

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS  
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PROTOCOLO PARA EL REGISTRO DEL SERVICIO SOCIAL  
POR ACTIVIDADES RELACIONADAS CON LA PROFESIÓN

## Título

APOYO EN EL DESARROLLO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN A  
PARTIR DE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

QUE PRESENTA EL ALUMNO ó A

**Alma Flor Vera Diego**

Matrícula  
21839069803

### ASESORES

Dr Lino Mayorga Reyes  
Profesor titular C. Departamento de Sistemas Biológicos.  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM Xochimilco.

Dra. María de Jesús Chávez Canales  
Instituto de investigaciones biomédicas (INC-UNAM).  
Laboratorio de Fisiología Experimental.



Ciudad de México

29 de agosto de 2024

# APOYO EN EL DESARROLLO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN A PARTIR DE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

## I. INTRODUCCIÓN

El servicio social se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" ubicado en Juan Badiano 1, Belisario Domínguez Sección 16, Tlalpan, 14080 Ciudad de México, CDMX, dentro del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en el Laboratorio de Fisiología Experimental.

El Instituto de Investigaciones Biomédicas es una dependencia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) que pertenece al Subsistema de la Investigación Científica. Su misión es el estudio de fenómenos biológicos y biomédicos en los niveles molecular, bioquímico, celular, organísmico y poblacional, para contribuir con este conocimiento al desarrollo científico y a la enseñanza y difusión de la ciencia en nuestro país con miras a un desarrollo mundial saludable. La visión del Instituto es ser líder en la generación de conocimiento en el área de su competencia en la UNAM y en México; debe constituir un estrecho vínculo entre la investigación científica de alta calidad y la atención a la salud en los Institutos Nacionales y la industria del país, al igual que debe jugar un papel fundamental en la formación de nuevos investigadores de primer nivel en el área biomédica. Sus objetivos son investigar en el nivel básico a los protagonistas moleculares, celulares y poblacionales de la biología, así como proyectar sus conocimientos y tecnologías al mejor entendimiento y solución de las enfermedades humanas; participar activamente en la docencia y formación de recursos humanos en las áreas de las ciencias que le competen; participar activamente en la llamada investigación traslacional; difundir y divulgar nacional e internacionalmente los conocimientos que genera para contribuir al desarrollo de la biología y la medicina; así como colaborar y establecer vínculos con otras entidades universitarias y extrauniversitarias en programas de investigación, docencia, difusión y desarrollo tecnológico.

En el Laboratorio de Fisiología Experimental se llevan a cabo técnicas de biología molecular como PCR, Inmunofluorescencia y Western Blot, como parte del servicio social se utilizaron las dos primeras técnicas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio que permite la producción (amplificación) rápida de millones a miles de millones de un segmento específico de DNA, lo que nos permite estudiar la molécula del DNA en mayor detalle en el laboratorio (National Human Genome Research Institute, 2020). Esta técnica genética que se realiza in vitro, utiliza una DNA polimerasa (enzima que las células utilizan para replicar su DNA). La amplificación de la secuencia diana se logra mediante una serie repetitiva de ciclos que implican tres pasos:

1. Desnaturalización de la plantilla molde mediante calor.
2. Alineamiento de los cebadores (primers) oligonucleótidos con secuencias diana monocatenarias.
3. Extensión de los primers mediante la DNA polimerasa termoestable.

(Ehtisham et al., 2016).

La electroforesis en gel va de la mano con la PCR, la cual es una técnica de laboratorio sencilla y rápida que se usa para separar moléculas de DNA, RNA o proteínas en función de su tamaño y carga eléctrica. Se usa una corriente eléctrica para mover las moléculas a través de los poros de un gel que actúan como un tamiz, lo cual permite que las moléculas más pequeñas se muevan más rápido que las más grandes. La electroforesis mediante geles de agarosa se utiliza para separar, analizar, identificar y purificar fragmentos de DNA. La ubicación de las bandas de DNA dentro del gel se puede determinar mediante tinción con bajas concentraciones de colorantes intercalantes fluorescentes, como bromuro de etidio (Green & Sambrook, 2019).

Por su parte, la Inmunofluorescencia (IF) es una técnica de gran utilidad para la detección y localización de proteínas de interés y antígenos celulares mediante el uso de anticuerpos marcados con fluorocromos (Abyntek Biopharma, 2017). Existen dos tipos de Inmunofluorescencia, la directa e indirecta, esta última es la que más se utilizó en el laboratorio. La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es una técnica para detectar la presencia de anticuerpos en una muestra que se unen a los anticuerpos fluorescentes, lo que permite su detección visual (Recalde-Reyes & Calderon, 2023).

Para optimizar los experimentos de Inmunofluorescencia es importante considerar los siguientes pasos que son fundamentales para el acceso de los anticuerpos:

1. Fijación para preservar al máximo la morfología celular respecto a su estado nativo utilizando aldehídos o solventes orgánicos.
2. Permeabilización en caso de utilizar aldehídos como agente de fijación.
3. Buffer isotónico para no alterar la estructura celular y mantener el pH en niveles cercanos al fisiológico.
4. Bloqueo para evitar uniones no específicas de los anticuerpos (ejemplo suero bovino fetal).
5. Anticuerpos altamente específicos frente a la proteína de interés.
6. Fluorocromos que mejor se ajusten a los experimentos.

(Abyntek Biopharma, 2017).

Por lo tanto, el objetivo principal de llevar a cabo el servicio social en esta institución fue desarrollar habilidades para el uso y manejo de técnicas de biología molecular, esto a partir de la preparación de soluciones, del conocimiento teórico de las técnicas (PCR, Electroforesis e Inmunofluorescencia) para comprender y analizar los resultados obtenidos de los experimentos realizados, así como el manejo adecuado de los animales de experimentación (ratones) tanto en el bioterio como en el laboratorio.

## **II. ACTIVIDADES REALIZADAS**

Durante este período de servicio social (6 meses o lo equivalente a 480 h) aprendí la preparación de distintas soluciones, la técnica de PCR para genotipar ciertos ratones transgénicos a partir del lisado de DNA, la preparación del MasterMix del gen de interés y finalmente la electroforesis en gel de agarosa para DNA. Asimismo, aprendí la técnica de Inmunofluorescencia, la selección de cortes de cerebro de ratón, la preparación de laminillas cargadas para la técnica y el uso del microscopio de epifluorescencia.

A continuación, se describen de manera específica los protocolos de las actividades desarrolladas en el Laboratorio de Fisiología Experimental.

### **1. Técnica de pipeteo**

La técnica se realizó durante todas las semanas para los experimentos que lo requerían, esto a partir del pipeteo directo como se describe a continuación:

- A. Verificar el volumen de la micropipeta a utilizar y ajustar el micrómetro en la misma para establecer el volumen requerido según el protocolo de ensayo.
- B. Colocar una punta desechable adecuada empujando suavemente el eje de la pipeta sobre una punta.
- C. Presionar lentamente el botón del émbolo hasta el primer tope fuera de la solución para desplazar el aire y evitar soplar burbujas en ella.
- D. Sin soltar el émbolo, colocar la punta en el líquido justo debajo del menisco en un ángulo vertical (~90 grados) (evitar sumergir la punta demasiado profundo o demasiado superficial).
- E. Subir el émbolo gradualmente para evitar que entre aire en la pipeta.
- F. Presionar el émbolo para liberar el reactivo o solución en el tubo de destino hasta el segundo tope para expulsar todo el volumen de la punta.

- G. Desechar la punta y usar una punta diferente si se va a cambiar de reactivo.
- H. Finalmente, dejar la micropipeta en su volumen máximo para mantener su precisión.

## 2. Preparación de soluciones Molares, Normales, de Peso/volumen y diluciones

Principalmente se llevó a cabo la preparación de soluciones buffer.

### TBS 10X (solución salina tamponada con Tris)

- A. Para preparar 1L de solución, pesar 24.5 g de Tris Base y añadir a un vaso de precipitado con agua destilada en agitación a temperatura ambiente.
- B. Pesar 88 gr de NaCl y añadir al vaso de precipitado anterior para que se disuelva. C. Medir el pH y ajustar a 7.6.
- C. Aforar a 1L con agua destilada.

### TGS 10X (Tris-Glicina-SDS)

- A. Para preparar 1L de solución, pesar 30 g de Tris Base y añadir a un vaso de precipitado con agua destilada en agitación a temperatura ambiente.
- B. Pesar 144 gr de Glicina y añadir al vaso de precipitado anterior para que se disuelva.
- C. Pesar 10 g SDS y añadir al vaso de precipitado.
- D. Medir el pH y ajustar a 8.3.
- E. Aforar a 1L con agua destilada.

### TBS Tween

- A. Con la ayuda de una probeta, medir 100 mL de TBS 10X.
- B. Medir 2 mL de Tween 20 y añadir a la probeta anterior (se recomienda recortar un poco la punta debido a que la sustancia es muy espesa).
- C. Colocar parafilm en la boca de la probeta para poder agitarlo.
- D. Aforar a 1L con agua destilada.

### PBS 10X (solución salina tamponada con fosfato)

- A. Para preparar 500 mL de solución, pesar 48.5 g de PBS y añadir a un vaso de precipitado con agua destilada en agitación a temperatura ambiente.
- B. Aforar a 500 mL con agua destilada.
- C. Filtrar la solución.

Para el caso de las diluciones, se empleó principalmente la fórmula  $C_1V_1=C_2V_2$ .

### 2.1. Ajuste de pH

Con ayuda del potenciómetro se determinaba el valor del pH para las soluciones que lo requerían.

- A. Prender el potenciómetro con el botón on/off.
- B. Enjuagar por afuera el electrodo (que va a estar en contacto con la solución) con mucha agua destilada y secarlo suavemente con una sanita.

Calibrar con la solución de referencia 1 (buffer de pH 4)

- C. Introducir el electrodo a la primera solución de referencia y dejar sobre una gradilla (no sostener con la mano por que se calienta). La punta del electrodo tiene que estar totalmente sumergida.
- D. Presionar el botón CAL.

- E. Esperar a que deje de parpadear y aparezca el letrero “Press CAL for next point o enter to finish” .
- F. Presionar CAL.
- G. Sacar el electrodo, enjuagarlo con mucha agua destilada por fuera nuevamente y secarlo suavemente con una sanita. Nota: arriba del valor de pH aparecen los estándares ya calibrados (4,7,10).

#### Calibrar con la solución de referencia 2 (buffer de pH 7)

- H. Introducir el electrodo a la segunda solución de referencia y dejar sobre una gradilla (no sostener con la mano por que se calienta). La punta del electrodo tiene que estar totalmente sumergida en la solución.
- I. Esperar a que deje de parpadear y aparezca el letrero “Press CAL for next point o enter to finish”.
- J. Presionar CAL.
- K. Sacar el electrodo, enjuagarlo con mucha agua destilada por fuera nuevamente y secarlo suavemente con una sanita.

#### Calibrar con la solución de referencia 3 (buffer de pH 10)

- L. Introducir el electrodo a la tercera solución de referencia y dejar sobre una gradilla (no sostener con la mano por que se calienta). La punta del electrodo tiene que estar totalmente sumergida.
- M. Esperar a que deje de parpadear y aparezca el letrero “Press CAL for next point o enter to finish”.
- N. Presionar ENTER para confirmar calibración y aparecerá un cartel del porcentaje de precisión. Si es menor a 90% repetir desde el paso 1.
- O. Sacar el electrodo, enjuagarlo con mucha agua destilada por fuera nuevamente y secarlo suavemente con una sanita.

#### Medición de pH en la solución a preparar

- P. Colocar una mosca en la solución y poner en agitación a temperatura ambiente.
- Q. Esperar a que todos los polvos e ingredientes estén bien disueltos. Se debe formar un vórtice pequeño con la mosca en agitación, sin salpicar. No calentar.
- R. Para medir el pH de la solución deseada, introducir la punta del electrodo en dicha solución con cuidado de no romper la punta.
- S. Presionar MEASURE. Comenzará a parpadear y cuando haya acabado la medición aparecerá un cartel de READY a la izquierda.
- T. Comenzará a parpadear mientras esté haciendo la medición y agregar con una pipeta de vidrio y un bulbo de látex gota a gota en el vórtice de la solución para ajustar (NaOH o HCl) hasta lograr el pH deseado.
- U. Si deja de parpadear, no agregar nada y presionar MEASURE para que continúe la medición (si los valores no están parpadeando el equipo no está midiendo).

#### Para apagar el equipo

- V. Levantar el electrodo con cuidado, enjuagar por afuera el electrodo con mucha agua destilada y secarlo suavemente con una sanita.
- W. Guardar en el capuchón con agua dentro y dejar en posición vertical sobre el soporte.

## 2.2. Filtración de soluciones

Únicamente para las soluciones que eran necesarias filtrarlas al prepararlas o al momento de utilizarlas.

- A. Escoger el filtro de la solución a filtrar.
- B. Colocar el filtro en la boca del frasco que va a contener a la solución filtrada.
- C. Conectar el filtro a la manguera correspondiente de la bomba del equipo de filtración.
- D. Verificar que la otra manguera que tiene el frasco de precipitado esté bien conectada a la bomba.
- E. Encender la bomba.
- F. Verter poco a poco la solución preparada en el filtro.
- G. Verificar que la solución sea la única en pasar por la manguera y no el aceite del equipo.

### 3. Manejo de ratones transgénicos

En primer lugar, el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán proporcionó un curso de inducción al bioterio a través de una sesión virtual, donde se mencionaron aspectos básicos del uso y manejo adecuado de los animales de un bioterio, principalmente ratones utilizados para fines de experimentación. Debido a que se estuvo más involucrado en la limpieza del bioterio, se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones:

- A. Usar bata de laboratorio limpia previamente lavada con jabón neutro, sin presencia de suavizantes o perfumes (los aromas pueden alterar a los ratones).
- B. Usar guantes estériles al momento de cambiar a cada ratón a una caja limpia, los cambios de caja deben ser sin movimiento bruscos y sujetándolos con cuidado de la cola.
- C. En caso de que haya nacimiento recientes (crías aún rositas) dejar a los ratones en la misma caja.
- D. Lavar con jabón neutro cada una de las jaulas o cajas, secarlas y adicionar aproximadamente 2 cm de cama (con aserrín).
- E. Lavar con jabón neutro las botellas, secarlas, volverlas a llenar con agua y regresarlas a las cajas.
- F. Adicionar la cantidad suficiente del alimento a cada caja. G. En caso de que haya cajas con ratones que no tienen algún tipo de juguetes (estériles), colocar alguno para evitar que se estresen.
- G. Al finalizar, checar la temperatura del cuarto, que cada caja permanezca cerrada y que cada una cuente con alimento y con una botella de agua.
- H. Reportar las observaciones y notificar a los responsables si es que hubo inconvenientes.
- I. Establecer un horario fijo para la limpieza del bioterio para no alterar las variables fisiológicas y comportamientos de los animales, sobre todo si se van a utilizar ratones donde se está analizando el ciclo de sueño.
- J. Hacer la limpieza del bioterio dos veces por semana.
- K. Supervisar periódicamente el estado de salud de los animales, toma de muestras, entre otras.

### 4. Lisis de DNA

La actividad se realizó al momento de genotipar ciertos ratones.

- A. En tubos de 1.5 ul etiquetar cada muestra de acuerdo al número de ratón.
- B. Realizar las biopsias de las colas con cortes lo más pequeño posible con la ayuda de una navaja (mucho DNA puede inhibir las reacciones). Después de cada corte, limpiar la navaja con etanol.
- C. Pasar los cortes a los tubos correspondientes y agregar 125 ul de NaOH 100mM (tener cuidado de tapar bien los tubos).
- D. Incubar en el termoblock por 30 min a 85-95°C (tener cuidado porque puede abrirse la tapa). No exceder más de una hora, aunque la cola no esté completamente deshecha.
- E. Retirar y dejar enfriar un poco sobre la mesa.
- F. Agitar en vórtex por unos segundos (sujetando la tapa con el pulgar) hasta que la cola esté más o menos deshecha (tener cuidado con la tapa que puede abrirse y explotar).
- G. Agregar 150 ul de Tris HCl 0,17 M pH 8.0.
- H. Cerrar y agitar en vórtex.
- I. Centrifugar a 20°C a una velocidad de 10 000 rpm durante 2 minutos.
- J. Guardar en el congelador y no dejar que pase mucho tiempo antes de hacer la PCR.

### 5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Durante el primer trimestre sólo se llevaron a cabo las PCR de los siguientes genes (**Tabla 1**).

<b>Tabla 1.</b> PCR de los genes realizados durante el primer trimestre.
--

Gen para tipificar: **SPAKKI** T243

Mastermix	1*(uL)	*(uL)
H <sub>2</sub> O	13,25	
Buffer 5X	5	
MgCl <sub>2</sub>	3	
dNTP's	0,5	
Primers	1	
Taq	0,1	

Gen para tipificar: **RIP CRE**

Mastermix	1*(uL)	*(uL)
H <sub>2</sub> O	14,5	
Buffer 5X	5	
MgCl <sub>2</sub>	2,5	
dNTP's	0,4	
Primers	0,5	
Taq	0,05	

Gen para tipificar: **GFP (Ai35)**

Mastermix	1*(uL)	*(uL)
H <sub>2</sub> O	13,05	
Buffer 5X	5	
MgCl <sub>2</sub>	3	
dNTP's	0,4	
Primers	0,5	
Taq	0,05	

Gen para tipificar: **VGAT FLOX**

Mastermix	1*(uL)	*(uL)
H <sub>2</sub> O	14,5	
Buffer 5X	5	
MgCl <sub>2</sub>	2,5	
dNTP's	0,4	
Primers	0,5	
Taq	0,1	

Gen para tipificar: **KLHL**

Mastermix	1*(uL)	*(uL)
H <sub>2</sub> O	14,0	
Buffer 5X	5	
MgCl <sub>2</sub>	3	
dNTP's	0,4	
Primers	0,5	
Taq	0,1	

En el último trimestre, se siguieron llevando a cabo las PCR de los genes ya indicados, sin embargo, también se realizaron la de nuevos genes, los cuales aparecen en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** PCR de los nuevos genes realizados durante el último trimestre.

Gen para tipificar: **KSKO**

Gen para tipificar: **HCN4**

Mastermix	1*(uL)	*(uL)
H <sub>2</sub> O	14,00	
Buffer 5X	5	
MgCl <sub>2</sub>	3	
dNTP's	0,4	
Primers	0,5	
Taq	0,1	

Mastermix	1*(uL)	*(uL)
H <sub>2</sub> O	13,25	
Buffer 5X	5	
MgCl <sub>2</sub>	3	
dNTP's	0,5	
Primers	1	
Taq	0,1	

De acuerdo al formato de cada gen, se llevó a cabo la preparación del MasterMix en base al número de muestras, más los controles correspondientes al gen de interés y el control negativo.

- Etiquetar un tubo de 2 ml, el cual corresponde al MasterMix (MM). Agregar la cantidad señalada de cada reactivo dependiendo del tipo de gen (se debe seguir el orden de cada uno tal como aparecen en las **Tabla 1 y 2**).
- Agitar en vórtex y centrifugar.
- Agregar 20 ul del MM a cada tubo para PCR.
- Tomar 2 uL del DNA de cada una de las muestras y controles y agregarlas al tubo de PCR. Para el control negativo no se le adicionará DNA de muestra.
- Centrifugar los tubos de PCR con las muestras ya colocadas.
- Mandar al termociclador y seleccionar el programa correspondiente de acuerdo al gen de interés.

### 5.1. Electroforesis para DNA (Gel de agarosa)

- Hacer los cálculos de la cantidad de agarosa al 2% de acuerdo al tamaño del gel: Chico 40 ml, Mediano 60 ml, Grande 90 ml (dependerá del números de muestras que se van a correr).
- Disolver la agarosa en buffer TAE 1X y agregar Midori Green (ofrece señales de DNA/RNA aún mejores que el bromuro de etidio y no es perjudicial para la salud) al 1 uL /100 mL
- Calentar la mezcla para disolver completamente el agarosa.
- Vertir la solución en una bandeja de gel y colocar los peines para crear pocillos (para el DNA).
- Cargar las muestras de DNA en los pocillos usando puntas apropiadas para evitar dañar el gel.
- Agregar el marcador de Peso Molecular (100 pB) al inicio de cada fila del gel.
- Correr el gel de acuerdo a su tamaño (**Tabla 3**):

<b>Tabla 3.</b> Parámetros del gel de electroforesis.			
Tamaño	Chico	Mediano	Grande
<b>TAE 1X (ml)</b>	40	60	90
<b>Voltaje (volts)</b>	60	70	80
<b>Tiempo(min)</b>	40	50	60

- Observar el gel en un equipo fotodocumentador modelo Chemidoc Biorad con luz UV.
- Tomar una fotografía de los resultados obtenidos.
- Analizar las bandas de ADN según su tamaño y densidad.
- Reportar los resultados en el excel del laboratorio.

## 6. Lavado de cerebros de ratón

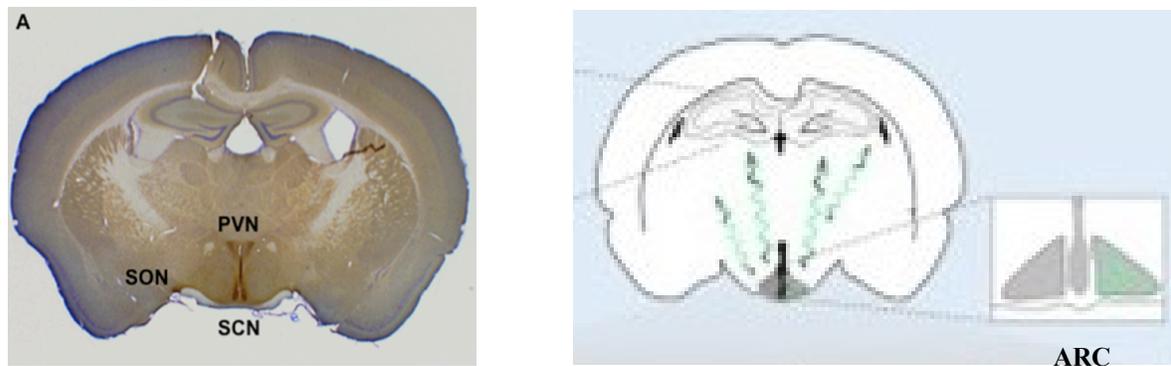
- Una vez extraídos, los cerebros se guardan en tubos Falcon de 15 ml con solución de criopreservador, por lo que se debe desechar esta solución.
- Agregar 3-4 ml de TBS 1X a cada tubo Falcon.
- Realizar 3 lavados de 5 min cada uno a 100 rpm.
- Agregar 5 ml de sacarosa a cada tubo y mandar al cuarto frío o proceder a realizar los cortes correspondientes.

## 7. Inmunofluorescencia

Para técnica principalmente se estuvo de apoyo, sin embargo, a continuación se describe la Inmunofluorescencia propiamente realizada.

### 7.1. Selección de cortes de cerebro de ratón

- Agregar TBS 1X o PBS 1X a una caja de petri.
- Colocar todos los cortes de los núcleos correspondientes (ARC, PVN, SCN) en la caja de petri y seleccionar 4 cortes de cada tipo, los cuales deben ser los más completos y deben cumplir con la forma correspondiente (**Imagen 1**).



**Imagen 1.** Núcleos de interés del hipotálamo: Paraventricular (PVN), Supraquiasmático (SCN) y Arqueado (ARC).

- En una caja para cortes, adicionar 1 ml de TBS 1X+0.05% Triton a cada pozo y agregar cada corte correspondiente, sin olvidar agregar el control negativo.
- Si aún no se va a realizar la inmunofluorescencia, almacenar los cortes en sacarosa 30% y cubrir con papel film.

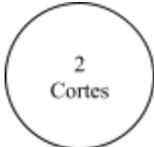
Para el experimento realizado se utilizó el ratón #9701 y se seleccionaron los cortes tal como aparecen en la **Imagen 2**.



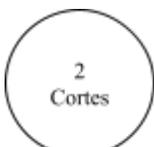
**Imagen 2.** Selección de cortes (núcleos) del ratón #9701.

## 7.2. Inmunofluorescencia en flotación

- A. Una vez seleccionados los cortes, realizar 3 lavados con TBS-T (TBS 1X + 0.05% Tritón) durante 5 min cada uno en agitación a 70 rpm. Si los cortes estuvieron mucho tiempo almacenados en sacarosa, realizar el primer lavado durante 10 min.
- E. Preparar la solución de bloqueo (3% Donkey serum en TBS-T). Para 6 cortes se utiliza 1 ml (la solución de bloqueo es la misma que la solución diluyente). Sin embargo, para este caso se utilizó 3% Suero Fetal Bovino como solución de bloqueo y diluyente.
- F. Incubar los cortes con la solución de bloqueo durante 1 h a t. a. y en agitación a 70 rpm.
- G. Preparar los anticuerpos primarios en la solución diluyente, para este experimento los anticuerpos utilizados se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados.		
Ratón #9701		Control negativo
		
<p><b>Condición 1</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● #25 pNKCC1 (hecho en oveja) (0.5 ug/ml) con <b>Non Phosphopeptide</b> (1 ul/ml)</li> <li>● #127 c-FOS (hecho en ratón) (1 ug/ml)</li> </ul>	<p><b>Condición 2</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● #25 pNKCC1 (hecho en oveja) (0.5 ug/ml) con <b>Non phosphopeptide</b> (1 ul/ml)</li> <li>● #128 c-FOS (hecho en ratón) (1 ug/ml)</li> </ul>	No se le adiciona anticuerpo primario.

- H. Después del bloqueo, incubar los cortes con anticuerpo primario durante dos noches a 4°C y en agitación a 70 rpm.
- I. Realizar 3 lavados con TBS-T (TBS 1X + 0.05% Tritón) durante 5 min cada uno en agitación (70 rpm).
- J. Preparar los anticuerpos secundarios (**Tabla 5**) en la solución diluyente. Los anticuerpos secundarios y la estreptavidina se utilizan 1:1000.

Tabla 5. Anticuerpos secundarios utilizados.		
Ratón #9701		Control negativo
		
<p><b>Condición 1</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● #1 Anti Sheep Biotina (anti oveja)</li> <li>● #6 Anti Mouse (anti ratón)</li> <li>● #38 Estreptavidina</li> </ul>	<p><b>Condición 2</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● #1 Anti Sheep Biotina (anti oveja)</li> <li>● #6 Anti Mouse (anti ratón)</li> <li>● #38 Estreptavidina</li> </ul>	Se le adicionan todos los anticuerpos secundarios.

- K. Incubar los cortes con anticuerpo secundario por 2 h a temperatura ambiente y en agitación (70 rpm). A partir de este paso los cortes se deben cubrir con aluminio.
- L. Debido a que se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado (Condición 1, Condición 2 y Control negativo), después del paso anterior:
  - a). Realizar 3 lavados con TBS-T (TBS 1X+0.05% Tritón) durante 5 min cada uno en agitación (70 rpm).
  - b). Preparar la estreptavidina 1:1000 en la solución diluyente.
  - c). Incubar los cortes con estreptavidina por 1 h a temperatura ambiente y en agitación (70 rpm).
- M. Realizar 3 lavados con TBS-T (TBS 1X+0.05% Tritón) durante 5 min cada uno en agitación (70 rpm).
- N. Dejar los cortes en TBS 1X overnight a 4°C. Este paso se realiza sin agitación y los cortes deben permanecer cubiertos con aluminio.
- O. Al día siguiente, preparar la solución DAPI (1:1000).
- P. Pasar los cortes a una laminilla cargada y dejar secar por completo.
- Q. Colocar la solución de DAPI por 10 minutos.
- R. Pasar rápidamente la laminilla a un vaso coplin con agua destilada para quitar el excedente de DAPI.
- S. Cubrir la laminilla con medio de montaje (usar 70 ul por laminilla).
- T. Ver al microscopio.

### **Consideraciones para el uso del microscopio de epifluorescencia.**

- Programa Zen Blue.
- Prender primero el microscopio antes del programa. Notificar si tarda más de 2 min en prender.
- Siempre dar clic en calibrar.
- Asegurarse de que siempre se esté trabajando en campo oscuro, nunca en campo claro.
- Nunca obstruir el lente del microscopio.
- La platina es la única que puede moverse de manera manual.
- Click en "Adquisición" para visualizar todos los filtros.
- Click en "Live" para visualizar los cortes.
- La resolución 10x es útil para visualizar todas las regiones de manera más rápida.
- La resolución 20x es la mejor para la toma de fotos.
- Para la resolución 50-60x usar siempre aceite de inmersión (el programa lo indica).
- Si no se utiliza el microscopio, apagar la lámpara.
- Los portaobjetos únicamente se limpian con papel cera.

### **7.3. Laminillas cargadas para Inmunofluorescencia**

- A. Diluir la solución de poli-L-lisina Sigma P8920 (0,1 % w/v) 1:10 en agua destilada para preparar la solución de trabajo (100 mL de poli-L-Lisisina ya diluida alcanza para recubrir de 100 a 150 laminillas).
- B. Llenar una caja de histología con portaobjetos al estilo de "línea de montaje" y colocarla en un recipiente con altura suficiente para cubrirla completamente.
- C. Agregar acetona al recipiente y limpiar los portaobjetos durante 5 minutos, puede realizarse en agitación para cubrir completamente cada portaobjeto.
- D. Secar al aire los portaobjetos en ángulo (apoyados en una rejilla para tubos u otro soporte adecuado) sobre toallas de papel hasta que se evaporen todas las gotas de acetona.
- E. Con un pincel/brocha cubra la cara de arriba del portaobjetos con la poli-L-lisina diluida 1:10 .  
 Alternativa 1: Agregar la solución de trabajo en un vaso coplin e introducir los portaobjetos.  
 Alternativa 2: Agregar la solución de trabajo en el mismo recipiente que se utilizó para la acetona e introducir los portaobjetos durante 30 minutos, puede realizarse en agitación para cubrir completamente cada portaobjeto.
- F. Seque los portaobjetos al aire en ángulo sobre toallas de papel durante unos minutos hasta que desaparezcan las gotas grandes.

- G. Opcional: Hornee los portaobjetos durante 1 hora a 55 °C.
- H. Guarde y etiquete apropiadamente.

## Discusión de resultados (PCR)

Estos protocolos se han utilizado para el análisis del genotipo de diversos ratones transgénicos que tienen un gen desconocido. A continuación presento los resultados que obtuve a lo largo de las primeras semanas.

**Análisis del transgen de SPAK-KI:** En la **Imagen 3** se observa una electroforesis de la amplificación por PCR del gen de SPAK-KI en 12 número de ratones. En el primer carril se colocó el marcador de peso molecular, en los últimos carriles se utilizaron 3 controles que confirman la amplificación de los dos alelos (KI, WT) para corroborar el genotipo homocigoto mutante o silvestre, respectivamente, o en su caso heterocigoto (HET). También se utilizó un control negativo sin DNA para garantizar que no existen contaminaciones. Para SPAK-KI la mitad de los ratones resultaron ser Heterocigotos, 3 KI y 3 WT.

Experimentador		SPAKKI PN			
Fecha	Ruth y Alma	Genotipo	Tamaño de banda		
14 marzo		WT	680 pb		
gen	SPAK	KI	780 pb		
		HET	680 y 780 pb		
SPAK					
Numero de carril	Número de ratón	Genotipo	Observaciones	Carril arriba	
1.1	795	WT		1	PM
1.2	796	KI		2	795
1.3	797	KI		3	796
1.4	798	WT		4	797
1.5	799	WT		5	798
1.6	800	HET		6	799
1.7	801	KI		7	800
1.8	802	HET		8	801
2.1	803	HET		9	802
2.2	804	HET		10	ESPACIO
2.3	805	HET		11	803
2.4	806	HET		12	804
2.5	WT	OK		13	805
2.6	Het	OK		14	806
2.7	KI	OK		15	CONT WT
2.8	-	-		16	CONT HET
				17	CONT KI
				18	CONT -
				19	
				20	

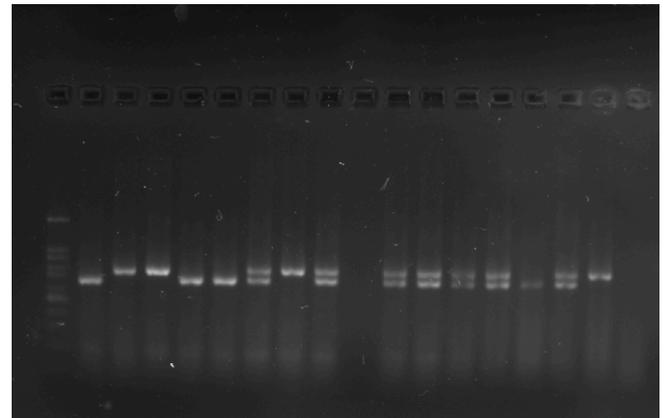


Imagen 3. PCR del transgen de SPAK-KI.

**Análisis del transgen de RIP-CRE:** De acuerdo con los resultados que se aprecian en **Imagen 4**, los ratones 796, 799 y 802 son los únicos en poseer el transgén CRE.

		RIP CRE			
		Genotipo	Tamaño de banda		
		Transgen	100 pb		
		Control Interno (+)	324 pb		
CRE					
Numero de carril	Número de ratón	Genotipo	Observaciones	Carril arriba	
1.1	795			1	PM
1.2	796	TG		2	795
1.3	797			3	796
1.4	798			4	797
1.5	799	TG		5	798
1.6	800			6	799
1.7	801			7	800
1.8	802	TG		8	801
2.1	803			9	802
2.2	804			10	ESPACIO
2.3	805			11	803
2.4	806			12	804
2.5	CONT TG CRE			13	805
2.6	-			14	806
2.7				15	CONT TG CRE
2.8	-	-		16	CONTROL -

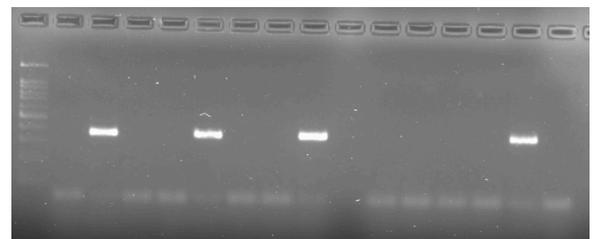
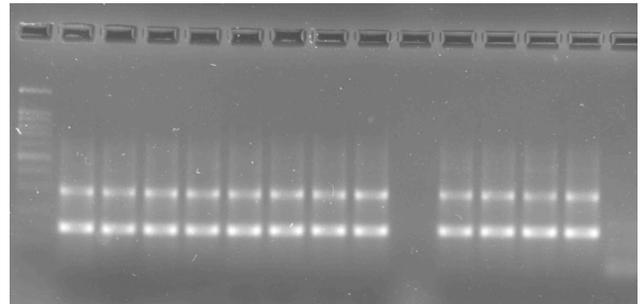


Imagen 4. PCR del transgen de RIP-CRE.

**Análisis del transgen de GFP:** Para el gen de GFP, los 12 ratones analizados resultaron ser Heterocigotos (Imagen 5).

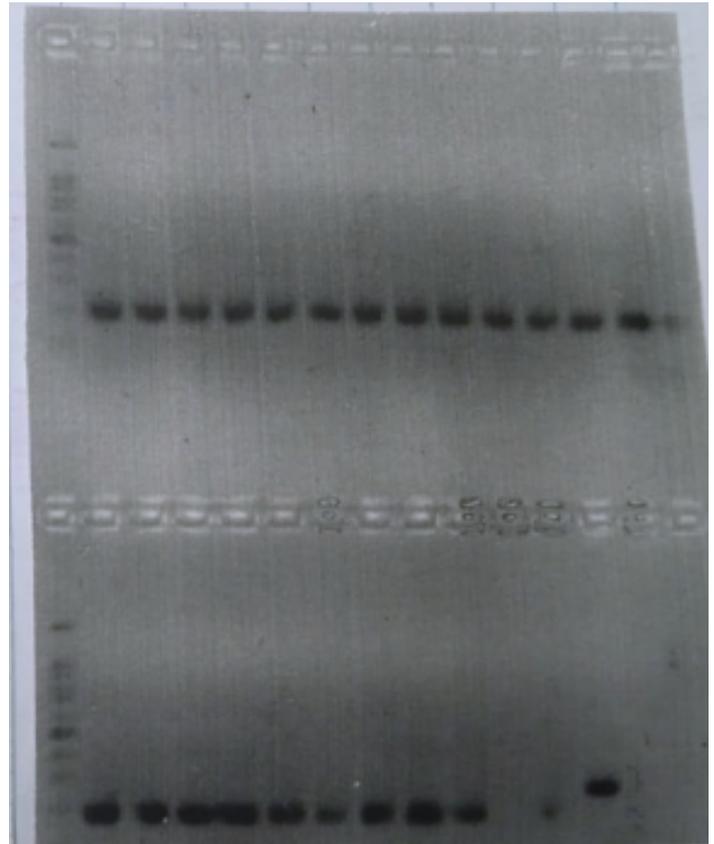
				GFPllox	
				Genotipo	Tamaño de banda
				WT	142 pb
				KI	384 pb
				HET	384 pb y 142 bp
GFP					
Numero de carril	Número de ratón	Genotipo	Observaciones	Carril arriba	
1.1	795	HET		1	PM
1.2	796	HET		2	795
1.3	797	HET		3	796
1.4	798	HET		4	797
1.5	799	HET		5	798
1.6	800	HET		6	799
1.7	801	HET		7	800
1.8	802	HET		8	801
2.1	803	HET		9	802
2.2	804	HET		10	ESPACIO
2.3	805	HET		11	803
2.4	806	HET		12	804
2.5	-			13	805
2.6				14	806
2.7				15	CONTROL-
2.8	-	-		16	
				17	
				18	
				19	
				20	



**Imagen 5.** PCR del transgen de GFP.

**Análisis del transgen de VGAT Flox:** Todos los ratones resultaron ser WT (Imagen 6).

				VGAT Flox	
				Genotipo	Tamaño de banda
				WT	185 pb
				KI	250 pb
				HET	185 y 250 pb
SPAK					
Numero de carril	Número de ratón	Genotipo	Observaciones	Carril arriba	
1.1	135	WT		1	PM
1.2	137	WT		2	135
1.3	138	WT		3	137
1.4	143	WT		4	138
1.5	144	WT		5	143
1.6	145	WT		6	144
1.7	146	WT		7	145
1.8	147	WT		8	146
2.1	153	WT		9	147
2.2	Error	-		10	153
2.3	155	WT		11	Error
2.4	156	WT		12	155
2.5	157	WT		13	156
2.6	158	WT		14	157
2.7	159	WT		15	158
				Carril abajo	
3.1	161	WT		1	PM
3.2	162	WT		2	159
3.3	163	WT		3	160
3.4	164	WT		4	161
3.5	165	WT		5	162
3.6	166	WT		6	163
3.7	154	WT		7	164
3.8	Cont Neg	-		8	165
4.1	Cont WT	-		9	166
4.2	Cont KI	-		10	154
4.3	Cont Neg	-		11	Cont Neg
				12	Cont WT
				13	Cont KI
				14	Cont Neg
				15	



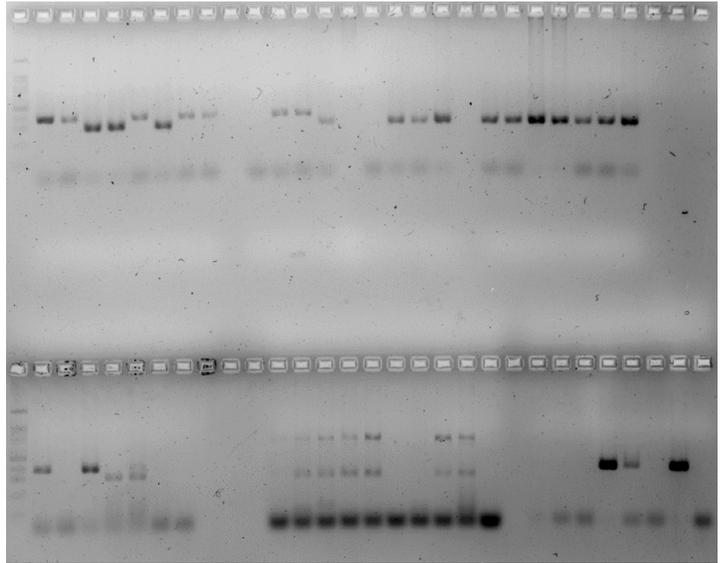
**Imagen 6.** PCR del transgen de VGAT Flox.

**Análisis del transgen de KLHL:** Para el gen KLHL, en la Imagen 7 se observa que la mayoría de los 27 ratones resultaron ser WT.

Fecha		7 de mayo		KLHL (R528H)	
gen	KLHL	Genotipo	Tamaño de banda		
		WT	308 pb		
		KI	383 pb		
		HET	308 y 383 pb		

KLHL					
Numero de carril	Numero de ratón	Genotipo	Observaciones	Carril arriba	
1.1	112	KI		1	PM
1.2	114	KI		2	112
1.3	239	WT		3	114
1.4	240	WT		4	239
1.5	251	KI		5	240
1.6	252	WT		6	251
1.7	253	KI		7	252
1.8	272	KI		8	253
2.1	274			9	272
2.2	275	KI		10	ESPACIC
2.3	280	KI		11	2.1
2.4	343	WT		12	2.2
2.5	346			13	2.3
2.6	347			14	2.4
2.7	348	WT		15	2.5
2.8	349	WT		16	2.6
3.1	350	WT		17	2.7
3.2	351	WT		18	2.8
3.3	369	WT		19	3.1
3.4	370	WT		20	ESPACIC
3.5	371	WT		21	3.2
3.6	376	WT		22	3.3
3.7	377	WT		23	3.4
3.8	394	WT		24	3.5
4.1	595	KI		25	3.6
4.2	656			26	3.7
4.3	657	KI		27	3.8
4.4	WT	-		28	ESPACIC
4.5	HET	-		29	ESPACIC
4.6	KI	-		30	ESPACIC
4.7	C-	-			



**Imagen 7.** PCR del transgen de KLHL.

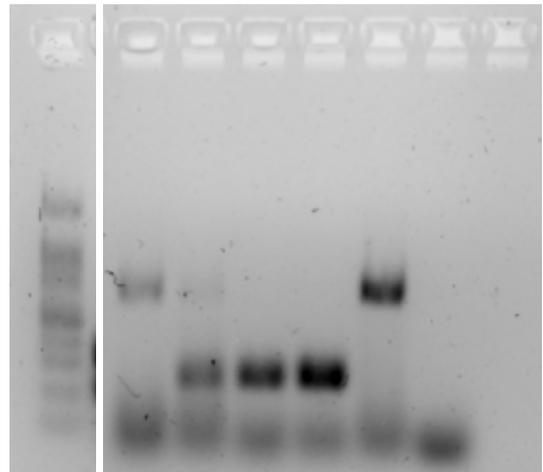
Asimismo, los resultados de las últimas PCR realizadas de los genes KSKO y HCN4 son los presentados en la **Imagen 8** e **Imagen 9**, respectivamente.

**Análisis del transgen de KSKO:** De acuerdo con los resultados (**Imagen 8**), los ratones 5954 y 9564 son los únicos en poseer el transgén de interés, el 5921 fue el único Heterocigoto y los 5874 y 9995 fueron silvestres (WT).

		KS-WNK1 KO			
		Genotipo	Tamaño de banda		
		WT	709 pb		
		KO	220 pb		
		HET	709 y 220 pb		

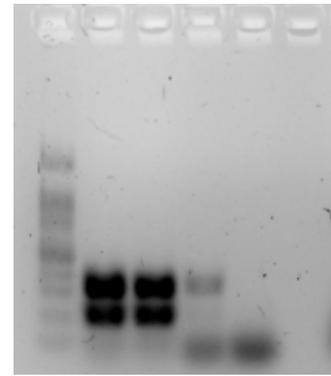
KSKO					
Numero de carril	Numero de ratón	Genotipo	Regenotipado	Observaciones	
2.1	5874	WT	WT	COINCIDEN	
2.2	5921	HET	HET	COINCIDEN	
2.3	5954	KO	KO	COINCIDEN	
2.4	9564	KO	KO	COINCIDEN	
2.5	9996	WT	WT	COINCIDEN	
2.6	C-	OK	OK		
2.7					
2.8					
2.9					



**Imagen 8.** PCR del transgen de KSKO.

**Análisis del transgen de HCN4:** Para este gen, en la **Imagen 9** se observa que los dos ratones (14 y 15) resultaron ser Heterocigotos.

Experimentador	Ruth y Alma				
Fecha	12 junio		HCN4-CRE		
gen	HCN4		Genotipo	Tamaño de banda	
			Transgene	200 pb	
			Internal positive control	324 pb	
HCN4					
Numero de carril	Numero de ratón	Genotipo	Observaciones		Carril arriba
1.1	14	HET			1 PM
1.2	15	HET			2 14
1.3	WT	OK			3 15
1.4	C-	OK			4 WT
					5 C-



**Imagen 9.** PCR del transgen de HCN4.

Todas las consideraciones mencionadas en los protocolos deben tomarse en cuenta desde la parte del lisado, pues la DNA molde se obtendrá de las muestras necesarias para la reacción y cualquier error afectará el proceso desde ese punto.

Cabe mencionar también el papel fundamental que tiene cada uno de los componentes esenciales de la reacción de PCR (MasterMix) para cada gen, en primer lugar el agua ya que proveerá el medio donde se llevarán a cabo las reacciones, por lo que debe de estar libre de nucleasas (Agua Mili Q). La relevancia del buffer es que mantiene el pH óptimo para que la enzima actúe y las sales disueltas en este proporcionan la fuerza iónica adecuada para su máxima actividad. Los cationes divalentes libres serán necesarios para la actividad de las polimerasas termoestables, normalmente se utiliza  $MgCl_2$  que se une a los dNTP y oligonucleótidos donde se debe procurar que no haya un exceso ya que la acumulación dará una amplificación no específica. Los trifosfatos de desoxinucleósido (dNTPs) proveerán los nucleótidos a la reacción para la síntesis de DNA y se incorporaran al DNA molde para realizar una copia exacta de este; por su parte, la elección de los primers adecuados (cortos, monocatenarios y complementario a las cadenas opuestas de las regiones del fragmento de interés) permitirá una amplificación específica. Finalmente, las consideraciones para la Taq DNA polimerasa es que debe ser termoestable para que pueda soportar las temperaturas de desnaturalización (94-95 °C) (Ehtisham et al., 2016). Además, la PCR se basa en la capacidad de la enzima Taq DNA polimerasa para sintetizar una nueva cadena de DNA complementaria a la hebra molde (Garrote & Díaz Alonso, 2019).

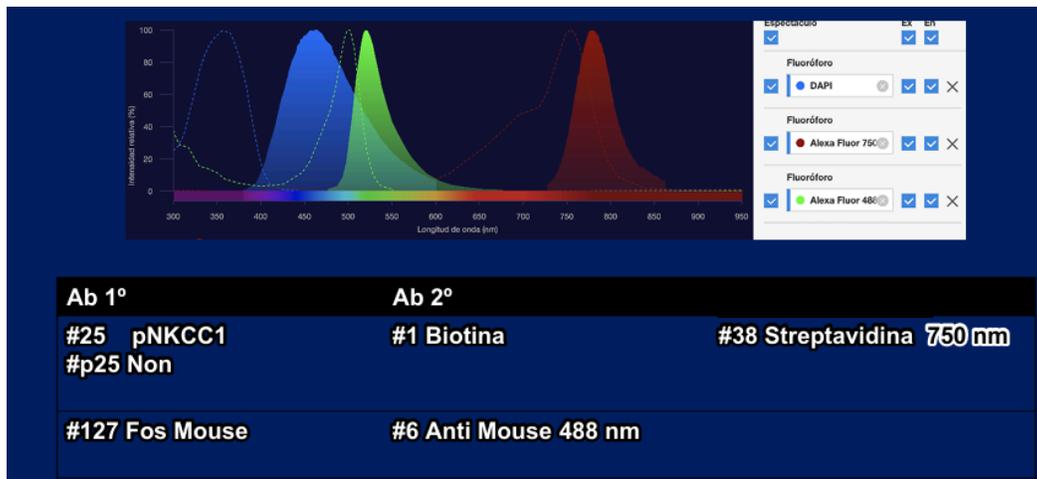
Para este punto, el equipo dónde se llevará a cabo la técnica es relevante pues el Termociclador es un aparato de laboratorio que se utiliza para amplificar segmentos de DNA a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde el ciclador sube y baja la temperatura del bloque en pasos discretos y preprogramados sin que ocurra la degradación de la Taq DNA polimerasa (One Lab, 2024).

## Discusión de resultados (Inmunofluorescencia)

Todos los protocolos mencionados también fueron de utilidad para las inmunofluorescencias dónde se sirvió de apoyo así como la que se llevó a cabo. A continuación presento los resultados de la técnica de inmunofluorescencia propiamente realizada en secciones de tejido de cerebro obtenidas del ratón transgénico #9701 en distintas condiciones experimentales, visualizados mediante microscopía de fluorescencia.

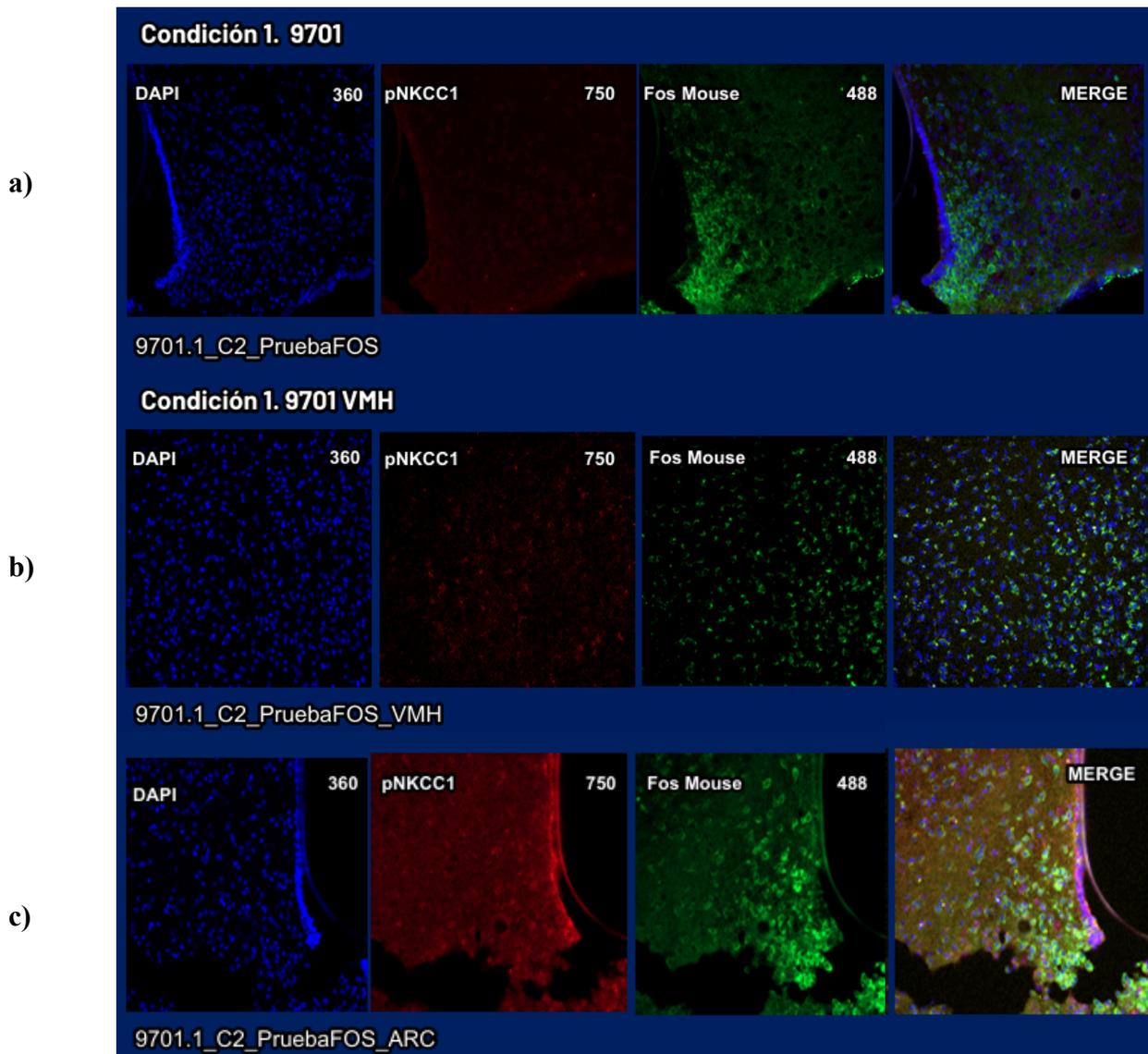
**Condición 1:** Los dos anticuerpos primarios utilizados fueron #25 pNKCC1 (hecho en oveja) el cual debe ir junto el **Non phosphopeptide**, el cual es un péptido no fosforilado que ayuda a bloquear la señal de los cotransportadores que no tienen unido un grupo fosfato, y el otro fue el #127 c-FOS (hecho en ratón). Respecto a los anticuerpos secundarios, estos deben de ir dirigidos contra la especie del primario, por lo que se usaron los anticuerpos secundarios #1 Anti Sheep Biotina (anti oveja) y #6 Anti Mouse (anti ratón), debido a que se utilizó un anticuerpo biotinilado se utilizó la #38 Estreptavidina para poder detectarlo.

En la **Imagen 10** se observa a qué longitud de onda se excita cada Ab  $2^\circ$  (nm), por lo cual se debe de buscar un fluoróforo en el Visor de espectros de fluorescencia que se excite a la misma longitud de onda (nm).



**Imagen 10.** Visor de espectros de fluorescencia. La **Estreptavidina** se excita a 750 nm y el **Anti Mouse** a 488 nm, por lo que el fluoróforo que les corresponde es el Alexa Fluor 750 y Alexa Fluor 488, respectivamente.

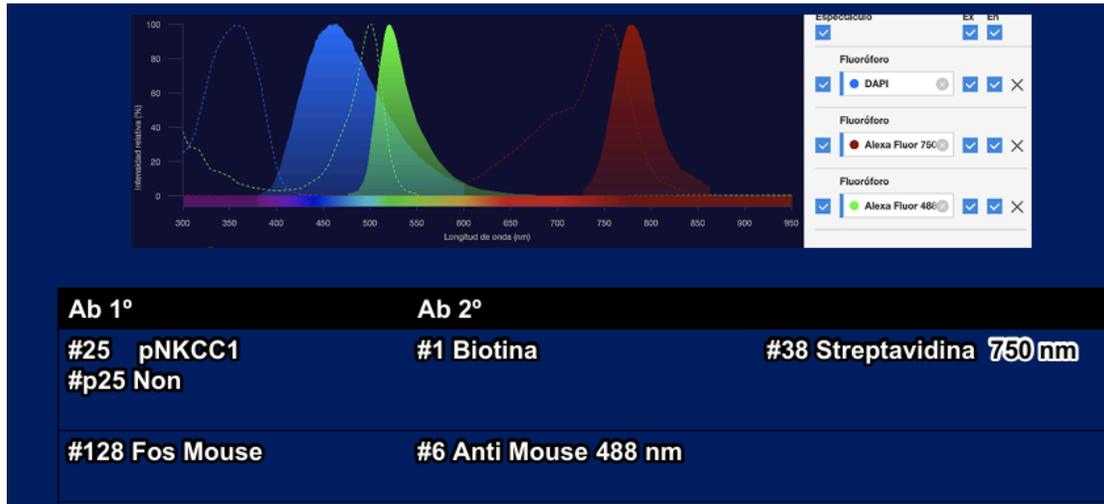
Debido a que la técnica de inmunofluorescencia permite detectar la presencia de una determinada proteína, en la **Imagen 11** tenemos la visualización de los resultados, donde el DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) es un compuesto fluorescente azul con un pico de excitación a 360 nm que marca los núcleos celulares de interés presentes en las secciones del hipotálamo del ratón, esto al intercalarse con el DNA. Por su parte, el Merge muestra todos los anticuerpos primarios presentes en las muestras junto con el DAPI. Para la **Condición 1**, existe la presencia del Ab 1° **pNKCC1** (hecho en oveja) y **c-FOS** (hecho en ratón) en los núcleos del Arqueado (ARC) y en el Hipotálamo ventromedial (VMH).



**Imagen 11. a) y c)** Núcleos del Arqueado: visualización del Ab 1° **pNKCC1** (rojo) y **c-FOS** (verde). **b)** Hipotálamo ventromedial: visualización del Ab 1° **pNKCC1** (rojo) y **c-FOS** (verde).

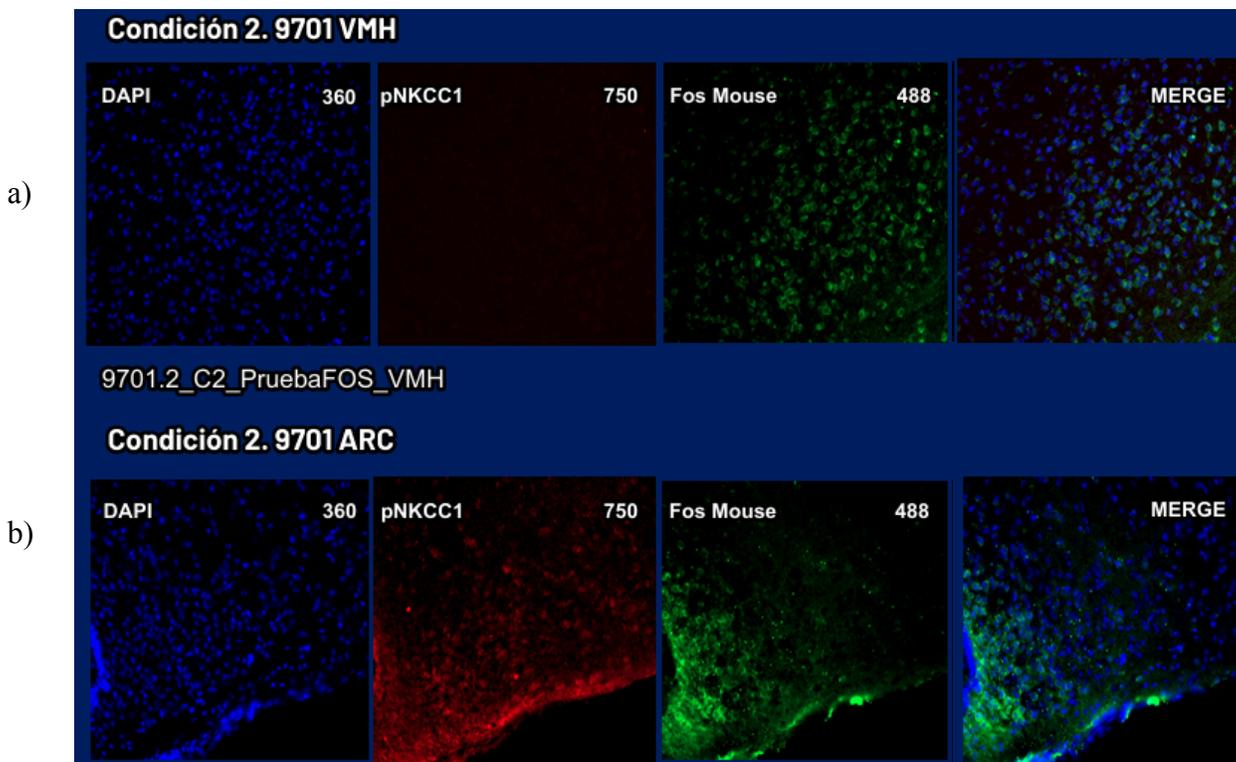
**Condición 2:** Los dos anticuerpos primarios utilizados fueron **#25 pNKCC1** (hecho en oveja) junto el **Non phosphopeptide** y el otro fue el **#128 c-FOS** (hecho en ratón). Los anticuerpos secundarios fueron los mismos que para la Condición 1, la única diferencia fue que para el Ab 1° **c-FOS** (hecho en ratón) se utilizó una alícuota diferente a la **Condición 1** con el objetivo de ponerlo a prueba.

En la **Imagen 12** se observa el Visor de espectros de fluorescencia y a qué longitud de onda se excita cada Ab 2° (nm) con su fluoróforo correspondiente.



**Imagen 12.** Visor de espectros de fluorescencia. La **Estreptavidina** se excita a 750 nm y el **Anti Mouse** a 488 nm, por lo que el fluoróforo que les corresponde es el Alexa Fluor 750 y Alexa Fluor 488, respectivamente.

En la **Imagen 13** se aprecian los resultados obtenidos de la **Condición 2**, donde existe la presencia del Ab 1° **pNKCC1** y **c-FOS** en el núcleo del Arqueado (ARC) y en el Hipotálamo ventromedial (VMH), aunque en este último la señal del **pNKCC1** es muy débil.



**Imagen 13. a)** Hipotálamo ventromedial: visualización del Ab 1° **pNKCC1** (rojo con señal débil) y **c-FOS** (verde). **b)** Núcleo Arqueado: visualización del Ab 1° **pNKCC1** (rojo) y **c-FOS** (verde).

Cómo en cualquier otro inmunoensayo, la especificidad del anticuerpo primario frente a nuestro antígeno diana es un factor determinante en la fiabilidad y el éxito de los resultados. Cuánto más específico sea el anticuerpo, mejor será la señal obtenida y menor el ruido de fondo generado. Asimismo, para optimizar los resultados de los ensayos, otro de los puntos clave es la titulación de los anticuerpos para determinar la dilución idónea a emplear en cada caso (Abyntek Biopharma, 2020).

Debido a que tanto en la **Condición 1** como en la **Condición 2** estuvieron presentes los anticuerpos primarios **pNKCC1** (hecho en oveja) y **c-FOS** (hecho en ratón) en los núcleos hipotalámicos de interés, se deduce que se media el transporte y la reabsorción de sodio y cloruro, ya que el Ab 1° **pNKCC1** reconoce una proteína que funciona como un sistema transportador electroneutro que media esta reabsorción intracelular (Fisher Scientific, 2024). Por su parte, **c-Fos** es un marcador de actividad neuronal ampliamente usado en el campo de la neurociencia, es un factor transcripcional que indica una despolarización de membrana de una neurona, su transcripción es rápida ~15 minutos a partir del estímulo recibido (Jaworski *et al.*, 2018).

A estas alturas, los estudios de inmunofluorescencia requieren que se utilice la técnica de microscopía de fluorescencia, por lo que el equipo debe ser el idóneo para obtener resultados confiables. La mayoría de los microscopios de fluorescencia actualmente en uso son microscopios de campo amplio de epifluorescencia, donde la excitación y la detección de una señal se realizan a través de la misma trayectoria de luz (el objetivo) (Labelinics, 2019).

### III. VÍNCULO CON LA FORMACIÓN DEL PLAN DE ESTUDIOS

De acuerdo con la formación básica del QFB, este puede acceder y desenvolverse exitosamente en el campo profesional, en los estudios de posgrado y en la investigación. Una de sus capacidades es la de participar en el desarrollo y adecuación de procesos biotecnológicos para la obtención ya sea de fármacos o de productos biológicos; por lo tanto, al llevar a cabo el servicio social en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM se contribuyó al desarrollo de proyectos de investigación a partir de la aplicación de tecnologías moleculares, donde los resultados de cada uno de los experimentos pueden servir para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades que representan problemas de salud en México.

Debido a que se exploró un área de estudio diferente como lo es la Biología molecular, se pudieron aprender nuevas técnicas (PCR e Inmunofluorescencia) lo que permitió que se complementara de manera significativa los conocimientos y habilidades, gracias a esto se puede acceder y desenvolverse exitosamente en el campo profesional. Además se fortaleció el comportamiento tanto ético como bioético para el ejercicio de la profesión farmacéutica pues se aprendió el manejo adecuado de los animales de laboratorio. Por otro lado, gracias a la interacción con estudiantes de maestría, doctorado, etc., se fortaleció el trabajo en equipo lo que será de apoyo para cualquier ámbito profesional (hospitalario, comunitario, etc.) y surge el interés para más adelante realizar estudios de posgrado u otro relacionado con la investigación.

### IV. CONCLUSIÓN

Durante el periodo de servicio social en el Laboratorio de Fisiología Experimental se desarrollaron las habilidades necesarias para el uso y manejo de técnicas de biología molecular como PCR, Electroforesis e Inmunofluorescencia. A partir de la investigación teórica y del apoyo de los compañeros del laboratorio se comprendieron y analizaron de la mejor manera los resultados obtenidos de cada uno de los experimentos realizados. Asimismo, gracias a la interacción con los animales de laboratorio (ratones) se desarrollaron habilidades para el manejo adecuado de los mismos.

Cabe mencionar que la estancia en el laboratorio fue grata y se agradece por el apoyo y paciencia que se recibió de cada uno de los integrantes.

## V. BIBLIOGRAFÍA

1. Abyntek Biopharma (2017). 5 Tips para Inmunofluorescencia (IF). Sitio web: <https://www.abyntek.com/tips-inmunofluorescencia/>
2. Abyntek Biopharma (2020). Anticuerpos para Inmunofluorescencia. Sitio web: <https://www.abyntek.com/anticuerpos-para-inmunofluorescencia/>
3. Ehtisham, M., Wani, F., Wani, I., Kaur, P., & Nissar, S. (2016). Polymerase chain reaction (PCR): back to basics. *Indian Journal of Contemporary Dentistry*, 4(2), 30.
4. Fisher Scientific, (2024). NKCC1 Monoclonal Antibody (6G7D2), Invitrogen™. Sitio web: <https://www.fishersci.es/shop/products/nkcc1-monoclonal-antibody-6g7d2-invitrogen/17921861>
5. Garrote Santana, H., & Díaz Alonso, C. A. (2019). Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa: del “Nobel” a la actualidad. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 35(4).
6. Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Analysis of DNA by agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(1), pdb-top100388.
7. Jaworski, J., Kalita, K., & Knapska, E. (2018). c-Fos and neuronal plasticity: the aftermath of Kaczmarek’s theory. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 78(4), 287-296.
8. Labclinics (2019). Inmunofluorescencia: campo amplio versus confocal. Sitio web: <https://www.labclinics.com/2019/04/30/inmunofluorescencia-campo-amplio-versus-confocal/>
9. National Human Genome Research Institute (2020). Polymerase Chain Reaction (PCR). Sitio web: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction>
10. One Lab (2024). Termociclador: para qué sirve, usos y cómo elegir el adecuado (Guía completa). Sitio web: <https://www.onelab.com.ar/termociclador-para-que-sirve-usos-y-como-elegir-el-adecuado>
11. Recalde-Reyes, D. P., & Calderon, J. L. (2023). Técnica de inmunofluorescencia indirecta para detección de dengue virus.
12. ThermoFisher Scientific. Fluorescence SpectraViewer. Sitio web: [https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer/?ef\\_id=CjwKCAiAibeuBhAAEiwAiXBoJA1K59ZBIRvxBTA\\_nF3nUu7n9Hia45vgjZEBN0GudCTjIKsUVHWPpxoCOZMQAvD\\_BwE:G:s&s\\_kwid=AL!3652!3!607635415850!e!!g!!spectraviewer%20bd!352133562!50158961722&cid=bid\\_pca\\_aup\\_r01\\_co\\_cp1359\\_pjt0000\\_bid00000\\_0se\\_gaw\\_nt\\_pur\\_con&gad\\_source=1&gclid=CjwKCAiAibeuBhAAEiwAiXBoJA1K59ZBIRvxBTA\\_nF3nUu7n9Hia45vgjZEBN0GudCTjIKsUVHWPpxoCOZMQAvD\\_BwE#!/?ef\\_id=CjwKCAiAibeuBhAAEiwAiXBoJA1K59ZBIRvxBTA\\_nF3nUu7n9Hia45vgjZEBN0GudCTjIKsUVHWPpxoCOZMQAvD\\_BwE:G:s&s\\_kwid=AL!3652!3!607635415850!e!!g!!spectraviewer%20bd!352133562!50158961722&cid=bid\\_pca\\_aup\\_r01\\_co\\_cp1359\\_pjt0000\\_bid00000\\_0se\\_gaw\\_nt\\_pur\\_con&gad\\_source=1&gclid=CjwKCAiAibeuBhAAEiwAiXBoJA1K59ZBIRvxBTA\\_nF3nUu7n9Hia45vgjZEBN0GudCTjIKsUVHWPpxoCOZMQAvD\\_BwE](https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer/?ef_id=CjwKCAiAibeuBhAAEiwAiXBoJA1K59ZBIRvxBTA_nF3nUu7n9Hia45vgjZEBN0GudCTjIKsUVHWPpxoCOZMQAvD_BwE:G:s&s_kwid=AL!3652!3!607635415850!e!!g!!spectraviewer%20bd!352133562!50158961722&cid=bid_pca_aup_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_nt_pur_con&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAibeuBhAAEiwAiXBoJA1K59ZBIRvxBTA_nF3nUu7n9Hia45vgjZEBN0GudCTjIKsUVHWPpxoCOZMQAvD_BwE#!/?ef_id=CjwKCAiAibeuBhAAEiwAiXBoJA1K59ZBIRvxBTA_nF3nUu7n9Hia45vgjZEBN0GudCTjIKsUVHWPpxoCOZMQAvD_BwE:G:s&s_kwid=AL!3652!3!607635415850!e!!g!!spectraviewer%20bd!352133562!50158961722&cid=bid_pca_aup_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_nt_pur_con&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAibeuBhAAEiwAiXBoJA1K59ZBIRvxBTA_nF3nUu7n9Hia45vgjZEBN0GudCTjIKsUVHWPpxoCOZMQAvD_BwE)



Firma del Asesor Externo. Dra. María de Jesús Chávez Canales

6925078

Instituto de investigaciones biomédicas (INC-UNAM). Laboratorio de Fisiología Experimental.



Firma del Asesor Interno: Dr. Lino Mayorga Reyes

8491

Profesor titular C. Departamento de Sistemas Biológicos. División de Ciencias Biológicas y de la Salud.  
UAM Xochimilco.