

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE
Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Sustentabilidad y tecnología

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)
Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos II



**ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara**

4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos II
Estandarización de técnicas inmunohistoquímicas, conductuales y método
de Lowry y ensayo de ácido tiobarbúrico en microplaca para un modelo de
hemiparkinsonismo en el CIBO, Guadalajara, Jalisco.

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes
Ing. en Biotecnología Mariana Fonseca Patiño

Profesor PAP: Dr. Aldo Rafael Tejeda Martínez
Tlaquepaque, Jalisco, mayo de 2023

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	2
Resumen	¡Error! Marcador no definido.
1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional.....	4
1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto	5
1.2 Caracterización de la organización.....	8
1.3 Identificación de la(s) problemática(s)	9
1.4. Planeación de alternativa(s).....	10
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora	13
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos	23
1.7. Bibliografía y otros recursos	24
1.8. Anexos generales.....	27
2. Productos	29
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	32
3.1 Sensibilización ante las realidades	32
3.2 Aprendizajes logrados	32

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son experiencias socio-profesionales de los alumnos que desde el currículo de su formación universitaria- enfrentan retos, resuelven problemas o innovan una necesidad sociotécnica del entorno, en vinculación (colaboración) (co-participación) con grupos, instituciones, organizaciones o comunidades, en escenarios reales donde comparten saberes.

El PAP, como espacio curricular de formación vinculada, ha logrado integrar el Servicio Social (acorde con las Orientaciones Fundamentales del ITESO), los requisitos de dar cuenta de los saberes y del saber aplicar los mismos al culminar la formación profesional (Opción Terminal), mediante la realización de proyectos profesionales de cara a las necesidades y retos del entorno (Aplicación Profesional).

El PAP es un proceso acotado en el tiempo en que los estudiantes, los beneficiarios externos y los profesores se asocian colaborativamente y en red, en un proyecto, e incursionan en un mundo social, como actores que enfrentan verdaderos problemas y desafíos traducibles en demandas pertinentes y socialmente relevantes. Frente a éstas transfieren experiencia de sus saberes profesionales y demuestran que saben hacer, innovar, co-crear o transformar en distintos campos sociales.

El PAP trata de sembrar en los estudiantes una disposición permanente de encargarse de la realidad con una actitud comprometida y ética frente a las disimetrías sociales. En otras palabras, se trata del reto de “saber y aprender a transformar”.

El Reporte PAP consta de tres componentes:

El primer componente refiere al ciclo participativo del PAP, en donde se documentan las diferentes fases del proyecto y las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo de este y la valoración de las incidencias en el entorno.

El segundo componente presenta los productos elaborados de acuerdo con su tipología.

El tercer componente es la reflexión crítica y ética de la experiencia, el reconocimiento de las competencias y los aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

El proyecto titulado *Estandarización de técnicas inmunohistoquímicas, conductuales y método de Lowry y ensayo de ácido tiobarbitúrico en microplaca para un modelo de hemiparkinsonismo en el CIBO, Guadalajara, Jalisco*, permitió la estandarización de una prueba conductual (Rotarod), una inmunohistoquímica para la proteína tirosina hidroxilasa (TH), del método de Lowry para cuantificación de proteínas y del ensayo de ácido tiobarbitúrico (TBARS) para la cuantificación de malondialdehído (MDA). Los alcances de esta estandarización corresponden al apoyo de un proyecto de investigación con la finalidad de producir conocimiento básico, que permita, por una parte, ampliar el conocimiento actual de una enfermedad compleja y multifactorial como lo es la enfermedad de Parkinson y, por otro lado, ser un precedente para la evaluación de moléculas con potencial terapéutico en dicha patología. Todo esto a través de la sistematización y descripción precisa de técnicas empleadas en la evaluación del modelo de hemiparkinsonismo con 6-OHDA que se utiliza en el laboratorio de Neurobiología de la División de Neurociencias del CIBO.

Se realizaron las pruebas suficientes para la obtención de curvas de calibración y resultados comparativos entre los murinos sin intervención contra los del modelo de hemiparkinsonismo, corroborándose en el proceso la funcionalidad del mismo por medio de las técnicas mencionadas. El modelo fue capaz de disminuir la inmunorreactividad a tirosina hidroxilasa, la latencia a la caída en la prueba conductual y de aumentar la cantidad de MDA sin modificar los niveles proteicos en las técnicas de TBARS y Lowry, respectivamente.

1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional

El PAP es una experiencia de aprendizaje y de contribución social integrada por estudiantes, profesores, actores sociales y responsables de las organizaciones, que de manera colaborativa construyen sus conocimientos para dar respuestas a problemáticas de un contexto específico y en un tiempo delimitado. Por tanto, la experiencia PAP supone un proceso en lógica de proyecto, así como de un estilo de trabajo participativo y recíproco entre los involucrados.

El presente PAP se lleva cabo en el Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), dentro de la división de

Neurociencias. El proyecto experimental forma parte de la investigación titulada “Efectos Conductuales, Celulares y Moleculares de la inhibición de la Monoacil Glicerol Lipasa en un Modelo Murino de Hemiparkinsonismo”.

La investigación previamente mencionada tiene como propósito evaluar el efecto de la inhibición de monoacil-glicerol lipasa (MAGL) en la progresión de la enfermedad de Párkinson en un modelo murino de hemiparkinsonismo inducido con 6-OHDA, al someter a cuatro grupos de ratones macho de la cepa C57BL6 a distintos tratamientos farmacológicos. El presente PAP es un proyecto experimental que tiene como objetivo general estandarizar las técnicas de microplaca (química húmeda Lowry TBARS), conductuales e inmunohistoquímica que sirvan de base para la evaluación y comparación de los diferentes tratamientos a los grupos de estudio.

Para lograrlo, se tienen como objetivos específicos:

- Estandarizar la técnica inmunohistoquímica para la proteína Tirosina hidroxilasa en tejidos de ratones control y del modelo de hemiparkinsonismo.
- Estandarizar el método de Lowry para la cuantificación de proteínas totales en tejidos de ratones control y del modelo de hemiparkinsonismo.
- Estandarizar el ensayo de ácido tiobarbiturico para evaluar la lipoperoxidación en tejidos de ratones control y del modelo de hemiparkinsonismo.
- Estandarizar una prueba conductual para la evaluación de la capacidad motora de los murinos.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

Etiología

La enfermedad de Párkinson (EP), es el trastorno del movimiento más prevalente y el segundo trastorno neurodegenerativo más común a nivel mundial. Se caracteriza por una lentitud y dificultad de la realización de movimientos y una reducción de la capacidad locomotriz en general. La edad representa un factor de riesgo aumentando un 93.1% las probabilidades de padecer la EP. Adicionalmente, se conocen variaciones genéticas involucradas con la enfermedad, reportando una mayor prevalencia en poblaciones europeas,

norteamericanas y sudamericanas, en comparación con poblaciones africanas, asiáticas y países árabicos [1]. Se ha estudiado también la relación de diferentes factores ambientales de exposición como los pesticidas, herbicidas y metales pesados con la EP.

En 1983, MPMT (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) fue administrada en pacientes y, debido a que se metaboliza y transforma en la neurotoxina MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridinio), que es un inhibidor del complejo I mitocondrial que daña principalmente a las células dopaminérgicas en la sustancia *nigra pars compacta* (SNpc), se le relaciona con la EP. Desde entonces, una gran cantidad de estudios mostraron que la enfermedad de Párkinson puede ser causado por toxinas ambientales [1]. Esta molécula ha sido ampliamente empleada como un modelo de la enfermedad en modelos murinos, sin embargo, al ser un oxidante en general se ha cuestionado su baja selectividad. Por su parte 6-OHDA es un análogo de la dopamina altamente oxidable que tiene la posibilidad de ser capturado mediante el transportador de dopamina. Sin embargo, contrario al MPTP, la 6-OHDA no atraviesa la barrera hematoencefálica, haciéndola mas selectiva para las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y por lo cual también requiere una administración por medio de cirugía [2].

Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc son mas vulnerables al estrés oxidativo inducido por 6-OHDA ya que poseen niveles elevados basales de especies reactivas de oxígeno (ERO), así como bajos niveles de glutatión-peroxidasa, enzima que tiene la capacidad de reducir el peróxido de hidrógeno a agua y evitar el daño generado por las ERO. A su vez la dopamina tiene alta susceptibilidad a autooxidarse y convertirse en neuromelanina, propiciando la formación de radicales hidroxilos (OH⁻) que, al combinarse con el hierro acumulado en altas concentraciones de las neuronas dopaminérgicas, afecta su capacidad de eliminación [2]. Es por ello que resulta de mucha utilidad la cuantificación de los niveles de estrés oxidativo, particularmente la lipoperoxidación puede ser medida como la cantidad de malondialdehído MDA a través del ensayo de ácido tiobarbitúrico. Para este ensayo es importante medir las concentraciones de proteínas totales puesto que pueden interferir en la cuantificación del MDA.

Neuropatología

La distinción principal respecto a los cambios morfológicos en la EP se observa en la sección transversal del tronco encefálico, donde la mayoría de los casos presentan una pérdida del pigmento oscuro en el área correspondiente a la sustancia *nigra pars compacta* y el *locus coeruleus*. La pérdida de pigmentación se puede relacionar directamente con una disminución de neuronas que contienen neuro-melanina (A9) [1].

Estudios cuantitativos morfométricos en *postmortem* de la enfermedad de Párkinson muestran una muerte de aproximadamente el 30%. Después de que los síntomas motores aparecen, las neuronas disminuyen cerca del 60% y a medida que la muerte celular progresa los síntomas motores lo harán también. Tras la pérdida celular, en la denervación de la ruta nigrostriatal, los niveles de dopamina en el cuerpo estriado disminuirán, además estudios recientes han demostrado que la muerte de las células nerviosas en la sustancia *nigra* está precedida por la pérdida de terminales axónicos que se proyectan hacia el cuerpo estriado. Mecánicamente, la pérdida de neuronas y axones sugiere una etapa preclínica importante que procede al inicio de los síntomas [1]. Es por ello que un modelo de Parkinsonismo con la antes mencionada 6-OHDA puede consistir en una administración de la toxina en el cuerpo estriado.

Patogénesis

La α -sinucleína nativa en el cerebro se despliega principalmente sin una estructura terciaria definida, aunque en soluciones acuosas puede estar presente en tetrámeros estables que resisten la agregación. Tras la interacción con lípidos cargados negativamente, como los fosfolípidos que forman las membranas celulares, la α -sinucleína se pliega en estructuras α -helicoidales a través de su N-terminal. En la EP, la α -sinucleína adopta una estructura similar a un amiloide rica en β hojas que es propensa a agregarse [1].

Estudios recientes en roedores indican que la especie de α -sinucleína más neurotóxica es la forma oligomérica temprana, en lugar de las fibrillas insolubles maduras. El aumento de la toxicidad de estos oligómeros, a diferencia de la α -sinucleína fibrilar, se validó en ensayos basados en células. Las especies oligoméricas de α -sinucleína son capaces de *sembrar* y acelerar la agregación anormal de proteínas y este podría ser el mecanismo subyacente a la propagación de la patología de la α -sinucleína en el cerebro [1]. Aunque no todos los modelos

de Parkinsonismo cuentan con la presencia de α -sinucleína si resulta muy común la evaluación de la capacidad locomotora de los sujetos experimentales. Para dicha evaluación existen diversas pruebas como la medición de la longitud de la zancada, las pruebas de varilla vertical y horizontal, y el Rotarod empleados ampliamente en roedores.

Además de la α -sinucleína, la tirosina hidroxilasa (TH) tiene un papel importante, al catalizar las conversiones de L-tirosina a L-3,4-dihidroxifenilalanina, la cual es el paso inicial en las rutas de biosíntesis de catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina) [3]. La importancia de TH radica en su modulación donde los niveles óptimos de catecolaminas se mantienen en respuestas a estímulos; cuando es expuesta a compuestos como el MPTP o 6-OHDA la expresión y actividad enzimática de TH se ve afectada, la cual tiene implicaciones significativas en la patología de la enfermedad de Párkinson [4]. De esta misma manera es un marcador importante para los modelos murinos de esta enfermedad, donde una tinción específica para esta proteína por medio de inmunohistoquímica es esencial para evaluar la extensión del daño en los tejidos de los roedores expuestos al modelo de 6-OHDA.

1.2 Caracterización de la organización

El Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) es parte del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y se localiza en la calle Sierra Mojada con número 800 en la colonia Independencia Oriente en Guadalajara, Jalisco. El centro está a cargo de la Doctora en Ciencias Blanca Torres Mendoza, y consta de cinco divisiones principales: Genética, la cual cuenta con once investigadores; Inmunología, con seis investigadores; Investigación Quirúrgica, con dos investigadores y tres catedráticos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT); Medicina Molecular, con cinco investigadores y Neurociencias, con siete investigadores. Además, cuenta con un bioterio y dos laboratorios: Laboratorio de Apoyo a la Vigilancia e Investigación Epidemiológica y Laboratorio del Retrovirus Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) de Noroccidente [5].

El CIBO tiene como visión ser un centro de excelencia para el desarrollo de la investigación para la solución de problemas en los procesos de atención a la salud, así como la formación de recursos humanos altamente calificados en el ámbito de la investigación científica biomédica. Su misión, por su parte, es generar conocimientos para explicar los fenómenos

biológicos a través del método científico, con el propósito de entender los mecanismos de enfermedad, desarrollar tecnología para la aplicación a la medicina institucional y formar profesionales de la investigación en salud [5].

En la división de Neurociencias, que está a cargo de la Doctora en Ciencias Blanca Torres Mendoza, se lleva a cabo el presente PAP con la guía del Dr. Aldo Rafael Tejeda Martínez.

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

La enfermedad de Párkinson (EP) es una alteración neurológica caracterizada por síntomas motores como movimientos lentos y temblorosos, así como pérdida del equilibrio. Además, los pacientes con EP pueden presentar complicaciones cognitivas, desórdenes mentales, problemas del sueño, dolor y trastornos sensoriales [6].

A nivel mundial los diagnósticos y mortalidad a causa de la EP aumentan a mayor velocidad que cualquier otro desorden neurológico [6]. La prevalencia de la enfermedad se ha duplicado en los últimos 25 años; las estimaciones actuales sugieren que en 2019 la EP dio lugar a 329 mil muertes, un aumento de más del 100% desde 2000 [7]. En México el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía estima una prevalencia de 50 casos nuevos por cada 100 mil habitantes, siendo la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en personas mayores de 50 años [8].

Algunos estudios sugieren que la enfermedad de Párkinson afecta más a la población masculina, además existen algunos factores que pueden aumentar el riesgo de una persona a padecer Párkinson. Uno claro factor es la edad, ya que la mayoría de los diagnósticos se dan en pacientes mayores de 60 años, sin embargo, cerca del 5-10% de los casos presentan síntomas antes de los 50 años [9].

La enfermedad de Parkinson ocurre cuando las neuronas de la glándula basal encargadas de producir dopamina sufren un daño y eventualmente mueren. Esto se manifiesta en los problemas de movimiento característicos de la enfermedad. Por otra parte, también existe una pérdida en los extremos de los nervios que producen norepinefrina, el compuesto

químico principal en la comunicación celular del sistema nervioso simpático, que controla funciones corporales como el ritmo cardiaco y la presión sanguínea, explicando otros síntomas de EP como fatiga, irregularidades en la presión sanguínea y disminución del movimiento de la comida por el tracto intestinal. Adicionalmente muchas neuronas de personas con EP contienen cuerpos de Lewy, acumulaciones de proteína α -sinucleína, sin embargo, aún continúa su estudio en las posibles implicaciones que puedan tener en la EP [9].

Es por ello por lo que la búsqueda de información que pueda aproximarnos a un mejor entendimiento de la patología y de posibles tratamientos para la misma, es una tarea muy importante para la sociedad.

1.4. Planeación de alternativa(s)

Medición de proteínas

Existen distintas técnicas para la cuantificación de proteínas como ensayo de Bradford, Kjeldahl o Lowry. El inicialmente mencionado es una técnica que se basa en los cambios colorimétricos de indicadores, con respecto a la cantidad de proteínas [10]. Sin embargo, debido a los costos de los reactivos en el método de Bradford se optó por no utilizar esta técnica.

Por su parte el método de Kjeldahl es una cuantificación directamente de la cantidad de nitrógeno proveniente de una muestra que, si bien refleja la cantidad de proteínas, también puede incluir especies químicas como la urea que pueden variar en un tejido si necesidad de significar un cambio en la cantidad de proteínas totales. Esta metodología incorpora un paso de digestión ácida y alcalina por lo cual es empleada primordialmente en el sector alimenticio, donde su potencial es explotado de una mejor manera [11].

Estrés oxidativo

Para la medición de estrés oxidativo, se puede utilizar la superóxido-dismutasa (SOD1) la cual es una enzima antioxidante que facilita la dismutación de radicales de oxígeno a peróxido de hidrógeno, y también cataliza las reacciones prooxidantes [12]. Sin embargo,

para evaluar la lipoperoxidación se optó por un kit de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, conocido como TBARS assay, ya que es un ensayo que proporciona los niveles de degradación oxidativa de los lípidos de la muestra y ha sido validado como un marcador para niveles de lipoperoxidación. Además, el centro de investigación contaba ya con los reactivos necesarios.

Para las pruebas motoras de los ratones se intentó implementar un laberinto de acrílico para medir la zancada de las pisadas de los roedores, sin embargo, no mostraron satisfacción por el circuito, ya que caminaban en la dirección incorrecta. Por ello, se optó por un dispositivo conocido como Rotarod, en el cual los ratones son colocados en las ruedas como se muestra en la Figura 1. El tiempo comienza a marcarse una vez que el ratón es colocado en el dispositivo y se detiene cuando cae de él. En la parte inferior del Rotarod existen pedales que al aplicarles una fuerza (como la del roedor al caer) detienen el tiempo de la prueba.



Figura 1. Ratones en prueba motora dentro del Rotarod.

Respecto al plan de trabajo, en la Tabla 1 se establece el desarrollo del presente PAP, donde se consideran las actividades que se llevarán a cabo en el CIBO, así como en el ITESO.

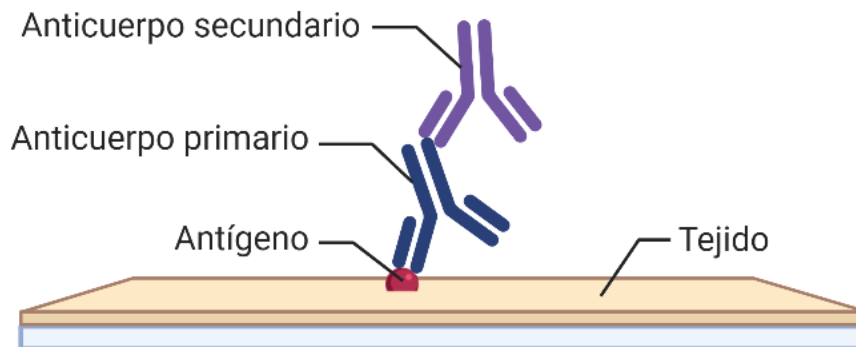
Tabla 1. Cronograma de actividades previstas para la realización del PAP

No mb re	Rec urs Tie	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo
----------------	-------------------	-------	---------	-------	-------	------

			Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11	S. Santa	Semana 12	Semana 13	Semana 14	Semana 15	Semana 16
Introducción a laboratorios de la división de Neurociencias	0	2																	
Identificación morfológica en los cerebros de roedores	LN	2																	
Entrenamiento de ratones para pruebas de zancada	CP	1																	
Introducción al uso de microscopios para técnicas utilizadas en la división de Neurociencias	AM	3																	
Entrega avance 1 de RPAP	CV	1																	
Investigación del ámbito y contexto	0	6																	
Medición de proteínas y estrés oxidativo en muestras de hipocampo y corteza cerebral de ratones.	LN KE M EF	3																	
Análisis de resultados respecto a la medición de proteínas	LN	2																	
Entrega avance 2 de RPAP	CV	1																	
Medición de estrés oxidativo y proteínas en nuevas muestras de ratones	LN KE M EF	5																	
Introducción y realización de pruebas inmunohistoquímicas	LN M	5																	
Entrega avance 3 de RPAP	CV	1																	
Registro de presentaciones	CI	1																	
Redacción de entrega 4 para establecer relación entre las pruebas realizadas y los objetivos del proyecto	LN	6																	
Revisión del avance 4 con el Dr. Aldo	LN	1																	
Entrega avance 4 de RPAP	CV	1																	
Realizar presentación ante el Dr. Aldo	LN	1																	

El aspecto inmunológico de la IHC radica en que la técnica depende de anticuerpos para reconocer y unirse a una proteína específica llamada antígeno. El anticuerpo primario puede ser generado en una especie animal diferente de la muestra; de la misma manera, el anticuerpo secundario puede ser producido en una especie animal diferente a la del anticuerpo primario y está dirigido contra la cadena pesada de la especie en la que esta hecha el anticuerpo primario [14].

Para llevar a cabo una inmunohistoquímica, es necesario incubar una muestra junto con un anticuerpo capaz de reconocer un antígeno específico. Después de añadir el anticuerpo primario, el anticuerpo secundario se agrega a la muestra, este es capaz de reconocer al primario, amplificando la señal. Cabe mencionar que el anticuerpo secundario solo podrá reaccionar con el primario si es dirigido contra la molécula de inmunoglobulina de la especie animal en donde el anticuerpo primario se generó [14]. En la Figura 2, se muestra a grandes rasgos, el acomodo de los anticuerpos primarios y secundarios sobre la muestra de tejido.



Created in BioRender.com bio

Figura 2. Representación del acomodo del anticuerpo primario y secundario sobre la muestra del tejido

Procedimiento

Para realizar la técnica de inmunohistoquímica, se utilizaron cortes de tejido cerebral de 40 μm previamente obtenidos de roedores. Los cortes fueron colocados en una placa de 12 pocillos. El tejido cerebral fue proporcionado por alumnos del Dr. Aldo.

Posteriormente se realizaron 3 lavados de los cortes de tejido cerebral con PBS (Buffer de solución salina y fosfato) en concentración 1X, agitando ligeramente 5 minutos entre cada uno de ellos. Inmediatamente después se dejaron incubar con solución de citrato de sodio 0.3% durante 30 minutos a 37°C.

Se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS de la misma manera. Al terminar, se agregó peróxido de hidrógeno al 10% en agitación durante 30 minutos. Se repitieron 3 lavados de PBS más, y se dejaron incubar con solución de bloqueo durante 24 horas en agitación. La solución de bloqueo estaba compuesta por 9 mL de PBS 1X, 10 µL de tritón, para permear la pared celular, y 1 mL de suero que contenía el anticuerpo primario contra la molécula tirosina hidroxilasa producido por la marca Abcam con número de catálogo ab6211.

Una vez transcurrido el periodo de agitación, se realizaron otros 3 lavados de los cortes con PBS y se dejaron incubar con la solución del anticuerpo secundario durante 2 horas en agitación. El anticuerpo secundario fue proporcionado por Vector Laboratories con un número de catálogo BA-5000. Nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS y se revelaron en una solución de 3,3'-Diaminobencidina (DAB), buffer y peróxido de hidrógeno. Se realizaron los últimos 3 lavados con PBS y se colocaron los cortes en un portaobjetos con ayuda de un pincel para evitar dañar el tejido, como se muestra en la Figura 3.



Figura 3. Acomode de tejidos en cubreobjetos para la técnica de inmunohistoquímica.

Después de acomodados los tejidos en el portaobjetos, se sumergió el portaobjetos en xilol e inmediatamente se le vertió resina y se colocó un cubreobjetos. Se dejó secar la resina durante 24 horas y se limpió el exceso con xilol.

Resultados

En la Figura 4 se muestra la región de cuerpo estriado de un murino control, en el cual se puede observar la inmunorreactividad de TH en tejido, indicando la presencia de neuronas dopaminérgicas. Por el contrario, en la Figura 5 se observan los efectos de la administración de 6-OHDA al no existir la presencia de neuronas dopaminérgicas en el lado izquierdo en cual se realizó la lesión.



Figura 4. Inmunoreactividad de TH en cuerpo estriado en un murino control

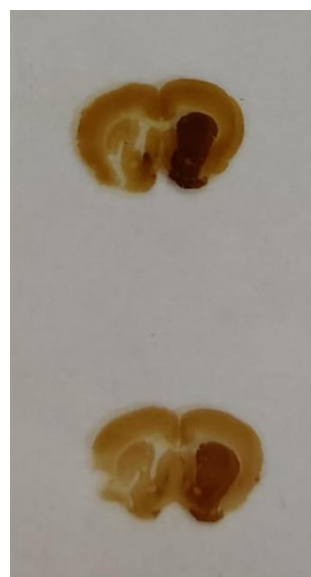


Figura 5. Inmunoreactividad de TH en cuerpo estriado en un murino bajo el modelo de 6-OHDA

De igual manera, en la Figura 6 se muestra el tejido de un murino control en el cual se puede observar la inmunoreactividad de TH en la SNpc indicando la presencia de neuronas dopaminérgicas. Por el contrario, en la Figura 7 se observan los efectos de la administración de 6-OHDA en el lado izquierdo en cual se realizó la lesión, al no existir la presencia de neuronas dopaminérgicas.



Figura 6. Inmunoreactividad de TH en SNpc en un murino control



Figura 7. Inmunoreactividad de TH en SNpc en un murino bajo el modelo de 6-OHDA

Así mismo, en las Figuras 8 y 9 se muestran los tejidos presentados en las Figuras 7 y 6, bajo el microscopio Leyca DM6B.

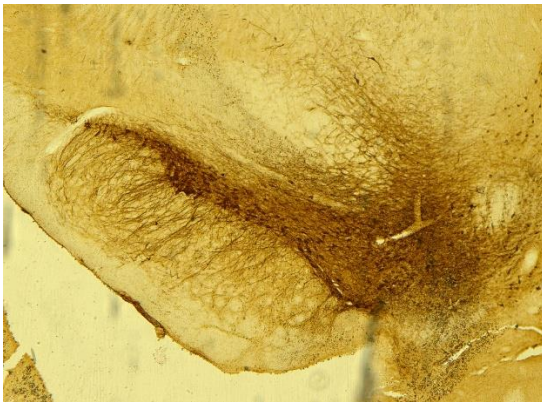


Figura 8. Inmunoreactividad de TH en SNpc en un murino control en microscopio

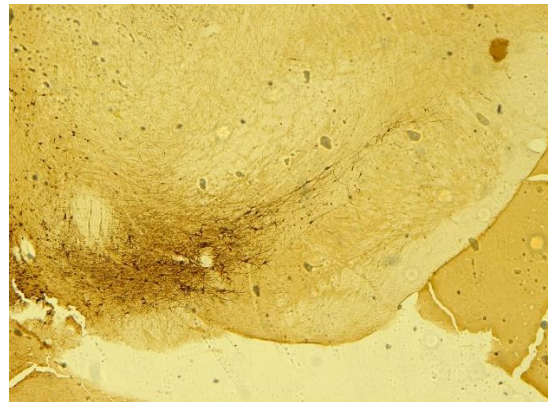


Figura 9. Inmunoreactividad de TH en SNpc en un murino bajo el modelo de 6-OHDA en microscopio

Ensayo de Lowry

Esta técnica se basa en la reacción de Biuret donde el cobre interactúa con cuatro átomos de nitrógeno de un péptido formando un complejo cuproso. En el ensayo de Lowry se agrega ácido fosmomolibdico/ fosfotúngstico también conocido como Folin-Ciocalteu. Este reactivo

interactúa con los iones cuprosos y las cadenas laterales de tirosina, triptófano y cisteína produciendo un color azul, el cual se puede detectar entre 650 y 700 nm [15].

Procedimiento

Se inició con la preparación de los reactivos A, B, C y D. Para el reactivo A se disolvió 1g de NaOH y 5g Na₂CO₃ en 250mL de agua destilada. Para el reactivo B se realizó una mezcla de CuSO₄ al 0.5% en citrato de sodio al 1%. Para el reactivo C se colocaron 50mL de reactivo A y 1mL de reactivo B. Para el reactivo D se colocó 1mL de reactivo de folín junto con 1.3mL de agua.

Para realizar la curva de calibración se utilizó una disolución de albúmina de 32mg/mL, y a partir de ella se realizaron ocho diluciones 1:1 como se muestra en la Figura 10.

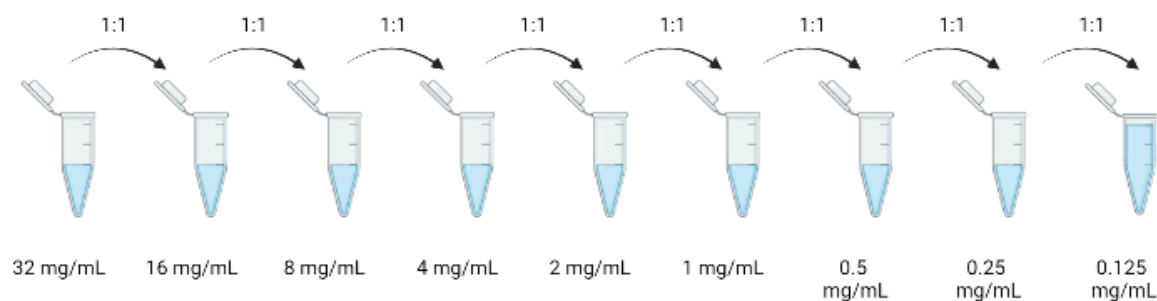


Figura 10. Curva de calibración para el método de Lowry.

Posteriormente, se colocaron en la microplaca 2 μ L de cada muestra, 20 μ L del reactivo C y 200 μ L del reactivo D. Al agregar este último se tomó especial precaución en mezclar con la micropipeta para obtener una muestra homogénea. Finalmente, se leyó la absorbancia a 700 nm en el espectrofotómetro.

Resultados

Con las lecturas de absorbancia se obtuvieron las concentraciones proteicas de las muestras en mg/mL. Posteriormente se realizaron pruebas de normalidad para saber el comportamiento de los datos. Los datos presentados pasaron exitosamente la prueba de Kolmogórov-Smirnov, por lo cual fue posible realizar una prueba de T de student. Estas se muestran en la Figura 11 y 12 respectivamente.

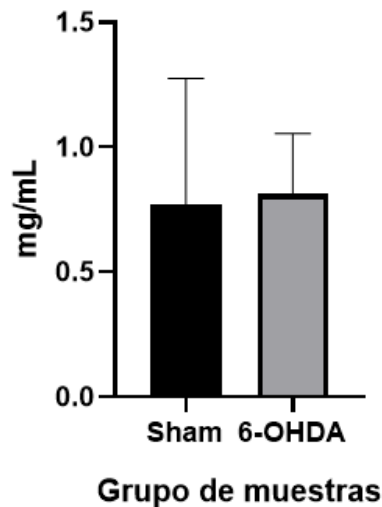


Figura 11. Resultados del método de Lowry en SNpc.

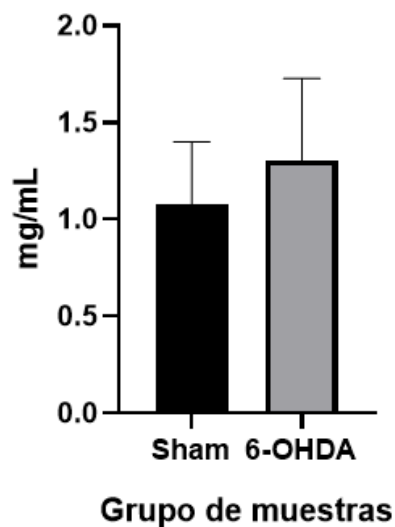


Figura 12. Resultados del método de Lowry en cuerpo estriado.

Al realizar los análisis estadísticos de ambos grupos se obtuvo un valor de p para las muestras de cuerpo estriado de 0.3248 y 0.8646 en el grupo de SNpc, indicando que no existe una diferencia significativa entre ambos grupos.

TBARS

El método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico o TBARS es utilizado para detectar la oxidación de lípidos. Este ensayo mide el malondialdehído (MDA), el cual es un producto

derivado de la oxidación de ácidos, siendo considerado como el metabolito final de la oxidación de cualquier lípido celular. El MDA reacciona con el ácido tiobarbitúrico formando un cromógeno rosado, y permitiendo su medición a través de un equipo de espectrofotometría [16].

Procedimiento

Se utilizó un kit de TBARS que contenía los reactivos necesarios para el procedimiento, al igual que la forma de preparación de soluciones y procedimiento del ensayo. Se comenzó por preparar una solución de hidróxido de sodio, la cual contenía 2 mL de NaOH y 18 mL de agua destilada. De igual manera se preparó una solución de ácido acético que contenía 4 mL de ácido acético y 16 mL de agua destilada. Para preparar la solución de color, utilizada en la cuantificación del MDA, se agregaron a 106 mg de ácido tiobarbitúrico (TBA), 10 mL de solución de NaOH y 10 mL de solución de ácido acético.

A 10 μ L de muestras de tejidos se le agregaron 10 μ L de solución SDS y 400 μ L de la solución de color. Se realizó una curva de calibración con una solución específica del Kit a la cual se le añadieron los mismos reactivos que a las muestras.

Una vez preparadas las muestras, se colocaron en baño María durante 1 hora e inmediatamente después, se colocaron en un baño de hielo por 10 minutos para detener la reacción. Después del tiempo transcurrido, se centrifugaron por 30 minutos a 1600 g. Se colocaron 150 μ L de cada muestra por duplicado en una microplaca de 96 pocillos, y se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

Resultados

Una vez obtenidas las lecturas de absorbancia se obtuvieron las concentraciones proteicas de las muestras. Posteriormente se realizaron pruebas de normalidad para saber el comportamiento de los datos. Al igual que los resultados del método de Lowry, los datos presentados pasaron exitosamente la prueba de Kolmogórov-Smirnov, por lo cual fue posible realizar una prueba de T de student. Estas se muestran en la Figura 13 y 14, respectivamente.

El análisis estadístico mostró valores de p menores a 0.0001 en el grupo correspondiente a cuerpo estriado, así mismo el grupo correspondiente a SNpc mostró un valor de 0.0327. Esto indica que ambos grupos tiene diferencias significativas entre el grupo control Sham y el grupo tratado con 6-OHDA. Los resultados obtenidos son correspondientes con lo esperado del modelo, ya que la lipoperoxidación es parte de los procesos observables en la enfermedad de Parkinson.

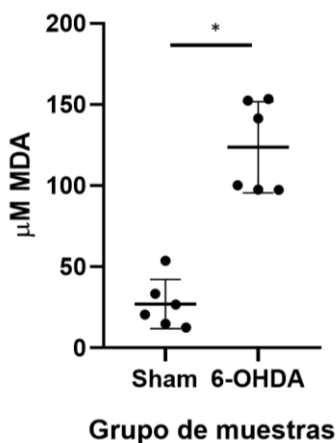


Figura 13. Resultados de ensayo TBARS en cuerpo estriado

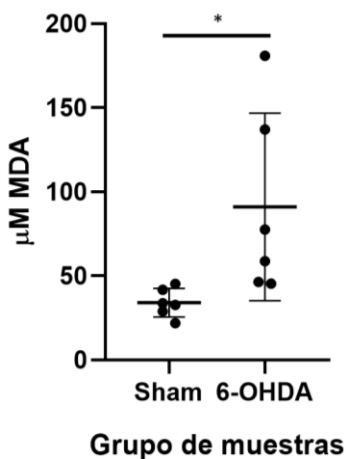
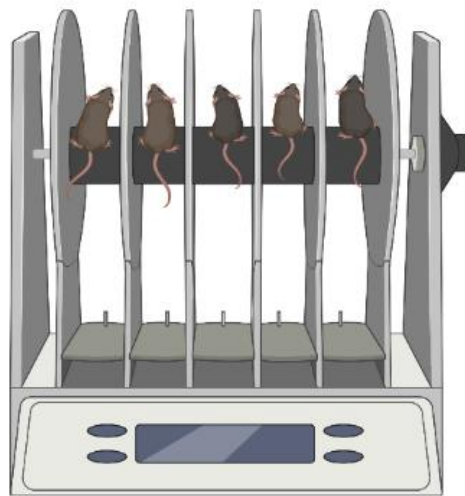


Figura 14. Resultados de ensayo TBARS en SNpc.

Rotarod

La prueba de Rotarod es utilizada para observar los efectos que pueda tener un procedimiento en el comportamiento animal. Consiste en una varilla circular que gira constantemente a una velocidad específica, en ella los animales se colocan y tratan de mantenerse en ella para evitar caer a la plataforma que se encuentra debajo de ellos [17]. El acomodo de los roedores en el equipo se muestra en la Figura 15. Debido a las dificultades motoras que aparecen como parte de la sintomatología de la enfermedad de Parkinson, el Rotarod permite analizar el equilibrio y movimiento de los ratones antes y después del daño neuronal, al igual que la respuesta a los futuros tratamientos.



Created in BioRender.com bio

Figura 15. Representación del acomodo de los ratones en el equipo de Rotarod.

Procedimiento

Para evitar que los ratones se desconcentraran, la prueba se llevó a cabo en un ambiente con la menor cantidad de distracciones posibles y, evitando la presencia y movimiento de personas. Cada prueba consistía en tres partes, cada una consistía en: 3 minutos con el Rotarod en movimiento y 15 minutos de descanso. El tiempo se comenzó a marcar al colocar a cada ratón en su respectiva superficie, y si alguno de ellos caía a la parte inferior, su tiempo automáticamente se detenía, dejando a los demás roedores terminar su tiempo de prueba. Al finalizar se registraban los tiempos de cada uno.

La prueba se llevó a cabo en tres fases. De manera inicial para que los ratones conocieran el funcionamiento, una segunda vez para tomar la línea base, y las siguientes pruebas a medida que progresaba la enfermedad de Párkinson.

Resultados

Se realizaron pruebas de normalidad para saber el comportamiento de los datos. Al igual que los resultados del método de Lowry y TBARS, los datos presentados pasaron exitosamente la prueba de Kolmogórov-Smirnov, por lo cual fue posible realizar una prueba de T de student (Figura 16). En ella se encontró un valor de p menor a 0.0001 indicando una diferencia significativa entre los grupos control Sham y los grupos sometidos a 6-OHDA. Debido a la pérdida de movilidad que se presenta en la enfermedad de Parkinson, así como en los modelos de Parkinsonismo, se obtuvieron los resultados esperados con una disminución de la movilidad en el grupo sometido al modelo.

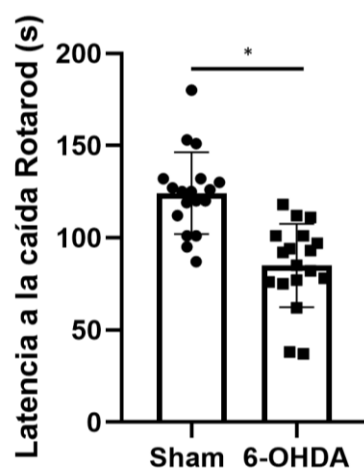


Figura 16. Resultados de la prueba locomotora en rotarod.

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

Los resultados mostraron diferencias significativas para todos los parámetros relevantes en las técnicas estandarizadas. Al comparar los grupos controles contra los grupos con el modelo

de hemiparkinsonismo bajo la administración de 6-OHDA, se obtuvieron: en primer lugar, una disminución de la capacidad motriz de los murinos bajo la prueba conductual de Rotarod, lo cual ofrece al modelo una validez de tipo aparente al emular la sintomatología de la enfermedad. Por su parte, la validez de constructo fue corroborada por medio de la prueba inmunohistoquímica y el ensayo TBARS donde el modelo logró disminuir la inmunorreactividad a la proteína TH y a su vez aumentar la cantidad de MDA que fueron evaluadas en estas metodologías, respectivamente. Además, dichos cambios fueron independientes de una diferenciación en la cantidad de proteínas en los mismos por el método de Lowry lo cual los valida a ambos de manera independiente. Por último, cabe destacar que, aunque la validez predictiva no fue analizada podría formar parte de las perspectivas a futuro dentro del laboratorio de investigación. Estos tres criterios de validez permiten identificar si un modelo experimental es lo suficientemente bueno según Paul Wilner, dando un respaldo al mismo y favoreciendo su reproducibilidad, una característica clave en el ámbito científico [18].

La comprensión y estandarización de metodologías clave en el estudio de patologías de alta prevalencia, así como la validación y reproducibilidad de sus modelos de estudio, es un factor clave en el desarrollo de la ciencia y tecnología necesarias para la prevención, atención y obtención de nuevos medicamentos contra estas patologías. Por lo anterior, el impacto social de la investigación no solo radica en la formación académica del alumno, sino en la generación de conocimiento necesario para la mejora de la salud y bienestar social.

1.7. Bibliografía y otros recursos

- [1] A. Kouli, K. M. Torsney y a. W.-L. Kuan, «Chapter 1 Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis,» 2018. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536722/>. [Último acceso: 28 Febrero 2023].
- [2] D. Hernandez-Baltazar, «El modelo de 6-hidroxidopamina y la fisiopatología,» 2015. [En línea]. Available: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0213485315001620?token=0C23D5A17CB9D7E26553E4A6AB881F85E02BEE4A520496451E0AC5ECE99E571C7ACA17C5DA4FA5BBBE34E638C1EA245D&originRegion=us-east-1&originCreation=20230504165655>. [Último acceso: 02 Mayo 2023].

- [3] K. Kobayashi y T. Nagatsu, «Chapter 7 - Tyrosine Hydroxylase,» 2012. [En línea]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978012386525000007X>. [Último acceso: 2 Mayo 2023].
- [4] G. Alam, «Chapter 4 - Regulation of tyrosine hydroxylase: relevance to Parkinson's disease,» 2020. [En línea]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128159507000047>. [Último acceso: 02 Mayo 2023].
- [5] O. S. Medina Gómez, «Libro Contribuciones del IMSS,» Diciembre 2018. [En línea]. Available: https://www.researchgate.net/publication/329841888_libro_contribuciones_del_IMS_S. [Último acceso: 27 Febrero 2023].
- [6] World Health Organization, «[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/parkinson-disease,](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/parkinson-disease)» 13 Junio 2022. [En línea]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/parkinson-disease>. [Último acceso: Febrero 2023].
- [7] World Health Organization, «Parkinson disease,» World Health Organization, 13 Junio 2022. [En línea]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/parkinson-disease>. [Último acceso: Febrero 2023].
- [8] Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores, «Párkinson, segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en personas mayores de 50 años,» Gobierno de México, 11 Abril 2019. [En línea]. Available: <https://www.gob.mx/inapam/es/articulos/parkinson-segunda-enfermedad-neurodegenerativa-mas-frecuente-en-personas-mayores-de-50-anos?idiom=es>. [Último acceso: Febrero 2023].
- [9] National Institute on Aging, «Parkinson's Disease: Causes, Symptoms, And Treatments,» National Institute on Aging, 14 Abril 2022. [En línea]. Available: <https://www.nia.nih.gov/health/parkinsons-disease>. [Último acceso: Febrero 2023].
- [10] J. M. Becker, G. A. Caldwell y E. A. Zachgo, «Exercise 13 - Protein Assays,» 1996. [En línea]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/bradford-protein-assay>. [Último acceso: 2 Mayo 2023].
- [11] B. Jiang, R. Tsao, Y. Li y M. Miao, «Food Safety: Food Analysis Technologies/Techniques,» 2014. [En línea]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780444525123000528>. [Último acceso: 2 Mayo 2023].
- [12] C. Estrada-Carrasco y J. Flores-Terrazas, «Regulación de enzimas antioxidantes como marcadores tumorales de la próstata,» Mayo 2010. [En línea]. Available: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-mexicana-urolgia-302-articulo-regulacion-enzimas-antioxidantes-como-marcadores-X2007408510538448>. [Último acceso: 28 Febrero 2023].
- [13] M. Carter y R. Essner, «Intracellular Signaling and Biochemical Assays,» 2022. [En línea]. Available: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128186466/guide-to-research-techniques-in-neuroscience>. [Último acceso: 25 Marzo 2023].

- [14] M. Carter, «Guide to Research Techniques in Neuroscience,» 2010. [En línea]. Available: doi:10.1016/b978-0-12-374849-2.00006-9. [Último acceso: 25 Marzo 2023].
- [15] C.-H. Shen, «Chapter 8 - Quantification and Analysis of Proteins,» 2019. [En línea]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128028230000080>. [Último acceso: 3 Mayo 2023].
- [16] S. Kumar y R. K. Chaitanya, «Chapter 20 - Assessment of Antioxidant Potential of Dietary Components,» 2018. [En línea]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128098530000201>. [Último acceso: 26 Marzo 2023].
- [17] V. Castagné y A. M. Hernier, «CNS Safety Pharmacology,» 2014. [En línea]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012801238304931X>. [Último acceso: 27 Marzo 2023].
- [18] P. Willner, «Methods for Assessing the Validity of Animal Models of Human Psychopathology,» 1991. [En línea]. Available: <https://link.springer.com/protocol/10.1385/0-89603-198-5:1#chapter-info>. [Último acceso: 5 Mayo 2023].

1.8. Anexos generales

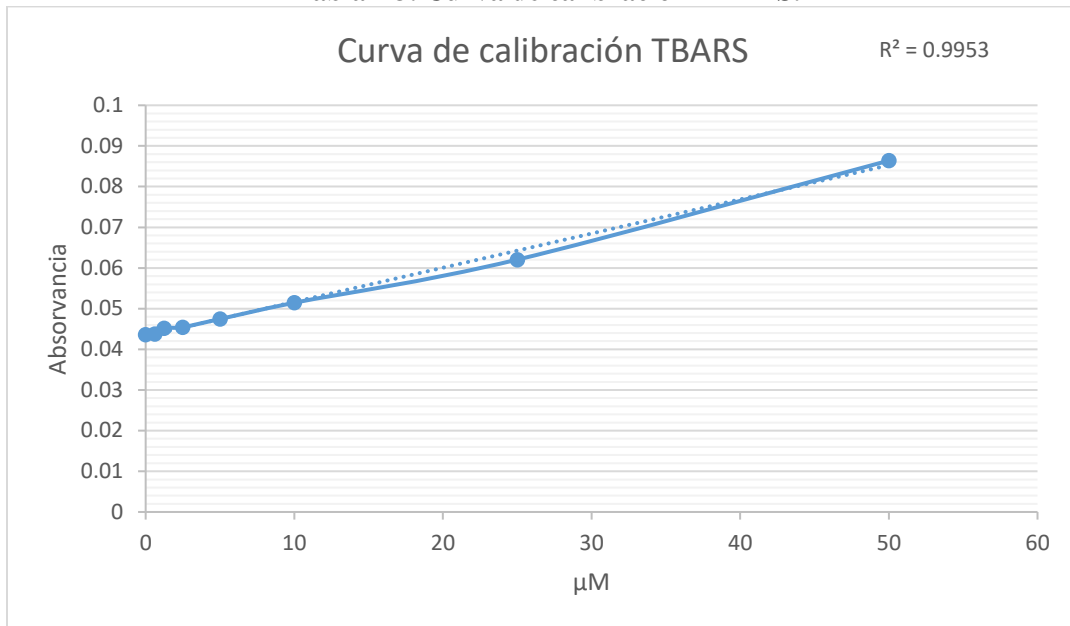
Tabla A1. Resultados del método de Lowry en SNpc.

Sustancia Nigra pars compacta				
Muestra	Abs	Abs 2	Promedio	[mg/mL]
ShamSN1	0.4143	0.4014	0.4079	1.04
ShamSN2	0.3686	0.3872	0.3779	0.86
ShamSN3	0.3709	0.3608	0.3659	0.79
ShamSN4	0.5083	0.4732	0.4908	1.52
ShamSN5	0.2832	0.2473	0.2653	0.20
ShamSN6	0.2601	0.2761	0.2681	0.22
Muestra	Abs	Abs 2	Promedio	[mg/mL]
6OHSN1	0.3415	0.3031	0.3223	0.54
6OHSN2	0.3892	0.3456	0.3674	0.80
6OHSN3	0.3923	0.4091	0.4007	1.00
6OHSN4	0.4385	0.3278	0.3832	0.89
6OHSN5	0.4083	0.4353	0.4218	1.12
6OHSN6	0.3442	0.2942	0.3192	0.52

Tabla A2. Resultados del método de Lowry en cuerpo estriado.

Cuerpo Estriado				
Muestra	Abs	Abs 2	Promedio	[mg/mL]
ShamCE1	0.3837	0.3666	0.3752	0.85
ShamCE2	0.3724	0.3756	0.3740	0.84
ShamCE3	0.4014	0.3899	0.3957	0.97
ShamCE4	0.4452	0.4982	0.4717	1.41
ShamCE5	0.3549	0.3933	0.3741	0.84
ShamCE6	0.5317	0.4622	0.4970	1.56
Muestra	Abs	Abs 2	Promedio	[mg/mL]
6OHCE1	0.3463	0.3542	0.3503	0.70
6OHCE2	0.459	0.4362	0.4476	1.27
6OHCE3	0.4862	0.5201	0.5032	1.60
6OHCE4	0.6599	0.4355	0.5477	1.86
6OHCE5	0.5033	0.4456	0.4745	1.43
6OHCE6	0.3951	0.3952	0.3952	0.96

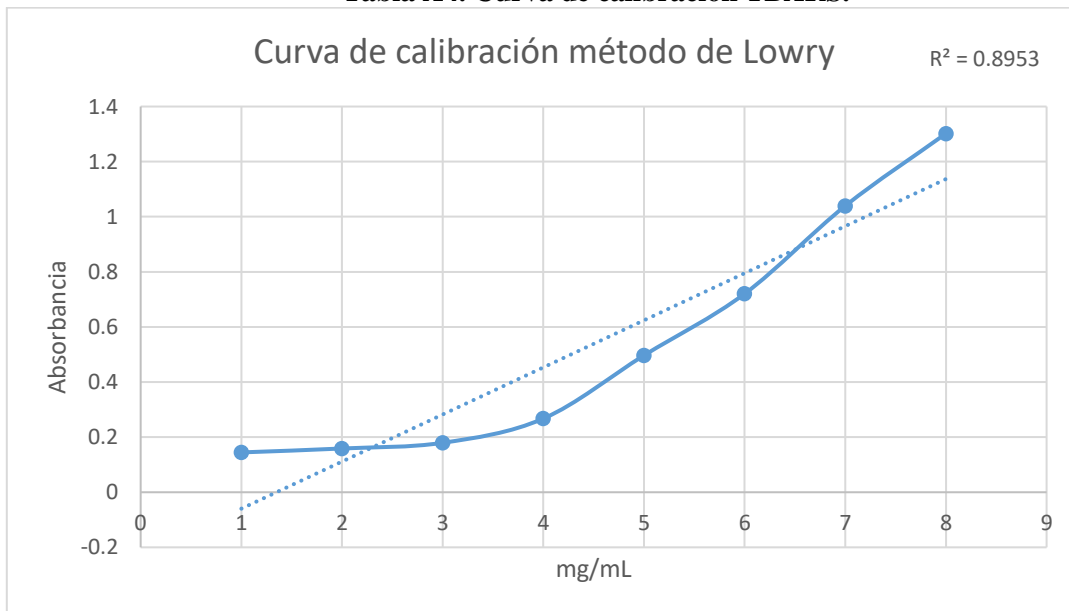
Tabla A3. Curva de calibración TBARS.



$$y = 0.0008x + 0.0433$$

Ecuación A1. Ecuación arrojada por la curva de calibración de TBARS

Tabla A4. Curva de calibración TBARS.



$$y = 0.1709x - 0.2305$$

Ecuación A2. Ecuación arrojada por la curva de calibración de método de Lowry

2. Productos

Nombre y código del PAP	4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos II
Nombre del proyecto	Estandarización de técnicas inmunohistoquímicas, método de Lowry y ensayo de ácido tiobarbitúrico en microplaca para un modelo murino de hemiparkinsonismo en el CIBO, Guadalajara, Jalisco.
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Un manual de las técnicas empleadas en el laboratorio de Neurobiología actualizado para las cuantificaciones de proteínas totales (Lowry) y de ácido tiobarbitúrico en microplaca (química húmeda) así como inmunohistoquímica y pruebas conductuales.
Autores:	Mariana Fonseca Patiño

El enlace para el manual de metodologías se encuentra a continuación [Manual de metodologías PAP II.](#)

Manual de metodologías

Mariana Fonseca Patiño

Método de Lowry

TBARS

Inmunohistoquímicas



Técnica inmunohistoquímica

1. Cortes de vibratomo de 40µM
2. Lavarlos 3 veces con PBS 1X (5min c/u)
3. Incubar con solución de Citrato de Sodio 0.3% 30 min a 37 °C
4. Repetir paso 2
5. Incubar con Peróxido de Hidrógeno al 10% en agitación por 30 min
6. Repetir paso 2
7. Incubar con solución de bloqueo 2hrs en agitación (9mL de PBS 1X +10µL de Tritón+ 1mL de suero (depende la especie en la que esté hecho el Ac. Secundario))
8. Incubar con Ac. Primario en PBS (dilución según referencia) 24hrs en agitación.
9. Repetir paso 2
10. Incubar con Ac. Secundario en PBS 2 horas en agitación (dilución según referencia)
(Si es biotinilado continuar con incubación de Kit ABC— pasó 12)
(Si es con HRP continuar Revelado Paso 14)
11. Repetir paso 2
12. Incubar con Complejo Avidina-Biotina (preparar según Kit) por 2 horas en agitación
(SOLO Si el Ac. Secundario es Biotinilado)
13. Repetir paso 2
14. Revelar con DAB (1 pastilla + 2 gotas de Buffer 7.4 [Tris-HCl] + 2 gotas de H₂O₂)
15. Repetir paso 2
16. Montar en portaobjetos y colocar en cámara húmeda
17. Deshidratar con serie de etanoles y xilol
18. Cubrir con Resina (dejar secar toda la noche).

3. Reflexión crítica y ética de la experiencia

El RPAP tiene también como propósito documentar la reflexión sobre los aprendizajes en sus múltiples dimensiones, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto para compartir una comprensión crítica y amplia de las problemáticas en las que se intervino.

3.1 Sensibilización ante las realidades

Durante el desarrollo del proyecto comprendí de una manera diferente los impactos que tiene la sintomatología de la enfermedad, desde las complicaciones motoras, emocionales e incluso cardíacas. Si bien había tenido cercanía con familiares con enfermedades neurodegenerativas, no había tenido la oportunidad de convivir con personas que padecieran Párkinson.

Por otra parte, el manejo de los modelos animales despertó en mi mucho sentimiento, pues si bien sabía el propósito de cada ratón, la idea del sacrificio no se acomodaba bien en mí. Con el tiempo comprendí que estos animales son criados con el único propósito de ser herramientas de laboratorio, además de que el trato que reciben en el proceso debe ser lo mas humano posible aun cuando al final deban de ser sacrificados. Es un proceso que tiene muchas legislaciones y regulaciones, sin embargo, aún queda por delante mejorar muchas de ellas.

3.2 Aprendizajes logrados

Definitivamente aprendí nuevas técnicas, desde inmunohistoquímicas, ensayo de TBARS, hasta cómo llevar a cabo las pruebas en Rotarod. Pero considero que llevar a cabo las técnicas de forma grupal, fue un reto inicialmente ya que estaba acompañada de una alumna del CUCBA y una estudiante alemana de química. Si bien compartíamos muchas metodologías, al final por barreras lingüísticas terminaba tomando el papel de líder durante el proceso. Fue una experiencia gratificante, pues todas lográbamos aportar algo y aprender la una de la otra.

Por otra parte, el análisis de datos que había desarrollado a lo largo de la carrera se fortaleció aún más, desde conocimientos de probabilidad y estadística hasta técnicas de química analítica, inmunología y cultivos de células y tejidos animales. Finalmente logré utilizar nuevos programas estadísticos y aprovecharlos en distintas áreas.

3.3 Inventario de competencias Inicial (ingreso del PAP) e Inventario de competencias Final (salida al PAP).

Competencia	Evidencia	Relevancia/Fortaleza*	Competencias nuevas y potencializadas
<p style="text-align: center;">Conocimientos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Conocimientos del funcionamiento de equipos de laboratorio. • Conocimientos superficiales de neurofisiología y Parkinson. • Conocimientos en tinción de muestras y manejo de reactivos. 	<p>He trabajado de manera exitosa dentro del laboratorio manejando equipos como, campana de flujo laminar, micropipetas, geles de poliacrilamida entre otros.</p> <p>Lleve exitosamente la materia de Neuropsicología además de tener un gran gusto por temas relacionados a enfermedades neurodegenerativas.</p> <p>En materias como microbiología e inmunología realicé distintos tipos de tinciones.</p>	<p>Me será mucho más fácil aprender nuevas técnicas que utilicen artefactos con los que estoy familiarizada.</p> <p>Podré aprender nuevos conceptos con mayor facilidad además de poder fortalecer los míos.</p>	<p>Aprendí a realizar técnicas inmunohistoquímicas, así como ensayos de TBARS.</p> <p>Aprendí a trabajar con modelos animales específicamente ratones.</p> <p>Obtuve nuevos conocimientos respecto al funcionamiento de procesos cerebrales, así como cuestiones morfológicas y fisiológicas del sistema nervioso central y periférico.</p> <p>Mejoré mis habilidades de trabajos multidisciplinarios, así como de liderazgo.</p>

Habilidades	<ul style="list-style-type: none"> • Aprendizaje veloz en nuevas técnicas de laboratorio • Buena motricidad fina • Atención a los detalles 	<p>Logré aprender a utilizar micropipetas, realizar geles de agarosa e introducir muestras en él, de manera exitosa a las pocas clases.</p> <p>Debido a mi gusto por artes manuales, logré desarrollar un buen manejo de objetos pequeños o delicados, así como su estética y funcionamientos.</p>	<p>Podré adaptarme con facilidad a nuevas técnicas que se me presenten</p> <p>Tener buena precisión es increíblemente útil al trabajar con muestras biológicas y reactivos.</p>	<p>Perfeccioné mis habilidades de motricidad fina, especialmente en el montaje de tejidos al momento de realizar las inmunohistoquímicas.</p> <p>Reforcé mis análisis de datos así como la organización necesaria para poder llevarlos a cabo.</p>
Actitudes	<ul style="list-style-type: none"> • Motivación por el aprendizaje y retroalimentación • Buena organización y responsabilidad • Pasión por temas relacionados a el área de Neurociencias 	<p>Escucho contantemente las críticas constructivas de mis profesores y las recuerdo y aplico.</p> <p>He mantenido distintas actividades durante algunos semestres fuera del ITESO</p>	<p>Podre adaptar nuevas técnicas tomando en cuenta la retroalimentación que se me proporcione</p> <p>Podre ser una buena adición al ambiente laboral</p> <p>Tendré mucha motivación para aprender respecto a el proyecto y su futura aplicación.</p>	

Poder reflexionar respecto a las competencias nuevas adquiridas, así como aquellas potencializadas, me ayudó a comprender lo mucho que logré aprender durante el semestre en general. Finalmente, viendo la conclusión de una carrera a la cual le dediqué 5 años de extremo esfuerzo, me permitió reflexionar respecto a todos los conocimientos que adquirí durante el proceso.