WB de diversas muestras de ratones con distintos genotipos y dietas, con el fin de analizar la expresión de la proteína SPAK mediante el uso de dos anticuerpos distintos (20 y 117), así como la detección de las proteínas OSR1 y NKCC1.

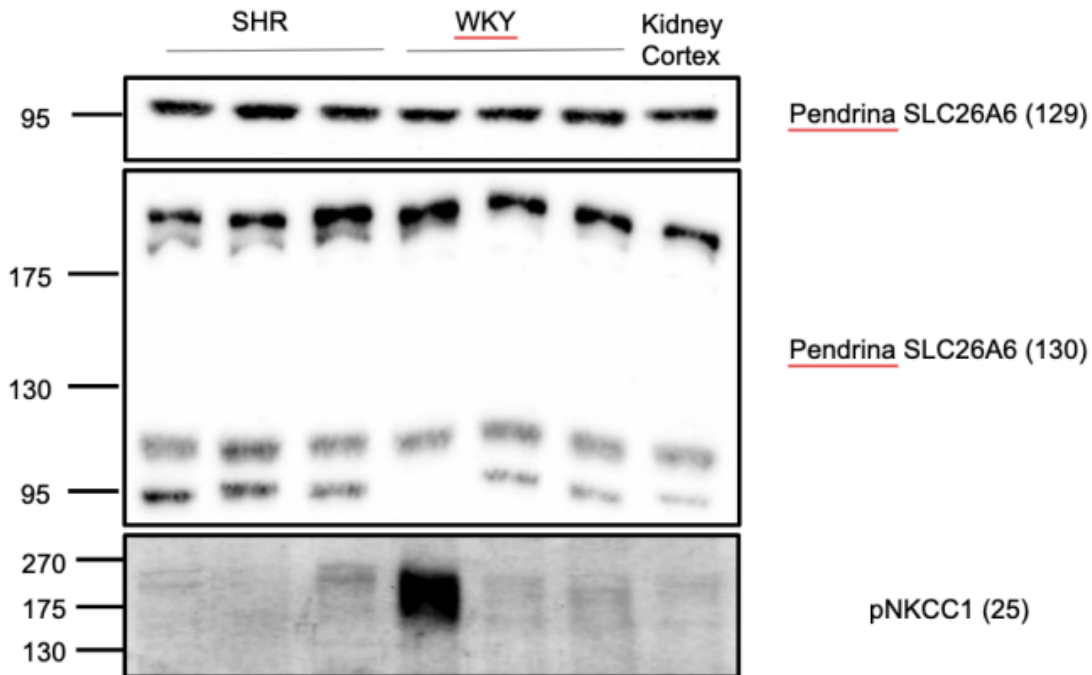


Figura 6. En esta imagen se presenta un WB que contiene muestras de ratas SHR (*Spontaneously Hypertensive Rat*) y ratas silvestres. El objetivo de este análisis fue evaluar la expresión de la pendrina, una proteína de intercambio iónico codificada por el gen *SLC26A6*. Para este propósito, se emplearon dos anticuerpos distintos

(129 y 130) dirigidos a esta proteína transmembrana. Además, se utilizó un anticuerpo específico para detectar la proteína fosforilada NKCC1 (25).

DESCRIPCIÓN DEL VÍNCULO DE LAS ACTIVIDADES DESARROLLADAS CON LOS OBJETIVOS DE FORMACIÓN DEL PLAN DE ESTUDIOS

El servicio social desarrollado involucró el uso de técnicas avanzadas, como PCR y *Western Blot*, dentro del ámbito de la investigación biomédica, específicamente en el Laboratorio de Fisiología Experimental. Estas técnicas contribuyeron significativamente a la comprensión de procesos biológicos, en particular, al estudio de ciertos cotransportadores iónicos y su influencia en la actividad metabólica. Este enfoque de investigación y aplicación de estas técnicas moleculares se alinea con los objetivos de formación del plan de estudios de la licenciatura en Química Farmacéutica Biológica de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Si bien el énfasis principal del plan es en el diseño, producción, control, regulación, y la dispensación de insumos farmacéuticos, es vital reconocer la relevancia de las tecnologías moleculares en la comprensión de procesos biológicos y patológicos a nivel molecular. De manera específica, mi inclinación hacia la Unidad de Enseñanza Aprendizaje “Tecnologías Moleculares para el diagnóstico y la Terapéutica” en el doceavo trimestre, demuestra una integración entre la formación académica recibida y las actividades desarrolladas durante mi servicio social. Las habilidades y conocimientos adquiridos durante este periodo reforzaron mi perfil profesional como químico farmacobiólogo, además de también ampliar las perspectivas en la investigación biomédica.

METODOLOGÍA

El presente servicio social se llevó a cabo por medio de prácticas relacionadas con la profesión por lo que se implementó la siguiente estrategia:

- **Recopilación de información:** Realicé una investigación documental de los fundamentos de cada una de las actividades que llevé a cabo. Así mismo, se familiarizó con los protocolos del laboratorio.
- **Capacitación:** Aprendí mediante la observación cómo se realiza cada una de las actividades que debía desempeñar durante su estancia en el servicio social.
- **Realización de actividades:** Una vez teniendo las bases teóricas y prácticas la alumna llevó a cabo las actividades descritas anteriormente.

METAS ALCANZADAS

Durante el desarrollo de mi servicio social, se lograron diversas metas que marcaron un avance significativo en mi formación académica y profesional. Entre estas metas, destaca la adopción y aplicación de técnicas avanzadas, como la PCR y el *Western Blot*, que se emplearon de manera especializada en el Laboratorio de Fisiología Experimental. Esta experiencia me permitió una comprensión profunda de procesos biológicos, con un enfoque en el estudio de ciertos cotransportadores iónicos y su papel en la actividad metabólica. Además, las técnicas y actividades realizadas se alinearon con los objetivos del plan de estudios de la licenciatura en Química Farmacéutica Biológica. Durante este periodo, pude profundizar en áreas de especialidad, orientándome específicamente hacia la Unidad de Enseñanza Aprendizaje “Tecnologías Moleculares para el diagnóstico y la Terapéutica”. Esta fase fue crucial para la integración de mi formación académica con prácticas reales, lo que no sólo reforzó mi perfil profesional como químico farmacobiólogo, sino que también amplió mis perspectivas en investigación biomédica. Finalmente, estos esfuerzos culminaron en la generación de resultados útiles para el Laboratorio de Fisiología Experimental.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El servicio social me brindó la oportunidad de aplicar y fortalecer mis conocimientos en técnicas de biología molecular en un entorno de investigación. Durante este período, realicé principalmente genotipificaciones en ratones utilizando la técnica de PCR punto final y *Western Blot* para analizar ciertas proteínas, especialmente los cotransportadores de iones relacionados con el metabolismo energético en modelos murinos. La PCR de punto final resultó ser una técnica relativamente fácil, aunque hay que poner énfasis en evitar la contaminación de las muestras y en la correcta preparación del *mastermix*, ya que la falta de cualquiera de los reactivos podría impedir la amplificación de los genes de interés. Por otro lado, el *Western Blot* presentó un conjunto de desafíos más complejos, dada su naturaleza que involucra diversos procesos y variables que pueden afectar los resultados. Por ejemplo, la etapa de lavado y recuperación de anticuerpos puede aumentar el ruido de fondo si no se realiza con cuidado. En ciertas ocasiones, al trabajar con muestras de riñón y músculo que habían sido lisadas previamente, obtuvimos resultados insatisfactorios en el *Western Blot*. La técnica de lisis de estos tejidos, que implicó la molienda con mortero, podría haber sido inapropiada, por lo que recurrí a la homogeneización

mediante el *Polytron*. También se destacaron desafíos relacionados con la preparación del *buffer* Laemmli para la desnaturalización de proteínas, donde se determinó que la adición de β -mercaptoetanol el mismo día de uso era crucial para evitar problemas en el resultado del *Western Blot*. Aprendí sobre la normalización de las bandas de proteínas para evitar errores de interpretación debido a una carga desigual de las muestras en los geles. Aunque comúnmente se usaba la β -actina como control de carga, en ciertos experimentos se observó degradación de esta proteína, por lo que se optó por la normalización mediante la detección de proteínas totales utilizando la tinción de Ponceau S, que en la actualidad es un método recomendado junto con el *stain-free*. A pesar de las dificultades iniciales, el *Western Blot* se convirtió en la técnica en la que más práctica y mejora logré, gracias a su frecuente ejecución en el laboratorio. En resumen, mi servicio social me permitió reforzar los conocimientos adquiridos durante mi licenciatura y aplicarlos en la solución de problemas prácticos. Además, me ayudó a identificar tanto mis fortalezas como mis debilidades para poder perfeccionar mis habilidades. Estas experiencias me acercaron a mi área profesional de interés y me brindaron experiencia y habilidades en técnicas de biología molecular. Esto se alinea con mis objetivos profesionales, ya que me permitirá aplicar estos conocimientos en el diagnóstico molecular de enfermedades en el futuro.

REFERENCIAS

- Alberts, B. (2015). *Molecular biology of the cell*. Garland Science.
- Bio-rad (s.f). *Stain-free imaging technology*. Recuperado el 20 de septiembre 2023, de <https://www.bio-rad.com/es-mx/applications-technologies/stain-free-imaging-technology?ID=NZ0G1815>
- Gavini K, Parameshwaran K. Western Blot. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): Publicación de StatPearls; 2023 enero. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542290/>
- Herráez, A. (2012). *Texto Ilustrado E Interactivo de Biología Molecular E INGENIERÍA genética: Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud* (2da ed.). Elsevier.
- Hou, H., He, H., & Wang, Y. (2020). Effects of SDS on the activity and conformation of protein tyrosine phosphatase from thermus thermophilus HB27. *Scientific reports*, 10(1), 3195. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60263-4>
- Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (s.f). *Presentación*. Recuperado el 10 de septiembre, 2023 de: https://www.cardiologia.org.mx/el_instituto/presentacion/
- MacPhee D. J. (2010). Methodological considerations for improving Western blot analysis. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 61(2), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2009.12.001>
- Matzumura, P. G. D., Núñez, L. G., Yáñez, A. L., & Rivera, N. Y. E. (2013). *Manual de prácticas de laboratorio. Técnicas básicas de biología molecular* (1ra ed.). Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.
- Mishra, M., Tiwari, S., & Gomes, A. V. (2017). Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert review of proteomics*, 14(11), 1037–1053. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1388167>
- Montes, S. A., Rodríguez, S. A., & Borunda, A. J. (2013). *Biología molecular: Fundamentos Y Aplicaciones en las ciencias de la salud*. McGraw Hill Education.
- Sule, R., Rivera, G., & Gomes, A. V. (2023). Western blotting (immunoblotting): History, theory, uses, protocol and Problems. *BioTechniques*. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0034>

Thermo Fisher Scientific. (s.f.). *10 steps to improve pipetting accuracy*. Recuperado el 5 de marzo, 2023, de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/lab-plasticware-supplies/lab-plasticware-supplies-learning-center/lab-plasticware-supplies-resource-library/fundamentals-of-pipetting/proper-pipetting-techniques/10-steps-to-improve-pipetting-accuracy.html>

Thermo Fisher Scientific. (s.f.). *Antibodies for western blotting*. Recuperado el 7 de marzo, 2023, de <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/western-blotting/detect-proteins-western-blot/western-blot-detection-reagents/western-blot-antibodies.html>

Thermo Fisher Scientific. (s.f.). *BCA Assay*. Recuperado el 6 de marzo, 2023, de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/protein-assays/bca-protein-assays.html>

Thieman, W. J., & Palladino, M. A. (2015). *Introducción a la biotecnología* (2da ed.). Pearson Education, S. A.

Turgeon, M. L. (2012). *Linne & Ringsrud's clinical laboratory science: the basics and routine technique* (6ta ed.). Elsevier.