



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura Química Farmacéutica Biológica

INFORME FINAL SERVICIO SOCIAL

“Estudio de la expresión y actividad de transportadores de la vía WNK-SPAK-CCC en modelos murinos transgénicos de obesidad y de hipertensión arterial”

Elaborado por: González Hernández Gabriela

Matrícula: 2192035280

ASESOR INTERNO: Dr. Rafael Bojalil Parra

ASESOR EXTERNO: Dra. María de Jesús Chávez Canales

FECHA DE INICIO: 15/10/2023 FECHA DE TERMINO: 15/4/2024

1. Introducción

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR nos permite producir en laboratorio muchas copias de un fragmento determinado de DNA. Esta reacción está basada en la actividad de una enzima muy importante, la DNA polimerasa la cual nos ayuda fabricando una hebra complementaria de DNA a partir de una preexistente, lo único que esta enzima necesita la presencia de nucleótidos que son parte de la composición de la cadena de DNA, tales como adenina, guanina, citosina o timina y también se requerirá de un primer capaz de unirse a la molécula que queremos copiar. La PCR se puede realizar en 3 pasos: primero se debe separar las dos hebras de DNA con la ayuda de un aumento de temperatura (95-96°C), estas cadenas van a servir como molde para poder crear su complementaria para luego bajar nuevamente la temperatura permitiendo que el cebador pueda unirse a su región complementaria en la cadena de DNA, por último, se genera una cadena complementaria de DNA gracias a la intervención de la DNA polimerasa. La elevación de temperatura necesaria para la separación de las cadenas no suele ser el ambiente adecuado para la DNA polimerasa por lo que se utiliza la bacteria Taq cuya DNA polimerasa puede realizar su trabajo a temperaturas que sobrepasan los 70° de forma que no se tenga que estar añadiendo la enzima constantemente. La aplicación de la técnica de PCR podría permitirnos detectar mutaciones o diagnosticar enfermedades infecciosas o genéticas. Después de que la PCR haya determinado la pureza de nuestro DNA, aplicamos una técnica llamada electroforesis, sobre el DNA analizado. (Galván Cejudo, 2014).

La electroforesis es una técnica que se utiliza para la separación de las moléculas según su tamaño y su carga eléctrica, se añade el DNA a los compartimentos del gel de agarosa, esto actúa a manera de criba molecular para la corrida electroforética y a continuación se somete a una corriente eléctrica que se encarga de separar las moléculas, de acuerdo a su tamaño y forma. Los ácidos nucleicos del DNA están cargados en forma negativa debido a su esqueleto de grupos fosfatos por lo tanto estos migraran hacia al polo positivo es así como la agarosa puede ser utilizada como transporte para la corrida electroforética. (Carmen Padilla, 2014).

Animales en la experimentación.

El uso de animales en experimentación ha ido en paralelo al desarrollo de la biomedicina. Se define como animal de laboratorio a todo aquel ser vivo no humano, vertebrado o invertebrado, usado para la experimentación y otros fines científicos; su uso se basa, fundamentalmente, en la analogía fisiológica con la especie humana. Entre los animales usados en investigación están: Junto con las ratas y otros roedores (cobayos y hámsteres), el ratón es el mamífero más utilizado en la investigación biomédica en el mundo. Su pequeño tamaño, fácil manipulación, así como su disposición y bajo costo de mantenimiento lo han hecho el animal ideal para la investigación. Además de que se puede disponer de una gran cantidad de cepas con características específicas, deficiencias genéticas espontáneas o inducidas que representan un buen número de enfermedades humanas. (Altamirano Bautista A,2014).

Técnicas para el manejo de animales.

El manejo de los animales se debe de realizar de manera adecuada, según lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999, con la finalidad de brindar un trato digno, minimizando el dolor para el animal, y evitando estresar excesivamente al animal, por esta razón deben seguirse las técnicas aprobadas para su transportación y administración. Estas técnicas varían según el animal. (Altamirano Bautista A,2014).

Ratón.

Generalmente son utilizados en experimentos de corta duración debido a que son animales fácilmente estresables, por lo que la técnica más recomendada establece que, deben ser tomados de la parte media de la cola con el dedo pulgar e índice. Es muy importante que sea de la parte media, pues si se toma de la punta o de la base se puede provocar desprendimiento de la piel o de la misma cola. Esta técnica puede ser útil para mover al ratón de un recipiente a otro pegado a este. Si se requiere transportar por distancias más largas o realizar la inyección o inoculación deberá tomarse al ratón de la piel del dorso con el pulgar y el índice, sosteniéndolo de la cola con el meñique y el anular apoyados en la palma de la mano sin ejercer presión. (Navarro J, 2012).

En caso de una inyección intraperitoneal el animal se inclina a 45 ° girando un poco de cabeza, a tal manera que por acción de la gravedad los órganos suban y el área abdominal quede libre, el área se divide en cuatro cuadrantes imaginarios y se realiza la introducción de la aguja, sin tocar las tetillas del animal y comprobando que no haya sangre al retraer el émbolo. (Navarro J, 2012).

Técnicas para administración de fármacos y medicamentos.

Intravenosa. Este procedimiento se lleva a cabo en las venas marginales que se encuentran en la oreja del conejo. Intramuscular. La administración intramuscular se aplica en la parte muscular de las patas traseras, en la región glútea, ya sea del conejo, la rata o el ratón. Intraperitoneal. Después de haber sujetado a la rata y el ratón, por la técnica anteriormente descrita, se divide, de manera imaginaria, la región ventral en cuatro cuadrantes. Se puede elegir cualquiera de los cuadrantes, se coloca la jeringa en un ángulo de 45°, para luego administrar el fármaco. Antes de inyectar se debe verificar que se encuentra en el peritoneo, al jalar el émbolo de la jeringa debe entrar aire, si esto no ocurre debemos tratar nuevamente. (Romero W, 2016).

Subcutánea. Generalmente se lleva a cabo en el conejo, se toma la piel floja de la espalda, se introduce la jeringa y se administra nuestra sustancia problema. Intracardiaca. Con la ayuda del medio se percibe el pulso cardiaco a un centímetro, aproximadamente, de la última costilla de la rata. Se introduce una jeringa de insulina a 90°, y se toma la muestra de sangre. (Romero W, 2016).

2. Objetivo General:

Se espera haber aprendido técnicas de biología molecular como, extracción de DNA de biopsias de animales transgénicos de laboratorio, reacción en cadena de la polimerasa, electroforesis horizontal de ácidos nucleicos e identificación de fragmentos de PCR. Además se espera que el alumno aprenda a desarrollarse en un ambiente académico y conozca cuál es el quehacer científico en un laboratorio de ciencia básica y medicina traslacional como lo es el laboratorio de Fisiología Experimental.

3. Objetivos Particulares:

-Aprender técnicas de laboratorio

-Aprender seguridad de laboratorio

-Aprender a preparar soluciones molares, normales y peso/volumne y ajustar el pH

-Aprender manejo de animales usados como modelo de investigación y obtener constancia.

-Manipulación de animales transgénicos para el estudio de la fisiopatología de la obesidad hipertensión. .

-Extraer DNA de muestras de biopsias de ratones

-Hacer PCR para identificar los genotipos de las crías de los ratones transgénicos

- Reconocer por medio de electroforesis horizontal en egeles de agarosa los fragmentos amplificados por PCR.

4. Actividades Realizadas

Durante los primeros meses del servicio social obtuve conocimiento de la seguridad y el manejo correcto de los reactivos y de los equipos del laboratorio, principalmente termociclador, termo block, Quimidoc, centrífuga, microscopio leyendo hojas de seguridad, protocolos y observando a los estudiantes, dentro de ese lapso también aprendí los conceptos teóricos de la preparación de soluciones Molares, normales, peso/volumen y diluciones madre como TAE 1X, TAE 50X, PFS, PBS, TBS, PFA, cargar laminillas para los procedimientos de PCR, inmunofluorescencia, western blot siguiendo los lineamientos establecidos dentro del laboratorio.

Aprendí el manejo adecuado de los animales del laboratorio ubicado dentro de las instalaciones del Instituto Nacional de Nutrición mediante un curso donde se impartió de manera teórica donde nos enseñaron las leyes y normas que lo rigen, tipos de animales, instalaciones y cuidados de cada uno de ellos y una fase práctica donde conocimos las instalaciones y la manipulación de los animales, en mi caso enfocado a ratones, para tener conciencia de los cuidados y su importancia, así mismo, obtuve una certificación para el ingreso al Bioterio. Durante ese aprendizaje tuve la oportunidad de realizar cirugías de perfusión en ratones, tomando muestras de sangre, obteniendo hígado y cerebro para sus investigaciones. De igual manera se nos enseñó a administrar y formular anestesia para procedimientos de eutanasia o anestesia, tomando en cuenta los diferentes tipos de inyecciones para una penetración de forma eficiente sin lastimar o dañar demasiado al ratón tomando en cuenta su peso y el sexo.

Cada dos veces por semana se hacía limpieza del bioterio donde los alumnos de servicio social teníamos un rol y un control, donde se reportaban anomalías como ratones lastimados, muertos, si no tenían comida o agua, de la misma forma nacimientos de las unidades de reproducción, pasadas las 3 semanas se realiza un destete de las crías separándolos identificando su sexo y otorgarles un número para registrarlos en la base y posteriormente identificar su tipo de mutación tomando una

muestra de biopsia de cola de ratón para poder extraer el DNA y realizar su lisado cuidando de no tener contaminación cruzada con una sepsis adecuada.

En mi área era la encargada de realizar la reacción en cadena de la polimerasa con primers específicos para cada uno de los genes utilizados o deseados de acuerdo a la colonia o cepa que se esté utilizó o al gen que se quería reconocer montando la reacción en el termociclador de acuerdo a la temperatura de alineamiento de los primer utilizados, posteriormente se preparan los geles de agarosa y acrilamida para realizar una electroforesis de DNA con el fin de separar las bandas obtenidas por diferencia de peso molecular usando un campo electromagnético, de esta manera, se reconocían los individuos que presenten alelos mutantes o silvestres y si los presentan en versión homocigota o heterocigoto utilizando los controles apropiados, esto se documentaba y analizaba con un fotodocumentador usando un intercalante de DNA.

De igual manera asistía a seminarios bibliográficos para estar al corriente y aprender acerca del quehacer cotidiano en los proyectos de investigación donde se realizaban mesas de discusión y conocimiento para su mejora.

.

5. Metas alcanzadas

Como principal meta considero que fue desarrollarme dentro de un laboratorio y poniendo a prueba mis capacidades obtenidas dentro de la carrera, la expansión de conocimientos de forma teórica y práctica por parte de la investigación mejorando mis habilidades con ayuda de las herramientas y el apoyo de la Dra. Chávez y estudiantes de maestría y doctorado que me impulsaron y orientaron dentro de las diversas ramas de los procedimientos de fisiología y biología molecular.

El manejo de animales, en este caso ratones, conociendo su anatomía y realizando cirugías de perfusión para obtener los órganos que los alumnos necesitaran para sus investigaciones ya que era una rama que dentro de mi carrera no se había tenido oportunidad de experimentar y la práctica de este proceso expandió mi interés

A pesar de que la pandemia nos limitó en cuestiones prácticas de laboratorio, dentro del servicio pude desarrollarme con los conocimientos que tenía y mejorar la información y técnica de la misma manejando los diversos equipos que anteriormente no había tenido la oportunidad de utilizar y de esta forma tener una visión más clara de los procesos.

Así mismo, fue interesante examinar como funcionan los roles y la disciplina que se ejerce dentro de un ambiente de investigación, el sistema modular de la UAM me ayudo a una mejor adaptación dentro del sistema profesional, me hizo poner en perspectiva mis aptitudes y como mejorarlas con una mayor preparación, enfrentando retos que antes no me planteaba y obtener una mayor confianza, de igual forma encontrar mis intereses dentro del gran campo laboral de la carrera.

Debido a que los experimentos tenían una planeación y calendarización con antelación, formé un hábito de orden y distribución de manera estricta para optimizar los resultados y obtener las menos inconformidades posibles aprovechando el tiempo para desarrollar una mejor organización, ya que eso encamina a realizar un trabajo de manera más profesional.

Resultados y conclusiones

Se obtuvieron diversos análisis de distintas mutaciones de ratones a partir de PCR demostrando si su naturaleza era homocigota o heterocigota para identificar que tipo de ratón podría servir para las técnicas de western blot o inmunofluorescencia, con diversos genes los cuales eran SPAKKI, KLHL, VGAT, KS-WINK1, AI35 entre otros, cada gen con su respectivo protocolo y primers específicos de distintas cepas y colonias de ratones.

Se sacrificaron diversos ratones de colonias a partir de 43 semanas para prácticas de cirugías de perfusión, con sexo indistinto y dosis de anestesia basándonos en su peso y sexo, obteniendo órganos de interés como riñones y cerebro para fines de investigación y posteriormente la realización de esterotaxias perforando el cráneo de manera estratégica para identificar zonas específicas de interés en arqueados y observados posteriormente en el microscopio.

Se aprendieron las diversas técnicas de biología molecular así como la extracción de DNA de biopsias de animales transgénicos de laboratorio, reacción en cadena de la polimerasa, electroforesis horizontal de ácidos nucleicos e identificación de fragmentos de PCR. Además logré desarrollarme en un ambiente académico y conocer cuál es el quehacer científico en un laboratorio de ciencia básica y medicina traslacional como lo es el laboratorio de Fisiología experimental, en el anexo al final del reporte se podrán encontrar diversas imágenes en las cuales se visualizan algunas de las actividades ya mencionadas y que se realizaron durante los 6 meses del servicio social

De igual manera la pandemia afectó el conocimiento práctico del laboratorio lo cual es un requisito fundamental para el correcto desarrollo de la formación académica y profesional, lo cual limitó la manera de desenvolverse de una manera práctica dentro de un laboratorio, sin embargo, gracias al sistema modular de la universidad esta práctica se fue sobrellevando.

6. Recomendaciones

En la búsqueda de mi servicio social fue de gran apoyo el listado que imparte la carrera para conocer los convenios con las distintas instituciones, sin embargo, en el laboratorio de Investigaciones Biomédicas de la UNAM ubicado dentro del Instituto Nacional de Cardiología no contaban con mucha experiencia con el sistema de la UAM, por lo que se dificultó algunos trámites respecto al servicio, se recomendaría un protocolo para conocer la información pertinente en situaciones similares.

8. Bibliografía:

Carmen Padilla, J. D. (2014). Electroforésis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.

Aislamiento y caracterización electroforética de ADN plasmídico. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

Galván Cejudo, M. T. (2014). Comprobación de colonias transformantes mediante PCR y electroforesis. Departamento de Bioquímica y biología Molecular

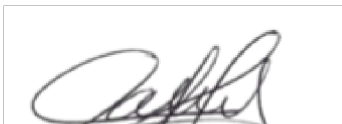
Altamirano Bautista A, Hernández Meza R, Escalera Zuñiga E. (2015). Manejo de ratones de laboratorio. FES Zaragoza

Navarro J., Ramírez R y Villagrán C. (2012). Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales. 1ª edición. México: Samsara Editorial

Romero W, Batista Z, Ruano A. (2016). El 1, 2, 3 de la experimentación con animales de laboratorio. Scielo Perú. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342016000200015

**ASESOR
EXTERNO:**

*Dra. María de Jesús
Chávez Canales*



ASESOR INTERNO:

Dr. Rafael Bojalil Parra



ALUMNO:

Gabriela

González

Hernández



9. ANEXOS

Principios básicos en las Interacciones Proteína-Proteína				KLHL (R258M)	
Experimentador	Grupo			Genotipo	Tamaño de banda
Fuente	AJ35			WT	308 pb
gen				KI	383 pb
				HET	308 y 383 pb

Número de ratón	Genotipo	Observaciones	Amiba cont	abajo cont
1.1	9719 WT		1	CONTROL
1.2	82 HET	HET	2	9719
1.3	9962 WT		3	82
1.4	9984 WT		4	9982
1.5	9985 WT		5	9984
1.6	85 WT		6	9985
1.7	86 WT		7	85
1.8	87 WT		8	86
2.1	88 WT		9	87
2.2	235 WT		10	ESPACIO
2.3	322 WT		11	68
2.4	324 WT		12	235
2.5	335 WT		13	322
2.6	336 WT		14	324
2.7	9713 KI		15	335
2.8	9714 KI		16	336
3.1	9852 WT		17	9713
3.2	9853 WT		18	9714
3.3	9918 WT		19	ESPACIO
3.4	9919 WT		20	9852
3.5	9921 WT		21	9853
3.6	9927 WT		22	9918
3.7	9928 WT		23	9919
3.8	9929 WT		24	9921
4.1	9930 WT		25	9927
4.2	9 WT		26	9928
4.3	9 WT		27	9929
4.4	10 WT		28	ESPACIO
4.5	11 NO SALIO	WT	29	
4.6	17 WT		30	
4.7	18 WT			
4.8	24 WT			
4.9	29 WT			
5.0	30 WT			
5.1	31 WT			
5.9	84 WT			
5.1	96 KI			
6.1	195 KI			
6.9	WT			

REPETICION
11
62
WT
KI
HET

Imagen 1. Base de datos PCR

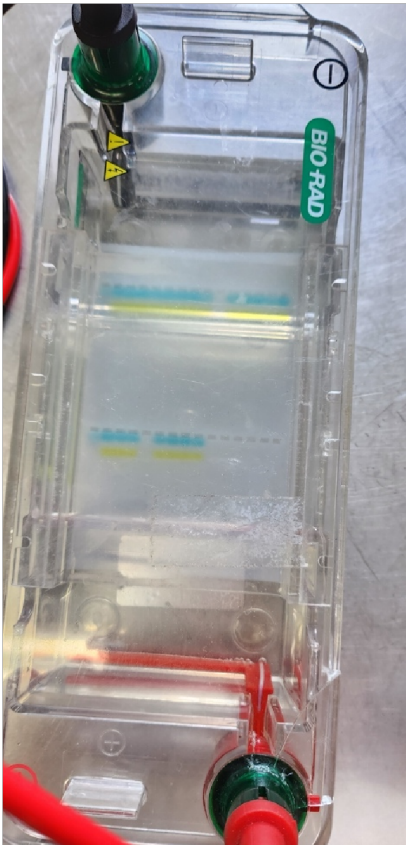


Imagen 2. Electroforesis

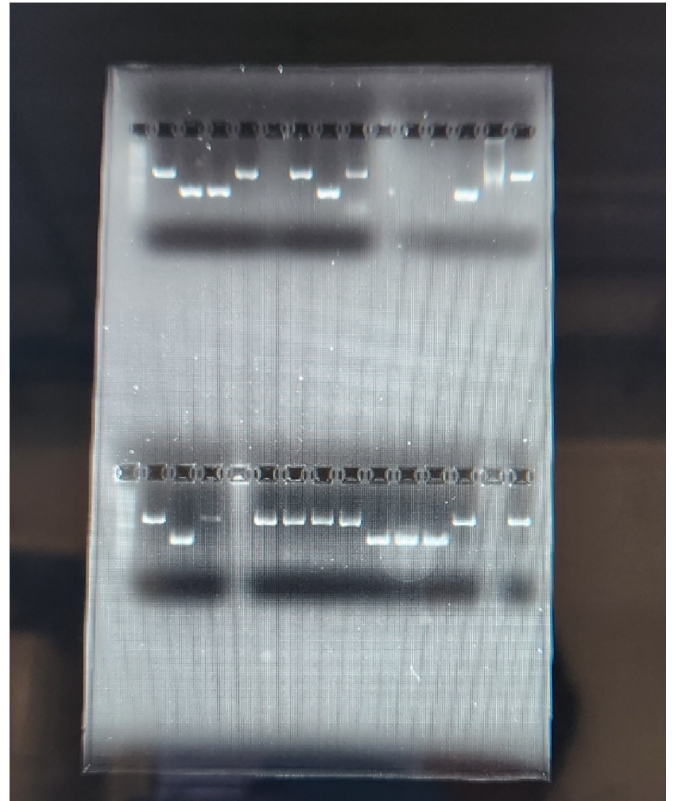


Imagen 3. Gel agarosa visualizado en Quimidoc



Imagen 4. Esterotaxia a ratones



Imagen 5. Cirugía de perfusión



Imagen 6. Crías de ratón



Imagen 7. Mesa de cirugía



Imagen 8. Constancia para ingreso al bioterio

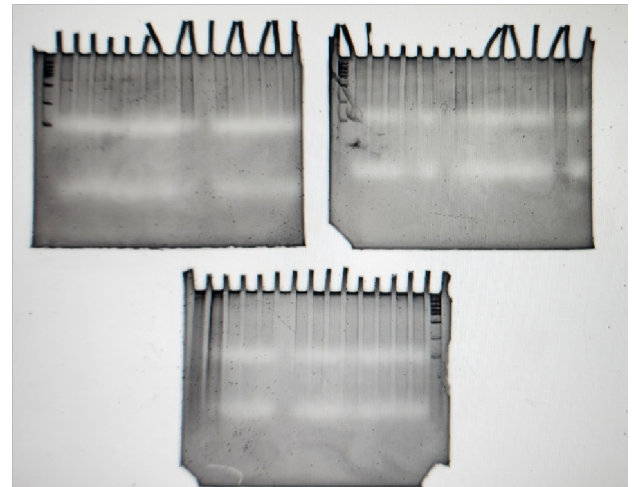


Imagen 9. PCR en geles de acrilamida