



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

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

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL
POR ACTIVIDADES RELACIONADAS CON LA PROFESIÓN

**Identificación de proteínas en lágrimas y vítreo de
ratones sanos para su futura comparación con
ratones que presentan retinopatía diabética temprana**

QUE PRESENTA

Andrea Morales Farfán

Matrícula: 2172029044



VoBo.

ASESOR INTERNO:
Dra. Gabriela Vázquez Silva
(30288)

Departamento El Hombre y su
Ambiente, UAM Xochimilco



ASESOR EXTERNO:
Dr. Mónica Lamas Gregori
(7179)

Profesora-Investigadora,
CINVESTAV sede Sur

Resumen

Las lágrimas son un complejo de fluidos extracelulares de color transparente, considerados como un ultrafiltrado hipotónico del plasma sanguíneo. Está compuesto en un 98% de agua y un 2% por distintas moléculas como electrolitos, proteínas, mucinas y lípidos lo que lo convierte en uno de los fluidos biológicos corporales más complejos de los cuales no están tan estudiados como es el caso de la sangre u orina. Dentro de la información que podemos encontrar en las lágrimas se encuentran moléculas que pueden estar asociadas al desarrollo de ciertas enfermedades y pudieran ser utilizadas como biomarcadores. Su fácil toma de muestra hacen que este biofluido sea una fuente ideal para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades en estadios tempranos a bajo costo, menos invasivo o riesgoso además de ser otra opción de análisis a diferencia de la orina o sangre.

Durante el servicio social se estandarizó un protocolo para la toma de muestras en lágrimas, su conservación y procesamiento en ratones sanos (C57BL/6J) con el fin de optimizar la técnica para su utilización en modelos experimentales de varias patologías o de envejecimiento.

El procedimiento estandarizado incluyó la evaluación de métodos de colecta óptimos, la cuantificación colorimétrica del contenido proteico de las muestras y la realización de la técnica western blot para la identificación de proteínas específicas. El protocolo fue optimizado y nos permitió obtener un promedio de 2.574 mg/ml de proteína por ratón e identificar la presencia de la proteína Beta Actina como en estas muestras.

Este protocolo será utilizado por el laboratorio en proyectos de investigación enfocados en la identificación de biomarcadores en enfermedades oculares.

Palabras clave: Biofluido, biomarcador, enfermedades, estadio temprano.

Índice

I. Marco institucional	4
II. Introducción.....	4
III. Ubicación geográfica.	7
IV. Objetivo general del proyecto.....	7
V. Especificación y fundamentos de las actividades a desarrollar	7
VI. Impacto de las actividades	14
VII. Aprendizaje y habilidades obtenidas.....	14
VIII. Fundamento de las actividades desarrolladas.....	16
I. Agradecimientos	17
IX. Referencias	17

I. Marco institucional

El CINVESTAV fue creado en 1961 por decreto presidencial, como un organismo público descentralizado con personalidad jurídica y patrimonio propios. Su director fundador, el Dr. Arturo Rosenblueth, impulso una exigencia académica que ha resultado en el éxito de la institución. Se cuenta con 28 departamentos de investigación que se encuentran distribuidos por los nueve planteles de la República Mexicana. Tiene como misión contribuir de manera destacada al desarrollo de la sociedad mediante la investigación científica y tecnológica de vanguardia y la formación de recursos humanos de alta calidad, además de ser la institución líder en la formación de investigadores de alto nivel y generación de conocimiento científico y tecnológico de frontera, con un creciente impacto nacional e internacional que contribuya en forma visible y relevante a la solución de problemas del país ampliando nuestra presencia en la sociedad y en la cultura contemporánea. (CINVESTAV, 2022)

II. Introducción

El correcto funcionamiento de células, tejidos y organismos se basa en patrones específicos de expresión génica que, cuando sufren alteraciones, pueden conducir a diversas patologías. Desde el punto de vista de la terapéutica, la identificación de estas alteraciones de manera temprana constituye una valiosa herramienta para aumentar la eficacia de los tratamientos. De esta idea surge el concepto de "biomarcador". Esto son moléculas que indican un estado biológico (una patología o la respuesta a un tratamiento). Por definición deben ser específicos, sensibles, predictivos, rápidos, económicos, estables in vivo e in vitro, no invasivos y relevantes desde el punto de vista preclínico (Strimbu, 2010).

Los biofluidos (sangre, orina, semen, saliva, leche materna) son la fuente por excelencia de los biomarcadores. La mayoría de los estudios son realizados en sangre u orina, pero existen otros biofluidos que pueden resultar útiles para esta investigación como es el caso de las lágrimas. Las lágrimas se consideran un

ultrafiltrado hipotónico plasmático. También se ha descrito como líquido intermedio entre suero plasmático y líquido cefalorraquídeo por la gran cantidad de proteínas que comparten (Ravishankar & Daily, 2022)

Dentro de su composición presentan un 98% de agua y un 2% de distintas moléculas como electrolitos, proteínas, mucinas y lípidos lo que lo convierte en uno de los fluidos biológicos corporales más complejos (Ubels, et al., 1994).

Están compuestas por tres capas: la capa externa o lipídica que mantiene la superficie de la lágrima suave, con la finalidad de permitir que podamos ver a través de ella y evitar la evaporación de las lágrimas; la capa intermedia acuosa, que mantiene hidratado al ojo, repele bacterias, protege la córnea y constituye el 90% de la lágrima; y, por último, la capa de mucina (una familia de proteínas de alto peso molecular) que está en contacto con la córnea y permite que la lágrima se adhiera al ojo.

La distribución de las lágrimas por la superficie ocular empieza a través de la secreción de la glándula lagrimal, guiando este fluido por los conductos lagrimales para que pasen por la superficie del ojo y se dirijan hacia los canales de drenaje. Cada parpadeo permite que las lágrimas se dispersen por todo el ojo, manteniéndolo humectado.

Hay diversas moléculas que se pueden encontrar en la sangre, orina y lágrimas, y sus niveles pueden aumentar o disminuir en situaciones de enfermedad. Estas moléculas se conocen como “biomarcadores” y se ocupan para realizar diagnósticos o para determinar la respuesta a un tratamiento terapéutico (Strimbu, K., y Tavel, J. A., 2010). La mayoría de los estudios enfocados en biomarcadores utilizan sangre, suero o plasma, ya que son considerados como los fluidos ideales para el estudio y evaluación de enfermedades sistémicas y hay muy pocos en los que utilizan lágrimas (Ravishankar y Daily., 2022). La gran ventaja de obtenerse fácilmente a través de métodos no invasivos, de bajo riesgo y un menor costo.

Por ello, se ha planteado la posibilidad de que en las lágrimas se pueden

observar la respuesta sistémica a enfermedades como el cáncer de mama (Böhm, 2012), diabetes tipo 2 (Li, B. et al., 2014), enfermedad de Alzheimer y artritis reumatoide (Kalló, G., et al., 2017), así como los cambios que pudieran ocurrir en enfermedades oculares.

El laboratorio de la Dra. Lamas se enfoca, desde hace unos años, en el estudio de los mecanismos moleculares que rigen el funcionamiento de la retina en condiciones fisiológicas y patológicas. Las investigaciones realizadas han permitido identificar algunas actividades enzimáticas que pudieran ser relevantes para la respuesta al daño retinal y pudieran estar involucradas en patologías muy prevalentes en México, como la retinopatía diabética.

De forma importante para este proyecto, el grupo de investigación sostiene la hipótesis de que estas enzimas pudieran estar presentes en el fluido lacrimal y pudieran ser utilizadas como biomarcadores al inicio de la patología. Para corroborar esta hipótesis, el grupo de investigación planea realizar un estudio en un modelo experimental de retinopatía diabética en ratón.

El presente trabajo sentará las bases para poder realizar el mencionado proyecto: Identificación de proteínas en lágrimas y vítreo de ratones sanos para su futura comparación con ratones que presentan retinopatía diabética temprana.

III. Ubicación geográfica.

El CINVESTAV sede Sur se encuentra ubicado en la Calz. de los Tenorios 235, Coapa, Rinconada de las Hadas, Tlalpan, 14330 Ciudad de México, CDMX. El CIE se encuentra a un costado de la institución, en el laboratorio de la Dr. Mónica Lamas, tercer piso.

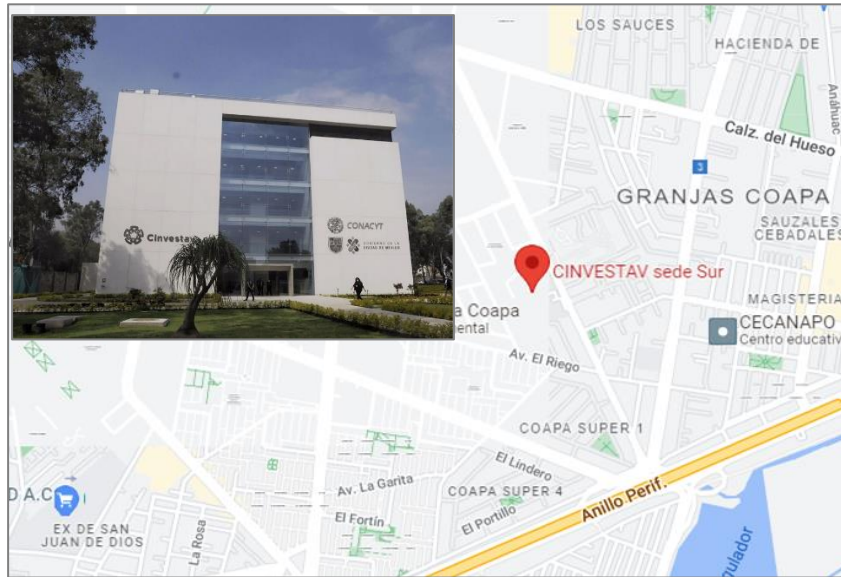


Figura 1. Ubicación del CINVESTAV sede SUR, Imagen tomada de Google Maps. Centro de investigación del envejecimiento (CIE), imagen tomada de Google.

IV. Objetivo general del proyecto

Estandarizar el proceso para la recolección y almacenamiento de muestras proteicas de lágrimas en ratones.

V. Especificación y fundamentos de las actividades a desarrollar

Acorde a la misión de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, las actividades del servicio social a realizar dentro de esta institución (CINVESTAV) están enfocadas a resolver cuestiones complejas que involucran diversas áreas de conocimiento, de tal manera que además aplicar conocimientos de la biología, se requiere de la comprensión de elementos

teóricos provenientes de otras disciplinas tales como, anatomía, biología molecular, bioquímica entre otras. Es por ello que en muchas de las actividades a realizar dentro de este servicio social exigen un trabajo multidisciplinario con alumnos de doctorado, egresados de carreras, planteles, planes de estudio y perspectivas diferentes, lo cual concuerda con lo expuesto en el documento Xochimilco que dice: “el estudiante debe ser un actor fundamental, capaz de intervenir en el proceso de transformación de la realidad social y material” (Villarreal *et al.*, 1974), pero con un solo objetivo, contribuir a la humanidad con nuevos conocimientos o técnicas para mejorar la calidad de vida como menciona Arbesu (1996), en cuanto a que expresa la vinculación de la universidad con la sociedad por medio del estudio de un problema concreto que afecte a las clases más necesitadas

Las actividades para desarrollar están enfocadas al apoyo, desarrollo y estandarización de técnicas para la obtención, almacenamiento y procesamiento de lágrimas, en ratones cepa C57BL/6J para la futura identificación de actividad epigenética. En cada experimento se utilizaron ratones macho de 3 meses de edad a los cuales se les anestesió y suministro un agonista colinérgico para la secreción de lágrimas, se determinó la manera más adecuada para su recolección, también la manera óptima para la disección de almacenamiento, posteriormente se realizó la cuantificación de proteína total y Western Blot para identificar B-actina. Cada una de las actividades desarrolladas durante el servicio social se describen a continuación.

➤ **Toma de muestras lagrimales en ratones:**

- 1) Se realizará la selección de individuos mediante los siguientes criterios de inclusión, ratones macho C57BL/6J, sanos de 3 meses.
- 2) Los ratones que se utilizaron se les debe de quitar el alimento tres horas antes de la toma de muestra esto debido a que los roedores a menudo almacenan algo de comida en su boca y al momento de anesthesiarse se puede ver obstruida su vía aérea (garanta) asfixiarse y morir.

Ketamina	
Dosis: 40 mg/kg	
Ratón de 25 g	2.5
80 mg	1000g de ratón
X	25g
X= 2mg o 20 μ l	
Para tener 2mg, tomar 20ul para un ratón con un peso de 25g	

Xilacina	
Dosis: 4 mg/kg	
Ratón de 25 g	2.5
4 mg	1000g de ratón
X	25g
X= 0.1 mg o 1 μ l	
Para tener 0.1 mg, tomar 1ul para un ratón con un peso de 25g	

3) Se anestesiaron a los individuos utilizando Ketamina stock 1000 mg/10 ml (100 μ g/ μ l), Xilacina stock 100 mg/ml (100 μ g/ μ l) y solución salina. La dosis adecuada para cada ratón variará según su peso y permanecerán así por un periodo de 15-20 minutos.

Se le añadieron las siguientes cantidades del anestésico acompañado de solución salina al 9% para un total de 250 ml por ratón.

Pilocarpina	
Dosis: 20 mg/kg	Ratón de 25 g
30 mg \rightarrow	1000g de ratón
X	25g
X= 0.75 mg	
Pilocarpina 20 mg/ml	
1 ml \rightarrow	20 mg
X \rightarrow	0.75 mg
X= 0.0375mg o 37 μ l	
Para tener 0.0375 mg, tomar 37ul para un ratón con un peso de 25g	

4) Para estimular la producción de lágrimas se utilizó Pilocarpina 20 mg/ml, suministramos 30 mg acorde a su peso:

5) 2-3 minutos después de la aplicación de la pilocarpina los ratones empezaron a salivar y lagrimear, con ayuda de las tiras de Schirmer cortadas en cuatro partes se recolectaron las lágrimas y se colocaron en tubos eppendorf de 600 μ l con un pequeño orificio en el fondo, este mismo eppendorf se colocó dentro de otro con capacidad de 1.5 ml en hielo.

6) Se llevó a centrifugar a 13,000 rpm a 5 minutos, para que la lágrima se precipita en el segundo eppendorf, se colocaron en hielo hasta su procesamiento.

➤ Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteína por el método de BCA en el cual se el ácido bicinconínico, sal sódica, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con inones Cu^{1+} en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret). La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas totales que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos.

- 1) Se realizó la cuantificación de lágrimas justo después de su colecta, debido a que solo se colectó 2 μl de lágrimas por ratón, por lo cual para evitar que se evaporara la muestra.
- 2) Para cuantificar la proteína total se utilizó el Kit de ensayo de proteínas Micro BCA™ 23235. Primeramente, se prepararon las siguientes diluciones para la curva y se calculó la cantidad necesaria de los componentes del kit (Solución A, B y C) acorde a lo que menciona el protocolo de dicho kit:
- 3) Posteriormente en una placa de 96 pozos se colocó la curva, las muestras y 200 μl de solución de BSA en cada pozo, como se muestra a continuación:

mg/ml	BSA (μl)	Agua MQ (μL)
0.0	0	100
0.1	5	95
0.2	10	90
0.4	20	80
0.8	40	60
1.6	80	20
2.0	100	0

➤ Western Blot

Esta técnica es utilizada para detectar una proteína específica (en este caso B-actina) en una muestra. El método implica el uso de **electroforesis** en gel

para separar las proteínas de la muestra. Las proteínas separadas se **transfieren** del gel a la superficie de una membrana. La membrana se expone a un anticuerpo específico contra la proteína en estudio (**Inmunodetección**). La unión del anticuerpo se detecta usando un marcador químico que desencadena una reacción con sustrato luminiscente generando luz, presenta una gran ventaja debido a su alta sensibilidad lo que permite identificar proteínas con niveles de expresión muy bajos y así determinar la presencia de dicha proteína de interés.

➤ **Electroforesis SDS-PAGE**

- 1) Colocamos los vidrios de 1.0 en el módulo de ensamble, acomodamos el peine y se hizo una marca sobre el vidrio a 0.5 cm por debajo de los dientes del peine Se prepararon los geles (gel separador 12% y gel concentrador 5%)
- 2) Agregamos la mezcla del gel separador lentamente en el espacio entre los vidrios, hasta la marca previamente realizada

Gel separador 12%	
H2O	4.0
30% Mixacrilamida	3.3
Tris 1.5 pH 8.8	2.5
SDS 10%	0.1
PSA 10%	0.1
TEMED	0.004
Volumen final	10 ml

Gel concentrador 5%	
H2O	2.1
30% Mixacrilamida	0.5
Tris 1.5 pH 8.8	0.38
SDS 10%	0.03
PSA 10%	0.03
TEMED	0.004
Volumen final	3 ml

- 3) Agregamos isopropanol con una micropipeta sobre el gel separador, para evitar que la presencia de oxígeno inhibiera la polimerización al bloquear los radicales libres.
- 4) Esperamos a que el gel solidifique (aproximadamente 30 min) y después agregamos la mezcla del gel separador lentamente en el espacio entre los vidrios, hasta llegar al borde, para finalizar colocando el peine de 1.0 cuidando no atrapar ninguna burbuja, porque provocan distorsión en la superficie del gel.
- 5) Esperamos a que el gel solidifique (aproximadamente 15 min).

- 6) Colocamos el gel en la cámara de electroforesis y agregamos amortiguador de corrida a cada compartimiento
- 7) Se removió cuidadosamente el peine y cargamos lentamente el marcador de peso molecular en el pozo #1 y el resto de las muestras por duplicado en los pozos adyacentes.
- 8) Cerramos la cámara de electroforesis y aplicamos una corriente de 120 V por 1 hora 45.

➤ **Transferencia**

- 1) Se cortó papel filtro y la membrana de PVDF a la medida del gel de poliacrilamida y se colocó una marca con lápiz sobre la membrana que permitió conocer su orientación.
- 2) Se sumergió la membrana de PVDF en metanol por 2 min en agitación suave y después en agua destilada por 2 min. También se equilibraron las almohadillas de fibra, los papeles filtro, el gel y la membrana en buffer de transferencia por 5 min.
- 3) Se abrió el casete portador del gel y se colocaron en el siguiente orden sobre el lado del cátodo (color negro): almohadilla de fibra, papel filtro, gel, membrana, papel filtro y almohadilla de fibra. Se eliminó cualquier burbuja que se haya formado en el sándwich y cerrar el casete.
- 6) Introducimos el casete en el módulo de transferencia (el lado negro del casete hacia el lado negro del módulo), luego en el tanque y agregamos amortiguador de transferencia hasta llenar el tanque.
- 16) Programamos la fuente de poder e iniciamos la transferencia (50 A toda la noche).
- 17) Al terminar, retiramos el casete y desmontamos el sándwich.

➤ **Inmunodetección**

- 1) Sumergimos la membrana en solución bloqueadora y agitamos por 1 h a temperatura ambiente.
- 2) Después reemplazamos la solución bloqueadora por la dilución adecuada del anticuerpo primario para B-actina en solución bloqueadora fresca.
- 3) Incubamos en agitación constante toda la noche a 4° C.
- 4) Retiramos el anticuerpo primario y se realizó un lavado con TBS-T por 15 min en agitación constante.
- 5) Se repitieron los lavados 3 veces más por 5 min cada uno.
- 6) Agregamos la dilución adecuada del anticuerpo secundario anti-mouse en TBS-T e incubamos por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante.
- 7) Retiramos el anticuerpo secundario y lavamos con TBS-T por 15 min y luego 3 veces más por 10 min cada uno.
- 8) Guardamos la membrana en TBS a 4° C hasta su revelado.

➤ **Revelado por quimioluminiscencia**

- 1) Colocamos una bolsa transparente dentro del cassette de rayos X.
- 2) Previo a temperatura ambiente, mezclamos 200 µL del reactivo de luminol y 200 µL de la solución de peróxido (ambos del kit Immobilon™ Western HRP Substrate) con 1 mL de TBS.
- 3) Agregamos inmediatamente a la membrana y pipetear sobre ella por 5 min.
- 4) Drenamos el exceso de líquido y se colocó dentro de la bolsa en el cassette de rayos X.
- 5) Dentro del cuarto oscuro y sólo con luz roja, colocamos una película radiográfica encima de la membrana, cerramos el casete y esperamos 2 min.
- 6) Retiramos y sumergimos por 2 min en solución reveladora, solución fijadora y agua.

VI. Impacto de las actividades

Las actividades descritas previamente se desarrollaron en un periodo de seis meses, entre octubre y abril del presente año. El conjunto de estas actividades permitió que como egresada adquiriera conocimientos y capacidades para desempeñarme en un laboratorio de biología molecular. Simultáneamente, a través de la participación en actividades extras, se tuvo la experiencia de discutir de artículos, asistencia a seminarios mejoró sus habilidades para desenvolverse en un ámbito de investigación científica. Adicionalmente, los experimentos realizados generaron datos que no brindaron los resultados esperados, pero al mismo tiempo son relevantes para las líneas de investigación del laboratorio y proyectos.

La principal conclusión de los experimentos realizados fue que el uso de la pilocarpina como agonista colinérgico ayudó a la secreción de lágrimas para obtener por ratón un aproximado de 2 ul, en este volumen se presentaron un promedio de 2.574 mg/ml de proteína por muestra lo cual es más que suficiente para realizar un Western Blot con 30 mg de muestra por carril, además de que se identificó la B-actina presente en lágrimas, con lo cual se estandarizó un protocolo para la toma de muestra de lágrimas y vítreo, la presencia de DNMT3a en lágrimas de ratones sanos, generando nuevas perspectivas y sentar las bases para futuros experimentos sin presentar limitaciones por el volumen (2ul) obtenido en las muestras y seguir avanzando en los proyectos de laboratorio

VII. Aprendizaje y habilidades obtenidas

La extracción de lágrimas se realizó con las tiras de Schirmer además se suministró el agente colinérgico pilocarpina (30 mg/kg) el cual interactúa con los receptores muscarínicos M3 incrementando los niveles de calcio intracelular, como Dartt, 2009 lo menciona este agente induce la secreción de lágrimas, otros fluidos como orina y saliva. Con las tiras de Schirmer (Figura 2) se recolectó un total por ratón de 2ul por lo cual se juntaron las muestras para un total de 10 ul y la concentración de proteína fue de 6 a 11 mg/ml (Figura 3) la cual es una alta

concentración lo cual facilita su análisis mediante diversas técnicas moleculares como Western Blot.



Figura 2. Toma de muestra (lágrimas) en ratones sanos usando tiras de schirmer.

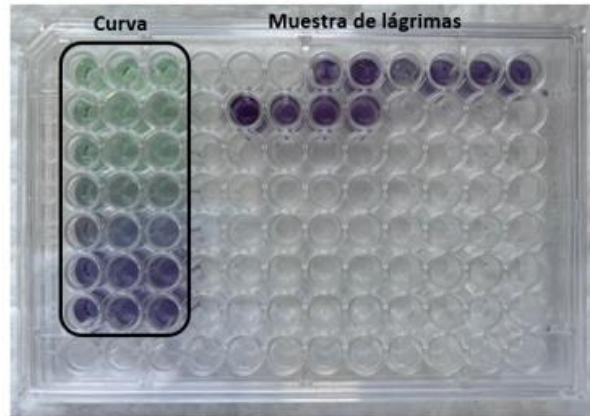


Figura 3. Cuantificación de proteína en lágrimas con kit de BCA.

Estudios recientes mencionan que el proteoma de las lágrimas, el cual es un conjunto completo de proteínas, comparte alrededor de 500 - 600 proteínas con el plasma sanguíneo (Zhou, 2012). Por ello, se ha planteado la posibilidad de que en las lágrimas se pueden observar la respuesta sistémica a enfermedades como el cáncer de mama (Böhm, 2012), diabetes tipo 2 (Li, B. *et al.*, 2014), enfermedad de Alzheimer y artritis reumatoide (Kalló, G., *et al.*, 2017), así como los cambios que pudieran ocurrir en enfermedades oculares. Estas proteínas involucran algunas citocinas inflamatorias, factores de crecimiento y neurotransmisores (Chiva, 2019).

Mediante la técnica Western Blot (SIGMA) se identificó la proteína B-Actina Monoclonal en las muestras de lágrimas, logrando reportar la presencia de dicha molécula en lágrimas de ratones sanos (Figura 4.)

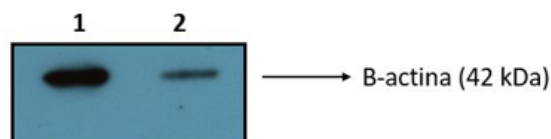


Figura 4. Identificación de B-actina en lágrimas (2) por medio de Western Blot y utilizando como control positivo retina (1).

La implicación de las alteraciones de los mecanismos epigenéticos en el desarrollo de enfermedades se ha justificado con varios estudios y está situado en los últimos años como la vía de investigación de biomarcadores obteniéndose resultados positivos en distintas patologías, de las cuales la oncología es la más estudiada, enfermedades cardiovasculares, la diabetes, los trastornos neuropsiquiátricos y muchas otras condiciones. Ciertos estudios han demostrado que las modificaciones epigenéticas pueden silenciar genes supresores de tumores, lo que aumenta la susceptibilidad al cáncer. Además, factores ambientales como la exposición a sustancias químicas tóxicas o el estrés crónico pueden alterar la regulación epigenética y contribuir al desarrollo de enfermedades crónicas.

Sin embargo todavía no se conoce bien la participación de la modificación en los patrones de metilación del ADN en el desarrollo de enfermedades en estadios tempranos en los cuales se pueda detectar diversas enfermedades en estadios iniciales, poder tomará acciones para evitar el avance y deterioro como en el caso de la retinopatía diabética la cual presenta dos fases la primera es la retinopatía no proliferativa la cual lo presenta sintomatología evidente ya que todos los daños se dan a nivel vascular en el ojo y la retinopatía diabética proliferativa que es la segunda fase avanzada en donde se puede presentar hemorragias y desprendimiento de retina, en donde ya son evidentes los cambios patológicos e irreversibles por lo cual identificar cambios en estadios tempranos es una ventana para

El uso de los biomarcadores en lágrimas puede demostrar que su aplicación clínica está a la vuelta de la esquina, la cual nos brinda ciertas ventajas como su composición y su fácil toma de muestra hacen que el líquido lagrimal sea una fuente ideal para el diagnóstico y el pronóstico de enfermedades.

VIII. Fundamento de las actividades desarrolladas

Las actividades relacionadas con la profesión para la liberación del servicio social se llevaron a cabo en un laboratorio de Biología molecular en el cual se realizaron actividades experimentales, las cuales fortalecen las habilidades, conocimientos de técnicas y uso de herramientas o equipos. El trabajar en un laboratorio nos

permite cuestionar los conocimientos adquiridos a lo largo de la licenciatura en Biología y confrontarlos con la realidad al poner en práctica dichas habilidades y conocimientos.

A lo largo de esta experiencia en laboratorio, realice diversas actividades como la extracción de lágrimas de ratones, cuantificación de proteína con ácido bicinconínico, preparación de geles para electroforesis, electroforesis, transferencia e inmunodetección (western blot). De igual forma se trabajó con diferentes herramientas y materiales de laboratorio como micropipetas, tubos eppendorf, centrifugadora, microscopio, báscula además de otras técnicas como inmunofluorescencia, PCR, cultivo celular primario, electroporación de células. También se mandó un artículo de divulgación científica a la revista ¿Cómo ves? de la UNAM para su próxima publicación titulada “Lágrimas que curan” y participe en actividades en la Semana del Cerebro 2023 con una actividad y dos carteles que se presentaron.

IX. Agradecimientos

Este trabajo forma parte de los requisitos para la obtención del grado de Licenciada en Biología y se realizó en el CINVESTAV sede Sur edificio CIE bajo la asesoría interna de la Dra. Gabriela Vázquez Silva, asesoría externa de la Dra. Mónica Lamas Gregori, la supervisión directa de la M. en C. Marysol Bello Gonzales que me guiaron y enseñaron técnicas moleculares a lo largo de estos meses. Este trabajo estuvo financiado por CONACYT (AS-1-s-25777) y Velux Stiftung (p. 1852)

X. Referencias

Arbesú, M. I. (1996). El sistema modular Xochimilco. En: Arbesú, M. I. y Berruecos, L. (coordinadores y editores). El sistema modular en la Unidad Xochimilco de la Universidad Autónoma Metropolitana. México. UAM-Xochimilco, 9-25 p.

Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. Hum Mol Genet 2000; 9: 2395-402.

Böhm, D., Keller, K., Pieter, J., Boehm, N., Wolters, D., Siggelkow, W., ... & Grus, F. H. (2012). Comparison of tear protein levels in breast cancer patients and healthy controls using a de novo proteomic approach. *Oncology reports*, 28(2), 429-438.

Burgers WA, Fuks F, Kouzarides T. DNA methyltransferases get connected to chromatin *Trends Genet* 2002; 18: 275-7.

Canetti, E. (2003). Epigenética: una explicación de las enfermedades hereditarias. *Perinatología y Reproducción humana*, 17(2), 57-60.

Chiva, A. (2019). Tear biomarkers in dry eye disease. *Eur. Ophthalmic Rev*, 13, 21-26.

Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet* 2001; 38: 285-303.

Dartt D. A. (2009). Neural regulation of lacrimal gland secretory processes: relevance in dry eye diseases. *Progress in retinal and eye research*, 28(3), 155–177.

Kalló, G., Emri, M., Varga, Z., Ujhelyi, B., Tózsér, J., Csutak, A., & Csósz, É. (2016). Changes in the chemical barrier composition of tears in Alzheimer's disease reveal potential tear diagnostic biomarkers. *PLoS One*, 11(6), e0158000.

Li, B., Sheng, M., Li, J., Yan, G., Lin, A., Li, M., & Chen, Y. (2014). Tear proteomic analysis of Sjögren syndrome patients with dry eye syndrome by two-dimensional-nano-liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Scientific reports*, 4(1), 1-6.

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for the novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99: 247-57.

Paulsen M, Ferguson-Smith AC. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol* 2001; 195: 97-110.

Ravishankar, P., & Daily, A. (2022). Tears as the next diagnostic biofluid: a comparative study between ocular fluid and blood. *Applied Sciences*, 12(6), 2884.

Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers?. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463.

Ubels, J. L., Williams, K. K., Bernal, D. L., & Edelhauser, H. F. (1994). Evaluation of effects of a physiologic artificial tear on the corneal epithelial barrier: electrical resistance and carboxyfluorescein permeability. *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes: Basic Science and Clinical Relevance*, 441-452.

Villarreal, R. (1974). Documento Xochimilco. Anteproyecto para establecer la Unidad del Sur de la Universidad Autónoma Metropolitana. México, UAM-X. 53 p

Zhou, L., Zhao, S. Z., Koh, S. K., Chen, L., Vaz, C., Tanavde, V., ... & Beuerman, R. W. (2012). In-depth analysis of the human tear proteome. *Journal of proteomics*, 75(13), 3877-3885.