

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

INFORME DE AVANCES DEL SERVICIO SOCIAL
POR ACTIVIDADES RELACIONADAS CON LA PROFESIÓN

USO Y APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE LABORATORIO, EN LA INVESTIGACIÓN EN NEUROCIENCIAS

QUE PRESENTA EL ALUMNO:

OSMAR YAEL MAYORAL TORRES

MATRÍCULA:
2162033376

ASESORES:

INTERNO

DOCTOR EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN JAVIER VELÁZQUEZ
MOCTEZUMA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA.

EXTERNA

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS MARTHA LEÓN OLEA
DEPARTAMENTO DE NEUROMORFOLOGÍA FUNCIONAL DEL INSTITUTO
NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ

Periodo: 01-mayo-2022 al 10-noviembre-2022

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN	5
DESCRIPCIÓN TEORICA.....	5
Cuidado y manejo de animales de laboratorio	5
Los modelos animales	5
Aplicación de fármacos y eutanasia en animales	6
Obtención de las muestras biológicas	6
Muestras biológicas	5
Obtención de la muestra	7
Procesamiento de muestras biológicas	7
Técnicas histológicas de rutina	7
Inclusión en parafina.....	8
Inclusión en resina	8
Técnicas de tinción	9
Técnicas especiales	9
Western Blot	9
Técnicas de Inmunolocalización.....	10
Inmunohistoquímica.....	10
Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica enzimática.....	11
Microscopía.....	11
Microscopía de fluorescencia.....	11
Microscopía confocal	12
Microscopía electrónica	12
Proyecto central del laboratorio	13
Efecto de la exposición perinatal a los contaminantes orgánicos	13
OBJETIVOS DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS	13
METODOLOGIA.....	14
Cuidado y manejo de animales de laboratorio para la investigación.....	14
Mantenimiento	14
Reproducción.....	15
Soluciones químicas	15
Solución amortiguadora de cacodilatos (BC)	16
Fijador de Karnovsky (FK)	16
Solución amortiguadora de fosfatos stock (PB).....	16

Solución amortiguadora de fosfato salino (PBS)	16
Solución fijadora (paraformaldehído 4%)	16
Solución de lavado salino al 0.9%.....	17
Solución crioprotectora de sacarosa al 30%	17
Procesamiento histológico para microscopía electrónica.....	17
Perfusión intracardiaca	17
Procesamiento de tejido.....	18
Procesamiento de tejido para la técnica de Western Blot	19
Cuantificación de proteínas.....	21
Electroforesis	21
Bloqueo y anticuerpos.....	23
Detección de la proteína	23
Procesamiento de tejido para la técnica de Inmunofluorescencia.....	23
Procedimientos de corte	24
Inmunofluorescencia.....	24
Procesamiento histológico para inclusión en parafina y tinción	25
Muestras de tejido cerebral.....	25
Muestras de nervio ciático	26
Hematoxilina de Gill y Eosina (HG&E)	27
Tinción de Nissl.....	27
Tinción de tionina.....	28
Exposición a contaminantes ambientales, los éteres bifenilos polibromados,	28
Durante el desarrollo en ratas <i>Wistar</i>	
Frotis vaginal	29
Exposición	29
Obtención de muestras.....	29
Histoquímica NADPH-d.....	29
Vinculo de las actividades desarrolladas con los objetivos de formación.....	30
RESULTADOS	31
Procesamiento de tejido para la técnica de Western Blot	31
Procesamiento de tejido para la técnica de inmulo-localización	31

Tinción con EG&E.....	32
Procesamiento histológico para inclusión en parafina y tinción	33
Exposición a contaminantes ambientales, los éteres bifenilos.....	36
Tecnica inmunoenzimática de la NADPH-d.....	37
Conclusion.....	37
Referencias.....	37

INTRODUCCIÓN

En el presente informe se reporta lo aprendido y aplicado durante el servicio social en el Departamento de Neuromorfología Funcional (DNF) de la Dirección de Investigaciones en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM), el cual tiene como objetivo: Ofrecer a los alumnos de Pregrado provenientes de Instituciones Públicas o Privadas con reconocimiento oficial, la oportunidad de conocer la realidad profesional por medio de la realización de actividades de interés y beneficio social promoviendo la aplicación de los conocimientos y habilidades de los alumnos e integrándolos (por un período establecido) en los programas o proyectos que se lleven a cabo en el Instituto. Todas las actividades que se desarrollarán responden a las necesidades del proyecto “Efecto de la exposición perinatal a los contaminantes orgánicos persistentes, los éteres bifenilos polibromados, como neurotóxicos y disruptores endocrinos, durante el desarrollo postnatal de la rata” por lo tanto, el objetivo de las actividades realizadas fue abordar varias técnicas que se emplean en este estudio: perfusión intracardiaca, tinciones, inclusión de tejido, Western blot o inmunoblotings, inmunolocalización, entre otras.

DESCRIPCIÓN TEORICA

Cuidado y manejo de animales en el bioterio

Los modelos animales

El uso de animales creados y criados para el laboratorio es fundamental para el conocimiento científico, en la farmacología, fisiología, toxicología, entre otras disciplinas de evidente aplicación al ser humano, sometiendo a los animales a experimentos u observando la ocurrencia espontanea de fenómenos en ellos. En general, la estructura de las ciencias médicas y biológicas sería inconcebible sin el empleo de animales (Cardozo de Martínez *et al.*, 2007). Cualquier animal, vertebrado o invertebrado usado en el laboratorio conlleva responsabilidad, por lo que los animales deben estar libres de crueldad, y recibir un trato con respeto y dignidad, exigiendo un cuidadoso mantenimiento bajo condiciones controladas en un espacio específico y aislado, denominado bioterio. El bioterio del Departamento de investigaciones en neurociencias, es una estancia para animales de laboratorio, en

donde se crían, mantienen y se utilizan para la investigación como modelo biológico (Vargas-Miranda *et al.*, 2018). En él se realiza la buena práctica del cuidado y manejo de los animales, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, la Ley de Protección de los animales de la Ciudad de México (2022), Las Reglas Internas de Funcionamiento del Comité de Ética en investigación del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón De La Fuente Muñiz (Mondragón-Barríos, 2021) y los lineamientos establecidos por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL, 2017).

Aplicación de fármacos y eutanasia en animales

Está comprobado que los animales estresados no constituyen en buenos sujetos de investigación (Cardozo de Martínez *et al.*, 2007; Wolfensohn y Lloyd, 2003), por esta razón es importante que antes de la administración de cualquier fármaco se tenga experiencia en la manipulación y sujeción del individuo (Vargas-Miranda *et al.*, 2018); en algunos procedimientos es necesario inmovilizar al animal (Mourelle *et al.*, 2013). Las vías de administración de fármacos para los roedores son: Inyecciones subcutáneas, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica y administración oral (Morton *et al.*, 2001).

Etimológicamente la palabra eutanasia significa “muerte sin dolor” y en sentido aplicativo “arte de sacrificar o matar animales de forma piadosa, evitando el sufrimiento físico y psíquico” (Bolant *et al.*, 1990). La NOM-062-ZOO-1999, especifica que el método seleccionado para la eutanasia depende de la naturaleza del estudio, la especie de animal involucrada y su número. Los métodos recomendables son: los agentes anestésicos inhalables, fármacos intravenosos, irradiación, dislocación cervical, decapitación y la electrocución.

Obtención de las muestras biológicas

Muestra biológica

Una muestra biológica es una fracción estadísticamente significativa que aporta información sobre un todo inaccesible, con el objetivo de inferir y diagnosticar qué le está sucediendo al órgano o al tejido en su conjunto (Bota i Arqué, 2004); pueden ser órganos completos, tejidos, células, ADN, ARN, proteínas o fluidos corporales como orina, saliva, sangre, sudor, humor vítreo, líquido cefalorraquídeo, etc. (Checa,

2017). Para lograrlo es necesario detener los procesos vitales del organismo y conservar la estructura que tenían en vida (Montalvo, 2010).

Obtención de la muestra

La fijación tisular es el proceso de preservación de las muestras biológicas, consiste en detener los procesos de degradación que ocurre durante o tras la muerte celular: autólisis (por liberación de enzimas lisosómicas) y putrefacción (por la presencia de microorganismos que liberan sus enzimas líticas). La fijación es un proceso químico o físico. Los métodos físicos incluyen el calor, las microondas y la criopreservación (congelación). La fijación química se realiza por inmersión o perfusión (Eltoum *et al.*, 2001). Este último método es casi instantáneo; después de anestesiarse al animal, en el caso de la perfusión intra cardíaca, se inicia abriendo cavidad torácica y canulando la aorta a través del ventrículo izquierdo, permitiendo introducir las soluciones en la circulación, siendo impulsadas por las contracciones cardíacas (Montuenga *et al.*, 2014).

El fijador líquido más utilizado es el formaldehído, el cual consiste en una solución acuosa del gas paraformaldehído al 39-40%, claro e incoloro. Su acción fijadora da lugar a un entrelazamiento de las proteínas mediante la formación de puentes de hidroximetileno entre el fijador y las moléculas de proteínas, estas pasan de estado sólido a gel, preservando la posición inicial de las proteínas solubles al inmovilizarlas (coagulándolas) (Montuenga *et al.*, 2014; Montalvo, 2010).

El paraformaldehído libera monómeros de formaldehído al calentarse en solución acuosa, regularmente en soluciones tamponadas a altas temperaturas (tampón fosfato salino o buffer fosfato salino). Los protocolos de fijación emplean una disolución de formol comercial al 10% (volumen/volumen) o de paraformaldehído sólido disuelto en medio acuoso al 4% (peso/volumen) (Montuenga *et al.*, 2014).

Procesamiento de muestras Biológicas

Técnicas histológicas de rutina

La Histología, es la rama de la anatomía que estudia las características estructurales y funcionales de los tejidos de animales y plantas, es decir, analiza la biología molecular de las células y de la matriz extracelular, además de las leyes que rigen en los siguientes sistemas de organización: molecular, celular, tisular, órgano y sistema de órganos (Herrera-Batista *et al.*, 2020)

Se le denomina “técnica histológica” a la serie de métodos y técnicas aplicadas a un material biológico para poder estudiar las características de los tejidos mediante la observación al microscopio óptico o electrónico. Para lograr este objetivo es necesaria la obtención de la muestra, fijación, inclusión, microtomía, coloración o tinción y el montaje (Megías *et al.*, 2022; Montalvo, 2010).

Inclusión en parafina

La inclusión, infiltración o impregnación tiene por objetivo rellenar completamente la muestra histopatológica con el medio de inclusión que se va a utilizar, es decir, la ocupación completa de los espacios intra y extratisulares, inicialmente rellenos por agua. La finalidad de este proceso es proporcionar a la pieza anatómica la homogeneidad y dureza suficiente para obtener secciones finas de calidad (Verdín-Terán *et al.*, 2013).

La parafina es una sustancia de tipo céreo, compuesta por mezcla de hidrocarburos saturados, generalmente sólida a temperatura ambiente. Existen diferentes tipos de parafina que se caracterizan por su longitud de cadena de átomos de carbono y punto de fusión (entre 40° y 60°C), lo que va a condicionar en gran medida en histotecnología. Esta se clasifica en blandas (punto de fusión de 45°-52°C), semiduras (54°-58°C), siendo la que se emplea con mayor frecuencia para realizar técnicas histológicas, y duras (60°-65°C) (Verdín-Terán *et al.*, 2013; Montalvo, 2010). La inclusión en parafina se realiza mediante baños sucesivos en parafina fundida, habiendo deshidratado y tratado a la muestra con un líquido intermediario previamente. Este procedimiento puede hacerse de forma manual, o de forma automática en procesadores de inclusión (Verdín-Terán *et al.*, 2013). En general, consiste en la orientación del tejido en parafina que, cuando se solidifica, proporciona un medio firme para mantener intactas todas las partes del tejido cuando se cortan cada una de las secciones (Luna, 1968).

Inclusión en resina

Los medios de inclusión epóxicos son los más utilizados para microscopía electrónica. El monomero epoxi (Poliaril-eter de glicerol) está constituido de grupos reactivos tipo epoxy, constituida por un oxígeno unido a dos átomos de carbono adyacentes de forma cíclica (RCH-O-CH₂) (Rojas-Morales y Torres-Gomez, 2016). El procedimiento de inclusión es similar al descrito para la parafina con algunas

modificaciones, por ejemplo, la solución fijadora suele contener glutaraldehído y es necesario una postfijación posterior en tetraóxido de osmio, el endurecimiento del medio de inclusión, la resina, no se realiza por enfriamiento sino por polimerización (60°C). En general, el empleo de resina Epon permite un proceso de imbibición rápida, facilita la obtención de secciones ultrafinas, del orden de nanómetros, tiene un buen contraste al microscopio electrónico para la observación de la ultraestructura celular del tejido (Romero de Pérez, 2003).

Técnicas de tinción

El procedimiento de coloración o tinción consiste en que una estructura celular o tisular adquiere un color específico bajo la acción que ejerce un colorante, con la finalidad de distinguir y facilitar su observación. Dichos colorantes se pueden clasificar como naturales, como el carmín, extraído de la cochinilla, la hematoxilina obtenida de la corteza de un árbol, “el palo de campeche” y artificiales, derivados de la destilación de la huella o carbón. En general son sales que se clasifican en **ácidos** como la eosina con afinidad por el citoplasma, que tiñe en diferentes tonos de rosa y **básicos** como el violeta de cresilo; pintando estructuras citoplasmáticas como los cuerpos de nissl de color púrpura y los núcleos de color rosa-violeta, la tionina; que tiñe los núcleos de las células en azul intenso, el nucléolo en azul violáceo, las granulaciones de las células cebadas de Ehrlich, en rojo heliotropo, los protoplasmas y el tejido muscular en azul claro, la queratina en azul turquí, y la sustancia fundamental del cartílago en rojo violáceo, la hematoxilina; demostrando la presencia de núcleos en una coloración azul; entre otros (Gallego, 1914; INECC, 2009; Montalvo, 2010; Megías *et al.*, 2022).

Técnicas especiales

Western Blot

El western blot o Inmunoblotting es una técnica que revolucionó la biología molecular a mediados de los años setenta como método de análisis de ácidos nucleicos, analizando la expresión de los genes, mediante la inmunodetección de proteínas, en particular proteínas que son de baja abundancia en muestras de sangre o tejido (Kurien y Scofield, 2015; De la Fuente Gonzales *et al.*, 2007).

Esta técnica permite transferir las proteínas de un gel de poliacrilamida, que contiene dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) a una membrana absorbente. Las proteínas de

la muestra (previamente desnaturalizadas por calor) se unen con el SDS, creando complejos negativamente cargados; la cantidad de SDS que se une a las proteínas desnaturalizadas es proporcional al peso molecular de estas. Esto hace que una vez que apliquemos la corriente, los complejos SDS-proteína (cargados negativamente) migren por el gel de poliacrilamida en base al tamaño del polipéptido, siendo las proteínas transferidas a la membrana una copia exacta del gel donde han sido separadas por electroforesis (Laemmli, 1970; Kurien y Scofield, 2015). Esta membrana se incuba con dos anticuerpos; El anticuerpo primario se une a las proteínas de la membrana, mientras que el anticuerpo secundario se une al anticuerpo primario. Posteriormente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática o fluorescencia, entre otros métodos. De esta forma, en el análisis quedará una mancha (banda) donde se encuentre la proteína buscada según su peso molecular. (Jensen, 2012).

Finalmente, se expone la membrana a una película, todo bajo condiciones de luz controlada (cuarto oscuro). Se sumerge la película en solución de revelado para finalizar en fijador. El patrón de bandas que se pinta en la película corresponde a la marca de la proteína analizada (según su peso molecular) (Milton-Laskibar, 2015).

Técnicas de inmunolocalización

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica histológica que se basa en la alta especificidad y afinidad de la reacción antígeno – anticuerpo, permitiendo, mediante el empleo de anticuerpos específicos y sistemas de detección, determinar la expresión de biomarcadores (proteínas). Para que la reacción antígeno-anticuerpo sea exitosa debe reconocer la estructura tridimensional del antígeno (de Dios-Soler y Acosta-Habb).

Esta técnica puede ser de dos tipos: directas, la cual consiste en una reacción de un único paso, en el que un anticuerpo que ha sido marcado tras su obtención (primario) se une, a través de la zona de unión de su molécula, con el correspondiente determinante antigénico presente en las células o tejidos. El marcaje se hace uniendo el anticuerpo a sustancias que hagan visible al microscopio el complejo de unión epítipo-anticuerpo, tales como fluorocromos, materiales radiactivos, enzimas, etc., e indirectos que además del anticuerpo primario, se utilizan uno o más, anticuerpos secundarios marcados, que se van uniendo entre sí.

El anticuerpo secundario se produce en un animal diferente al del primario y reconoce los antígenos del animal donde se produjo el Ac primario (Pedrosa–Raya *et al.*, 2019).

Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica enzimática

Esta técnica se basa en evidenciar la fijación de anticuerpos sobre un antígeno precisando su localización mediante el marcado del anticuerpo con una sustancia fluorescente, sin alterar su especificidad. La presencia del Ac conjugado con el fluorocromo no necesita de ninguna reacción química para hacerse evidente (Torras-Rabasa, 1976; Fundora, 2013).

Los fluorocromos son colorantes que absorben la radiación (luz ultravioleta), son excitados por ella, emitiendo una alta fluorescencia en el espectro visible con una coloración diferente a la emitida por los tejidos (Aoki *et al.*, 2010).

Existen dos métodos de detección del antígeno, con marcaje conjugado directo, donde el anticuerpo primario está marcado con el fluorocromo con especificidad para el antígeno, o con un método conjugado indirecto, en donde el anticuerpo primario reconoce el antígeno y el anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo reconocer al anticuerpo primario (Parra-Medina y Fernando-Polo, 2017).

La histoquímica enzimática, se basa en la capacidad de algunas enzimas del tejido de mantener funcional su centro activo tras la fijación. Estas enzimas y las células que las poseen se manifiestan mediante la adición de un sustrato que produce una reacción enzimática, que normalmente libera electrones y convierte a unas sustancias solubles e incoloras en complejos insolubles y coloreados. El sustrato es específico para cada enzima. Las moléculas que dan color, durante la reacción enzimática, se depositan en donde se localiza la enzima. Para esta técnica es recomendable no incluir el material en medios como la parafina puesto que la deshidratación y la temperatura elevada pueden dañar la conformación de la enzima y la actividad de su centro activo (Megías *et al.*, 2022).

Microscopia

Microscopia de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia (microscopio de transmisión o de transparencia y de epifluorescencia) permite demostrar, por la radiación luminosa que emiten, partículas sumamente pequeñas, partes de la célula, estudiar procesos celulares,

localizar moléculas específicas y estudiar la interacción entre moléculas *in vivo* (Monteleone, 2017; Montalvo, 2010).

Se caracterizan por utilizar una fuente de iluminación de alta intensidad, generalmente de arco de mercurio o de xenón que ilumina la muestra a través de un filtro interferencial (excitación) y un espejo dicróico. Ambos seleccionan una banda del espectro óptima para la excitación del fluorocromo (molécula capaz de absorber fotones y emitirlos con menor energía), que emite luz (fluorescencia) a una longitud de onda mayor. Esta luz es recogida por el objetivo, pasa el espejo dicróico y un segundo filtro interferencial (emisión) y es enfocada en un plano para formar la imagen amplificada del objeto fluorescente, accesible al observador a través de los oculares o a un dispositivo de captura de imagen (cámara de video digital) a través de un puerto especial (Díez-Guerra, 2004).

Microscopia confocal

El principio de la microscopía confocal (MC) se basa en la confocalidad, es decir, la colimación de un punto de luz en un plano particular de una muestra, arrojando imágenes provenientes de la región enfocada (en los planos x, y, z), eliminando el resto de la luz proveniente de la muestra. A diferencia de la fluorescencia, se emplea láser como fuente de luz; esta luz pasa por un diafragma o pinhole, dando como resultado que el observador reciba la luz de una región de 500 nanómetros de profundidad contenida en un corte de tejido micrométrico (López-Macay *et al.*, 2016). En general, la reconstrucción tridimensional y el análisis de colocación son las aplicaciones más frecuentes del MC (Samaniego, 2009).

Microscopia electrónica

En el Laboratorio de Neuromorfología funcional del INPRFM, tenemos un microscopio Zeiss Crossbeam 550, el cual integra las funciones de un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (SEM) con un microscopio de iones de Galio focalizados (FIB). La técnica del funcionamiento de combinar lo electrónico e iónicos, se basa en que podemos obtener imágenes SEM de alta resolución al mismo tiempo que realizamos modificaciones en la muestra con el haz de iones (Pérez-Willard, 2016).

Proyecto central del laboratorio

Efecto de la exposición perinatal a los contaminantes orgánicos persistentes, los éteres bifenilos polibromados, como neurotóxicos y disruptores endocrinos, durante el desarrollo postnatal de la rata.

Los compuestos industriales organohalogenados, los éteres de difenilo polibromados (PBDE) son sustancias químicas usados como retardantes de flama en una amplia gama de productos de uso para el humano, (industria electrónica, textil, plásticos, teléfonos móviles, materiales de construcción, electrodomésticos de cocina), además de que han penetrado todos los aspectos del medio ambiente, ocasionando contaminación ambiental mundial que conduce a la bioacumulación tanto en los sedimentos como en la biota (OMS, 1994; De Wit, 2002; Watanabe y Sakai, 2003; Johnson-Restrepo y Kannan, 2009; EPA de EE. UU., 2010; ATSDR, 2017).

En general, la exposición a PBDE produce trastornos a la salud en los diferentes organismos de la escala filogenética, incluyendo a los humanos que están expuestos durante el desarrollo, comenzando en la etapa fetal a través de la circulación placentaria, durante el periodo neonatal a través de la lactancia y durante la edad adulta por ingestión/contacto directo (Li *et al.*, 2013; Eskenazi *et al.*, 2013; Abdalla y Harrad, 2014; Cowell *et al.*, 2018), provocando desordenes sobre los sistemas neuroendocrinos, del comportamiento, cognitivos alteraciones en la atención, y dificultades sensoriales y motoras (Costa y Giordano, 2007; León-Olea *et al.*, 2014; Viberg *et al.*, 2006) además de alterar el sistema vasopresinérgico en ratas adultas (Alvarez-Gonzalez *et al.*, 2020).

OBJETIVOS DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

- **Aprender el cuidado y manejo de los animales del bioterio, así como las necesidades y requerimientos esenciales para el alojamiento de los animales que se utilizan para la investigación en el DNF.**
- **Conocer y aplicar diferentes metodologías para la obtención, preservación, manejo y análisis de muestras biológicas.**
- **Participar en otras actividades del departamento, como son la asistencia a cursos, seminarios y conferencias.**
- **Participar activamente en el proyecto 00000000283268 “Efecto de la exposición perinatal a los contaminantes orgánicos persistentes, los éteres bifenilos polibromados, como neurotóxicos y disruptores endocrinos,**

durante el desarrollo postnatal de la rata”, como aprendizaje y preparación para la realización del proyecto de tesis de maestría.

METODOLOGÍA

Descripción específica de las actividades desarrolladas

En este apartado se describen las técnicas que usé y apliqué en el Departamento de Neuromorfología Funcional, bajo la supervisión de mi tutor, Dra. Martha León Olea, y mis compañeros del laboratorio: Dra. Mhar Y. Álvarez González, Dr. Lucio Antonio Ramos Chávez, Dr. Eduardo Sánchez Islas y el M. en C. José Samuel Mucio Ramírez.

Cuidado y manejo de animales de laboratorio para la investigación.

Para obtener las habilidades de manejo de animales de laboratorio, tomé un curso teórico-práctico de “Cuidado y manejo de animales de laboratorio impartido en el bioterio de la dirección de investigaciones en neurociencias, donde realicé un recorrido en las instalaciones de alojamiento, reproducción y mantenimiento de las ratas *Wistar* que se utilizan en la investigación en el DNF y aprendí el manejo ético de los animales. Además, colaboré en el mantenimiento y administración de fármacos de los animales que se utilizan para las investigaciones en el DNF.

Mantenimiento

- En el bioterio se reproducen ratas *Wistar* y ratones SW y Balb/C
- Las Ratas y ratones son mantenidas bajo condiciones controladas de luz y temperatura, entre 20 y 25°C, en un cuarto cerrado sin ventanas.
- En cajas jumbo con pisos y paredes continuas sólidas, bordes y aristas redondeados y con tapa removible de reja, preparadas con una cama de aserrín, se alojan máximo 5 ratas o 10 ratones, separados por sexo (hembra y macho).
- Se alimenta con LabDiet 5008 a los animales en temporada de reproducción o que se encuentren amamantado y LabDiet 5001 para crecimiento. El alimento y el agua son proporcionado *ad libitum*.
- Los animales son sujetados de la región media de la cola, con el dedo índice y pulgar o abrazándolos del cuello para su traslado. (Fig. 1).



Figura 1. Formas de sujetar a la rata. Izquierda: pasando el dedo índice y pulgar a través de su cuello. Derecha: abrazando el cuello con el dedo medio e índice.

Reproducción

- Se colocan dos hembras por macho durante 5 días (duración del ciclo astral), en ratones, en ratas se deja una hembra con un macho durante 7 días y 7 días más con un macho diferente
- A las hembras gestantes no se les cambia el aserrín durante 6 días. Se dejan en una caja sola. Se les coloca un poco de algodón para que hagan sus nidos y protejan a sus crías del frío.
- Los animales pueden tener un máximo de 5 partos.
- Después del destete, se sexan y se separan a las crías. Se observa la distancia ano-genital para la identificación (Fig. 2).

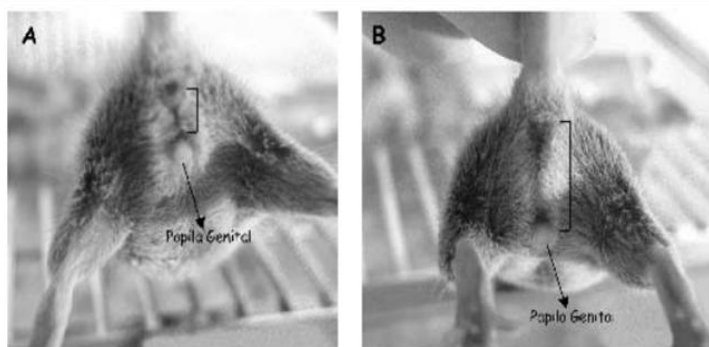


Figura 2. Sexado de ratas. Distancia ano-genital menor en hembras (A) y aproximadamente el doble en machos (B).

Soluciones químicas.

Aprendí a preparar diferentes soluciones utilizadas en las técnicas de laboratorio, descritas a continuación.

Solución amortiguadora de cacodilatos (BC)

Esta solución se utiliza como tampón en microscopía electrónica. Para la preparación se utilizó la siguiente fórmula: $g = M * PM * V$

Se pesaron 107.01g de cacodilato de sodio trihidratado para 5l de agua MilliQ (0.1M, pH 6.5).

Fijador de Karnovsky (FK) (glutaraldehído 2.5% - paraformaldehído 2%)

Este fijador se utiliza para la fijación de tejidos para la microscopia electrónica y se prepara en la solución amortiguadora de cacodilatos. Para preparar 4l de FK se utilizó la siguiente fórmula: $\% * V$

Utilizando paraformaldehído en polvo al 2%, se disolvieron 80g en 4l de BC (a 60°C). Se ajustó el pH a 7.2 - 7.4 con HCL y se dejó enfriar. Posteriormente se calculó la cantidad necesaria de glutaraldehído al 25% para obtener una concentración final de 2.5%, utilizando la siguiente fórmula: $C_1 + V_1 = C_2 + V_2$

De esta manera, a la solución de 4l de paraformaldehído al 2% se le añadieron 400 ml de glutaraldehído al 25%.

Solución amortiguadora de de fosfatos stock (PB 1M)

Para la preparación se emplea fosfato de sodio Na_2HPO_4 (dibásico) PM = 142 g/mol y fosfato de sodio NaH_2PO_4 (monobásico), PM = 120 g/mol.

Solución A: Se pesaron 71g de fosfato de sodio dibásico, diluida en 500ml de agua destilada, en agitación. **Solución B:** Se prepararon 30g de fosfato de sodio monobásico, diluida en 250ml de agua destilada, en agitación. La solución **A** se ajustó a un pH de 7.4 vertiendo la solución **B**, mantenida en agitación y utilizando un potenciómetro.

Solución amortiguadora de fosfato salina (PBS)

Se preparo una solución PBS 0.1M, pH7.4, 0.9% de NaCl a partir de la solución stock **PB 1M**. Para elaborar 1l de PBS se disolvió 10ml de solución stock de **PB 1M** más 9g de NaCl en 1000ml de agua destilada. El PBS se etiquetó y almaceno a temperatura ambiente.

Solución fijadora (paraformaldehído 4%)

Se disolvieron 40g de paraformaldehído en 1l de PB 0.1M a 60°C

Solución de lavado salina al 0.9%

Se disolvieron 9g de NaCl en 1l de agua destilada y 1ml de heparina

Solución crioprotectora de sacarosa al 30%

Se disolvieron 30g de sacarosa en 100ml de agua destilada

Procesamiento tejido para microscopía electrónica.

Perfusión intracardiaca

Se utilizaron 12 ratas macho para obtener las muestras biológicas (nervio ciático y cerebro). Se requirió la preparación de las siguientes soluciones: Solución fisiológica de NaCl al 0.9% más heparina. BC, y FK.

En botellas de cristal una con la solución salina y la otra con la solución fijadora, se conectaron a un equipo de venoclisis por medio de una llave de 3 vías. Ambas soluciones se colocaron en alto para que la perfusión fuera por goteo por gravedad.

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (0.4ml) vía intraperitoneal (IP).

- Para facilitar la manipulación, se sujetó al animal por las 4 patas decúbito dorsal, se realizó una toracotomía para exponer el corazón.
- Se hizo una incisión introduciendo la aguja en el ventrículo izquierdo del corazón para canular la aorta, que se muestra como vaso grueso color blanco, y administrar las soluciones (con ayuda de una pinza hemostática, se sujetó el corazón). Las soluciones se infundieron posterior a hacer un corte en la aurícula derecha para el drenaje de la sangre y soluciones. En seguida, se abre el sistema de solución salina, así se lavará la sangre de todo el organismo (la coloración blanquecina del hígado es un indicador de que el sistema se está limpiando). Ya terminada la limpieza, se cierra el equipo de venoclisis de la solución salina y se abre el de la solución fijadora (fig. 3).
- Se comienza a pasar solución Fijadora de Karnovsky por todo el organismo. En este punto el cuerpo del animal comienza a contraerse y a endurecer.
- Una vez fijado el animal (después de 10 a 15 minutos de fijación, aproximadamente), se cerró el sistema, se retiró la aguja del corazón, y el animal paso a la extracción del nervio ciático.
- Se colocó el animal en una charola con hielo, con el dorso hacia arriba.

- Para extraer el nervio ciático se cortó a la altura de muslo, con ayuda de un bisturí (entre cadera y la rodilla.), para encontrar el nervio (fig. 4).
- Utilizando unas tijeras de punta roma, se cortó el nervio (bilateral) y se colocaron las partes distales y proximales en un frasco que contiene la solución de posfijación (solución de Karnovsky).
- Por último, se etiquetaron los frascos y se llevaron a 4°C por 24 h.

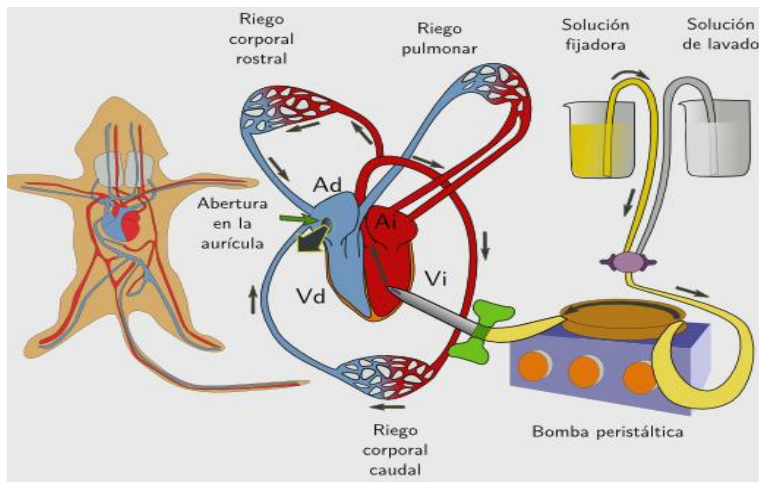


Figura 3. Fijación por perfusión en ratona. Entrada del fijador a través del ventrículo izquierdo pasando a la aorta, desde la cual se distribuye por todo el cuerpo.



Figura 4. Disección del nervio ciático en ratona *Wistar*. A) ejemplar en posición dorsal B) corte longitudinal a la altura del muslo C) corte vertical y D) extracción del nervio.

Procesamiento de tejido

Después de la posfijación:

- Se lavó el tejido en BC 1h a 4°C (0.1M pH7.2).
- Se incubó en solución de tetraóxido de osmio (1% en agua MillieQ), durante 2h en movimiento a 4°C
- Se lavó 3 veces con agua bidestilada por 15min cada uno.

- Se deshidrato en alcoholes graduales de 75; 90; 95 durante 15min y dos baños de alcohol 100% de 20min cada uno.
- Se dejo en solución saturada de acetato de uranilo alcohólico 100% (filtrado), tapado en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche.
- Se lavó con etanol 100%, 3 veces por 15min. cada uno, en agitación
- Se dejo en 10ml aproximadamente de solución saturada de acetato de plomo alcohólico al 100% (filtrado), cubierto por 2h en agitación.
- Se lavó por 2 veces, en etanol 100% durante 15min en agitación.
- Se dejo en acetonitrilo por 20min por 2 veces, en agitación.
- Se infiltró en resina Epon en diferentes proporciones.
 - Epon: acetonitrilo 1:1 (1.5ml/1.5ml) durante 1h en agitación.
 - Epon: 2:1 en agitación durante 1h.
 - Epon: 3ml toda la noche en agitación a temperatura ambiente.
- Se incluyó en Epon puro toda la noche a 60°C para obtener los bloques de resina.

Por último, los moldes de resina se tallaron con una cuchilla afilada hasta obtener una pirámide trunca cuadrangular y así poder realizar los cortes ultrafinos en un ultramicrotomo.

Nota: En esta práctica se realizaron 2 técnicas diferentes con el objetivo de conocer el método que arroja mejor resultado.

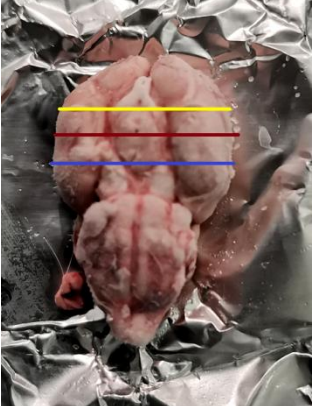
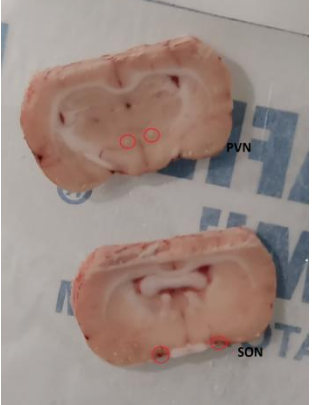

Procesamiento de tejido para la técnica de Western Blot.

Se utilizaron cerebros de rata Wistar machos y hembras de 3 meses de edad, las cuales fueron expuestas en la etapa perinatal por vía oral a la mezcla comercial de éteres de difenilos polibromados (PBDE; DE-79), disuelto en aceite de maíz (vehículo) o solo vehículo (grupo control), 0 (control), 1.7 (dosis baja) y 10.2 (dosis alta) mg/kg/día. La mezcla se inyectó en frituras de maíz y se les dio a las ratas madre desde el día 6 de la gestación hasta el día 21 posnatal. A las crías al llegar a los 3 meses de edad, se sometieron a un desafío normosmótico (acceso *ad libitum* al agua del grifo) o hiperosmótico (acceso *ad libitum* a solución salina al 2% NaCl, durante 4 días). Los cerebros fueron preservados en congelación a -80°C hasta su análisis.

Para el estudio del polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) y su receptor PAC 1 se obtuvo el núcleo supraóptico (SON) y

paraventricular (PVN), donde se encuentra este péptido en una alta concentración (Mucio-Ramírez et al., 2004), se utilizó el atlas “The Rat Brain” (Paxinos y Watson, 2007), se retiró la parte anterior del cerebro para obtener el tejido bilateralmente con un sacabocados a nivel del hipotálamo (Tabla 1).

Tabla 1. Procedimiento de corte en cerebro de rata para la obtención del SON y PVN

IMAGEN	DESCRIPCIÓN
	<p>Cerebro de rata donde se marca los cortes que se le realizó. Se retiró la parte anterior (amarillo), posteriormente se hicieron dos cortes en el hipotálamo para obtener las rebanadas donde se encuentra el SON (rojo) y el PVN (azul).</p>
	<p>Rebanadas de cerebro donde se obtiene el tejido. En la parte inferior de la imagen se señala en círculo rojo el SON y en la imagen superior el PVN.</p>
	<p>Se obtuvo el tejido del SON (imagen inferior) y PVN (imagen superior) con un sacabocados. obtenidos el tejido</p>

Cuantificación de proteínas

- El tejido total se homogenizó en tampón de lisis enfriado con hielo (50µl para SON y 100µl para PVN), que contenía Tris-HCL 50mM, NaCl 150mM, EDTA 2mM, Ácido tetraacético de etilenglicol (EDTA) 1mM, Pirofosfato de sodio 2.5mM, Gliserol-2-fosfato 1mM, Ortovanadato de sodio, Triton X-100 1%, Ditiotreitól (DDT) 1mM, Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM y Cóctel inhibidor de proteasa.
- Todas las muestras fueron procesadas en tubos eppendorf y mantenidas en frío para evitar la desnaturalización y degradación de proteína (Jensen, 2012).
- Los homogenizados se centrifugaron a 15 000 x g durante 30min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Las concentraciones de proteínas se determinaron utilizando un kit de ensayo de proteínas Micro BCA (Protein Assay), 200µl / 10µl de muestra en cada pozo, en un espectrofotómetro a 570nm.

Electroforesis

- Las muestras se sometieron a SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se prepararon las placas de gel de poliacrilamida (gel separador y gel concentrador), utilizando el método desarrollado por Laemmli (1970), modificado en el laboratorio por Ramos-Chavéz, (2022) (Comunicación personal) (Tabla 2 y 3).

Nota: Es importante que la solución de persulfato de amonio 10% (catalizador) y TEMED (iniciador) se agreguen hasta el final, posteriormente se homogenizó toda la solución. El porcentaje de poliacrilamida usado en los geles se debió a al tamaño de la proteína.

Tabla 2. Gel separador. Solución para preparar el gel separador Tris-Glicina SDS-PAGE.

Volumen de cada componente por gel (5ml por gel)	
Solución	15ml
12%	
H ₂ O	4.9
Mix de acrilamida al 30%	6
Tris 1.5M (pH8.8)	3.8
SDS 10%	0.15

Persulfato de amonio 10%	0.15
TEMED	0.006

Tabla 3. Gel de carga. Solución para preparar el gel concentrador Tris-Glicina SDS-PAGE.

Volumen de cada componente por gel (2ml por gel)	
Solución	4ml (dos geles)
H2O	2.7
Mix de acrilamida al 30%	0.67
Tris 1.5M (pH6.8)	0.5
SDS 10%	0.04
Persulfato de amonio 10%	0.04
TEMED	0.004

- Se preparó la muestra de proteínas con solución buffer Laemmli sample (4x) en proporción 3:1 y se sometieron a 100°C durante 5min con el fin de desnaturalizarlas hasta su estructura primaria.
- Por último, se centrifugo 1 min a 12000 rpm.
- Los geles, previamente polimerizados, se introdujeron en un tanque cubierto con solución buffer Tris-Glicina (1x) en donde se lleva a cabo la separación de las proteínas bajo un campo eléctrico a 120V, de acuerdo con su peso molecular. Se cargaron los pozos; primer pozo, control interno (agua), último pozo (marcador de peso molecular de la proteína diana), los pozos restantes llevaran la muestra de proteínas.
- Se realizó la electroforesis hasta que el frente de corrida llegó a la parte inferior del pozo (visto como una línea azul por el colorante del buffer).
- Posteriormente, las proteínas separadas son transferidas del gel a la membrana de nitrocelulosa. Para ello se armó un “sándwich” (esponja, 3 hojas de papel filtro, membrana de nitrocelulosa, gel de poliacrilamida, 3 hojas de papel filtro y esponja) humedecido con tampón de transferencia. La transferencia se realizó en

frio, colocándose en un recipiente con hielos. El tiempo de transferencia fue de 2 horas a 200mA (voltaje constante).

Bloqueo y anticuerpos

- Las membranas se bloquearon con leche baja en grasa (Svelty) dos horas en agitación y se incubaron con el anticuerpo primario Rabbit IgG monoclonal. Las bandas de proteínas se visualizaron con el anticuerpo secundario Donkey Anti-Rabbit IgG H&L, ligado a una molécula de HRP (peroxidasa de rábano).

Detección de la proteína

Por último, se realizó la quimioluminiscencia. En una cámara oscura se expuso la membrana a una película (Kodak, cat 604-0331) utilizando un kit de quimioluminiscencia mejorado (Western Reactivo de Quimioluminiscencia de Iluminación Plus NEN, cat. NEL105001EA; Waltham, MA, USA.). Se sumergió en solución de revelado y fijador para su visualización.

Procesamiento de tejido para la técnica de inmunofluorescencia

Además de los procedimientos en los que participe dentro del proyecto de PBDEs esta técnica la realizamos dentro de otro proyecto del laboratorio.

Se obtuvo tejido de los cojinetes de las patas de rata *Wistar*, previamente fijada por la técnica de perfusión intracardiaca con paraformaldehído al 4% y mantenidas en crioprotección (sacarosora 30%) hasta su uso. De esta manera se realizó la detección del péptido relacionado con la calcitonina (CGRP) en terminales nerviosas.

Se cortó tejido de ambas patas, en el área de los cojinetes (fig. 5) y se realizaron cortes en el criostato.

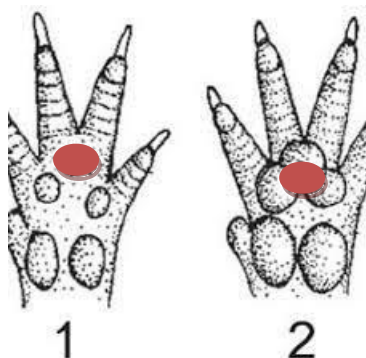


Figura 5. Área de los cojinetes cortadas, pata derecha e izquierda (coloreadas en rojo).

Procedimientos de corte

Se utilizó un criostato de rotación manual, donde se sitúa una cámara de congelación al interior, la cual permite congelar el tejido y obtener secciones tisulares delgadas.

- Se montó el tejido en un medio de congelación (Tissue-Tek) que funciona como molde. Se incluyó de manera homogénea, evitando dejar burbujas. Se reguló la temperatura del criostato a -20°C .
- La muestra, previamente montada se dejó en la cámara del criostato antes de comenzar a cortar para que el medio de montaje penetre y monte firmemente el tejido.
- Se orientó con la inclinación deseada y se colocó la cuchilla (el estirador debe quedar ligeramente por encima de la cuchilla)
- La técnica de corte es muy similar a la de parafina. Se obtuvieron cortes de $20\mu\text{m}$ y se montaron directamente de la superficie de la cuchilla en portaobjetos superfrost. Se guardaron en refrigeración a 4°C hasta su uso.

Inmunofluorescencia

Se prepararon las siguientes soluciones: PBS-Tritón al 0.3%, solución de bloqueo en PBS (suero normal de burro al 3%, albúmina de suero bovino al 3%, gelatina de pescado al 1% y tritón X-100 al 0.3%).

Se seleccionaron los cortes coronales de cojinete de las ratas. Utilizamos anticuerpo específico monoclonal CGRP. La técnica se realizó de la siguiente manera:

- Se lavaron los portaobjetos con PBS-T para remover el Tissue-Tek
- Se bloqueó con $200\mu\text{l}$ de solución de bloqueo en PBS por 1h a temperatura ambiente en agitación constante.
- Se retiró la solución de bloqueo. Se prepararon las diluciones del Ac primario en solución de bloqueo: 1:250 ($500\mu\text{l}$ de solución de bloqueo más $4\mu\text{l}$ de Ac CGRP) y 1:500 ($500\mu\text{l}$ de solución de bloqueo más $2\mu\text{l}$ de Ac). A cada portaobjetos con el tejido se puso $200\mu\text{l}$ de la dilución.
- Se incubó por 72h a 5°C en cámara húmeda con agitación constante.
- Se realizaron 3 lavados de 10min con PBS-T.

- Se incubo 1:30h con 200µl del segundo anticuerpo (Alexa Fluor 555 Donkey anti Mouse), diluido en PBS-T, 1:300, a 37°C en cámara húmeda con agitación constante (la muestra se forro con papel aluminio para proteger de la luz).
- Se realizaron 3 lavados de 10min con PBS-T.
- Se incubo por 10 min con IB4 (10µl de IB4 en 1200µl de PBS), se lavó con PBS-T y se volvió a incubar 10min con Dapi 1:500.
- Se realizó un lavado de 10min con PBS (protegiendo de la luz).
- Se colocó el cubreobjetos con Antifade Reagent para proteger la fluorescencia.

Nota: A las muestras control no se les agregó anticuerpo primario.

Se utilizaron algunas muestras para teñir con hematoxilina de Gill's (6min) y eosina (30seg).

Procesamiento histológico para Inclusión en parafina y tinción.

Para la realización de la práctica de histología en parafina y tinción, se utilizaron cerebros y nervio ciático de dos proyectos distintos. Por esta razón se describe el proceso que se les aplico a los ejemplares, los cuales no fueron propiamente para la técnica que realicé.

Muestras de tejido cerebral:

Se utilizaron 2 rata macho adulto de la cepa *Wistar* (N8 y N6), inducidos a un modelo de neuropatía periférica (Tabla 4.).

Fueron fijadas con solución de Karnovsky (FK) intracardialmente. Posteriormente se disecciono el cerebro:

- Se retiro la cabeza con guillotina.
- Se realizó una incisión a lo largo de la línea media, desde el cuello hasta la nariz, hasta exponer el cráneo.
- Cuidadosamente se fue pelando el cráneo, utilizando unas gubias
- Con una espátula se cortaron los bulbos olfatorios y las conexiones nerviosas en la zona más anterior del cerebro.
- Por último, se retiró el encéfalo y se colocó en posfijación en la misma solución por 24h para después conservarse en solución crioprotectora (sacarosa 30% en PB 0.1M pH7.4) hasta su uso.

Tabla 4. Ratas inducidas a un modelo de neuropatía periférica durante 7 días

Rata	Tratamiento
------	-------------

N8	Paclitaxel 4 inyecciones de 2mg/kg (Total) + Ceftriaxona 200mg/kg peso
N6	Paclitaxel 4 inyecciones de 2mg/kg (Total) + Ceftriaxona 400mg/kg peso

Muestras de nervio ciático:

Se utilizaron dos ratas macho adulto previamente fijado en paraformaldehído al 4%, sometida a un reto osmótico (tabla 5). El nervio fue retirado con la misma técnica descrita anteriormente y dejado en posfijación en la misma solución a 4°C por 24h. Por último, se pasó a solución crioprotectora hasta su uso (sacarosa 30% en PB 0.1M pH7.4)

Tabla 5. Consumo de agua y alimento por día (rata control y tratada con NaCl)

	Rata	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Agua (ml)	Control	50	55	42	46	42
	NaCl	55	55	1	1	53
Alimento (ml)	Control	36.2	29	22.3	22.6	20.9
	NaCl	23.7	15.4	3	1	0
Peso (g)	Control	287.1				298
	NaCl	311.8				262.8

Previo a la deshidratación, se almacenaron los nervios en formaldehído 10% a 4°C por 24h. El encéfalo y el nervio ciático se procesaron para su inclusión en parafina de la siguiente manera:

- Se lavó el tejido (encéfalo y nervio) en agua corriente durante 10min aproximadamente y se dejaron en 3 baños con agua destilada por 10min cada uno en agitación.
- Se deshidrato en alcoholes graduales de 70; 80; 96 y 100; realizando 2 baños en cada uno durante 30min.
- Se pasó a xilol realizando 2 baños durante 30min cada uno.
- Se dejo en una solución 1:1 xilol/parafina toda la noche a temperatura ambiente.
- Se embebió en parafina liquida a 60°C, realizando 2 baños por 60min posteriormente se vertió parafina liquida en moldes de plástico y se introdujo la muestra. Se dejo solidificar a temperatura ambiente durante 2 días.
- Se realizaron cortes coronales para el cerebro y longitudinal para el nervio con un grosor de 10 y 15µm, en un micrótopo rotatorio. Se obtuvieron cortes

consecutivos, montados en seriación en portaobjetos en un baño de flotación para tejidos con gelatina en polvo tipo B a una temperatura de 40°C.

Nota: Los tiempos en los procesos de deshidratación, aclaramiento e inclusión cambian según el tipo y tamaño de tejido que se desee. En este proceso se realizó un segundo procedimiento debido a que los cortes en el micrótopo eran deficientes, por lo que se volvió a embeber en parafina por 2 horas más el tejido.

El acomodo de los cortes en el portaobjetos es importante para la observación al microscopio, de igual manera los datos escritos en el.

Se preparo un tren de tinción con las soluciones a utilizar. Se modifiko según la técnica empleada.

Hematoxilina de Gill y Eosina (HG&E).

La tinción se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Se desparafinarón los cortes en xilol I y II, 5min cada uno.
- Se hidrataron los cortes en baños decrecientes de alcohol 100° I y II, 95° I y II, 70° I, por 3min cada uno.
- Agua corriente 5min.
- Agua destilada 2min.
- Se coloreó en Hematoxilina de Gill 5min.
- Lavado por 2min en agua destilada.
- Se diferenció, para eliminar el exceso de colorante, 5 veces en alcohol ácido.
- Lavado por 2min en agua corriente.
- Se viró al color azul, 3 veces en carbonato de litio al 1%.
- Lavado en agua corriente 5min.
- Lavado en agua destilada, 2min.
- Se coloreó en solución alcohólica de eosina (Luna, 1968), 30seg.
- Se deshidrato en baños crecientes de alcohol etílico, alcohol 70°, 95° I y II, 100° I, por 1min cada uno y 2min en alcohol absoluto II
- Se aclaró en xilol I por 1min y xilol II por 2min.
- Se monto utilizando ENTELLAN (medio de montaje rápido para microscopía a base de xilol) y se observó al microscopio.

Tinción de Nissl

- Xilol I y II por 5min cada uno.
- Alcohol 100° I y II y 96° I y II 5min cada uno.

- Lavado en agua destilada por 1min.
- Se coloreó en violeta de cresilo al 0.1% durante 40seg.
- Lavado en agua destilada por 2min.
- Se diferenció en alcohol de 96° durante 5min y se comprobó al microscopio
- Alcohol 96° 1min
- Alcohol 100° I y II por 3min cada uno
- Xilol I y II por 3min cada uno.
- Se monto y se observó al microscopio.

Tinción de tionina

- Se desparafinaron los cortes en Xilol I y II por 5min cada uno.
- Lavado en agua destilada por 3min.
- Se coloreó con tionina por 6min.
- 2 Lavados con agua destilada, 5min y 3min respectivamente.
- Se diferenció en alcohol 70% por 5min y después por 1min.
- 2 baños en Alcohol 95% por 1min cada uno.
- 2 baños en alcohol 100% 1min y 2min respectivamente
- Xilol I y II por 3min cada uno.
- Se monto y se observó al microscopio.

Exposición a contaminantes ambientales, los éteres bifenilos polibromados, durante el desarrollo en ratas *Wistar*.

Las actividades que desarrollé en este proyecto fueron en conjunto con el grupo de trabajo del DNF, poniendo en práctica todo lo anteriormente aprendido: Por lo anterior, este proyecto me permitió vincularme con diferentes grupos de investigadores con el fin de ampliar mi conocimiento científico, aprendiendo y aplicando diferentes técnicas de laboratorio que me ayudaran a la realización del proyecto de tesis de maestría.

- Se pusieron a aparear 8 ratas hembra (2 hembras y 1 macho por caja), con un peso correspondiente entre 200-260g, previamente corroboradas en periodo de estro mediante un frotis vaginal.

Frotis vaginal

- Se sujetó a la rata en posición ventrodorsal para exponer el orificio vaginal, se colocó la punta de una pipeta Pasteur de plástico con 1ml de agua bidestilada en la abertura del canal vaginal; se vació su contenido y se aspiró espontáneamente para obtener una cantidad suficiente de células epiteliales. Se colocó una gota en un portaobjetos de vidrio y se dejó secar en el horno durante 1h a 30°C. Una vez secos, se tiñeron los frotis con Tionina al 0.5% por un minuto. Se dejó secar hasta su observación en el microscopio óptico. Para la evaluación citológica de los frotis vaginales se consultaron esquemas del ciclo estral de la rata para determinar en qué fase del ciclo se encontraban (McLean *et al.*, 2012).

Exposición

- Expusimos vía oral a las ratas gestantes a la mezcla comercial de PBDE (DE-79) disuelto en aceite de maíz (Vehículo) o sólo vehículo (grupo control). Del día 6 gestacional al 21 posnatal con la dosis de 0 (control) 1.7 y 10.2 en frituras de maíz.
- Los animales experimentales madres y crías, se cuidaron y mantuvieron en condiciones controladas de bioterio hasta su sacrificio.

Obtención de muestras

Para obtener las muestras biológicas (tejido cerebral) se realizó la técnica de perfusión intracardiaca con solución fijadora de paraformaldehído (PF) al 4%. Una vez fijado el animal, se extrajo el cerebro y se dejó en posfijación por inmersión durante 4h en la misma solución fijadora.

Los cerebros se almacenaron en solución crioprotectora de sacarosa al 30% a 4°C hasta su corte.

Histoquímica NADPH-d

Se realizaron cortes coronales de 30µm de cerebro de las ratas R6, R4, control y virgen en el área de interés (núcleo supraóptico y paraventricular hipotalámicos). Los cortes se recuperaron y se colocaron en flotación con PBS 0.1M, pH7.4. Se empleó la técnica histoquímica de la NADPH-d de la siguiente forma:

- Se realizó un lavado con PB 0.1M, pH7.4, 0.3% Tritón X-100, por 5min, hasta ver permeado el tejido.

- Después de desechar la solución de lavado, se incubó con 10ml de una solución de PB 0.1M, 0.3% Tritón X-100 por 1h a 37°C con agitación constante y tapados para evitar el contacto directo con la luz. La solución contenía:
 - 1 mg/ml de β -NADPH
 - 2 mg/10ml de azul de nitroetrazolio (NBT)
- Posterior a la incubación, se realizaron 2 lavados con solución de PB 0.1M, 0.3% Tritón X-100
- Se montaron los cortes en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar.

Se deshidrataron los cortes de la siguiente forma:

- Se rehidrataron los cortes aplicando un baño de 5min con agua destilada
- Se deshidrataron en baños crecientes de alcohol etílico por 10min, 70%, 80%, 95% y 100%.
- Por último, se deshidratan en xilol y se montan en medio de montaje Entellan.

Vinculo de las actividades desarrolladas con los objetivos de formación

Las actividades desarrolladas en mi servicio social retroalimentan los fundamentos teórico-práctico que adquirí en la licenciatura en Biología y refuerzan la formación autodidacta, lo que me permitió cumplir y comprender diferentes temas de interés. En este sentido fue importante conocer la historia de vida de la Rata *Wistar* para identificar las fases del ciclo de reproducción, las condiciones que afectan su dinámica, las biotecnias para su manejo y las técnicas de anestesia y eutanasia más adecuadas. Comprender y realizar las técnicas inmunológicas, la formación del complejo antígeno-anticuerpo para el estudio de las técnicas de inmunohistoquímica y el desarrollo de la respuesta inmunitaria, dilucidar mediante la observación, exanimación y análisis de componentes morfológicos y ejercer las buenas prácticas de laboratorio.

Como manejador de recursos naturales, me ha permitido conocer, comprender y asimilar con actitud analítica y propositiva el problema central que se investiga en el laboratorio de cómo afecta a la salud los contaminantes ambientales persistentes desde una perspectiva multidisciplinaria para la resolución de problemas biológicos, ya sean conceptuales o prácticos y desarrollarme profesionalmente en el ámbito real de las neurociencias, con rigor científico, sentido ético y de compromiso hacia la comunidad, cumpliendo los objetivos que estipula la licenciatura en biología de la Universidad Autónoma Metropolitana.

RESULTADOS

Se muestran algunos resultados que logramos obtener de las técnicas aplicadas durante mi servicio social en el DNF. Uno de los animales de experimentación que se utilizan en el laboratorio son las ratas *Wistar*, las cuales se emplean en diferentes protocolos de investigación mencionados a continuación.

Procesamiento de tejido para la técnica de Western Blot.

En el análisis de transferencia Western se obtuvo la expresión del receptor de la proteína PACAP (PAC1) en el núcleo supraorbital (SON) del cerebro de rata (fig. 5).

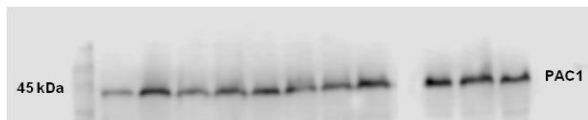


Figura 5. Ejemplo de Inmunotransferencia de PAC1 en el SON del cerebro de rata control.

Procesamiento de tejido para la técnica de inmunolocalización.

Esta técnica se empleó para visualizar la presencia de la molécula CGRP encontrada en terminales nerviosas dolorosas con el uso de anticuerpos específicos (primario y secundario) en los cortes de cojinete de pata en rata. Los fluorocromos Alexa 555 (emite en rojo) IB4 (emite en verde) y Dapi (emite en azul) nos permitieron observar la localización de fibras en la zona de interés (fig. 6), la observación de las preparaciones las realice en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51).

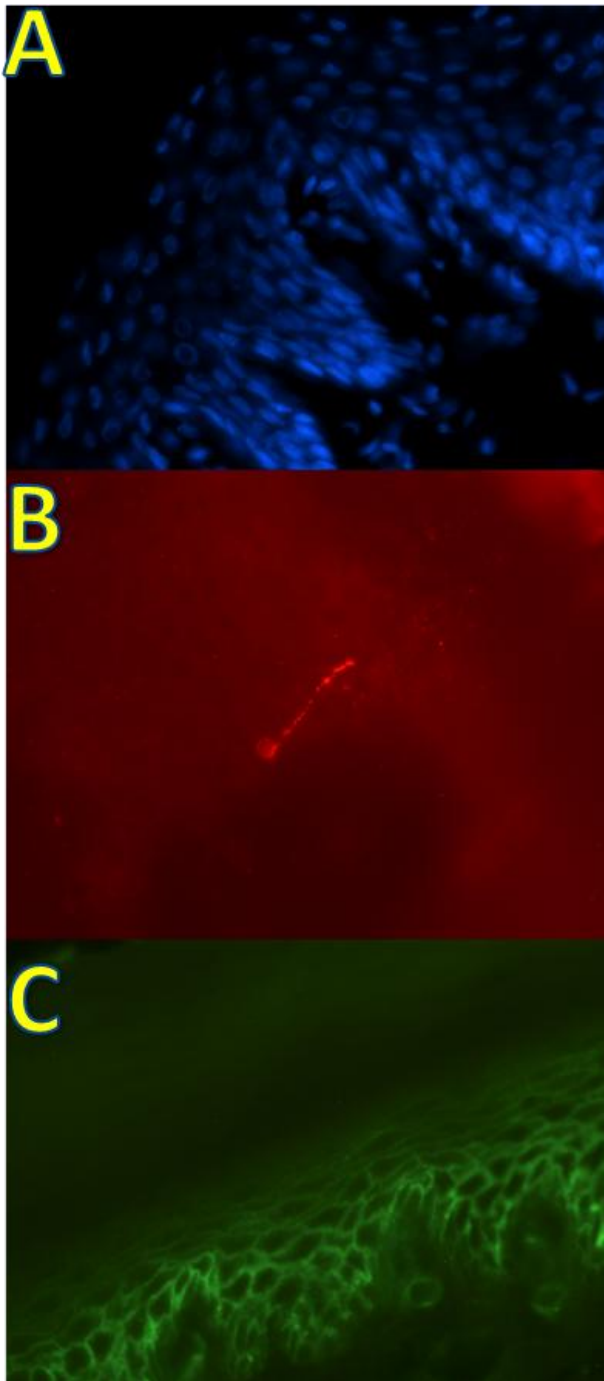


Figura 6. Panel de imágenes con diferentes flurocromos. Inmunofluorescencia de Dapi (**A**), molecula CGRP en terminales nerviosas peptidérgicas con Alexa 555 (**B**) e IB4 (**C**). Cortes coronales (20 μ m) de cojinete de pata de rata.

Tinción con EG y E

Se muestra la tincion con hematoxilina de Gill y eosina del cojinete de la pata izquierda de la rata *Wistar*, en la cual se puede apreciar el citoplasma teñido de diferentes tonos de rosa y diferentes componentes tisulares, asi como nucleos de tono azul (fig. 7).

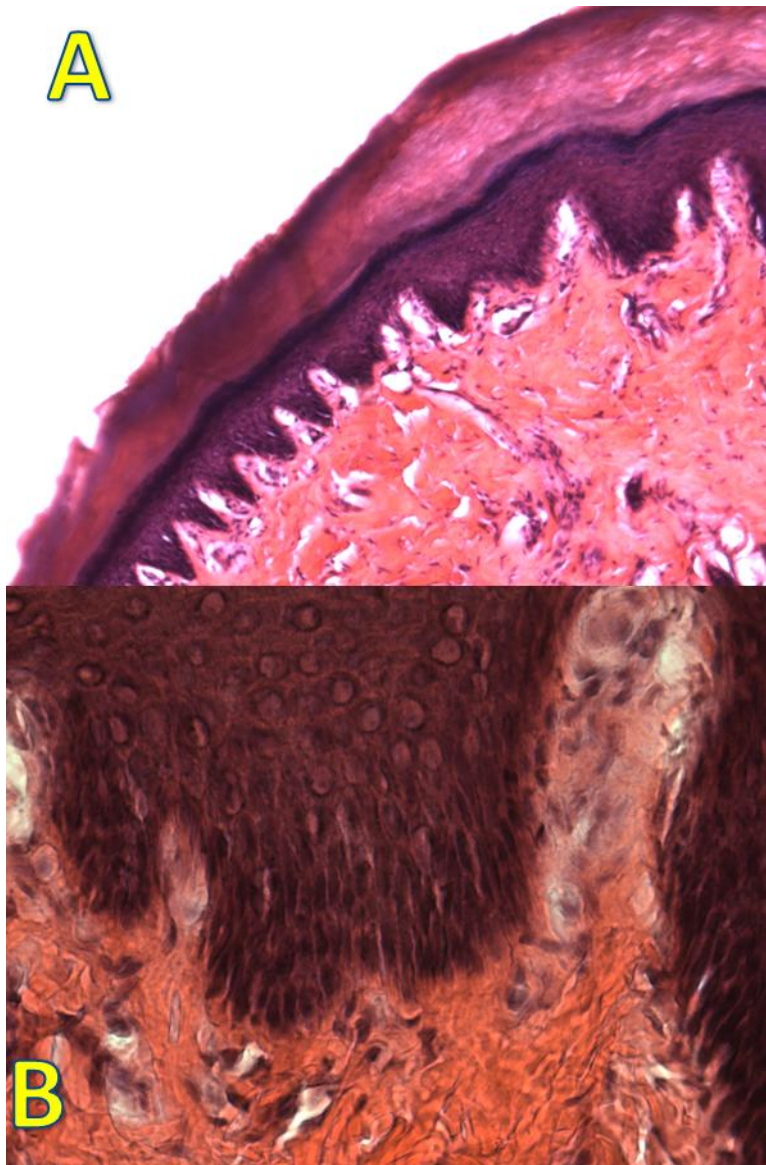


Figura 7. Cojinete de la pata izquierda de rata teñido con HG & E.

Procesamiento histológico para Inclusión en parafina y tinción.

Comprendí que todo el proceso histológico es variable dependiendo del tipo de tejido, temperatura ambiental etc. Con variaciones en los tiempos de los diferentes baños, estos cambios se establecen en pruebas previas al protocolo establecido. Muchos factores contribuyen a causar variaciones en la técnica, por ejemplo, el fijador utilizado, el tiempo de exposición de fijación, tamaño de la muestra, la fecha en la que se hizo la solución de tinción, el medio de inclusión, entre otros. Por esta razón realice varios ensayos de inclusión en parafina.

Se muestran las imágenes de tejido cerebral y nervio ciático observadas en un microscopio OLYMPUS BX51 y capturadas con una cámara Evolution MP, además de diferentes estructuras tisulares que logramos identificar (fig. 8).

Con la tinción de hematoxilina de Gill y eosina obtuvimos un resultado de color azul para el núcleo de la célula y varios tonos de rosa para el citoplasma (fig. 9)., La tinción tiñó los núcleos de la célula en un azul intenso, el nucléolo en un azul más bajo y el tejido muscular en azul claro (fig. 10)., El violeta de cresilo (tinción de Nissl) tiñó estructuras como los gránulos de Nissl de color púrpura y los núcleos rosa-violeta (fig. 11)., El nervio ciático se tiñó con EG&E y tinción (fig. 12).

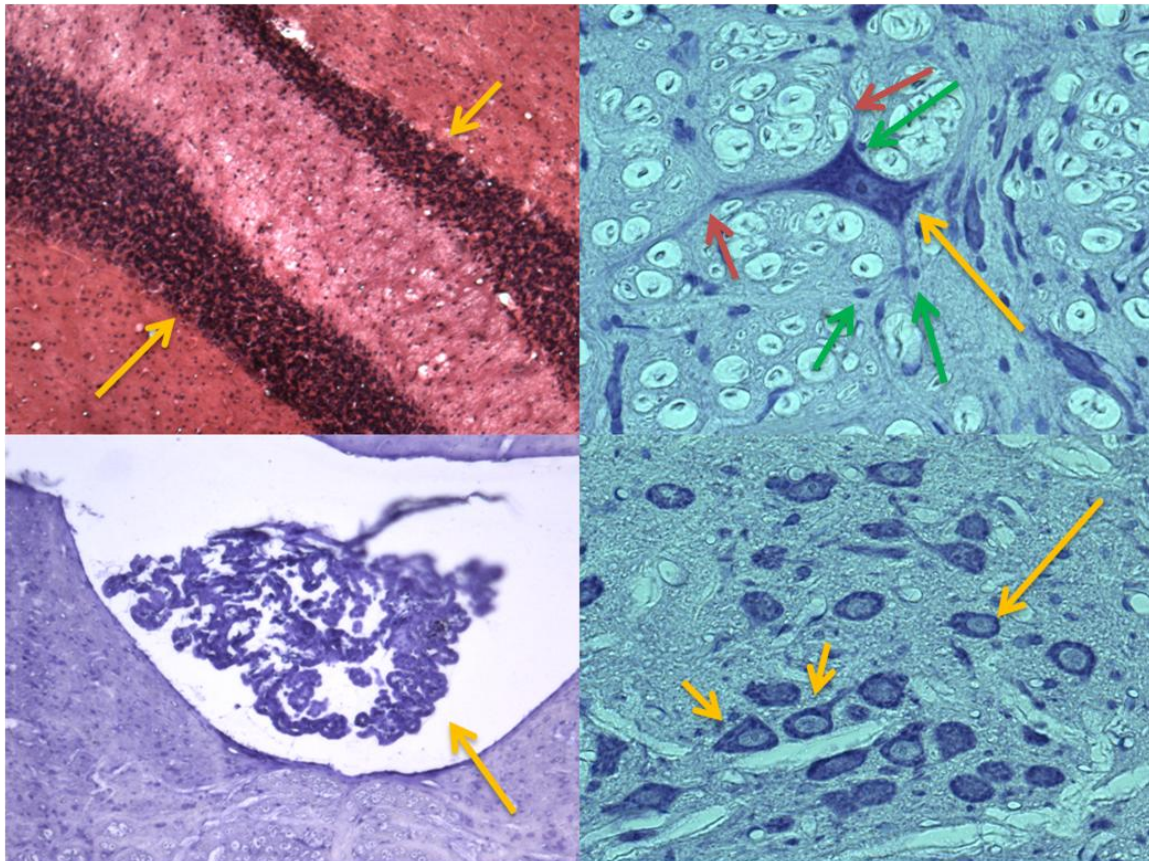


Figura 8. Morfología tisular del sistema nervioso central de la rata *Wistar*. En la imagen superior izquierda, se indica la capa granulosa del hipocampo cerebral (muy basofila y celular). Tinción de HG&E. En la imagen superior derecha se indica con flecha color amarilla una neurona teñidos con violeta de cresilo, las flechas rojas indican los axones y las verdes células gliales. En la imagen Inferior izquierda se muestran los plexos coroideos del ventrículo cerebral teñidos con violeta de cresilo (Nissl) y en la imagen inferior derecha se muestra un conjunto de neuronas en donde se observan los gránulos de Nissl.

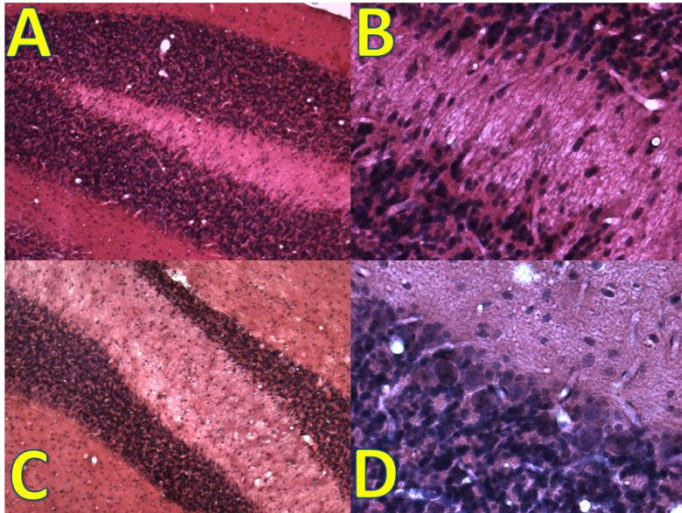


Figura 9. Corte de cerebro de rata incluido en parafina y teñido con HG&E. A) y B) rata tratada N8, 10x y 40x; C) y D) rata tratada N6 a 10x y 40x respectivamente.

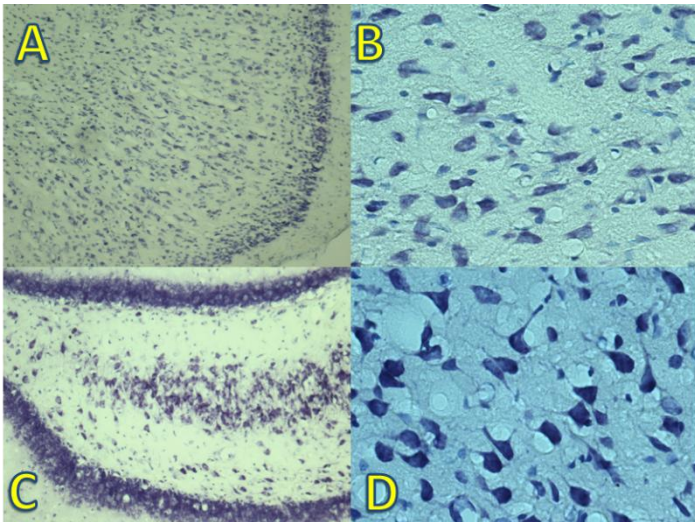


Figura 10. Corte de cerebro de rata incluido en parafina y teñido con Tionina. A) y B) rata tratada N8 a 10x y 40x. C) y D) rata tratada N6 a 10x y 40x respectivamente.

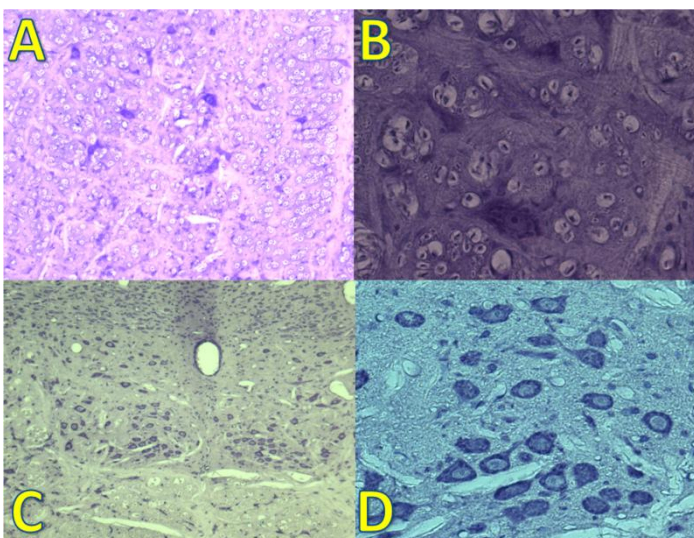


Figura 11. Corte de cerebro de rata incluido en parafina y teñido con Violeta de Cresilo. A) y B) rata tratada N8 a 10x y 40x. C) y D) rata tratada N6 a 10x y 40x respectivamente.

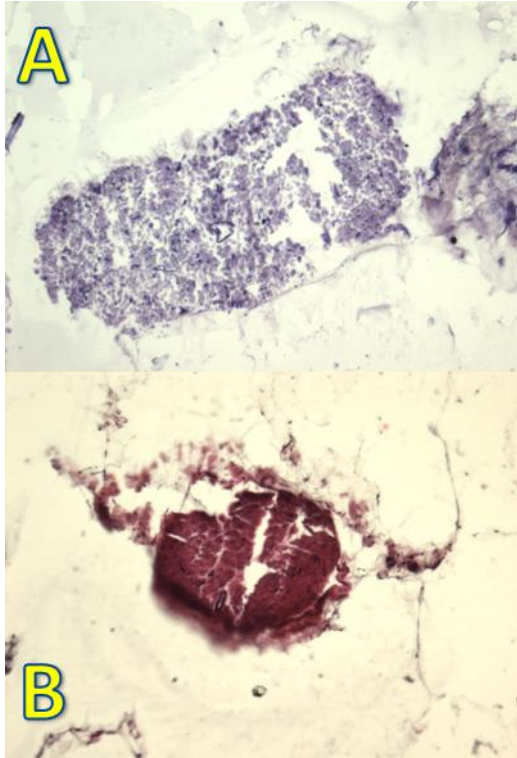


Figura 12. Corte de nervio ciático incluido en parafina. Cortes A corresponde a rata hiperosmótica, teñida con violeta de cresilo 10x y B a rata normosmóticas teñida con HG&E 10x.

Exposición a contaminantes ambientales, los éteres bifenilos polibromados, durante el desarrollo en ratas *Wistar*.

Previo a la fase de apareamiento, se comprobó que las hembras estuvieran en fase de estro, o celo (por frotis vaginal). Se observaron el estadio de proestro y estro así como cristales de ácido úrico (fig. 13). Se verifico el estado de preñez con la diferencia del peso antes y después del apareamiento, donde se esperó un aumento del peso corporal de la rata de más de 9g.

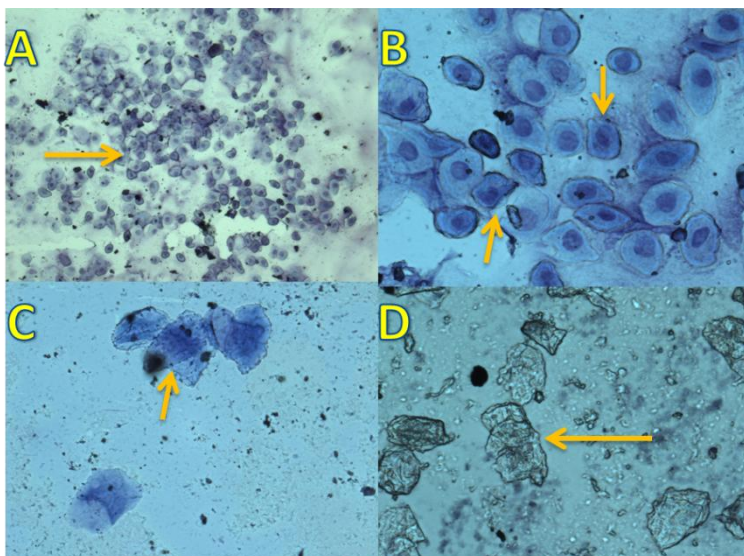


Figura 13. Frotis vaginal de ratas Wistar a diferentes estadios del ciclo estral. **A y B.** **Proestro:** células epiteliales nucleadas. **C.** **Estro:** células epiteliales cornificadas escamosas. **D. Cristales.** Presencia de

Técnica inmunoenzimática de la NADPH-d

En esta técnica detectamos la actividad de la NADPH-d en el tejido cerebral. Es una manera indirecta de evidenciar a las neuronas productoras de óxido nítrico, de esta manera las neuronas se tiñen de color azul (fig. 14).

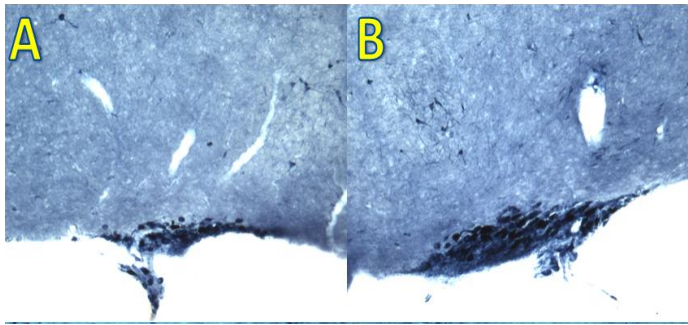


Figura 14. Histoquímica enzimática para la NADPH-d. Se muestran las neuronas productoras de óxido nítrico (azul) localizadas en el SON (A y B) del cerebro de rata a 10X.

Conclusión

Con base a los resultados obtenidos durante mi servicio social en el DNF he logrado el cumplimiento de los objetivos establecidos y vincularme a diferentes metodologías de investigación que responden a las demandas del proyecto central de cómo afectan a la salud los contaminantes ambientales persistentes y los mecanismos implicados en este proceso, específicamente los éteres bifenilos polibromados (PBDE) usados como retardantes de flama en muchos productos de consumo humano. De esta manera he reforzado mi formación académica como biólogo de la UAM y me ha ayudado a fortalecer mis debilidades. Por lo anterior se me brindó la oportunidad de plantear un proyecto de investigación de posgrado para continuar con mi formación multidisciplinaria y seguir ampliando el conocimiento científico, mismo que continúo trabajando.

REFERENCIAS.

- Abdalla, M. A., y Harrad, S. (2014). Éteres de difenilo polibromados en la leche humana del Reino Unido: implicaciones para la exposición infantil y relación con la exposición externa. *Reinar. Int*, 63, 130–136. Doi: 10.1016/j.envint.2013.11.009.
- Alvarez-Gonzalez, M. Y., Sánchez-Islas, E., Mucio-Ramirez, S., de Gortari, P., Amaya, M. I., Kodavanti, P. R. S., y León-Olea, M. (2020). Perinatal exposure

- to octabromodiphenyl ether mixture, DE-79, alters the vasopressinergic system in adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 114914. Doi: 10.1016/j.taap.2020.114914.
- Aoki, V., Sousa Jr, J. X., Fukumori, L. M. I., Périgo, A. M., Freitas, E. L., Oliveira, Z. N. P. (2010). Inmunofluorescencia directa e indirecta. *Anais Brasileiros de Dermatología*, 85(4), 490-500. Doi: 10.1590/s0365-05962010000400010.
- ATSDR. Agencia para sustancias tóxicas y registro de enfermedades. (2017). Perfil toxicológico para bifenilos polibromados y difeniléteres polibromados. *Departamento de EE. UU. Sanar. Tararear. Serv*, 1-599. (Consultado el 26 de octubre de 2022). Recuperado de: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp207.pdf>
- Checa, A., (2017). *Muestra biológica*. Conogasi. Recuperado de: <https://conogasi.org/diccionario/muestra-biologica/#:~:text=Las%20muestras%20biol%C3%B3gicas%20son%20una,%C3%ADtreo%2C%20%C3%ADquido%20cefalorraqu%C3%ADdeo%2C%20etc.>
- Costa, L. G., y Giordano, G. (2007). Neurotoxicidad del desarrollo de los retardantes de llama de polibromodifenil éter (PBDE). *NeuroToxicología*, 28(6), 1047–1067. Doi: 10.1016/j.neuro.2007.08.007
- Bolant, B., Calvo, M.A., Cejalvo, D., Gimeno, L.O., Gimeno, L., y Lloris, J.M. (1990). La Eutanasia en los Animales de Laboratorio. *Research In Surgery*, suplemento 5. 45-56. Recuperado de: <http://www.oc.lm.ehu.es/fundamentos/doctorado/cursos/cirexp/019.pdf>
- Bota i Arqué, A., (2004). El reto de la muestra biológica en los estudios farmacogenéticos. *Acta Bioeth*, 10(2), 201-212. Doi: <http://dx.Doi.org/10.4067/S1726-569X2004000200008>
- Cardozo de Martínez, C.A., Mrad de Osorio, A., Martínez, C., Rodríguez-Yunta, E., y Lolas-Stepke, F. (2007). *El animal como sujeto experimental Aspectos técnicos y éticos*. Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo Universidad de Chile. Centro Interdisciplinario de Estudios en Bioética (CIEB)
- Comité institucional para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL). (2017). *Manual de organización y funcionamiento*. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.

- Cowell, W. J., Sjödin, A., Jones, R., Wang, Y., Wang, S., y Herbstman, J. B. (2018). Determinantes de la exposición prenatal a los éteres de difenilo polibromados (PBDE) entre los bebés pertenecientes a minorías urbanas nacidos entre 1998 y 2006. *Reinar. Contaminación* 233, 774–781. Doi: 10.1016/j.envpol.2017.10.068.
- De Dios-Soler, M., y Acosta-Haab, G. (2018). *Guía de Inmunohistoquímica para Técnicos*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Instituto Nacional del Cáncer.
- De la Fuente-Gonzalez, A., Rodriguez-Lozano, J., y Fonseca, E. (2007) Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western blot). *Piel*, 22(5), 252-258. Doi: 10.1016/S0213-9251(07)73064-2
- De Wit, C. A. (2002). Una descripción general de los retardantes de llama bromados en el medio ambiente. *Quimiosfera*, 46(5), 583-624. Doi: 10.1016/S0045-6535(01)00225-9
- Díez-Guerra, F.J. (2004). Técnicas de microscopía óptica. *Arbor*, 698, 225-258.
- Eltoum, I., Fredenburgh, J., Myers, R.B., y Grizzle, W.E. (2001). Introducción a la teoría y práctica de la fijación de tejidos. *Journal of Histotechnology*, 24(3), 173-190. Doi: <http://dx.Doi.org/10.1179/his.2001.24.3.173>
- EPA de EE. UU. Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. (2010). *Una evaluación de exposición de éteres de difenilo polibromados (PBDE) (Final)*. En: Agencia de Protección Ambiental de EE. UU., Washington, DC, EPA/600/R-08/086F.
- Eskenazi, B., Chevrier, J., Rauch, S. A., Kogut, K., Harley, K. G., Johnson, C., Trujillo, C., Sjödin, A., y Bradman, A. (2013). Exposición intrauterina e infantil a polibromodifenil éter (PBDE) y neurodesarrollo en el estudio CHAMACOS. *Reinar. Perspectiva de salud*, 121(2), 257–262. Doi: 10.1289/ehp.1205597.
- Fundora, H. H., Puig, P. Y., Chiroles, R. S., Rodríguez-Bertheau, A. M., Gallardo-Díaz, J., y Milán-Samper, Y. (2013). Métodos inmunológicos utilizados en la identificación rápida de bacterias y protozoarios en aguas. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* 51(1), 84-96.
- Gallego, A. (1914). Técnica Histológica. El formol agente transformador y fijador de las coloraciones por las fuchinas básicas.- Nuevo método de tinción utilizable en histología y en Anatomía patológica. *Revista de higiene y sanidad veterinaria*, 3.

- Herrera-Batista, A.J., Ruiz-Candina, H.J., Borroto-Leiseca, A., y Puldón-Segui, G. (2020). Historia de la histología en el ICBP Victoria de Girón. Revisión bibliográfica. *Invest Medicoquir*, 12(3), 1-21.
- INECC. (2009). Manual de procedimientos estándares para el análisis histológico e histopatológico en organismos acuáticos. México, 22p.
- Jensen, E. C. (2012). The Basics of Western Blotting. *The Anatomical Record*, 295, 369-371
- Johnson-Restrepo, B., y Kannan, K. (2009). Una evaluación de las fuentes y vías de exposición humana a los éteres de difenilo polibromados en los Estados Unidos. *Chemosphere*, 76(4), 542-548. Doi: 10.1016/j.quimiosfera.2009.02.068.
- Kurien, B. T., y Scofield, R. H. Western Blotting: An Introduction. *Author manuscript*, 1312, 17-30. Doi: 10.1007/978-1-4939-2694-7_5.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- León-Olea, M., Martyniuk, C. J., Orlando, E. F., Ottinger, M. A., Rosenfeld, C., Wolstenholme, J., y Trudeau, V. L. (2014). Conceptos actuales en disrupción neuroendocrina. *Compensación general Endocrinol* 203, 158–173. Doi: 10.1016/j.ygcen.2014.02.005.
- Ley de Protección a los Animales de la Ciudad de México. (2002). Gaceta Oficial del Distrito Federal. https://paot.org.mx/centro/leyes/df/pdf/2021/LEY_PROTEC_ANIMALES_27_05_2021.pdf
- Li, T., Wang, W., Pan, Y-W., Xu, L., y Xia, Z. (2013). A Hydroxylated Metabolite of Flame-Retardant PBDE-47 Decreases the Survival, Proliferation, and Neuronal Differentiation of Primary Cultured Adult Neural Stem Cells and Interferes with Signaling of ERK5 MAP Kinase and Neurotrophin 3. *Toxicological Sci*, 134(1), 111-124. Doi: 10.1093/toxsci/kft083
- López-Macay, A., Fernández-Torres, J., y Zepeda, A. (2016). Principios y aplicaciones de la microscopia láser confocal en la investigación biomédica. Artículo de revisión. *Investigación en discapacidad*, 5(3), 156-164.
- Luna, L.G. 1968. *Manual de Métodos de Tinción Histológica del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas*. (3rd ed.). New York. McGraw-Hill.

- McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S., y Bennett, S. A. L. (2012). Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. *J. Vis. Exp*, (67), e4389. Doi: 10.3791/4389
- Megías, M., Molist, P., Pombal, M.A. (2022). *Atlas de histología vegetal y animal. Técnicas histológicas*. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. Recuperado de: <file:///C:/Users/INP/Downloads/xdoc.mx-inclusion-atlas-de-histologia-vegetal-y-animal.pdf>
- Milton-Laskibar, I. (2015). *Manejo de la técnica Western Blot. Determinaciones relacionadas con obesidad y diabetes*. (Trabajo final de Master). Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10810/15183>
- Mondragón-Barrios, L. 2021. Reglas Internas de funcionamiento del Comité de Ética en Investigación. *Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM)*, México. 32.
- Montalvo, C.E., (2010). *Técnica histológica*. Recuperado de: https://bct.facmed.unam.mx/wp-content/uploads/2018/08/3_tecnica_histologica.pdf
- Montalvo, C.E., (2010). *Microscopía*.
- Monteleone, M., (2017) *Fluorescencia*. Recuperado de: <http://www.iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2017/BioCel/1504634347.pdf>
- Montuenga, L., Esteban-Ruiz, F.J., y Calvo, A. (2014). *Técnicas en histología y biología celular (2)*. Barcelona, España: Elsevier Masson.
- Morton, D.B., Jennings, M., Buckwell, A., Ewbank, R., Godfrey, C., Holgate, B., Inglis, I., James, R., Page, C., Sharman, I., Verschoyle, R., Westall, L., y Wilson, A.B. (2001). Refinando los procedimientos para la administración de sustancias. *Laboratory animals*, 35(1), 1-41. Doi: 10.1258/0023677011911345
- Mourelle, A.C., Herrero, E., y Ricca, M. (2013). Recomendaciones para manipulación y sujeción de ratas y ratones de laboratorio. *Spei Domus*, 9(19), 39-47.
- Mucio-Ramírez, S., Miller-Pérez, C., Curras-Collazo, M., y León-Olea, Martha. (2004). El polopéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP): actualización de conocimientos. *Salud Mental*, 27(2), 55-69. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=58222707>

- Norma Oficial Mexicana NOM-062-Z00-199, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario oficial de la federación. 1999.
- OMS. Organización Mundial de la Salud. (1994). *Programa Internacional de Seguridad Química. Criterios de Salud Ambiental 162: Éteres de difenilo bromados*. (Consultado el 17 de septiembre de 2022). Recuperado de: <https://inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc162.htm>
- Parra-Medina, R., y Fernando-Polo, J. (2017). Inmunofluorescencia en tejidos fijados y preservados en parafina (IF-P). Una mirada desde la patología quirúrgica. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 26(4), 202-207. Doi: 10.1016/j.reper.2017.08.009
- Paxinos, G., y Watson, C. (2007). *The Rat Brain in stereotaxic coordinates (6th ed.)*. Oxford, Reino Unido: Elsevier.
- Pedrosa-Raya, J. Á., Hernández-Cobo, R., Siles, R. E., Martínez-Lara, E., Blanco-Ruíz, S., Del Moral-Leal, M. L., Rus, M. A., Molina-Ortega, F. J., y Peinado, H. M. (2019). Localización y análisis de moléculas o estructuras celulares mediante distintos tipos de microscopía. En Peregón-Sánchez, J., y Peinado-Herreros, M. Á. (Ed.). *Biología Molecular y Celular. Volumen 1, Técnicas y fundamentos*. Universidad de Jaén: Uja.
- Pérez-Willard, F. (2016). High Throughput Imaging with. Zeiss Crossbeam 550. *Technology Note*, 1-5. Recuperado de: file:///C:/Users/INP/Downloads/EN_wp_Crossbeam_high-throughput-imaging.pdf
- Rojas-Morales, M., y Torres-Gomez, D.A. (2016). *Evaluación para la obtención de resina epoxica a partir de aceite de ricino a nivel de laboratorio*. (Proyecto integral de grado para optar al título de ingeniero químico, Fundación Universidad de América Facultad de Ingenierías. Programa de ingeniería química, Bogotá D.C.). Recuperado de: <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/616/1/6102561-2016-2-IQ.pdf>
- Romero de Pérez, G. (2003). *Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) Área Biomédica: Teoría y Práctica (12)*. Academia Colombiana de ciencias exactas, física y naturales. Colección Julio Carrizosa Valenzuela, Bogota, D.C., Colombia: GUADALUPE LTDA.

- Samaniego, R. (2009). Hablemos de... Aplicaciones de la microscopía confocal. *GH Continuada*, 8(2), 115-119.
- Torras-Rabasa, A. (1976). *Contribución de la Inmunofluorescencia al estudio de las nefropatías glomerulares* (Doctor en medicina). Recuperado de: https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2317/01.ATR_1de8.pdf?sequence=16.txt
- Vargas-Miranda, B., Ambriz-García, D., Navarro-Maldonado, M., Trejo-Córdova, A., Rodríguez-Esquivel, G., y González-Vieira, M. (2018). *Manejo de animales del laboratorio de la UAM-I*. Universidad Autónoma Metropolitana. Disponible en: <http://publicacionescbs.izt.uam.mx/DOCS/BIOTERIO.pdf>
- Verdín-Terán, S.L., Moreno-Fierros, L., Rojo-Botello, N.R., García-Hernández, A.L., Omaña-Molina, M., Meneses-Aguirre, A., y Nieto-Yáñez, Ó. de J. (2013). *Histología e Inmunohistoquímica. Manual de Métodos*. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
- Viberg, H., Johansson, N., Fredriksson, A., Eriksson, J., Marsh, G., y Eriksson, P. (2006). La exposición neonatal a éteres de difenilo más bromados, hepta, octa o no abromodifenil éter, perjudica el comportamiento espontáneo y las funciones de aprendizaje y memoria de los adultos ratones. *Toxicol. Sci*, 92(1), 211–218. Doi: 10.1093/toxsci/kfj196.
- Watanabe, I., y Sakai, S. (2003). Liberación ambiental y comportamiento de los retardantes de llama bromados. *Reinar. Int*, 29(6), 665-682. Doi: 10.1016/S0160-4120(03)00123-5.
- Wolfensohn, S., y Lloyd, M. (2003). *Manual de manejo y bienestar de los animales de laboratorio*. (3rd ed.). Oxford, Reino Unido. Blackwell Publishing.