



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

**“Desarrollo de un manual de técnicas celulares y
moleculares usadas en el laboratorio de
bioquímica clínica e inmunología con aplicación
en investigación dirigido a alumnos de la Facultad
de Farmacia”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN FARMACIA

P R E S E N T A

KARLA CRISTINA VÁZQUEZ ROCHA

DIRECTOR DE TESIS

DR. GERMAN BERNAL FERNÁNDEZ



CUERNAVACA, MORELOS. 2024

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABLAS	4
ABSTRACT	5
RESUMEN.	6
INTRODUCCIÓN.	7
Sistema inmunológico.....	8
Inmunidad Innata.	9
Inmunidad Adaptativa.	10
Obesidad.....	11
Clasificación de la Obesidad.....	11
Clasificación Etiológica.....	11
Sobrepeso.....	14
Datos y cifras sobrepeso y obesidad.	15
Obesidad Infantil en México.....	16
Obesidad, inflamación y RI.	18
Resistencia a la Insulina.	19
Diabetes.....	20
Clasificación Etiológica de la Diabetes.....	21
Dislipidemia.....	23
Hipertensión Arterial.....	23
Síndrome metabólico.	26
JUSTIFICACIÓN	26
OBJETIVO GENERAL	26
METODOLOGÍA	27
TÉCNICAS DE LABORATORIO.	27
Obtención de Células Mononucleares por gradiente de Ficoll.	27
Toma de muestra de sangre periférica.	28
Determinación de la Viabilidad Celular.	30
Conteo Celular y Evaluación de Viabilidad por Azul Tripano.	32

Proliferación Celular.....	36
Determinación de la proliferación celular con Cell Proliferation Dye eFlour (CPDF)-670®	37
Técnica para evaluar la proliferación con CPDF-670.....	37
Citometría de Flujo.....	39
Conceptos Básicos de la CF.....	39
Funcionamiento General del CF.	40
Preparación de las CMN para la adquisición en el citómetro de flujo.	41
Adquisición de las CMN en el citómetro de flujo.	42
Técnica de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)	45
El ensayo de ELISA posee las siguientes características:.....	45
Técnica de ELISA	46
Cuantificación del ensayo de Elisa.....	50
Principio del Test UV cinético.	59
Técnicas Biología Molecular.	62
Técnica qPCR.....	65
PCR Punto Final.	67
Técnica PCR punto final.	69
CONCLUSIONES	71
BIBLIOGRAFÍA.	72

ABREVIATURAS

ADA	Asociación Americana de Diabetes
ACV	Accidente Cerebro Vascular
EAP	Enfermedad Arterial Periférica
ERC	Enfermedad Renal Crónica
CMN	Células Mononucleares
CMSP	Células Mononucleares de Sangre Periférica
DM	Diabetes mellitus
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
FID	Federación Internacional de Diabetes
ELISA	Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzima (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
HTA	Hipertensión Arterial
IAM	Infarto Agudo De Miocardio
Ig	Inmunoglobulina
HAS	Hipertensión Arterial Sistémica
IFN- γ	Interferón- γ
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-17	Interleucina-17
IL-1 β	Interleucina-1 β beta

IL-2	Interleucina-2
IL-22	Interleucina-22
IL-4	Interleucina-4
IMC	Índice de Masa Corporal
LT	Linfocitos T
LDL	Colesterol de baja densidad
MCP-1	Factor Químico atrayente de Monocitos-1
mg/dL	Miligramos por decilitro
mmol/L	Milimol por litro
mmol/mol	Milimol por mol
NK	Células Asesinas Naturales
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PA	Presión Arterial
PD	Presión Arterial Diastólica
PS	Presión Arterial Sistólica
RANTES	Quimiocina de regulación por activación expresada y secretada por los linfocitos T.
SM	Síndrome Metabólico
Th	Linfocitos T cooperadores
Th1	Linfocitos T cooperadores tipo 1
Th17	Linfocitos T cooperadores tipo 17
Th2	Linfocitos T cooperadores tipo 2
TLR	Receptor tipo Toll

TCR	Receptor de Células T
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral- α
TNF- β	Factor de Necrosis Tumoral- β
VFG	Velocidad de Filtración Glomerular
VLDL lipoproteins.	Lipoproteínas de muy baja densidad, del inglés very low density lipoproteins.
μ M	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Gradiente de densidad con el reactivo Ficoll-Hypaque.....	28
Figura 2	Toma de muestra de sangre periférica.....	29
Figura 3	Separación de células mononucleares con Ficoll Hypaque.....	30
Figura 4	Técnica de Conteo Celular y Evaluación de Viabilidad por Azul Tripano.....	33
Figura 5.	Conteo Celular y Evaluación de Viabilidad por Azul Tripano.....	33
Figura 6.	Conteo Celular y Evaluación de Viabilidad por Azul Tripano.....	33
Figura 7.	Conteo Celular y Evaluación de Viabilidad por Azul Tripano.....	34
Figura 8.	Conteo Celular y Evaluación de Viabilidad por Azul Tripano.....	34
Figura 9.	Conteo Celular y Evaluación de Viabilidad por Azul Tripano.....	34
Figura 10.	Representación en tubo de CMN.....	35
Figura 11.	Histograma de número de células vs linfocitos T cooperadores.....	35
Figura 12.	Dot Plot de FoxP3 vs CD25 marcadores con APC y PE.....	42
Figura 13.	Técnica de ELISA.....	44
Figura 14.	Técnica de ELISA.....	44
Figura 15.	Técnica de ELISA.....	44
Figura 16.	Técnica de ELISA.....	44

Figura 17.	Técnica de ELISA.....	47
Figura 18.	Técnica de ELISA.....	47
Figura 19.	Técnica de ELISA.....	47
Figura 20.	Técnica de ELISA.....	48
Figura 21.	Técnica de ELISA.....	48
Figura 22.	Ejemplificación de curva estándar donde se interpolan los valores de las absorbancias problema para así obtener un valor cuantitativo, en este ejemplo, concentración.....	49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Valores del Índice de Masa Corporal.....	13
Tabla 2	Valores óptimos de glucosa.....	52
Tabla 3	Valores óptimos de triglicéridos.....	53
Tabla 4	Valores de Colesterol.....	57
Tabla 5	Comparación de PCR convencional y PCR en tiempo real.....	64

Abstract.

The multidisciplinary or research laboratories are places indicated and designated to the realization of activities, formative-experimental, directed to corresponding tests in research projects that in most cases involve biochemical determinations, and/or basic immunological different, taking into account that there are different fields and/or areas of experimentation that can have as objective new discoveries and advances in science, depending on the objective and needs of research, each laboratory is provided according to the type of research to be performed, including equipment, environmental control, etc., Because the laboratory encourages the student to understand, explain, create, and design projects that enrich such learning. Working in the laboratory implies assuming certain responsibilities on the part of the one who performs the experiment, that is why within this document different biochemical, cellular and molecular techniques are provided that lead to clinical research within the laboratory, which is mainly directed to students of the School of Pharmacy, subsequently ensuring that such tests and / or experiments are carried out in a feasible, reproducible, with proper execution and operation ensuring the quality of each result required by the student, according to the conceptualized, it was sought to ensure a better effectuation and optimization of the results of the experiments, and to guarantee the quality of the results.

Resumen.

Los laboratorios multidisciplinarios o de investigación son lugares indicados y designados a la realización de actividades, formativas-experimentales, dirigidas a ensayos correspondientes en proyectos de investigación que en el mayor de los casos implican determinaciones bioquímicas, y/o inmunológicas básicas diferentes, tomando en cuenta que existen diferentes campos y/o áreas de experimentación que pueden tener como objetivo nuevos descubrimientos y avances en la ciencia, en función del objetivo y las necesidades de la investigación, cada laboratorio se suministra según el tipo de investigación que se vaya a realizar, incluyendo el equipamiento, el control del entorno, etc., Debido a que el laboratorio incita al alumno a comprender, explicar, crear, y diseñar proyectos que enriquecen dicho aprendizaje. Trabajar en el laboratorio implica asumir ciertas responsabilidades por parte del que efectúa el experimento, es por ello que dentro de este documento se proporcionan diferentes técnicas bioquímicas, celulares y moleculares que conllevan a la investigación clínica dentro del laboratorio, el cual se dirige principalmente a los alumnos de la Facultad de Farmacia, posteriormente garantizando que dichos ensayos y/o experimentos sean llevados a cabo de manera factible, reproducible, con su debida ejecución y funcionamiento asegurando la calidad de cada resultado que requiera el alumno, de acuerdo con lo conceptualizado, se buscó garantizar una mejor efectuación y optimización de las técnicas, las cuales fueron basadas desde sus los principios básicos, para así hacerlos comprender de mejor manera, entonces estas metodologías proporcionarán al alumno elementos factibles y didácticos asegurando la accesibilidad de búsqueda y comprensión de cada técnica.

INTRODUCCIÓN.

Un laboratorio tanto de investigación como de docencia representan áreas de trabajo y dentro de ésta, se pueden llevar a cabo experimentos, que van desde ensayos, prácticas, y trabajos de carácter científico y/o tecnológico, dentro de estos trabajos destacan análisis y determinaciones para el diagnóstico clínico, bioquímico, toxicológico, inmunológico, tales como ELISA, obtención y separación de células mononucleares por gradiente de Ficoll y Ficoll-Hypaque, determinación y cuantificación de la viabilidad celular, evaluación de la actividad citotóxica, etc. Las pruebas diagnósticas son fundamentales para la identificación de enfermedades y procesos patológicos que afectan a la población en general.

El concepto de laboratorio se asocia a la idea de experimentación, sin embargo, los instrumentos en el laboratorio no solo se usan en una sola disciplina y pueden cumplir con diversos objetivos, de acuerdo con los intereses y objetivos de acuerdo a los proyectos de investigación que se realicen en el laboratorio y áreas de estudio. Un ejemplo de lo anterior es el área de investigación, que se divide en diversas especialidades, diferenciadas por su función y objetivo, así como por las necesidades de los proyectos que se desarrollen. Es relevante destacar que incluso los laboratorios que coinciden en el mismo campo del conocimiento o especialización pueden tener sutiles y significativas diferencias, particularmente hablando de los laboratorios clínicos y químicos, existe una notoria diferencia, mientras que los primeros son especialistas en el estudio de los parámetros y propiedades biológicas, los segundos analizan las propiedades químicas de las sustancias, compuestos o elementos.

Un laboratorio de investigación es un espacio establecido con ciertas condiciones e infraestructura que permitan desarrollar pruebas especiales y la utilización de técnicas sofisticadas, que, de manera particular, en el área biomédica, es indispensable para la generación y aplicación del conocimiento, así como en el trabajo técnico que dará como resultado el entendimiento de los procesos fisiológicos y/o patológicos de la población.

Dentro de las diversas áreas del laboratorio de investigación se encuentra el laboratorio clínico que contribuye al estudio, prevención, diagnóstico y tratamiento de problemas de salud, esto se efectúa con la utilización de diversas metodologías apoyado por diversas disciplinas. (Heskouri, 2022)

Respecto al equipamiento se identifican instrumentos de medida y observación básicos e imprescindibles, tales como material de cristalería, centrífugas, microcentrífugas de mesa, vórtex, set de micropipetas automáticas, agitadores, balanzas analíticas, estufas de secado, estufas de incubación, baño de incubación, congelador de -20°C, microscopios ópticos, entre otros. (Heskouri, 2022)

De manera particular, este trabajo está dirigido a los alumnos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) y principalmente a los del laboratorio 9, el cual se especializa en el estudio de los mecanismos celulares y moleculares del sistema inmunológico en enfermedades crónicas degenerativas, principalmente, diabetes, obesidad y síndrome metabólico, por lo que se han realizado trabajos enfocados en la determinación y análisis de los niveles circulantes de moléculas de adhesión, asociadas a inflamación en pacientes con diabetes, así como el estudio de medicamentos usados en contra de la diabetes y que podrían reposicionarse ya que han mostrado propiedades en contra de lípidos, propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras; otros trabajos han involucrado el estudio de la expresión o inhibición de moléculas y poblaciones celulares de importancia inmunológica en diabetes y muy recientemente en cáncer, donde se observa un efecto en la regulación de biomarcadores. Finalmente se ha iniciado la implementación de técnicas de biología molecular para la determinación de miRNA's.

Sistema inmunológico.

El sistema inmunológico es un conjunto de órganos, tejidos, células y moléculas que interaccionan y forman un frente común para integrar la llamada respuesta inmunológica. La inmunidad es el estado de resistencia que tienen ciertos seres vivos ante un reto antigénico que proviene de microorganismos u otras sustancias extrañas o inherentes como sucede en enfermedades autoinmunes (Vega-Robledo GB., 2008). La respuesta inmunológica a estos estímulos tiene un orden y un tiempo de aparición por lo que se puede dividir en dos: innata (inespecífica) y adaptativa (adquirida o específica).

Inmunidad Innata.

La inmunidad innata o inespecífica es la primera línea de defensa contra agentes externos. La piel actúa como una efectiva barrera que impide el paso de los microorganismos patógenos, no sólo de manera físicomecánica, sino por la presencia de ácidos grasos que dificultan e impiden la proliferación bacteriana. La boca, el estómago y el intestino también forma parte de este sistema inespecífico de defensa, las bacterias que llegan a la boca son retenidas en parte por fijación a la secreción que recubre el epitelio bucal, las que llegan al estómago sufren la acción bactericida del ácido clorhídrico secretado en este órgano y la nariz, la nasofaringe y las vías respiratorias altas, por su estructura anatómica y su capa de células con movimiento ondulatorio, actúan como elementos defensivos barriendo la capa mucosa que las recubre. También, el parpadeo y las lágrimas limpian la superficie ocular y eliminan las bacterias que pudieran hallarse en ella. El tracto genitourinario en el hombre arrastra la mayor parte de los microorganismos por la orina; en la mujer, la vagina posee una microbiota rica en lactobacilos, lo que origina un medio con pH bajo que impide la proliferación de otros microorganismos (Guyton A. y Hall J., 2001).

Cabe mencionar que dentro de la respuesta inmunitaria innata participan importantes elementos como las citocinas, quimiocinas, leucocitos como los neutrófilos, monocitos/macrófagos y células asesinas naturales (NK). Así mismo, las proteínas de fase aguda juegan un importante papel en esta respuesta (Black PH. et al., 2003). La reacción inicial de la inmunidad innata es la respuesta inflamatoria, en la que los leucocitos son atraídos hacia la zona del estímulo físico o del reto antigénico. En el proceso inflamatorio se destruyen los microorganismos patógenos al reclutar a las células efectoras activadas hacia los tejidos infectados (Xu J. et al., 2013). Los macrófagos son parte fundamental en esta respuesta y participan en la homeostasis al reparar, modelar e inducir la angiogénesis de los tejidos; están involucrados en la respuesta inflamatoria y en el inicio y la regulación de la inmunidad adaptativa a través del procesamiento y presentación de antígeno, Los macrófagos se pueden considerar proinflamatorios y antiinflamatorios. Los

proinflamatorios son productores de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), además participan en contra de células tumorales y secretan el factor de necrosis tumoral alfa (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β , IL-6 e IL-12 que promueven la generación de linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1). Mientras que el tratamiento con IL-4 o IL-13 induce macrófagos M2 (macrófagos activados por la vía alterna), los cuales secretan interleucinas antiinflamatorias como la IL-10, promoviendo la generación de linfocitos T cooperadores tipo 2 (Th2). (Branco M., 2011).

Inmunidad Adaptativa.

La respuesta inmunológica adaptativa o específica se divide en dos grandes ramas, la inmunidad humoral y la inmunidad celular. La primera está sustentada por los linfocitos B cuya función es la producción de anticuerpos luego de su diferenciación a células plasmáticas. Los LB también cumplen la función de CPA. Por otra parte, los linfocitos T (LT) CD4+ denominados cooperadores o de ayuda, Th por sus siglas en inglés (T helper lymphocyte) y CD8+ denominados citotóxicos, TC por sus siglas en inglés (T cytotoxic lymphocyte) por su función efectora encargada de eliminar células infectadas o tumorales juegan un papel fundamental en la inmunidad celular. Estas células cumplen un proceso de maduración y de educación en el timo. Los LT se identifican por la presencia del receptor de antígeno en la superficie denominado receptor de células T (TCR) y el complejo asociado CD3. Estos, a su vez, se dividen en diferentes subpoblaciones caracterizados por la síntesis particular de ciertas citocinas, por ejemplo, linfocitos T CD4+ Th1 productores de IFN- γ , IL-2 y factor de necrosis tumoral beta (TNF- β) producidas contra patógenos intracelulares, Th2 productores de IL-4, IL-6 e IL-13 contra helmintos, Th17 productores de IL-17 e IL-22, que se desarrollan en infecciones por bacterias extracelulares y hongos, entre otras clonas perfectamente caracterizadas. Los LT CD4+ también ejercen su efecto cooperador sobre los LT CD8+ citotóxicos, a través del reconocimiento antigénico y la coestimulación de las CPA y la señalización inducida por IL-2 de los linfocitos Th1 (Branco M., 2011).

Obesidad.

De acuerdo con la OMS, la obesidad es una enfermedad crónica, caracterizada por el aumento de la grasa corporal, lo que se asocia con mayor riesgo para la salud, pocas enfermedades crónicas han avanzado en forma tan alarmante en la mayoría de los países durante las últimas décadas como ha ocurrido con la obesidad, motivo de preocupación para las autoridades de salud debido a las nefastas consecuencias físicas, psíquicas y sociales. (Manuel Moreno, 2012)

A partir de la perspectiva antropométrica, que es la habitualmente utilizada en clínica, una persona obesa tendrá un índice de masa corporal (IMC) ≥ 30 kg/m². En la actualidad el empleo de la impedanciometría multifrecuencia (estimaciones de los volúmenes de líquido de los diferentes compartimentos corporales), tiene un impacto complementario a la valoración antropométrica para la estimación de la composición corporal y grado de adiposidad. En función del porcentaje graso corporal, se define como sujetos obesos aquellos que muestran porcentajes por encima del 25% en los hombres y del 33% en las mujeres. Los valores comprendidos entre 21 y 25% en los hombres y entre 31 y 33% en las mujeres se consideran límites. Los valores normales son del orden del 12 al 20% en varones y del 20 al 30% en las mujeres. (Manuel Moreno, 2012)

Clasificación de la Obesidad.

La obesidad se clasifica en tres grupos: Etiológica, dependiente del IMC, debida a la disposición topográfica de la acumulación de grasa. Cabe resaltar que, dentro de la clasificación etiológica, se enfatiza por su frecuencia. Dentro de esta clasificación se incluyen también la obesidad de origen endocrinológico, hipotalámico, genético, e inducida por fármacos. (Kaufer-Horwitz & Pérez Hernández, 2021)

Clasificación Etiológica.

Actualmente se sabe que la obesidad se produce cuando coinciden en una misma persona la predisposición genética y factores ambientales desencadenantes.

Obesidad Ovárica: Se percibe en el síndrome de Stein-Leventhal que se caracteriza por oligomenorrea o amenorrea, hirsutismo y aumento progresivo de peso. La causa de la alteración endocrinológica del ovario es compleja y no del todo conocida. (Fernández-Morales, 2005)

Hiperinsulinemia: En diabetes tipo 2 con hiperinsulinemia o bien diabetes tipo 2 en pacientes que requieren insulina. Esto se debe a que la insulina es una hormona anabolizante que favorece la síntesis de grasa y su depósito en el tejido adiposo. (Rojas et al., 2008)

Hiperfunción suprarrenal: Aumento de la producción de glucocorticoides como sucede en la enfermedad o síndrome de Cushing que conlleva un incremento de peso con una distribución característica de la grasa en la región faciotroncular del cuerpo. (FID, 2019)

Hipotiroidismo: Relacionada con el incremento de peso.

De origen Hipotalámico: Este tipo de obesidad ha sido demostrado en experimentación animal. (Poco frecuente en humanos). Se obtiene, en animales de laboratorio, cuando se lesiona el núcleo ventromedial del hipotálamo, esta lesión provoca hiperfagia y, como consecuencia, obesidad, esta se ve asociada a traumatismos, tumores, infecciones, cirugía, etc. (Quesada et al., 2021)

De origen genético: Causada principalmente por anomalías cromosómicas. Son síndromes de inusual aparición que cursan con obesidad (Prader-Willi, Ålstrom, Carpenter, Cohen, Bardet-Biedl).

Por medicamentos: Determinados fármacos pueden provocar o aumentar el grado de obesidad. Algunos son glucocorticoides utilizados como inmunosupresores para tratar enfermedades autoinmunes. (Danza et al., 2021)

Los estrógenos: (anticonceptivos orales). Se piensa que el aumento de peso se relaciona a una retención hídrica que a un incremento del tejido adiposo. (Pedersen BK, 2003).

Las hidracidas: Empleadas en la terapia de la tuberculosis son potencialmente encargadas del aumento de peso que padecen los pacientes después de empezar dicho tratamiento. (Danza et al., 2021)

La insulina: Particularmente cuando es requerida en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. (Antonio-Arques et al., 2021)

Antidepresivos tricíclicos y en particular la amitriptilina; Especialmente las fenotiacinas y otros psicofármacos también pueden favorecer el depósito de grasa en el tejido adiposo. (Heerlein, 2002)

De acuerdo al Índice de Masa Corporal (IMC) se establece un índice que relaciona el peso del individuo expresado en kg entre la altura expresada en m² (Tabla 1). (Oleas Galeas et al., 2017)

Tabla 1. Valores del IMC

Valores límites del IMC

<18.5	Peso insuficiente
18.5-24.9	Normopeso
25-26.9	Sobrepeso grado I
27-29.9	Sobrepeso grado II (probesidad)
30-34.9	Obesidad tipo I
35-39.9	Obesidad tipo II
40-49.9	Obesidad tipo III (Mórbida)
≥50	Obesidad tipo IV (Extrema)

$$\text{IMC} = \text{Peso (Kg)} / \text{Altura}^2 \text{ (m)}$$

Valores del IMC Galeas et al., 2017)

De acuerdo con la disposición topográfica de la acumulación de grasa:

La distribución del acumulo de grasa puede tener una influencia superior, obesidad central o androide o inferior, obesidad periférica o ginoide. En la primera, más

relacionada con el sexo masculino, la grasa se acumula sobre todo en la cara, región cervical, tronco y región supraumbilical, aumenta de modo notable la grasa abdominal profunda (obesidad visceral). Este tipo de acumulación grasa es el que está ligado a las complicaciones metabólicas y cardiocirculatorias vinculadas a la resistencia de insulina, por lo cual se induce un síndrome plurimetabólico. Con respecto a la obesidad periférica o ginoide, más propia de las mujeres, la grasa se acumula en la parte inferior del cuerpo: región infraumbilical del abdomen, caderas, región glútea y muslos. (Pérez Miguelsanz et al., 2010)

La diferenciación entre estos dos tipos de acumulación adiposa tiene gran importancia desde el punto de vista clínico para poder valorar el grado de riesgo metabólico y cardiovascular vinculado a la acumulación adiposa. (Kasper D. et al., 2005).

Sobrepeso.

El peso normal es un valor individualizado que depende de diversos factores: fisiológicos (edad, género, talla, etc.), genéticos, patológicos e incluso culturales. Existen diversos métodos que intentan estandarizar el peso normal del individuo combinando los factores fisiológicos entre sí. La más utilizada es la que se basa en el índice de Quetelet o índice de masa corporal (IMC). El IMC se calcula de la siguiente forma:

$$\text{IMC} = \text{peso (kg)} / \text{talla}^2 \text{ (m)}$$

De acuerdo a la OMS, se considera que un individuo tiene sobrepeso cuando su índice de masa corporal (IMC) se encuentra entre 25kg/m² y 29,9kg/m².

El sobrepeso y la obesidad son desencadenantes imprescindibles de la interacción entre factores genéticos y ambientales (sólo en ocasiones se debe a otras causas de origen endocrino, asociadas a síndromes genéticos, tumores, infecciones, etc.)

Existe información dirigida a que estas afecciones se centran en la leptina, adipocitocina secretada por el tejido adiposo con efecto activador de la síntesis de melanocortinas e inhibidor del neuropéptido, por lo cual se produce un efecto inductor de la anorexia; la alteración genética tanto en esta citocina como en su receptor dará lugar a la obesidad. (Sánchez-Muñoz et al., 2005)

Las posibles complicaciones derivadas del sobrepeso y la obesidad están fuertemente relacionadas con la distribución de grasa en el cuerpo y llevan consigo una serie de problemas asociados, entre los que destacan:

- Físicos: Diabetes mellitus, dislipemias, hipertensión arterial, etc.
- Psíquicos: Deño de autoestima, depresión, ansiedad, etc.
- Sociales: Rechazo social, discriminación laboral, etc.
- Económicos: Costos relacionados al gasto sanitario.

Enfermedades como diabetes, HTA, alteraciones lipídicas, aterosclerosis, así como sus consecuencias: trombosis, hemorragia cerebral, infarto de miocardio, etc. aparecen con más frecuencia en personas con sobrepeso que en personas con peso normal. (ADA, 2006).

Datos y cifras sobrepeso y obesidad.

En relación con los datos recabados por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del año 2022 (ENSANUT 2022), se ha observado que el sobrepeso y la obesidad han crecido de manera significativa en todos los grupos de la población, ya que la ganancia excesiva de peso da inicio desde los primeros cinco años de vida, entre un 7 y 8%.

Conforme a la población adolescente, entre 12 y 19 años, hubo un aumento del 24% en el año 2022, con una prevalencia de 41.1%. En estos últimos casos no hay diferencias importantes entre géneros. (La salud de los mexicanos en cifras: resultados de la ENSANUT, 2022)

Asimismo, 75.2% de las personas mayores de 20 años presentan sobrepeso y obesidad, y la proporción es mayor en mujeres (76.8%) que en hombres (73.5%).

Es de enfatizar que la prevalencia de obesidad aumentó 21.4% en el periodo que va de 2006 a 2022. Otro dato por acentuar es que el grupo correspondiente a los adultos de 40 a 60 años es el que concentra las prevalencias significativas más altas (85%). (La salud de los mexicanos en cifras: resultados de la ENSANUT, 2022)

Hoy en día, la mitad de todas las mujeres con obesidad viven en 11 países, mientras que la mitad de todos los hombres que viven con obesidad viven en 9 países. En ambos casos, México se encuentra en dicha lista; se estima que para la cifra global actual aumente en 150 millones para el año 2030. (Cruz Sánchez et al., 2013)

La ENSANUT 2022 señaló también que la prevalencia de diabetes diagnosticada es de 12.6%, y la no diagnosticada, de 5.8%; es decir, 18.4% de la población mayor de 20 años padece diabetes en México, y se estima que 31.7% de las personas con esta enfermedad desconoce su diagnóstico; en menores de 40 años el porcentaje llega a 65.6%, y en adultos mayores de 60 años, a 18.1%.

Por otro lado, la hipertensión arterial (tensión arterial sistólica mayor a 140 mmHg o tensión arterial diastólica mayor a 90 mmHg) se presenta en 29.4% de los adultos en México: al momento de la encuesta, 16.5% de los hipertensos registrados contaban con un diagnóstico previo, y 12.9% de los casos fueron identificados como parte de los hallazgos de la encuesta. Entre los factores de riesgo asociados a este padecimiento están: ser hombre, tener una edad mayor, una menor escolaridad y tener diagnóstico de diabetes. Un tercio de los adultos con hipertensión no toma medidas para monitorear y controlar su tensión arterial. (La salud de los mexicanos en cifras: resultados de la ENSANUT, 2022)

Obesidad Infantil en México.

Es evidente que la obesidad infantil en México es un problema de salud pública complejo del siglo XXI, ya que ha ido en aumento en los últimos años de forma alarmante, acorde al World Obesity Atlas, México se encuentra entre los primeros

lugares en obesidad infantil, ya que en 2030 más de 100 millones de infantes padecerán obesidad. (Cruz Sánchez et al., 2013)

Dicho problema está presente no solo en la infancia y la adolescencia, sino también en la población preescolar, acarreado esta problemática en la edad adulta, teniendo una alta probabilidad de contraer padecimientos crónico-degenerativos a edades aún más tempranas, tales como presión arterial elevada y alto nivel de colesterol, diabetes, problemas en las articulaciones, incluida la osteoartritis, problemas respiratorios y apnea del sueño.

En México la población infantil de 5 a 11 años registra una prevalencia de sobrepeso mayor en la región norte del país (20%); mientras que en la Ciudad de México (Zona Metropolitana del Valle de México, conformada por la Ciudad de México más municipios conurbados del Estado de México) se ubican las prevalencias más altas para los grupos de 12 a 19 años (32%) y 20 años o más (41%), lo anterior, de acuerdo con el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF).(INEGI, 2020)

El World Obesity Atlas arroja que, de no tomar medidas, en 2030 la obesidad afectará a más de 100 millones de infantes de 5 a 9 años y a más de 150 millones de adolescentes de 10 a 19 años en todo el mundo.

El Laboratorio de Datos contra la Obesidad (LabDO) resaltó los datos de la Ensanut 2022 donde la prevalencia nacional de sobrepeso de niños de 5 a 11 años fue de 18.8%, en tanto que la de obesidad fue de 18.6%, mientras que el indicador de sobrepeso se encontró en 7.8% de las y los menores de 5 años. (La salud de los mexicanos en cifras: resultados de la Ensanut 2022, s/f)

De acuerdo con un artículo del sistema de atención médica Stanford Medicine Children's Health, señala que los factores de riesgo que determinan la obesidad infantil pueden ser genéticos, socioeconómicos, metabólicos, y elecciones de estilo de vida, entre otros, además de que algunos trastornos endócrinos, enfermedades y medicamentos pueden influir en el peso de una niña o niño. (Stanford Medicine Children's Health 2023, s/f)

World Obesity Atlas resalta que esta condición también acarrea problemas psicosociales como baja autoestima y, en consecuencia, afectaciones en su vida social y su salud emocional.

Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que el sobrepeso y la obesidad, así como enfermedades no transmisibles vinculadas, pueden prevenirse en su mayoría. (La salud de los mexicanos en cifras: resultados de la Ensanut 2022, s/f)

Obesidad, inflamación y RI.

Es fundamental la participación de las células del sistema inmune en la etiología de la resistencia a la insulina y DM2 a través de la inflamación del tejido adiposo. Está señalado que la obesidad lleva a la hipoxia del tejido adiposo y estrés oxidativo, conduciendo a la disfunción de los adipocitos y a la inflamación, el estrés oxidativo puede disparar múltiples vías de señalización, incluyendo NF- κ B y JNK-AP1, las cuales pueden influir en la regulación o disfunción del metabolismo y la inflamación. Por otra parte, la muerte de los adipocitos puede ocurrir en situaciones extremas de obesidad, cuando los adipocitos crecen en exceso y son incapaces de obtener sus requerimientos de oxígeno debido a la hipoxia local. Los restos de los adipocitos al morir son reconocidos por células presentadoras de antígenos, específicamente macrófagos, pero sin excluir a las células B y a otras células, ya que los macrófagos son activados por la interacción de los ácidos grasos y restos apoptóticos a través de las vías de señalización de los Long Terminal Repeat (TLR por sus siglas en inglés) y opsoninas. La vía de señalización a través del TLR4 promueve la diferenciación de los macrófagos hacia el fenotipo M1, conduciendo a la producción local de citocinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 y algunas moléculas quimioatrayentes como MCP-1 y RANTES. Consecuentemente, las quimiocinas reclutan monocitos, los cuales se diferencian a macrófagos con fenotipo M1, y de esta manera incrementan aún más su proporción. Asociado a este incremento de adipocinas, citocinas y quimiocinas en el tejido adiposo de individuos obesos, los linfocitos T CD8+ son activados, posiblemente por la

interacción con macrófagos o células dendríticas, produciendo y secretando citocinas proinflamatorias e incrementando la estimulación, reclutamiento y diferenciación de macrófagos M1, así como la diferenciación de células Th0 a Th1, junto con el aumento de la expresión de IFN- γ , lo que también induce la diferenciación hacia macrófagos M1, posteriormente la Inhibición de células Tregs y macrófagos M2 implica incremento de la inflamación.

En circunstancias de obesidad, el reclutamiento y activación de macrófagos M1, mastocitos, neutrófilos, células Th1, Th17, células B y células T CD8+ inclinan la balanza a su favor, resultando en la inducción de una inflamación excesiva, con producción aumentada de citocinas proinflamatorias, las cuales actúan en distintas células inhibiendo la vía de señalización de la insulina y, por lo tanto, la entrada de glucosa a las células, provocando resistencia a la insulina y posteriormente la DM2. (Gabay C, 1999).

Resistencia a la Insulina.

Se define como resistencia a la insulina (RI) a la disminución de la acción de la insulina a nivel celular, lo que produce alteraciones en el metabolismo de azúcares, lípidos y proteínas. Frente a la RI el páncreas aumenta la secreción de insulina produciendo un estado de hiperinsulinismo compensatorio. (Castillo, 2015).

Durante las condiciones de ayuno, la producción hepática de la glucosa ayuda a mantener concentraciones normales de glucosa en la sangre. El hígado produce glucosa a través de la glucogenólisis y la gluconeogénesis. Después de una comida, el intestino se convierte en la fuente principal de glucosa, lo que aumenta la disponibilidad de la glucosa en el páncreas. Esto, a su vez, estimula el páncreas para secretar insulina. Esta hormona regula el transporte de glucosa y el metabolismo en tejidos blanco: el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo para mantener en última instancia, la normoglucemia. Específicamente, la insulina suprime la producción hepática de glucosa a través de la inhibición del gluconeogénesis y glucogenolisis; y aumenta la síntesis de glucógeno hepático. Además, los principales efectos de la insulina en el músculo esquelético son

umentar la captación de glucosa y su utilización. Por último, la insulina inhibe la lipólisis y la lipogénesis en el tejido adiposo (TA). Por lo tanto, un estado de RI se caracteriza por alteraciones en la supresión mediada por insulina de la producción hepática de glucosa, eliminación de glucosa en el músculo esquelético y la inhibición de la lipólisis. Esto conduce a la hiperglucemia relativa y posteriormente DM2 (Kalupahana NS. et al., 2012).

Diabetes

La diabetes es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglucemia. Esta puede ser consecuencia de defectos en la secreción de insulina, en su acción, o en ambas. La hiperglucemia crónica se asocia con daño a largo plazo en diferentes órganos, especialmente en los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. (León, et al, 2015; Sanzana y Durruty, 2016; Rodríguez 2017).

Esta enfermedad aparece cuando el organismo no puede producir suficiente insulina o utilizarla eficazmente (Harris M. y Zimmet P., 1997). Los síntomas significativos de la enfermedad son, sed, poliuria, visión borrosa y pérdida de peso, los cuales no son graves o no se aprecian tangiblemente, por lo que es frecuente que el diagnóstico sea tardío. La diabetes está asociada a variadas dificultades, que pueden ser agudas (metabólicas o infecciosas) o crónicas y estas a su vez pueden ser micro o macro vasculares como es el caso de la arteriosclerosis que afecta a las arterias en general produciendo enfermedad cardíaca coronaria, cerebrovascular y vascular periférica, microvasculares, que incluiría la retinopatía, nefropatía y neuropatía. (Reinauer H. et al., 2003).

En el año 2021, 537 millones de adultos, es decir, 1 de cada 10 entre 20 y 79 años, viven con diabetes. Se prevé que este número aumente a 643 millones para 2030 y 783 millones para 2045. Entre 2000 y 2019, las tasas de mortalidad por diabetes normalizadas por edades aumentaron en un 3%. (et al., Día Mundial de la Diabetes 2021).

Como se mencionó anteriormente, la diabetes es una enfermedad que tiene complicaciones importantes como ceguera, insuficiencia renal, infarto de miocardio,

accidente cerebrovascular y amputación de los miembros inferiores. En 2019, la diabetes y la nefropatía diabética causaron 2 millones de defunciones. (Versión Online del Atlas de la Diabetes de la FID. Novena edición 2019. pág. 4)

La alimentación saludable, el ejercicio físico regular, el mantenimiento de un peso normal y la evitación del consumo de tabaco previenen la diabetes de tipo 2 o retrasan su aparición. Sin embargo, es posible su tratamiento y evitar o retrasar sus consecuencias por medio de la actividad física y una alimentación sana, con un tratamiento adecuado y el monitoreo periódica y permanente. (et al., IDF diabetes atlas 2022)

Por otro lado, la insulina es una hormona producida en el páncreas que permite que la glucosa de los alimentos sea metabolizada en las células del cuerpo, donde posteriormente se convierte en la energía necesaria para la función de los músculos y tejidos. Un déficit en su producción y/o deterioro de las células β pancreáticas son claves en el desarrollo de la hiperglucemia. El inicio de la enfermedad, la velocidad de progresión y la naturaleza de los factores precipitantes externos y genéticos, varían en los diferentes tipos de diabetes (Eelco JP., et al., 2008).

Clasificación Etiológica de la Diabetes.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido varios sistemas de clasificación para la diabetes mellitus (Wild S, 2000). El sistema de clasificación actual de la OMS se ha establecido en colaboración con la Asociación Americana de Diabetes, basado principalmente en la etiología de la enfermedad.

I. Diabetes tipo 1: Es causada por la destrucción de las células β , lo que produce deficiencia absoluta de insulina. Esta destrucción se produce por dos mecanismos: inmunológico e idiopático.

II. Diabetes tipo 2: Representa el 90% de los casos de diabetes. Se inicia con resistencia a la acción de la insulina y posteriormente se manifiesta la enfermedad por una falla en la síntesis y/o el efecto de esta hormona. Estos dos trastornos se

pueden suceder simultáneamente y se manifiestan de manera variable en cada paciente.

III. Diabetes gestacional: Reside en la intolerancia a la glucosa que se manifiesta en el tercer trimestre del embarazo; es causada por la acción de las hormonas contrarreguladoras que produce la placenta, por la resistencia a la insulina que ocurre en condiciones normales durante el embarazo. (American Diabetes Association, 2006).

IV. Otros tipos específicos de diabetes: Representan alrededor del 1% de los casos y son originados por otras causas como: defectos genéticos en la función de las células β , defectos genéticos en la acción de la insulina, así como patologías del páncreas exocrino que van correlacionadas con la inflamación (pancreatitis aguda, pancreatitis crónica), neoplasia (adenocarcinoma ductal, tumores neuroendocrinos o neoplasias pancreáticas), obstrucción del conducto por cálculos o mucosidad viscosa anormal (fibrosis quística), en muchos de los casos inducida por medicamentos, químicos e infecciones, formas no comunes de diabetes mediadas por inmunidad y otros síndromes genéticos asociados con diabetes (ADA, 2006).

La obesidad, síndrome metabólico y diabetes son tres enfermedades interrelacionadas que comparten mecanismos de aparición y evolución y con frecuencia se van combinando sucesivamente ya que por un lado el síndrome metabólico puede provocar hipogonadismo y disfunción eréctil, mientras que por otro estas alteraciones obligan a una evaluación de riesgo cardiometabólico en el paciente. Aún más, muchas de las terapias para el síndrome metabólico y la diabetes producen y ocasionan complicaciones cardiovasculares. Su prevalencia crece significativamente y debería incitar a los profesionales de la salud a implantar medidas urgentes para prevenir la aparición de complicaciones. Las más eficaces, aunque menos practicadas, son las relacionadas con el estilo de vida. (Suárez de Venegas Sanz et al., 2002)

Dislipidemia.

Se denomina dislipidemia al conjunto de enfermedades asintomáticas que tienen en común concentraciones anormales de lípidos en la sangre, debido a que son principales factores de riesgo para el desarrollo de afecciones cardiovasculares y se encuentran de las cuatro primeras causas de mortalidad en México. Entre los factores desencadenantes se encuentran el consumo excesivo de grasas y azúcares, alcohol, defectos hereditarios, algunos medicamentos, así como enfermedades como diabetes, hipotiroidismo, sobrepeso y obesidad. Los adultos con obesidad tienen una probabilidad cuatro veces mayor de presentar concentraciones altas de C-LDL y TG, y bajas de C-HDL que aquellos con normopeso. (DiPenta JM, 2007). Desde 1988, el hipercolesterolemia se considera un problema de salud entre la población mexicana. La mala alimentación a causa del consumo excesivo de bebidas con alto aporte energético y el abuso de alimentos procesados con elevada densidad energética por su alto contenido en azúcar y grasa, aunada a la reducción en la actividad física, afecta negativamente la salud. En niños mexicanos con obesidad se han detectado cifras elevadas de C-LDL y TG, lo que aumentan significativamente la probabilidad de padecer dislipidemias en la adultez. (Ford ES, 2003; Esteve E, 2005).

Hipertensión Arterial.

La hipertensión arterial es una condición clínica multifactorial que se presenta cuando los vasos sanguíneos ejercen una presión mayor a 140/90 mm Hg; lo que significa que entre más alta sea la fuerza, más se esforzará el corazón para que la sangre circule adecuadamente, y en muchos de los casos es asociada, frecuentemente a alteraciones funcionales y/o estructurales de los órganos como el corazón, encéfalo, riñones vasos sanguíneos y alteraciones metabólicas, con consecuente aumento de riesgo en problemas cardiovasculares fatales y no fatales. (Magrini & Martini, s/f)

Sabemos que la obesidad y el aumento de peso son fuertes e independientes factores de riesgo para la hipertensión; se estima que el 60% de los hipertensos presentan más del 20% de sobrepeso. Entre las poblaciones, se observa el

predominio de la hipertensión arterial aumentada con relación a la ingestión de la NaCl e ingestión dietética baja de calcio y potasio lo que puede contribuir para el riesgo de la hipertensión. Mientras los factores ambientales como el consumo de alcohol, estrés psicoemocional y niveles bajos de actividad física también pueden contribuir a la hipertensión. (Weschenfelder Magrini & Gue Martini, 2012)

El latido cardíaco sólo inyecta sangre en el árbol arterial durante la fase de la sístole ventricular. Esto determina un flujo pulsable sobre las paredes de las arterias. Debido a que la aorta y grandes arterias son distensibles, almacenan en su zona distendida parte de la sangre recibida durante la sístole, la cual es devuelta a la circulación durante la diástole. El hecho anterior determina que también fluya sangre por las arterias durante la diástole, a pesar de que el corazón no expulsa sangre en esa fase. (Ciancaglini, 2004)

El valor máximo de la presión durante la sístole se conoce como PA sistólica (PAS), y el valor mínimo durante la diástole se conoce como PA diastólica (PAD). La PAS depende del déficit cardíaco y la distensibilidad de la aorta y las grandes arterias, esta última se expresa a través de la onda de pulso retrógrada. En cambio, la PAD depende de la resistencia periférica, ya que la PA es una variable biológica y por ende continuo, por lo tanto, no existe un claro e indiscutible punto de corte para definir el umbral bajo el cual los valores de PA son normales. Si bien, existe una relación entre la PA y el riesgo cardiovascular (CV) en que aumenta progresivamente éste último al aumentar los niveles de PA, de tal manera que, de acuerdo a estudios epidemiológicos, el valor óptimo de PA sería de 115/75 mmHg (Ciancaglini, 2004) Esta relación es muy clara, continua y graduada con el desarrollo de enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ECV), ya sea accidente cerebrovascular (ACV), infarto agudo de miocardio (IAM), enfermedad renal crónica (ERC), enfermedad arterial periférica (EAP) y todas las causas de muerte cardiovascular.

Los niveles elevados de PA producen cambios estructurales en el sistema arterial que alteran órganos, tales como cerebro, corazón, riñón, determinando las principales complicaciones de la hipertensión arterial (HTA), que en orden de

frecuencia son: ACV, enfermedad coronaria e insuficiencia cardiaca. (Xinjie, et al, 2019).

Los estados proinflamatorio y protrombótico tienen un papel importante en el síndrome metabólico, ya que se asocian con obesidad e inflamación, donde destaca la hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos, reclutamiento de macrófagos, aumento de la hipoxia, elevación del estrés oxidativo y secreción incrementada de citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-6 y proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1). El estado protrombótico, en el síndrome metabólico, está caracterizado por un aumento del inhibidor del IAP-1 y aumento en los niveles plasmáticos del fibrinógeno, siendo estos dos componentes los más relevantes como factores de riesgo para la arteriosclerosis. El IAP-1 es un factor protrombótico que inhibe la plasmina, evitando la degradación de los coágulos de fibrina; su principal función es promover la acumulación de fibrina en el sitio de la lesión del vaso sanguíneo; sin embargo, también está relacionado en la adhesión y migración celular, en la angiogénesis y la fibrosis, es importante en la remodelación tisular especialmente de la pared de los vasos sanguíneos con arteriosclerosis y en el tejido adiposo, el IAP-1 es producido por el tejido adiposo, siendo la grasa visceral abdominal la más activa en su síntesis, mucho más que el tejido adiposo subcutáneo. Igualmente se ha observado una sobreproducción por parte del hígado graso de pacientes obesos. Las citocinas ejercen un profundo efecto sobre la sensibilidad a la insulina en el hígado, tejidos periféricos y en la homeostasis del endotelio vascular, como se mencionaba anteriormente la IL-6, también conocida como una citocina pleiotrópica, producida por numerosas células del sistema inmune, tejido adiposo omental y subcutáneo. Sus niveles se relacionan con el IMC y la RI. La IL-6 es la principal reguladora de la respuesta proinflamatoria aguda y tiene un papel crítico en la inflamación crónica estimulando la síntesis de Proteína C Reactiva (PCR) y de fibrinógeno, así que el estado protrombótico, tanto en el SM como en la DM2, está dado básicamente por disfunción endotelial, alteraciones en la coagulación, fibrinólisis, e hiperactividad plaquetaria. (Rodríguez López et al., 2017)

Síndrome metabólico.

El síndrome metabólico (SM) se conforma de factores fisiológicos, bioquímicos, clínicos y metabólicos interconectados que aumentan directamente el riesgo de enfermedad aterosclerótica, cardiovascular, diabetes tipo 2 y mortalidad por todas las causas [Grundy SM, et al., 2005; Wilson PWF, et al., 2005; Kaur J, 2014]. El SM se compone de ciertas anormalidades metabólicas como la resistencia a la insulina, la obesidad abdominal, la dislipidemia, la hipertensión arterial y un estado proinflamatorio y protrombótico (Reaven GM, 1988)

JUSTIFICACIÓN.

La importancia de consultar un material de referencia para llevar a cabo ciertos procedimientos radica en que se explique de manera detallada los procesos que se deben ejecutar de principio a fin, esto coadyuvará a minimizar algún tipo de sesgo y/o error, al reducir el tiempo para obtener resultados exitosos con las técnicas empleadas.

Este documento brindará a los alumnos del laboratorio 9 un panorama sencillo al momento de consultarlo, así como la mejor elección de las técnicas a utilizar en el área de inmunología y en general en el de bioquímica clínica. Será una guía para comprender y ejecutar las técnicas que se desarrollan, tanto a nivel licenciatura como en posgrado, lo que ayudará a reducir el tiempo de estandarización y optimizará los resultados en los proyectos académicos o de investigación que los alumnos desarrollen en el laboratorio 9 de esta Facultad.

OBJETIVO GENERAL.

- Desarrollar un manual de técnicas empleadas en el laboratorio de inmunología y el área de bioquímica clínica con aplicación en docencia e investigación dirigida a alumnos de la Facultad de Farmacia.

METODOLOGÍA

1. Para la elaboración del presente manual, se analizaron las diferentes tesis de licenciatura y/o posgrado desarrolladas por los alumnos en el laboratorio 9 de la Facultad de Farmacia a cargo del Dr. Germán Bernal Fernández y se seleccionaron las que de manera constante se han utilizado.
2. La descripción de las técnicas se realizó de manera sencilla y comprensible para facilitar el desarrollo y la obtención de resultados confiables y veraces.
3. Los criterios empleados para seleccionar las técnicas incluidas fueron en función de la frecuencia del uso en los diversos trabajos desarrollados para asegurar la reproducibilidad de resultados, así mismo se seleccionaron las técnicas con base en su utilidad e idoneidad para cumplir con los objetivos de los trabajos.
4. Las descripciones de cada una de las técnicas se muestran a continuación:

TÉCNICAS DE LABORATORIO.

En este documento se incluyen las técnicas utilizadas en el laboratorio 9 de la Facultad de Farmacia con el propósito de que aquellos alumnos que ingresen al área ya sean de licenciatura o posgrado y que precisen de información sobre las técnicas fundamentales y sus procedimientos, obtengan datos claros y precisos de cómo desarrollar sus actividades apoyados en el desarrollo de las diferentes metodologías.

Obtención de Células Mononucleares por gradiente de Ficoll.

La capacidad de aislar células linfoides purificadas ha hecho avanzar mucho el análisis del sistema inmunitario funcional. Este procedimiento se puede realizar a través de un gradiente de densidad con el reactivo Ficoll-Hypaque (Ferrante y Thong, 1980; Vissers et al., 1988). Ficoll-Hypaque es un medio que genera un gradiente de densidad comúnmente usado para aislar células mononucleares provenientes de sangre periférica humana, utilizando un procedimiento de

centrifugación basado en el método desarrollado por Bøyum (Bøyum, A., Scand. J. 1968).

Los linfocitos, monocitos y plaquetas no son lo suficientemente densos para penetrar en las capas del medio de Ficoll-Hypaque. Estas células, por lo tanto, se reúnen como una banda concentrada en la interfase de la muestra. Esta banda permite aislar las células mononucleares para ser recuperadas con un alto rendimiento en un pequeño volumen. (Imagen 1) (Bøyum (Bøyum, A., Scand. J. 1968).

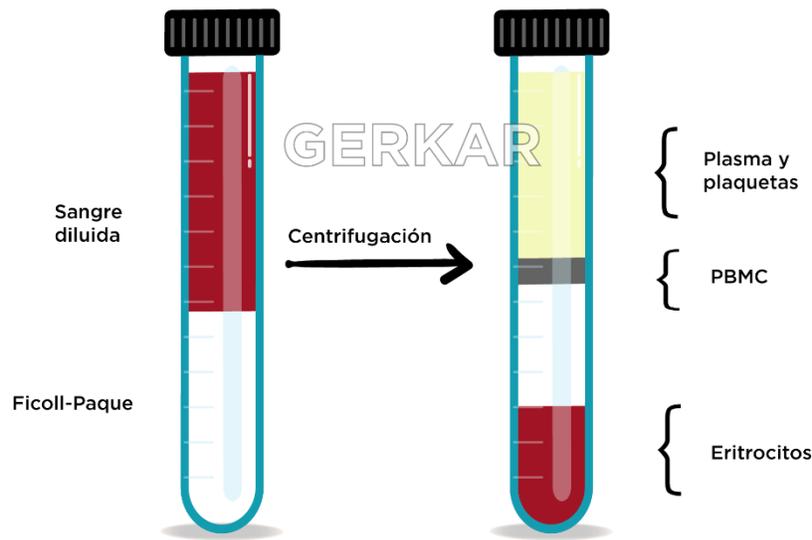


Figura 1. Gradiente de densidad con el reactivo Ficoll-Hypaque

Toma de muestra de sangre periférica.

1. Hacer lavado de manos correspondiente, posteriormente colocarse guantes de látex, como medida de seguridad rigurosa.
2. Colocar la ligadura entre 7-8 cm por encima del punto de punción.

NOTA: La vena más utilizada se localiza en la fosa antecubital. (Imagen 2)

Vena Cubital: Es la más larga y gruesa de todas y es la preferida por bordear la musculatura del brazo.

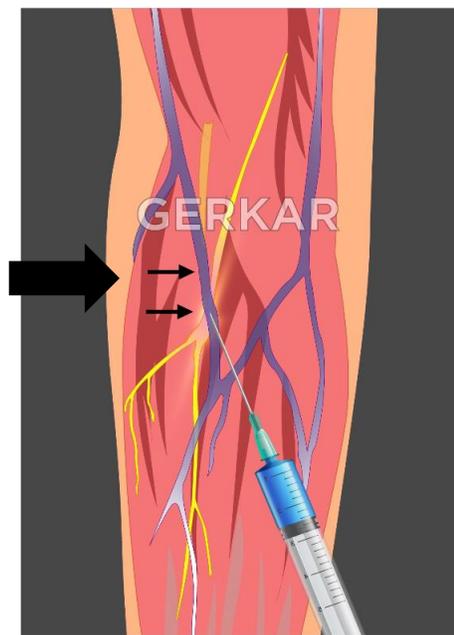


Figura 2. Toma de sangre periférica.

3. Desinfectar la zona con alcohol al 70% u otro antiséptico para evitar la contaminación bacteriana.

NOTA: Dejar secar el alcohol para evitar molestias de irritación.

4. Inmovilizar la vena utilizando el pulgar bajo la zona de punción haciendo tensar la piel.

NOTA: evitar que el paciente se mueva.

5. Supervisar que el bisel de la aguja esté hacia arriba, hacer la punción rápido y firme en un ángulo $<45^\circ$ aproximadamente.

RECOMENDACIÓN: Comprobar que la aguja no incluya bordes ásperos o toscos (sin tocar). Cuando la aguja esté asegurada en la jeringa, aspirar con el émbolo para que la sangre fluya, finalmente retirar el torniquete y colocar un algodón con alcohol en la pequeña lesión producida por la aguja.

NOTA: En caso de utilizar el sistema vacutainer, el tubo puede contener algún aditivo, por ejemplo, EDTA o heparina como anticoagulante o un sistema de fraccionamiento sanguíneo. (Fuss et al., 2009)

Técnica de separación de células mononucleares con Ficoll Hypaque

1. Obtener sangre periférica a través de punción venosa como se indicó.

2. Diluir 1:1 con Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS). A pH 5.5-7.0 (Consultar Apéndice A)
3. En un tubo de 15 mL, añadir 3 mL de Ficoll.
4. Estratificar de 10-12 mL de sangre diluida por cada 3 mL de Ficoll.
5. Cerciorarse de tapar adecuadamente el tubo, posteriormente, centrifugar a 1500 rpm por 30 min.
6. Después de este tiempo y una vez que la centrífuga haya parado (sin freno), retirar los tubos de manera cuidadosa para así evitar mezclar la sangre con el Ficoll. El tubo con la sangre separada tendrá este aspecto (ver imagen 3):

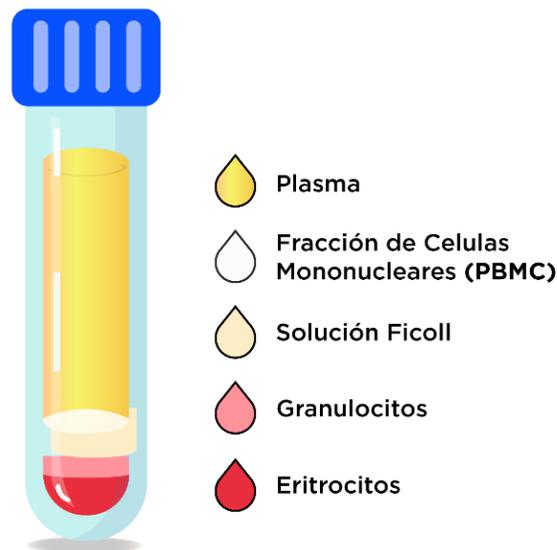


Figura 3 Separación de células mononucleares con Ficoll Hypaque

7. Una vez que se centrifugó la sangre y las células se separaron por el gradiente de densidad, con ayuda de una pipeta Pasteur, retirar la fracción donde se encuentran las células mononucleares.
8. Colocar las CMN en otro tubo y lavarlas con PBS a 4°C, 3 veces; al recogerlas, tener cuidado de no traer la fracción de Ficoll ya que es tóxico e implicaría una disminución en la viabilidad celular. (Bøyum, A et al.,1964)

Determinación de la Viabilidad Celular.

Dentro del análisis celular se debe considerar la viabilidad celular, la cual, hace referencia a las células vivas en una población y que puede evaluarse, analizando

la actividad enzimática, la integridad de la membrana celular y la producción de ATP, entre otros indicadores. (Marcela et al., s/f) Los presentes métodos pueden utilizar lecturas de luminiscencia, fluorescencia o colorimetría como indicadores de la viabilidad celular general o incluso de vías celulares específicas. (Leitnera J, *et al.*, 2003).

En gran medida, aplicaciones de la citometría de flujo se basan en el monitoreo o medición de la fluorescencia. (Frauwirth y Thompson, 2002). Algunas de las aplicaciones más comunes utilizando fluorocromos son el análisis de la viabilidad celular y el estado fisiológico.

La determinación de la viabilidad celular es el conteo de las células vivas (sanas) o muertas en una muestra. Generalmente los métodos de determinación de la viabilidad se basan en el análisis de dos parámetros: actividad metabólica de la célula o integridad de membrana plasmática.

1. La definición de viabilidad en términos de capacidad reproductiva, excluye a células completamente diferenciadas y funcionales como es el caso de células nerviosas y musculares en el caso de eucariontes, y a células vegetativas en el caso de procariontes. En esta situación, la preservación de alguna función celular estaría más acorde con el criterio de viabilidad celular.

2. Mientras que la reproducción celular en un cultivo proporciona una evidencia inequívoca de viabilidad, la falla en reproducir células se puede deber a una falla en el método usado más que a un daño celular.

Una de las formas de evaluar la integridad de la membrana, es el uso de colorantes de exclusión o colorantes de retención. Los colorantes de exclusión tiñen los ácidos nucleicos de las células con membranas deterioradas y los de inclusión generalmente utilizan sustratos fluorescentes que son degradados por las enzimas intracelulares y que generan productos fluorescentes (Riesberg, 2001).

Alternativamente, el uso de 7-amino actinomicina D (7-AAD), facilita el uso conjunto de marcadores de superficie conjugados con ficoeritrina (PE) o con isotiocianato de fluoresceína (FITC). (Acuto O. et al., 2003 y Rudd CE. et al., 2009).

Para poder teñir o marcar constituyentes no localizados en la superficie de células intactas, un fluorocromo debe ser capaz de cruzar la membrana celular. La mayoría de los colorantes descritos como tinciones vitales son pequeñas moléculas que son relativamente solubles en lípidos, y están cargadas positivamente o son eléctricamente neutras a pH fisiológico. Una alta solubilidad en lípidos favorece el paso desde un medio acuoso a la fase lipídica de la bicapa de la membrana celular. Los compuestos orgánicos que contienen al menos dos cargas positivas (como el DAP), son impermeables a las membranas intactas. El bromuro de etidio (BE) comparte la estructura de anillo heterocíclico del yoduro de propidio (IP), pero sólo presenta una carga positiva. (Ehrlich, 1904).

Conteo Celular y Evaluación de Viabilidad por Azul Tripano.

El azul tripáno (azul diamina, azul niagara, azul vital) es un colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir a tejidos y células muertas (Ehrlich, 1904). Este colorante es uno de varios empleados para evaluar la viabilidad de células por exclusión de captación, ya que no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas íntegras. El azul tripano no es necesario para realizar conteos simples de células, pero sí es imprescindible para diferenciar entre las células muertas (con disrupción membranal) de las vivas con membranas íntegras. (Standard Operating Procedures (SOPs) Laboratorio de Genómica Viral y Humana Facultad de Medicina UASLP, s/f)

En este procedimiento, una suspensión de células mononucleares (CMN) es mezclada con una solución al 0.4% de azul tripáno antes de ser observada bajo el microscopio haciendo uso de un hemocitómetro de Neubauer. (Herráez, s/f)

Técnica.

1. Situar en el objetivo 25x dentro del recorrido óptico del microscopio a campo iluminado.



Figura 4. Conteo Celular y Evaluación de Viabilidad por Azul Tripano

2. Homogeneizar la suspensión celular y llevarla a un volumen conocido con PBS o medio de cultivo, de la cual se tomará la alícuota que será analizada.



Figura 5. Conteo Celular y Evaluación de Viabilidad por Azul Tripano

3. Añadir 90 μ L de azul tripano al 0.4% en un microtubo o un pozo de una microplaca.

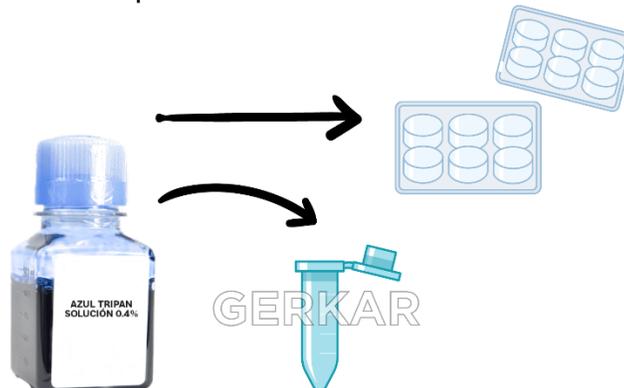


Figura 6. Conteo Celular y Evaluación de Viabilidad por Azul Tripano

3. Añadir 10 μL de la suspensión celular al microtubo o micropozo donde se encuentran los 90 μL del azul tripano).



Figura 7 Conteo Celular y Evaluación de Viabilidad por Azul Tripano

5. Mezclar la suspensión celular con azul tripano pipeteando de 5 a 8 veces.



Figura 8. Conteo Celular y Evaluación de Viabilidad por Azul Tripano

6. Añadir 10 μL de la mezcla en cada cámara del hematocitómetro. Es conveniente llenar ambas cámaras para una distribución homogénea de las células y evitar que diferencias de presión alteren los resultados del conteo.



Figura 9. Conteo Celular y Evaluación de Viabilidad por Azul Tripano

7. Colocar el hematocitómetro en la platina del microscopio y ubicar la cuadrícula central.

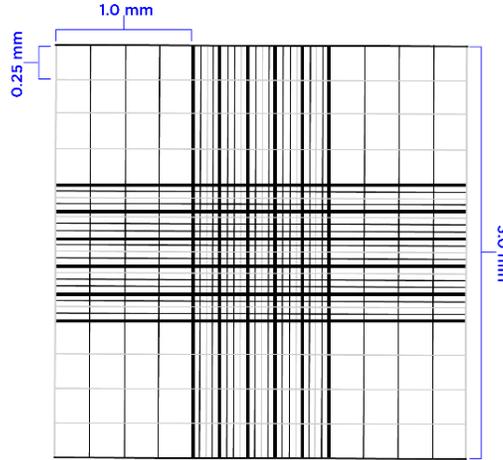


Figura 10. Conteo Celular y Evaluación de Viabilidad por Azul Tripano

Una vez localizada la cuadrícula central, se procederá a hacer el conteo celular que podrá ser a 25x o 40x. Solo se contarán las células que se encuentren dentro del cuadrante central, aquellas que se localicen en los bordes o sobre las líneas que delimitan la cuadrícula central, no deberán ser contabilizadas. Al final se contarán por separado a las CMN azules (muertas) y a las CMN refringentes (vivas) o en las cuadrículas centrales de ambas cámaras. (Figura 9)

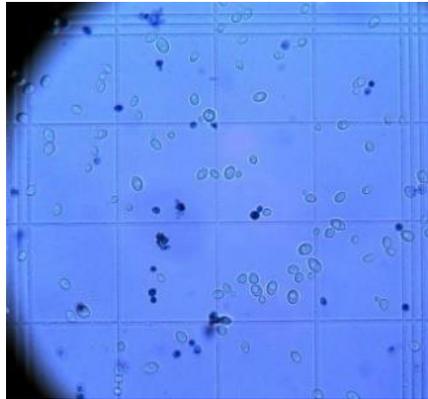


Figura 11. Conteo Celular y Evaluación de Viabilidad por Azul Tripano

Obtención del número total y la concentración de las CMN

Para proceder al conteo de las CMN se hará un promedio del resultado de cada cámara, posteriormente se multiplicará por la dilución de la suspensión celular con el azul tripano; en nuestro caso es por 10, ya que la dilución fue 1:10 y finalmente por el factor de la cámara que es 1×10^4 . El resultado nos dará la concentración de CMN/mL y para obtener el número total de células, multiplicaremos por el volumen total de la suspensión celular.

Proliferación Celular.

La proliferación celular alude al aumento de células y es sumamente necesario para el crecimiento de los tejidos, ya que es el resultado tanto del crecimiento como de la división celular. En contextos experimentales, la monitorización de la proliferación celular puede proporcionar información sobre los efectos de fármacos u otros tratamientos sobre una población de células. La ventaja que supone el uso de la citometría de flujo se relaciona con la rapidez de obtención de resultados, la capacidad de cuantificación y la posibilidad de medir varias propiedades y/o parámetros de forma simultánea. Durante la proliferación ocurre nueva síntesis de ADN, con lo que al añadir análogos de nucleótidos como la BrdU o la EdU (5-ethynyl-2´deoxyuridine) al medio de cultivo, todas aquellas células que entren en proliferación incorporarán estos análogos a su ADN. Una vez transcurrido el tiempo de análisis, estos análogos se pueden detectar con anticuerpos específicos (en el caso de BrdU) o mediante una reacción “Click-IT” (EdU-Click-IT), que tiene como ventaja que no hace falta desnaturalizar el ADN para detectar la incorporación de EdU. Esto último implica que se pueden analizar otros parámetros de forma simultánea, ya sea por tinción con anticuerpos o analizando la presencia de proteínas fluorescentes. Además, se pueden analizar la fracción de células que se encuentran en las distintas fases del ciclo celular. (Trickett A. y Kwan YL., 2003).

Determinación de la proliferación celular con Cell Proliferation Dye eFlour (CPDF)-670®

La evaluación de la proliferación celular se lleva a cabo a través de citometría de flujo mediante con el empleo del fluoroforo CPDF-670® (eBioscience).

El CPDF-670® es un colorante fluorescente rojo que se puede utilizar para monitorear divisiones celulares individuales. Este tinte fluorescente se une a cualquier proteína celular que contiene aminos primarias, y como las células se dividen, el tinte se distribuye por igual entre las células hijas que se pueden medir como reducción a la mitad sucesiva de la intensidad de fluorescencia del colorante. Hasta 6 generaciones pueden ser visualizadas y también se puede utilizar para el seguimiento a largo plazo de células marcadas. La proliferación de células del CPDF-670® tiene un máximo de excitación de 647 nm y puede ser excitado por la línea de láser rojo (633 nm). Tiene un pico de emisión de 670 nm y se puede detectar con un filtro de banda 660/20 equivalente a APC, Alexa Fluor 647 o eFluor 670. (Yao Y. et al., 2015).

El CPDF-670® es un colorante fluorescente rojo que se puede utilizar para monitorear divisiones celulares individuales. Este tinte fluorescente se une a cualquier proteína celular que contiene aminos primarias, y como las células se dividen, el tinte se difunde por igual entre las células hijas que se pueden medir como reducción a la mitad sucesiva de la intensidad de fluorescencia del colorante. (EBioscience™ cell proliferation dye eFluor™ 670, s/f)

Técnica para evaluar la proliferación con CPDF-670.

1. Resuspender las CMN en medio RPMI-1640 (BioWhittaker) suplementado con L-glutamina, penicilina-estreptomina, 2-mercaptoetanol y suero bovino fetal (Sigma) a una concentración de 1×10^6 CMN/mL.
2. Posteriormente, en placas de cultivo estériles de 96 pozos (Costar) colocar 1×10^5 CMN/pozo.

3. Estimular las CMN con el o los elementos convenientes para tal efecto (anticuerpos, mitógenos, citosinas, antígenos, etc.), este paso se hará por triplicado.
4. Incubar la placa a 37°C, en una atmósfera al 5% de bióxido de carbono (CO₂) durante el tiempo establecido en el protocolo del trabajo a desarrollar (24 a 120 hrs).
5. La proliferación de las CMN se mide por citometría de flujo a través de la incorporación del fluoroforo CPDF-670® (eBioscience) a las CMN.
6. Para la evaluación de la proliferación celular se hace uso del fluoroforo CPDF-670®.

1. Preparar una suspensión celular.
2. Hacer lavado de las células dos veces con PBS (a temperatura ambiente) para eliminar el suero y posibles elementos que pudieran interferir en el experimento.
3. Resuspender en PBS las células al doble (2X), considerando la concentración final deseada.

Por ejemplo, si la concentración final de células que se desea es 2×10^6 /mL, resuspender las células a 4×10^6 /mL.

Nota: La concentración final de células no debe exceder los 10×10^6 /mL. Si etiqueta menos de 5×10^6 células totales, no utilice menos de 0.5 mL de PBS.

4. Preparar una solución de 10 µM de CPDF 670® en PBS. Esto se mezclará 1:1 con la suspensión celular 2X previamente preparada.

Nota: Se recomienda utilizar 5 µM como punto de partida para marcar las células; sin embargo, es necesario que la concentración óptima se determine para cada uno de los ensayos de interés.

No se recomienda utilizar concentraciones superiores a 10 µM de CPDF 670® para marcar las células, ya que se ha observado que esto inhibe parcialmente la proliferación y disminuye la viabilidad de las células marcadas.

5. Una vez que se alcanzó el tiempo de estimulación celular, se añade el CPDF 10 μM ; se recomienda agregar un volumen igual de la solución de marcaje 10 μM (preparada en el Paso 4).
6. Incubar durante 15 minutos a 37°C en la oscuridad.
7. Parar la reacción de marcaje agregando 4-5 volúmenes de medio completo frío (que contenga $\geq 10\%$ de suero) e incube en frío durante 5 minutos.
8. Lavar las células 3 veces con medio completo.
9. Finalmente, para la evaluación de la proliferación celular, se realiza en un citómetro de flujo y mediante un software. Para su lectura en el citómetro de flujo se utilizan 200,000 células marcadas con CPDF-670® por tubo.

Citometría de Flujo.

La citometría de flujo (CF) es una técnica que permite evaluar diferentes características simultáneamente de una célula o partícula en suspensión, como son el tamaño y la complejidad interna, así como los componentes celulares, o moléculas asociadas a sus múltiples funciones a través anticuerpos marcados con un fluorocromo. La citometría de flujo como técnica de análisis celular ha tenido un rápido incremento relacionado a su uso, tanto en los laboratorios de investigación básica como en los laboratorios clínicos. (Orlao et al., s/f)

Conceptos Básicos de la CF.

La citometría se especializa en la cuantificación de parámetros celulares, ya que permite la medición de características celulares, mientras éstas pasan en suspensión en una corriente de fluido. (Carolina et al., s/f)

La citometría es una disciplina orientada tecnológicamente a la determinación multiparamétrica de elementos celulares tanto morfológicos como moleculares (Shapiro, 2003). En la CF las partículas o células en suspensión viajan a través de una corriente de fluido hasta el punto donde el haz de luz, generalmente un láser,

las intercepta y se generan señales de cada parámetro (fluorocromo). Un separador de células, conocido en inglés como "cell sorter" o "flow sorter", posee dispositivos, ya sea mecánicos o eléctricos, capaces de seleccionar y coleccionar células (Shapiro, 2003, Barrera y Cols, 2004).

Se entiende como parámetro a la característica física o química de una célula que puede ayudar a identificarla dentro de una población celular (Shapiro, 2003). Por medio de CF se pueden analizar numerosos parámetros en una célula, dentro de ellos están: tamaño y complejidad interna (relacionada con los organelos y las membranas internas), receptores de superficie, proteínas intracelulares, cambios en la membrana celular, ácidos nucleicos y síntesis de ADN, metabolismo celular etc.

La capacidad de medir simultáneamente múltiples parámetros celulares se debe a la detección de la desviación del haz de luz, permitiendo así obtener el tamaño y complejidad celular, así como la fluorescencia proveniente de cualquier componente celular marcado con un anticuerpo o sustancia fluorescente sensible a la fuente de luz. (Barrera y cols., 2004; Ortiz y cols., 2006).

Al día de hoy, existen numerosas aplicaciones de esta tecnología, ya que ha sido empleada en diferentes disciplinas tanto en investigación básica como clínica, sin embargo, siguen apareciendo nuevas utilidades, lo que demuestra la amplia capacidad y versatilidad de esta herramienta. Además, las compañías fabricantes se han esmerado en desarrollar mejoras técnicas en los equipos, así como en los programas de cómputo (software) para ampliar las capacidades de análisis y confiabilidad de los equipos en los resultados obtenidos. El citómetro de flujo está constituido por diversos sistemas, los cuales se describen brevemente a continuación. (Janeway C, 2001).

Funcionamiento General del CF.

La muestra se coloca en el compartimento de succión y las células se alinean gracias a la diferencia de presión a la cual circula la solución que va por fuera de la muestra (líquido envolvente), produciendo el enfoque hidrodinámico de las células, así, la muestra fluye de manera constante para que el láser incida sobre cada célula;

la desviación del láser se relaciona con el tamaño y la complejidad interna de cada célula, las señales son detectadas por un detector frontal (FSC) (tamaño) y el detector lateral (SSC) (granularidad o complejidad interna). (Ortuño Giner & Orfao, 2002)

La determinación de marcadores de superficie, antígenos de diferenciación (cluster of differentiation, CD por sus siglas en inglés), moléculas de función o actividad celular, etc., se realiza a través del marcaje de las células por medio de anticuerpos marcados con fluorocromos. La técnica aprovecha la especificidad de unión de los anticuerpos y que estos pueden ser marcados con diferentes fluorocromos, es posible identificar sobre una sola célula múltiples marcadores y moléculas. Esto depende de la capacidad del o los rayos láser y de la capacidad del citómetro. Los detectores de tamaño, complejidad y los que captan las señales fluorescentes, llevan la información a un software para que este enlace la información a una computadora y la muestre en gráficos como histograma y dot plot. (Torres et al., 2017)

Preparación de las CMN para la adquisición en el citómetro de flujo.

1. Para la determinación de parámetros a través de la técnica de CF es necesario que la CMN hayan sido purificadas y contenidas en una solución de concentración conocida (1×10^6 CMN/mL). Se recomienda iniciar el marcaje con 1×10^6 CMN; centrifugar a 1500, rpm, eliminar el sobrenadante y resuspender el botón restante, incubar las células con el o los anticuerpos marcados por 45 min a 4°C en obscuridad. La cantidad de anticuerpo marcado será de acuerdo a lo establecido por el proveedor, o bien, posterior a la titulación del anticuerpo. Lavar con PBS para FACS (Apéndice X) 2 veces a 1500 rpm eliminar el sobrenadante y mantener el botón en el fondo del tubo.
2. En el caso de que el anticuerpo primario no esté marcado con un fluorocromo, será necesario utilizar un anticuerpo secundario anti-anticuerpo primario marcado con el fluorocromo (previo a su uso, deberá titularse para

evitar un pegaje inespecífico y falsos positivos), posteriormente se realizarán 3 lavados como se mencionó anteriormente.

3. El botón remanente se resuspenderá en 200 μ l de PBS-p-formaldehído al 1%, recién preparado.
4. Las muestras se pueden almacenar hasta una semana a 4°C en oscuridad. Después, la fluorescencia disminuye considerablemente.

Adquisición de las CMN en el citómetro de flujo.

1. El citómetro de flujo deberá estar en condiciones de limpieza y funcionamiento óptimo para la adquisición de las células.
2. Ajustar los detectores FSC y SSC para tamaño y granularidad/complejidad, con células sin marcar.
3. Hacer la compensación de los detectores de las diferentes fluorescencias empelando tubos con células marcadas con cada uno de los fluorocromos que se emplearán en el estudio. Este trabajo lo realizará la persona responsable del citómetro de flujo, ya que se requiere de un entrenamiento y una especialización en el tema.
4. Es necesario identificar las poblaciones presentes en nuestra muestra, las cuales, estarán representadas en un dot plot que graficará tamaño (FSC) vs granularidad/complejidad. Con base en el estudio que se quiera realizar se determinará mediante una ventana la o las poblaciones con que se trabajará (En esta imagen, las CMN representadas por linfocitos y monocitos)

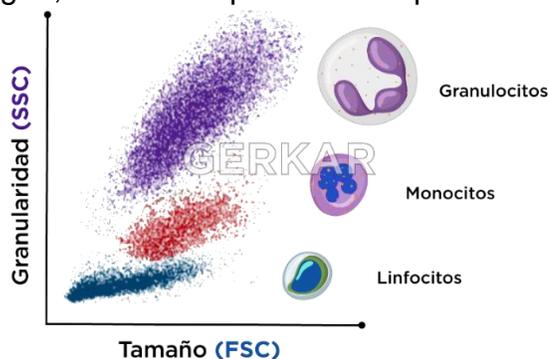


Figura 12. Representación de CMN.

5. Una vez que la preparación del equipo está completada, se procederá a la adquisición de las CMN. Las células marcadas se colocarán en un tubo para citometría de flujo y se colocará en el compartimiento de obtención de la muestra a través de una aguja que succionará la muestra.
6. Las células pasaran en el citómetro en un flujo continuo (10,000 células/min), que permitirá que el rayo láser impacte a cada célula y de acuerdo a los detectores de tamaño, granularidad/complejidad y las diferentes longitudes de onda emitidas por los fluorocromos con los que esté marcada la célula, se obtendrá información sobre las moléculas propias presentes en las células.
7. Las adquisiciones de los datos de las células quedarán almacenadas en una computadora. Posteriormente, los datos serán analizados y presentados en forma de gráficas, por ejemplo, tipo histograma y dot plot.

8. Histograma

- El histograma muestra la intensidad de expresión de un marcador versus el número de eventos. El desplazamiento de la curva hacia la derecha indica mayor expresión del marcador, mientras que la altura del pico indica la frecuencia de las células capturadas.

En este sentido, es importante recalcar que el área bajo la curva contiene a las células que se está analizando. (Carolina et al., n.d.)

Ejemplo: Se observan dos picos; el pico de la derecha representa a las células positivas para el marcador de linfocitos T cooperadores CD4+, mientras que el de la izquierda muestra las células negativas para este marcador, el pico de la derecha es más alto que el de la izquierda; por tanto, existe un mayor número de linfocitos que expresan al marcador CD4 (T cooperadores), con respecto a aquellos que no lo expresan.

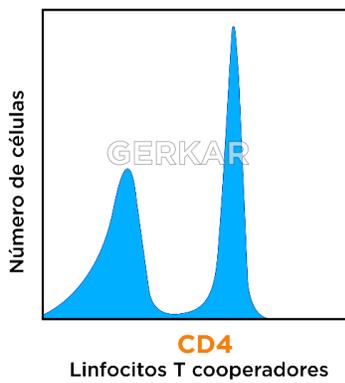


Figura 13. Histograma de número de células vs linfocitos T cooperadores

9. Dot plot

- Otra manera de expresar los datos generados por el citómetro de flujo son los gráficos de puntos o dot-plot, donde cada punto representa un evento (se define como evento a cualquier partícula que haya sido excitada por el láser), en este caso, una célula marcada con un anticuerpo específico acoplado con un fluorocromo. (Ramachandran & Tsokos, 2021) Este grafico surge de la posibilidad que tiene esta técnica, de marcar con dos o más marcadores una célula, para determinar poblaciones y subpoblaciones celulares. A continuación, se muestra un ejemplo de un diagrama de puntos (dot plot).

En este ejemplo se muestra un dot plot de FoxP3 vs CD25 marcados con APC y PE, respectivamente. El cuadrante inferior izquierdo muestra las células FoxP3-CD25- (54.6%), el cuadrante inferior derecho muestra las células FoxP3+CD25- (0.644%), en el cuadrante superior izquierdo, se localizan las células FoxP3-CD25+ (37.5%) y en el cuadrante superior derecho las células FoxP3+CD25+ (dobles positivas) (7.22%).

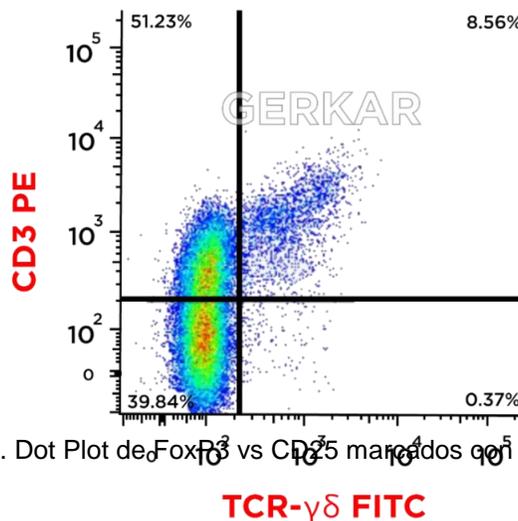


Figura 14. Dot Plot de FoxP3 vs CD25 marcados con APC y PE.

Una vez obtenido el Dot Plot que grafica FSC vs SSC de las células a analizar y seleccionada la ventana de las células de interés, se establecen y ajustan los cuadrantes con la ayuda de células sin marcar (células control) y los controles de isotipo, los cuales tienen las mismas características de isotipo que los anticuerpos utilizados en las muestras problema, pero en contra de un blanco que no se encuentra en dicha muestra, así se podrá descartar la unión inespecífica de los anticuerpos y evitar falsos positivos. Estos controles de isotipo se analizarán en tubos con células diferentes a los tubos problema. En los cuadrantes identificarán las poblaciones celulares específicas y su proporción en la mezcla celular. (Villalba, 2014).

Técnica de ELISA ([Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay](#))

Fundamento.

- La técnica de ELISA es un Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, (colorido), puede ser medido espectrofotométricamente. (Guzmán-Vázquez, 2004)

[El ensayo de ELISA posee las siguientes características:](#)

- 1) El antígeno y anticuerpo pueden enlazarse a una matriz sólida y retener su reactividad inmunológica.
- 2) Las enzimas tienen una alta actividad específica y convierten una cantidad relativamente grande de sustrato en producto detectable, lo que permite identificar concentraciones muy bajas del ligando.
- 3) La actividad enzimática o reactividad inmunológica de los conjugados se preserva y permanece estable durante el análisis y el almacenamiento.
- 4) Las enzimas no están presentes en el líquido biológico que se va a analizar. Los anticuerpos utilizados en el método ELISA son de origen monoclonal o policlonal que se suministran como antisuero no fraccionado o fracciones de inmunoglobulina

purificada, pueden ser solubles o estar inmóviles en una matriz sólida y por último reaccionan con el determinante antigénico específico o de un anticuerpo ligando-específico (anticuerpo primario) según el protocolo de análisis, ELISA directo o indirecto, respectivamente.

Técnica de ELISA

1. Los micropozos de la placa se lavan dos veces, con el buffer indicado. (Figura13)

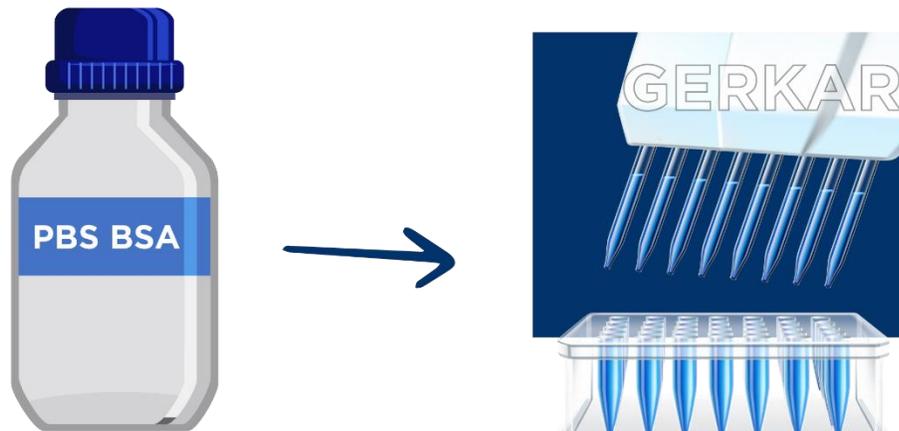


Figura 15. Técnica de ELISA

2. La microplaca se incuba con 100 μ l/pozo del antígeno o la sustancia a identificar a una concentración de 5 μ g/mL en buffer de carbonatos (Apéndice X), a una temperatura de 37°C durante toda la noche.

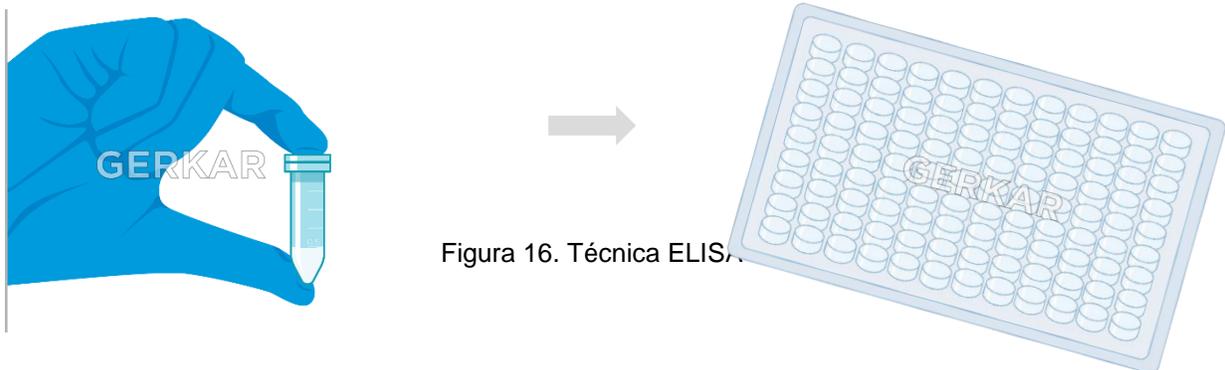


Figura 16. Técnica ELISA

3. Las placas se lavan 3 veces con buffer de lavados (Apéndice A) por decantación, durante 3 minutos c/u.

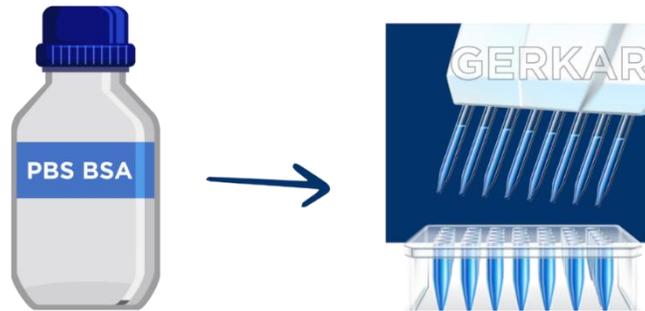


Figura 17. Técnica ELISA

4. Los micropozos se bloquean con 200 μ l de PBS más BSA (Apéndice B) al 1.0 % por una hora a 37°C.

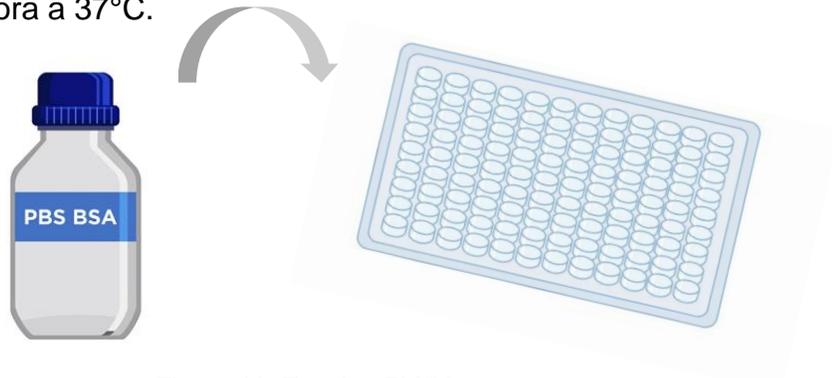
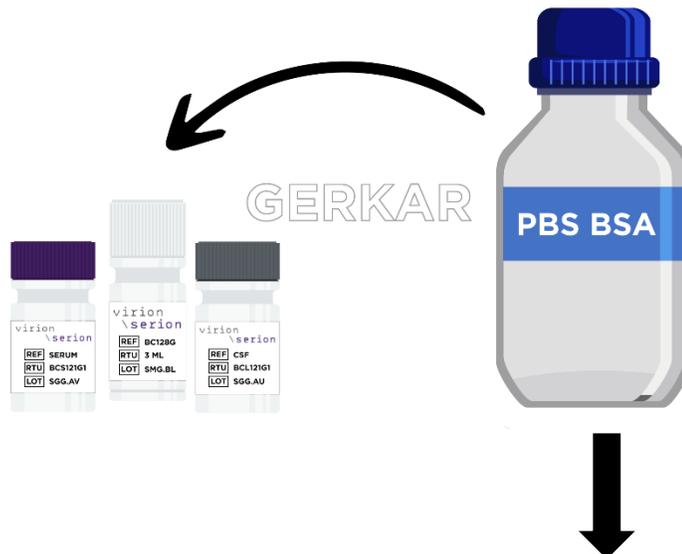


Figura 18. Técnica ELISA

5. Posteriormente, se realiza la incubación con el o los sueros problema, diluidos a la concentración adecuada en PBS/BSA al 1% por una hora a 37°C.



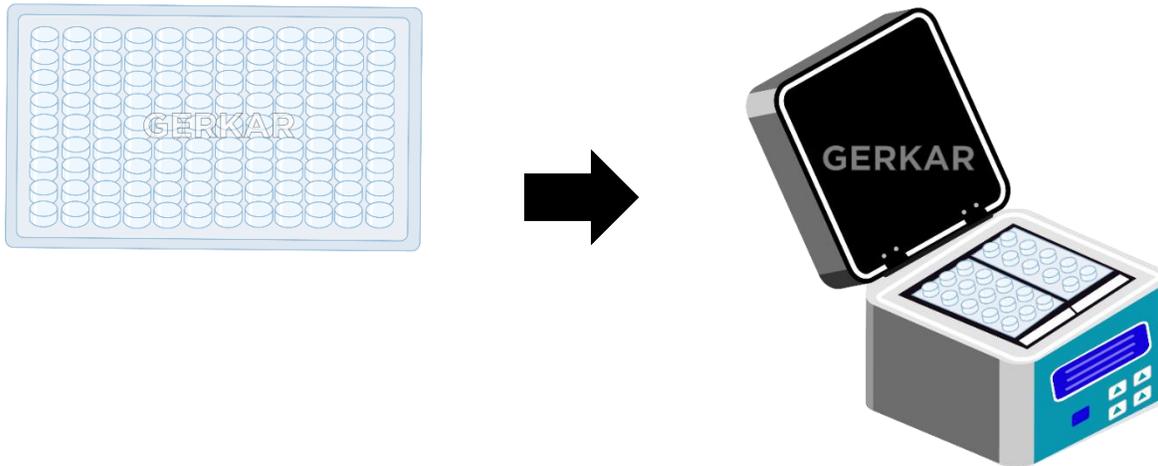


Figura 19. Técnica ELISA

6. Se realizan 5 lavados de 3 minutos c/u. (Figura 17)



Figura 20. Técnica ELISA

7. Después se añade el anticuerpo secundario o de revelado adecuado (anti-IgG total) marcado con un cromógeno acoplado a una enzima (fosfatasa alcalina) diluido en PBS/BSA al 1% por una hora a 37°C.



Figura 21. Técnica ELISA

8. La microplaca se lava como en el inciso 6.



Figura 22. Técnica ELISA

- Finalmente se añade el buffer de revelado, (di-etanol amina, Apéndice C) durante 30 minutos en obscuridad, a temperatura ambiente y en agitación a 100 rpm, posterior a esto, se para la reacción con 50 μ l/pozo de solución STOP (Frecuentemente con NaOH 2M).

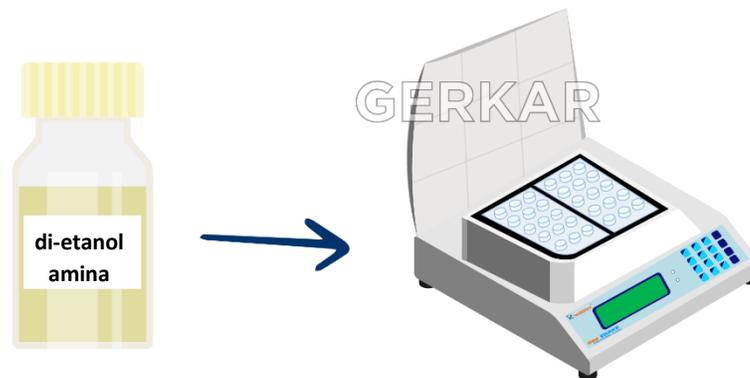


Figura 23. Técnica ELISA

El tiempo en que se deja actuar el buffer de revelado es aproximado, ya que no todas las reacciones se llevan a cabo de la misma forma, la concentración de la molécula problema influye directamente en la velocidad de la reacción por lo que es necesario revisar periódicamente el desarrollo de color en los micropozos para detener la reacción en el momento preciso y que los resultados sean confiables. Una vez detenida la reacción, la placa debe ser leída en un aparato denominado lector de ELISA. Este instrumento cuenta con varios filtros de diferentes longitudes de onda, dependiendo del cromógeno utilizado y el resultado colorido que se observe en los micropozos deberán seleccionarse los filtros primario y de referencia.

En este ejemplo los filtros utilizados fueron de 450 nm y 620 nm, respectivamente, finalmente, el lector de ELISA arrojará un resultado para cada pozo, que será en términos de absorbancia, esta unidad es directamente proporcional a la concentración de la molécula problema en cada pozo. Para tener un valor cuantitativo en esta técnica es necesario realizar una curva estándar con concentraciones conocidas de la sustancia problema o molécula a evaluar, se realiza añadiendo 100 μ L de la muestra problema de concentraciones conocidas en los pozos indicados. Se recomienda hacer diluciones para tener concentraciones de estas magnitudes: 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 y 100.0 ng/mL. A los pozos blanco (control) se les añaden 100 μ L de PBS/BSA al 1% (diluyente de muestra). Los sueros problema se diluyen según convenga y dependiendo de las condiciones del estudio. La curva estándar también dependerá de lo que se requiera analizar, estas pueden realizarse mediante el uso de otros reactivos como BSA o proteínas estándar y kits.

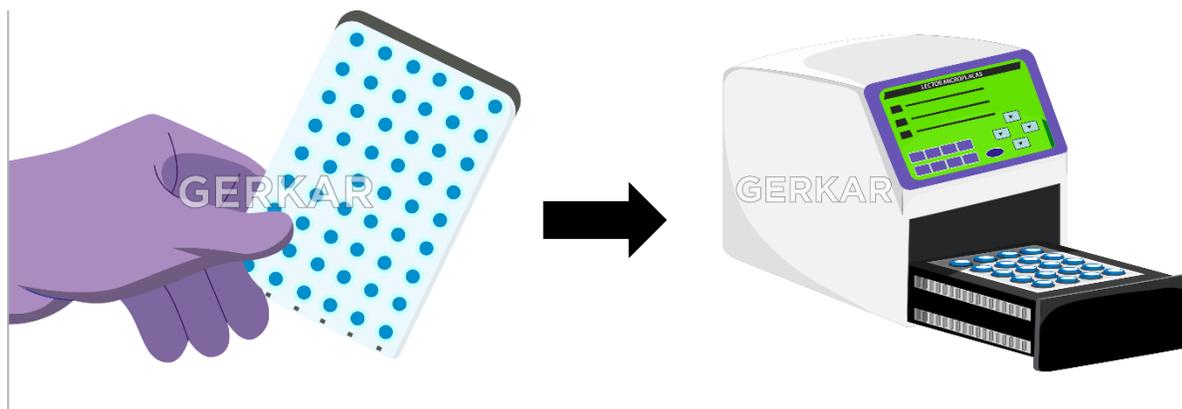


Figura 24. Técnica ELISA

Cuantificación del ensayo de Elisa.

Para convertir la Absorbancia a una medida cuantitativa (concentración) es necesario emplear La ley de Lambert-Beer que establece que la Absorbancia está directamente relacionada con las propiedades intrínsecas del analito, con su concentración y con la longitud de la trayectoria del haz de radiación al atravesar la muestra. La expresión matemática de la ley de Lambert-Beer es:

$$A = C \cdot \epsilon \cdot L$$

Dónde:

A = Absorbancia de la muestra

C = Concentración del cromóforo

L = Longitud del paso óptico que contiene la muestra

ϵ = Absorptividad molar. Depende del cromóforo en sí mismo, de la λ y de las condiciones de medida (pH, T....). La Absorbancia es adimensional, es decir, no tiene ninguna unidad de medida. (Sánchez, s/f)

Para convertir la Absorbancia en un valor cuantitativo a través de una curva estándar, es necesario reservar algunos pozos de la placa para depositar concentraciones conocidas de la sustancia problema como se describió líneas arriba. (Figura 22). (González, 2010).

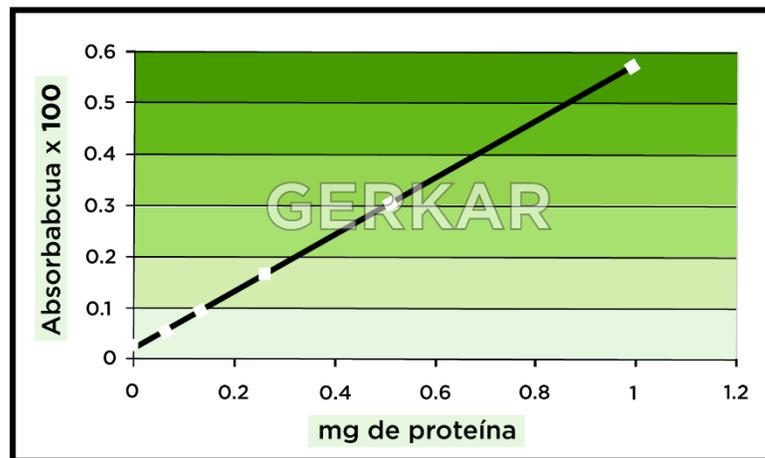


Figura 25. Ejemplificación de curva estándar donde se interpolan los valores de las absorbancias problema para así obtener un valor cuantitativo, en este ejemplo, concentración.

Glucosa

Glucosa (C₆H₁₂O₆). - Aldohexosa conocida también con el nombre de dextrosa. Es el azúcar más importante, el más abundante; además, de ser transportada por el torrente sanguíneo a todas las células de nuestro organismo, forma parte de los polisacáridos, constituyéndose en la base del metabolismo energético porque todas las células son capaces de metabolizar a la glucosa, algunas células como las neuronas y glóbulos rojos solo pueden obtener su energía a partir de la glucosa sanguínea. Se encuentra en frutas dulces principalmente la uva, en la miel, el jarabe de maíz y las verduras. Al oxidarse la glucosa, produce dióxido de carbono, agua y energía, la cual es utilizada por el organismo para realizar sus funciones vitales. La concentración normal de glucosa en la sangre en ayuno es de 70 a 100 mg/dl y en condiciones postprandiales hasta 140 mg/dl. Cuando la glucemia rebasa los límites anteriores, es posible que se deba a un trastorno asociado a la diabetes mellitus. Cuando la glucosa se encuentra elevada en la sangre (hiperglicemia) como ocurre en la diabetes mellitus; esta puede pasar y estar presente en la orina, denominándose glucosuria.

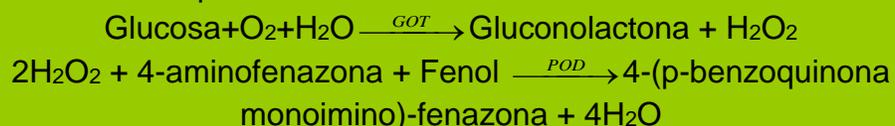
La glucosa se absorbe a una velocidad promedio de 1 gr/kg de peso/hora. El transporte de la glucosa a través de la membrana plasmática de las células representa uno de los eventos más importantes del transporte de nutrientes ya que este azúcar tiene un papel central en el metabolismo y en la homeostasis celular. El ingreso de la glucosa a las células se realiza mediante dos tipos de proteínas acarreadoras: los transportadores de glucosa asociados a sodio (SGLT) o transporte activo y los sistemas facilitadores del transporte de glucosa o difusión facilitada (GLUT). (Roberta R, 2017)

Tabla 2. Valores óptimos de glucosa.

CONDICIÓN	SIN DIABETES	CON DIABETES
En ayuno	70-100 mg/dL	70-130 mg/dL
2 horas después de comer	70-140 mg/dL	Menos de 180 mg/dL

Niveles de glucosa en sangre y automonitoreo. (2020, junio 18). Federación Mexicana de Diabetes, A.C. - Federación Mexicana de Diabetes, A.C.

Fundamento de la prueba enzimática colorimétrica.



Debido al oxígeno del aire, la glucosa se oxida a gluconolactona bajo la acción de la glucosa oxidasa (GOD). Se forma peróxido de hidrógeno que, en presencia de la peroxidasa (POD), oxida la 4-aminofenazona y el fenol a 4-(p-benzoquinona-monoimino)-fenazona. La intensidad del colorante es directamente proporcional a la concentración de glucosa. (Libby P, 2002).

Triglicéridos.

Los triglicéridos (TG) o grasas neutras constituyen la mayor parte de los lípidos en el cuerpo humano; son, por lo tanto, los principales lípidos en depósito de grasas y en los alimentos (Murray, R., Bender, D., Botham, P., Rodwell, V. y Well, P. 2009, p. 205). En el cuerpo humano podemos encontrar dos tipos de tejido adiposo o tejido graso: El blanco, que es la mayoritaria, supone el 20-25% del peso del cuerpo y es un reservorio de energía y acumulación de ácidos grasos que, en caso de necesidad, se metabolizan para obtener glucosa para las células.

La elevación de los triglicéridos en la sangre por encima de los 150 mg/dl, se denomina hipertrigliceridemia, que es posible pueda causar aterosclerosis; además, se asocia con elevación de ciertas lipoproteínas aterogénicas como la LDL y niveles bajos de HDL, que aumentan considerablemente el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular. (Baynes, J., Dominiczak, M. 2011, pp. 200-201).

Tabla 3. Valores óptimos de triglicéridos

CATEGORÍA	NIVEL
NORMAL	<150mg/dL
LÍMITE ALTO	150-199mg/dL
ALTO	200-499 mg/dL
MUY ALTO	>500 mg/dL

Fundamento de la prueba enzimática colorimétrica.



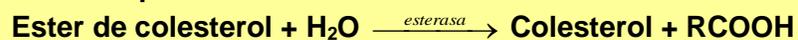
Los triglicéridos se hidrolizan enzimáticamente por acción de la lipasa para producir ácidos grasos libres y glicerol. El glicerol se fosforila por acción del adenosín trifosfato (ATP) con la glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato y adenosín difosfato. El glicerol-3-fosfato se oxida a dihidroxiacetona fosfato (DAP) por acción del glicerol fosfato oxidasa, produciendo peróxido de hidrógeno (H₂O₂). En una reacción de color catalizada por la peroxidasa, el H₂O₂ reacciona con la 4-aminoantipirina (4-AAP) y sulfonato de 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno (DHBS) para producir un tinte de color rojo. La absorbancia de este tinte es proporcional a la concentración de los triglicéridos presentes en la muestra.

Colesterol.

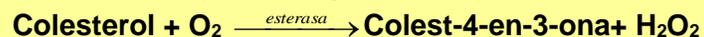
El colesterol es un lípido anfipático, presente en los tejidos y plasma en forma libre o combinado con ácidos grasos (esterificado) que es su forma de almacenamiento; son productos de origen animal y el organismo lo sintetiza a partir de la Acetil Co-A. Sin embargo, participa en la génesis de la aterosclerosis, que conlleva a enfermedades cerebrovasculares, coronarias y vascular periféricas. El colesterol es una molécula de dos caras: la misma propiedad que lo hace útil en las membranas celulares, a saber, su absoluta insolubilidad en el agua, lo hace fatal (Brown, M., Goldstein, J. 1985).

El colesterol es un componente lipídico muy importante para el buen funcionamiento del cuerpo humano; formando parte de las membranas de todas las células y organelos; es precursor de muchos componentes biológicos como los ácidos biliares, vitamina D, hormonas suprarrenales, sexuales etc.

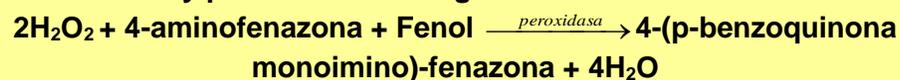
Fundamento de la prueba enzimática colorimétrica



Los esteres de colesterol se desdoblan por la acción de la colesterol-esterasa a colesterol libre y ácidos grasos



La colesteroxidasa cataliza entonces la oxidación del colesterol a colest-4-en-3-one y peróxido de hidrogeno.



Bajo la acción catalítica de la peroxidasa, el peróxido de hidrogeno formado reacciona con 4-aminofenazona y fenol para formar un colorante rojo cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de colesterol.

Lipoproteínas de baja densidad (HDL).

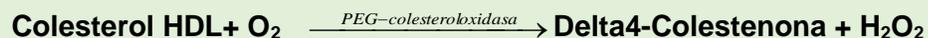
Las HDL secretada por el hígado y enterocitos, transportan colesterol desde los tejidos periféricos al hígado, como se mencionaba anteriormente son sintetizadas a nivel hepático e intestinal; sus Apo principales son: AI, AII, CI, CII, CIII, E. La función que tienen las partículas de las HDL es transportar el colesterol desde las células periféricas hasta el hígado. La HDL en general, es una molécula de un diámetro muy pequeño, aproximado de 8-13 nm y una densidad muy alta (1.063-1.210 g/mL) en promedio 1.080; las Apo A y C representa casi la mitad de su peso; contiene 25% de fosfolípidos, 16% de esteres de colesterol, 5% de colesterol y 4% de triglicéridos (Laguna, J. 2002, p. 391).

Fundamento de la prueba enzimática colorimétrica.

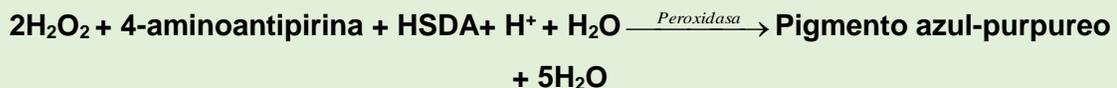
La concentración del colesterol HDL se determina enzimáticamente por la **colecetolesterasa** y **colecetoloxidasa** acopladas con PEG a los grupos amínicos (aprox. el 40%).



La **colecetolesterasa** provoca el **desdoblamiento** de los esteres de colesterol a **colecetol libre** y **ácidos grasos**.



En presencia de oxígeno, el **colecetol** se **oxida** por la **colecetoloxidasa** a **delta4-colestenona** y **peróxido de hidrogeno**.



Bajo la acción catalítica de la peroxidasa, el peróxido de hidrogeno formado reacciona con 4-aminoantipirina y HSDA (HSDA=N-(2-hidroxi-3-sulfopropilo)-3,5-

dimetoxianilina sódica) para formar un colorante purpúreo azul. La intensidad del colorante es directamente proporcional a la concentración de colesterol. (Hansson GK, 2005).

Lipoproteínas de baja (LDL) y muy baja densidad (VLDL).

Las lipoproteínas son complejos macromoleculares formados por lípidos y proteínas que se encargan de transportar las grasas desde el hígado hacia los tejidos periféricos. (Carvajal, 2014)

Es este mecanismo el quilomión (QM) entrega los triglicéridos de la dieta a los tejidos periféricos sobre todo al tejido muscular y adiposo. Las VLDL entregan los triglicéridos secretados por el hígado a los tejidos periféricos haciendo énfasis en el tejido adiposo. Las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) se forman de la degradación de las VLDL y entregan los triglicéridos y colesterol al hígado son necesarias para que confieran el colesterol a las células periféricas, y estas sintetizan membranas celulares entre otras cosas.

De acuerdo a los diferentes tipos de lipoproteínas, debemos considerar: densidad (está influenciada por la cantidad de lípidos y proteínas que contienen; y se determina, por medio de ultracentrifugación), tamaño (que se confiere por medio de la electroforesis de gel), tipo de lípidos que contiene, tipo de Apo que la constituyen (tipo de proteínas), migración durante la electroforesis (la movilidad electroforética de la partícula en gel de agarosa, refleja el tamaño y la carga de superficie de la partícula, donde beta es la posición de las LDL y alfa la posición de las HDL) y funciones que cumplen; características que le dan a cada una, sus particularidades. La forma inmadura, con una única apolipoproteína (B-100), sale del hepatocito por exocitosis e, inmediatamente, intercambia materiales, de forma similar al QM, con las células del entorno y con las HDL. En este proceso, capta apoC-II y ésteres de colesterol, dando lugar a la VLDL «madura», lista para descargar sus TAG a su paso por los capilares de los tejidos periféricos, donde está la lipoproteína lipasa, de forma similar a como lo hacen los QM. Igual que ellos, a medida que pasa por los capilares de esos tejidos captadores de grasas, la VLDL se empobrece en triacilglicéridos, hasta llegar a convertirse en otra lipoproteína de densidad

intermedia, la IDL (parecida a los QMr), de la que un 50%, aproximadamente, es captado casi inmediatamente por receptores hepáticos. El otro 50% continúa circulando e intercambiando material con las HDL, a las que cede los TAG restantes y todas las apoproteínas que contiene, excepto las B-100, y de la que recibe ésteres de colesterol, es así como las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) son transportadores de los triacilgliceroles (TAG), mientras que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL), lo son de los ésteres de colesterol (EC). (Lucentini, s/f)

La LDL es una molécula de un diámetro aproximado de 20 nm y una densidad de entre 1.019-1.063 g/mL, está compuesta en un 35% de ésteres de colesterol, 12% de colesterol, 8% de triglicéridos y 20% de fosfolípidos.

Constituyendo los lípidos el 75 % de la molécula aproximadamente; de tal manera, que son las moléculas que transportan la mayor cantidad de colesterol en los humanos, es decir, dos terceras partes del colesterol plasmático total (Laguna, J. 2002, p. 390)

Tabla 4. Valores de colesterol.

Valores óptimos de colesterol	
Colesterol total	<200mg/dL
LDL	<100mg/dL
HDL	>35 mg/dL hombres
	>40 mg/dL mujeres

Valores óptimos de colesterol. (Fletcher, 2021)

Razones para el aumento o la disminución de los valores

- Aumento: Dietas ricas en grasas saturadas, trastornos hereditarios del metabolismo del colesterol
- Disminución: Ingesta elevada de fibra, tratamiento farmacológico

Índices Aterogénicos.

El tejido graso compuesto por células específicas, llamadas adipocitos, en las cuales se almacena la energía (en forma de grasa), funciona como reserva energética, un incremento importante de éste tejido predispone la aparición de trastornos cardiometabólicos, secundarios a la hipertrofia del adipocito, situación que se ve influenciada por el género, el cual de manera paralela interviene en la distribución de la grasa, favoreciendo su acumulación en el tejido subcutáneo en las mujeres y visceral en los hombres, siendo de mayor riesgo para padecer enfermedades cardiometabólicas, también se conoce su asociación con una mayor resistencia a la insulina, en el organismo se ha descrito de manera importante la relación entre la elevación de éstos índices y la presencia de sobrepeso y obesidad. Ya que los índices aterogénicos representan un conglomerado de indicadores bioquímicos, a partir de la relación entre el colesterol total, la lipoproteína de baja densidad (LDL), la lipoproteína de alta densidad (HDL) y los triglicéridos (TG), estos factores permiten identificar de manera temprana en el paciente el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares. (Herrera González et al., 2022)

Se ha reportado una relación significativa entre el índice de triglicéridos y la presencia de diabetes y enfermedad renal diabética, cabe resaltar que aunque el IMC, ha sido ampliamente estudiado en el abordaje del riesgo cardiometabólico, este índice no es certero a la hora de determinar si el sobrepeso o la obesidad, corresponden a un incremento de la masa grasa o magra, por lo cual se recurre frecuentemente al uso de otros índices antropométricos como la bioimpedancia, método útil para medir el agua corporal total en sus compartimentos, la masa libre de grasa y la masa grasa, entre otros, a partir de la resistencia de los tejidos, al paso de una corriente alterna. En relación a ello, se ha documentado que en sujetos con

normopeso, determinado por IMC, la masa grasa puede variar desde el 5 hasta el 40 % del peso corporal y que del mismo modo, en sujetos con sobrepeso y obesidad, la masa grasa puede corresponder solamente al 20 % del peso corporal, y por ello es posible que no siempre el incremento del IMC sea indicativo de riesgo cardiometabólico, aunque se encuentren reportes de correlaciones fuertes entre este y el porcentaje graso, tanto en hombres como en mujeres. (De la Torre-Cisneros et al., 2019)

Urea.

Compuesto químico de fórmula $\text{CO}(\text{NH}_2)$. Se encuentra en mayor proporción en la orina, en el sudor y en la materia fecal. Principal producto terminal del metabolismo de las proteínas en los mamíferos, como los humanos; contenido en la orina humana, se presenta en unos 20 g/L (gramos por litro); un adulto elimina de 25 a 39 g (gramos) diariamente.

En cantidades menores, se presenta en la sangre, en el hígado, en la linfa y en los fluidos serosos, también se encuentra en el corazón, en los pulmones, en los huesos y en los órganos reproductivos. La urea se forma principalmente en el hígado como un producto final del metabolismo. El nitrógeno de la urea, que constituye el 80 % del nitrógeno en la orina, procede de la degradación de los diversos compuestos con nitrógeno, sobre todo de los aminoácidos de las proteínas en los alimentos. (Munoz & Fernandez, 2012)

Principio del Test UV cinético.

La determinación de urea establece uno de los análisis más usuales empelados para evaluar la función renal. El test se utiliza frecuentemente aunado a la determinación de creatinina, se ocupa para el diagnóstico diferencial de la hiperuremia prerrenal (insuficiencia cardiaca, excreción de orina, catabolismo

proteico elevado), renal (glomerulonefritis, riñón policístico, nefroesclerosis y necrosis tubular) y postrenal (obstrucción de vías urinarias).

La urea es el producto final del metabolismo de las proteínas y de los aminoácidos, ya que, en la degradación de proteínas, éstas se despliegan en aminoácidos y se desaminan. El amoníaco formado es sintetizado a urea en el hígado, convirtiéndose en la vía más importante de degradación del exceso de nitrógeno en el organismo humano. (Tenorio Cañamás et al., 2010)

En el año 1913, Marshall desarrolló una prueba para determinar la urea en sangre por medio de la enzima ureasa, que cataliza la hidrólisis de la urea a dióxido de carbono y amoníaco, liberado por la ureasa que es determinado por titrimetría. Se establecieron métodos para determinar el amoníaco liberado incluyendo el test de indofenol de Berthelot y la reacción de amoníaco con el reactivo de Nessler.

Fue hasta 1965, Talke y Schubert publicaron un método completamente enzimático para la determinación de la urea empleando el sistema enzimático de ureasa/glutamato-deshidrogenasa (GLDH).

El test UREA/BUN de Roche se basa en el método de Talke y Schubert y fue optimizado para su empleo en analizadores automáticos que permiten la medición cinética del punto final, debido a que la composición de los reactivos permite una mayor linealidad y estabilidad más continua.



A continuación, el amoníaco formado reacciona con el α -cetoglutarato y el NADH bajo la acción de la GLDH para obtener glutamato y NAD^+ .



La reducción de la ansroancia debida al consumo del NADH se mide cinéticamente.

Reactivos - Soluciones utilizadas.

R1

Tampón CAPSOE: 5 mmol/L, pH 9.65; NADH (levadura)

2 0.23 mmol/L: conservante

R2

Tampón BICINb: 1000 mmol/L, pH 7.6; ureasa (*Canavalia ensiformis*) ≥ 120 kat/L;

GLDH (hígado bovino) ≥ 15.0 pkat/L;

α -cetoglutarato = 8.3 mmol/L; conservante.

a) CAPSO - ácido 3-(ciclohexi amino)-2-nidraxi-1-propanosulfónico

b) BICIN = N.N-Bis(2-hidroxiatil-glicina).

Creatinina.

La creatinina es un producto metabólico no enzimático de la creatina y la fosfocreatina, que en condiciones normales se produce a una tasa constante desde el tejido muscular esquelético (alrededor de 2% por día de la reserva total de creatina). Molécula pequeña (113 Dalton) que no circula unida a proteínas plasmáticas, por lo que se filtra libremente a nivel glomerular. No se reabsorbe, pero se secreta por el túbulo proximal en un porcentaje variable, que aumenta a medida que progresa la insuficiencia renal, lo que determina que la depuración de creatinina sobreestime el valor real de la velocidad de filtración glomerular (VFG) y que esta situación aumente a medida que progresa la falla renal. En condiciones normales la excreción extrarrenal de creatinina es mínima; sin embargo, a medida que decae la VFG se produce un aumento de su excreción intestinal, favorecida por proliferación de flora intestinal capaz de degradarla. (Huidobro E. et al., 2018)

Test cinético colorimétrico

creatinina+ácido picrico $\xrightarrow{\text{solución-alcalina}}$ **Complejo creatinina + ácido picrico**

En una solución alcalina, la creatinina forma un complejo amarillo-naranja con el picrato. La intensidad cromática es directamente proporcional a la concentración de creatinina.

Técnicas Biología Molecular.

qPCR (Tiempo Real)

Los niveles de cuantificación de expresión génica son de gran aporte, debido a que pueden proporcionar información valiosa sobre la función de los genes. (Laikhter, 2015). Tal y como lo presentan las mediciones precisas de la expresión génica que pueden identificar el tipo de células o tejidos donde se expresa un gen, revelar niveles de expresión génica individuales en un estado biológico definido (p. ej., enfermedad, desarrollo, diferenciación) y así mismo detectar una alteración en los niveles de expresión génica, ya que en el mayor de los casos los ensayos de protección de RNasa intervienen mucho tiempo y, a veces, resultan difíciles para generar de manera confiable mediciones precisas de los niveles de expresión génica. El uso de RT-PCR en tiempo real ofrece más de una ventaja favorable sobre estos métodos, la cantidad relativamente pequeña de muestra requerida para el análisis, la capacidad de reproducir datos rápidos y precisos y la capacidad de analizar más de un gen a la vez lo convierte en una técnica ampliamente reproducible. (Strum et al., 2002)

La PCR es una prueba la cual se basa en la reacción de la cadena del ADN polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés «primer»). (Witvrouwen et al., 2018)

Esta variante de la PCR hace uso de marcadores fluorescentes con el objetivo de saber la cantidad de ADN inicial en todo momento y detectar la presencia de variaciones genéticas, ya que la emisión de fluorescencia será proporcional al número de moléculas producidas, determinando que la técnica sea cuantitativa. Para llevar a cabo la realización de la técnica, asimismo del uso de los reactivos sugeridos para la PCR convencional, se utilizan sondas marcadas con enzimas, sustratos antigénicos, radioisótopos, quimioluminiscencia o fluorescencia, con capacidad de unión a la cadena de ácido nucleico que se requiere amplificar. En función del marcado de la sonda, para su interpretación se utilizan diferentes métodos. Esta prueba es factible de utilizar en la identificación de virus, bacterias y hongos, el fluoróforo marcador más utilizado es el SYBR Green, ya que presenta carga positiva y no emite fluorescencia si está libre, debido a que esta prueba es una modalidad del PCR de punto final, donde la acumulación de ADN amplificado es detectado y cuantificado a medida en que la reacción va avanzando, de ahí el nombre “tiempo real”, es recomendable que antes de hacer uso de la PCR en tiempo real para cuantificar un mensaje de destino, se debe tener meticulosidad para optimizar el aislamiento del ARN, el diseño del cebador y las condiciones de reacción de la PCR para que estas se puedan realizar mediciones precisas y confiables. (Kovalenko & Santos, 2009)

En relación con el principio de la técnica se basa en la PCR punto final, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados que sucede en cada ciclo de la reacción. A su vez, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de la PCR punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco.

La nomenclatura que se usa también es diferente, si utilizamos ADN genómico entonces hablamos de una qPCR (quantitative PCR), si por lo contrario, primero obtenemos ADNc y luego hacemos la PCR, nos referimos a una RT-qPCR.9 Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Teniendo una cantidad muy pequeña de templado,

el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Una de sus aplicaciones más usadas es para cuantificar cambios muy pequeños en la expresión génica mediante la detección de los niveles del ARNm procedente de células o tejidos. La cantidad de ARNm que puede detectar la reacción puede ser a partir de concentraciones bajas a diferencia de la PCR, punto final que necesita una mayor concentración. (Ebai et al., 2015)

Los aditivos químicos en la PCR en tiempo real son propios utilizados en la PCR punto final, sólo que generalmente la enzima, dNTP's, Mg +, el buffer y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados se venden juntos en una solución conocida como «Master mix», el agua es proporcionada por separado y también es libre de nucleasas. Los primers deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad y para que generen ampliaciones de un tamaño que oscile entre 17-21 pb; si éstos son más grandes, la eficiencia de la reacción disminuye considerablemente. Para evitar estos problemas, una alternativa es diseñar los primers, utilizando programas informáticos disponibles, o comprarlos ya validados de las compañías de biología molecular, quienes garantizan resultados altamente eficientes y satisfactorios para los usuarios. (Sánchez, s/f).

Tabla 5. Comparación de PCR convencional y PCR en tiempo real.

PCR CONVENCIONAL	QPCR EN TIEMPO REAL
<ul style="list-style-type: none"> • Detecta un único segmento del ADN • Amplificación y cuantificación del producto en dos fases. • Menor sensibilidad • Menor especificidad • Equipos con menor costo 	<ul style="list-style-type: none"> • Detecta y amplifica el ADN • Aplicación y cuantificación en un solo paso • Mayor sensibilidad • Mayor especificidad • Equipos y reactivos más costosos • (sondas fluorescentes más caras)

(Meregildo-Rodriguez et al., 2023)

Flujo de trabajo unidireccional

Zona: Extracción de Ácidos Nucleicos (PRE-PCR)


Zona 2: Preparación de reactivos de PCR (PRE-PCR)


Zona 3: Amplificación y detección (POST-PCR)



Técnica qPCR.

2. Diseño de primers:

✓ Se deberá diseñar cebadores específicos para su gen de interés.

Para ello es importante hacer uso de algún software, por ejemplo, Primer3Plus o implementos de empresas tales como IDT. (Integrated DNA Technologies)

Considerar: Evitar la formación de estructuras secundarias o dímeros.

3. Extracción de ADN/ARN:

✓ Para llevar a cabo la extracción de ADN o ARN de las muestras, se deberá utilizar aquellos métodos de extracción adecuados.

✓ En caso de emplear ARN, se deberá sintetizar ADNc mediante transcripción inversa.

4. Preparación de “Master Mix” (mezcla de componentes para una sola reacción).

1. Tampón qPCR (generalmente incluido con la polimerasa) - 10 μ l

2. Cebador directo (stock 10 μ M): 0,5 μ l

3. Cebador inverso (stock 10 μ M) - 0,5 μ l

4. Sonda (si se utiliza qPCR basada en sonda) o SYBR Green (para SYBR Green qPCR): el volumen varía según la concentración.

5. ADN polimerasa (normalmente Taq): 0,2-0,5 μ l

6. Mezcla de dNTP (si no está incluida en el tampón) - 0,5 μ l

7. Agua libre de DNasa/RNasa: hasta el volumen deseado, normalmente 20 μ l.
8. Muestra de ADN o ADNc: 1-3 μ l.

Nota: Las cantidades y los volúmenes variarán según las recomendaciones del fabricante del kit/reactivo.

4. Configurar reacciones:

- ✓ Adicionar la mezcla maestra a cada pocillo.
- ✓ Añadir la cantidad adecuada de ADN o ADNc a cada pocillo.
- ✓ Verificar incluir un control sin plantilla (NTC) para comprobar si hay contaminación.

5. Condiciones de ciclo (para máquina qPCR convencional):

1. Desnaturalización inicial: 95°C durante 3-10 minutos
2. Desnaturalización: 95°C durante 10-30 segundos
3. Recocido: 55-65°C (depende de la T_m del cebador) durante 10-30 segundos
4. Extensión: 72°C durante 20-30 segundos
5. Repetir paso no. 2 durante 35-45 ciclos.
6. En caso de hacer uso de SYBR Green: El análisis de la curva de fusión: de 65 °C a 95 °C con un incremento de 0,5 °C cada 5 segundos para comprobar si hay amplificación no específica.

6. Análisis de datos:

- Realizar la verificación de los gráficos de amplificación y las curvas de fusión (para SYBR Green qPCR).
- Utilizar los valores de Ct (ciclo umbral) de los gráficos de amplificación para cuantificar muestras.
- En caso de utilizar una curva estándar, verificar que la eficiencia se encuentre en el 90 % y el 110 % para obtener una cuantificación más precisa.

7. Interpretación:

✓ Relacionar los valores de Ct de su gen de interés y con genes de referencia (genes de mantenimiento) para determinar la expresión genética relativa.

- Sugerencias de uso:

1. Ejecutar siempre un control sin plantilla (NTC) así como es recomendable de ser posible, un control positivo. (Bookout et al., 2006)

2. Para comparar los niveles de expresión genética entre muestras, verificar de normalizar utilizando genes de genes de mantenimiento o también llamados constitutivos

3. Asegúrese de analizar muestras por duplicado o triplicado para tomar en consideración variaciones menores de pipeteo.

4. De trabajar con ARN, incluir un paso para eliminar la posible contaminación del ADN genómico.

PCR Punto Final.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction) es una técnica que se emplea para la detección de presencia de dianas relacionadas a su cantidad relativa al finalizar la reacción, ya que la longitud limitada de las secuencias producidas durante la PCR convencional, de aproximadamente 5 kb, se supera en parte con la incorporación de factores añadidos que proporcionan actividad de verificación y corrección, el poder inherente de la PCR es su capacidad para amplificar exponencialmente secuencias de ácidos nucleicos específicas en un corto período de tiempo. La amplificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) mediante PCR se logra a través de múltiples ciclos de replicación del ADN in vitro, la cual brinda respuestas cualitativas acerca de si una secuencia objetivo particular está presente o no, pero no ofrece información cuantitativa. (Fraga et al., 2014)

Durante la PCR de punto final, se utiliza un tubo que contiene la mezcla de PCR, la cual se va a amplificar en un termociclador hasta que se completan todos los ciclos

deseados, de acuerdo con una parte del contenido del tubo generalmente se analiza por medio de electroforesis en gel y se procede a teñir con tinte de bromuro de etidio. La electroforesis en gel de agarosa separa los fragmentos de ADN de la mezcla según su tamaño, los fragmentos más pequeños se mueven a través del gel de agarosa que los fragmentos más grandes, en el caso del bromuro de etidio se une al ADN y emite fluorescencia cuando se excita bajo una luz ultravioleta. Si la amplificación fue exitosa, entonces se puede detectar un producto llamado amplicón. (Kuslich et al., 2019)

De acuerdo con la qPCR frente a PCR, las diferencias significativas son la cuantificación, la velocidad y la resolución. La PCR de punto final permite el análisis cualitativo o semicuantitativo al final de todos los ciclos de PCR mediante un gel de agarosa o un microchip. qPCR se apoya en tintes o sondas fluorescentes y curvas de calibración para entregar datos cuantitativos en tiempo real. Con relación a PCR frente a qPCR, la qPCR tiende a ser más dinámica y con mayor resolución.

Con la PCR cada DNA recién sintetizado se convierte en una molécula molde para generar más, creando así una reacción en cadena que genera copias de DNA de manera exponencial. (Coffee, 2009)

1. Se necesita ADN polimerasa para sintetizar las copias de ADN, debido a que la PCR implica varios pasos de alta temperatura, por lo que se requiere una ADN polimerasa resistente al calor. Las polimerasas termoestables se aíslan de bacterias que viven en ambientes a temperaturas de hasta 90 °C o más. El ADN polimerasa *Taq* de *Thermus aquaticus* es la más usada, pero muchas especies diferentes de bacterias termófilas han proporcionado características mejoradas para realizar copias de una secuencia de DNA diana durante la PCR.
2. El ADN polimerasa necesita un suministro de nucleótidos, o bloques de construcción para el nuevo ADN, con el objetivo de sintetizar las nuevas copias. Estos se proveen como desoxinucleósidos trifosfatos (dNTP).

3. Una solución amortiguadora o tampón que contiene las concentraciones adecuadas de iones y pH que garantizan las condiciones óptimas.

Conforme a los avances técnicos en el área de biología molecular moderna, la PCR es uno de los más rentables; de hecho, la PCR es lo suficientemente sensible como para amplificar el DNA de una sola célula, debido a esto incursionar en el rubro biotecnológico el análisis y manipulación de DNA, propone construcción de plantas, animales transgénicos, ciencia forense, diagnóstico médico, terapia génica y análisis ambiental que le confiere el gran aporte. (Arany, 2008)

Técnica PCR punto final.

1. Diseño de primers:

✓ Se deberá diseñar cebadores específicos para su gen o región de interés.

Nota: Cerciorarse de que no haya formación de estructuras secundarias o dímeros.

2. Extracción de ADN:

Extraer el ADN de sus muestras haciendo uso del método adecuado (extracción con fenol-cloroformo, utilización de kits comerciales de extracción de ADN).

3. Preparación de Master Mix (para una única reacción de 50 µl):

1. Tampón de PCR 10x (frecuentemente incluido con la polimerasa) - 5 µl
2. Cebador directo (stock 10 µM) - 1 µl
3. Cebador inverso (stock 10 µM) - 1 µl
4. Mezcla de dNTP (normalmente 2 mM de cada dNTP) - 1 µl
5. MgCl₂ (de ser necesario y no estar incluido en el tampón): el volumen varía según las características específicas del cebador y la plantilla.
6. Taq ADN polimerasa: 0,25-0,5 µl (varía según la concentración y la fuente de la enzima)

7. Agua libre de DNasa/RNasa: hasta 50 μ l (ajustar el volumen según otros componentes)
8. Plantilla de ADN: 1-3 μ l (dependiendo de la concentración)

Consideración: Las cantidades y los volúmenes podrían modificarse según las recomendaciones del fabricante del kit/reactivo.

4. Configuración de la reacción de PCR:

- Mezclar todos los componentes en un tubo de PCR.
- Mezclar moderadamente y centrifugar rápidamente para llevar los componentes al fondo del tubo.

5. Condiciones de ciclo (para una máquina de PCR típica):

1. Desnaturalización inicial: 94-98°C durante 2-5 minutos
2. Desnaturalización: 94-98°C durante 20-30 segundos
3. Recocido: temperatura específica de los cebadores (a menudo 5 °C por debajo de la T_m de los cebadores) durante 20 a 40 segundos.

Nota: Si el primer es menor a 20 pb, la temperatura de fusión (T_m), se calcula en base a la siguiente fórmula:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

Siendo G, C, T y A el número de cada una de las bases que forman cada uno de los oligos.

4. Extensión: 72°C, la duración depende de la longitud del fragmento que se va a amplificar (normalmente 1 minuto por 1 kb)
5. Repita los pasos 2 a 4 durante 25 a 35 ciclos.
6. Extensión final: 72°C durante 5-10 minutos

6. Análisis:

Analizar los productos de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa.

Cargar el producto de PCR mezclado con un tinte de carga de ADN apropiado en un gel de agarosa que contenga un tinte intercalador de ADN (como bromuro de etidio o una alternativa más adecuada).

Transportar el gel y visualizar bajo luz UV (o la fuente de luz adecuada para el tinte).

Consideraciones de uso:

1. Ejecutar siempre un control sin plantilla (NTC) para verificar contaminación o amplificación no específica.
2. Guardar los productos de PCR a 4 °, en caso analizar pronto a -20 °C para un almacenamiento a largo plazo.
3. Para mejorar la especificidad, considerar utilizar una Taq polimerasa de inicio en caliente o un protocolo de PCR de touchdown.
4. Es posible optimizar la temperatura de recocido según el par de cebadores utilizado.

Nota: Las condiciones pueden requerir optimización según los cebadores, la plantilla y el kit o reactivos específicos que esté utilizando, ya que algunos detalles pueden variar según los reactivos y los instrumentos que se estén utilizando. (Beverly, 2001)

Este trabajo busca impulsar y ayudar a los alumnos que inician el desarrollo de trabajos experimentales (licenciatura) y que no tengan experiencia con estas técnicas y que se familiaricen de manera sencilla, accesible y clara, para facilitar su ejecución y coadyuvar en la obtención de resultados confiables y veraces. De igual forma, los alumnos que tengan alguna formación afín al área biomédica (posgrado), podrán apoyarse en este texto que de manera particular será una herramienta de mucho valor en el laboratorio 9 de la Facultad de Farmacia.

CONCLUSIONES

- Se desarrolló un manual de técnicas que frecuentemente se emplean en el laboratorio 9 de la Facultad de Farmacia de la UAEM.
- El presente manual servirá como material de referencia y apoyo para los estudiantes que ingresen al laboratorio 9 de esta Facultad a desarrollar sus tesis experimentales, pero de manera general a los alumnos del área de bioquímica clínica.

- El presente manual facilitará la ejecución de cada técnica asegurando la confiabilidad de los resultados y su veracidad.

BLOGRAFÍA.

- Alvirde-García, U. (s/f). Dislipidemias e hipertensión arterial. Org.mx. Recuperado el 20 de octubre de 2023, de https://www.anmm.org.mx/GMM/2016/s1/GMM_152_2016_S1_056-062.pdf
- American Diabetes Association. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. Diabetes Care. 2003; 26 (suppl 1): S33-S50.
- American Diabetes Association: Standards of Medical Care in Diabetes. 2006. Diabetes Care 29 (Suppl 1): S4-S42.
- Arany, Z. P. (2008). High-throughput quantitative real-time PCR. Et al [Current Protocols in Human Genetics], 58(1). <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg1110s58>
- Barberena, E. C., Ríos, E. C., & Muñiz, A. R. O. (2014). Manual de prácticas de laboratorio de Citometría de Flujo. Retrieved from <http://publicacionescbs.izt.uam.mx/DOCS/MCF.pdf>
- Beverly, S. M. (2001). Enzymatic amplification of RNA by PCR (RT-PCR). Et al [Current Protocols in Molecular Biology], 56(1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1505s56>.

- Bleesing JJH, Risma KA. Assessment of functional immune responses. En: Rich RR edt.
- Bøyum, A., "Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood." Scand. J. Clin.Lab. Invest. 21 Suppl. 97 (Paper IV): 77-89, 1968.
- Bøyum, A., "Separation of white blood cells." Nature 204: 793-794, 1964.
- Branco Mautner y Guyton Hall. Inmunology. Panamericana. 2011; 623-625.
- Carvajal, C. (2014). Lipoproteínas: metabolismo y lipoproteínas aterogénicas. Medicina legal de Costa Rica, 31(2), 88–94. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152014000200010
- Cell Culture Manual 2008-2009, 3rd Edition. Sigma Life Science, pp 230-231.
- Cell Culture Manual 2008-2009, 3rd Edition. Sigma Life Science, pp 230-231.
- Ciancaglini, C. (2004). Hidrodinamia de la circulación vascular periférica normal y patológica. Revista costarricense de cardiología, 6(2), 43–61. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-41422004000200006.
- Ciudad J., San Miguel J. F., González M., López-Berges M. c., Vidriales B., Orfao A.: Enfermedad mínima residual en LLA: análisis multiparamétrico mediante citometría de flujo. Sangre, 1992 (en prensa).

- Cleeman, J.I., et al., Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *Jama-Journal of the American Medical Association*, 2001. 285(19): p. 2486-2497.
- *Clinical Immunology Principles and practice*. 3rd edition. Mosby Elsevier. 2008;1447-1460.
- Coffee, B. (2009). Methylation-specific PCR. Et al [*Current Protocols in Human Genetics*], 61(1). <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg1006s61>
- Danza, A., Narváez, J., Graña, D., Pérez, L., Viera, A., Baccelli, A., Borgia, I., & Roca, F. (2021). Relación entre el uso de glucocorticoides y el daño crónico en Lupus Eritematoso Sistémico: una asociación precoz y nociva. Estudio exploratorio. *INNOTEC*, 6(1), 14–23. <https://doi.org/10.26445/06.01.2>.
- Daniels T. Killinger K. Michael J. Wright R. Jiang Z. Lipoproteínas, homeostasis del colesterol y salud cardíaca. *Ciencias Biológicas Internacionales J 200*): 5(5):474-488.
- Diana, O. (s/f). Técnicas: ELISA y Western Blot Aspectos prácticos.... Wordpress.com. Recuperado el 25 de octubre de 2023, de <https://inmunojmvucv.files.wordpress.com/2017/02/elisa-y-wb-2017.pdf>
- Donner, T. y Sarkar, S. (2019). Insulin–Pharmacology, Therapeutic Regimens, and Principles of Intensive Insulin Therapy. División de Endocrinología, Diabetes y Metabolismo. Universidad Johns Hopkins. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278938/>

- Drareni, K. et al. (2019). Transcriptional control of macrophage polarisation in type 2 diabetes. Seminario en inmunología. Springer-Verlag. Doi: 10.1007/s00281-019-00748-1
- Ebai, T., Kamali-Moghaddam, M., & Landegren, U. (2015). Parallel protein detection by solid-phase proximity ligation assay with real-time PCR or sequencing. Et al [Current Protocols in Molecular Biology], 109(1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2010s109>.
- EBioscience™ cell proliferation dye eFluor™ 670. (s/f). Thermofisher.com. Recuperado el 25 de octubre de 2023, de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/mx/es/65-0840-85>
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. (s/f). ENCUESTAS. Recuperado el 24 de octubre de 2023, de <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanutcontinua2023/index.php>
- Federación internacional de diabetes (FID), (2019). Diabetes Atlas. 9th Edition. Recuperado de <https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas.html>
- Federación mexicana de diabetes (FMD) (2015). Factores sociales y culturales influyen en incremento de la diabetes. Recuperado de <http://fmdiabetes.org/factores-sociales-y-culturales-influyen-en-incremento-de-la-diabetes/>
- Federación mexicana de diabetes (FMD) (2015). Factores sociales y culturales influyen en incremento de la diabetes. Recuperado de

<http://fmdiabetes.org/factores-sociales-y-culturales-influyen-en-incremento-de-la-diabetes/>

- Firake B, Chettiar R, y Firake T. (2017). Nitazoxanide: A Review of Analytical Methods. *PharmaTutor*, 5(9); 61-68.
- Fleisher TA, de Oliveira JB. Flow Cytometry. En: Rich RR ed. *Clinical Immunology*.
- Fernández-Morales, D. (2005). Manifestaciones clínicas del síndrome del ovario poliquístico. *Acta Médica Costarricense*, 47(4), 180–185.
https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022005000400004
- Fraga, D., Meulia, T., & Fenster, S. (2014). Real-time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 8(1).
<https://doi.org/10.1002/9780470089941.et1003s08>
- Fundación Comprarte Vida, A.C. Manual de Procedimientos Serológicos y Celulares de Histocompatibilidad. Departamento de Inmunología e Inmunogenética del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 2007.
- Fuss, I. J., Kanof, M. E., Smith, P. D., & Zola, H. (2009). Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. Et al [*Current Protocols in Immunology*], 85(1).
<https://doi.org/10.1002/0471142735.im0701s85>

- Gruber W, Lander T, Leese B, Songer T, Williams R. (eds.). The economics of diabetes and diabetes care. A report of the Diabetes Health Economics Study Group. Bruselas: International Diabetes Federation-World Health Organization; 1997.
- Grundy, S.M., et al., Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation*, 2004. 110(2): p. 227-239.
- Guadalajara Boo, J. F., Quiroz Martínez, V. A., & Martínez-Reding García, J. O. (2007). Definición, fisiopatología y clasificación. *Archivos de cardiología de México*, 77, 18–21. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-99402007000500003
- Guyton A y Hall J. Tratado de fisiología médica. 10^a Ed. España. Editorial McGraw – Hill Interamericana. 2001; 34: 490.
- Guzmán-Flores, J. M., & López-Briones, S. (s/f). Células de la inmunidad innata y adaptativa en la diabetes mellitus tipo 2 y obesidad. *Org.mx*. Recuperado el 20 de octubre de 2023, de https://anmm.org.mx/GMM/2012/n4/GMM_148_2012_4_381-389.pdf
- Hans Reinauer, Philip D. Home, Ariyur S. Kanagasabapathy, Claus-Chr. Heuck. Diagnóstico y monitorización de la Diabetes Mellitus desde el laboratorio. (2003). Organización Mundial de la Salud. 11-17
- Harris M y Zimmet P. Classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. Second Edition. Chichester: 1997; 9-23.

- Hawley TS, Hawley RG. Flow Cytometry Protocols; 2nd edition. Humana Press Incorporated, Totowa 2004.
- Hawley, T. S., & Hawley, R. G. (2004). Flow cytometry protocols. Humana Press.
- Heerlein, A. (2002). Tratamientos farmacológicos antidepresivos. Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría, 40 , 21–45. <https://doi.org/10.4067/s0717-92272002000500003>
- Herráez, A. (s/f). Exclusión del colorante azul tripano. Uah.es. Recuperado el 25 de octubre de 2023, de <https://biomodel.uah.es/tecnicas/cel/tripano.htm>
- Herrera González, A., Peña Garcel, Y., Soto Matos, J., León Patiño, E. H., & Mora Díaz, I. (2022). Utilidad de los índices aterogénicos del perfil lipídico en el diagnóstico de aterosclerosis subclínica. Revista cubana de medicina, 61(3). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232022000300010
- Hession C, Tizard R, Vassallo C, Schiffer SB, Goff D, Moy P, Chi-Rosso G, Luhowskyj S, Lobb R, Osborn L. Cloning of an alternate form of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1). J Biol Chem. 1991 Apr 15;266(11):6682-5.
- Hillis GS, Flapan AD. Cell adhesion molecules in cardiovascular disease: a clinical perspective. Heart 1998;79: 429-31.
- Hoffman, R. A. (2008). Flow Cytometry: Instrumentation, Applications, Future Trends and Limitations. In Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements II (pp. 307–342). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/4243_2008_037

- Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha: a key of the obesity-diabetes link. *Diabetes*. 1994 43:1271-8.
- Hu FB, Stampfer MJ, Solomon CG, Liu S, Willett WC, Speizer FE, et al. The impact of diabetes mellitus on mortality from all causes and coronary heart disease in women. *Arch Intern Med* 2001; 161:1717-23
- Huidobro E., J. P., Tagle, R., & Guzmán, A. M. (2018). Creatinina y su uso para la estimación de la velocidad de filtración glomerular. *Revista Medica de Chile*, 146(3), 344–350. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872018000300344>
- Kovalenko, O. A., & Santos, J. H. (2009). Analysis of oxidative damage by gene-specific quantitative PCR. Et al [*Current Protocols in Human Genetics*], 62(1). <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg1901s62>
- Kuslich, C. D., Chui, B., & Yamashiro, C. T. (2019). Overview of PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 18(1). <https://doi.org/10.1002/cpet.27>
- Laboratorio de Citometría de Flujo. (s/f). Uam.es. Recuperado el 25 de octubre de 2023, de <https://www.uam.es/uam/sidi/unidades-de-analisis/unidad-citometria-de-flujo/citometria-de-flujo>
- Kaufer-Horwitz, M., & Pérez Hernández, J. F. (2021). La obesidad: aspectos fisiopatológicos y clínicos. *Inter discipline*, 10(26), 147. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485705e.2022.26.80973>.

- Laikhter, A. (2015). Overview of qPCR molecular probes. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 11(1). <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et1005s11>.
- Lucentini, D. M. O. (s/f). METABOLISMO DE LAS LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS. Uba.ar. Recuperado el 25 de octubre de 2023, de <https://www.fmed.uba.ar/sites/default/files/202003/17%20METABOLISMO%20DE%20LIPOPROTE%C3%8DNAS.pdf>
- Macey MG. *Flow Cytometry: Principles and Applications*. Humana Press Incorporated, Totowa 2007.
- Magrini W, Martini G Hipertensión arterial: principales factores de riesgo. (s/f). 1Library.co. Recuperado el 24 de octubre de 2023, de <https://1library.co/article/magrini-w-martini-hipertensi%C3%B3n-arterial-principales-factores-riesgo.zp02l5rq>
- Manuel Moreno, G. (2012). Definición y clasificación de la obesidad. *Revista médica Clínica Las Condes*, 23 (2), 124–128. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(12\)70288-2](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(12)70288-2)
- Marcela, E., Alvarez, L., Raquel, E., & Haro, A. (s/f). MÉTODOS PARA DETERMINAR LA VIABILIDAD CELULAR CON APLICACIÓN EN ODONTOLOGÍA. Edu.pe. Recuperado el 25 de octubre de 2023, de https://repositorio.usmp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12727/5143/lopez_aem.pdf?sequence=3&isAllowed=y
- Margni, R. *Inmunología e inmunoquímica*. 5 a Ed. Editorial Médica Panamericana. 1997; 21-22.

- Maurice R. G. O’Gorman M.R.G et al. Flow Cytometry. En: Detrick B et al, edt. Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology. 7th edition. Washington; ASM press. 2006;141-230.
- Meltzer S, Leiter L, Daneman D, Gerstein HC, Lau D, Ludwig S, Yale JF, Zinman B, Lillie D. 1998 clinical practice guidelines for the management of diabetes in Canada. Canadian Diabetes Association. CMAJ. 1998;159 Suppl 8:S1-29.methods of isolating leukocytes." Blood 11: 436-454, 1956.
- Mexico. (s/f). World Obesity Federation Global Obesity Observatory. Recuperado el 24 de octubre de 2023, de <https://data.worldobesity.org/country/mexico-139/>
- Mirta Roses, Juan Rosas Guzmán. Organización Panamericana de la Salud “Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de Diabetes Mellitus tipo 2” .2008, 7-8.
- Munoz, C. M., & Fernandez, A. M. (Eds.). (2012). Urea: Synthesis, Properties & Uses. Nova Science.
- Nunez, R. (2001). DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. Current Issues in Molecular Biology, 3(3), 67–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11488413>
- Obesity as an inflammatory process. (s/f). La obesidad como un proceso inflamatorio. Org.mx. Recuperado el 24 de octubre de 2023, de <https://www.scielo.org.mx/pdf/bmim/v67n2/v67n2a2.pdf>

- Olaiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Ávila M, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública; 2006
- Oleas Galeas, M., Barahona, A., & Salazar Lugo, R. (2017). Índice de masa corporal y porcentaje de grasa en adultos indígenas ecuatorianos Awá. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 67(1), 42–48. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222017000100006
- Orfao A, Ciudad J, López A, López-Berges MC, Vidriales B, Macedo A, et al. La citometría de flujo en el diagnóstico clínico. Servicio General de Citometría. Universidad de Salamanca, 1993
- Organización Mundial de la Salud. Global Health Observatory Data Repository. Geneva, Switzerland; 2013.
- Pérez Miguelsanz, M. ^a. J., Cabrera Parra, W., Varela Moreiras, G., & Garaulet, M. (2010). Distribución regional de la grasa corporal: Uso de técnicas de imagen como herramienta de diagnóstico nutricional. *Nutricion hospitalaria: organo oficial de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral*, 25(2), 207–223. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112010000200003
- Principles and practice. 3rd edition. Mosby Elsevier. 2008;1435-1446.
- Quesada, D., Hernández-Solano, M. I., Brenes, J., & Vindas-Smith, R. (2021). Modelo preclínico de obesidad basado en alimentos altamente procesados y de alta palatabilidad. *Población y salud en Mesoamérica*, 19(2), 399–418. <https://doi.org/10.15517/psm.v19i2.48138>

- Reaven, G. M. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37(12), 1595–1607. <https://doi.org/10.2337/diab.37.12.1595>
- Reinauer Hans, Home P, Kanagasabapathy S, Chr C. Diagnóstico y monitorización de la Diabetes Mellitus desde el laboratorio. Organización Mundial de la Salud. 2003; 11-17.
- Ridker, P.M., et al., Comparison of C-reactive protein and lowdensity lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med*, 2002. 347(20): p. 1557-
- Rojas, J., Bermúdez, V., Leal, E., Cano, R., Luti, Y., Acosta, L., Finol, F., Aparicio, D., Arraiz, N., Linares, S., Rojas, E., Canelón, R., & Sánchez, D. (2008). Insulinorresistencia e hiperinsulinemia como factores de riesgo para enfermedad cardiovascular. *Archivos venezolanos de farmacología y terapéutica*, 27(1), 29–39. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642008000100008
- Rodríguez López, C. P., González Torres, M. C., Aguilar Salinas, C. A., & Nájera Medina, O. (2017). Mecanismos inmunológicos involucrados en la obesidad. *Investigación clínica*, 58(2), 175–196. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332017000200008
- Rodríguez López, C. P., González Torres, M. C., Aguilar Salinas, C. A., & Nájera Medina, O. (2017). Mecanismos inmunológicos involucrados en la obesidad. *Investigacion clinica*, 58(2), 175–196. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332017000200008.

- Sanchez, M. A. S. (s/f). TRANSMITANCIA, ABSORBANCIA Y LEY DE LAMBERT-BEER. Innovacionumh.es. Recuperado el 25 de octubre de 2023, de https://repositorio.innovacionumh.es/Proyectos/P_22CursoMateriales/Miguel_Angel_Sogorb/Wimba/Espectroscopia_05.htm
- Shapiro H. M. (ed). Practical flow cytometry. Alan R Liss Inc, New York, 1988.
- Shapiro HM. Practical Flow Cytometry. 4th ed. New Jersey: Wiley-Liss, Hoboken, 2003
- Sigma-Aldrich, Histopaque-1077, Procedure No. 1077.
- Skoog, W.A. and Beck, W.S., "Studies in the fibrinogen, dextran, and phytohemagglutinin
- Sobrepeso y obesidad en niños, niñas y adolescentes. (s/f). Unicef.org. Recuperado el 24 de octubre de 2023, de <https://www.unicef.org/mexico/sobrepeso-y-obesidad-en-ni%C3%B1os-y-adolescentes>
- SOP #290 Cell Counting and Viability Determination, Johns Hopkins University. The Genetic Resources Core Facility: The Cell Center. MD, USA.
- Standard Operating Procedures (SOPs) Laboratorio de Genómica Viral y Humana Facultad de Medicina UASLP, s/f)

- Standard Operating Procedures (SOPs) Laboratorio de Genómica Viral y Humana Facultad de Medicina UASLP. (s/f). Uaslp.mx. Recuperado el 25 de octubre de 2023, de http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_counts_ENG.pdf
- Strum, J. C., Carrick, K. M., Stuart, J. S., & Martensen, S. A. (2002). Tissue expression profiling using real-time PCR. Et al [Current Protocols in Pharmacology], 18(1). <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0609s18>
- Suárez Carmona, W., Sánchez Oliver, A., & González Jurado, J. (2017). Fisiopatología de la obesidad: Perspectiva actual. Revista Chilena de Nutricion: Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Nutricion, Bromatologia y Toxicologia, 44(3), 226–233. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182017000300226>
- Suárez de Venegas Sanz, C., De Miguel Crisóstomo, E., & Aguas Solo de Zaldívar, Y. (2002). Sobrepeso y obesidad. Farmacia profesional (Internet), 16(5), <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-sobrepeso-obesidad-13031770>
- Sundaram M. Yao Z. Progresos recientes en la comprensión de los factores proteicos y lipídicos que afectan el ensamblaje y la secreción de VLDL hepática. Nutrición y metabolismo 2010
- Tenorio Cañamás, M. T., Galeano Álvarez, C., Rodríguez Mendiola, N., & Liaño García, F. (2010). Diagnóstico diferencial de la insuficiencia renal aguda. Nefrología (English Edition), 3(2), 16–32. <https://doi.org/10.3265/NefroPlus.pre2010.Jul.10548>

- Trypan blue”, 1-Hemocitómetro y. Test de Exclusión. (s/f). Metodología e instrumentación de análisis celular. Unican.es. Recuperado el 25 de octubre de 2023, de <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/1295/3de9.CSFc.ap3.pdf>.
- Vega-Robledo Gloria Bertha. La respuesta inmune. Coordinación de Educación Médica Continua, Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM Rev Fac Med UNAM. 2008; 51-57.
- Weinstein L, Swartz MN. Pathologic properties of invading microorganisms. En: Sodeman WA, ed. Pathologic physiology. Philadelphia: Saunders, 1974;457-459.
- Winer S, Chan Y, Paltser G, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. Nat Med. 2009; 15(8): 921-929.
- Witvrouwen, I., Gevaert, A. B., Van Craenenbroeck, E. M., & Van Craenenbroeck, A. H. (2018). MicroRNA isolation from plasma for real-time qPCR array. Et al [Current Protocols in Human Genetics], 99(1). <https://doi.org/10.1002/cphg.69>
- World Health Organization. Diabetes mellitus. Second report. Geneva: WHO, 1980. Technical report Series 646. 1999.
- World Health Organization. Prevention of diabetes mellitus. Report of a WHO Study Group. Geneva: World Health Organization; 1994.

- Xu J, Jia YY, Chen SR, Ye JT, Bu XZ, Hu Y, Ma YZ, Guo JL, Liu PQ. (E)-1-(4-ethoxyphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-prop-2-en-1-one suppresses LPS-induced inflammatory response through inhibition of NF- κ B signaling pathway. *Int Immunopharmacol.* 2013; 15:743-751.

APENDICE.

Buffer de carbonatos

Carbonato de sodio (Na_2CO_3) 1.59 g

Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 2.93 g

Ajustar pH a 9.6 con HCl o NaOH y aforar a 1lt

Apéndice A

Buffer de lavados para ELISA

PBS

Tween 20 al 0.05 %

Apéndice B

Buffer salino de fosfatos

Cloruro de sodio (NaCl) 8.0 g

Cloruro de potasio (KCl) 2.0 g

Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) 1.442 g

Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) 0.200g

Agua desionizada 1 lt

Ajustar pH a 7.2

Esterilizar en autoclave a 15 lb de presión

Apéndice C

Sustrato de fosfatasa alcalina para ELISA

Di-etanol amina	100 mL
Cloruro de magnesio hexa-hidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	102 mg
Azida de sodio (NaN_3)	0.4 g
Agua destilada	700 mL

Ajustar pH a 9.8 con HCl concentrado, aforar a un litro y proteger de la luz. Se toman 12 a 15 mL de buffer y se disuelven dos tabletas de para-nitrofenil fosfato disódico (cada tableta es de 0.5 mg). Se añaden 100 μ l/pozo y se incuba la placa aproximadamente 30 min a 37°C



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

SECRETARIA DE DOCENCIA

JEFATURA DE LICENCIATURA

Cuernavaca, Morelos, 08 de febrero de 2024
FF/D/SD/JLF/17/2024
Asunto: VOTOS APROBATORIOS

**DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES
UAEM**

PRESENTE

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo **“Desarrollo de un manual de técnicas celulares y moleculares usadas en el laboratorio de Bioquímica Clínica e Inmunología con aplicación en Investigación dirigido a alumnos de la Facultad de Farmacia”** presentado por la pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. **C. Karla Cristina Vázquez Rocha (10010906)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

Jurado

Dr. Jesús Rivera Islas

Dra. Blanca Estela Duque Montaña

Dr. Mauricio Castillo Salazar

Dra. Angélica Flores Flores

Dr. Germán Bernal Fernández

Firma electrónica



Atentamente
Por una humanidad culta

**M.P.D. REYNA AMERICA SERRANO LÓPEZ
SECRETARIA DE DOCENCIA**

C.c.p: Archivo
FSLs/bedm*



UAEM
RECTORÍA
2023 - 2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

REYNA AMERICA SERRANO LOPEZ | Fecha:2024-02-09 11:27:02 | Firmante

EPnwnosKdoQblEu+6YAV1J1qrlpJbVfhdxy/b3ljd/drJeGnC32yLhDjAiv0Z4tlIM8+SbJ6Xnl6tkk8Lh+voUmNGrgU8MLECcfFnM2nSnPgkrGge+W0q/jzf+lh3qN3g+H3bl7V4IKhETXbt
ZQzSwFIecOdywxUN+moofrdRkHl3okrt0YICWktqycvvsz8IOYmYnW3LDjUQik1b4L3a6EH/DhNrm7YYEpbCLCrr4ZAdhal26DcxDL4j5h0IRQ725BVK35nglTlrcfKbw3tKqPY+PG
Wx5FPGrEV5IRJ5etszcE4I8hPK/MfgC1XMoDJ8jxdncnRgGFjWI76Wkufro3Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[yMcbNrfTz](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/VrQx0V2S7ABp7lPXkZmX8mqdrPWd4VOI>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GERMAN BERNAL FERNANDEZ | Fecha:2024-02-12 17:12:25 | Firmante

XiWszbf91sUQOdE51wplGqju6sCXGaT1+WQ7ft6UJ0syxcVbMuzTkHSmyhEEudAHchYdl55UKyQ0CORac3GMN5zK20Um4AJayBNKtCKKdq7ofvfDdDnBiLuEA0CDTM95u2YI
E4HLCb2UnWysoEY3ChSOqcKL85wJ1c8Gua6Q8le8uvqgKPYJsRs3bGa2JoULQtnEQxiv+17jp+HByrkXCRvnEF5PDDMbpoxoDBHtLnGKHuORKkrnR5JWS0zK2HSBjLEbvvdg9n6
4T7tPQvCJvYEKrogJ5IRFCJGQ/0wf7vihzK2fSW75AiVfWu+xYJC9WgkXMh4wMHFKsugX/Nnrcw==

MAURICIO CASTILLO SALAZAR | Fecha:2024-02-12 17:17:09 | Firmante

ukKuY+XNVL6U4AFxj/YMlrDt0+PGXGi9ltL/pcRNmkqE0XTcQbFPDHRkVmUdmlw1k81mKeAYZtTXERDKaB22E62NuJTD+Ck30hal9GV4UiknA9y5ax33e/lzkBlu2ZAefiRkMUD
Cy2+6/vuXMz6MXxw53yTTbAxWMyGZYvxaMn7GvtlIWPzDqqcEm/6Z3azJe4jBLyLzOJKcJrzAGR4aKFS3n8sPp0T85EBHcd5fKbdfgekaU/hLca5jJdD0cQF007Lnu+gV75NWh
CeXSlpeur+Wwf6Jx4qKm2sxb2Y6/8YmhWVjnOdFFIGlG3SC12HWfhaRjaA0sEk4XjehJ28ag==

JESUS RIVERA ISLAS | Fecha:2024-02-13 08:43:45 | Firmante

kgNJZqZxUloMs03rZb+umRIJ0yeObbMGT9CXR4Z4kHNxz8SVEEj76DMLoEg2KYmrX5NNFPwzLvWUtZBvqE00l/1H0GeUYaJLlIOD5fXE8Ip8OhDAAdvfWXMoB9AQXt0vMS3vn
wBZ/5UqQ3DRK3OdaD77f2UZONp8tUhwnuRMpMWFgRhP5qSOSwGhV9VX7AacybJankk++cYREidy68MjG15Wgvi9PmuOE1yBvmlqWLchyQXevpdBrC2itJvXD9gagu4+TNv+
kYQ8zR Ya/CdHL2L/ohthLHi8hD3sGrdsxlKpnttUlYgfmstCv5SjJtEuRWK1QRDRPBhoiTEyPPQ==

ANGELICA FLORES FLORES | Fecha:2024-02-13 12:49:33 | Firmante

XmhNVg1AgrTmhf3XvTT7K9Nh3KWtYJwknYoXrMPTBrvkyubRs1suCUAdCxdBivPollUksAqmlW31EBBQBh5o4xPLAHSaTE28jUVPMu0UQ24IvcWs+iRI4LbZjIHwjZfjLYGuk
HRocEgwehQ0047Z4QkbMQC7RqWqrjh6f8Lsqfucfh7A2O1iUUuJHH5CCoQJqIHi8iC1JUhiAtU/CTXgmjVr9y50Xxrf/9fUruVetwoCE9kb1qnvBU9kw/inDTIX+J34kTERusbxXv+7
0NhgilxCpdP9NwC++xrm/Wwuxuovq90gpZ6gVSRuZd82SG3JDUewwUCGc54HuiloQ==

BLANCA ESTELA DUQUE MONTAÑO | Fecha:2024-02-29 16:31:13 | Firmante

vFk4NXtpc+kFFP3JN3ZhwAjBH5vDp6QvbTWBPRZwa5KSOpes8WQpLoulrQ0VyDcszwntSNUh8AZK2YigJ619OqKvnxTRXMTJRB9PMVFE/zaq+SnaSzSriyAodPsGyAA+Llg42
LETWQ00yLr+94C7f2VxIx3DOnMnSFLJyGxhK07H+f1sro1cJvF8D0wtS/Dk2qwmJz0J6LmDV0V1wWuwceYdZa98zS2MBAbBdriwIY7OB3LYD5tOsiQLckpywBlJnSax1zn9exUIS
qs30WCf5QueZfBhGKUVbjWQPoWbaWuR3oFCmXhtDjzeqOWKki2hkdpgiamm1hmZql6Q4CwQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



FgZ0UXY7q

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/CJ8GoyQ8PBpzLExYwq43243ESmIY6J7d>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029