UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Química Farmacéutico Biológica

Área Bioquímica Clínica

MANUAL DE LABORATORIO DE GENÉTICA CLÍNICA

Fecha de aprobación: 06 de marzo de 2020
Fecha de vigencia: Bajo concesion

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**2/330**

MANUAL DE LABORATORIO DE GENÉTICA CLÍNICA

Autores primera versión

Parte I.

Martha Legorreta Herrera

Marisol Molina Sigala

Catalina Machuca Rodríguez

Raquel Retana Ugalde

Elia Roldán Reyes

Janette Rebeca Rodríguez López

Financiado por el Proyecto PAPIME PE204105

1ª. Edición mayo del 2007

ISBN 978-970-32-4542-0 Obra general

ISBN 978-970-32-3583-4 Parte I

Aprobado por el Comité Académico de Carrera de QFB 27 de abril de 2007

Parte II

Martha Legorreta Herrera

Isabel Soto Cruz

María Teresa Tusié Luna

Leticia Moreno Fierros

Fernando Hernández Clemente

Catalina Machuca Rodríguez

Raquel Retana Ugalde

Lourdes Vega Navarrete

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**3/330**

Sureyma Hernández Posadas

Miguel Ángel León Tapia

Rodrigo Oviedo Meza

Oswaldo Daniel Castelán Martínez

Francisco Javier Parada

Financiado por el Proyecto PAPIME PE204105

1ª. Edición mayo del 2009

ISBN: 978-607-02-0423-4 Parte II

Aprobado por el Comité Académico de Carrera de QFB 12 de mayo de 2009

Revisores:

Martha Legorreta Herrera

Raquel Retana Ugalde

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**4/330**

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE GENÉTICA CLÍNICA
PARTE I

ÍNDICE **Página**

Introducción al Manual del Laboratorio de Genética Clínica Parte I **6**

Objetivos del Manual parte I y parte II **7**

Práctica 1. Extracción y cuantificación de acidos nucleicos. **8**
Dra. Martha Legorreta Herrera.
M en C. Catalina Machuca Rodríguez

Práctica 2. Detección de daño al DNA por electroforesis unicelular alcalina (ensayo cometa). **37**
Dra. Martha Legorreta Herrera
Dra. Raquel Retana Ugalde
Dra. Elia Roldán Reyes

Práctica 3. Detección de mutaciones en los genes kras y p53 asociados con la susceptibilidad al desarrollo de cáncer. **54**
Dra. Martha Legorreta Herrera
QFB. Marisol Molina Sigala

Práctica 4. Protocolo para el diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas (malaria). **93**
Dra. Martha Legorreta Herrera
QFB. Jannete Rebeca Rodríguez López

Abreviaturas **133**

Glosario **135**

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**5/330**

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE GENÉTICA CLÍNICA
PARTE II

ÍNDICE **Página**

Introducción al Manual del Laboratorio de Genética Clínica Parte II **145**

Práctica 5. Detección de deleciones en el cromosoma "Y" Asociadas a la infertilidad masculina **147**
Dra. Martha Legorreta Herrera
QFB. Sureyma Hernández Posadas

Práctica 6. Protocolos: PCR, ELISA y Western blot para la identificación de organismos transgénicos (toxina cry1ac de maíz) **173**
Dra. Martha legorreta herrera
Dra Isabel Soto Cruz
Dra. Leticia Moreno Fierros
QFB. Rodrigo Oviedo Meza
QFB Osvaldo Daniel Castelán Martínez

Práctica 7. Detección del polimorfismo r230c del gen abca1, asociado con una mayor susceptibilidad al desarrollo de Diabetes mellitus tipo 2 y obesidad **210**
Dra. Martha Legorreta Herrera
Dra. María Teresa Tusié Luna
M en C Fernando Hernández Clemente
QFB Osvaldo Daniel Castelán Martínez

Práctica 8. Detección de errores innatos del metabolismo **239**
Dra. Martha Legorreta Herrera
QFB. Javier Parada García

Práctica 9. Cultivo de linfocitos y observación de cariotipo humano **258**
Dra. Raquel Retana Ugalde
Dra. Martha Legorreta Herrera

Página

Práctica 10. Identificación humana con fines de exclusión de paternidad **272**
Dra. Martha Legorreta Herrera
QFB. María Lourdes Vega Navarrete
M en C. Catalina Machuca Rodríguez
Biol. Miguel Ángel León Tapia

Abreviaturas **319**

Glosario **320**

Criterios de evaluación **328**

Reglamento del laboratorio **329**

Manejo de residuos **332**

Simulacro de emergencia y sismos **332**

Anexo I Consentimiento informado **333**

Anexo II Carta de conocimiento informado **336**

Anexo III Formato para evaluar las presentaciones orales **337**

Agradecemos a la Maestra María Esmeralda Bellido Castaños por la revisión a la versión original de este manuscrito

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**7/330**

Introducción del Manual de Laboratorio Parte I

En este trabajo se destaca la importancia de la Biología Molecular y su impacto en la Genética Clínica. El conocimiento de que el ADN es la molécula portadora de la información genética y la dilucidación de su estructura por Francis Crick y James Watson en 1953 inició una revolución científica. Su modelo explica la forma en la que se puede copiar la información genética a partir de una cadena molde de ADN. En la década de los sesentas Marshall Niremberg, Har Khorana y Severo Ochoa descifraron el código genético lo que permitió explicar que solo con cuatro letras se podían formar las combinaciones necesarias para codificar los 20 aminoácidos que constituyen a todas las proteínas.

En el ADN existen secuencias reguladoras que identifican donde se debe iniciar la transcripción, y secuencias de paro que indican en donde termina la proteína. El conocimiento de los mecanismos que regulan la expresión de los genes tendrá un fuerte impacto en el diagnóstico y tratamiento de todas las enfermedades que afectan al humano.

En este manual modificamos las prácticas del Laboratorio de Genética Clínica para que el alumno detecte el daño al ADN con la técnica de electroforesis unicelular alcalina. También se calibraron diferentes variantes de la técnica de PCR para la detección de secuencias asociadas con un incremento en la susceptibilidad de desarrollar enfermedades de origen genético como el cáncer. La tecnología que utilizamos permitirá identificar secuencias únicas en el genoma de microorganismos patógenos lo que es sumamente útil en el diagnóstico molecular de las enfermedades infecciosas, en particular paludismo o malaria. Para lograrlo, calibramos diferentes metodologías como lo son: la electroforesis unicelular alcalina; la extracción y la cuantificación de ácidos nucleicos con microtécnicas; la estandarización de diferentes variantes de la técnica de PCR para amplificar secuencias únicas en el ADN presentes en los géneros como en las especies de los plasmodios que afectan al humano, calibramos también la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida para resolver los productos de amplificación de estas variantes de PCR. También calibramos las técnicas de corte con enzimas de restricción, tinción con bromuro de etidio y la detección de los resultados con un transiluminador de luz UV acoplado a una cámara de video.

Este manuscrito es una herramienta para preparar a nuestros alumnos y actualizar a los profesores que imparten las asignaturas del ciclo Terminal de la Carrera de Química Farmacéutico Biológica en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Dra. Martha Legorreta Herrera.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**8/330**

Objetivos del manual de laboratorio partes I y II

Que los alumnos:

- Comprendan los fundamentos y apliquen los conocimientos sobre bioquímica y biología molecular como una herramienta para detectar daño al ADN, o mayor susceptibilidad genética a desarrollar enfermedades comunes en nuestra población como diabetes y cáncer.

- Comprendan y apliquen los fundamentos del diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas para la detección de genes específicos de parásitos.

- Comprendan los fundamentos y desarrollen la metodología para detectar microdeleciones en el cromosoma Y asociadas con infertilidad masculina o para identificar a un organismo modificado genéticamente.

- Comprendan, desarrollen y apliquen la metodología que permita la identificación humana con fines forenses o de exclusión de paternidad.

- Comprendan los fundamentos de las determinaciones de enfermedades debidas a alteraciones en el número de cromosomas y metabolopatías.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**9/330**

CONTENIDO

PRÁCTICA 1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

1. OBJETIVO:

- Que el alumno comprenda la importancia biológica de los ácidos nucleicos y aplique sus propiedades fisicoquímicas para su aislamiento a partir de diversos tejidos biológicos.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

A partir de 1953, cuando James D. Watson y Francis Crick reportaron el descubrimiento de la estructura molecular del ADN, (Watson, Crick, 1953), la Biología Molecular ha experimentado un desarrollo vertiginoso, convirtiéndose en una herramienta fundamental en Biomedicina. Actualmente, es posible el aislamiento, caracterización y manipulación de genes de diferentes organismos, incluido el hombre. El manejo de genes humanos ha permitido el estudio de la constitución genética del hombre, lo cual conduce a un mejor entendimiento de los factores que determinan las enfermedades de origen genético.

En el transcurso de su desarrollo, la Biología Molecular ha utilizado a los genes como *marcadores*, lo que ha facilitado el diagnóstico prenatal o la detección de portadores sanos de enfermedades genéticas, algunos de estos diagnósticos incluyen; la distrofia muscular de Duchene, la anemia de células falciformes, la hemofilia, la corea de Huntington, la fibrosis quística o la fenilcetonuria. También ha sido posible explorar la predisposición genética a varias enfermedades como: el Alzheimer y las maniaco-depresivas. La caracterización de nuevos oncogenes ha permitido comprender los cambios estables que se presentan en el genoma durante el cáncer, así mismo dichos oncogenes se han utilizado para la detección de esta enfermedad.

Por otro lado, en el campo de la epidemiología molecular la utilización de secuencias específicas de ADN de los agentes infecciosos ha tenido gran impacto en el diagnóstico molecular de las enfermedades infecciosas, por ejemplo el manejo de genes de bacterias ha contribuido a un crecimiento vertiginoso del estudio de enfermedades gastrointestinales, ya que gracias a la tecnología del ADN se han caracterizado diferentes cepas, lo cual permite conocer las diferencias o similitudes

que se presentan en los genomas de bacterias que causan fiebre tifoidea en distintos lugares geográficos.

El conocimiento del genoma permite utilizar genes específicos para la detección de organismos patógenos en distintos fluidos lo que ha generado el desarrollo de métodos más sensibles y confiables, por ejemplo la detección temprana del virus del SIDA o de parásitos letales para el hombre como *Plasmodium falciparum*. Recientemente la tipificación molecular del *Bacillus anthracis* ha proporcionado importantes discernimientos en bioterrorismo ya que ha permitido la identificación precisa de distintas cepas.

En genética forense el estudio de las regiones polimórficas en el DNA humano, ha conducido al desarrollo de la tecnología que permite la identificación humana, con fines de exclusión de la paternidad, además de poseer una enorme importancia en crimininalística.

Como podemos apreciar de manera general, los conceptos de la Biología Molecular y sus técnicas tienen grandes repercusiones en distintas disciplinas, por lo que su conocimiento se hace necesario en el entendimiento del desarrollo científico.

A continuación de explicaran algunos conceptos básicos relacionados con el DNA que serán revisados posteriormente, en la descripción de los métodos utilizados para estudiarlo.

3. ANTECEDENTES

3.1 Estructura Bioquímica del ADN y del ARN.

El ADN (ácido desoxirribonucleico) está compuesto por un esqueleto de grupos fosfato y desoxirribosa unidos a las bases nitrogenadas: Adenina, Timina, Citosina y Guanina. La combinación de una base nitrogenada, un azúcar, y un grupo fosfato se denomina nucleótido (Figura 1) (por ejemplo, dATP es la abreviación para desoxiadenosina trifosfato; dNTP es la abreviación usada para nombrar cualquier nucleótido). Los nucleótidos son los bloques básicos para la construcción del ADN (Saenger, 1984; Leontis y SantaLucia, 1998).

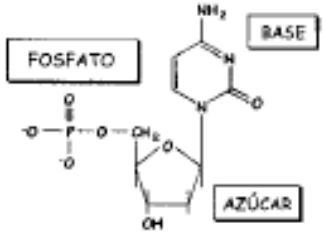


Figura 1. Estructura de un nucleótido del ADN.

Los nucleótidos se mantienen unidos para formar una cadena linear y el orden en que se unen unos a otros, se denomina **"***secuencia***"** y determina el tipo de aminoácidos y proteínas que se van a sintetizar. (Abu-Daya *et al.*, 1995; Bailly *et al*., 1999; Berman *et al*., 2000).

La cadena de uniones azúcar-fosfato constituye la "*columna vertebral"*, está construida de tal forma que posee una polaridad, esto es, que el fosfato en el carbono 5' de la desoxirribosa se une al 3' de la siguiente desoxirribosa. Por lo que se dice que tiene una dirección 5' → 3'. Las dos hebras del ADN presentan una disposición antiparalela, donde una de ellas va en sentido de 5' → 3' y la complementaria de 3' → 5' (Shui *et al.,* 2000; Fox y Waring, 1984) (Figura 2).

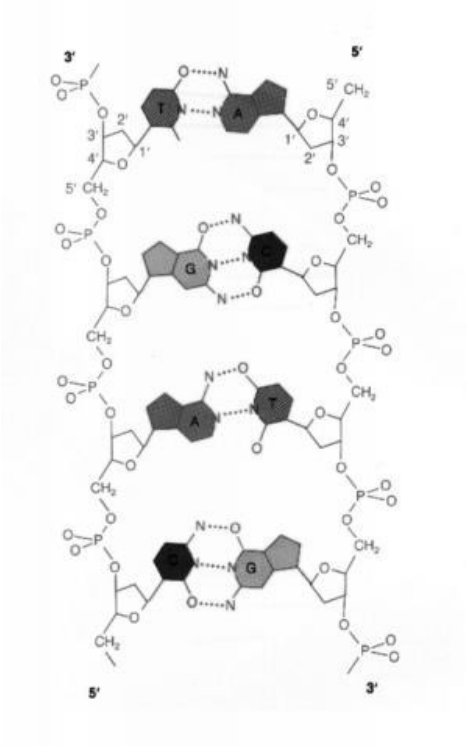


Figura 2. Orientación antiparalela de las cadenas de ADN. Una hebra tiene la dirección 3'→ 5' y la otra 5'→ 3'. Las bases adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G) están enlazadas por pares AT/TA; GC/CG. En la molécula de RNA la T se sustituye por el uracilo (U).

Dos hebras de ADN constituyen una doble hélice por apareamiento de las bases nitrogenadas (G-C y A-T) mediante puentes de hidrógeno (Gallego *et al*., 1994). Los pares guanina-citocina forman 3 puentes de hidrógeno mientras que los de adenina-timina forman solamente 2 (Figura 2) (Bruce Alberts *et al*., 2002).

La longitud del ADN de doble cadena se mide en pares de bases. Una kilobase (1 kb) es una unidad de 1000 pares de bases. Las dos hebras de ADN son complementarias una con la otra, es decir, que si se conoce la secuencia de una hebra, automáticamente podremos saber la secuencia de la segunda. Generalmente se documenta la secuencia de una sola hebra, la hebra codificante y es la misma que se encuentra en el ARN mensajero (ARNm) que se ha transcrito del gen y siempre se escribe con el extremo 5' hacia la izquierda.

El ARN (ácido ribonucleico) está compuesto de un grupo fosfato, una ribosa y las bases nitrogenadas: Adenina, Citocina, Guanina y Uracilo. El ARN que contiene la información que codifica para la proteína se conoce como ARN mensajero o ARNm y es de una sola hebra (Darnell *et al*.,1993).

3.2 Endonucleasas de restricción

Las endonucleasas de restricción (ER) son enzimas que cortan al DNA de doble hélice en una secuencia específica de pares de bases. Esas secuencias son palíndromas, es decir, se leen igual hacia delante en la hebra codificante que hacia atrás en la hebra no codificante. Por ejemplo, la enzima de restricción EcoRI, corta el DNA en la secuencia:

GAATTC (hebra codificante)

CTTAAG (hebra no codificante) (Figura 4)

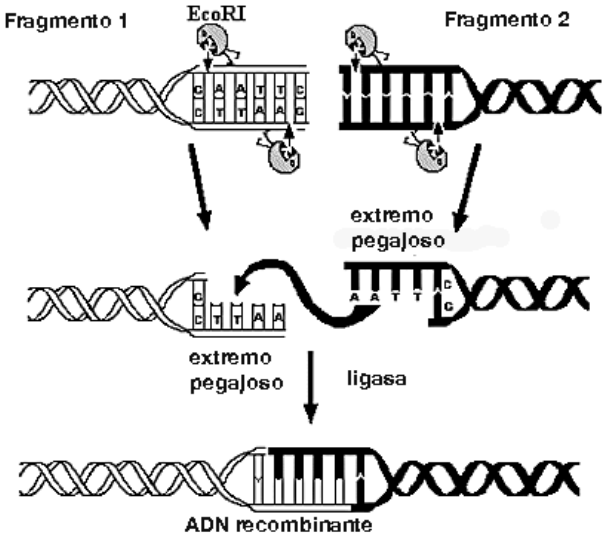


Figura 3. La enzima Eco R1 corta en la cadena del fragmento 1 y el mismo tipo de corte en el fragmento 2. Estos cortes los realiza cuando encuentra las secuencias blanco, dejando dos extremos complementarios (pegajosos) que luego se unen por la enzima DNA ligasa, por último se obtiene un DNA recombinante.

Depende de la enzima de restricción, los extremos que se generan después del corte son planos (o romos) o tienen una protuberancia en el extremo 5' o en el 3' (extremos cohesivos o pegajosos). La enzima *SmaI*, por ejemplo, genera puntas romas:

5' CCC↓GGG 3'

3' GGG↓CCC 5'

5' CCC 3'

3' GGG 5'

5' GGG 3'

3' CCC 5'

La enzima EcoRI, en cambio, genera una protuberancia 5':

5' **G**↓AATTC 3'

3' CTTAA↓**G** 5'

5' **G** 3'

5' AATTC 3'

3' CTTAA 5'

3' **G** 5'

Los fragmentos con extremos cohesivos pueden unirse unos a otros sólo si sus protrusiones son compatibles, es decir, si tienen secuencias complementarias. Los fragmentos de DNA con extremos romos pueden ligarse entre sí. El número de nucleótidos que define el sitio de corte de la enzima de restricción es variable. Las ER con secuencias de reconocimiento más cortas cortarán el DNA más frecuentemente que aquellas con secuencias de reconocimiento más largas. Asumiendo que un fragmento de DNA contiene igual cantidad de cada base (A, C, G, y T), la ER con una secuencia de reconocimiento de 4 pares de bases cortará el DNA, en promedio, cada 4^4 (256), comparado con 4^6 (4096) bases para una ER con un secuencia de reconocimiento de 6 bases.

Las ER son ***endo****nucleasas,* por lo que el sitio de restricción aparece en el extremo de un fragmento de DNA, la enzima de restricción no lo reconocerá, de esta forma la enzima EcoRI no cortará la secuencia:

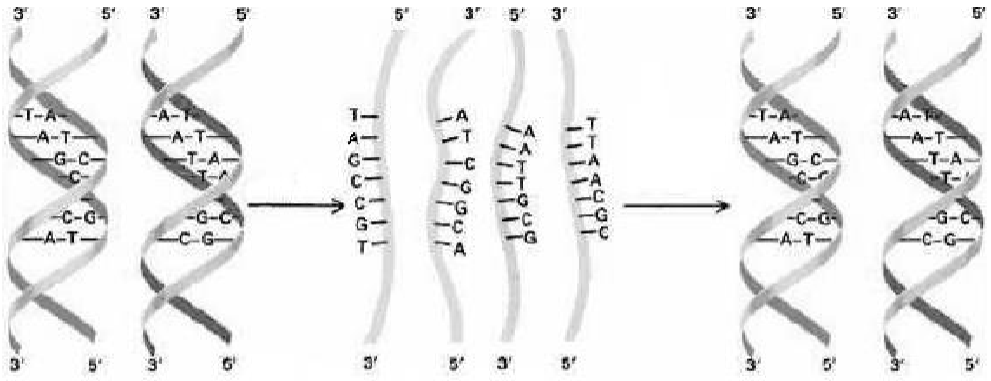
5' **GAATTC**GACTGCCATA 3'

3' CTTAAGCTGACGGTAT 5'

3.3 La desnaturalización y la hibridación.

La desnaturalización rompe los enlaces de hidrógeno que mantienen unidas las bases y, por lo tanto, el DNA de doble hebra. La desnaturalización se puede lograr calentando el DNA o tratándolo con álcali (NaOH) o con solventes polares, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), o formamida, los cuales rompen los enlaces de hidrógeno.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**16/330**



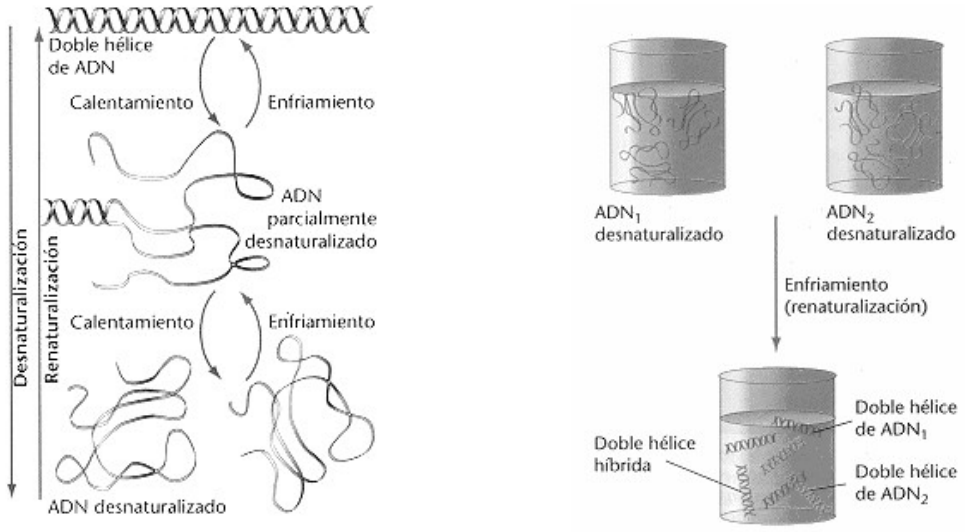


Figura 4. Rompimiento del ADN nativo por agentes químicos (NaOH) o físicos (calor), se observa la escisión de la de la doble cadena, y el estado de renaturalización.

La temperatura de fusión o Tm (melting temperature) se define como la temperatura en la cual el 50% del DNA está hibridado (es decir, se encuentra en la forma de doble cadena) mientras que el otro 50% está desnaturalizado. (Suh y Chaires, 1995; Wilson *et al*., 1997). Es posible estimar la Tm de porciones cortas de DNA utilizando la siguiente fórmula:

[4 x # pares G+C] + [2 x # pares A+T]

La Tm depende de la composición de bases y la longitud del DNA de doble cadena El calentamiento del DNA a una temperatura de 94°C o mayor desnaturalizará todo el DNA de doble cadena independientemente de su longitud y de su composición de bases. Por ejemplo, la Tm de la siguiente secuencia es:

ATTGCGGAT

TAACGCCTA

Tm = (4x4)+ (2x5)= 26°C.

La hibridación del ADN regenera los pares de bases para formar la doble cadena y la eficiencia de la hibridación depende de:

a) **La concentración del ADN**: Si, desnaturalizamos el ADN aislado a partir de una célula humana, le tomará un largo tiempo a una de las hebras de un gen para insulina, el encontrar su hebra complementaria entre todos los otros genes presentes. Por el contrario, la hebra podrá encontrar rápidamente su complemento en una solución que solamente contiene muchas copias del gen para insulina.

b) **El tiempo de hibridación:** Entre más compleja sea la mezcla de ADN, más tiempo le tomará a una hebra simple de ADN el encontrar a su hebra complementaria. Entre más largo sea el tiempo de hibridización mayor es la posibilidad de que las hebras se encuentren y se unan (Braña *et al*., 2002; Chaires *et al*., 1987).

c) **La composición de bases del ADN**: Las porciones de pares G-C tienden a unirse más rápidamente que las porciones de pares A-T para formar un ADN de doble cadena. Esto se debe probablemente a una mayor estabilidad

producida por la formación de 3 puentes de hidrógeno entre los pares de bases C-G. Los pares de bases A-T sólo forman 2 puentes de hidrógeno. El cloruro de tetrametilamonio o TMAC es un compuesto químico que causa que el ADN se una a una velocidad que depende únicamente de su longitud y no del número de pares G-C.

d) **Las condiciones de baja estringencia**. Cuando la estringencia es baja, las hebras simples de ADN se ligan unas a otras de forma imperfecta. Por el contrario, bajo condiciones de alta estringencia, sólo se unen las secuencias que son perfectamente compatibles. Por lo general, la estringencia se controla modificando la concentración de sales y la temperatura.

e) **Temperatura de la reacción:** Las temperaturas altas hacen que las hebras de DNA se muevan más rápidamente. Los híbridos de DNA que se unen con imperfecciones se disocian más rápidamente a altas temperaturas y por lo tanto, favorecen la generación de híbridos perfectamente compatibles. Obviamente, si la temperatura es muy alta, las dos hebras no se unirán.

f) **La concentración de sal de la mezcla de reacción:** Las concentraciones altas de sal permiten que se formen híbridos imperfectamente compatibles mientras que a bajas concentraciones de sal se formarán sólo híbridos perfectamente compatibles.

La concentración de sal baja y la temperatura alta crean condiciones de alta estrinqencia, este parámetro es importante para la unión y se controla durante la hibridación de un ADN de cadena sencilla o durante el lavado que sigue a la reacción de hibridación. La temperatura es el parámetro más fácil de controlar para obtener apareamientos perfectos. Si se usa un fragmento corto de ADN de cadena sencilla para la hibridación, el lavado final de alta estringencia se lleva a cabo de 3 a 5°C por debajo de la Tm no tanto para mantener las bandas perfectamente apareadas sino para eliminar los híbridos imperfectos.

3.4 Identificación de fragmentos de ADN

Las ***sondas*** son fragmentos sintéticos de ADN de hebra simple (oligonucleótidos) que tienen una longitud de 12 a 26 nucleótidos, se utilizan para detectar secuencias específicas de ADN gracias a que hibridan porque son complementarias. Debido a que se pueden agregar muchas copias de estas sondas y por lo tanto, crear altas concentraciones, la hibridación toma lugar rápidamente. (De Pascual-Teresa *et al*., 1996). Generalmente una hebra de ADN se une a un soporte sólido por ejemplo, una

membrana, para incrementar la velocidad, lo que ayuda a detectar la reacción de hibridación.

Detección de la hibridación. Si la sonda está marcada la hibridación puede detectarse con la marca. Las sondas se pueden marcar con fósforo radioactivo (P^{32}) o con la adición de un nucleótido modificado a la sonda. La marca se agrega a la sonda ya sea durante o después de su síntesis.

La unión se puede detectar empleando técnicas de autoradiografía (para detectar P^{32}) o utilizando técnicas de detección de color, quimioluminiscencia (luz emitida por una reacción química) y fluorescencia. Los detectores pueden ser placas de rayos X, espectrofotómetros, detectores de fluorescencia o de quimioluminiscencia.

3.5 Análisis de imágenes.

Uno de los sistemas de análisis de imágenes que se utiliza actualmente es el sistema TYPHOON 9410, es un escáner diseñado para realizar la detección y análisis de diferentes imágenes obtenidas de ensayos con marcaje fluorescente principalmente. De ésta forma se pueden visualizar geles y membranas procedentes de ensayos tales como: Southern/Northern fluorescente, Western blooting quimiofluorescente, geles de proteínas SDS page y 2-D, geles de cuantificación de ácidos nucleicos, microarreglos, diferential display, etc. Los reactivos de marcaje y detección deben ser los adecuados para poder realizar la visualización fluorescente en el equipo.

3.6 Electroforesis.

La electroforesis a través de un gel de agarosa o poliacrilamida es el método estándar para separar, identificar, y purificar fragmentos de ADN (Hamdan *et al*., 1998; Job, 1928). Esta molécula tiene carga negativa debido a su esqueleto de grupos fosfato y en un campo eléctrico se aleja del polo negativo (cátodo) y se dirige hacia el polo positivo (ánodo). Los fragmentos pequeños de ADN se mueven más rápidamente que los grandes. Si el ADN se tiñe con bromuro de etidio, se puede visualizar en un gel utilizando luz ultravioleta (Graves *et al*., 1981). Si el ADN se marcó con un isótopo radioactivo, la hibridación se puede detectar en una placa de rayos X (Kielkopf *et al*., 2000).

El gel es una matriz a través de la cual migran los fragmentos de ADN. Los geles de policrilamida se usan para separar fragmentos de ADN de diferentes tamaños y se utilizaban anteriormente para la secuenciación de ADN o para la purificación de

oligonucleótidos. Los geles de agarosa, por su parte, se usan para separar fragmentos de ADN de mayor tamaño de entre 200 y 50,000 pares de bases (50 kilobases). Por ejemplo, dos fragmentos de 50 pares de bases y 55 pares de bases se pueden distinguir por su diferente velocidad de migración si se corren en un gel de poliacrilamida pero migrarán juntos en uno de agarosa (Blackburn y Gait, 1996). Los geles de agarosa también se pueden utilizar para separar ARNs ribosomal y de transferencia (Figura 5). La composición porcentual de acrilamida o de agarosa determina que tan fácilmente migrarán en el gel los fragmentos de ADN de diferentes tamaños; por lo tanto, la composición porcentual del gel permite establecer el nivel de resolución de los fragmentos de ADN.

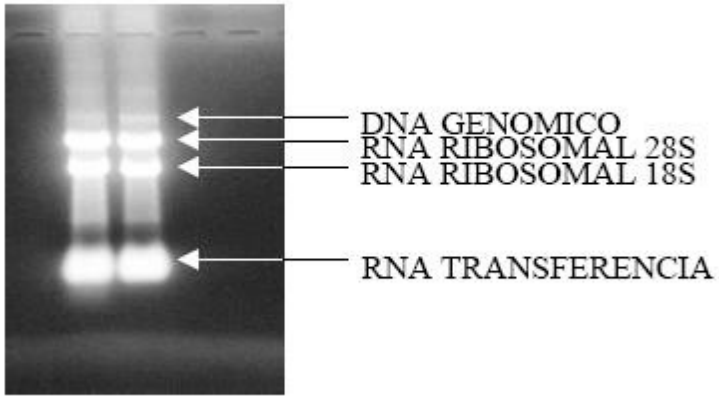


Figura 5. Corrimiento de RNA total en un gel desnaturalizante de agarosa

3.7 Síntesis de ADN.

La síntesis del ADN se lleva a cabo mediante una clase de enzimas llamadas ADN polimerasas, las cuales son capaces de sintetizar ADN de cadena sencilla, para que una ADN polimerasa pueda iniciar su proceso, requiere de:

a) Un molde o patrón de ADN de hebra simple. Las polimerasas sintetizan un producto cuya secuencia es complementaria a dicho molde. La ADN polimerasa termoestable (ADN *Taq* polimerasa), el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, las polimerasas T4 y T7 (incluyendo la secuenasa) requieren un molde de ADN. Cuando se usa un molde de RNA, la enzima transcriptasa reversa copia el ARNm para crear ADN complementario (ADNc).

b) Un iniciador o primer de ADN de cadena sencilla. Es un oligonucleótido sintético que se hibrida o se une al molde. Las polimerasas por lo general agregan nucleótidos en el 3' al final del iniciador y extienden la nueva banda sintetizada del extremo 5' al 3'.

c) Nucleótidos (dNTP's) para formar la nueva hebra de ADN.

Durante el proceso de síntesis, el fragmento de ADN que se está en ese proceso se puede marcar, si se agregan nucleótidos modificados marcados con isótopos radioactivos o bien con un iniciador que contenga biotina o digoxigenina (Fox , 1997; Gago, 1998; Gale *et al*., 1994).

El ADN de hebra simple, de una secuencia definida (oligonucleótido) se puede generar en el laboratorio utilizando un sintetizador automático de ADN y química de fosforoamidita. Esos fragmentos pueden emplearse como iniciadores para la síntesis de ADN o como sondas en las reacciones de hibridación. (Ausubel *et al*., 1995).

3.8 Enzimas importantes en los ácidos nucleicos.

La enzimas llamadas ADN ligasas (por ejemplo, T4 ADN ligasa) catalizan la formación de enlaces fosfatos en el ADN de doble cadena y se pueden utilizar para unir fragmentos de ADN. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que se han cortado con la enzima de restricción EcoRI se pueden pegar nuevamente al incubar los fragmentos con una ligasa.

Las cinasas como la T4 polinucleótido cinasa agregan fosfatos en los extremos 5' de los fragmentos de ADN, esto permite marcarlo con fósforo radioactivo (P^{32}) de modo que se puede detectar la hibridación.

La transferasa terminal agrega nucleótidos en los extremos 3' de las moléculas de ADN y hace una cola de una sola hebra. Esta enzima se puede utilizar para crear colas de homopolímeros (colas constituidas por un sólo nucleótido) que se utilizan para clonar o marcar el ADN.

3.9 Extracción del ADN de las células.

Se puede utilizar cualquier célula nucleada como fuente de ADN. Aunque los eritrocitos no tienen núcleo, otras células sanguíneas, como los leucocitos, son una buena fuente de ADN. Algunas líneas celulares, como los linfocitos B transformados, también son una buena fuente de ADN. Debido a que las células transformadas se pueden cultivar en el laboratorio, ellas proveen una fuente inagotable de ADN.

La extracción del ADN implica:

- Lisis de la membrana celular utilizando Tritón 100X u otro detergente.
- Centrifugación para obtener un botón y / lavado de los núcleos
- Lisis de los núcleos usando Tween 20, u otro detergente como el duodecil sulfato de sodio.
- Remoción de las proteínas unidas al ADN con proteinasa K o con pronasa.
- Destrucción de la proteinasa K con calor.
- Precipitación del ADN con alcohol isopropílico o etanol absoluto.

Se pueden utilizar diferentes protocolos para aislar el ADN de las células, uno de estos utiliza Tritón X-100, un detergente, para lisar las membranas y liberar a los núcleos. Si el procedimiento se inició con sangre total, esos núcleos se deben lavar repetidamente para eliminar cualquier resto de hemoglobina proveniente de los eritrocitos. La porción heme de la hemoglobina interfiere con la reacción de amplificación de genes usada para determinar los tipos de HLA.

Así mismo, los núcleos se lisan usando otro detergente, Tween-20 y el ADN se libera de las proteínas unidas a él mediante un tratamiento con proteinasa K, una enzima que destruye las moléculas proteicas. Después de haber destruido a las proteínas, la proteinasa K se puede inactivar por incubación del DNA a altas temperaturas (90°C), o también con la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. Este paso es importante porque la proteinasa K puede interferir en procesos ulteriores.

4. METODOLOGÍA

4.1 Extracción de ADN

Material y reactivos

- Tubos Falcon
- Tubos Eppendorf
- Caja de Petri
- Jeringa o sistema Vacuntainer con heparina

- Amortiguador de lisis (Tris 10mM pH 8.0; EDTA 20mM; SDS 0.5%)
- Pronasa (25mg/mL)
- Amortiguador de lisis con pronasa (980 µL de amortiguador de lisis y 20 µL de pronasa)
- Acetato de Sodio 375 mM p H 5.5
- Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamilico (50:48:2)
- Isopropanol
- Etanol absoluto
- Etanol al 80%
- TE (Tris 10mM, EDTA 1mM p H 8.0).

Equipo

- Centrífuga
- Termociclador
- Vortex
- Micropipetas

Servicios

- Agua, energía eléctrica, vacío.

Procedimiento

1. Extraer 3 mL de sangre venosa en tubos con heparina.
2. Adicionar 5 mL de agua doble destilada estéril y 50 µL de saponina al 10%.
3. Mezclar suavemente hasta la lisis completa de los eritrocitos.
4. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos.

5. Eliminar el sobrenadante y resuspender el botón en 400 µL en amortiguador de lisis con pronasa.
6. Incubar a 37ºC durante 30 min
7. Adicionar 40 µL de acetato de sodio 3M.
8. Incubar nuevamente a 37ºC por 3 min.
9. Adicionar 440 µL de la mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y agitar vigorosamente en vortex durante 5 min.
10. Centrifugar a 13,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
11. Separar la fase acuosa y adicionar el mismo volumen de isopropanol previamente enfriado a -20°C.
12. Centrifugar 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
13. Eliminar el sobrenadante.
14. Adicionar un volumen de 980 µL de alcohol etílico al 80% en agua bidestilada.
15. Centrifugar 13,000 rpm durante 15 minutos.
16. Eliminar el sobrenadante.
17. Cubrir el tubo con papel parafilm y hacer perforaciones con una aguja estéril.
18. Colocar los tubos en el termociclador a 60°C por 5 minutos o dejarlos secar durante 24 horas en un lugar limpio y seco a temperatura ambiente.

4.2 Hidratación y cuantificación del ADN.

Material y reactivos

- Tubos Eppendorf
- Agua bidestilada estéril
- Agua calidad millipore

Equipo

- Micropipetas
- Vortex
- Centrifuga
- Espectrofotómetro
- Refrigerador

Servicios

- Agua, energía eléctrica, vacío

Procedimiento

1. Hidratar la muestra con 20 µL de agua bidestilada estéril.
2. Agitar durante 5 minutos y mantener las muestras en refrigeración (4°C) de 1-2 horas agitando con vortex cada 30 minutos.
3. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 segundos.
4. Colocar en un tubo Eppendorf 1 µL de ADN puro y adicionar 199 µL de agua bidestilada (dilución 1:200).
5. Leer la absorbancia de las muestras a 260 nm.
6. Determinar la concentración de ADN con la siguiente fórmula

$$\text{ADN (µg/µL)} = \frac{\text{Absorbancia}_{260nm} \times 50\ \mu g \times \text{factor de dilución}}{1000\ \mu L}$$

4.3 Extracción de ADN en papel FTA.

Esta técnica es útil para la toma de muestras en condiciones de campo, dado que permite transportar la muestra sin necesidad de refrigeración, además que el ADN se conserva estable por varios años (siempre y cuando se almacene libre de humedad).

Material y reactivos

Material de limpieza

Guantes

Cubrebocas

Tubos Eppendorf de 1.5 mL

Tubos Falcon de 15 mL.

Puntas para micropipetas de 1 mL y de 200 µL

Bulbos o pipetas de transferencia estériles

Pipetas graduadas de 10 mL.

Lancetas o sistema Vacutainer

Papel higiénico.

Tarjetas FTA

Reactivo FTA

Agua doble destilada estéril libre de nucleasas

Acohol al 70%

Equipo

Thermomixer o vortex

Baño seco

Micropipetas

Microperforador Harris

Servicios

Agua, energía eléctrica, vacío

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**27/330**

Procedimiento

1. Limpiar perfectamente el área de trabajo, usar guantes y cubrebocas, cerrar lo que permita la circulación de aire (puertas, ventanas, etc).
2. Etiquetar el sobre con el papel FTA.
3. Etiquetar tubos Eppendorf de 1.5 mL con la clave correspondiente a la muestra a trabajar.
4. Limpiar el sitio donde va a realizar la punción con al alcohol al 70%, permitir que se evapore el líquido y con una lanceta realizar una punción en el dedo.
5. Colocar 5 gotas de sangre en el papel FTA y dejar que seque.
6. Hacer perforaciones en el papel FTA impregnado con la sangre.
7. Colocar 5-10 fragmentos de 1.0 mm de diámetro de papel FTA con la muestra de sangre en un tubo Eppendorf de 1.5 mL previamente etiquetado (hacerlo por duplicado).
8. Adicionar 400µL (8 gotas) del reactivo de FTA a cada tubo.
9. Incubar a temperatura ambiente y agitación (1000 rpm) durante 5 minutos en el thermomixer o en vortex a baja velocidad durante el mismo tiempo.
10. Decantar con sumo cuidado el reactivo de FTA, procurando limpiar el remanente del reactivo en la boca del tubo con un papel absorbente limpio.
11. Adicionar 400 µL (8 gotas) de agua destilada estéril libre de nucleasas a cada muestra.
12. Incubar a temperatura ambiente y agitación (1000 rpm) durante 5 minutos en el thermomixer o en vortex a baja velocidad por el mismo tiempo.
13. Decantar con sumo cuidado el agua, limpiar el remanente del reactivo en la boca del tubo con un papel absorbente limpio.
14. Colocar 400 µL (8 gotas) de agua destilada estéril libre de nucleasas a cada muestra.
15. Incubar a temperatura ambiente y agitación (1000 rpm) durante 5 minutos en el thermomixer o en vortex a baja velocidad por el mismo tiempo.

16. Retirar el agua con una micropipeta y punta de 1000 µL con sumo cuidado.
17. Colocar los tubos a 60ºC en un baño seco durante 30 minutos, observar que no queden residuos de agua o dejarlas todo el día y la noche hasta observar que los discos de papel están completamente secos.

La muestra está lista para amplificarse con el protocolo de PCR y la amplificación de FTA con la enzima *Taq* polimerasa.

4.4 Extracción de ARN.

Método modificado de Chomczynsky y Sacchin (1987). Este método se basa en adicionar un reactivo caotrópico (isotiocianato de guanidinio) combinado con la extracción de fenol:cloroformo y una precipitación en alcohol isopropílico.

Procedimiento

1. Extraer 3 mL de sangre venosa en tubos con heparina.
2. Adicionar 5 mL de agua doble destilada estéril y 80 µL de saponina al 10%
3. Mezclar suavemente hasta la lisis completa de los eritrocitos
4. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos.
5. Eliminar el sobrenadante y resuspender el botón en 400µL de solución de TriZol (invitrogen).
6. Pasar el contenido a un tubo Eppendorff de 1.5 mL
7. Adicionar 100 µL de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (40:1)
8. Agitar vigorosamente en vortex durante 10 min.
9. Centrifugar a 8,000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.
10. Separar la fase acuosa y colocarla en otro tubo.
11. Adicionar el mismo volumen de isopropanol previamente enfriado a -20°C.
12. Mezclar suavemente.

13. Centrifugar 13,000 rpm durante 15 minutos a -4°C.
14. Eliminar el sobrenadante.
15. Adicionar un volumen de 980 µL de alcohol etílico al 80% en agua DEPC.
16. Centrifugar 13,000 rpm durante 15 minutos.
17. Eliminar el sobrenadante.
18. Tapar los tubos con papel Parafilm y hacer perforaciones con una aguja estéril para permitir que se evapore el etanol.
19. Colocarlo en el termociclador a 60ºC por 5 minutos o a temperatura ambiente durante toda la noche.
20. Una vez seco retirar el papel parafilm, tapar perfectamente y almacenar a -20ºC.

4.5 Hidratación y cuantificación del ARN.

Material y reactivos

- Tubos Eppendorf
- Puntas para micropipeta de 100 µL
- Agua DEPC al 1% estéril
- Agua calidad millipore

Equipo

- Micropipetas
- Agitador de tubos Eppendorf
- Centrífuga
- Espectrofotómetro
- Refrigerador

Servicios

Agua, energía eléctrica.

Procedimiento

1. Hidratar la muestra con 10 µL de agua DEPC al 1% estéril.
2. Agitar durante 5 minutos y mantener las muestras en refrigeración (4°C) de 1-2 horas agitando con vortex cada 30 minutos.
3. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 segundos.
4. Colocar en un tubo Eppendorf 1 µL de ARN y adicionar 199 µL de agua calidad milipore (1:200).
5. Leer la absorbancia de las muestras a 260 nm.
6. Determinar la concentración de ARN con la siguiente fórmula

$$\text{ARN (µg/µl)} = \frac{\text{Absorbancia}_{260nm} \times 40\ \mu g \times \text{factor de dilución (200)}}{1000\ \mu L}$$

5. PREPARACION DE REACTIVOS

Tris 2M pH 8.0

Pesar 60.55 g y llevarlos a 250 mL con agua doble destilada estéril, ajustar el pH antes de aforar. Esterilizar por autoclave por 15 min a 120lb de presión.

EDTA 0.5M pH 8.0

Pesar 46.53 g de EDTA y llevar a 250 mL con agua doble destilada estéril, ajustar el pH antes de aforar.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**31/330**

MANUAL DE LABORATORIO DE GENÉTICA CLÍNICA

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**20/05/2016**	0	**31 /339**

SDS al 10%

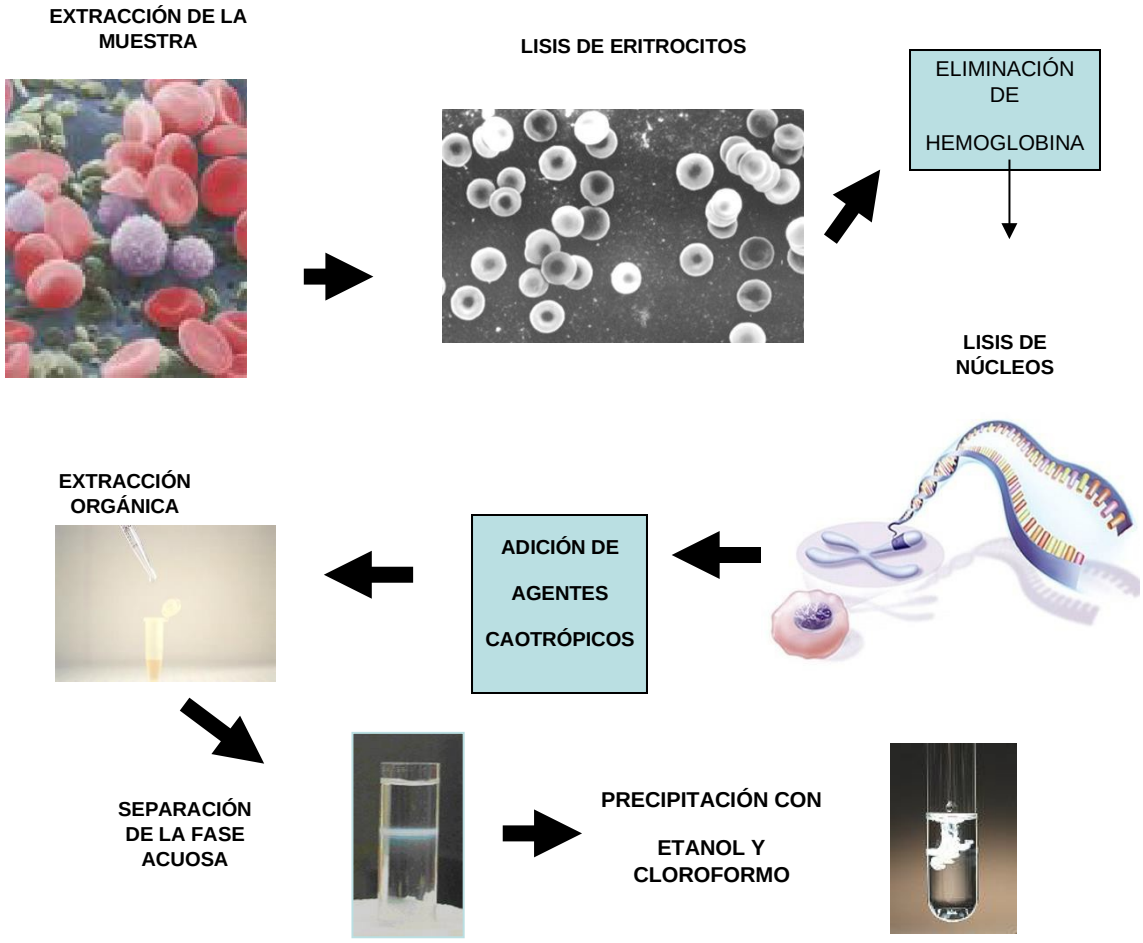
Pesar 25 g y ajustar a 250ml. con agua doble destilada, permitir que se hidrate antes de agitar.

Acetato de sodio 3.75M pH5.5

Pesar 127.6 g de acetato de sodio y llevar a 250 mL con agua doble destilada, ajustar el pH antes de aforar con ácido acético.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**32/330**

6. DIAGRAMA DE FLUJO.



7. RESULTADOS ESPERADOS

Para el método de extracción orgánica tanto para ADN como para ARN, se espera que el alumno obtenga un precipitado blanquecino y que al cuantificarlo por espectrofotometría de luz UV tenga su máxima absorción aproximadamente a los 260nm. Se espera que el resultado de dividir la absorbancia a 260nm entre la absorbancia a 280nm se encuentre entre los valores de 1.8 a 2.0.

Para el método de separación de ADN en el papel FTA se espera que el papel quede de color blanquecino y que sirva para su utilización como ADN molde en la amplificación por PCR.

8. CUESTIONARIO.

Instrucciones. Conteste las siguientes preguntas:

1.- ¿Cuál será el resultado de hidrolizar un nucleotido en condiciones ligeramente alcalinas y en condiciones ligeramente ácidas?

2.- Se podrían formar polinucleotidos a partir de trifosfatos de nucleosidos? (justifique su respuesta)

3.- ¿Cuantos enlaces de hidrógeno se forman entre una base guanina y una citosina?

4.- ¿Cómo es la polaridad entre las dos cadenas de polinucleotidos del ADN? (Explique)

5.- ¿El emparejamiento de bases es menos eficaz cuando participa la timina en lugar del uracilo, debido a que el grupo 5-metil interfiere con la formación de enlaces de hidrógeno? (justifique la aseveración o la falsedad de su respuesta)

6.- ¿Cuál es la función de las ADN-polimerasas?

7.- ¿Cuál es la función de las ADN-ligasas?

8.- ¿Todos los virus oncogénicos son DNA-virus? (justifique la aseveración o la falsedad de su respuesta)

9.- Explique 3 aplicaciones del ADN obtenido

10. Explique 3 aplicaciones del ARN obtenido

11.- ¿Cuál es la dirección que presenta la traducción del ARN mensajero?

12.- Investigar en un libro de biología molecular la secuencia de reconocimiento de 3 enzimas (Hind III, Pst1, Hxo1. Escriba la secuencia de ADN de doble cadena e indique el sitio de corte de cada una de las enzimas., marque los extremos 5' y 3' y obtenga los fragmentos generados en cada caso.

13.- Suponga que quiere identificar en un gel de agarosa un fragmento de 600 pares de bases. ¿Qué estrategia experimental utilizaría?

9. MANEJO DE RESIDUOS

1. El material punzocortante (jeringas o agujas) empleado para la extracción de sangre se desechará en el contenedor rojo ubicado en el área de confinamiento de residuos.
2. Los sobrantes y desechos de sangre líquida o sus componentes se inactivarán con una solución de hipoclorito de sodio al 7% de cloro libre. Esta solución se adicionará a la sangre líquida o sus componentes para alcanzar una concentración final de cloro libre del 0.7%, se incubará a temperatura ambiente por 30 minutos y se verterá al drenaje.
3. Los residuos con fenol:cloroformo y alcohol isoamílico se colocarán en un recipiente de vidrio color ambar y se confinarán en el área de residuos.

10 . REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Abu-Daya A, Brown PM, Fox KR. DNA sequence preferences of several AT-selective minor groove binding ligands. Nucleic Acids Res. 1995; 23:3385-3392

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, More D, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, York, N.Y. 1995.

Bailly C, Echepare S, Gago F, Waring MJ. Recognition elements that determine affinity and sequence-specific binding to DNA of 2QN, a biosynthetic bis-quinoline analogue of echinomycin. Anticancer Drug Des. 1999; 14:291-303.

Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The Protein Data Bank. Nucleic Acids Res. 2000; 28:235-242.

Blackburn GM, Gait MJ. Nucleic Acids in Chemistry and Biology. New York: Oxford University Press, 1996.

Braña MF, Cacho M, García MA, de Pascual-Teresa B, Ramos A, Acero N, Llinares F, Muñoz-Mingarro D, Abradelo C, Rey-Stolle MF, Yuste M. Synthesis, Antitumor Activity, Molecular Modeling and DNA-binding Properties of a New Series of Imidazonaphthalimides. J. Med. Chem. 2002; 45:5813-5816.

Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian, Lewis, Martin Raff. Keith Roberts, Peter Walter. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Co, New York, 4 Ed. 2002.

Chaires JB, Fox KR, Herrera JE, Britt M, Waring MJ. Site and sequence specifity of the daunomycin-DNA interaction. Biochemistry 1987; 26:8227-8236.

Chaires JB, Herrera JE, Waring MJ. Preferential binding of daunomycin to 5'(A/T)CG and 5'(A/T)GC sequences revealed by footprinting titration experiments. Biochemistry 1990; 29:6145-6153.

Chomczynsky. Y, Sacchin N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987 162:156-159.

Darnell J, Lodish H, Beck A, Zipursky L, Matsudaria P, Baltimore D. Biología celular y molecular. Barcelona: Omega, 1993.

De Pascual-Teresa B, Gallego J, Ortiz AR, Gago F. Molecular Dynamics Simulations of the Bis-Intercalated Complexes of Ditercalinium and Flexi-Di with the Hexanucleotide d(GCGCGC)2: Theoretical Analysis of the Interaction and Rationale for the Sequence Binding Specificity. J. Med. Chem. 1996; 39:4810-4824.

Fox KR, Waring MJ. DNA structural variations produced by actinomycin and distamycin as revealed by DNAase I footprinting. Nucleic Acids Res. 1984; 12:9271-9285.

Fox KR. Methods in Molecular Biology: Drug-DNA Interaction Protocols. New Jersey: Totowa, 1997.

Gago F. Stacking Interactions and Intercalative DNA Binding. Methods 1998; 14:277-292.

Gale DC, Goodlett DR, Light-Wahl KJ, Smith RD. Observation of Duplex DNA-Drug Noncovalent Complexes by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. J. Am. Chem. Soc. 1994; 116:6027-6028.

Gallego J, Luque FJ, Orozco M, Burgos C, Alvarez-Builla J, Rodrigo MM, Gago F. DNA sequence-specific reading by echinomycin: role of hydrogen bonding and stacking interactions. J. Med. Chem. 1994; 37:1602-1609.

Gallego J, Ortiz AR, de Pascual-Teresa B, Gago F. Structure-Affinity relationships for the binding of actinomycin D to DNA. J. Comput.-Aided Mol. Des. 1997; 11:114-128.

Graves DE, Watkins CL, Yielding LW. Ethidium bromide and its photoreactive analogues: spectroscopic analysis of deoxyribonucleic acid binding properties. Biochemistry 1981; 31:1887-92.

Hamdan II, Skellern GG, Waigh RD. Use of capillary electrophoresis in the study of ligand-DNA interactions. Nucleic Acids Res. 1998; 26:3053-3058.

Job P. Formation and stability of inorganic complexes in solution. Ann. Chim. 1928; 9:113-203.

Kielkopf CL, Erkkila KE, Hudson BP, Barton JK, Rees DC. Structure of photoactive rhodium complex intercalated into DNA. Nature Str. Biol. 2000; 7:117-121.

Lane MJ, Dabrowiak JC, Vournakis JN. Sequence specifity of actinomycin D and netropsin binding to pBR322 analysed by protection from DNAase I. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1983; 80:3260-3264.

Leontis NB, SantaLucia JJ. Molecular Modeling of Nucleic Acids. Washington DC: American Chemical Society, 1998.

Saenger W. Principles of Nucleic Acid Structure. New York: Springer-Verlag, 1984.

Scamrov AV, Beabealashvilli RS. Binding of actinomycin D to DNA revealed by DNAase I footprinting. FEBS Lett. 1983; 164:97-101.

Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N. Y. Acad. Sci 1949; 51:660.

Shui X, Peek ME, Lipscomb LA, Gao Q, Ogata C, Roques BP, Garbay-Jaureguiberry C, Williams LD. Effects of Cationic Charge on Three-Dimensional Structure of Intercalative Complexes: Structure of a bis-Intercalated DNA Complex Solved by MAD Phasing. Curr. Med. Chem. 2000; 7:59-71.

Suh D, Chaires JB. Criteria for the mode of binding of DNA binding agents. Bioorg. Med. Chem. 1995; 3:723-728.

Wilson WD, Tanious FA, Fernandez-Saiz M, Rigl CT. Evaluation of Drug-Nucleic Acid Interactions by Thermal Melting Curves. In: Fox KR, ed. Methods in Molecular Biology: Drug-DNA Interaction Protocols. Totowa, New Jersey, 1997; 219-240.

Watson JD, Crick FH. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. Nature 1953; 171:737-38

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**38/330**

PRACTICA 2. ELECTROFORESIS UNICELULAR (ENSAYO COMETA)

1. OBJETIVO

- Que el alumno desarrolle la metodología del ensayo de Electroforesis Unicelular en Gel (EUG) en condiciones alcalinas (pH > 13), sobre leucocitos humanos en G0, tratados *in vitro* con algún fármaco de efecto genotóxico conocido (por ejemplo Mitomicina C (MMC)).

2. INTRODUCCIÓN

Los agentes físicos como la radiación solar, los rayos X y una gran variedad de agentes químicos pueden dañar el ADN de las células vivas. Si ese daño no se repara, esas lesiones pueden iniciar una cascada de consecuencias biológicas en la célula, en los órganos de un individuo y finalmente en una población. Por ejemplo el daño al ADN en diversos animales acuáticos se ha asociado con una reducción en el crecimiento, un desarrollo anormal y sobrevivencia reducida de los embriones, larvas y adultos (Lee y Seinert, 2003).

Las lesiones que se producen por substancias químicas y por agentes físicos incluyen rompimiento en la cadena de ADN, modificación de las bases, uniones cruzadas ADN-ADN y uniones cruzadas ADN-proteína. Los compuestos genotóxicos ocasionan rompimientos en las cadenas del ADN, lo que induce el proceso de apoptosis o el de necrosis. Los daños en esta molécula también pueden generarse por la interacción con radicales libres del oxígeno o del nítrógeno.

Se han desarrollado diversos métodos para detectar el daño en las cadenas del ADN como lo son las técnicas de micronúcleos e intercambio de cromátides hermanas. Un método más reciente se conoce como electroforesis en gel de una sola célula o ensayo cometa que detecta los rompimientos en las cadenas del ADN y los sitios lábiles a los álcalis midiendo la migración del ADN de núcleos de ADN inmovilizados, tiene la ventaja de que mide el daño en una sola célula, se requieren pocas células para el ensayo, se puede realizar en prácticamente todas las células eucarioticas, además de ser muy sensible (Faust *et al*., 2004).

El ensayo consiste en que las células embebidas en agarosa sobre un portaobjetos se lisan con detergentes y alta concentración de sal para formar los nucleoides que contienen asas super enrolladas de ADN unidas a la matriz nuclear, si estos nucleoides se someten a electroforesis a un pH alcalino, el resultado es muy similar a los cometas y se visualiza por microscopía de fluorescencia, la longitud de la cola del cometa en relación a la cabeza refleja el número de rompimientos de la molécula de ADN.

En los últimos años la versión alcalina de la técnica cometa se ha convertido en una nueva herramienta en el área de Toxicología genética. Este ensayo permite detectar el daño genético *in vitro* e *in vivo* en una gran variedad de células. Aunque la mayoría de las publicaciones sobre el ensayo cometa se refieren al uso del sistema de prueba en estudios de efectos genotóxicos inducidos *in vitro* en células humanas, animales y vegetales, el número de estudios se ha incrementado debido a su aplicación en los efectos de las dietas, en el escrutinio del daño al ADN como resultado de algunas enfermedades, o bien del tratamiento con drogas y en análisis de grupos o individuos expuestos a substancias genotóxicas debido a su estilo de vida, la contaminación ambiental u ocupacional. También sirve para detectar contaminación ambiental con genotoxinas, es útil para el bio-escrutinio en humanos y en epidemiología molecular. La sensibilidad y especificidad del ensayo se incrementan enormemente si el nucleoide se incuba con endonucleasas de reparación que reconocen daños específicos en el ADN y convierten las lesiones en rompimientos, lo que incrementa la cantidad de ADN en la cola del cometa. La reparación del ADN se puede detectar si se incuban las células después de tratarlas con el agente dañino y se miden los cometas a intervalos de tiempos cortos (Collins, 2004).

La importancia de desarrollar esta técnica radica en que el daño al ADN se considera un evento inicial muy importante en el desarrollo de cáncer.

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

El Ensayo de Electroforesis Unicelular Alcalina en Gel (EUG) (pH > 13), desarrollado por Singh *et al*., en 1988 combina la simplicidad de las técnicas bioquímicas para detectar rompimientos de cadena sencilla en el ADN y los sitios lábiles al alcali, además de los enlaces cruzados en una sola célula, una aproximación típica de los ensayos citogenéticos. Las ventajas de la técnica de EUG incluyen: (1) la colección de datos a nivel de células individuales, seguida de análisis estadísticos más robustos; (2) el requerimiento de un bajo número de células por muestra (< 10,000); (3) la

sensibilidad para detectar daño al DNA; y (4) virtualmente cualquier población de células eucarióticas puede analizarse (Ostlling y Johanson, 1984; Kassie *et al.,* 2000).

Durante los últimos años la electroforesis unicelular en gel (EUG) o Ensayo Cometa se adoptó como una técnica útil para el escrutinio en humanos. Mientras los estudios de bio-escrutinio que emplean técnicas citogenéticas, se limitan a analizar a los linfocitos circulantes y a las poblaciones celulares en proliferación, la técnica de EUG incluye a las células que estén o no proliferando, además de células de los tejidos que fueron los primeros sitios de contacto con las substancias mutagénicas y/o carcinogénicas, por ejemplo las células de las mucosas oral y nasal.

En resumen, la EUG es una técnica rápida, simple y sensible para medir rompimientos en el ADN, con un pequeño número de células y detecta diferencias intercelulares en el ADN dañado (Ostling y Johanson, 1984).

Desarrollo del ensayo de Electroforesis Unicelular en Gel

Rydberg y Johanson en 1978, realizaron los primeros intentos por cuantificar los rompimientos en la cadena del ADN, utilizaron células embebidas en agarosa sobre portaobjetos, y las lisaron bajo condiciones medias de alcalinidad. La posterior tinción de los núcleos con naranja de acridina, mostró una alta proporción de fluorescencia de color rojo (que indica los rompimientos en la cadena sencilla del ADN), que cambia a verde (señalando los rompimientos de la cadena doble del ADN) en las células con el ADN dañado. Más tarde, Östling y Johanson en 1984 introdujeron una técnica microelectroforética conocida con el nombre de ensayo EUG o ensayo cometa. En esta técnica, las células embebidas en un gel de agarosa sobre una laminilla para microscopio, se lisan con detergentes y altas concentraciones de sales, para liberar el ADN después de la electroforesis, bajo condiciones neutras y de la tinción con naranja de acridina.

La corriente eléctrica arrastra al ADN presente en el gel desde el núcleo en dirección del ánodo y genera imágenes características parecidas a un ***cometa*** con su cabeza y su cola. Cuando el ADN pierde su superenrrollamiento a bajas concentraciones de genotóxicos o, cuando ocurre la fragmentación del ADN con niveles elevados de genotóxicos, se observa mayor fluorescencia en la cola en relación a la cabeza, en las células dañadas. Los fragmentos de ADN migran más libremente en el gel que en las asas y origina la formación de colas más largas (Singh, *et al.,* 1988).

Como en los experimentos anteriores la lisis se realizó a un pH neutro, fue posible detectar los rompimientos en las dos cadenas del ADN, ya que a este pH, el apareamiento de las bases en el ADN no se altera, sin embargo, no se pueden detectar los rompimientos discontinuos de una sola cadena (McKelvey-Martin *et al.,* 1993).

Sing y colaboradores en 1988 modificaron importantemente este ensayo, introdujeron la técnica de electroforesis bajo condiciones alcalinas (pH>13), con lo que la técnica es capaz de detectar no sólo rompimientos francos, sino también sitios sensibles al álcali, enlaces entrecruzados con el ADN y, los sitios de reparación por escisión incompletos. Esta es la metodología que se utiliza con mayor frecuencia, sólo con ligeras modificaciones en los diferentes pasos. Muy recientemente, el ensayo se modificó nuevamente para la detección de los tipos específicos de ADN dañado, con el uso de las enzimas: endonucleasa III (Endo III) y formamidopiridina glicosilasa lo que permite identificar pirimidinas oxidadas y lesiones 8- hidroxiguanina, respectivamente (Collins *et al.,* 1993; Collins *et al*., 1996).

Viabilidad celular

Se utiliza la técnica con colorantes fluorocromados descrita por Tice y colaboradores en 1996. Al final del tiempo de tratamiento, se resuspenden 10 µl del botón celular en 10 µL de la solución de flurocromos. Preparada con bromuro de etidio (0.025 µg/ml) y di-acetato de 5,6-carboxifluoresceína (0.125 µg/mL) en una proporcion 1:1. Después de 5 min de incubación, se realizan tres lavados con 1 ml de medio de cultivo. Las muestras se analizan en un microscopio de fluorescencia Nikon Optiphot –2, se utiliza un filtro de excitación de luz de 450-490 nm. Se evalúan 200 células por tratamiento, distinguiendo las vivas de color verde (porque metabolizan el 5,6- diacetato de carboxifluoresceína a un derivado que tiñe el citoplasma verde), de las no vivas (no viables), en las que el bromuro de etidio tiñe el núcleo de color rojo cuando la membrana celular se encuentra dañada.

4. FUNDAMENTO DE LA PRÁCTICA

El ensayo de Electroforesis Unicelular Alcalina en Gel (EUG) (pH > 13), o ensayo cometa, combina la simplicidad de técnicas bioquímicas para detectar rompimientos de cadena sencilla del ADN, en sitios lábiles al álcali, así como enlaces cruzados con el ADN, en células individuales en división y/o en G0, que al teñirse con colorantes fluorocromados se visualizan como cometas, cuando el ADN de las células está dañado.

5. METODOLOGÍA

5.1 Preparación de la muestra

Material y reactivos

- Sistema vacuntainer tubos con heparina como anticoagulante
- Portaobjetos esmerilados (completamente esmerilados).
- Cubreobjetos
- Tubos Eppendorf de 1.5ml
- Cajas Coplin
- Agarosa Regular 0.75% Sigma
- Agarosa de bajo punto de fusión 0.5% Sigma
- Amortiguador salino de fosfatos (PBS). Sigma
- NaCl 2.5M Sigma
- EDTA 100mM Sigma
- Tris 100mM Sigma
- NaOH 300mM Sigma
- N-lauril sarcosianato de sodio. Sigma

- HCl Sigma
- Triton X-100 Sigma
- Dimetil sulfóxido (DMSO). Sigma

Equipo

- Parrilla de calentamiento Corning
- Horno de microondas
- Baño de calentamiento
- Potenciómetro Corning
- Micropipetas Gilson

Servicios

- Agua, energia eléctrica

Procedimiento

1. Se preparan 3 portaobjetos completamente esmerilados a los cuales se les coloca una capa de 120 µL de agarosa regular hasta que solidifique.

2. Cada muestra de sangre de 10 µL se mezcla con 75 µL de agarosa de bajo punto de fusión en un tubo Eppendorf de 1.5ml y se coloca sobre cada portaobjetos preparado con la capa de agarosa regular, con ayuda de un cubre objetos.

3. Una vez solidificada la mezcla se agrega otra capa de 75 µL de agarosa de bajo punto de fusión.

4. Cuando la agarosa de las laminillas se solidifica se quita el cubreobjetos y se colocan en una caja Coplin que contenga una solución fresca de lisis fría, que previamente se preparó y se dejo en el congelador por 30 minutos, una vez que las laminillas están sumergidas se dejan reposar por lo menos una hora a 4°C y máximo una semana antes de realizar el corrimiento electroforético.

5.2 Electroforesis

Material y reactivos

- Probetas de 1000 mL
- Vasos Erlenmeyer de 250 y 500 mL
- Cajas Coplin
- NaOH 300 mM Sigma
- EDTA 1 mM Sigma
- Tris 0.4M Sigma
- HCl Sigma
- Metanol Merck

Equipo

- Cámara de electroforesis Hoeffer
- Fuente de poder Bio-Rad
- Potenciómetro Cornig
- Pinzas

Servicios

Energía eléctrica, agua

Procedimiento

1. Las laminillas se colocaran en una cámara de electroforesis, la cual contiene un amortiguador a pH 13 se cubren totalmente permitiendo que el ADN se desenrolle por

20 minutos. (Este paso se realiza protegido de la luz).

2. Ajustar la fuente de poder a 25 volts y 300 miliampers para efectuar la electroforesis por 20 minutos (se realiza protegidos de la luz).

3. Una vez apagada la fuente de poder se retiran cuidadosamente la laminillas de la cámara de electroforesis y se lavaran tres veces con amortiguador de neutralización durante 5 minutos.

4. Se escurren las laminillas del exceso de amortiguador y se sumergen durante 5 minutos en una caja Coplin con metanol absoluto y se dejan secar al aire.

5.3 Tinción y lectura

Material y reactivos

- Cubreobjetos
- Cajas Coplin
- Bromuro de etidio 1X Sigma
- Metanol Merck

Equipo

- Microscopio de fluorescencia con ocular graduado Nikon
- Micropipetas Gilson

Servicios

Enérgía eléctrica, agua

Procedimiento

1. Las laminillas se tiñen con 50 µL de bromuro de etidio 1X se colocará cuidadosamente un cubreobjeto.

2. Las laminillas se observan al microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación de 515-560nm a un aumento de 40X. Finalmente con un ocular graduado y calibrado, se mide el diámetro del núcleo y la longitud de la estela del cometa de 100 células.

3. Si se desea conservar las laminillas se pueden volver a desecar colocándolas en metanol por 5min para posteriormente dejar secar al aire.

5.4 Control positivo

Material y reactivos

- Tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Cubreobjetos
- Cajas Coplin
- Puntas para micropipeta
- Peróxido de Hidrógeno 0.5 mM
- Medio RPMI 1640 Gybco
- Agua fría

Equipo

- Microcentrífuga eppendorf
- Micropipetas Gylson

Procedimiento

1. Para conocer si la técnica se llevó a cabo correctamente en cada corrida electroforética se incluye una laminilla como control positivo. El control positivo se realiza al exponer una muestra de sangre a peróxido de hidrógeno 0.5 mM por 30

minutos, sumergida en agua fría.

2. Posteriormente se centrifuga a 3000 rpm por 3 min para retirar el sobrenadante, inmediatamente se prepara la laminilla con agarosa de bajo punto de fusión para continuar con la técnica del ensayo cometa.

6. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

Preparación de agarosa regular

Se pesa 1g de agarosa regular y se disuelve en 100 mL de amortiguador salino de fosfatos, calentando por 20 segundos en el horno de microondas, homogeneizar y calentar por 10 segundos más hasta disolver completamente.

Preparación de agarosa de bajo punto de fusión

Se pesan 500 mg de agarosa de bajo punto de fusión y se disuelven en 100ml de amortiguador salino de fosfatos, calentando por 20 segundos en el horno de microondas, homogeneizar y calentar por 10 segundos más hasta disolver completamente.

Preparación del stock de la solución de lisis.

NaCl 2.5 M	146.3 g/l
EDTA 100 mM	37.2 g/l
Tris 0.10 mM	1.2 g/l
Lauril Sarcosianato de sodio 1%	10 g
NaOH 300 mM	12 g
Agua Bidestilada cbp	1000 mL

Se agitan con barra magnética para homogenizar la mezcla de NaCl, EDTA y Tris, posteriormente se adiciona el hidróxido de sodio poco a poco para ajustar el pH a

10. De ser necesario ajustar con HCl concentrado. Finalmente se adiciona el lauril sarcosinato de sodio y se lleva a 1000 mL.

Como siguiente paso la solución de lisis se debe filtrar utilizando un filtro millipore de 0.05 µm.

Para preparar la solución de lisis fresca es necesario preparar en una caja de Coplin de 50 mL loS siguientes reactivos:

35.6 mL	De solución stock de lisis
0.4 mL	Triton X-100
4 mL	DMSO

Amortiguador de electroforesis pH 13

NaOH 10N	30 mL
EDTA 200mM	5 mL
Agua Bidestilada cbp	1000 mL

Amortiguador neutralizante pH= 7.5

Tris 0.4 M	48.5 g
Agua Bidestilada cbp	1000 mL

Ajustar el pH con ácido clorhídrico concentrado.

Solución de tinción stock 10X de bromuro de etidio.

Se pesan 10 mg de bromuro de etidio y se llevan a 50 mL con agua bidestilada. Guardar a temperatura ambiente protegido de la luz en frasco ámbar.

La solución de trabajo se prepara con 1ml de la solución stock 10X y se adicionan 9 mL de agua.

Solución stock de peróxido de hidrógeno

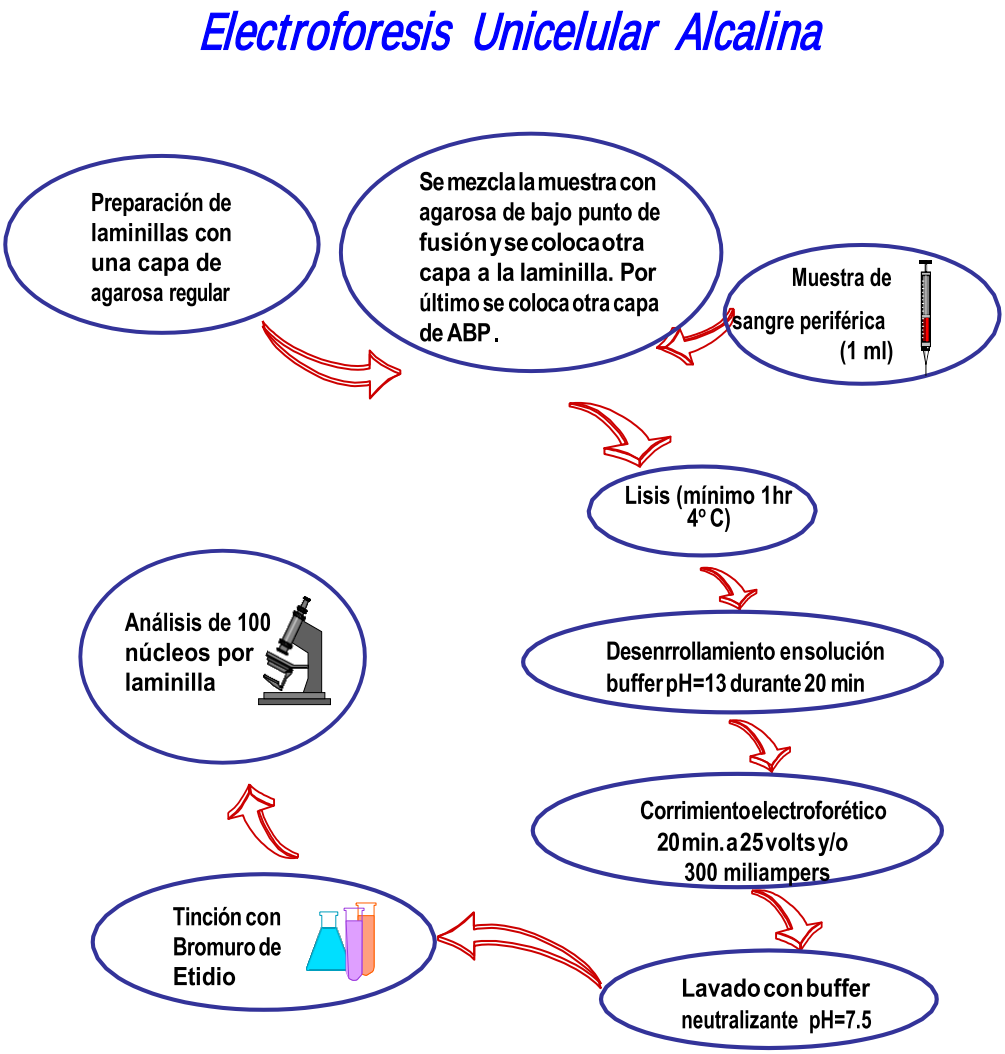
Se toma 1 mL de peróxido de hidrógeno al 30% y se adicionan 9 mL de medio de cultivo RPMI.

Para la solución de trabajo se agregan 50 µL de solución stock con 20 µL de la muestra de sangre y 930 µL de medio de cultivo RPMI.

Centrifugar a 3000 rpm por 3 minutos.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**50/330**

7. DIAGRAMA DE FLUJO



8. RESULTADOS ESPERADOS

Los resultados se analizarán de la siguiente forma: a) tomando en cuenta las estelas de los cometas y el núcleo b) otro criterio de evaluación es el grado de daño al ADN, se utilizan los criterios de Anderson 1994 y el punto de corte establecido fue de 5≤40% y > 40%. c) para evaluar la magnitud de daño al ADN se establecen dos categorías de 1-5 células y de 6 y más células con daño.

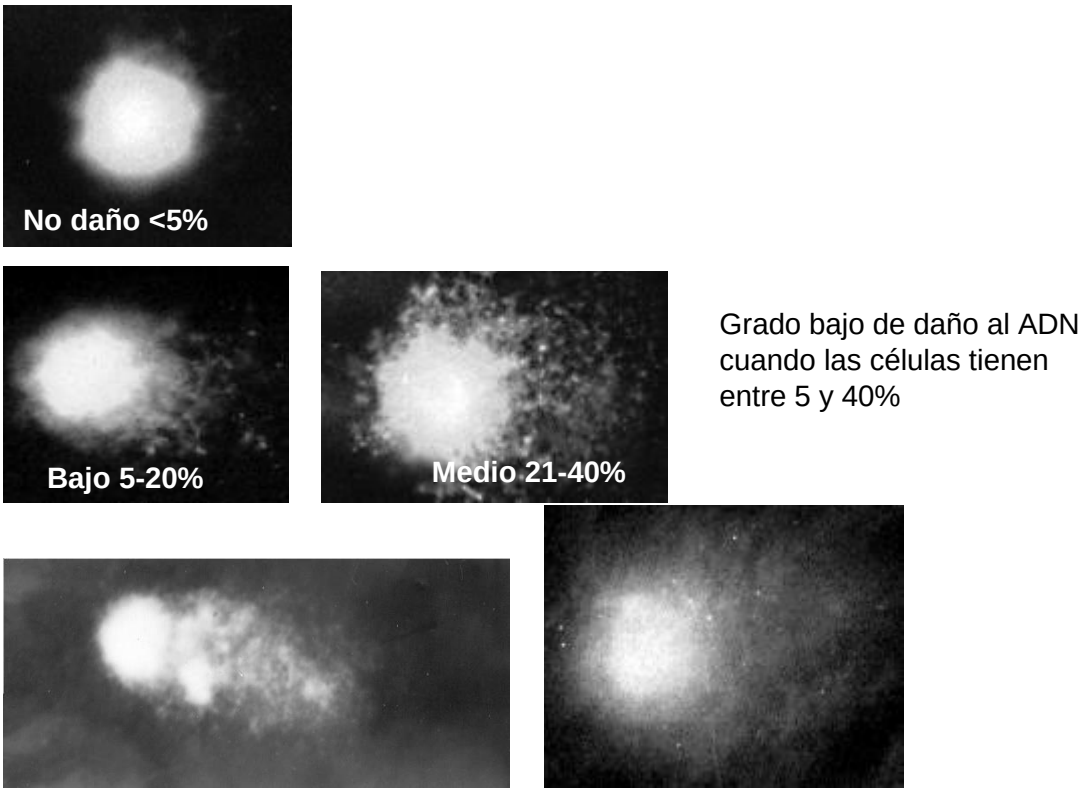


Figura 6. Electroforesis unicelular alcalina. Observación al microscopio de fluorescencia de células: sin daño (< 5%), con daño bajo (5 al 20%), con daño medio (40%) y con daño alto (40%).

9. DISEÑO ESTADÍSTICO

Los datos se analizarán a través de medidas descriptivas y las pruebas estadísticas χ^2, y t de Student, asumiendo una significancia estadística de $p<0.05$. (Infante y Zárate, 1997).

10. MANEJO DE RESIDUOS

1. El material punzocortante (jeringas o agujas) empleado para la extracción de sangre se desechará en el contenedor rojo ubicado en el área de confinamiento de residuos.
2. Los sobrantes y desechos de sangre líquida o sus componentes se inactivarán con una solución de hipoclorito de sodio al 7% de cloro libre. Esta solución se adicionará a la sangre líquida o sus componentes para alcanzar una concentración final de cloro libre del 0.7%, se incubará a temperatura ambiente por 30 minutos y se verterá al drenaje.

11. CUESTIONARIO

Instrucciones: Conteste las siguientes preguntas en una hoja anexa.

1. Explique qué tipo de material biológico se puede utilizar para desarrollar el Ensayo de Electroforesis Unicelular en Gel (EUG) o Ensayo Cometa.

2. Explique 3 ventajas y 3 desventajas del ensayo cometa.

3. Describir otros 2 ensayos que se podrían utilizar para detectar daño al ADN.

4. ¿Qué función cumplen los siguientes reactivos?:

   a) peróxido de hidrógeno

   b) bromuro de etidio

   c) solución de lisis

   d) amortiguador de corrimiento.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. Mol Biotechnol. 2004 26:249-261.

Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, Stetina R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker?, Environ. Health Perspect. 1996 104:465-469.

Collins R, Duthie SJ, Dobson VL. Direct enzymatic detection of endogenous base damage in human lymphocyte DNA. Carcinogenesis 1993 14: 1733-1735.

Devore JL. Probabilidad y estadística para Ingeniería y ciencias. 5° Ed. Thomson Learning, Ing. México, 2001 pág. 649-658.

Faust F, Kassie F, Knasmüller, Boedecker RH, Mann M, Mersh-Sundermann V. The use of alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. Mut Res. 2004 566:209-229.

Infante GS Zárate LG. Métodos estadísticos: un enfoque interdisciplinario . Ed. Trillas, México. 1997 pág. 537-548.

Kassie F, Parzefall W, Knasmuüller S. Single cell gel electrophoresis assay : a new technique for human biomonitoring studies. Mut Res. 2000 463:13-31.

Lee RF, Seinert S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mut Res. 2003 544:43-64

Maruez De SMJ. Probabilidad y estadística para Ciencias Químico-Biológicas. Mc. Graw-Hill, SA de CV, México. 1991 657 pp.

McKelvey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. Mutat Res. 1993 288:47-63.

Östling O, KJ Johanson. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun. 1984 123:291-298.

Östling O, KJ, Johanson. Bleomycin in contrast to gamma radiation induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell. Int J Radiant. Boil. 1987 52:683-691.

Rydberg B, Johanson KJ. Estimation of single strand breaks in single mammalian cells, in: PC Hanawalt, EC Friedber, CF Fox (Eds), DNA Repair Mechanisms, Academic Press, New York, NY, 1978 pp 465-468.

Singh NP, Mccoy MT, Tice RR, Schnider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell. Res. 1988 175:184-191.

PRÁCTICA 3. DETECCION DE MUTACIONES EN LOS GENESKRAS Y p53 ASOCIADOS CON LA SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE CÁNCER

1. OBJETIVO.

- Que el alumno comprenda y desarrolle experimentalmente la metodología para detectar mutaciones en diferentes genes asociados con el incremento en la susceptibilidad al desarrollo de cáncer.

2. INTRODUCCIÓN

La ocurrencia de tumores malignos constituye uno de los principales problemas de salud en el mundo. En México, han ocupado uno de los cinco primeros lugares como causa de muerte durante los últimos años. La primera conexión entre el cáncer y la genética se propuso a principios del siglo XX, y esta idea ha servido como una de las bases de la investigación sobre el cáncer.

El cáncer, neoplasia o tumor, puede considerarse una enfermedad genética que se desarrolla en organismos superiores, en la mayoría de los tejidos y en todo tipo de células somáticas. Bajo el nombre genérico de cáncer se engloba un conjunto de enfermedades que tienen en común un crecimiento celular desordenado (tumor) y una colonización tisular (metástasis), todo ello determinado por una mutación inicial seguida de la acumulación de otras mutaciones sucesivas.

El cáncer probablemente es la enfermedad más intensamente estudiada desde varios puntos de vista, en los últimos años ha pasado de un conocimiento casi nulo a un gran avance en diversos aspectos moleculares, desde aquellos que explican la proliferación excesiva y la muerte de células por apoptosis, hasta los mecanismos por los que el cáncer genera las metástasis.

Con el presente trabajo se pretende iniciar el estudio sobre la detección de mutaciones en los genes asociados con la predisposición a desarrollar cáncer cérvico-uterino, utilizando técnicas de Biología Molecular Básica, que puedan realizarse en el laboratorio de Genética Clínica.

3.1 Ciclo celular.

Las células que conforman el tejido normal responden a estímulos y señales tanto externas como internas que les indican si deben proliferar o detener su división. Cuando este control se pierde, se establece el cáncer debido a la expresión errónea de genes que codifican proteínas reguladoras de este proceso, ya sea por alteraciones genéticas o epigenéticas. En la actualidad, se han asociado al menos 90 genes con transformaciones malignas de las células y se clasifican como ***oncogenes, protooncogenes y genes supresores de tumores***, los cuales tienen como denominador común la participación directa en la regulación del ciclo celular y, por lo tanto, se encuentran involucrados en la proliferación celular (Luque y Herráez, 2001).

El ciclo celular es un proceso fundamental en todos los organismos, eucariontes y procariontes. Es la rutina metabólica que realiza una célula para multiplicarse por medio de una red de eventos bioquímicos y moleculares. La importancia del ciclo celular se manifiesta a través de la evolución, ya que los procesos bioquímicos involucrados en este fenómeno persisten desde las levaduras hasta el ser humano.

El ciclo celular lo forman las fases G_1, S, G_2 y M y está acoplado al ciclo de control del crecimiento en el que existen señales de diferenciación celular y factores de crecimiento. Una célula que se encuentra diferenciada en la fase G_0 pasa a la fase G_1, mediante un estímulo dado por un factor de crecimiento (Klug y Cummings, 1999; Panduro, 2000). En la fase G_1 se ubica un sitio de control llamado punto de restricción en el que actúan los genes supresores de tumores; cuando este nivel se alcanza la célula pasa a la fase S, donde se sintetiza el DNA, que a su vez se analizará y si es necesario se reparará en la fase de G_2 antes de entrar a la mitosis. Terminada la mitosis, el estímulo proliferativo puede seguir originando varias divisiones celulares. Al cesar el estímulo de un factor de crecimiento o recibir una señal de diferenciación, la célula pasa del punto de restricción de la fase G_1 a la fase G_0 (Cox y Sinclair, 1998) (Figura 7).

El camino que sigue un estímulo está dado por un factor de crecimiento, desde el espacio extracelular hasta el núcleo de la célula, involucra una serie de proteínas con diferentes ubicaciones celulares y funciones. Un factor de crecimiento es una señal extracelular (ligando) que se une a su receptor específico anclado en la membrana citoplásmica, el cual lleva la señal hacia el interior de la célula de tres formas (Luque y Herráez,1998; Panduro, 2000) (Figura 8).

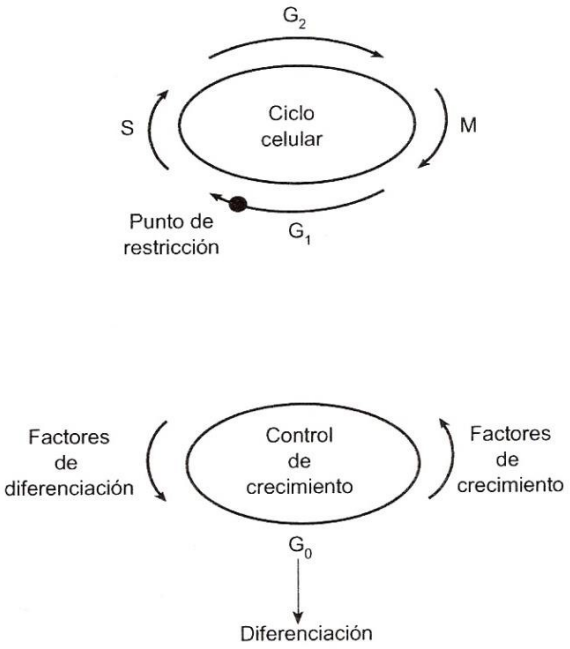


Figura. 7. Ciclo celular y control del crecimiento. Cuando la célula es estimulada en la fase G_0 por factores de crecimiento pasa a la fase G_1, S, G_2 y M para tener una división completa. Una vez que el estímulo del factor de crecimiento desaparece o por medio de factores de diferenciación, la célula regresa a la fase G_0.

1. El receptor se une a su ligando y la parte citoplásmica del receptor tiene actividad enzimática de cinasa de tirosina o de cinasa de serina-treonina.
2. El receptor se une a su ligando y la parte intracitoplásmica del receptor se acopla a proteínas con actividad de cinasa de tirosina.
3. El receptor se une a su ligando y la parte citoplásmica activa proteínas con actividad de GTPasa (proteína G).

Una vez que el receptor fosforila la primera proteína citoplásmica, ésta a su vez fosforila a otra, iniciándose una serie de fosforilaciones a través de proteínas

citoplásmicas cuyo blanco final es un factor transcripcional. Dichos factores transcripcionales son proteínas que pueden transportarse del citoplasma hacia el núcleo y unirse en regiones reguladoras de genes para activar la transcripción de las ciclinas que van a participar en el ciclo celular (Cox y Sinclair, 1998; Strachan, 2004).

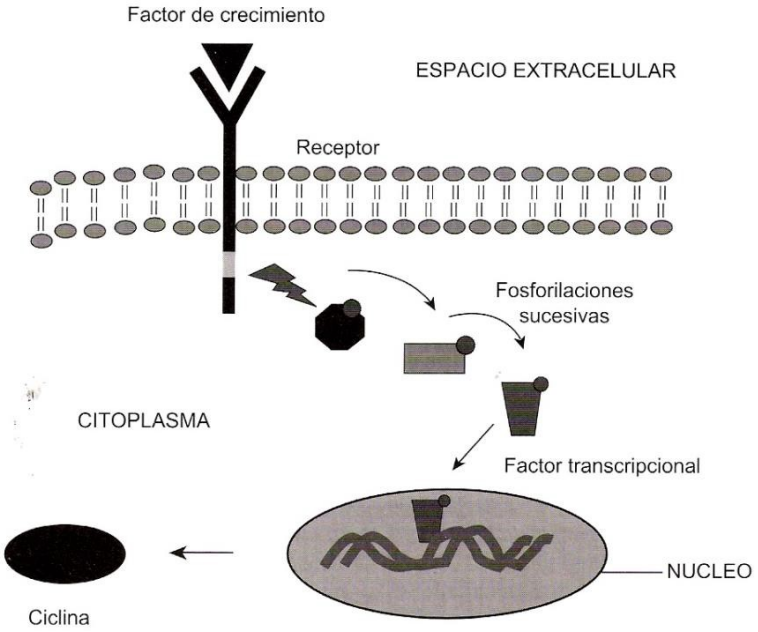


Figura 8. El estímulo que recibe la célula para proliferar, llega hasta el núcleo mediante proteínas que funcionan como: factores de crecimiento, receptores, cinasas citoplásmicas y factores transcripcionales. Estas proteínas codificadas por protooncogenes pueden sufrir mutaciones y originar un oncogen.

3.2 Genes responsables del cáncer

Las mutaciones, presentes en las células cancerosas, que provocan la aparición de las características tumorales afectan genes cuyos productos proteicos regulan la proliferación celular, la apoptosis (muerte celular programada) o la senescencia celular (envejecimiento), por lo tanto debemos definir la existencia de dos tipos de genes cuya alteración se relaciona con el proceso canceroso: oncogenes y genes supresores de tumores u oncosupresores.

3.2.1 Genes supresores de tumor y oncogenes

En general, la mitosis se puede regular de dos formas:

1. Por genes que detienen la división celular y
2. Por genes que promueven la división celular (Klug, 1999).

La primera clase llamados ***genes supresores de tumores (oncosupresores),*** codifican proteínas que actúan deteniendo la proliferación o bien induciendo la apoptosis. Cuando una mutación del gen genera una proteína no funcional o impide su síntesis, la proliferación pierde su control o bien la apoptosis nunca tiene lugar, por lo que la proliferación es excesiva a menudo con acumulación de daños genéticos en las células (Cox y Sinclair, 1998; Klug, 1999).

3.2.1.1 Tipos de genes supresores

Los genes oncosupresores codifican proteínas que actúan en distintos puntos de las rutas de señalización, del control del ciclo celular y de la apoptosis:

- **Los factores inhibidores del crecimiento celular.** La mutación del gen oncosupresor correspondiente anula la funcionalidad de la proteína sintetizada. Ejemplo: el gen oncosupresor ***dcc*** codifica una proteína de adhesión celular, ausente en el carcinoma de colon.
- **Los receptores de estos factores inhibidores o de hormonas que frenan el crecimiento celular.** La forma mutada del gen oncosupresor codifica un receptor insensible a su ligando o que no transmite la señal al interior de la célula. Ejemplo: el gen oncosupresor que codifica el receptor de membrana para el factor β de crecimiento transformante (TGF-β).
- **Las proteínas citoplasmáticas que intervienen en los sistemas de transducción de señales acoplados a los receptores anteriores.** La situación varia según sea la función concreta de la proteína. Ejemplo: el gen oncosupresor ***nf1*** codifica la neurofibromina, proteína que estimula la actividad GTPasa de Ras, en consecuencia la inactiva. En la enfermedad de Recklinghausen, el gen ***nf1*** está mutado, por lo que la neurofibromina es defectuosa, la proteína Ras no libera GTP y queda en forma activa más tiempo del normal, lo que aumenta la proliferación.

- **Los factores de transcripción que dirigen la expresión de genes cuyos productos proteicos frenan el ciclo celular o producen apoptosis.** Ejemplos: los genes oncosupresores ***Rb*** y ***p53***.
- **Las proteínas que frenan el ciclo celular o producen apoptosis.** El gen mutado no expresa la proteína o da lugar a una forma no funcional.

3.2.1.2 Características de la expresión de los genes oncosupresores

La pérdida de la función de un gen oncosupresor sólo se produce cuando han mutado los dos alelos (individuos homocigóticos). Es decir, la forma mutada de un gen oncosupresor se expresa con carácter recesivo, ver ejemplos en la Tabla 1. Esto es así puesto que la mutación produce pérdida de función en la proteína, pero las moléculas de proteína sintetizadas a partir del alelo normal pueden suplir esa carencia, al menos parcialmente (Klug, 1999; Fuesse *et al.*, 2005; Panduro, 2000).

Gen supresor de tumor	*Correlación con neoplasias*
Rb	Implicado en neoplasias de retina, hueso, pulmón, vejiga y mama
p53	La pérdida de la función de p53 se vincula con más de 50 tipos de cáncer en seres humanos
FHIT	Implicado en el cáncer de mama y pulmón
BRCA1	Asociado a tumores de mama y ovario
BRCA2	Relacionado con el cáncer de mama
VHL	Implicado en tumores malignos de riñón
NF-1	Relacionados con los neurofibromas
APC	Asociado a tumores de colon y estómago

Tabla 1. Correlación de genes supresores con algún tipo de proceso canceroso.

La herencia de los genes oncosupresores mutados corresponde a su carácter recesivo, pero sólo tiene lugar cuando la mutación ha afectado a células germinales. La probabilidad de mutación somática en los alelos de una misma célula es baja, por lo que la homocigosis generada de novo es poco frecuente; sin embargo, los

individuos heterocigóticos en un gen oncosupresor tienen predisposición a la aparición de cáncer, ya que sólo necesitan una mutación somática en el otro alelo para perder totalmente la función de la proteína oncosupresora. A continuación se muestra la tabla 1 que indica la correlación de genes supresores de tumores con algunos tipos de cáncer (Danienberg *et al*., 1992; Luque y Herráez, 2001).

Los genes de la segunda clase, llamados ***protooncogenes***, promueven la división celular. Estos genes se pueden activar o desactivar, cuando se activan, promueven la división celular. Para detener la proliferación, estos genes y/o sus productos génicos, tienen que inactivarse. Si los protooncogenes quedan permanentemente activados, entonces se da una proliferación celular descontrolada lo que origina un tumor. Las formas mutantes de los protooncogenes se conocen con el nombre de ***oncogenes*** (Luque y Herráez, 2001).

3.2.1.3 Tipos de protooncogenes

Se han identificado protooncogenes que codifican proteínas muy diversas:

- **Los factores estimuladores del crecimiento celular**. La mutación oncogénica origina una producción excesiva del factor proteico o una mayor actividad de éste. Ejemplo: el protooncogen ***sis*** que codifica para la cadena B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).
- **Los receptores de factores de crecimiento o de hormonas, presentes en la membrana o dentro de la célula.** Para el caso de un factor de crecimiento u hormona estimuladora de la proliferación, la forma oncoproteíca del receptor puede ser aquella con una conformación que la mantiene activa aunque no se le una al ligando. Si se trata del receptor de un factor u hormona inhibidores del crecimiento, la oncoproteína es aquella que no responde a la unión del ligando. Ejemplo: el protooncogén ***erbB*** codifica el receptor de membrana para el factor de crecimiento epidérmico EGF.
- **Las proteínas citoplasmáticas que intervienen en los sistemas de transducción de señales**. La mutación hace que el oncogén exprese una proteína que se mantiene activa sin necesidad de que le llegue la señal. Ejemplo: el protooncogen ***ras*** que codifica una proteína G monomérica.

- **Los factores de transcripción que controlan la expresión de los genes que codifican a su vez proteínas implicadas en la señalización, el control del ciclo celular o la apoptosis.** Ejemplos: los protooncogenes ***fos, jun*** y ***myc.*** El protooncogén ***erbA*** codifica el receptor intracelular para hormonas tiroideas, que es un factor de transcripción.

- **Las proteínas responsables de la activación directa del ciclo celular (tales como las ciclinas o las cinasas y fosfatasas activadoras de las Cdk) o de la inhibición de la apoptosis.** Los oncogenes respectivos expresan proteínas en mayor cantidad o con la función aumentada. Ejemplos: el protooncogen ***bcl-1*** codifica la ciclina D1, ***cdk1*** modifica la quinasa dependiente de ciclina Cdk1, ***mdm-2*** codifica un antagonista de la proteína p53, ***bcl-2*** codifica una proteína mitocondrial que bloquea la apoptosis al inhibir a las caspasas (Luque y Herráez, 2001; Panduro, 2000¸Gemignani, 2003).

3.2.1.4 Características de la expresión de los oncogenes

Puesto que existe ganancia de función en la oncoproteína, basta con que este mutado uno de los dos alelos del protooncogen para que se exprese el efecto de la oncoproteína anormal. En consecuencia los oncogenes se expresan con carácter dominante, y los individuos heterocigotos para un oncogen sufren sus efectos de forma similar a los homocigóticos (Klug, 1999; Luque y Herráez, 2001; Panduro, 2000). La herencia del oncogén será acorde con este carácter, pero sólo si la mutación del protooncogen afecta a las células germinales. En la Tabla 2 se mencionan algunos protooncogenes y tumores humanos relacionados (Panduro, 2000; Wannapa *et al.,* 2005).

En los laboratorios de Inmunología Molecular y Diferenciación Celular y Cáncer de la FES Zaragoza se ha iniciado el estudio tanto de genes oncosupresores, como de oncogenes utilizando técnicas de Biología Molecular básicas como el aislamiento de ADN y ARN, así como la amplificación de secuencias específicas del material genético realizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), esas técnicas se mencionan a continuación:

Protooncogenes	*Neoplasia (s)*	*Lesión*
Abl	Leucemia mielógena crónica	Translocación
erbB	Carcinoma de células escamosas; astrocitoma	Amplificación
Neu	Adenocarcinoma mamario, ovárico y gástrico	Amplificación
Gip	Carcinoma de ovario y de glándula suprarrenal	Mutaciones puntuales
Gsp	Adenoma hipofisario, carcinoma tiroideo	Mutaciones puntuales
Mic	Linfoma de Burkitt, Carcinoma de pulmón, glándula mamaria y cuello uterino	Translocación, Amplificación
L-*mic*	Carcinoma de pulmón	Amplificación
N-*mic*	Neuroblastoma, carcinoma pulmonar de células pequeñas	Amplificación
H-*ras*	Carcinoma de colon, pulmón y páncreas; melanoma	Mutaciones puntuales
K-*ras*	Leucemia aguda mielógena y linfoblástica; carcinoma de tiroides, melanoma	Mutaciones puntuales
N-*ras*	Carcinoma genitourinario y tiroideo; melanoma	Mutaciones puntuales
Ret	Carcinoma tiroideo	Redisposición
Ros	Astrocitoma	Se desconoce
K-*sam*	Carcinoma de estómago	Amplificación
Sis	Astrocitoma	Se desconoce
Src	Carcinoma de colon	Se desconoce
Trk	Carcinoma tiroideo	Redisposición

Tabla 2. Protooncogenes y tumores humanos relacionados (Kalliopi, 2006).

3.3 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR BÁSICAS PARA EL ESTUDIO DE GENES REALCIONADOS CON CÁNCER.

3.3.1 Extracción de ADN.

La estructura básica del ADN es idéntica en todos los organismos; está compuesto por cadenas de nucleótidos unidas por la complementariedad de las bases a través de puentes de hidrógeno entre A y T (Adenina y Timina), C y G (Citosina y Guanina) en forma de doble hélice. El ADN está localizado dentro del núcleo de las células eucarióticas, rodeado de proteínas, histonas y organizado en cromosomas (Jiménez, 2004; Kochl, *et al.,* 2005).

El aislamiento del ADN, es el primer paso en cualquier análisis genético. Dada la complejidad de esta molécula, los ácidos nucleicos son difíciles de separar de los componentes de membrana (lípidos, proteínas, carbohidratos) y de otras moléculas solubles (polisacáridos) (Adams y Burdan, 1980; Luque y Herráez, 2001; Jiménez, 2004). Generalmente, se lleva acabo el método de extracción de DNA con fenol/ cloroformo/ alcohol isoamílico (Kochl, *et al.,* 2005).

En este método, la primera etapa en la extracción de ADN es la lisis de las membranas externa y nuclear de las células; se realiza en un medio alcalino, por la acción de detergentes y enzimas proteolíticas, como la proteinasa K para liberar el material genético (Figura 9).

Durante la segunda etapa, se lleva a cabo la extracción orgánica, las proteínas contaminantes se desnaturalizan y se depositan en la interfase entre la fase acuosa y la fase orgánica. Los ácidos nucleicos permanecen en la fase acuosa.

El fenol se utiliza a pH 8 para prevenir los productos oxidativos que dañan los ácido nucleicos (Luque y Herráez, 2001). La mezcla fenol/ cloroformo se utiliza para las extracciones, ya que facilita la desnaturalización de proteínas y la precipitación de éstas en la interfase.

Por último, en la precipitación con etanol absoluto, las sales permanecen en solución, mientras que los ácidos nucleicos forman un precipitado blanco en forma de malla que se puede separar por centrifugación (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989; Minch, 1989)

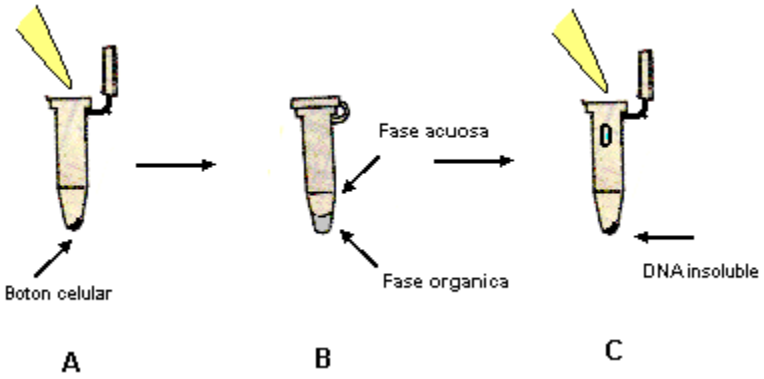


Figura 9. Extracción de ADN. A) Primera etapa: lisis celular por acción de algunos detergentes. B) Segunda etapa: extracción orgánica (desnaturalización de las proteínas). C) Tercera etapa: precipitación con alcohol absoluto.

3.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En 1986, se desarrolló una nueva técnica denominada reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que ha ampliado enormemente el poder de la investigación del ADN recombinante (Zyskind y Berstein, 1992). La reacción de PCR permite la amplificación directa de segmentos específicos y puede utilizarse en fragmentos de ADN que estén presentes, inicialmente, en cantidades infinitesimalmente pequeñas.

Se basa en la amplificación de un segmento de ADN utilizando ADN polimerasa y cebadores, oligonucleótidos que hibridan con la cadena complementaria de la secuencia a amplificar. Hay tres pasos fundamentales en la reacción de PCR, y la cantidad de ADN amplificado producido sólo está limitado, en teoría, por el número de veces que se repiten estos pasos (Luque y Herráez, 2001; Jiménez, 2004; Strachan, 2004).

1. Primero, el ADN que se quiere amplificar se desnaturaliza en cadenas sencillas. Este ADN no necesita estar purificado ni clonado, y puede provenir de distintas fuentes, incluyendo ADN genómico, muestras forenses como sangre seca o semen, muestras almacenadas en registros médicos, pelos, restos momificados, y fósiles. El ADN de doble cadena se desnaturaliza por calor (a unos 90°C) hasta que se disocia en cadenas sencillas (normalmente 5 minutos).

2. Los cebadores hibridan al ADN de cadena sencilla. Estos cebadores son oligonucleótidos sintéticos que hibridan con las secuencias flanqueantes del segmento a amplificar. Generalmente se utilizan dos cebadores diferentes. Cada uno de ellos tiene la secuencia complementaria a una de las dos cadenas del ADN. Los cebadores se alinean con sus extremos 3' complementarios ya que hibridan a cadenas opuestas. La utilización de cebadores sintéticos significa que se debe tener alguna información de la secuencia de ADN a amplificar.

3. A la mezcla de reacción se le añade una ADN polimerasa resistente al calor (polimerasa ***Taq***). La polimerasa extiende los cebadores en dirección 5' a 3', utilizando como molde al ADN de cadena sencilla unido al cebador. El producto es una molécula de ADN de doble cadena con los cebadores incorporados en el producto final.

Cada grupo de tres pasos (desnaturalización del producto de doble cadena, hibridación de los cebadores, y extensión por la polimerasa) se denomina ciclo (Figura 10).

Generalmente, cada paso del ciclo se realiza a una temperatura diferente (Luque y Herráez, 2001; Jiménez, 2004; Zyskind, 1992). El ciclo puede repetirse llevando a cabo otra vez todos los pasos. Empezando con una molécula de ADN, el primer ciclo produce dos moléculas, con dos ciclos se producen cuatro, tres ciclos producen ocho, etcétera. Veinticinco ciclos amplifican varios millones de veces el ADN en cuestión (Brinkman *et al.,*2004; Bartlett y Stirling, 2003).

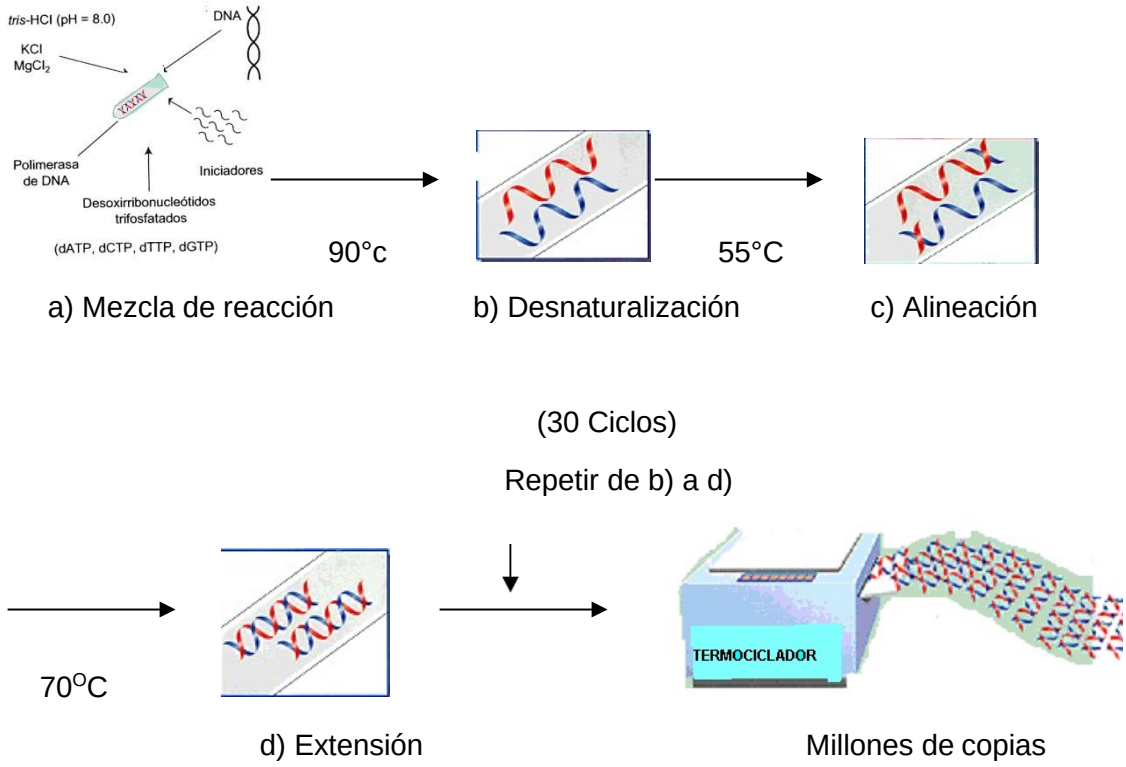


Figura 10. Programa de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa.

3.3.3 Electroforesis.

Se basa en la capacidad de las macromoléculas cargadas para desplazarse en un campo eléctrico, con velocidad proporcional a su carga e inversamente proporcional a su tamaño. Las moléculas de DNA poseen al pH alcalino, una carga negativa uniforme por unidad de masa, lo cual permite que su movilidad hacia el ánodo (+) sólo este determinada por el tamaño de la molécula. La separación de los fragmentos de ADN de doble cadena se realiza en geles de agarosa o poliacrilamida; en ambos casos el gel se prepara con distintas concentraciones en función al tamaño de los fragmentos de ADN que se requiere separar (Figura 11).

Una vez separadas las moléculas de ADN se visualizan normalmente por la fluorescencia de algunos compuestos que se unen a ellas. El más utilizado es el bromuro de etidio cuya fluorescencia aumenta cuando se encuentra unido al ADN (Cox y Sinclair, 1998; Luque y Herráez, 2001; Zyskind y Berstein, 1992).

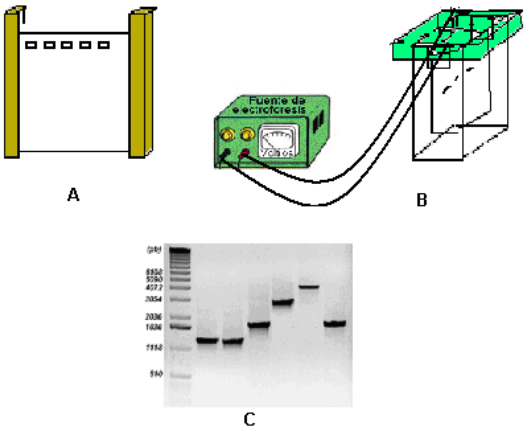


Figura 11. A) Gel de acrilamida, B) cámara de electroforesis conectada a una fuente de poder, C) Fotografía de un gel de acrilamida una vez teñido con bromuro de etidio.

3. 3. 4 Secuenciación (Método enzimático o de didesóxidos)

No resultó sencillo conocer la secuencia del genoma humano, en la actualidad se conocen las secuencias de una considerable cantidad de genes y varias alteraciones estructurales como mutaciones, inserciones, deleciones, etc., que conducen a trastornos funcionales, y por tanto, a enfermedades específicas.

Para llevar acabo el método de didesóxidos, se requiere del molde de ADN, un iniciador (cebador), desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), didesoxirribonucleótidos (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) y la enzima polimerasa de DNA (*Taq* Polimerasa de DNA), en un amortiguador que contenga cloruros de Magnesio y de Potasio ($MgCl_2$, KCl) (Micklos, 2003).

Para que la polimerasa de DNA pueda iniciar su síntesis, es necesario que los cebadores se fijen de forma específica al molde de DNA, así, la enzima comienza a añadir dNTP a la cadena en crecimiento por complementariedad de bases (se forma

un enlace fosfodiestér entre el extremo 3′OH terminal de la cadena y el grupo 5′PO_4^{2-} del dNTP añadido)[1].

Un requisito para este método, es que, uno de los dNTP añadido debe encontrarse marcado de forma radioactiva (^{35}SdATP). La reacción se lleva a cabo en 4 tubos donde se adiciona un ddNTP diferente; así cuando el ddNTP equivalente se incorpora en la cadena en crecimiento, se detiene la elongación la misma (debido a que ddNTP carece de grupo y por lo tanto no puede formarse otro enlace fosfodiestér). A partir del tubo que contiene ddATP, se obtendrán cadenas que terminan con la base A y así sucesivamente para las cadenas que se sintetizan en los tubos ddCTP, ddGTP, ddTTP (Cox y Sinclair, 1998; Panduro, 2000) (Figura 12).

Después de efectuar se las cuatro reacciones, se separan las cadenas de cada tubo en un gel de acrilamida, es importante señalar, que cada producto obtenido se coloca en un carril diferente en la electroforesis y se debe identificar correctamente. Posteriormente se realiza una autoradiografía y por último se lee la secuencia de ADN (Figura 12).

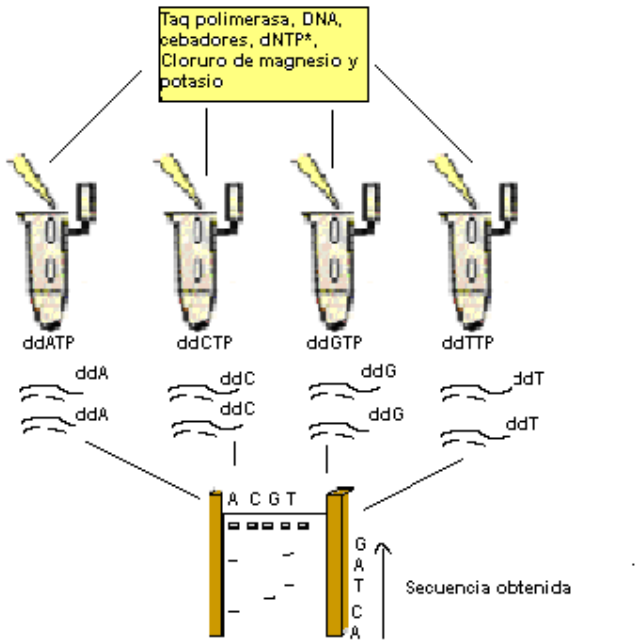


Figura 12. **Secuenciación de ADN**. Método enzimático de cadena terminal o didesóxido.

4. METODOLOGÍA

4.1 Extracción de ADN

Material y reactivos

- Tubos Falcon
- Tubos Eppendorf
- Cajas Petri
- Puntas para micropipetas
- Amortiguador de lisis
- Acetato de Sodio 375 mM p H 5.5
- Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico (50:48:2) Sigma
- Isopropanol Sigma
- Alcohol etílico absoluto Merck
- Etanol 80%
- TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM p H 8.0) Sigma

Equipo

- Centrifuga Eppendorf
- Termociclador Eppendorf
- Vortex Genie
- Micropipetas Gilson

Servicios

- Agua, energía eléctrica, vacío

Procedimiento

1. Resuspender la línea celular con 80 µL de amortiguador de lisis e incubar 30 minutos a 37°C.
2. Llevar a un volumen de 400 µL con 320 µL de acetato de sodio 0.375M.
3. Mezclar por 5 minutos e incubar 30 minutos a 37°C.
4. Adicionar 480 µL de la mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamilico.
5. Agitar en vortex por lo menos 5 minutos.
6. Centrifugar a 13,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Separar la fase acuosa y adicionar el mismo volumen de isopropanol previamente enfriado a -20°C.
8. Centrifugar 13,000 rpm durante 15 minutos a -4°C.
9. Eliminar con ayuda de una micropipeta el sobrenadante.
10. Adicionar un volumen de 980 µL de alcohol etílico absoluto.
11. Centrifugar 13,000 rpm durante 15 minutos.
12. Desechar el sobrenadante y adicionar 500 µL de etanol al 80% (frío).
13. Centrifugar nuevamente a las mismas revoluciones y por el mismo tiempo.
14. Eliminar el sobrenadante y colocar los tubos en el termociclador a 60°C por 5 minutos o dejarlos secar durante 24 horas en un lugar limpio a temperatura ambiente (Figura 13).
15. Resuspender el botón formado con 50 µL de TE. Guardar a -20°C.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**71/330**

Extracción de ADN

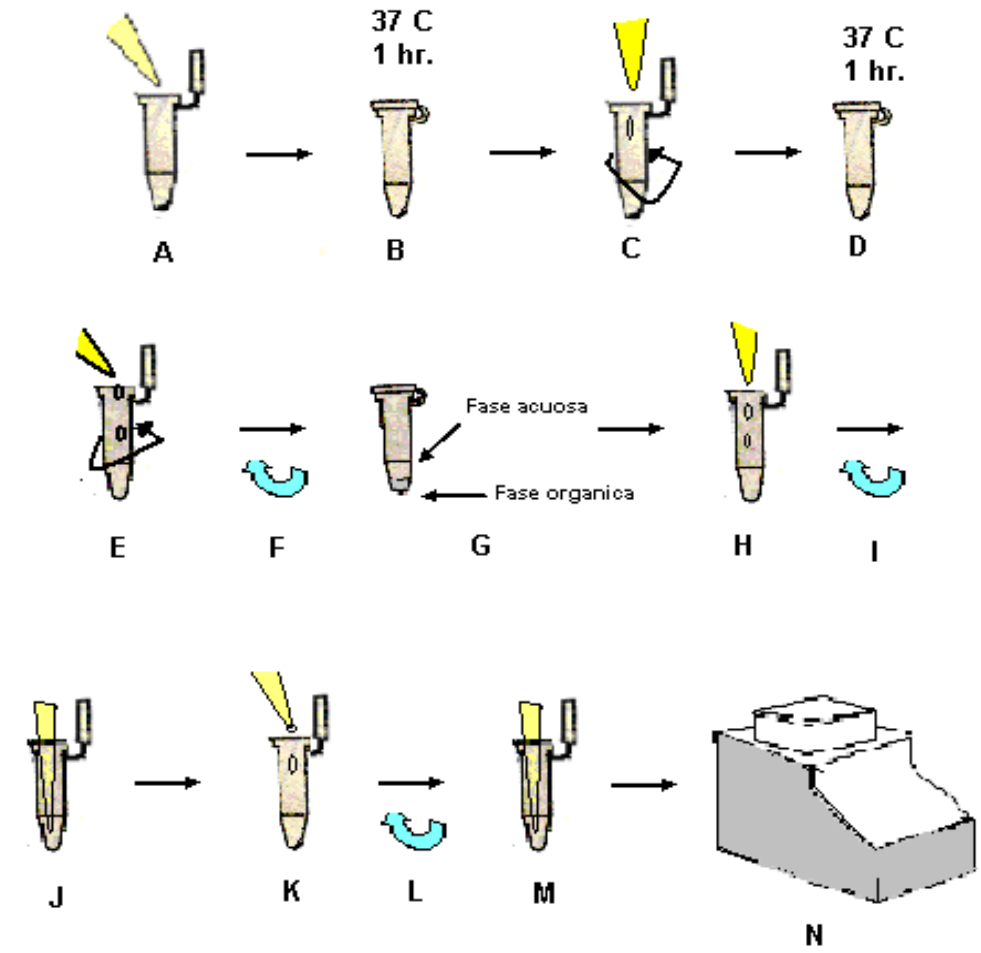


Figura 13. Pasos en la extracción del ADN. A) Resuspender la línea celular con amortiguador de lisis + pronasa. B) Incubar a 37ºC por una hora. C) Adicionar acetato de sodio y mezclar lo mejor posible. D) Incubar nuevamente a 37ºC una hora. E) Adicionar la mezcla Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico y agitar. F) Centrifugar. G) Separar la fase acuosa. H) Adicionar un volumen de isopropanol. I) Centrifugar. J) Eliminar el sobrenadante. K) Adicionar alcohol etílico frío. L) Centrifugar. M) Eliminar el sobrenadante. N) Colocar el tubo en el termociclador para secar o dejar a temperatura ambiente 24hrs.

4.2 Hidratación y cuantificación del ADN.

Material y reactivos

- Tubos Eppendorf
- Puntas para micropipetas
- Agua DEPC al 1% estéril Sigma
- Agua calidad milipore

Equipo

- Micropipetas Gilson
- Vortex Genie
- Centrifuga Eppendorf
- Espectrofotómetro WPA
- Refrigerador Revco

Procedimiento

1. Hidratar la muestra con 20 µL de agua DEPC al 1% estéril.
2. Agitar durante 5 minutos y mantener las muestras en refrigeración (4°C) de 1-2 horas agitando con vortex cada 30 minutos.
3. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 segundos.
4. Colocar en un tubo Eppendorf 1 µL de ADN puro y adicionar 199 µL de agua calidad millipore (1:200).
5. Leer la absorbancia de las muestras a 260 nm (Figura 14).
6. Determinar la concentración de ADN con la siguiente fórmula:

$$\text{ADN } (\mu g/\mu L) = \frac{\text{Absorbancia}_{260nm} \times 50\ \mu g \times \text{factor de dilución}}{1000\ \mu L}$$

Hidratación y cuantificación del ADN

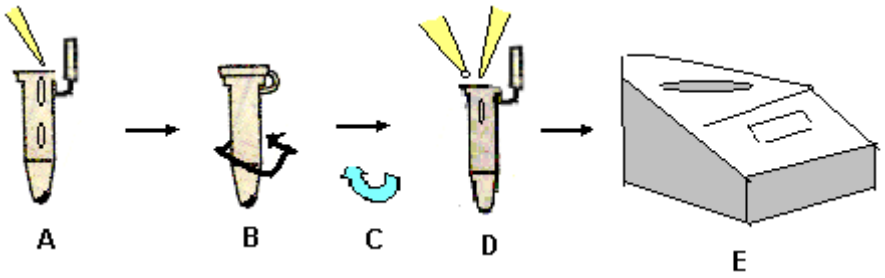


Figura 14. Procedimiento para hidratación y cuantificación del ADN. A) Hidratar la muestra. B) Agitar la muestra ya hidratada. C) Centrifugar. D) Realizar dilución. E) Leer absorbancia a 260 nm y determinar la concentración de ADN presente.

4.3 Amplificación de los genes K-ras y p53

Material y reactivos

- Puntas para micropipeta
- ADN de las siguientes líneas celulares:

  1. T47D
  2. MDA231
  3. 293T
  4. CALO
  5. INBL
  6. ADN problema

7. ADN problema

- amortiguador PCR 10 X
- $MgCl_2$ 25 mM
- dNTP's 5 mM
- oligo K-ras 20 µM 5´CCTTATGTGTGACATGTTCT

  TCTGAATTAGCTGTATCGTC (Gemignani, et al, 2003)
- oligo P53 20 µM CCCGGACGATATTGAACA
- AGAAGCCCAGACGGAAAC 3´ antisentido (Wannapa, Nipa y Churalrat, 2005).
- 5 U/µL Taq polimerasa Cetus
- Agua desionizada libre de nucleasas
- Aceite mineral

Equipo

- Micropipetas Gilson
- Vortex Genie
- Termociclador Mastercycler Eppendorf
- Tubos Eppendorf

Servicios

Agua, energía eléctrica

Procedimiento

- Etiquetar 8 tubos Eppendorf con base en la numeración proporcionada a cada línea celular (Número 8 corresponde al control negativo).

- Preparar la mezcla de reacción considerando que el volumen final en un tubo de reacción debe ser no mayor de 20 µL (mantener “todos los reactivos en hielo; la mezcla se prepara dentro de la campana de flujo laminar”).

Reactivo	Concentración/Reacción	µL/reacción	µL/8.5 Reacciones
10X amortiguador PCR	1X	2.0 µL	17.0 µL
25m M $MgCl_2$	2 mM	1.6 µL	13.6 µL
5 mM d NTP’s	0.2 mM	0.8 µL	6.8 µL
5 U/µL Taq polimerasa	0.5 U	0.1 µL	0.85 µL
Agua Para PCR		14.4 µL	122.4 µL
	Vol. Final	18.9 µL	160.65 µL

- Preparar la mezcla de reacción en el tubo etiquetado como número 8, agitar en vortex; adicionar 0.8 µL del oligo Kras y distribuir en cada tubo (del 1 al 7), 19 µL de dicha mezcla.
- Adicionar 50 µL de aceite mineral.
- Depositar los siguientes volúmenes de ADN, en el tubo correspondiente:

Línea celular	Volumen (µL)
1. T47D	0.34
2. MDA231	0.48
3. 293T	0.20
4. CALO	1.40
5. INBL	2.00
6.DNA problema	1.00
7. DNA problema	0.20
8. Control (-)	1.00

- Colocar los tubos en el termociclador a 95°C Kras y 94°C p53 seguir los siguientes programas (Figura 15).

*Para **Kras***	*Para **p53***
1. 95°C por 5 minutos	1. 94°C por 5 minutos
2. 58°C por 1 minutos	2. 55°C por 2 minutos
3. 72°C por 1 minutos	3. 72°C por 2 minutos
4. 95°C por 1 minutos	4. 94°C por 2 minutos
5. Repetir de punto 2-4, 29 veces	5. Repetir de punto 2-4, 29 veces
6. 58°C por 2 minutos	6. 55°C por 2 minutos
7. 72°C por 7 minutos	7. 72°C por 7 minutos
8. 20°C por 1 hora	8. 20°C por 1 hora

Amplificación del gen (kras)

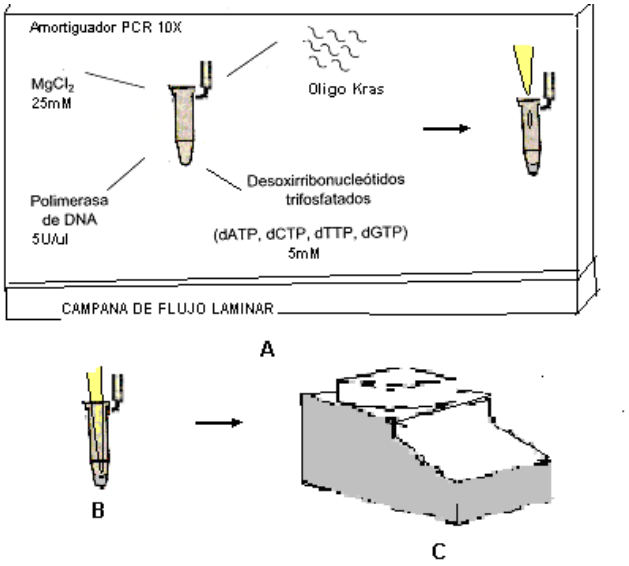


Figura 15. Amplificación del gen kras. A) Preparación de la mezcla de reacción; se preparan las alícuotas correspondientes y se adiciona aceite de PCR. B) Depositar las muestras ADN de las diferentes líneas celulares. C) Colocar los tubos en el termociclador y seguir el programa de amplificación.

4.4 Corte con enzima de restricción

Material y reactivos

- Tubos Eppendorf
- Puntas para micropipeta de 200 µL
- 5 µL de cada amplicón p53
- Enzima de restricción BstU I
- Amortiguador PCR 10X
- Agua desionizada libre de nucleasas

Equipo

- Micropipetas Gilson
- Termociclador Eppendorf
- Centrifuga Eppendorf

Servicios

Energía eléctrica, agua

Procedimiento

- Colocar 5 µL de cada amplicón de p53 en un tubo Eppendorf (un tubo por cada amplicón) y adicionar 1 µL de enzima BstU I).
- Adicionar 2 µL de amortiguador 10 x y 12 µL de agua a cada tubo.
- Incubar las muestras en el termociclador a 60°C utilizando el programa BstU I durante 6 horas (Figura 16).

- Centrifugar por 5 segundos y realizar la electroforesis.

Corte con Enzima de Restricción

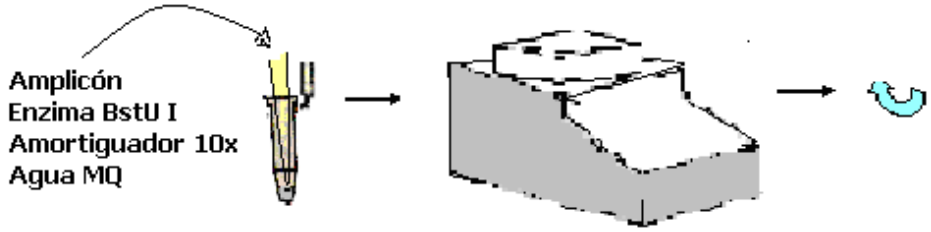


Figura 16. Corte con enzima de restricción. Inicialmente se adicionan todos los reactivos necesarios para realizar el corte, una vez realizado este procedimiento, los tubos se colocan en el termociclador por 4 horas con el programa correspondiente.

4.5 Electroforesis de los productos PCR

Material y reactivos

- Gel de acrilamida al 4%
- TBE 1X (Tris- ácido bórico- EDTA) Sigma
- Amortiguador de carga
- Bromuro de etidio
- Agua destilada

Equipo

- Micropipetas Gilson
- Cámara de electroforesis vertical Bio-Rad

Servicios

Energía eléctrica, agua

Procedimiento

- Preparar gel de acrilamida al 4% en TBE 1X.
- Adicionar a cada muestra 10 µL de amortiguador de carga y mezclar la fase acuosa evitar la generación de emulsión con el aceite.
- Depositar 10 µL de la muestra con amortiguador a cada pozo.
- En un pozo de los extremos colocar 10 µL del marcador de peso molecular de 50 pares de bases.
- Correr la electroforesis a 180 volts por 1.5 horas en TBE 1X.
- Teñir el gel con bromuro de etidio (7 µL de una solución 10 mg/mL en 70 mL de TBE 1X agitar suavemente durante 1 min).
- Desteñir con agua destilada por 2 minutos.
- Colocar el gel en el equipo analizador de geles (Figura 17).

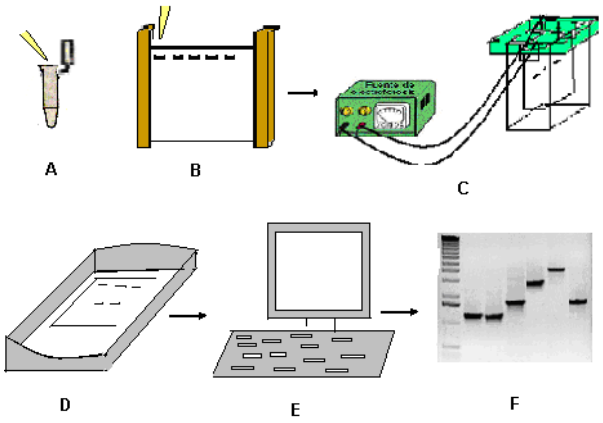


Figura 17. Electroforesis de los productos de PCR. A) Adicionar a cada muestra amortiguador de carga mezclando la fase acuosa sin hacer emulsión. B) Depositar una muestra por pozo, dejar el marcador de peso molecular en uno de los extremos. C) Correr la electroforesis. D) Teñir el gel con bromuro de Etidio. C) Colocar el gel en el equipo analizador de geles. D) Capturar la imagen del gel con una cámara de video conectada a una computadora y tomar una fotografía del gel.

4.6 Extracción de ADN a partir de las bandas del gel de acrilamida (método de difusión)

Material y reactivos

- Tubos Eppendorf
- Puntas para micropipetas

Reactivos

- Agua calidad Millipore estéril
- Acetato de sodio 3M Sigma
- Etanol Absoluto

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**81/330**

Equipo

- Micropipetas Gilson
- Centrifuga eppendorf
- Refrigerador Revco
- Placa de calentamiento Corning

Servicios

Energía eléctrica, agua

Procedimiento

- Cortar las bandas del gel de acrilamida lo más pequeño posible con ayuda del transiluminador, un bisturí y caretas para protección de la luz UV.
- Colocar las bandas en un tubo Eppendorf nuevo y etiquetado y cubrir con un volumen suficiente de agua millipore.
- Refrigerar durante 3 días.
- Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos.
- Separar la fase acuosa y colocar en un tubo nuevo.
- Lavar el tubo donde se encuentra la banda con 40 µL de acetato de sodio 3 M y 60 µL de agua calidad millipore. (Invertir el tubo varias veces de manera suave para homogenizar).
- Centrifugar a 13,000 rpm por 10 minutos.
- Recuperar la fase acuosa y colocarla en el tubo con la primera.
- Adicionar dos volúmenes de etanol absoluto frío. Refrigerar durante 45 minutos.
- Centrifugar nuevamente a 13,000 rpm durante 10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante.

- Cubrir el tubo con papel parafilm y realizar algunas perforaciones con una aguja limpia y estéril, dejar secar por 24 horas o utilizar un baño seco hasta observar el botón seco.
- Hidratar con 20 µL de agua calidad Millipore y cuantificar.
- Realizar corrimiento electroforético de la muestra para observar la presencia y pureza del material obtenido.
- A este producto se le determinó su secuencia y de esa forma se comprobó si existe o no mutación en el gen Kras (Figura 18).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**83/330**

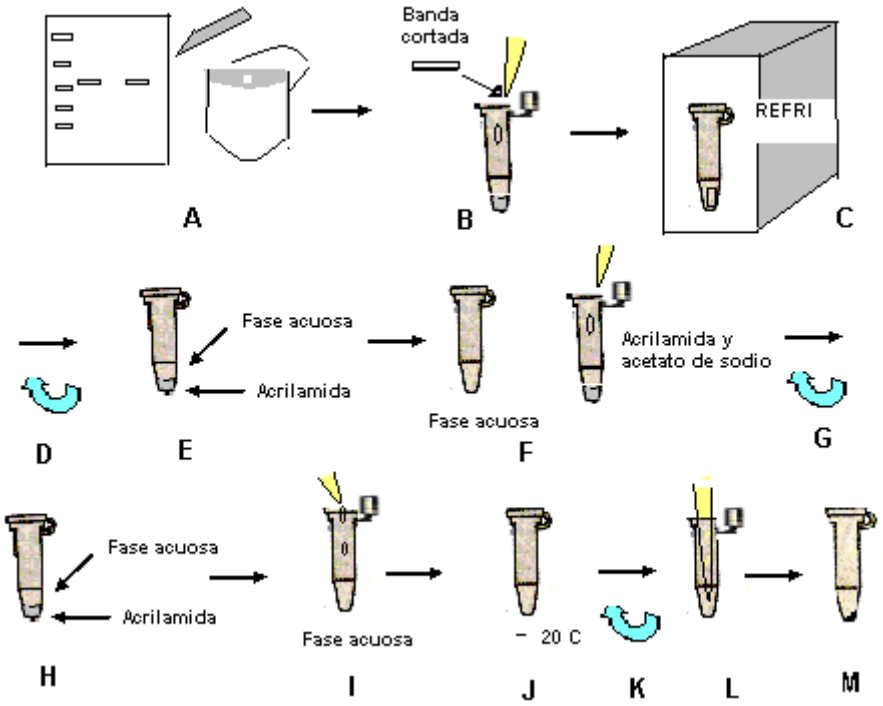


Figura 18. Extracción de ADN por el método de difusión A) Una vez visualizada la banda, realizar su corte. B) Colocar en un tubo limpio e hidratar con agua estéril. C) Refrigerar de dos a tres días. D) Centrifugar. E) Separar la fase acuosa. F) Lavar la banda con acetato de sodio. G) Centrifugar. H) Separa la fase acuosa y colocar con la primera. I) Adicionar dos volúmenes de etanol absoluto frío. J) Mantener a -20^{O}C por 45 minutos. K) Centrifugar. L) Eliminar el sobrenadante. M) Hidratar el botón.

5. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- Preparación del amortiguador de lisis

EDTA 0.1M	37.224g
NaCl 0.15M	8.766g
Agua Bidestilada cbp	1000ml

- Preparación de SDS 10%

Duodecilsulfato de Sodio	10 g
Agua bidestilada	100 mL

- Preparación de acetato de sodio 3M

Acetato de sodio	246.09 g
Agua bidestilada cbp	1000 mL

- Preparación de amortiguador de carga 5X

Tris 50 mM p H 8
EDTA 75 mM pH 8
SDS 0.5%
Ficoll 10%
Sacarosa 30%
Naranja G, Xilen Cyanol y Azul de Bromofenol 0.2%
Agua bidestilada cbp 100 mL

- Preparación de marcador de peso molecular

Marcador de 50 bp	1 µL
Agua	9 µL
Solución de carga	5 µL

- Preparación de acrilamida/bisacrilamida al 30%

Acrilamida	29.0 g
Bisacrilamida	1.0 g
Agua bidestilada cbp	100 mL

- Preparación de TBE 10X (Tris- Ácido bórico- EDTA)

Tris 1 M	121.10 g
Ácido Bórico 1 M	61.38 g
EDTA 50 mM	14.61 g
Agua bidestilada cbp	1000 mL

- Preparación de gel de acrilamida al 10%

	5.0 mL (1 gel)
Agua bidestilada	2.81 mL
TBE 10X	0.5 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	1.6 mL
APS 10%	80 µL
TEMED	8.0 µL

6. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA DETECCIÓN DE MUTACIONES EN LOS GENES KRAS Y p53

Extracción de ácidos nucleicos a partir de líneas celulares de cáncer cérvico-uterino.

↓

Hidratación y cuantificación de ácidos nucleicos

↓

Calibración de la técnica de PCR para el gen Kras y para p53

↓

Electroforesis en acrilamida de los productos de PCR (Figuras 19-21).

↓

Extracción de ADN de las bandas producto de PCR para su secuenciación (Figura 22).

↓

Análisis de resultados y evaluación de mutaciones en el producto de PCR DEL gen Kras y el producto de PCR de p53 cortarlo con la enzima de restricción.

7. RESULTADOS ESPERADOS

Kras:

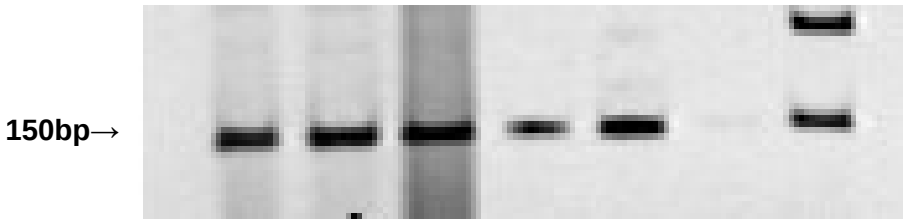


Figura 19. Electroforesis de la amplificación de las líneas celulares de cáncer humano (controles positivos) en un gel de acrilamida al 5%. El fragmento amplificado corresponde a un peso de 141 pares de bases.

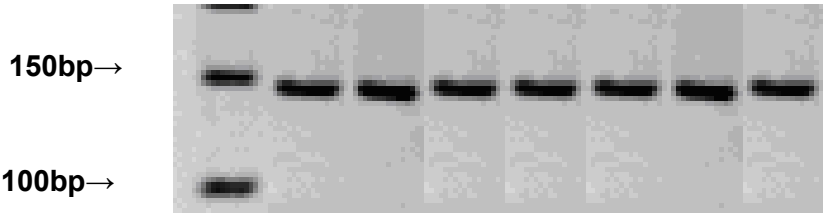


Figura 20. Electroforesis de los controles positivos y las muestras problema una vez realizada la cuantificación.

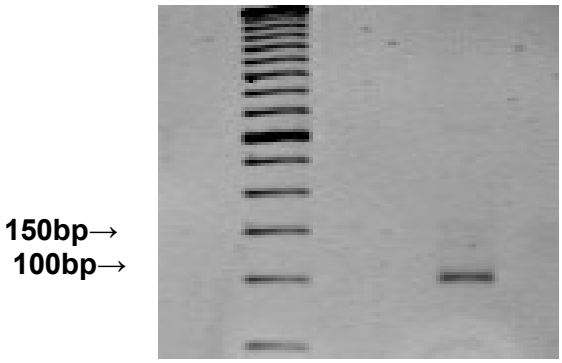


Figura 21. Electroforesis del producto obtenido a partir de la extracción de ADN de la banda cortada del gel de acrilamida.

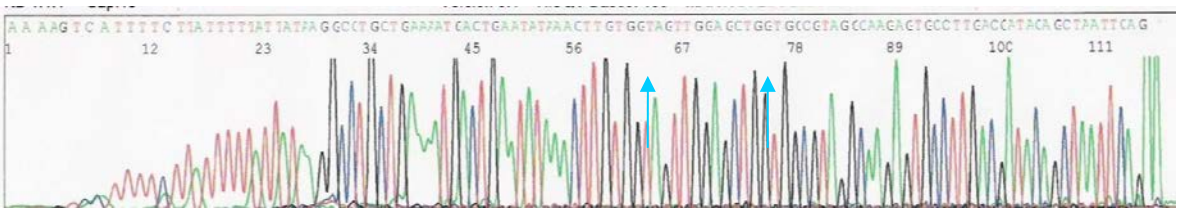


Figura 22. Secuencia del producto de la figura 3 con el primer Kras Forward. Las flechas indican los sitios donde debe encontrarse la mutación GGT (Gly) por GAT (Asp) o por GTT (Val) presente en cáncer cérvico úterino

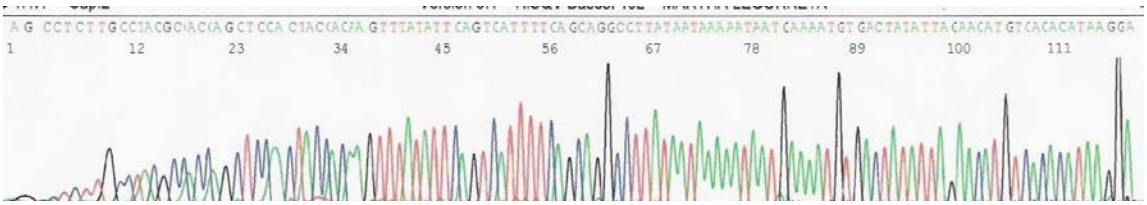


Figura 23. Secuencia del producto de la figura 3 con el primer Kras antisentido.

Resultados esperados para p53:

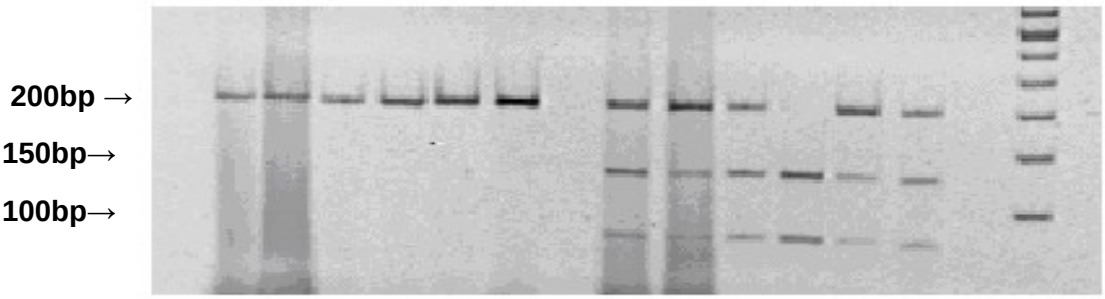


Figura 24. Electroforesis de la amplificación de las líneas celulares de cáncer humano. (Controles positivos) en un gel de acrilamida al 5%, así como el corte con enzima de restricción de las líneas celulares anteriores. Se observa el corte en dos sitios correspondientes fragmentos de 125 y 78 pares de bases. El fragmento amplificado sin corte corresponde a un peso de 203 pares de bases.

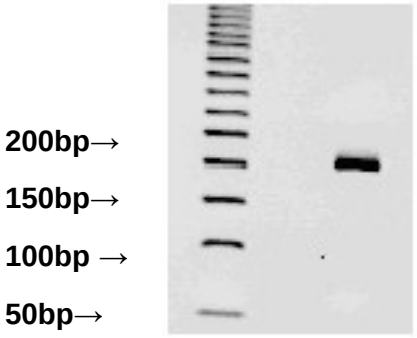


Figura 25. Electroforesis del producto obtenido a partir de la extracción del producto de PCR extraído de la banda cortada del gel de acrilamida**.**

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**90/330**

8. CUESTIONARIO

Instrucciones: Responder a las siguientes preguntas en una hoja por separado.

1. ¿Qué es el cáncer?

2. ¿Qué función tiene Kras y p53 cómo interviene en el cáncer?

3. ¿Qué es una mutación?

4. ¿En qué consisten las siguientes técnicas: PCR, electroforesis, secuenciación y corte con enzimas de restricción?

5. ¿Para que se utilizan las técnicas anteriores?

6. ¿Qué es un protooncogen?; mencione tres ejemplos

7. ¿A qué se le denomina gen supresor de tumor?; mencione tres ejemplos

8. ¿Qué función tiene la pronasa durante la extracción de ADN?

9. ¿Para qué se utiliza la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamilico?

10. Mencione 2 técnicas alternativas para la extracción de ADN

11. ¿En qué ocasiones es conveniente utilizar geles de acrilamida y en cuales geles de agarosa?

12. Mencione la función del bromuro de etidio y las precauciones que deben seguirse al utilizarlo.

13. ¿Qué ventajas tiene el uso de la polimerasa *Taq*?

14. Mencione la diferencia que existe entre la estructura molecular de dNTP y ddNTP.

15. Mencione el intervalo de concentración óptimo de los dNTP´s en la reacción de PCR.

16. ¿Cómo eliminaría la presencia de bandas inespecíficas durante la reacción PCR?

17. Mencione el fundamento de dos métodos alternativos para extraer y purificar el producto obtenido a partir de la banda en gel de acrilamida.

9. MANEJO DE RESIDUOS

1. El material punzocortante (jeringas o agujas) empleado para la extracción de sangre se desechará en el contenedor rojo ubicado en el área de confinamiento de residuos.
2. Los sobrantes y desechos de sangre líquida o sus componentes se inactivarán con una solución de hipoclorito de sodio al 7% de cloro libre. Esta solución se adicionará a la sangre líquida o sus componentes para alcanzar una concentración final de cloro libre del 0.7%, se incubará a temperatura ambiente por 30 minutos y se verterá al drenaje.
3. Los residuos con fenol:cloroformo y alcohol isoamílico se colocarán en un recipiente de vidrio color ambar y se confinarán en el área de residuos.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍCAS

Adams R.L.P. Burdan R.H. Bioquímica de los ácidos nucleicos, Editorial Reverté, España, 1980: 48-130.

Bartlett M.S., Stirling D. Methods in Molecular Biology. PCR Protocols, Volumen II, 2ª ed. Editorial Press Humana, New Yersey, 2003:77-78.

Brinkman JA, Rahmani MZ, Jones WE. Optimization of PCR based detection of human papillomavirus DNA from urine specimens. J Clin Virol. 2004; 29(4): 230-40.

Cox M.T. Sinclair J. Biología molecular en medicina, Editorial Médica Panamericana, Argentina,1998.

Danenberg PV, Horikoshi T, Vokenandt M, Danenberg K. Detection of point mutations in human DNA by analysis of RNA conformation polymorphism (s). Nucleic Acids RES 1992; 20 (3): 573-579.

Fuessel HA, Woeber S, Gomez M, Garza N, Gomez Y, Rady P, He Q, et al. Human papillomavirus infection and p53 codon 72 genotypes in a hispanic population at high-risk for cervical cancer. J Med Virology 2005; 77: 265-272.

Gemignani LM, Schlaerth CA, Bogomolniy F, Barakat RR, et al. Role of *KRAS* and *BRAF* gene mutations in mucinous ovarian carcinoma. Gynecologic Oncology 2003; 90: 378-381.

Jiménez C.E. Manual de técnicas de Biología molecular básica. Editorial Prado, México, 2004: 1-6, 27-28.

Kalliopi IP, Choleza M, Markaki S, Giannikaki E, Kyroudi A, et al. Consistent absence of BRAF mutations in cervical and endometrial cancer despite KRAS mutation status. Gynecologic Oncology 2006; 100: 596-600.

Klug S.W., Cummings R.M. Conceptos de genética*,* 5ª ed. Editorial Prentice Hall, España, 1999: 626-643, 743-751.

Kochl S, Niederstatter H, Parson W. DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol- choloroform method and real-time PCR. Methods Mol Biol 2005; 297: 13-30.

Luque J. Herráez A. Texto ilustrado de Biología molecular e Ingeniería Genética, Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud*,* Ediciones Harcourt, España, 2001:116-139, 187-196.

Micklos A.D., Freyer A.G., DNA Science a first course, 2ª ed. Editorial CSHL Press, U.S.A, 2003: 221-224.

Minch J.M., Experiments in Biochemistry. Projects and Procedures*,* Editorial Prentice Hall, U.S.A, 1989: 207-214.

Panduro A. Biología molecular en la clínica*,* Editorial Mc Graw-Hill interamericana, México, 2000: 420-450.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual .Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 1.21-1.52.

Strachan T., Human Molecular Genetics *3.* Editorial Garland Science, India, 2004: 123-128, 182-184.

Wannapa SI, Nipa K, Churalrat K. Human papillomavirus genotypes and the p53 codon 72 polymorphism in cervical cancer of Northeastern Thailand. Microbiol Inmunol 2005; 49(5): 417-421.

Zyskind W.J. Berstein I. S. Recombinant DNA laboratory manual*.* Academic Press INC. 1992: 151-161.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**93/330**

PRACTICA 4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS (MALARIA)

1. OBJETIVO.

- Que el alumno aplique diferentes metodologías de biología molecular para que al utilizar las secuencias específicas en el ADN de organismos patógenos (*Plasmodium*), descritas en la literatura sea capaz de realizar un diagnóstico molecular rápido y preciso de enfermedades infecciosas como la malaria.

2. INTRODUCCIÓN

El diferenciar y detectar microorganismos y el diagnosticar infecciones parasitarias se ha realizado por diferentes métodos como técnicas biológicas y morfológicas, así como por procedimientos bioquímicos, inmunológicos y moleculares. La microscopía directa se ha utilizado ampliamente para el diagnóstico de infecciones parasitarias como la malaria, sin embargo para un diagnóstico preciso se requiere de: un microscopista experimentado además de analizar más de 50 campos por lo que se convierte en una técnica laboriosa y no muy sensible (Zaman, 1996).

En los últimos 15 años se ha presentado una intensa evolución en las estrategias moleculares para estudiar a los parásitos y a las enfermedades parasitarias. Se han desarrollado métodos basados en la identificación de regiones en los ácidos nucleicos específicas de estos organismos. Los parásitos que se han estudiado con esas técnicas incluyen el *Plasmodium, Leishmania, Tripanosoma, Toxoplasma gondii, Entamoeba histolytica, Giardia, Tricomonas vaginalis, Criptosporidium parvum, Taenia, Echinococus, Brugia Malayi, Wuchereria bancrofti, Loa loa, Onchocerca Vovulus y Schistosoma moansoni.* Los métodos originales involucraban la hibridación de sondas específicas marcadas con radioactividad que detectaban blancos en el ADN. Estos métodos se han reemplazado por otros más sensibles como ensayos de PCR acoplados a hibridación, o a RFLP (polimorfismos de longitud generados por enzimas de restricción), la variante nested de PCR, etc., (Singh, 1997).

Los incrementos en la sensibilidad que se obtienen utilizando la técnica de PCR permiten a los científicos investigar cambios a nivel de una sola célula. Esta técnica ha tenido impacto en los avances de sistemática, epidemiología, inmunología e interacciones hospedero-parásito, diseño de vacunas con ADN recombinante y

recientemente el análisis del genoma total secuenciando directamente el ADN. Una nueva estrategia que provee de nuevos conocimientos es el PCR múltiple, que utiliza la tecnología de PCR acoplada a fluorescencia (PCR en tiempo real) con varios pares de oligonucleótidos para amplificar diversas regiones al mismo tiempo, además de las diferentes variantes cuantitiativas también se puede conocer la expresión de ARN mensajero para un determinado gen cuando se utiliza RT-PCR (Zarlenga y Higgins, 2001).

La malaria o paludismo, es una enfermedad infecciosa ocasionada por un parásito protozoario del género *Plasmodium.* Ha constituido un problema sanitario muy importante en todo el mundo debido a que más del 40% de la población mundial es decir, más de 2400 millones de personas están expuestas a la infección en un centenar de países (OMS, 2000, Breman, 2001). Este número va en aumento debido al desarrollo de resistencia a las drogas antimaláricas por parte del parásito y la resistencia a los insecticidas que ha desarrollado el mosquito vector (Sherman, 1998). La mayor mortalidad se presenta en niños menores de 5 años y en mujeres primogestas, de aquí que sea sumamente importante el diagnóstico oportuno y certero de esta enfermedad. Por esta razón, el diagnóstico molecular que se basa en identificar secuencias específicas de género y especie de *Plasmodium* constituye una excelente aproximación por su sensibilidad y rapidez, puesto que las infecciones por este parásito pueden ser mortales si no se diagnostican a tiempo y si el paciente no recibe el tratamiento adecuado contra la cepa con la que está infectado. Estas tecnologías son de alto valor para estudios epidemiológicos y son extremadamente útiles para genotipificar cepas de parásitos y vectores, además de mejorar el diagnóstico de enfermedades parasitarias (Cancrini y Lori, 2004).

Por lo anterior, es importante que el alumno maneje los conceptos más relevantes y las técnicas de biología molecular, en particular algunas variantes de la técnica de PCR que le permitirán detectar secuencias específicas de género y especie de organismos patógenos. En nuestro país las enfermedades parasitarias por su frecuencia, constituyen un problema de salud grave, por lo que capacitar a nuestros estudiantes en estas metodologías diagnósticas precisas e innovadoras, constituirá una herramienta muy valiosa en su formación, lo que repercutirá en una mejor atención a los pacientes afectados.

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

3.1 La Malaria

Denominación científica: Plasmodiosis

Denominación mundial: Malaria

Denominación latinoamericana: Paludismo

Existen 5 especies de *Plasmodium* que ocasionan malaria en el humano (*P. falciparum, P. ovale, P. vivax, P malariae y P. knowlesi*). El parásito se transmite al hombre por la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles* infectada. La enfermedad se caracteriza por episodios febriles comunes de acuerdo a la especie de parásito presente, también se manifiestan escalofríos intensos lo que culminan con diaforesis; además se presenta hepatomegalia, esplenomegalía y anemia que pueden variar de leves a graves.

La malaria representa una de las enfermedades documentadas más antiguas de la humanidad, es la enfermedad infecciosa con la mayor mortalidad en el mundo. Se ha detectado esplenomegalia en las momias egipcias de más de 3000 años de antigüedad, probablemente ocasionada por la malaria. Las fiebres mortales y la esplenomegalia se han mencionado en escritos egipcios y japoneses desde 2700 a. C. Las descripciones más completas del paludismo se hicieron en la Roma antigua en donde la malaria causó enormes estragos.

A falta de registros en el Nuevo Mundo antes del arribo de los exploradores europeos, conquistadores y colonos, se asume que ellos importaron a *P malariae y P vivax* a América. Aparentemente la llegada de *P falciparum* coincide con la importación de esclavos africanos, de tal forma que a principios de 1800 la malaria ya estaba extendida por todo el mundo. Esta enfermedad ha tenido un gran impacto sobre la historia del mundo, fue responsable de los resultados en guerras, movimientos populares, el crecimiento y el desarrollo de varias naciones del mundo. En l631 Don Juan de Vega, usó la infusión de la corteza de la quina para tratar de curar la malaria del conde de Chinchón, pero fue hasta 1880 que Laveran descubrió el agente etiológico, en 1889 Sajaron hizo la descripción detallada de *P falciparum* y un año más tarde Romanowski introdujo el método panóptico de coloración con azul de metileno y eosina al estudio de los plasmodios. Sin embargo, no fue hasta 1897 que Ross descubrió al transmisor del paludismo y más tarde, todos los estadios morfológicos de

la esporogonia que se desarrolla en el mosquito, se describieron gracias a los experimentos realizados por varios investigadores tales como, Bastieanelli, Gignami y Grassi.

El paciente contrae malaria cuando viaja a una región endémica. Sin embargo, también la puede adquirir por: transfusiones de sangre, el uso de agujas hipodérmicas contaminadas por prior uso, infecciones congénitas, y por transmisión por mosquitos nativos que adquieren el parásito de infecciones importadas.

En los países africanos, la malaria ocasiona el 90% de las muertes. Si bien, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades describe de 1.5 a 2.7 millones de nuevos casos de malaria cada año, el número actual puede ser mucho mayor dado que la enfermedad frecuentemente no se diagnostica o se confunde con otras enfermedades que comparten sintomatología (Shore, 2001).

La prevención de la malaria es difícil, puesto que los parásitos han desarrollado resistencia a la mayoría de las drogas antipalúdicas disponibles. La secuenciación total del genoma tanto del *Plasmodium* como del humano constituyen la base para la genómica y la proteómica, de esta forma se forman grupos de científicos que desarrollarán en los próximos años el análisis de secuencias blanco para incrementar la respuesta inmunológica y con ello el desarrollo de vacunas efectivas, como para el desarrollo de fármacos más eficaces y que no generen resistencia.

3.2 Clasificación taxonómica del Plasmodium

Phyllum: *Apicomplexa* (una sola célula)

Clase: *Sporozoea* (carecen de organelos de locomoción)

Subclase: *Coccidia*

Familia: *Plasmodiídae*

Género: *Plasmodium*

3.3 Ciclo biológico

El vector de la malaria es el mosquito hembra *Anopheles*, cuando el vector toma su alimento sanguíneo, los esporozoitos presentes en las glándulas salivales del mosquito se introducen en la corriente sanguínea del humano y se dirigen al hígado, ahí penetran a los hepatocitos y proliferan, lo que inicia el ciclo preeritrocítico o exoeritrocítico. Los esporozoitos se dividen repetitivamente y generan un gran número

de merozoitos exoeritrocitarios. Cuando los eritrocitos infectados no se eliminan por el sistema inmune o por terapia, el número de parásitos en los eritrocitos se incrementa de nuevo junto con los síntomas clínicos, a esto se le llama recrudescencia.

Los parásitos que se encuentran en los eritrocitos se alimentan de hemoglobina, el merozoito (o trofozoito joven) forma un anillo. Cuando los núcleos del trofozoito empiezan a dividirse, proceso que se denomina esquizogonia, los trofozoitos maduran y se desarrollan los merozoitos que se liberan al torrente sanguíneo. El sistema inmune destruye muchos de los merozoitos, pero otros invaden a eritrocitos sanos, en los cuales se inicia nuevamente el ciclo eritrocítico. Después de varias divisiones, parte de los merozoitos maduran a gametocitos femeninos y masculinos. Las formas sexuales y asexuales solamente se presentan en el ciclo eritrocítico. Si los gametocitos se ingieren por el mosquito, maduran en gametos dentro del intestino del mosquito. Los microgametos masculinos sufren una división nuclear por un proceso llamado exflagelación, en el cual el microgametocito se rompe fuera del eritrocito, comienza a moverse y penetra el macrogametocito femenino, lo que genera el zigoto, que madura y se transforma en el oocineto. Este estado migra al intestino medio del mosquito donde se genera el oocisto En un tiempo que varía de unos pocos días a 2 semanas el oocisto madura con la formación de cientos de esporozoitos mismos que se liberan dentro del hemocele y se distribuyen por el cuerpo, algunos se dirigen hacia las glándulas salivales. Cuando el mosquito toma su siguiente alimento sanguíneo, inocula a los esporozoitos junto con la saliva dentro del huésped (Zaman, 1996).

3.4 Patogenia y patogénesis

Los síntomas y los signos se deben a las formas asexuales del parásito, las cuales invaden y destruyen a los eritrocitos, lo que induce la síntesis de muchas citocinas proinflamatorias, como IFN-γ, IL-1β y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) entre otras. El esporozoito inyectado por el insecto, los parásitos exoeritrocitarios, y las formas sexuales del parásito no causan la enfermedad clínica (Kumar y Miller, 1990).

La invasión es un proceso altamente específico, ordenado y secuencial que se completa en 30 segundos. En la infección con *P. falciparum* el eritrocito se une a las proteínas de superficie del merozoito (MSP-1 y MSP-2), mientras que en la infección por *P vivax*, está involucrado el antígeno Duffy del eritrocito.

La citoadherencia: es el proceso mediante el cual las células infectadas maduran adheridas específicamente a las células endoteliales dentro de las venúlas pos

capilares, juega un papel central en la patogénesis de la malaria ocasionada por *P. falciparum* debido a la localización de las formas maduras de los parásitos en órganos como el cerebro. Además, la citoadherencia de parásitos maduros: evita su transporte hacia el bazo, que es el sitio ideal para su destrucción y permite una reducción en la tensión de oxígeno lo que favorece el crecimiento del parásito. La citoadherencia del parásito conduce a la obstrucción microvascular, también sirve para localizar los efectos de las toxinas parasitarias que activan a las células endoteliales, lo que genera la liberación de citocinas. Los eritrocitos que contienen los estadios más maduros del parásito unen eritrocitos no infectados a su superficie lo que origina rosetas que pueden ocasionar obstrucción microcirculatoria (Sherman, 1998).

Toxinas parasitarias y citocinas: el incremento en la producción de diversas citocinas proinflamatorias como el TNF-α, durante un episodio febril, coincide con la ruptura de un eritrocito infectado con equizontes lo que libera pirógenos endógenos como la IL- 1β,

3.5 Cuadro clínico

La malaria es una enfermedad febril, pero las características clínicas pueden variar enormemente porque los eritrocitos parasitados circulan por órganos y tejidos del cuerpo y por lo tanto pueden producir una amplia variedad de patologías. En las regiones endémicas las manifestaciones más severas se presentan en niños con malaria cerebral quienes presentan convulsiones, y anemia severa, mientras que los adultos desarrollan fallas en diferentes órganos como daño renal y esplenomegalia. La anemia es normocítica con Hb <4g/dL. Se puede presentar trombocitopenia (<100,000 plaquetetas/μL) y en las formas más graves de la enfermedad se observa una leucocitosis periférica. Se pueden elevar los valores de: la creatinina, la bilirrubina y las enzimas séricas como la: aminotransferasa y 5'nucleotidasa. Los pacientes graves suelen tener acidosis. Tanto en el adulto como en el niño, las concentraciones de ácido láctico en la sangre y el líquido cefalorraquideo están elevadas de forma proporcional con la gravedad de la enfermedad. La malaria cerebral ocasiona somnolencia y coma en unas cuantas horas, se puede desarrollar parálisis nerviosa craneal (OMS, 2000).

3.6 Diagnóstico

El diagnóstico clínico es difícil dado que la malaria comparte sintomatología con diversas infecciones que van desde fiebre tifoidea, septicemia, meningitis, dengue y otras infecciones por virus como la hepatitis y la encefalitis vírica (la rabia). El diagnóstico parasitológico se realiza en frotes de sangre periférica en gota gruesa o en extensión fina que revelan la presencia del parásito. La gota gruesa es más útil que la extensión para detectar una parasitemia de baja densidad. La presencia del pigmento palúdico en los leucocitos polimorfonucleares, es un indicio útil para el diagnóstico de paludismo. El diagnóstico definitivo de malaria se realizaba por examen microscópico en una extensión de sangre teñida con Giemsa. Sin embargo, esta técnica requiere la revisión minuciosa de muchos campos para no dar por negativa una muestra que es positiva, la tienen que realizar personas expertas y altamente capacitadas, además no siempre se puede hacer un diagnóstico diferencial de la especie, en particular en infecciones con mezclas de plasmodios porque la especie en mayor cantidad puede enmascarar a la de menor número en la muestra, frecuentemente resulta tediosa cuando se tienen que examinar decenas de frotes. Por lo anterior, se han aprovechado las secuencias únicas de cada especie de *Plasmodium* para diseñar métodos de biología molecular que sean sensibles y precisos para desarrollar el diagnóstico (Shore, 2001).

El diagnóstico molecular se puede realizar con técnicas de RFLP (del inglés Restriction Fragment Length Polimorphisms), sin embargo, se requieren varios días para conocer el resultado, por eso se desarrolló una alternativa más rápida y con mayor sensibilidad para el diagnóstico que utiliza la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, se han descrito las variantes en nido y multiplex que proporcionan información sumamente valiosa cuando existen problemas morfológicos para identificar la especie del parásito con una sensibilidad extrema. La técnica de PCR puede detectar parásitos de malaria utilizando unos cuantos microlitros de sangre en pacientes con un diagnóstico negativo por microscopía. La mayor ventaja es detectar e identificar a nivel de especie con un 100% de especificidad e igual sensibilidad. Esta técnica es particularmente útil para estudios de variación en cepas, mutaciones y estudios de genes de parásitos involucrados en la resistencia a drogas (Snounou, et al, 1993).

3.7 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa causó una minirevolución en la biología molecular. La PCR es un método *in vitro* para la síntesis de ADN por la cual un segmento particular de ADN se puede amplificar específicamente. Para realizar la

técnica, se requiere de dos oligonucleótidos (oligos) o iniciadores que flanquean el fragmento de ADN que se va a amplificar, alineándose a sus secuencias complementarias. Estos iniciadores hibridan con las cadenas opuestas a la secuencia blanco y se orientan para que exista unas síntesis de ADN en la región entre los dos oligonucleótidos. Seguida de la primera extensión, las cadenas se desnaturalizan y los oligonucleótidos se alinean nuevamente a su secuencia complementaria, lo que permite que la síntesis de ADN ocurra de nuevo. Estos ciclos de desnaturalización, alineación y extensión se repiten de 25 a 35 veces.

Kary Mullis de la compañía Cetus Corporation en 1985 inventó la técnica de PCR. Mullis originalmente uso el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I para el primer paso de extensión en sus primeras reacciones de PCR, ya que el fragmento Klenow es inestable a altas temperaturas, se tenia que adicionar nueva enzima en cada ciclo de la reacción de PCR, así que él y David Gelfand, también de Cetus, remplazaron la enzima Klenow con la polimerasa *Taq*, la cual posee una temperatura óptima de 72°C y proviene de la bacteria *Themophilus aquaticus*, puede soportar altas temperaturas sin significar una pérdida de la actividad y permanecer activa a través de los ciclos de la reacción de PCR. La *Taq* mejora el procedimiento ya que no se tiene que adicionar nueva enzima en cada ciclo. Se requieren temperaturas de 72°C para la síntesis de ADN lo que incrementa la astringencia y por lo tanto minimiza la extensión de los iniciadores que se unieron de forma inespecífica con el templado (Ausubel et al, 1995).

3.7.1 Los detalles de la técnica.

La técnica de PCR se basa en la repetición de ciclos en los que se utilizan distintas temperaturas; la de desnaturalización a 94-97°C; la de alineación de los iniciadores a 55-72°C y la temperatura de extensión de la *Taq* ADN polimerasa por el extremo 3’ del primer a 72°C. Esta técnica realiza de 25 a 45 ciclos. La amplificación de los productos es una acumulación exponencial, 2^n, de la secuencia blanco específica, donde n es el número de ciclos. El producto que se obtiene aparece como una banda cuando se examina en un gel de agarosa después de realizar la electroforesis. Cada molécula del producto de PCR tiene terminación 5’, del iniciador que se adhirió en el primer ciclo. El

número de moléculas blanco que se utilizan como templado es importante para determinar el número de ciclos. Eventualmente, la amplificación de los productos ya no se realiza de manera exponencial, ya que se alcanza una meseta y entonces no se generan nuevos productos. Una de la razones de esta meseta puede ser el agotamiento de la enzima porque después de varios ciclos la enzima pierde actividad (Luque, 1995; Persing, 2004; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 1985).

3.7.1.1 La desnaturalización.

Durante este paso el ADN de doble cadena se desnaturaliza a ADN de una cadena sencilla, esto se logra al incubar al ADN por 1-3 minutos a 94°C. Si la desnaturalización no se completa el ADN puede renaturalizarse rápidamente. Cuando el tiempo y la temperatura son demasiado altos la actividad de la *Taq* puede disminuir. La enzima tiene una vida media de aproximadamente 2 horas, 40 minutos y 5 minutos a 92.5, 95 y 97.5°C, respectivamente.

3.7.1.2 Alineación del iniciador

Los oligonucleótidos iniciadores (oligos) pueden ser de 18 a 30 nucleótidos de longitud, 50-60% G+C, y si es posible la T_m(°C) debe ser la misma para ambos oligos. En la elección de la secuencia de un oligonucleótido, es importante evitar la complementariedad en el extremo 3' de los iniciadores porque así se evita la formación de artefactos que forman dímeros de oligos, también se deben evitar secuencias palindrómicas. Es importante usar 5°C por debajo de la T_m de los oligos para la temperatura de alineación. La T_m de los iniciadores se puede calcular con la formula empírica: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$. Debido a que la *Taq* polimersa es activa en un amplio espectro de temperaturas, es posible usar la misma temperatura para alinear y extender el oligo.

3.7.1.3 Extensión del iniciador.

Durante este paso, la ADN polimerasa *Taq* extiende la cadena de ADN desde el extremo 3' de los oligos alineados. El tiempo que invierte la *Taq* para incorporar un nucleótido a 72°C se estima que varía de 35 a 100 nucleótidos por segundo dependiendo de: la base, el amortiguador, el pH, la concentración de sal y el ADN molde. El tiempo de extensión del oligo o primer es de 1 min a 72°C pero podría ser mayor, lo suficiente para producir productos de hasta 2 Kb de longitud (Figura 26).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**102/330**

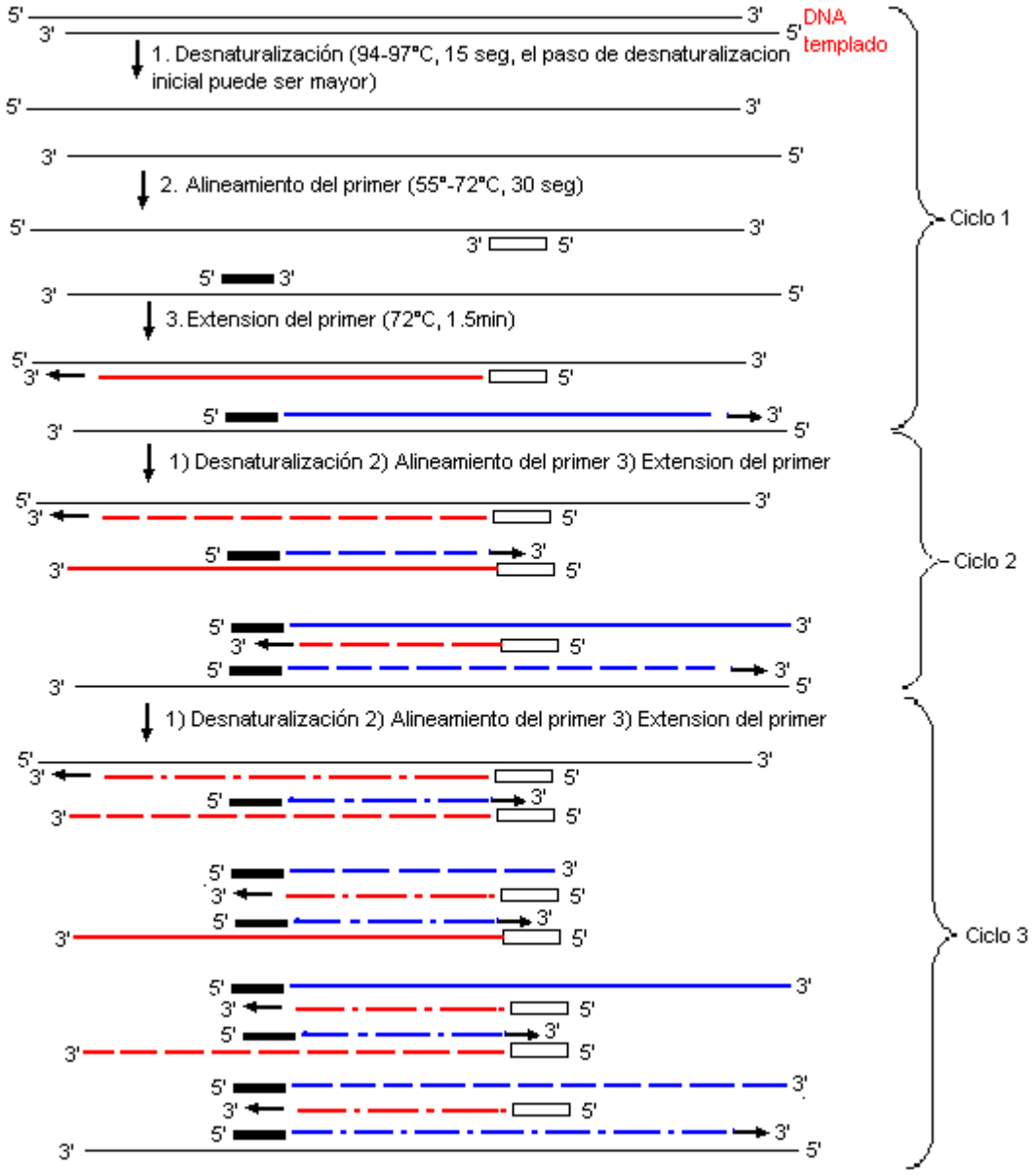


Figura 26. Representación esquemática del fundamento de la técnica de PCR.

3.7.1.4 Optimización de la PCR.

No existen las condiciones de reacción que sirvan para todas las amplificaciones, por lo que se deben establecer de forma experimental para cada caso. Los elementos de mayor importancia para obtener un resultado satisfactorio son: la concentración de magnesio, la temperatura y el tiempo de la alineación, la concentración de la enzima y la concentración de los desoxinucleótidos trifosfatos.

a) **La concentración del magnesio:** puede afectar a la unión de los iniciadores al ADN blanco, así como la especificidad de la reacción y la aparición de artefactos como por ejemplo dímeros de primers y perjudicar tanto la actividad como la fidelidad de la enzima. Las concentraciones de magnesio elevadas no son deseables, aunque se necesitan con ciertas combinaciones de oligos.

b) **La temperatura y el tiempo de alineación del iniciador al ADN:** dependen de la composición de bases de los oligos, del número de nucleótidos, de la longitud de los mismos y de la concentración. Estás condiciones se establecen experimentalmente para cada caso, pero se utiliza con buenos resultados una temperatura de 5 a 15°C inferior a la temperatura de fusión (T_m) de los oligos. El incremento en la temperatura de alineación aumenta la discriminación contra iniciadores inespecíficos y reduce la incorporación errónea de nucleótidos, esto aumenta la especificidad de la amplificación, por lo tanto los iniciadores que tengan de 30 a 40 nucleótidos tendrán T_m mas elevadas y darán mejores resultados en los casos con problemas de especificidad.

c) **La concentración de enzima**. Los requerimientos de enzima pueden variar con respecto a determinados ADN blanco o iniciadores. Las concentraciones de la enzima demasiado bajas producirán amplificaciones insuficientes, mientras que concentraciones demasiado altas pueden producir amplificaciones inespecíficas.

d) **Desoxinucleótidos trifosfatos.** Los cuatro desoxinucleótidos se deben usar a concentraciones equivalentes. Concentraciones elevadas o desequilibradas de nucleótidos tienden a aumentar la tasa de incorporación errónea de los nucleótidos durante la etapa de polimerización.

3.7.2 Procedimientos para minimizar la contaminación.

La principal característica de la técnica de PCR es la gran sensibilidad, que en algunos casos puede llegar a permitir la detección de una sola copia de ADN inicialmente presente en un tubo de ensayo, supone también la principal dificultad ya que necesita un cuidado extremo para evitar la aparición de falsos positivos, cuya fuente la constituye la contaminación cruzada entre muestras, los procedimientos para minimizar esta contaminación consisten en:

a) **La separación física de las manipulaciones anteriores y posteriores a las amplificaciones**. Para evitar la contaminación de las muestras por productos de amplificaciones anteriores es esencial que todo el manejo de las muestras y la preparación de las reacciones de amplificación se realicen en laboratorios separados. Ningún material debe desplazarse desde el área de material amplificado a la preparación de muestras.

b) **Colocar en alícuotas los reactivos.** Todos los reactivos en la técnica de PCR se deben preparar, alicuotar y guardar en un área que esté libre de productos de PCR. Hacer alícuotas de los reactivos evita abrir un mismo tubo varias veces, disminuyendo la probabilidad de contaminación. En caso de contaminación se deben tirar todas las alícuotas en uso.

c) **Establecer barreras al pipetear**. Una fuente de contaminación entre muestras se produce con el uso de pipetas automáticas. Aerosoles producidos durante el pipeteo de una muestra pueden contaminar la pipeta y de esta manera contaminar la muestra o muestras siguientes. Para evitar este problema se han diseñado pipetas automáticas de desplazamiento positivo que evitan esta contaminación por aerosoles. También da buenos resultados el uso de puntas con filtro, las cuales permiten usar las pipetas automáticas normales.

d) **Uso de técnicas de laboratorio muy meticulosas.** Para evitar la contaminación entre distintas muestras es también conveniente tener una serie de precauciones en el manejo de las muestras, Para ello se aconseja:

- Cambiar los guantes frecuentemente.
- Centrifugar brevemente los tubos antes de abrirlos.
- Destapar los tubos cuidadosamente para evitar aerosoles.
- Minimizar el manejo de las muestras.
- Añadir todos los componentes de la reacción antes de la adición de las muestras.

- Tapar los tubos después de la adición del DNA y antes de proceder con la muestra siguiente.

3.7.3 Métodos para aumentar la especificidad de la amplificación.

Otro de los problemas que pudiera tener la PCR son las amplificaciones inespecíficas, en general, se pueden disminuir e incluso evitar optimizando la temperatura de unión del iniciador y la concentración de magnesio, sin embargo estas medidas en algunos casos no son suficientes y se requiere de enzimas *Taq* que se activan a 92°C o bien se puede adicionar uno de los reactivos cuando ya se desnaturalizó el ADN (inicio caliente).

3.7.4 PCR Nested o "en nido".

Esta técnica se utiliza como estándar para la identificación de especies, está diseñada principalmente para incrementar la sensibilidad, la PCR "en nido" utiliza dos juegos de oligos para la amplificación, un juego se emplea para la primera ronda de amplificación, la cual consiste de 15 a 30 ciclos. Los productos de la primera reacción se someten a una segunda ronda de amplificación con otro juego de iniciadores específicos para la secuencia interna al primer par de iniciadores. La técnica de PCR "en nido" es sumamente sensible debido al enorme número total de ciclos. Esta variante es teóricamente más específica que la amplificación usando el mismo número de ciclos con un simple juego de iniciadores, porque el amplicón de la primera ronda de amplificación debe contener sitios de hibridación para el segundo juego de oligos lo que confirma la especificidad de la primera reacción de la PCR. La principal desventaja de la amplificación anidada es el alto riesgo de contaminación durante la transferencia de los productos de la primera ronda de amplificación al segundo tubo. Este paso puede evitarse con la separación física de las dos mezclas de amplificación con una capa de cera o aceite, o por el diseño del segundo juego de iniciadores con una temperatura de alineamiento sustancialmente mayor que el de la primera.

3.7.5 Visualización de los productos de PCR.

Los fragmentos de ácidos nucleicos de diferente tamaño pueden separarse mediante electroforesis a través de un medio semisólido como son los geles de agarosa o poliacrilamida, este método aprovecha la carga negativa de los ácidos nucleicos, lo que permite que se muevan hacia el ánodo a través del gel al aplicarse a éste una diferencia de potencial. La movilidad de una macromolécula de ácido nucleico dependerá fundamentalmente de: su tamaño, la concentración del gel, la conformación del ácido nucleico, la corriente aplicada al gel, la composición de bases y la temperatura.

3.7.6 Geles de poliacrilamida.

Se pueden preparar a varias concentraciones (desde 3.5% al 20%) según el tamaño de los fragmentos de ADN a separar. En su preparación se utiliza una solución de acrilamida/bisacrilamida al 30% que se mezcla con TBE 10X y agua para dar la concentración de acrilamida deseada, se añade persulfato de amonio al 10% y se adiciona el N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina (TEMED), se mezcla y se vierte inmediatamente en el molde que se habrá preparado anteriormente de la forma siguiente: dos cristales se superponen separados por dos tiras de plástico (espaciadores) de 1-2 mm de grosor. Se inserta el peine para formar los pozos y se deja polimerizar durante unos 60minutos. Cuando el gel ha polimerizado se retira el peine, se lavan los pozos con TBE 1X y se colocan las muestras, posteriormente se coloca la base dentro de la cámara con TBE 1X suficiente para que se cierre el circuito y se aplica el voltaje requerido. La visualización del ADN se realiza por tinción con bromuro de etidio durante 2 min y el resultado se detecta en un transiluminador de luz ultravioleta (Luque, 1995; Persing, 2004).

3.7.7 La técnica de PCR en la identificación de especies.

Los experimentos basados en la técnica de PCR representan la mayor ventaja de los laboratorios de diagnóstico de malaria, esta variante de PCR puede detectar 1 a 5 parásitos/µL de sangre (≤ 0.0001% de eritrocitos parasitados), ofrece la posibilidad de procesamiento de un gran número de muestras al mismo tiempo, y puede de manera ideal detectar infecciones de especies mezcladas, de hecho el uso de la técnica de

PCR ha revelado que las mezclas de infecciones existen con mayor frecuencia de lo que se creía, según diversos estudios, las infecciones con mas de un parásito están presentes en 6 a 19% de las muestras positivas por microscopía.

3.7.7.1. Detección de la especie de Plasmodium que afecta al humano.

Se requieren cinco pares de oligonucleótidos para la detección e identificación de las cuatro especies de *Plasmodium* que infectan al humano. El blanco de la amplificación de PCR son los genes que codifican para una pequeña subunidad ribosomal de ARN, ssrARN, estos genes consisten de regiones cuya secuencia esta conservada para el género *Plasmodium*, pero también existen regiones internas que contienen secuencias específicas para cada una de las especies. Estas diferencias se han explotado para diseñar oligonucleótidos género y especie específicos apropiados para la técnica de PCR (Snounou *et al*, 1993). En la reacción inicial de amplificación, el ADN purificado de la muestra se utiliza como templado para la amplificación de una gran porción de genes plasmodiales ssrRNA, de tal forma que si la muestra contiene al parásito *Plasmodium*, los oligos iniciadores rPLU5 y el rPLU6 que son género específicos promueven la amplificación del ADN de las cuatro especies. Para determinar la especie de parásito presente en la muestra, se utiliza el producto de amplificación de la primera reacción como templado para el Nest-2 en donde se preparan cuatro reacciones de amplificación, cada una de ellas con un par de oligonucleótidos específicos para cada especie. Los pares de iniciadores especie específicos para cada una de las reacciones subsecuentes, y el tamaño esperado de los productos de amplificación se indican en la Tabla 3.

Nombre del primer	**Detección de**	**Secuencia del primer 5' a 3'**	**Tamaño de los productos de la amplificación de PCR (pb)**
rPLU5 rPLU6	Genero *Plasmodium*	CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG	1200
rFAL1 rFAL2	Especie *falciparum*	TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC	205
rVIV1 rVIV2	Especie *vivax*	CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA	120
rMAL1 rMAL2	Especie *malariae*	ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA	144
rOVA1 rPLU2	Especie *ovale*	ATC TCT TTT GCT ATT TTT TAG TAT TGC AGA	Aprox. 240

Tabla 3. Secuencias y nombres de los iniciadores utilizados en la técnica de PCR en nido para la identificación de *Plasmodium* humanos.

3.7.7.2. Detección de las especie de Plasmodium que infectan al ratón.

Al igual que en la detección de plasmodios humanos, se utiliza una reacción de PCR en nido. Para la primera reacción se utiliza un juego de oligonucleótidos (ML-1 y ML-2) que amplifican la primera región variable del gen que codifica para la proteína merozoítica 1 (MSP1), se aprovechan las secuencias constantes de las regiones flanqueantes, lo que permite amplificar a los Plasmodiums murinos (P. chabaudi, P. vinckeii, P. yoelii 17XL). El producto de amplificación de esta primera reacción de PCR sirve como templado para la segunda reacción que amplifica una región interna a la primera y utiliza un segundo juego de iniciadores degenerados que permiten amplificar y generar polimorfismos de tamaño en los diferentes plasmodium lo que se aprovecha para su identificación en geles de poliacrilamida (Legorreta-Herrera, et al, 2004).

Nombre del oligo	Secuencia del oligo 5’ a 3’	Tamaño del amplicón (pb)
ML-1 **ML-2**	**GTG AAA TTC CTG AAC ATC TA AAA TTA ATG-** **ATG GGT AAC TAA TAC CAT TTG GAT AAC GT**	**427**
McK4 **McK5**	**CAA GCT ATG TAC AAT GTT ATA TT** **GCA ATT TCT TTA ATT TGA GCA TA**	**408**

Tabla 4. Secuencias y nombres de los iniciadores utilizados en la técnica de PCR en nido para la identificación de *Plasmodium* murinos.

Material y reactivos

Material Biológico

- Muestras de ADN humano infectado con: *Plasmodium ovale, Plasmodium vivax, Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae.*
- Ratones CBA/Ca Infectados con: *Plasmodium chabaudi* AS *y Plasmodium yoelii* 17XL.

Equipo

Equipo

Balanza Analítica

Balanza Granataria

Cámara de electroforesis

Congelador

Espectrofotómetro

Fuente de Poder

Incubadora de CO_2

Micro centrífuga

Microscopio

Refrigerador

Termociclador

Trans iluminador UV

Vortex

Reactivos

Reactivo	***Concentración***
Aceite Mineral	
Acetato de sodio	375 mM
Ácido Bórico	50 mM
Agua destilada	
Alcohol Isopropilico	
Ampli*Taq*	
Archilamida -*bis*Acrilamida	30%
Bromuro de etidio	10 mg/mL
Cloruro de Magnesio	
Cloruro de Potasio	500 mM
ADN *Taq*	
ADN *Taq* store Buffer B	10X
dNTP's	
EDTA	50 mM
Etanol Absoluto	
Flexi Buffer Green	5X
Flexi Buffer Incolorless	5X
Gelatina	1 mg/mL
Taq	
Metanol	

Mezcla Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico	25:24:1
Persulfato de Amonio (APS)	10%
Pronasa	
Saponina	10%
TEMED	
TRIS	pH 8.3 100 mM
TRIS	1 M

Servicios

Agua, energía eléctrica.

4. METODOLOGIA.

*4.1 Infección de ratones y parasitemia***.**

Dado que el objetivo principal de este trabajo es el conocimiento y manejo de las técnicas básicas de biología molecular, se infectaran ratones, para realizar las tomas de muestra y la respectiva extracción del ADN para su posterior amplificación con los oligos específicos para las especies de plasmodios murinos.

Una semana previa a la práctica, se infectarán un par de ratones con $5x10^4$ eritrocitos parasitados con *P. chabaudi* y otros dos ratones con $5x10^4$ *P.yoelii* 17XL. A partir del día 5 se tomarán frotes sanguíneos y se teñirán con Giemsa para analizar la parasitemia, el día de a práctica se extraerán 30 µL de sangre de la cola del ratón y se adicionarán a un tubo Eppendorf que contenga 450 µL de PBS, a partir de esta muestra se extraerá el ADN.

Para evaluar las parasitemias se observarán al microscopio, para establecer el porcentaje de eritrocitos parasitados se contarán un total de 200 eritrocitos (Figura 27).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**112/330**

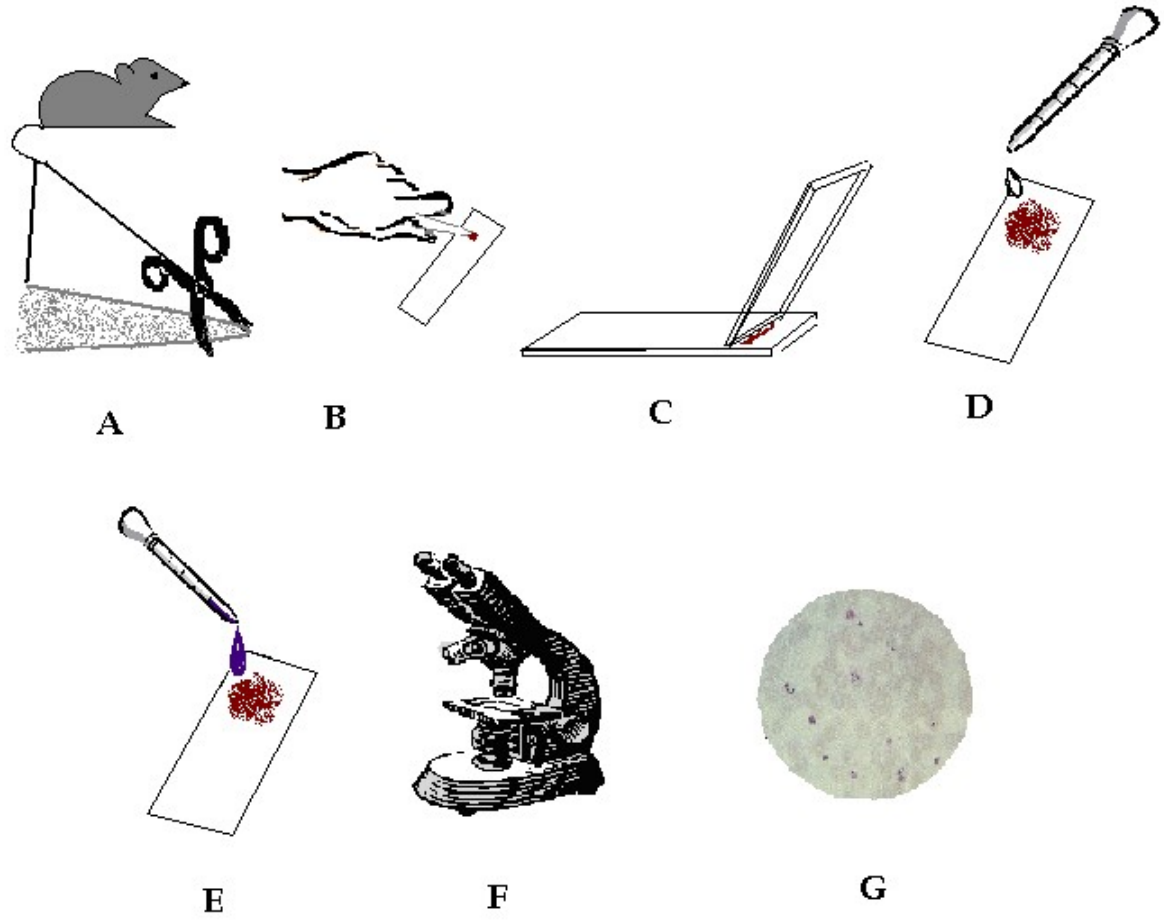


Figura 27. Metodología para evaluar de la parasitemia. A) Corte con tijera de una pequeña porción de la cola del ratón, B) depósito de una gota de sangre en el portaobjetos, C) extensión de la muestra sanguínea, D) fijar con metanol absoluto, E) tinción con Giemsa, F) observación al microscopio y G) aspecto de los eritrocitos parasitados.

4.2 Extracción de ADN

- Realizar una toma de muestra de aproximadamente 30 µL de sangre, y colocarlos en un tubo Eppendorff de 1.5 mL el cual contiene 450 µL de HSSB o PBS.
- Mezclar contenido del tubo y mantenerlo en hielo.
- Adicional 3 µL de saponina al 10% mezclar por inversión del tubo, hasta la lisis completa de los eritrocitos.
- Centrifugar a 7000 rpm por 15 min.
- Eliminar el sobrenadante con una pipeta, teniendo cuidado de no remover el botón.
- Resuspender el botón con 80 µL de amortiguador de lisis con pronasa (para preparar 1 mL de esta mezcla se colocan 980 µL del amortiguador de lisis y se le adicionan 20 µL de pronasa).
- Incubar a 37°C por 1h.
- Adicionar 320 µL de acetato de sodio a una concentración de 375 mM.
- Incubar nuevamente a 37°C por 1h.
- Adicionar 480µl de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y agitar vigorosamente en votex por 5 min.
- Centrifugar a 13000rpm por 15 min.
- Separar la fase acuosa en otro tubo Eppendorf de 1.5 mL evitando llevarse la fase inferior (orgánica).
- Colocar el mismo volumen de isopropanol y agitar suavemente.
- Permitir que precipite el ADN colocando el tubo en el congelador.
- Centrifugar a 13000rpm por 15 min.
- Eliminar el sobrenadante evitando tocar la zona donde se encuentre el botón.
- Colocar una capa de parafilm sobre la boca del tubo y perforarla con una aguja estéril.
- Dejar secar al aire toda la noche, evitando cualquier tipo de contaminación.

- Adicionar la cantidad de agua necesaria de acuerdo al tamaño del botón obtenido para cada tubo.
- Una vez hidratado el ADN se puede almacenar a -20°C hasta su uso.

NOTA: Utilizar guantes durante todo el procedimiento para evitar contaminaciones con nucleasas que puedan degradar al ADN (ver anexo-1).

4.3 Amplificación por PCR.

Antes de iniciar la amplificación, el alumno debe diseñar su experimento para lo cual registrará en su libreta cada uno de los reactivos que constituyen las mezclas de reacción, las muestras que va a amplificar y de esa forma etiquetará los tubos de reacción con el número que le asignó y la fecha de la amplificación (ver anexo-2 y anexo-3).

4.3.1 Amplificación por PCR en nido a las especies de Plasmodium que afectan al humano.

Las cantidades en la tabla establecen los µl que utilizará para una reacción, si se requiere que prepare más de una reacción únicamente multiplique el número de reacciones por los µL. Se prepara una mezcla maestra y posteriormente se realizan alícuotas de 19µL en cada tubo de reacción. Se recomienda hacer 1-2 reacciones de más para utilizarlas como un blanco de reactivos.

NEST-1

1ª Amplificación género específica utilizando el juego de oligos rPLU5+rPLU6

Concentración del reactivo	Reactivo	Concentración para 1 reacción	µL para 1 reacción
10X	Amortiguador de PCR	1X	2 µL
25 mM	$MgCl_2$	2 mM	1.6 µL
5 mM	dNTP's	125 µM	0.5 µL
25 µM	rPLU5 + rPLU6	125 nM	0.1 µL
5U/µL	enzima Ampli*Taq*	0.4 U/µL	0.08 µL
	Agua		14.72 µL
		Volumen Total	19 µL

NOTA: Realizar la Mezcla de reacción en condiciones estériles de preferencia en una campana de flujo laminar, adicionar a cada tubo 50 µL de aceite mineral y fuera de la campana adicionar 1 µL del ADN a amplificar para completar un volumen total de 20 µL por reacción.

PROGRAMA PARA LA AMPLIFICACIÓN NEST-1 EN EL TERMOCICLADOR

Paso 1	95°C	por	5 min	Desnaturalización inicial
Paso 2	58°C	por	2 min	Alineación
Paso 3	72°C	por	2 min	Extensión
Paso 4	94°C	por	1 min	Desnaturalización
Paso 5	Repetir los pasos 2 al 4 25 veces			
Paso 6	58°C	por	2 min	Alineación final
Paso 7	72°C	por	5 min	Extensión final
Paso 8	20°C	La reacción finalizó.		

NEST- 2

2ª Amplificación especie específica utilizando el juego de oligos específicos para cada especie

Concentración del Stock	Reactivo	Concentración para 1 reacción	µL para 1 reacción
10X	Amortiguador de PCR	1X	2µl
25mM	$MgCl_2$	2 mM	1.6µl
5mM	dNTP's	125 µM	0.5µl
25µM	Primer específico	125 nM	0.1µl
5U/µl	Enzima Ampli*Taq*	0.4 U/µL	0.08µl
	Agua		14.72µl
		Volumen Total	19µl

NOTA: Realizar la Mezcla de reacción en condiciones estériles de preferencia en una campana de flujo laminar, adicionar a cada tubo 50µl de aceite mineral y afuera de la campana **adicionar 1µL de la Nest-1 para completar un volumen total de 20 µL** se debe tener cuidado de transferir la alícuota al tubo marcado previamente.

PROGRAMA PARA LA AMPLIFICACIÓN NEST- 2 EN EL TERMOCICLADOR

Paso 1	95°C	por	5 min	Desnaturalización inicial
Paso 2	58°C	por	2 min	Alineamiento
Paso 3	72°C	por	2 min	Extensión
Paso 4	94°C	por	1 min	Desnaturalización
Paso 5	Repetición de los pasos 2 al 4 un total de 25 veces			
Paso 6	58°C	por	2 min	Alineación final

Paso 7	72°C	por 5min	Extensión final
Paso 8	20°C	La reacción finalizó	

NOTA: Utilizar geles de acrilamida al 5% y dejar correr 1hora y 30 minutos a 180V

5.4.2 Amplificación de los Plasmodiums murinos P. chabaudi y P. yoelii 17XL.

Se procederá de igual forma que para la amplificación de las secuencias de los plasmodios de humanos, antes de iniciar la amplificación etiquetar los tubos y registrar en su libreta las muestras que amplificarán, la fecha, la cantidad de cada uno de los reactivos utilizados y el programa que utilizó en el termociclador.

AMPLIFICACIÓN POR PCR ANIDADA PARA PLASMODIOS MURINOS

1ª Amplificación género específica utilizando el juego de primers ML1 + ML2

Concentración del Stock	Reactivo	Concentración para 1 reacción	µl para 1 reacción
10X	Amortiguador de PCR	1X	2 µL
25mM	$MgCl_2$	1.9 mM	1.5 µL
5mM	dNTP's	200 µM	0.8 µL
20 µM	ML1+ML2	0.1 µM	0.1 µL
5U/µl	Enzima Ampli *Taq*	1 U/µL	0.2 µL
	Agua		14.4 µL
		Volumen Total	19 µL

NOTA: Preparar la mezcla de reacción en condiciones estériles de preferencia en una campana de flujo laminar, adicionar a cada tubo 50 µL de aceite mineral y fuera de la campana adicionar 1 µL del ADN a amplificar para completar un volumen total de 20 µL.

PROGRAMA PARA LA AMPLIFICACIÓN EN EL TERMOCICLADOR

Paso 1	94°C	por	5min	Desnaturalización inicial
Paso 2	60°C	por	2min	Alineamiento
Paso 3	72°C	por	2min	Extensión
Paso 4	94°C	por	1min	Desnaturalización
Paso 5	Repetición de los pasos 2 al 4 un total de 24 veces			
Paso 6	60°C	por	2min	Alineamiento final
Paso 7	72°C	por	5min	Extensión final
Paso 8	20°C La reacción finalizó			

2ª Amplificación género específica utilizando el juego de primers MCK4+MCK5

Concentración del Stock	Reactivo	Concentración para 1 reacción	µl para 1 reacción
10X	Amortiguador de PCR	1X	2µl
25mM	$MgCl_2$	1.9mM	1.5µl
5mM	dNTP's	200µM	0.8µl
2.5mM	MCK4+MCK5	100µM	0.8µl
5U/µl	Enzima Ampli *Taq*	0.5U/µl	0.1µl
	Agua		13.8µl
		Volumen Total	19µl

NOTA: Realizar la mezcla de reacción en condiciones estériles de preferencia en una campana de flujo laminar, adicionar a cada tubo 50µl de aceite mineral y fuera de la campana **adicionar**

1µl de la Nest-1 para completar un volumen total de 20 µL, se debe tener cuidado de transferir la alícuota al tubo propiamente marcado.

PROGRAMA PARA LA AMPLIFICACIÓN EN EL TERMOCICLADOR

Paso 1	94°C	por	5min	Desnaturalización inicial
Paso 2	59°C	por	2min	Alineamiento
Paso 3	72°C	por	2min	Extensión
Paso 4	94°C	por	45seg	Desnaturalización
Paso 5	Repetición de los pasos 2 al 4 un total de 29 veces			
Paso 6	59°C	por	2min	Alineación final
Paso 7	72°C	por	5min	Extensión final
Paso 8	20°C	La reacción finalizó.		

NOTA: Para resolver los productos de la reacción se deben utilizar geles de poliacrilamida al 3% y dejar correr las muestras por 2 horas durante 40 minutos a 180V.

5. RESULTADOS ESPERADOS

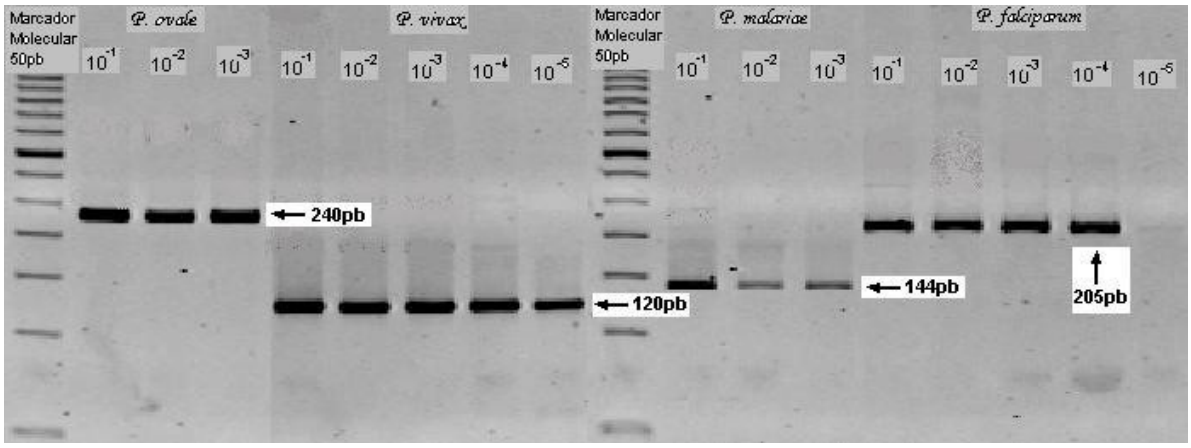


Figura 28. Detección por PCR anidada de plasmodiums humanos. Corrimiento electroforético en gel de acrilamida al 10% de los productos de PCR para las diluciones seriadas de *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. falciparum*.

6. CUESTIONARIO.

1) Escriba una definición de malaria
2) Describa 5 de los principales signos de la enfermedad
3) ¿Cuáles son las especies de *Plasmodium* que afectan al humano?
4) Describa el fundamento de la Reacción en cadena de la polimerasa.
5) Explique en que consiste la PCR en nido.
6) Describa 2 ventajas de la técnica de PCR sobre la microscopía.
7) Mencione el juego de primers utilizados para la primera amplificación de *Plasmodium* humanos
8) Mencione el tamaño (pares de bases) esperados para cada especie de *Plasmodium.*
9) ¿Cuáles son las condiciones óptimas para el corrimiento electroforético?
10) ¿Cuál es la región que se amplifica con los primers para los plamodiums de ratón?

7. MANEJO DE RESIDUOS

a) El material punzocortante (jeringas o agujas) empleado para la extracción de sangre se desechará en el contenedor rojo ubicado en el área de confinamiento de residuos.

b) Los sobrantes y desechos de sangre líquida o sus componentes se inactivarán con una solución de hipoclorito de sodio al 7% de cloro libre. Esta solución se adicionará a la sangre líquida o sus componentes para alcanzar una concentración final de cloro libre del 0.7%, se incubará a temperatura ambiente por 30 minutos y se verterá al drenaje.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Ausubel FM *et al.,* (editores) S*hort protocol in molecular biology.* 4a ed Wiley Publisherd. USA, 1999. p 15-1-15-7.

Breman JG. The ears of the hippopotamus: Manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. Am J Trop Med Hyg 2001; 64: 1-11.

Cancrini G, Lori A. Traditional and innovative diagnostic tools: when and why they should be applied. Parassitologia. 2004 46:173-176.

Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Programa de Ingeniería Genética, *Manual de técnicas básicas*, Madrid. 1985. p 23-27.

Jiménez C.F. *Control de Calidad en Parasitología*, Ed Prado, México, 2006, p 56- 64.

Kumar S & Millar LH. Cellular mechanisms in immunity to blood stage infection. Immunol Lett 1990; 25:109-114.

Legorreta-Herrera M, Ventura-Ayala ML, Licona-Chávez RN, Soto-Cruz I & Hernández-Clemente FF. Early treatment during a primary malaria infection modifies the development of cross immunity. Parasite Immunol 2004 26:7-17.

Luque F. *Técnicas de Inmunología molecular*. Oxford Press, England, 1995, p371-383.

OMS, *Tratamiento del Paludismo Grave, Guía Práctica*. 2ª edición. Servicios Gráficos OMS. Malta. 2000. p 46-48.

Persing D.H. (Editor) et al *Molecular Microbiology Diagnostic Principle and Practice*. AMS Press. USA. 2004. p 48-51, 603-614.

Sherman I. W. (Editor). Malaria *Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection. American Society for Microbiology.* USA. 1998, p401-452.

Shore G.L. *Diagnostic Medical Parasitology*, 4ª edición, ASM Press, USA, 2001, p 159-192.

Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. Inter J Parasitol. 1997 27:1135-1145.

Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S & Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. Mol Biochem Parasitol. 1993 61:315-320.

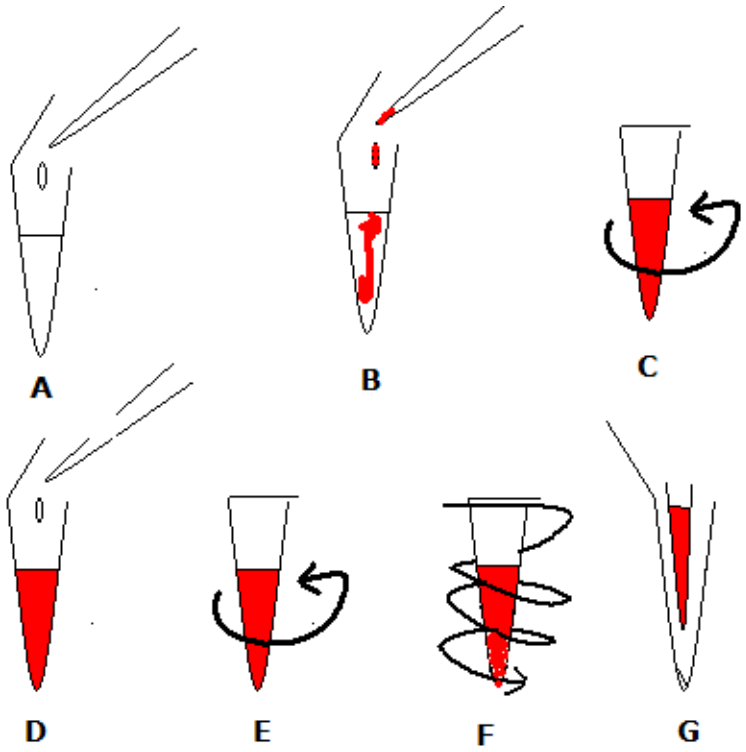
Zaman, V. *Atlas color de Parasitología Clínica, Un atlas de protozoarios, helmintos y artrópodos más importantes, la mayoría de ellos en colores,* 2ª ed. Editorial Médica Panamericana, Argentina, 1996, p 93-113.

Zarlenga DS, Higgings J. PCR as diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. Vet Parasitol 2001 101:215-230.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**122/330**

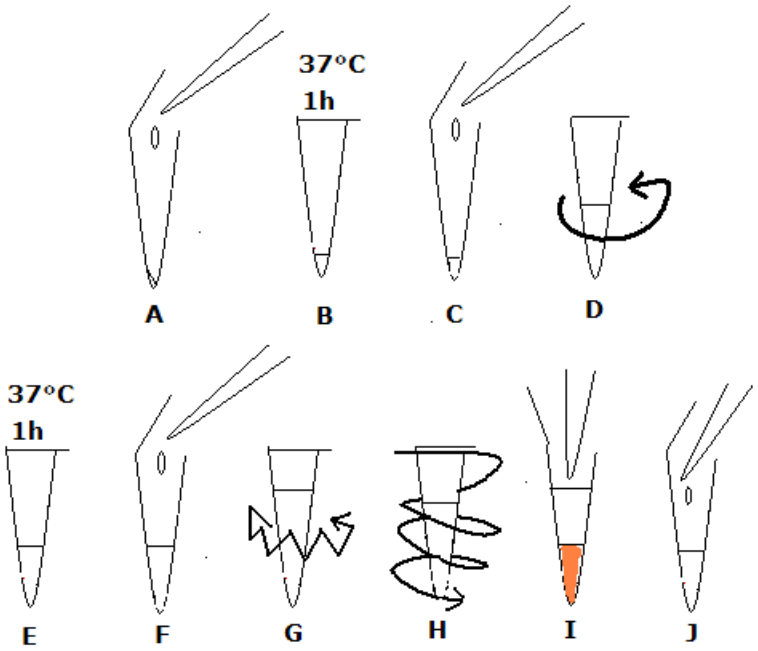
9. ANEXOS

9.1 Anexo-1 Extracción de ADN.



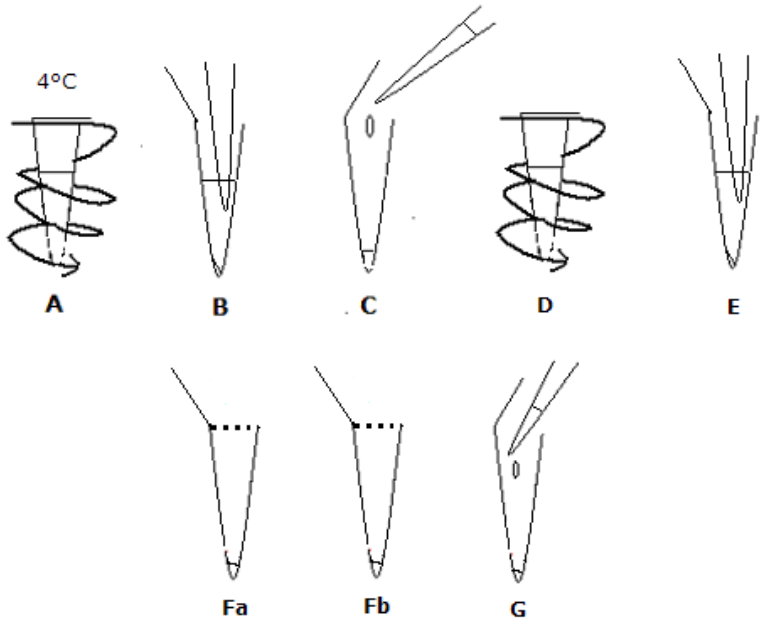
PRIMEROS PASOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS DE SANGRE PARASITADAS CON LAS DISTINTAS ESPECIES DE *PLasmodium*
A) Tubo eppendorf con 450 µL de HSSB en hielo, **B)** Adicionar muestra de sangre, **C)** Agitar ligeramente para evitar la coagulación, **D)** Adicionar 2µL de saponina, **E)** Agitar hasta obtener una solución traNslucida, que indica lisis completa de los eritrocitos, **F)** Centrifugar a 7000 rpm por 5min, **G)** Eliminar el sobrenadante evitando tocar el botón.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**123/330**



ÚLTIMOS PASOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN A) Resuspender el botón con 80µl de solución de lisis con pronasa, **B)** Incubar a 37°C por una hora, **C)** Adicionar 320 µL de acetato de sodio 375 mM a pH 5.5, **D)** Agitar perfectamente **E)** Incubar a 37°C por una hora, **F)** Adicionar 480 µL de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, **G)** Agitar con vortex por 5 min mínimo, **H)** Centrifugar a 13000 rpm por 15 min, **I)** Separar la fase acuosa en otro nuevo tubo Ependorf, **J)** Adicionar el mismo volumen de isopropanol**.**

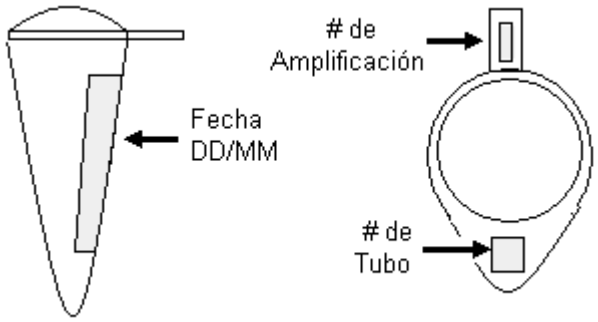
Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**124/330**



PROCEDIMIENTO PARA SECAR EL ADN OBTENIDO. A) Centrifugar a 14000 rpm por 15min las muestras que se encuentran con isopropanol de preferencia a 4°C, para favorecer la precipitación del ADN, **B)** Eliminar el sobrenadante evitando tocar el botón del precipitado. **C)** Adicionar 400 μL de Etanol frío al 80% en agua de DEPC. **D)** Centrifugar nuevamente a 4°C. **E)** Eliminar el sobrenadante, **Fa)** Cubrir con papel parafilm los tubos y con una aguja estéril hacerle orificios para que se evapore el etanol, por toda la noche, **Fb)** O bien, evaporar el etanol en el termociclador a 58°C. **G)** Una vez obtenido el ADN seco este puede conservarse de esta manera por mucho tiempo, o bien rehidratarse con agua suficiente dependiendo de la cantidad obtenida

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**125/330**

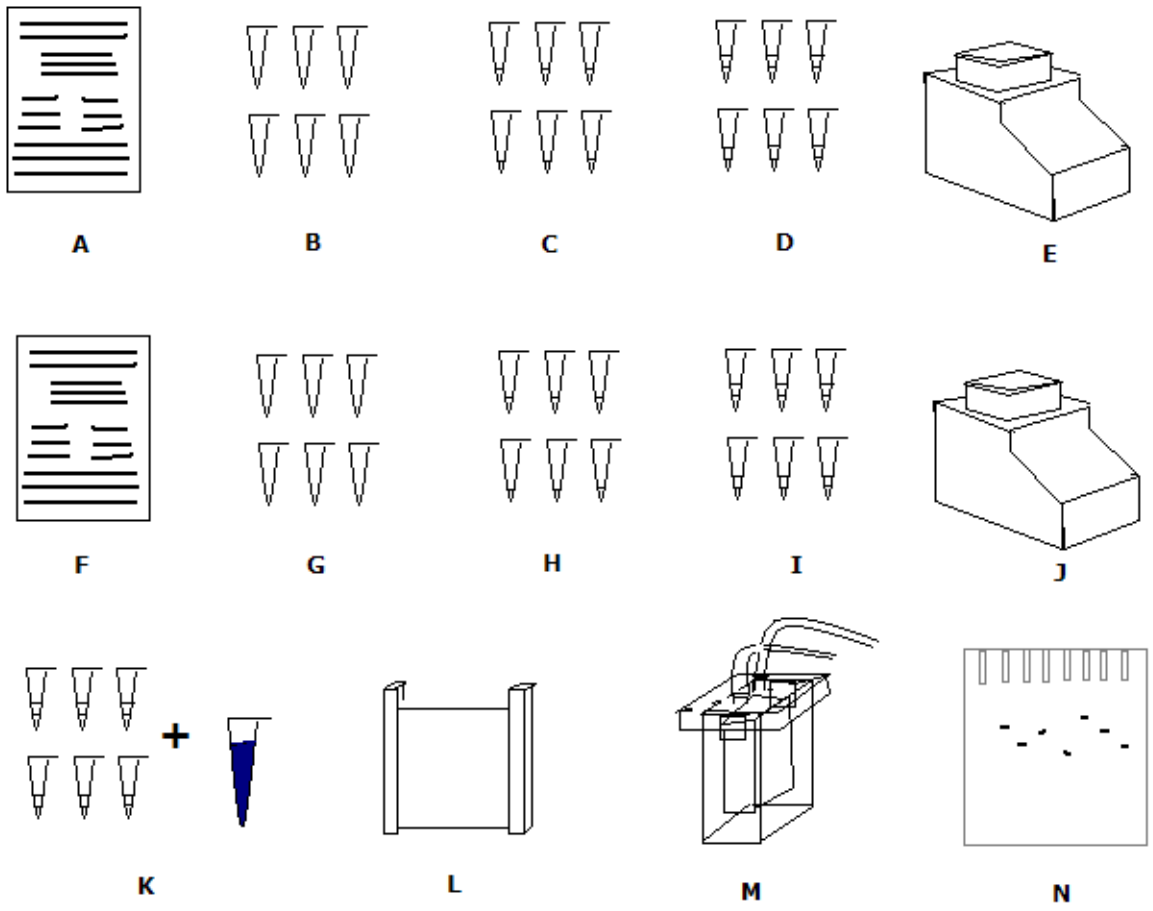
9.2 Anexo-2. Como etiquetar los tubos.



LUGARES RECOMENDADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS TUBOS.

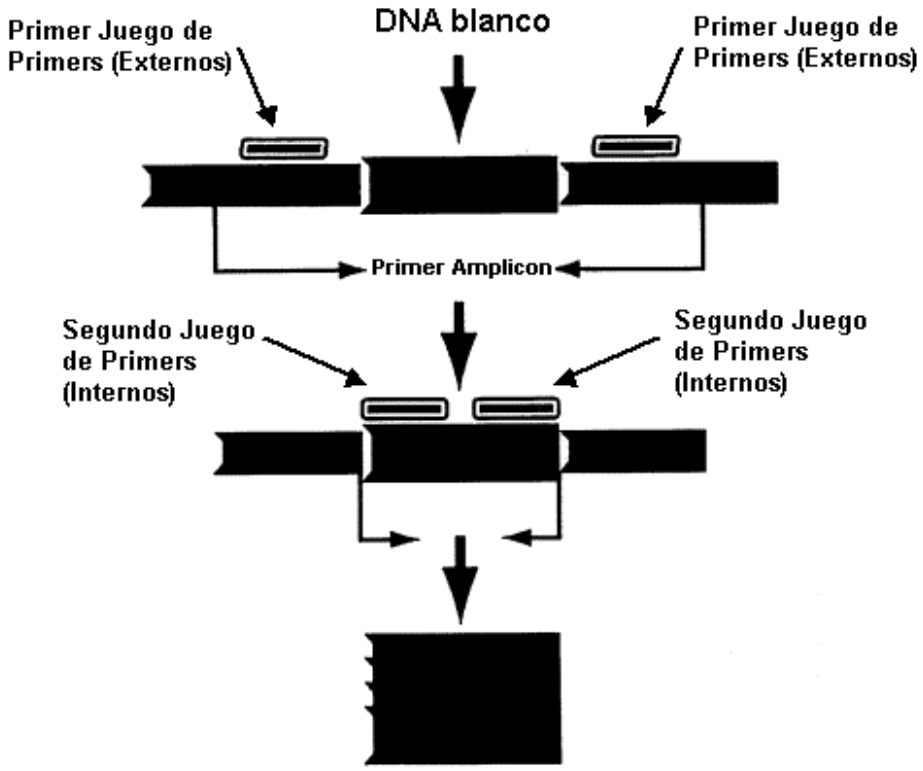
Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**126/330**

9.3 Anexo-3. Diagrama de la reacción de PCR variante Nest.



PCR NESTED (ANIDADA) A) Antes de iniciar, realizar los cálculos y diseñar la amplificación de las reacciones, así como registrar todos los procedimientos y etiquetado de los tubos para la primera amplificación de PCR Nest. **B)** Etiquetar y registrar los tubos de reacción. **C)** Depositar la mezcla maestra sin adicionar el ADN, **D)** Adicionar 50 μL de aceite mineral, y posteriormente las muestras de ADN que requiera cada tubo (esto fuera de la campana), **E)** Colocar los tubos en el termociclador en el programa correspondiente a cada oligo específico. **F)** Registrar los cálculos, los tubos para la segunda amplificación de PCR anidada,
G) Etiquetar y registrar bien los tubos, **H)** Montar las reacciones sin la muestra de la primera reacción, I. Adicionar 50 μL de aceite mineral y solo entonces adicionar 1 μL de la primera amplificación lejos de cualquier cuarto limpio de productos de

PCR. **J)** Colocar los tubos en el termociclador de acuerdo al programa requerido por el oligo específico. K**)** A los productos obtenidos ya sea de la primera o segunda amplificación se le agrega 10 μL de solución de carga, así como un tubo extra que contendrá un marcador de peso molecular. **L)** Todos los tubos de reacción que se separaran por electroforesis en gel, se deben registrar de manera que se puedan interpretar los resultados sin lugar a dudas. **M**) Aplicar el voltaje y correr la electroforesis aproximadamente una hora y media a 180V, **N)** Después de la electroforesis teñir con bromuro de etidio, enjuagar y eliminar el exceso de agua, colocar el gel en el trasiluminador y analizar los resultados.Anexo- 4. Fundamento para la técnica de PCR en nido.



Amplificación específica de DNA blanco

La PCR Nested consiste en hacer dos PCR's consecutivas. En la segunda se amplifica un fragmento interno del amplificado en la primera PCR. Los primers usados en la primera PCR son externos y los usados en la segunda son internos. Esté método no solo aumenta enormemente la especificidad de la amplificación, sino que también genera mayor sensibilidad, lo que permite detectar una sola copia de ADN blanco.

9.4 Anexo-5 Preparación de reactivos para la técnica de PCR.

Amortiguador de carga de PCR 10X con Mg

Concentración del Stock	Reactivo	Concentración Final en el tubo	mL's para 10mlde Amortiguador
2.5M	KCl	50 mM	2 mL
2M	TRIS pH 8.3	10 mM	0.5 mL
20mg/mL	Gelatina	0.1 mg/mL	0.5 mL
1M	$MgCl_2$	2 mM	0.2 mL
	Agua millipore		6.8 mL
		Volumen Total	10ml

NOTA: La gelatina se debe esterizar con autoclave y todos los reactivos deben estar estériles.

Acrilamida/ bis- acrilamida al 30%

Acrilamida	29 g
Bis- Acrilamida	1 g
Agua bidestilada c.b.p.	100 mL

NOTA: La acrilamida es neurotóxica usar guantes y cubrebocas para su manipulación.

Persulfato de amonio (APS) 10%

Persulfato de Amonio 10g

Agua bidestilada cbp 100 mL

NOTA: Preparar alícuotas de 500 µL y guardar en el congelador a -20°C

TBE 10X

TRIS	121.10 g
Ácido Borico	61.83 g
EDTA	14.61 g
Agua bidestilada cbp	1000 mL

Gel de acrilamida al 10% cantidades necesarias para preparar 5.0 mL (para un gel de 5 X 5 cm).

Agua bidestilada	3.32 mL
TBE 10X	0.5 mL
Acrilamida/bisacrilamida al 30%	1.66 mL
APS 10%	80 µL
TEMED	8.0 µL

ABREVIATURAS

A: adenina

ADN: ácido Desoxirribonucleico

bp: pares de bases

C: citosina

°C: grados centígrados

c.b.p: cuanto baste para

dNTP´s: desoxirribonucleótidos trifosfatados

dATP: desoxiadenosina trifosfato

dCTP: desoxicitosina trifosfato

dTTP: desoxitimina trifosfato

dGTP: desoxiguanidina trifosfato

DEPC: dietil piro carbonato

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

G: guanina

IFN-γ interferón gamma

IL-1β: Interleucina 1 beta

M: molaridad

mM: milimolar

µg: microgramo

µL: microlitro

rpm: revoluciones por minuto

TBE: Tris- Ácido Bórico- EDTA

TE: Tris-EDTA

TNF-α Factor de necrosis tumoral alfa

UV: Iuz ultravioleta

U/µL: unidad por microlitro

GLOSARIO

A

Ácido desoxirribonucleico (ADN). Molécula que contiene la información genética en los seres vivos. Está formada por dos cadenas de nucleótidos unidas por puentes fosfodiestér. Los nucleótidos participantes son adenina, citosina, guanina y timina.

Ácidos nucleicos: Moléculas constituidas por nucleótidos en las que reside la información genética; existen dos tipos: ADN y ARN

Adenina. Es una base nitrogenada con estructura purínica, componente de los ácidos nucleicos.

ADN complementario (ADNc): Molécula de ADN, copiada de un ARN mensajero o por medio de la transcriptasa inversa, debido a esto carece de los intrones presentes en el ADN genómico. La secuencia del ADN complementario permite que se pueda deducir el orden de aminoácidos de una proteína; la expresión del ADNc en una célula recombinante se puede utilizar para producir grandes cantidades de esta proteína *in vitro*.

ADN genómico: Secuencia de ADN que compone todo el genoma de una célula o un organismo.

ADN molde. Es el ADN que servirá para fabricar nuevas cadenas de ADN *in Vitro* (PCR).

ADN polimerasa: Enzima que sintetiza la cadena molde de ADN para hacer la cadena complementaria. De acuerdo a las reglas de Watson y Crick, los desoxoribonucleótidos se añaden uno la vez usando como sustrato desoxiribonucleótidos trifosfatados y liberando pirofosfato

Alineación. En el caso de la reacción de PCR, se refiere a la etapa en la que los iniciadores se unen por complementariedad al DNA molde. Por lo general esto se lleva acabo a una temperatura de 50 a 60°C.

Amplificación: Proceso por el cual fragmentos de DNA se pueden multiplicar Los procesos normales involucran técnicas como PCR ó clonación en organismos de reproducción rápida.

Apareamiento: Unión de un DNAc o RNA-DNA de acuerdo con las reglas de Watson y Crick, se une una citosina a una guanina y una adenina a una timina

ARN: polímero de ribonucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster, se forman por la transcripción del ADN o en algunos virus por la copia de una molécula de RNA molde. Existen tres tipos de ARN celulares ARN ribosomal, mensajero y de transferencia.

ARN mensajero: ARN que codifica el orden de los aminoácidos de una proteína. Se produce por la transcripción de ADN por la ARN polimerasa y en algunos virus a partir de RNA.

ARN polimerasa: Enzima que copia una cadena de ADN para formar una cadena de ARN complementaria, usando las reglas de apareamiento de Watson y Crick los ribonucleótidos se añaden uno a la vez usando como substrato ribonucleótidos trifosfatos y liberando pirofosfato.

ARN ribosomal (ARNr): Moléculas de ARN que forman parte estructural y funcional del ribosoma

B

Base. Corresponde a cada una de las cuatro unidades químicas que forman la doble hélice del DNA: adenina, guanina (purinas), citosina y timina (pirimidinas).

Biología molecular: Conjunto de técnicas que permiten el estudio de moléculas de nucleótidos, así, como la modificación de la expresión de proteínas y metabolitos.

Biotecnología: Toda aplicación tecnológica que utiliza recursos biológicos, organismos vivos y sus partes o sus productos para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos.

Blotting: Técnica bioquímica usada para detectar la presencia de macromoléculas específicas (proteínas, RNA o DNA) en una mezcla. La muestra se separa en un gel de agarosa o poliacrilamida generalmente en condiciones desnaturalizantes, el componente ya separado se transfiere a una membrana de nylon o nitrocelulosa, esta membrana se expone a una sonda que se une específicamente a la molécula de interés, después se localiza su ubicación por autorradiografía, quimioluminiscencia o anticuerpos.

C

Cadena molde de DNA. Secuencia de DNA que sirve para obtener cadenas complementarias de la misma.

Cebador: Oligonucleótido que contiene un grupo extremo 3´ libre que es complementario con una cadena molde de DNA y funciona como punto de inicio para la adición de nucleótidos para copiar la cadena molde en el PCR

Ciclo celular. Ciclo reproductivo de la célula, secuencia ordenada de eventos en la cual la célula duplica todos sus elementos para finalmente dar lugar a dos células idénticas.

Ciclo de amplificación. Período en la PCR que comprende tres cambios de temperatura: el de desnaturalización (92 a 96°C) del DNA, el de alineamiento de iniciadores (50 a 60°C) y el de amplificación o polimerización (70 a 74°C). Generalmente se emplean de 25 a 40 ciclos de amplificación de cada reacción de PCR.

Citosina. Base nitrogenada con estructura pirimidínica componente de los ácidos nucleicos.

Clonación (molecular) de DNA: Conjunto de métodos que permiten la incorporación y eventual amplificación, a través de la replicación repetida, de un fragmento específico de DNA en un organismo, y su eventual transferencia a su progenie. Esta técnica permite obtener una población o clona de organismos en donde todos ellos llevan una copia de la molécula original de DNA. Constituye uno de los procedimientos centrales de las técnicas de la ingeniería genética.

Complementariedad de bases. Es una característica del DNA que consiste en que las bases nitrogenadas de cada cadena no se unen al azar, sino que siempre los puentes de hidrógeno entre ambas cadenas de la doble hélice se forman entre adenina y timina o entre guanina y citosina, nunca en otro orden.

Composición de bases: Frecuencia en que se presentan los residuos de cada una de las bases dentro de la secuencia de los ácidos nucleicos.

Conjugación: Intercambio de DNA entre dos células bacterianas F^+ y F^-, El DNA pasa a través de un puente celular que une a ambas células.

Control genético: Mecanismos involucrados en la regulación de la expresión genética. Estos mecanismos pueden operar a varios niveles moleculares incluyendo la transcripción, el procesamiento del RNA, la estabilización del RNA y la traducción.

D

Desnaturalización: En proteínas es el rompimiento de enlaces no covalentes que resultan en el desplegamiento de la cadena polipeptídica; en los ácidos nucleicos, se refiere al rompimiento de enlace de hidrógeno entre bases, lo que provoca que las dobles cadenas se separen en moléculas de cadena sencilla. El calentamiento o la exposición a ciertos químicos produce la desnaturalización, normalmente esto lleva a la perdida de la función biológica. Renaturalización significa la unión por complementariedad nuevamente de las cadenas sencillas.

Desoxirribonucleótidos. Son moléculas formadas por una base nitrogenada (purínica o pirimidínica), una pentosa (desoxirribosa) y un grupo fosfato.

Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP). Bases nitrogenadas unidas a una molécula de desoxirribosa y tres moléculas de fosfato. Es la forma como la polimerasa de ADN puede reconocer a los nucleótidos para formar nuevas cadenas de DNA en el proceso de replicación o en la técnica de PCR.

Desoxirribosa: Azúcar de 5 carbonos que forma parte de los desoxirribonucleótidos en el ADN.

Diagnóstico genético: Metodología que permite, mediante el uso de sondas o detectores de ácidos nucleicos específicos, la identificación de secuencias específicas de DNA entre millones de ellas.

Didesóxido. Desoxirribosa carente del grupo OH^- libre de la posición 3´. Son los nucleótidos que se utilizan para realizar la secuenciación, ya que al introducir un didesóxido en la cadena creciente de ADN, se interrumpe la polimerización y de esta manera de obtienen cadenas de diferente longitud de ADN.

E

Electroforesis. Técnica que se emplea para separar moléculas cargadas eléctricamente con base en su velocidad de migración al someterse a un campo eléctrico. Las moléculas sometidas a electroforesis también se separan según su tamaño, de tal manera que las moléculas pequeñas tendrán mayor velocidad de migración que las moléculas más grandes.

Enzima de restricción: Enzima que reconoce y rompe secuencias pequeñas especificas dentro de la molécula de doble cadena del DNA (sitio de restricción). Estas

enzimas están ampliamente distribuidas en bacterias y se usan en técnicas de biología molecular.

Expresión genética: Proceso por el cual la información codificada en los genes se convierte en un fenotipo resultante.

F

Fragmentos de restricción: Fragmentos resultantes del rompimiento de una molécula de ADN con enzimas de restricción. Estos fragmentos se utilizan en la producción de moléculas de ADN recombinante, clonación de genes e identificación de especies.

G

Gen: Es la secuencia de DNA necesaria para la síntesis de un polipéptido funcional o una molécula de RNA. Además de las secuencias codificadoras muchos genes también contienen secuencias no codificables como los intrones y los reguladores.

Gen estructural: Secuencia de DNA que codifica para una proteína funcional.

Gen regulador: Gen que generalmente codifica una proteína de regulación ya sea un inhibidor o un promotor. Puede tratarse también de secuencias que permiten la unión de proteínas reguladoras, actúan activando, disminuyendo o modulando la transcripción de otros genes.

Guanina. Base nitrogenada purínica, componente estructural de los ácidos nucleicos.

H

Hibridación: Unión de dos cadenas de dos cadenas de ácido nucleico complementarias para formar una molécula de doble cadena, estas cadenas pueden contener dos moléculas de DNA, dos moléculas de RNA o una molécula de DNA y una de RNA. Aplicado a los ácidos nucleicos, significa su capacidad de encontrar o asociarse a la hebra opuesta o complementaria.

I

Iniciador. Secuencia de nucleótidos necesaria para que la polimerasa de ADN empiece la replicación.

Iniciadores externos. Son las secuencias de nucleótidos empleados para lograr la primera amplificación de una secuencia específica de ADN mediante PCR.

L

Ligasa: Enzima que une el final 3´ de una cadena de ácido nucleico con el extremo 5´ de otra cadena, lo que genera una cadena contínua.

Línea celular. Células que crecen y se replican indefinidamente *in Vitro* (fuera del organismo).

M

Mapa de restricción: Técnica que permite encontrar la secuencia de genes dentro de una molécula de ADN, la molécula de ADN se fragmenta con enzimas de restricción, cada fragmento se secuencia, después la molécula completa se fragmenta por la acción de otras enzimas de restricción y se secuencia nuevamente, los resultados obtenidos en ambos casos se comparan entre sí, de tal manera que se puede deducir la secuencia total de los genes.

Mutación. Cambio en la secuencia del ADN genómico que lo altera de manera permanente y provoca un cambio hereditario.

N

Northern blotting: Técnica empleada para detectar secuencias específicas de RNA por hibridación con una sonda de DNA en una membrana

Nucleósido: Molécula compuesta por una purina o pirimidina unidas a una pentosa que normalmente puede ser ribosa o desoxirribosa.

Nucleótido: Molécula compuesta por una purina o pirimidina unidas a una pentosa y a uno o más grupos fosfatos unidos por un enlace éster al residuo de azúcar. El ADN y ARN son polímeros de nucleótidos. Existen cinco bases nitrogenadas en los ácidos nucleicos de los seres vivos; tres de ellas guanina (G), citocina (C) y adenina (A) están

presentes en el ADN y el ARN. Además, en el ADN existe también timina (T) y en el ARN en lugar de timina esta el uracilo (U).

O

Oligonucleótidos: Molécula de ADN de bajo número (5 a 200) de nucleótidos. Se utilizan como sondas en sistemas de diagnóstico y como iniciadores en procesos de polimerización y amplificación de ADN, por técnicas de PCR.

P

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa): Técnica que permite la amplificación especifica de un segmento de ADN a partir de una mezcla compleja, utiliza varios ciclos de síntesis que realiza la enzima ADN polimerasa de *Thermophilus aquaticus* empleando oligonucléotidos específicos y una cadena molde de ADN. Seguidos por calentamiento para separar las cadenas complementarias y llevar a cabo un nuevo ciclo de síntesis.

Polimerasa de ADN. Es una de las enzimas que participan en la replicación celular llevando a cabo la unión de los nuevos desoxirribonucleótidos trifosfatos a la cadena de ADN creciente.

Polimerasa *Taq*. Abreviatura de la polimerasa de ADN proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus,* comúnmente utilizada en la PCR. Esta enzima tiene la característica de su actividad óptima a 72°C, por lo cual es ideal para ser utilizarse en la reacción de PCR.

Producto amplificado o amplicón. Millones de copias de un fragmento de DNA obtenidas a partir de un fragmento específico de ADN inicial mediante PCR.

R

Replicación: Copia de una molécula de polinucleótidos por medio de una polimerasa

Replicón: cuerpo de replicación formado por la ADN polimerasa y otras enzimas accesorias unidas a la molécula de ADN.

Ribosa: Azúcar que forma parte de los ribonucleótidos en el ARN.

S

Secuencia: Orden lineal de monómeros dentro de moléculas poliméricas, especialmente proteínas o ácidos nucleicos.

Secuenciación de ADN. La posición (secuencial) que guardan los nucleótidos, uno inmediatamente después del anterior, en el polímero de la hebra de la molécula de DNA. Existen varias metodologías para determinar la secuencia de los millones de nucleótidos en la molécula de ADN.

Secuenciación enzimática. Sirve para conocer el orden en que se encuentran los nucleótidos en un segmento de ADN determinado.

Sonda: Fragmento de ADN o ARN o anticuerpo marcado química o radioactivamente, se usa para localizar secuencias de nucleótidos o aminoácidos por hibridación.

Southern blotting: Técnica que se basa en el apareamiento específico de secuencias de ADN con una sonda unida a una membrana de nylon o nitrocelulosa, esto permite aislar y detectar secuencias específicas de ADN dentro de una mezcla compleja.

T

Temperatura de desnaturalización (Tm). Es la temperatura a la cual 50% del ADN se encuentra en forma de doble cadena y el otro 50%, en forma libre o cadena sencilla. Este parámetro de usa en la PCR para el cálculo se la temperatura de alineamiento de los iniciadores.

Termociclador. Instrumento en el que se realiza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Su función es llevar a cabo cambios rápidos y precisos de temperatura de una manera cíclica.

Timina. Base nitrogenada pirimidínica constituyente del ADN.

U

Uracilo: Una de las cuatro bases nitrogenadas que conforman los nucleótidos que integran el ARN. Existen millones de nucleótidos en una molécula de ARN.

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE GENÉTICA CLÍNICA

PARTE II

ÍNDICE **Página**

INTRODUCCIÓN

Práctica 5. Detección de deleciones en el cromosoma "Y" asociadas a la infertilidad masculina
Dra. Martha Legorreta Herrera
QFB. Sureyma Hernández Posadas

Práctica 6. PCR, ELISA y Western blot para la identificación de organismos transgénicos (toxina cry1ac de maíz)
Dra. Martha Legorreta Herrera
Dra Isabel Soto Cruz
Dra. Leticia Moreno Fierros
QFB. Rodrigo Oviedo Meza
QFB Osvaldo Daniel Castelán Martínez

Práctica 7. Detección del polimorfismo r230c del gen abca1, asociado con una mayor susceptibilidad al desarrollo de Diabetes mellitus tipo 2 y obesidad
Dra. Martha Legorreta Herrera
Dra. María Teresa Tusié Luna
M en C Fernando Hernández Clemente
QFB Osvaldo Daniel Castelán Martínez

Práctica 9. Detección de errores innatos del metabolismo
Dra. Martha Legorreta Herrera
QFB. Javier Parada García

Práctica 10. Cultivo de linfocitos y observación de cariotipo humano
Dra. Raquel Retana Ugalde
Dra. Martha Legorreta Herrera

Práctica 11. Identificación humana con fines e exclusión de paternidad
Dra. Martha Legorreta Herrera
QFB. María Lourdes Vega Navarrete
M en C. Catalina Machuca Rodríguez
Biol. Miguel Ángel León Tapia

ABREVIATURAS
GLOSARIO

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**140/330**

INTRODUCCIÓN DEL MANUAL DE GENÉTICA CLÍNICA

PARTE II

La secuencia del genoma humano nos ha brindado una vista holística de nuestra herencia genética. El refinamiento de los datos, será una fuente fundamental en la investigación biomédica en el futuro.

Los 46 cromosomas humanos (22 pares de cromosomas autosómicos y dos cromosomas sexuales) albergan casi 3 millones de pares de bases de ADN que contienen alrededor de 30,000 genes que codifican para proteínas específicas. Las regiones que codifican representan menos del 5% del genoma, y algunos cromosomas tienen una mayor densidad de genes que otras.

La mayoría de los desordenes genéticos son el resultado directo de una mutación en un gen particular. Sin embargo, uno de los problemas más difíciles por resolver es encontrar como es que los genes contribuyen al desarrollo de las enfermedades que tienen un patrón complejo de herencia, tal como la diabetes, el asma, el cáncer y enfermedades mentales. En todos estos casos, ningún gen tiene el poder absoluto para poder definir si una persona tiene una enfermedad o no. Es probable que se requiera más de una mutación antes de que la enfermedad se manifieste, y varios genes pueden contribuir con cierta susceptibilidad a desarrollar una enfermedad, los genes también pueden afectar como una persona reacciona a los factores ambientales. El esclarecimiento de esta serie de eventos representa un reto en el futuro próximo, y será de gran ayuda la disponibilidad de la secuencia del genoma humano.

En esta segunda parte del manual de prácticas para el Laboratorio de Genética Clínica proporcionamos al alumno la información y las herramientas metodológicas necesarias para que puedan detectar la presencia de genes que confieren susceptibilidad para el desarrollo de enfermedades. Se presenta el protocolo que permite al alumno cultivar linfocitos a partir de sangre periférica para la observación de cromosomas humanos y construir un cariotipo, lo que permite evidenciar aberraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales.

Con la técnica de PCR y algunas de sus variantes es posible detectar secuencias de genes asociados con susceptibilidad a desarrollar diabetes, el desarrollo de la técnica de PCR múltiple permite detectar microdeleciones en el cromosoma Y que están asociadas con infertilidad masculina. En contraste, también se utilizan pruebas cualitativas muy sencillas, que sirven como tamiz para detectar errores innatos del metabolismo en bebés o inclusive en adultos, dado que están fuertemente asociadas

con retardo mental. Además, se desarrollaron diferentes protocolos para detectar si un organismo está modificado genéticamente. Con este objetivo, establecimos las condiciones adecuadas para detectar la presencia de la proteína Cry1Ac en semillas de maíz por tres métodos diferentes. Por un lado, se obtuvieron anticuerpos policlonales de conejo inmunizados con la proteína Cry y se establecieron las condiciones para detectar la presencia de la proteína en lisados de ápices de germinados de semillas de maíz mediante inmunoblot, también se desarrollo el protocolo de ELISA y finalmente, se diseñaron primers para una región de la proteína Cry que permitieron detectar este transgen en el ADN obtenido a partir de semillas de maíz.

La tecnología del ADN ha tomado un lugar irremplazable en el campo de las ciencias forenses. Desde sus inicios en 1985, hasta el presente se han resuelto más de 50,000 casos en el mundo mediante el uso de la tecnología basada en el ADN. En las ciencias forenses, el análisis del ADN se ha convertido en una “nueva forma de evidencia científica”, se ha colocado bajo el escrutinio público y ha aumentado la demanda de competencia en esta área. Cada vez más cortes aceptan la evidencia basada en el ADN, por tanto, en un futuro muy cercano esta tecnología se aceptará completamente en el sistema legal. Existen dos principales aplicaciones en la genética forense: para la investigación criminal y para pruebas de paternidad. Debido a lo anterior, consideramos de suma importancia que nuestros alumnos desarrollen la tecnología necesaria para el análisis del ADN, tanto proveniente de la escena del crimen, como para determinar una disputa de paternidad.

Estandarizamos en el laboratorio de investigación las condiciones experimentales necesarias para desarrollar los diferentes protocolos que permiten la identificación humana con fines de exclusión de paternidad. Utilizamos marcadores moleculares STR individuales provenientes de donaciones de los diferentes kits de la casa comercial Promega, para amplificar regiones en el ADN que permiten obtener múltiples productos de PCR correspondientes a diferentes repeticiones en tandem de varios polimorfismos humanos, para después analizarlos mediante electroforesis en acrilamida y compararlos con un patrón conocido de los polimorfismos, por lo que se puede establecer una relación entre el menor y el posible padre.

Finalmente, actualizamos los protocolos de: cultivo de linfocitos y observación de cariotipo humano y el de detección de errores innatos del metabolismo.

Esta tecnología ya se desarrolló en diversos cursos que se impartieron a los profesores de la Facultad y se transferirá al laboratorio de docencia de Genética Clínica en el octavo semestre de la carrera de QFB.

Dra. Isabel Soto Cruz

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**142/330**

PRACTICA 5. DETECCIÓN DE DELECIONES EN EL CROMOSOMA "Y" ASOCIADAS A LA INFERTILIDAD MASCULINA

1. OBJETIVO

Que el alumno desarrolle las técnicas de biología molecular para detectar deleciones del cromosoma Y asociadas con la infertilidad masculina.

2. INTRODUCCIÓN

La esterilidad es un problema que atañe a ambos sexos, en la actualidad afecta a un 15% de las parejas. Al analizar las causas, se estima que los factores masculinos constituyen hasta un 50% de los casos. De ellos un 10% se deben a defectos severos en la producción de espermatozoides. En consecuencia, aproximadamente un 1% de los hombres en edad fértil tendría alteraciones graves en el seminograma. A pesar de la alta frecuencia de esta patología, poco se sabe de los posibles factores genéticos que puedan ocasionarla, salvo en los casos asociados a deleciones del cromosoma Y. Se entiende por deleciones cromosómicas a la falta de una sección de un determinado cromosoma o en secuencias en la molécula de ADN [1].

La infertilidad masculina es una condición difícil de tratar porque no es una entidad única, refleja una variedad de diferentes condiciones patológicas que dificultan emplear una sola estrategia de tratamiento. Las alteraciones estructurales en el cromosoma Y constituyen el principal factor responsable de la infertilidad masculina [2].

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

3.1 Estructura del cromosoma Y

En teoría, el Adán cromosómico-Y sería el varón del cual descienden todos los cromosomas Y que determinan el sexo masculino. Un estudio biológico de la Universidad de Standford sobre 93 polimorfismos genéticos humanos descubiertos en este cromosoma en 1000 individuos de 21 regiones del

mundo, permitio estimar que un antepasado o grupo de antepasados masculinos comunes a todos los humanos actuales vivió en África aproximadamente 70,000 años [3].

En los primeros estudios realizados sobre el cromosoma Y no le asignaron ningún gen, se creía que su única función era la determinación del sexo, de modo que daba lugar a la transformación de las gónadas del embrión hacia testículo en lugar de hacia el ovario. Fue a partir de los años 70 cuando se empezó a establecer la presencia de diferentes factores génicos. El cromosoma Y humano está compuesto de dos brazos y un centrómero. El brazo largo se denomina Yq y el corto Yp. Cuando se utiliza la técnica de mapeo de deleciones se divide en siete intervalos de deleción, que posteriormente se subdividen en subintervalos designados con letras del alfabeto: A, B y C. En el brazo corto se sitúan los intervalos del 1 al 4, y en el largo del 5 al 7 (Figura.1).

3.2 Factor de azoospermia (AZFa, AZFb, AZFc)

En 1976 Tiepolo y Zuffardi [4], detectaron deleciones microscópicas en la porción distal del brazo largo del cromosoma Y (Yq) en cuatro varones con azoospermia. Sobre esta base postularon la existencia de uno o más genes críticos para la espermatogénesis en esta región cromosómica. Las microdeleciones del brazo largo del cromosoma Y afectan aproximadamente a un 10% de los pacientes azoospérmicos las microdeleciones de Yq afectan a un 15% de los pacientes con oligozoospermia idiopática severa y a un 20% de los pacientes con azoospermia no obstructiva [5].

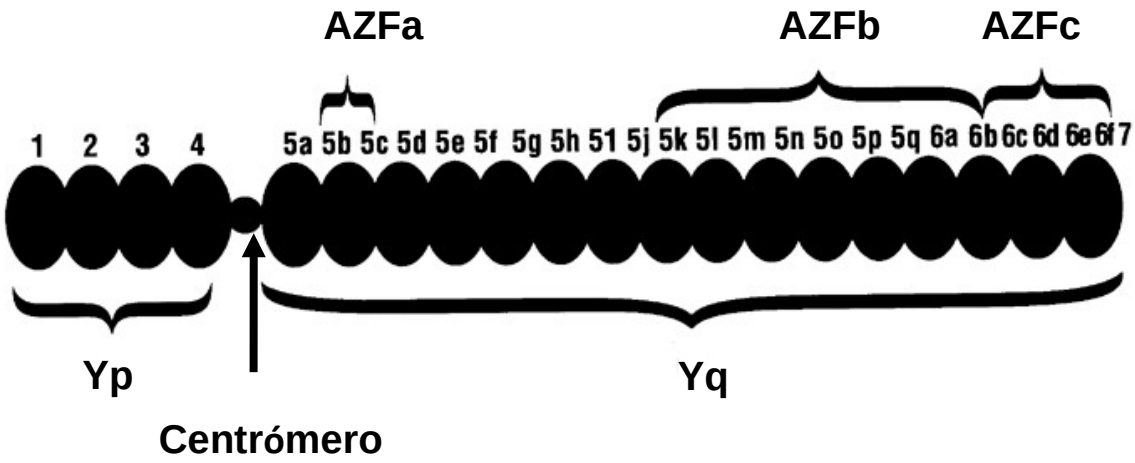


Figura 1. Estructura del cromosoma Y. Se representan las diferentes regiones donde se han detectado deleciones en particular en el brazo largo.

Esas microdeleciones son demasiado pequeñas para analizarse por cariotipo, pero se pueden estudiar fácilmente con la técnica de PCR. La mayoría de las microdeleciones que ocasionan azoospermia u oligospermia ocurren en regiones que no se recombinan en el brazo largo del cromosoma Y y se les conoce como regiones de factor azoospermia (AZF), las cuales son responsables de la espermatogénesis [6]. Estas regiones a su vez se dividen en tres regiones denominadas AZFa, AZFb y AZFc [7]. Para una óptima espermatogénesis se requiere de un cromosoma Y intacto en particular en las regiones AZF [8] (Figura 1).

Las microdeleciones en las regiones AZFa, AZFb y AZFc conducen a diferentes patrones de infertilidad masculina que van de una oligospermia severa a una azoospermia no obstructiva. Se han identificado algunos mecanismos de recombinación homóloga intracromosomal en pacientes con deleciones simultáneas en las regiones AZFb y AZFc, además por estudios de alineación de secuencia de otros patrones de deleción se sugiere que son el resultado de mecanismos de recombinación no homóloga [9].

La región AZFa tiene aproximadamente un tamaño de un millón de pares de bases, se localiza en la zona 5c-5d, abarca genes que presentan copias homólogas en el cromosoma X y que además se expresan de manera ubicua. La deleción de la región AZFa se asocia con el síndrome de células de Sertoli tipo I (SCO) en los que los individuos afectados presentan testículos pequeños

(5 a 10 cc), además de azoospermia, ausencia de células germinales, elevación de la FSH y niveles de testosterona normal [5].

La región AZFb tiene un tamaño de tres millones de pares de bases, se localiza desde 5k hasta 5q y de 6a a 6b, en ella se han determinado la presencia de los genes RBM (Ribonucleid Acid Binding Motifs), además de los genes PRY y TTY, que se expresan de manera específica sólo en el testículo. Existen copias de RBM repartidas a lo largo del cromosoma Y. Cuando se tienen deleciones de la región AZFb se presentan en la histología testicular espermatogonios y espermatocitos primarios, pero ausencia de células germinales postmeióticas, no se obtienen espermatozoides válidos para inyección intracitoplásmática de esperma (ICSI) en la punción testicular. Lo que sugiere que su detección podría ser una contraindicación de la ICSI [10].

La región AZFc ó Factor de azoospermia, tiene un tamaño de 1,4 millones de pares de bases, se localiza en 6c hasta 6f y en ella se encuentra al gen DAZ (Deleted in Azoospermia) [11]. Este gen tiene una copia en el brazo corto del cromosoma 3. Las deleciones de esta zona son mucho más frecuentes que las otras. Se han asociado tanto a azoospermia como a oligospermia. Es la causa molecular más clara relacionada con la esterilidad. Los daños sobre el gen DAZ no transmiten un efecto claro sobre la espermatogénesis debido a la presencia de múltiples copias del DAZ en la AZFc y en el cromosoma 3. Se han desarrollado estrategias basadas en PCR para detectar las microdeleciones en el cromosoma Y (Figura 2).

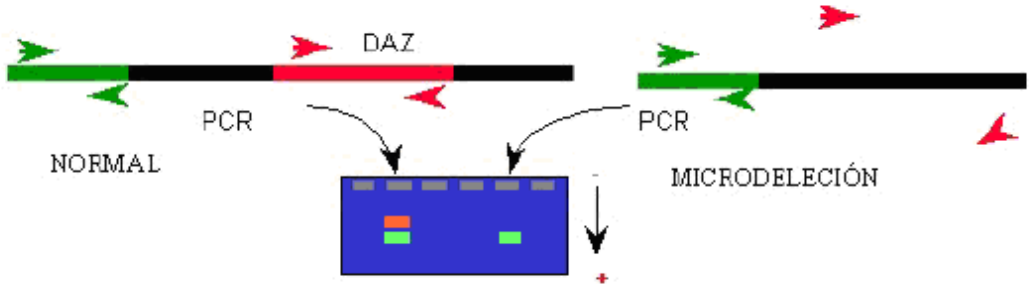


Figura 2. Estrategia basada en PCR para detectar microdeleciones en el cromosoma Y. Se indica la pérdida del gen DAZ lo que origina la ausencia de amplificación con los oligonucleótidos específicos. Este resultado es común en pacientes con azoospermia u oligospermia.

En los pacientes oligospérmicos (la oligospermia es el número reducido de espermatozoides) con microdeleciones en el cromosoma Y son estériles. La selección natural previene la transmisión de mutaciones causando infertilidad pero esto se puede salvar con las técnicas de reproducción asistida. Incluso en muchos de los pacientes azoospérmicos con microdeleción de Yq es posible recuperar espermatozoides a partir de una biopsia testicular con los que se puede proceder a ICSI. Todos los pacientes con una microdeleción tratados con éxito a través de ICSI transmiten la microdeleción y la infertilidad a su descendencia masculina, pero no a su descendencia femenina, por lo que la identificación de factores genéticos y el manejo apropiado de la pareja estéril son sumamente importantes.

Recientemente, se han realizado estudios en la población mexicana en el que se demostró que las microdeleciones en el cromosoma Y están fuertemente asociadas a la infertilidad [12].

La infertilidad en varones es un ejemplo claro de una enfermedad extremadamente compleja con una enorme carga genética. Se han estudiado numerosos modelos murinos en machos, de tal forma que el escrutinio de mutaciones y los estudios de asociación revelan una alta prevalencia de causas genéticas en la espermatogénesis alterada. Esos hallazgos incluyen aberraciones cromosómicas y mutaciones puntuales. No obstante, una gran cantidad de hombres infértiles se diagnostican como idiopáticos, lo que refleja un entendimiento pobre de los mecanismos básicos que regulan la espermatogénesis y la función del esperma. Además, no se conocen con lujo de detalle los mecanismos moleculares que conducen a daño espermatogénico que originan infertilidad genética es el caso de las microdeleciones del brazo largo del cromosoma Y. Esos problemas se pueden abordar con estudios de asociación en gran escala y con el análisis de expresión testicular por microarreglos en alteraciones bien definidas de la espermatogénesis [13, 14]. Este tipo de estudios en el futuro tendrán importancia diagnóstica y terapéutica.

3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es un método engañosamente simple, pero muy versátil, que tiene aplicación en todas las áreas donde se haga uso de la biología molecular, lo que la PCR consigue es fabricar múltiples copias de una secuencia diana de ADN mediante un proceso de amplificación que llega a permitir la obtención de microgramos de ADN apartir de cada molécula inicial. Cualquier segmento de ADN o de ARN se puede amplificar siempre que se conozcan las secuencias flanqueantes de la región diana, es decir, podemos amplificar cualquier porción de ácido nucleico, conocido o no, siempre que quede comprendido entre dos secuencias conocidas con las que podrán hibridar oligonucleótidos complementarios que actuarán como cebadores para que la polimerasa pueda copiar las hebras molde.

Para que la reacción tenga lugar, los componentes básicos e indispensables de la misma son: ADN molde que se desea amplificar, ADN polimerasa, cebadores de secuencia específica, nucleótidos para la síntesis de nuevo ADN y amortiguador de reacción que incluye las distintas sales requeridas por la enzima. La PCR es una reacción que ocurre en un único tubo tras mezclar en él los componentes necesarios e incubarlos en un termociclador, un aparato que permite variar la temperatura de incubación a lo largo del tiempo de forma programada. Los protocolos básicos de PCR constan de los siguientes pasos fundamentales:

1. Desnaturalización térmica del ADN que se va a usar como molde.

2. A una temperatura menor que la de desnaturalización, alineamiento de cebadores sintéticos cuya secuencia les permite hibridar uno a cada lado de la secuencia diana.

3. Extensión por parte de la ADN polimerasa de los oligonucleótidos que actúan como cebadores.

4. Este proceso de tres pasos se repite un número determinado de veces (25-35), duplicándose cada vez el número de moléculas de producto. Esta amplificación exponencial tiene como resultado un gran número de copias de la secuencia de ADN flanqueada por el par de oligonucleótidos.

De esta forma, la reacción logra obtener una gran sensibilidad al poderse llevar a cabo con cantidades extremadamente bajas de ADN molde y especificidad al detectar únicamente la secuencia de ácido nucleico para la que han sido diseñados los cebadores.

No obstante, en este proceso teórico que hemos descrito pueden influir numerosos factores que hacen que la reacción no sea realmente específica o que su eficiencia no sea la adecuada, de manera que la amplificación no ocurra en la progresión esperada y por lo tanto que no sea sensible. Entre los muchos factores que pueden influir en el resultado final de la PCR múltiple destacan: el diseño apropiado de los iniciadores, la calidad y concentración del ADN, la concentración de magnesio, el tipo y la cantidad de ADN polimerasa y el programa de amplificación.

En la PCR múltiple, lo que se persigue es amplificar simultáneamente en un único tubo distintas secuencias específicas, lo cual necesariamente implica que los reactivos mezclados y el programa utilizado sean suficientes y adecuados para permitir la detección de cada diana y no inhibir la de las demás. Con este fin, algunos parámetros, como la concentración de magnesio y de cebadores, así como el tipo y la cantidad de ADN polimerasa, deben ajustarse experimentalmente. En el caso de los cebadores y el programa de temperaturas utilizado, es necesario tener en cuenta varias premisas: *a)* escoger o diseñar oligonucleótidos que no interaccionen entre sí, es decir, que no formen dímeros; *b)* que tengan temperaturas de alineación similares;
c) que cada pareja amplifique una única secuencia diana, y *d)* que generen productos de PCR de tamaño suficientemente diferente para poder separarse y diferenciarse tras la amplificación. En cuanto a la calidad y cantidad de ADN molde, se debe intentar partir de la concentración menor posible y evitar la presencia de sustancias inhibidoras que puedan interferir en la reacción. Para ello, los protocolos de purificación variarán en función del tipo de muestra clínica de partida.

Durante los últimos años, se han publicado numerosos trabajos en los que se describen nuevos protocolos para la extracción de ADN en cantidad y calidad adecuadas para la PCR o para la realización de reacciones de amplificación sensibles y específicas directamente a partir de muestras clínicas. Por supuesto, por su rapidez y sencillez, esta última opción es la más deseable, aunque también la más difícil de lograr. Por otro lado, también se debe considerar que en los casos en que se detectan genes que codifican para toxinas u otros factores de virulencia, la presencia del gen no implica que la proteína se este produciendo, por lo que la PCR múltiple debería aplicarse, siempre que sea posible, en conjunto con métodos bioquímicos y/o inmunológicos. No obstante, tampoco se debe menospreciar la gran utilidad que puede tener una detección precoz de información genética que puede ser peligrosa si se expresa, ya que permite la ejecución de medidas preventivas, tanto de tratamiento como de control. Por último, es conveniente recordar que la PCR es una técnica que, por su aparente simplicidad y su alta sensibilidad, es muy susceptible de errores de ejecución y de contaminaciones, la introducción de la PCR múltiple en los laboratorios clínicos requiere una formación especializada del personal que ejecute el análisis.

4. METODOLOGIA

4.1 Extracción de ADN

4.1.1 Extracción de ADN con fenol-cloroformo

Material y equipo

- Microcentrifuga Eppendorf
- Termociclador Eppendorf
- Vortex Genie
- Micropipetas Gilson
- Tubos Falcon de 15 mL
- Tubos Eppendorf 0.5 mL
- Sistema Vacuntainer con EDTA.

Reactivos

- Amortiguador de lisis (Tris 10 mM pH8, EDTA 20 mM, SDS 0.5%)
- Pronasa Sigma
- Amortiguador de lisis con pronasa (980 µL de amortiguador de lisis y 20 µL de pronasa)
- Acetato de sodio 375 mM pH5.5
- Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1)
- Isopropanol Sigma
- Etanol al 80%
- Agua estéril

Servicios

Energía eléctrica, agua

Procedimiento

- Extraer 4 mL de sangre venosa en tubos con EDTA como anticoagulante.
- Adicionar 5 mL de agua bidestilada estéril.
- Mezclar suavemente hasta la lisis completa de los eritrocitos.
- Centrifugar a 5,000 rpm durante 10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el botón en 80 µL en amortiguador de lisis con pronasa.
- Incubar a 37°C durante 1 hora.
- Adicionar 320 µL de acetato de sodio 373 mM.
- Incubar nuevamente a 37°C por una hora.
- Adicionar 480 µL de la mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico y agitar con el Vortex durante 5 minutos.
- Centrifugar a 13,000 rpm por 15 minutos a 4°C.
- Separar la fase acuosa y adicionar el mismo volumen de isopropanol previamente enfriado a -20°C.
- Centrifugar a 13,000 rpm por 15 minutos.
- Eliminar el sobrenadante.
- Adicionar 980 µL de alcohol etílico al 80% en agua bidestilada.
- Centrifugar a 13,000 rpm por 15 minutos.
- Eliminar el sobrenadante.
- Tapar los tubos con papel Parafilm y realizar perforaciones en la tapa.
- Dejar secar a temperatura ambiente durante toda la noche

4.1.2 Extracción de ADN en papel FTA

Materiales

- Guantes
- Cubrebocas
- Tubos Eppendorf
- Tubos Falcón
- Micropipetas y puntas de 200µL
- Bulbos o pipetas de transferencia estériles
- Pipetas graduadas de 10 mL
- Microperforador Harris
- Jeringa con tubos Vacutainer
- Papel absorbente
- Tarjetas FTA

Soluciones y reactivos

- Reactivo FTA®
- Agua bidestilada estéril libre de nucleasas
- Etanol al 70%

Equipo

- Thermomixer o vortex

Servicios

Energía eléctrica, agua.

Procedimiento

- Limpiar perfectamente el área de trabajo, usar guantes y cubrebocas, cerrar puertas y ventanas.
- Etiquetar el sobre que contiene el papel FTA
- Etiquetar los tubos Eppendorf de 1.5 mL con la clave correspondiente de la muestra a trabajar.
- Limpiar el sitio donde se va hacer la punción con alcohol al 70%, y con una lanceta hacer la punción en el dedo.
- Colocar 5 gotas de sangre en el papel FTA y dejar que seque.
- Hacer perforaciones en el papel FTA impregnado con sangre.
- Colocar 5-10 fragmentos de 1.12 mm de papel FTA con la muestra de sangre en un tubo Eppendorf de 1.5 mL previamente etiquetado.
- Adicional 400 µL (8 gotas) del reactivo de FTA a cada tubo.
- Incubar a temperatura ambiente y agitación (1000rpm) durante 5 minutos en el Thermomixer
- Decantar con sumo cuidado el reactivo de FTA, limpiar el remanente del reactivo en la boca del tubo con un papel absorbente limpio.
- Colocar 400 µL (8 gotas) de agua destilada estéril libre de nucleasas a cada muestra.
- Incubar a temperatura ambiente y agitación (1000rpm) durante 5 minutos en el Thermomixer o en vortex a baja velocidad.
- Retirar el agua con una micropipeta y punta de 1000 µL
- Colocar los tubos a 60°C en el Thermomixer durante 30 minutos, hasta observar que los discos de papel están completamente secos.

4.2 Hidratación y cuantificación de ADN

- Hidratar la muestra de ADN con 20 µL de agua libre de nucleasas estéril
- Agitar de 10-15 veces con la misma pipeta.
- En otro tubo agregar 199 µL de agua millipore y 1 µL de la solución anterior dilución 1:200
- Leer en el espectrofotómetro a 260 nm utilizando agua como blanco.
- La muestra restante se mantiene congelada a -20ºC.

$$\text{ADN (µg/µL)} = \frac{\text{Abs 260 nm} * 50 * \text{Factor de dilución}}{1000}$$

4.3 Reacción en cadena de la polimerasa múltiple

Materiales

- Guantes
- Cubrebocas
- Tubos Eppendorf
- Micropipetas de 100, 0.2-2.0 y 20 µL

Soluciones y reactivos

- Aceite mineral Sigma
- Agua bidestilada
- Taq polimerasa Applied Biosystems

- Multiplex master A, B, C, D
- ADN genómico (control positivo)

Equipo

- Vortex Genie
- Termociclador Eppendorf

Procedimiento.

- Descongelar las mezclas maestras y agitar de 5-10 segundos en el Vortex y mantenerlos en un baño de hielo. Descongelar agua libre de nucleasas y el ADN genómico.
- Preparar las cuatro mezclas maestras, una para cada mezcla múltiple (A, B, C y D).

COMPONENTE	VOL. POR REACCION	VOL. PARA 4 REACCIONES
Multiplex master	10 µL	40 µL
Taq polimerasa	0.2 µL	0.8 µL
Vol. final	10.2 µL	40.4 µL

- Etiquetar el número necesario de tubos para cada reacción.

NOTA: Usar tubos de amplificación de pared delgada y colocarlos sobre hielo.

- En un tubo por separado diluir el ADN de la muestra a 10 ng/µL con agua libre de nucleasas. Mezclar durante 5-10 segundos en el vortex y regresar al hielo.
- Añadir 5 µL de ADN diluido a los tubos de reacción etiquetados previamente y mantenerlos en hielo.
- Diluir 12 µL de ADN genómico en 18 µL de agua libre de nucleasas y mezclar durante 5-10 segundos en el vortex y añadir 5 µL a los tubos de reacción etiquetados (control positivo).
- Para el control negativo añadir 5 µL de agua libre de nucleasas a los tubos de reacción previamente etiquetados.
- Mezclar bien en el Vortex.
- Añadir 20 µL de la mezcla principal múltiple y el ADN polimerasa a los tubos de reacción que contienen el ADN de la muestra, controles positivos y negativos.
- Mezclar en el vortex con sumo cuidado.
- Centrifugar los tubos brevemente para sedimentar el contenido de los tubos mantener los tubos en baño de hielo hasta estar listo el termociclador.
- Añadir 50 µL de aceite mineral.
- El programa de amplificación que se utilizara es el siguiente:

Núm. de paso	**Temperatura °c**	**Tiempo**
1	**94**	**6 min.**
2	**94**	**45 seg.**
3	**57**	**45 seg.**
4	**72**	**1 min.**
5	**Repetir desde el paso 2 al 4 35 ciclos**	
6	**57**	**2 min.**
7	**72**	**5 min.**
8	**20**	**59 min.**
9	**fin**	

4.4 Electroforesis de los productos de PCR

Material y Equipo

- Cámara de electroforesis
- Fuente de poder Bio-Rad
- Probetas de 10 mL
- Pipetas de 10, 50, 100 μL
- Vasos de 250 mL

Reactivos

- Gel de acrilamida al 10%
- TBE 1X (Tris-ácido bórico-EDTA) Sigma
- Amortiguador de carga
- Bromuro de etidio (10 mg/mL).
- Agua bidestilada

Procedimiento

- Preparar un gel de acrilamida al 10%.
- Adicionar a cada muestra 10 μL del amortiguador de carga a la fase acuosa sin formar emulsión con el aceite.
- Depositar 10 μL de la muestra con amortiguador de carga a cada pozo.
- En un pozo del extremo colocar el marcador de peso molecular de 100pb.
- Correr la electroforesis a 180 volts por 180 minutos
- Teñir el gel con bromuro de etidio (40 μL de bromuro de etidio en 400 mL de agua bidestilada) durante 2 minutos.
- Lavar con agua bidestilada por 3 minutos.
- Colocar el gel en el equipo analizador de geles.
- Utilizar el software del equipo para observar las bandas y compararlas con el control positivo para detectar las posibles deleciones del cromosoma Y.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**157/330**

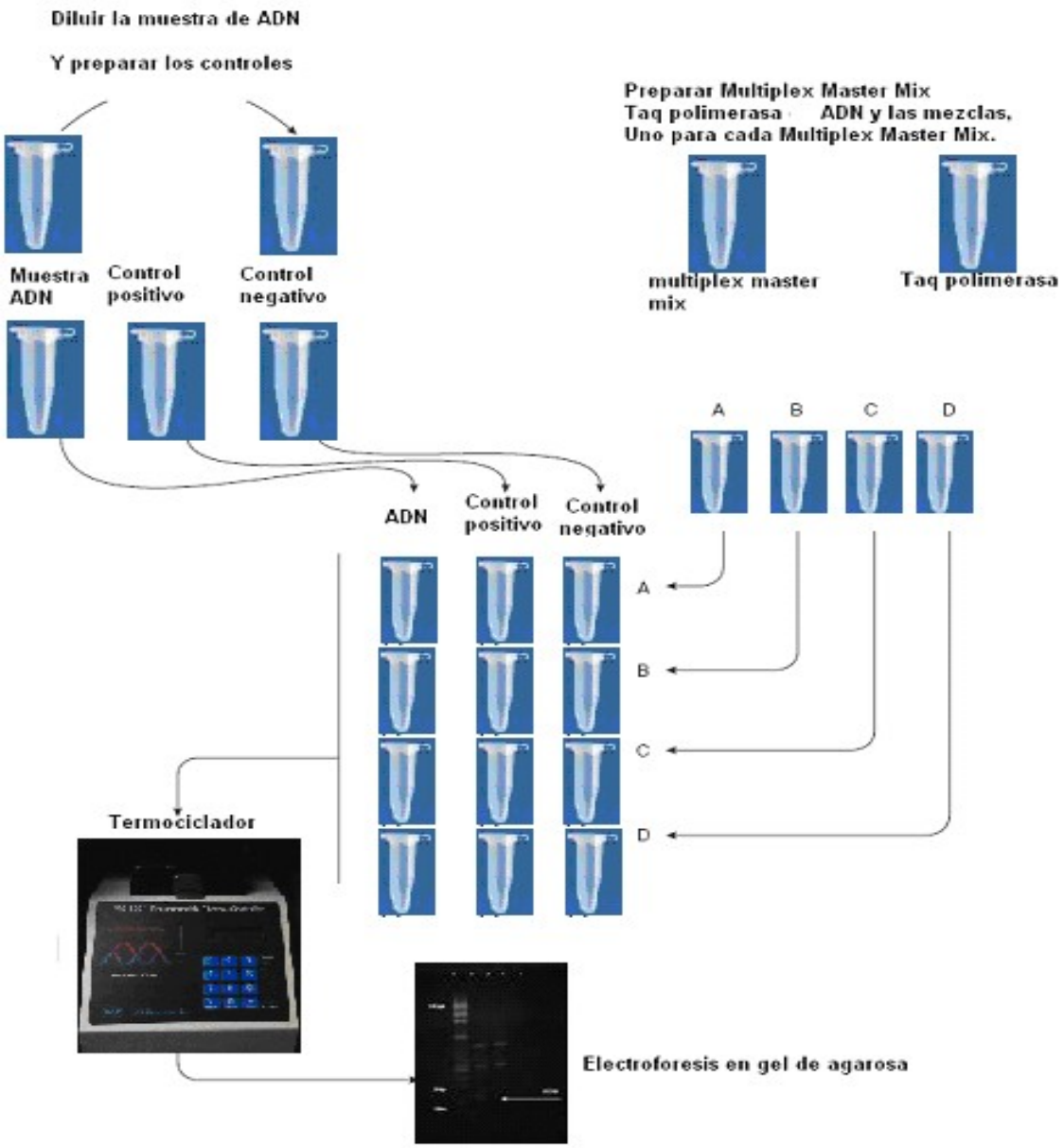


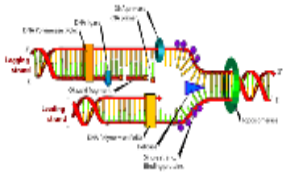
Figura 3. Representación esquemática del ensayo de detección de las microdeleciones en el cromosoma Y.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**158/330**

5. DIAGRAMA DE FLUJO

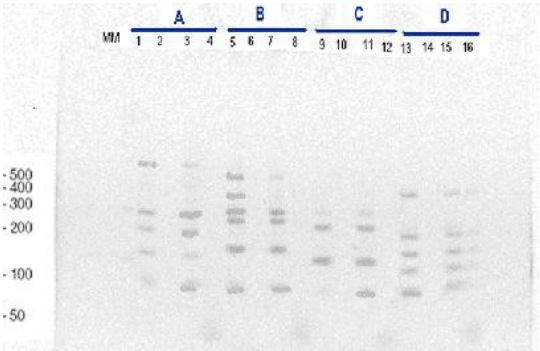
Extracción de ácidos nucleicos

PCR múltiple para detectar las deleciones del cromosoma Y



Electroforesis en acrilamida de los productos de PCR

Análisis de resultados y detección de las deleciones del cromosoma Y



6. PREPARACION DE REACTIVOS

Amortiguador de lisis

EDTA 0.1 M	37.224 g
NaCl 0.15 M	8.766 g
Agua bidestilada cbp	1000 mL

Amortiguador de carga 5X

50 mM Tris pH 8

75 mM EDTA pH 8

0.5% SDS

10% Ficoll

30% Sacarosa

0.2% Naranja G, xilen cynol y azul de bromofenol

Agua bidestilada cbp 100 mL

Marcador de peso molecular 100pb

Marcador de 50pb	1 µL
Agua	4 µL
Amortiguador de carga	5 µL

Acrilamida-bisacrilamida al 30%

Acrilamida	29.0 g
Bisacrilamida	1.0 g
Agua bidestilada cbp	100 mL

TBE 10X

Tris 1M	121.10 g
Ácido bórico 1M	61.38 g
EDTA 50 mM	14.61 g
Agua bidestilada	1000 mL

7. RESULTADOS ESPERADOS

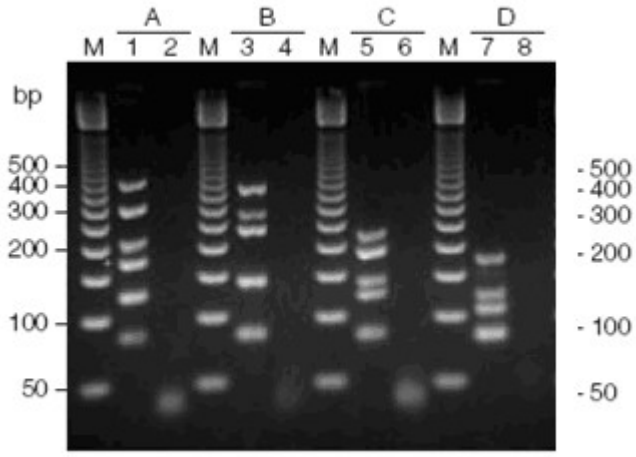


Figura 4. Análisis de las mezclas maestras A, B, C y D en los controles positivos y negativos. Carriles 1, 3, 5 y 7 corresponden a la amplificación de los controles positivos de un varón sin deleciones en las mezclas maestras A, B, C y D respectivamente. Los carriles 2, 4, 6 y 8 corresponden a ADN proveniente de mujeres o controles negativos, los carriles marcados con M corresponden al marcador de peso molecular de 50bp.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**161/330**

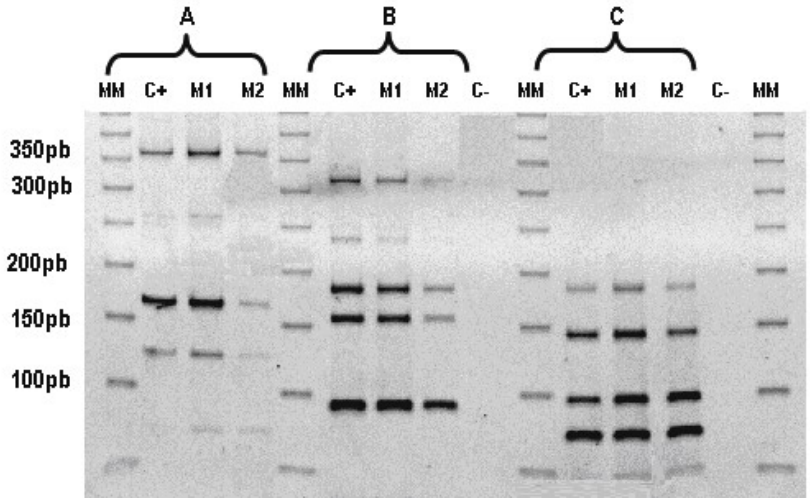


Figura 5. Corrimiento electroforético de las amplificaciones de los controles positivos y dos muestras provenientes de dos varones fértiles. Carriles MM corresponden al marcador de peso molecular de 50bp, M1 y M2 corresponden a la muestra 1 y la muestra 2, las letras A, B y C corresponden a las mezclas maestras. C+ y C- corresponden a los controles positivos y negativos respectivamente.

Para reportar los resultados llenar la tabla 1. Comparar las bandas de las amplificaciones para cada una de las mezclas maestras con las bandas del marcador de peso molecular. También considerar el mapa del cromosoma Y (Figura 6).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**162/330**

Multiplex A				**Control (* / -)**					
STS	Locus	**Peso prod. pb**	**Posicion mapa**	**C***	**C-**	**M 1**	**M 2**		
SY254	*DAZ*	380	18	●		●			
SY157	DYS240	290	20	●		●			
SY81	DYS271	209	2	●		●			
SY130	DYS221	173	11	●		●			
SY182	*KAL-Y*	125	5	●		●			
	SMCX	83	Control						

Multiplex B				**Control (* / -)**					
STS	Locus	**Peso prod. pb**	**Posicion mapa**	**C***	**C-**	**M 1**	**M 2**		
SYPR3	*SMCY*	362	7	●		●			
SY127	DYS218	274	9	●		●			
SY242	*DAZ*	233	16	●		●			
SY208	*DAZ*	140	17	●		●			
	SMCX	83	Control	●		●			

Multiplex C				**Control (* / -)**					
STS	Locus	**Peso prod. pb**	**Posicion mapa**	**C***	**C-**	**M 1**	**M 2**		
SY128	DYS219	228	10	●		●			
SY121	DYS212	190	6	●		●			
SY145	DYF51S1	143	14	●		●			
SY255	*DAZ*	124	19						
	SMCX	83	Control	●		●			

Multiplex D				**Control (* / -)**					
STS	Locus	**Peso prod. pb**	**Posicion mapa**	**C***	**C-**	**M 1**	**M 2**		
SY133	DYS223	177	12	●		●			
SY152	DYS236	125	15	●		●			
SY124	DYS215	109	8	●		●			
	SMCX	83	Control	●		●			

Tabla 1 Ejemplo de como reportar los resultados

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**163/330**

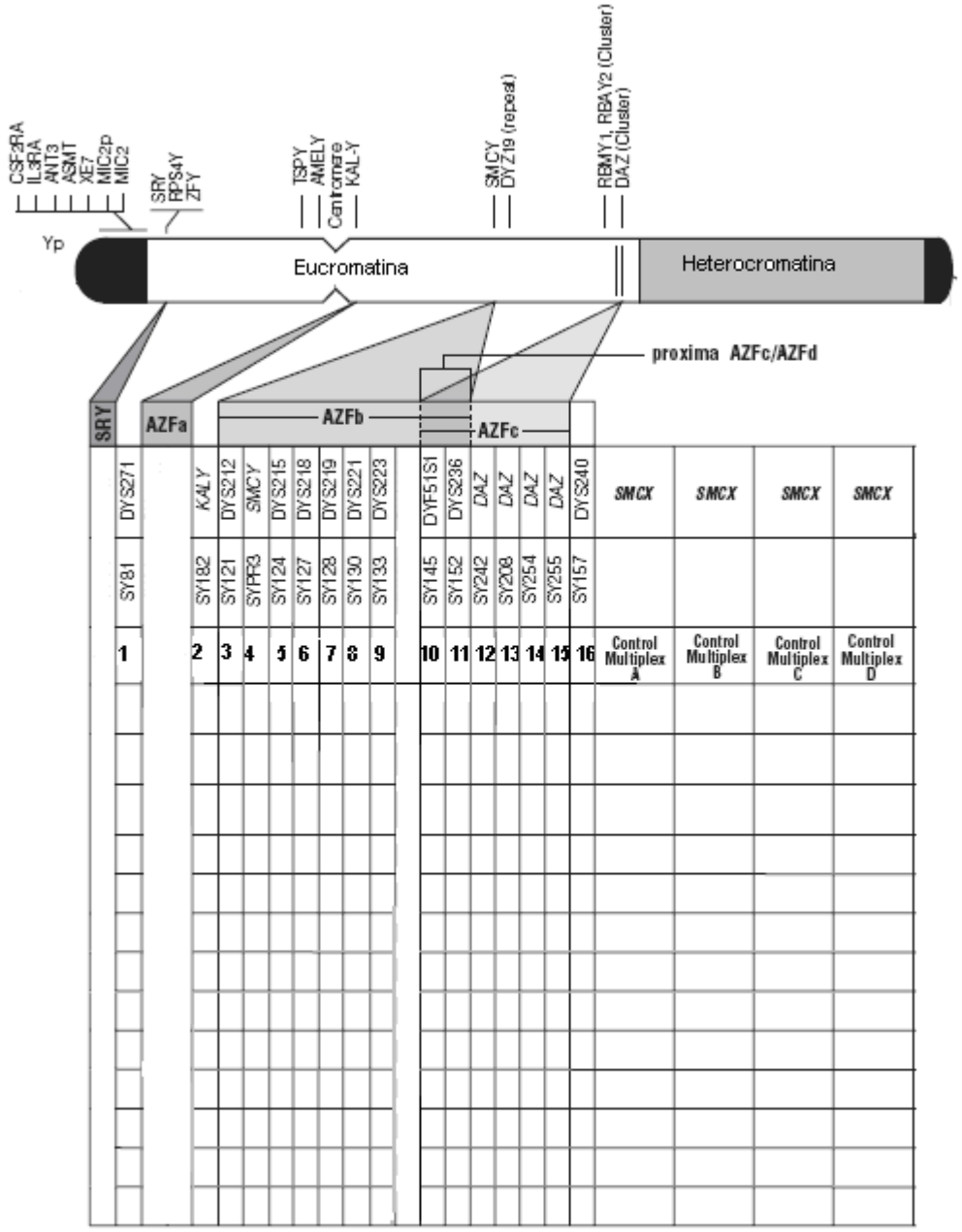


Figura 6. Mapa del cromosoma Y.

8. CUESTIONARIO

1. Mencione 3 causas de la esterilidad masculina.
2. ¿Explicar que es una deleción?
3. ¿En cuantas regiones esta dividido y subdividido el cromosoma Y?
4. ¿Qué es el factor de azoospermia (AZF)?
5. ¿Con qué patología se relaciona el AZFa, AZFb y la AZFc?
6. Si es que existe otro AZF mencione cual es y con que patologías se relaciona.
7. ¿Cuál es la importancia clínica del gen DAZ?

9. MANEJO DE RESIDUOS

1. El material punzocortante (jeringas o agujas) empleado para la extracción de sangre se desechará en el contenedor rojo ubicado en el área de confinamiento de residuos.
2. Los sobrantes y desechos de sangre líquida o sus componentes se inactivarán con una solución de hipoclorito de sodio al 7% de cloro libre. Esta solución se adicionará a la sangre líquida o sus componentes para alcanzar una concentración final de cloro libre del 0.7%, se incubará a temperatura ambiente por 30 minutos y se verterá al drenaje.
3. Los residuos con fenol:cloroformo y alcohol isoamílico se colocarán en un recipiente de vidrio color ambar y se confinarán en el área de residuos.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Peterlin B, Kunej T, Sinkovec J, Gligorievska N, Zorn B: **Screening for Y chromosome microdeletions in 226 Slovenian subfertile men**. *Human reproduction (Oxford, England)* 2002, **17**(1):17-24.
2. Rodovalho RG, Arruda JT, Moura KK: **Tracking microdeletions of the AZF region in a patrilineal line of infertile men**. *Genet Mol Res* 2008, **7**(3):614-622.
3. Underhill PA, Shen P, Lin AA, Jin L, Passarino G, Yang WH, Kauffman E, Bonne-Tamir B, Bertranpetit J, Francalacci P *et al*: **Y chromosome sequence variation and the history of human populations**. *Nature genetics* 2000, **26**(3):358-361.
4. Tiepolo L, Zuffardi O: **Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm**. *Human genetics* 1976, **34**(2):119-124.

5. Foresta C, Moro E, Garolla A, Onisto M, Ferlin A: **Y chromosome microdeletions in cryptorchidism and idiopathic infertility**. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1999, **84**(10):3660-3665.

6. Viswambharan N, Suganthi R, Simon AM, Manonayaki S: **Male infertility: polymerase chain reaction-based deletion mapping of genes on the human chromosome**. *Singapore medical journal* 2007, **48**(12):1140-1142.

7. Kostiner DR, Turek PJ, Reijo RA: **Male infertility: analysis of the markers and genes on the human Y chromosome**. *Human reproduction (Oxford, England)* 1998, **13**(11):3032-3038.

8. Sadeghi-Nejad H, Oates RD: **The Y chromosome and male infertility**. *Current opinion in urology* 2008, **18**(6):628-632.

9. Costa P, Goncalves R, Ferras C, Fernandes S, Fernandes AT, Sousa M, Barros A: **Identification of new breakpoints in AZFb and AZFc**. *Molecular human reproduction* 2008, **14**(4):251-258.

10. Najmabadi H, Chai N, Kapali A, Subbarao MN, Bhasin D, Woodhouse E, Yen P, Bhasin S: **Genomic structure of a Y-specific ribonucleic acid binding motif-containing gene: a putative candidate for a subset of male infertility**. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1996, **81**(6):2159-2164.

11. Najmabadi H, Huang V, Yen P, Subbarao MN, Bhasin D, Banaag L, Naseeruddin S, de Kretser DM, Baker HW, McLachlan RI *et al*: **Substantial prevalence of microdeletions of the Y-chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia and oligozoospermia detected using a sequence-tagged site-based mapping strategy**. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1996, **81**(4):1347-1352.

12. Martinez-Garza SG, Gallegos-Rivas MC, Vargas-Maciel M, Rubio-Rubio JM, de Los Monteros-Rodriguez ME, Gonzalez-Ortega C, Cancino-Villarreal P, de Lara LG, Gutierrez-Gutierrez AM: **Genetic screening in infertile Mexican men: chromosomal abnormalities, Y chromosome deletions, and androgen receptor CAG repeat length**. *Journal of andrology* 2008, **29**(6):654-660.

13. Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C: **Male infertility: role of genetic background**. *Reproductive biomedicine online* 2007, **14**(6):734-745.

14. Osborne EC, Lynch M, McLachlan R, Trounson AO, Cram DS: **Microarray detection of Y chromosome deletions associated with male infertility**. *Reproductive biomedicine online* 2007, **15**(6):673-680.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**166/330**

PRACTICA 6. IDENTIFICACIÓN DE ALIMENTOS TRANSGÉNICOS (TOXINA CRY1AC EN MAÍZ) POR LAS TÉCNICAS DE: PCR, ELISA Y WESTERN BLOT (

1. OBJETIVO

Que el alumno Identifique el transgene Cry1Ac en distintas fuentes de maíz utilizando diferentes protocolos: PCR, ELISA y Western blot.

2. INTRODUCCION

De de los avances más importantes en la investigación biomédica esta la creación y el desarrollo de organismos (animales, plantas, parásitos, bacterias y virus), a los que se les han agregado de forma permanente genes funcionales extraños a su genoma. Asimismo, ha sido muy importante el desarrollo de animales que llevan alterados uno o varios genes específicos e incluso animales en los que se ha eliminado o inactivado completamente un gen. Justo hace poco más de una década, gracias a las técnicas para lograr la transmisión en líneas germinales de material genético en ratones, cambió drásticamente la forma de hacer investigación en todas las áreas biomédicas. La introducción de un fragmento lineal de ADN dentro del pronúcleo de embriones unicelulares (o más recientemente en células troncales embrionarias), permite el estudio del patrón de expresión de ese gen y las consecuencias biológicas de la sobreexpresión de la proteína exógena codificada por el transgen en tejidos específicos. La mutagénesis de un gen blanco, por medio de recombinación homóloga en células totipotenciales troncales embrionarias, ha permitido a los investigadores generar cepas de ratones que carecen de proteínas individuales, suministrando modelos específicos de pérdida de función. Con estas metodologías es posible, en la actualidad, amplificar, modificar o eliminar un gen. Esto nos permite construir, en teoría, cualquier animal, de cualquier especie, con cualquier alteración genética. Los animales modificados, en particular los ratones, pueden utilizarse en todas las áreas biomédicas con un

gran número de aplicaciones y propósitos, que van desde el conocimiento básico del gen alterado en el contexto total de ese organismo, hasta el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para controlar alguna enfermedad. Estos animales, además, han ayudado a clarificar los mecanismos de acción y señalización que ocurren en los procesos biológicos y bioquímicos, tanto en el desarrollo embrionario, como en los procesos de malignidad generados en el cáncer. Todas las áreas médicas y biológicas se han enriquecido con el desarrollo de estas metodologías.

En el presente trabajo, nos hemos dado a la tarea de estandarizar diferentes protocolos (PCR, ELISA y Western blot) que permiten evaluar la presencia del transgene Cry1Ac en maíz de distintas fuentes: como el cacahuazintle utilizado principalmente para cocinar pozole; el maíz que se utiliza para producir tortillas o el que se denomina palomero. Las técnicas que se estandarizaron pueden emplearse también para identificar la presencia de este gene en otras variedades de maíz o en otros vegetales.

Pareciera fácil pero no lo fue dado que tuvimos que producir un anticuerpo que reconociera a la proteína Cry en conejo para lo cual además de diseñar un protocolo de inmunización adecuado requeriamos de la proteína Cry pura. Fue gracias a la colaboración de la Dra. Leticia Moreno Fierros de FES Iztacala quien además de donarlos la proteína nos donó el plásmido que la codificaba mismo que sirvió como control positivo para estandarizar el protocolo de PCR. Además la Dra. Fierros participó en el diseño de los protocolos de inmunización en conejo y ratón. Con el anticuerpo policlonal anti-Cry que producimos en conejo, montamos las técnicas de ELISA y de Western-blot.

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

3.1 Los organismos que se pueden manipular genéticamente

En teoría, todos los organismos son susceptibles de manipularse genéticamente. Existen trabajos en la literatura en los que las técnicas transgénicas se han utilizado en plantas y en diversos animales, como son: la oveja, la cabra, el cerdo, la vaca, el conejo, la rata, el pez, los insectos, algunos

parásitos e incluso el hombre [1]. Sin embargo, la especie más importante ha sido el ratón, ya que fue la primera especie que se utilizó y en el que se desarrollaron todas las técnicas que se han empleado exitosamente para la generación de animales transgénicos.

3.2 El ratón es la especie animal más estudiada

Las ventajas del ratón sobre otros animales experimentales incluyen: la capacidad para manipular la información genética nueva dentro de la célula y de transmitirla a la línea germinal; tiene un ciclo reproductivo muy corto y los tamaños de las camadas son muy grandes. El ratón es un animal pequeño, manejable, bien caracterizado y muy usado en el laboratorio; es una especie que cuenta con muchas cepas consanguíneas diferentes. Además, el conocimiento de la biología del ratón es grande. Para el ratón existe un número abundante de anticuerpos y sondas de cADN, se han construido bibliotecas genómicas y de ADNc para cada cepa de ratón. Los ratones son relativamente baratos en comparación con otros animales experimentales, su mantenimiento aún en condiciones de alta seguridad es relativamente sencillo. Por otro lado, en la técnica de células troncales embrionarias, necesaria para crear ratones knock-out, las únicas células disponibles hasta muy recientemente, son las células troncales embrionarias de ratón [2]. En el ratón el empleo de la técnica de inyección que se usa para hacer animales transgénicos, es eficiente, debido a la disponibilidad de números relativamente grandes de huevos fertilizados, y también a su tamaño y resistencia. Es muy importante hacer notar que la conservación evolutiva nos ha mostrado que tanto los ratones como otros mamíferos son embarazosamente similares a los humanos. Por estas razones la década de los 1990's se ha nombrado como "la década del ratón" por el Harvard Health Letter. En el futuro, la expresión transgénica en animales superiores permitirá la producción a gran escala de proteínas recombinantes y otros estudios en los que el ratón no ha funcionado como el mejor modelo [3]. Finalmente, la reciente posibilidad de mutagénesis dirigida en células troncales embrionarias de rata, permitirá desarrollar y estudiar modelos de enfermedades que requieren técnicas quirúrgicas inaplicables a los ratones.

3.3 Los animales transgénicos

Los animales transgénicos portan un fragmento de ADN exógeno en su genoma. Estos animales se fabrican usando una construcción transgénica (plásmido de ADN con la secuencia del gen que se piensa introducir). Utilizando técnología de ADN recombinante y con técnicas de micromanipulación o transfección, se introducen en la célula blanco para que se inserte este nuevo gen al azar en el genoma celular. Todos los organismos cuyo genoma tiene un gen añadido o alterado en sus células (incluyendo a las células germinales) y portan el gen nuevo o alterado, son en el sentido estricto de la palabra, organismos transgénicos [4]. Es decir, todo animal al que se la insertado un gen azarosamente y añadido al repertorio genético de su organismo, con la consecuente ganancia de función otorgada por el transgen, recibe el término de animal transgénico. ¿Qué es un animal "Knock-out" o "Knock-in"? Una mutación dirigida (mutación en un sitio predeterminado) con frecuencia producirá una deleción funcional del gen. A esta eliminación específica se le ha denominado "gen targeting" y el producto es un animal mutante que carece de la expresión específica de ese gen recibe el nombre de animal "knock-out". Por otro lado, un organismo al que se le ha sustituido un gen normal por otro alterado, con mutaciones específicas, recibe el nombre de "knock-in" [5]

3.4 La clonación en animales

Cuando se realiza la manipulación genética de los organismos, existe la posibilidad de crear individuos que lleven la misma información genética derivada de una célula diferenciada. Con esto, no es necesario crear a un individuo a partir de las células germinales haploides o huevos fertilizados, ni tampoco a través de la utilización de células totipotenciales embrionarias. En estos casos, se utiliza el material genético completo de una célula somática y se introduce en un huevo no fertilizado. Este huevo se implanta en el útero de una hembra pseudopreñada y el resultado es un individuo que cuenta con la misma información genética que el donador. Se le ha denominado clonación,

ya que es posible generar un número ilimitado de individuos genéticamente iguales, que llevan la misma información genética.

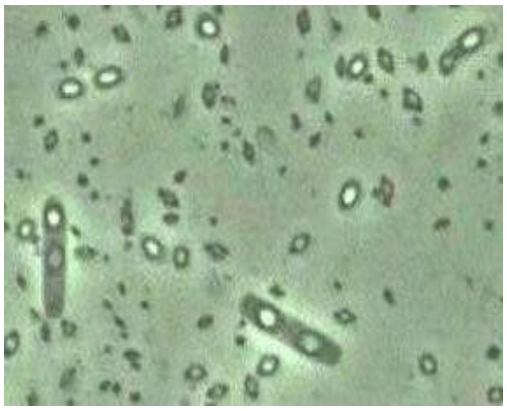
3.5 Alimentos transgénicos

Uno de los logros más importantes de la biotecnología agrícola es el desarrollo de cultivos transgénicos. Los alimentos modificados genéticamente o cultivos transgénicos se desarrollaron en un intento por mejorar la calidad del alimento y resolver problemas asociados con la agricultura comercial que incluyen enfermedades y el manejo de las malas hierbas. En la actualidad los cultivos transgénicos más importantes son: el maíz, la papa, la canola, el algodón, el trigo, el arroz, y la soya. Las características incorporadas con mayor frecuencia en estos cultivos, son la resistencia a insectos, la tolerancia a herbicidas y la resistencia a enfermedades virales y bacterianas, lo que ha permitido evitar la aspersión de una cantidad considerable de toneladas de insecticidas y agroquímicos.

Específicamente, el maíz Bt con genes de la bacteria *Bacillus thuringiensis* resiste al ataque del insecto “barrenador” *(Ostrinia nubilabis)*. La resistencia la produce la proteína codificada por el gen (Cry). Esta proteína es capaz de unirse a receptores específicos del tubo digestivo de los insectos, interfiriere en su alimentación y causa su muerte. Para obtener una mayor producción de ésta proteína, se requiere de un promotor fuerte, el más utilizado es el CaMV 35 S, proveniente del virus que causa la enfermedad del mosaico de la coliflor.

3.6 Generalidades de Bacillus thuringiensis

El *Bacillus thuringiensis* (Bt) es un bacilo gram positivo anaerobio facultativo y móvil. Pertenece al género *Bacillus*, y forma inclusiones cristalinas visibles al microscopio óptico durante la esporulación. Estas inclusiones cristalinas están compuestas por protoxinas, que contienen endotoxinas, de actividad insecticida específica contra insectos.



Fotografía del *B. thuringiensis* en el microscopio de contraste de fase. Se observan células vegetativas conteniendo endosporas (brillantes) e inclusiones cristalinas (de endotoxina). La mayoría de células se han lisado, y las esporas y los cristales de inclusión (estructuras con forma piramidal) están libres.

Casi todas las variedades de *B. thuringiensis* son capaces de formar mas de un tipo de cuerpos de inclusión. Cada variedad de Bt puede tener un número variable de plásmidos responsables de la síntesis de diferentes endotoxinas. Estos plásmidos portan varios genes de toxina (genes *cry*), a veces idénticos. Además, Bt puede tener diferentes transposones que contribuyen a aumentar la diversidad genética de estas toxinas.

Las diferentes variedades de Bt pueden intercambiar fácilmente sus plásmidos mediante un proceso semejante a la conjugación, fenómeno que se ha demostrado en el intestino de larvas de mosquito. De este modo, las variedades de Bt también pueden intercambiar plásmidos que contienen genes de endotoxina (los genes *cry*) y así aumentar su espectro de acción contra más especies de insectos.

3.7 La toxina Cry y sus propiedades como bioinsecticida.

El *B. thuringiensis* produce un insecticida con las características inusuales que hacen útil para el control de parásito en ciertas situaciones. Bt es una bacteria

natural común en suelos en diversas regiones del mundo. Varias tensiones pueden infectar y matar a insectos. Debido a esta característica, Bt se ha desarrollado para el control del insecto. Actualmente, la toxina Cry obtenida a partir de Bt es el único "insecticida microbiano" en uso extenso [6]. Su mecanismo de acción aún no esta totalmente definido pero se sabe que se une a receptores específicos y entonces la toxina forma poros en la membrana apical del intestino de los insectos susceptibles, los receptores forman parte de la estructura del poro y permanecen asociados a este una vez que ya se formo [7]

La actividad insecticida de Cry fue descubierta en 1911. Sin embargo, no estuvo disponible en el comercio hasta los años 50. Estos últimos años, ha habido enorme interés renovado en Bt. Varios productos nuevos se han desarrollado, en gran parte debido a la seguridad asociada a los insecticidas basados en Bt [8]. Sin embargo, existe controversia sobre los riesgos en el consumo de estos productos por el humano, tales riesgos pueden ser la presencia de alergias, o bien, que las bacterias del tracto intestinal animal y humano puedan incorporar directa o indirectamente la información genética contenida en los alimentos transgénicos, el riesgo se incrementa cuando se utilizan como genes reporteros los que producen resistencia a antibióticos.

3.8 Es importante saber identificar a los organismos modificados genéticamente

Existen problemas muy serios en los consumidores, relacionados con bioseguridad, riesgo ecológico y problemas éticos, para los cuales la ciencia no tiene todavía respuesta, por lo que se han generado diversas políticas de regulación en todo el mundo, aunque poco se hace en América, han permitido legislar y hacer necesario el etiquetado de los alimentos modificados genéticamente en varios países principalmente en la Unión Europea, Corea, Japón y Australia, sorprendentemente el procedimiento va muy lento en Estados Unidos y Canadá y ni hablar de México. Implementar la política de etiquetado requiere el desarrollo de métodos de detección adecuados.

Por otro lado, la revolución azul ha desencadenado la investigación sobre la producción de peces o acuacultura, de tal forma que se ha incrementado el crecimiento y alimentación de algunos peces produciendo cepas transgénicas que contienen construcciones modificadas del gene de la hormona del crecimiento, es impresionante el incremento en el número de salmonidos del atlántico, pez gato,

trucha arcoiris, etc., que se producen por estas tecnologías [9] y que también han generado debate en relación a la bioseguridad del alimento y sobre todo a los impactos ecológicos [10],de ahí que también sea una necesidad poder distinguir entre un pez transgénico del que no lo es.

3.9 Identificación de un organismo transgénico

La técnica de PCR, es la más utilizada para identificar la presencia de alimentos transgénicos, pero también se utilizan las técnicas de ELISA y Western blot para identificar la presencia no solo del transgen sino de la proteína [11]. La mayoría de los protocolos de PCR involucran reacciones que amplifican un solo blanco, sin embargo la variación denominada PCR múltiple permite amplificar dos o mas blancos simultáneamente en la misma reacción, lo que ofrece mayor flexibilidad y menor costo, así pues se pueden detectar dos diferentes transgenes en maíz como los son CryIA(b) y pat [10], de hecho un sistema ideal sería aquel PCR múltiple que pudiera determinar en los blancos transgénicos los genes: promotores, terminadores, y /o secuencias comunes de transgenes [12].

4. METODOLOGÍA

4.1 PROTOCOLO PARA IDENTIFICAR EL TRANSGEN PROTEÍNA CRY1AC EN DIFERENTES MUESTRAS DE MAÍZ POR MEDIO DE PCR.

MÉTODOS

Extracción de ADN

Material y Equipo

- Centrífuga

- Termociclador Mastercycler Eppendorf
- Vortex Genie
- Micropipetas Gilson
- Tubos Eppendorf

Material biológico

- Maíz para tortillas
- Maíz palomero
- Maíz cacahuazintle

Reactivos

- Amortiguador de extracción (Tris 10mM pH 8.0; EDTA 25 mM, SDS 2.5 %, NaCl 1.5 M) PVP 1% y Mercaptoetanol. 0.2% (agregar inmediatamente antes de usar)).
- Mezcla Sevag (Cloroformo: Alcohol isoamilico (96:4)).
- Isopropanol.
- Etanol al 80%.
- NaCl 5M.

Servicios

Energía eléctrica, agua

Procedimiento

Extracción de ADN

1. Triturar en un mortero una muestra de maíz hasta homogenizar.
2. Colocar 200 mg de maíz en un tubo Eppendorf de 2 mL.
3. Añadir 200 µL del amortiguador de extracción (mezclar suavemente por inversión).
4. Incubar durante 1 hora a 37° C.
5. Añadir 200 µL de la mezcla Sevag (agitar durante 15 minutos en un vortex)
6. Centrifugar a 15000rpm durante 15 min. (se observarán 3 fases)
7. Colectar el sobrenadante (sin tocar el precipitado).
8. Colocar el sobrenadante en un tubo Eppendorf de 2 mL
9. Añadir 100 µL de NaCl 5M y un volumen igual de isopropanol (mezclar suavemente por inversión).
10. Centrifugar a 14000rpm durante 15 min (se observarán dos fases)
11. Desechar el sobrenadante y añadir 200 µL de etanol al 80% (mezclar suavemente por inversión).
12. Centrifugar a 14000rpm durante 10 min.
13. Eliminar el sobrenadante.
14. Cubrir el tubo con papel parafilm y hacer perforaciones con una aguja estéril.
15. Colocar el tubo en el termociclador a 60°C durante 30 minutos.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**176/330**

DIAGRAMA DE FLUJO.

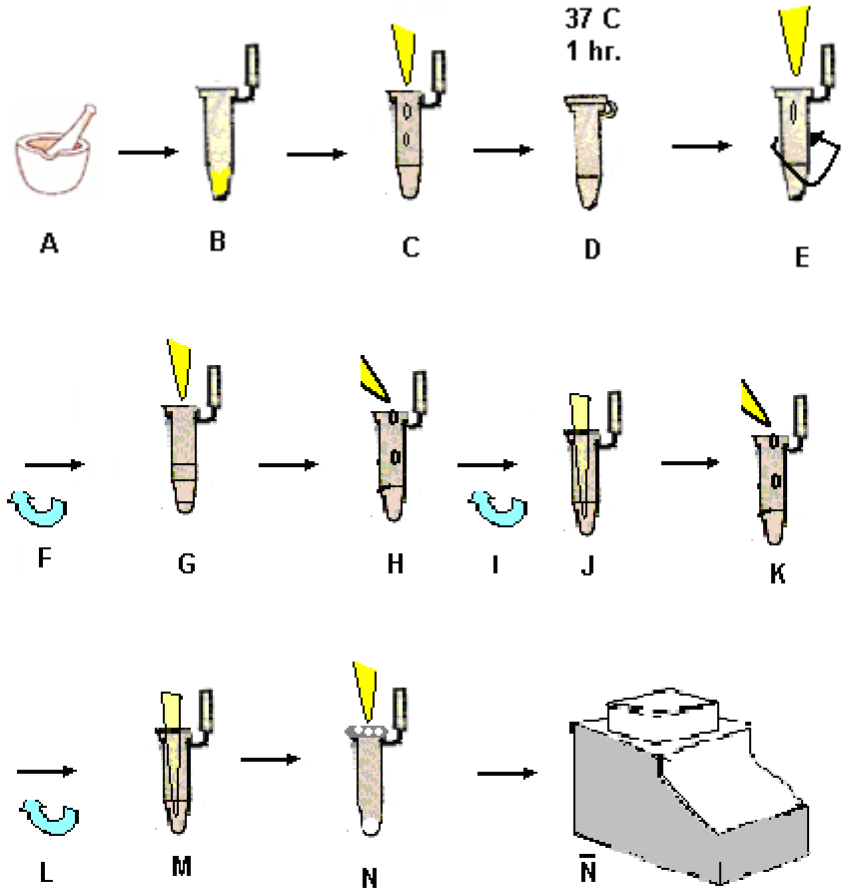


Figura 1. A) Triturar en un mortero una muestra de maíz hasta homogenizar. B) Colocar el maíz en un tubo. C) Añadir amortiguador de extracción. D) Incubar a 37°C una hora. E) Adicionar la mezcla Sevag y agitar. F) Centrifugar. G) Colectar el sobrenadante. H) Añadir NaCl 5M y un volumen igual de isopropanol. I) Centrifugar J) Eliminar el sobrenadante. K) Adicionar etanol al 80%. L) Centrifugar. M) Eliminar el sobrenadante. N) Cubrir el tubo con papel parafilm y hacer perforaciones con una aguja estéril. Ñ) Colocar el tubo en el termociclador a 60°C durante 30 minutos.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

TRIS 100 mM pH 8

Pesar 1.211 g y llevarlos a 100mL con agua doble destilada estéril, ajustar el pH antes de aforar.

Esterilizar por autoclave por 15 min a 120lb de presión.

EDTA 25 mM

Pesar 0.9306 g de EDTA y llevar a 100 mL con agua doble destilada estéril, ajustar el pH antes de aforar.

Esterilizar por autoclave por 15 min a 120lb de presión.

NaCl 1.5M

Pesar 8.775 g de NaCl y llevar a 100 mL con agua doble destilada estéril.

Esterilizar por autoclave por 15 min a 120 lb de presión.

SDS al 2.5%

Pesar 2.5 g y ajustar a 100 mL con agua doble destilada, permitir que se hidrate antes de agitar.

Esterilizar por autoclave por 15 min a 120 lb de presión.

Mezcla Sevag

Adicionar 96 mL de cloroformo y agregar 4 ml de alcohol isoamílico.

Almacenar en el refrigerador.

NaCl 5M

Pesar 29.25g de NaCl y llevar a 100 mL con agua doble destilada estéril.

Esterilizar por autoclave por 15 min a 120lb de presión.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**178/330**

Método para la Hidratación y cuantificación del ADN

Material y Equipo

- Micropipetas Gilson
- Vortex Genie
- Microcentrifuga
- Espectrofotómetro WPA
- Refrigerador
- Tubos Eppendorf

Reactivos

- Agua bidestilada estéril
- Agua calidad millipore

Procedimiento

1. Hidratar la muestra con 20 µL de agua millipore (resuspender por completo toda la muestra).
2. Centrífugar a 14000rpm durante 10 min.
3. Colocar en un tubo Eppendorf 1 µL de ADN puro y adicionar 99 µLde agua millipore (1:100).
4. Leer en el espectrofotómetro a 260nm, 280nm, 260/280nm.
5. Determinar la concentración de ADN con la siguiente fórmula

$$\text{ADN } (\mu g/\mu l) = \frac{\text{Absorbancia 260nm x 50 } \mu g \text{ x factor de dilución}}{1000\ \mu L}$$

Amplificación del gen Cry1AC

Material y Equipo

- Micropipetas Gilson
- Vortex Genie
- Termociclador Mastercycler Eppendorf
- Tubos Eppendorf

Reactivos

- ADN problema
- 10 x amortiguador PCR
- 25 mM $MgCl_2$
- 5 mM dNTP's
- 20 µM oligo 5´ TGCCCTTACAACCGCTATTC 3´ sentido;

  5´ GATAGTCGCGGCATCAAATC 3´ antisentido 20 µM oligo 5´CCCGGACGATATTGAACA 3´ sentido; 5´AGAAGCCCAGACGGAAAC 3´ antisentido.
- 5 U/ µL Taq polimerasa
- Agua desionizada libre de nucleasas

- Aceite mineral

Procedimiento

- Etiquetar 6 tubos Eppendorf con base en la numeración proporcionada a cada línea.
- Preparar la mezcla de reacción considerando que el volumen final en un tubo de reacción debe ser no mayor de 20 µl (mantener “todos los reactivos en hielo; la mezcla se prepara dentro de la campana de flujo laminar”).

Reactivo	**Concentración/Reacción**	**µL/Rxn**	**µL/6.5 Rx**
Agua para PCR	--	13.65	88.73
10 x amortiguador PCR	1X	2.0	13.0
25 mM de $MgCl_2$	2.5 mM	2.0	13.0
5 mM dNTP’s	250 nM	1.0	6.5
5 U/µL Taq polimerasa	0.5 U	0.1	0.65
Mezcla de oligo	250 nM	0.25	1.63

- Preparar la mezcla de reacción en el tubo etiquetado como número 6, agitar en vortex; adicionar 0.25 µL del oligo y distribuir en cada tubo (1-5), 19 µL de dicha mezcla.
- Adicionar 50 µL de aceite mineral.
- Depositar los siguientes volúmenes de ADN, en el tubo correspondiente:

Línea celular	Volumen (µL)
1. ADN problema	1
2. ADN problema	1
3. ADN problema	1
4. Control (-)	1
5. Control (-)	1
6. Control (+) plásmido	1

Colocar los tubos en el termociclador y seguir el programa.

Programa de ciclaje

1 94°C por 5 minutos

2 57°C por 2 minutos

3. 72°C por 2 minutos

4. 94°C por 45 segundos

5. Repetir de 2-4 (35 veces)

6. 57°C por 2 minutos

7. 72°C por 2 minutos

8. 20°C por 1 hora

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**182/330**

Electroforesis de los productos PCR

Material y Equipo

- Micropipetas Gilson
- Cámara de electroforesis vertical Bio-Rad
- Transluminador
-

Reactivos

- Gel de arcrilamida al 10%
- TBE 1X (tris- ácido bórico- EDTA) Sigma
- Amortiguador de carga 5X
- Bromuro de etidio
- Agua destilada

Procedimiento

- Preparar gel de acrilamida al 10% en TBE 1X.
- Adicionar a cada muestra 10 µL de amortiguador de carga y mezclar la fase acuosa evitando formar una emulsión con el aceite.
- Depositar 10 µL de la muestra con amortiguador en cada pozo (utilizar un pozo por muestra).

- En un pozo de los extremos colocar 10 µL del marcador de peso molecular de 50 pares de bases.
- Correr la electroforesis a 180 volts por 30 minutos en TBE 1x.
- Teñir el gel con bromuro de etidio (10 µL de una solución 100mg/ml en 200 ml de TBE 1x agitando suavemente durante 2 min).
- Desteñir con agua destilada por 5 minutos.
- Colocar el gel en el equipo analizador de geles.
- Utilizar el software del equipo para detectar la expresión del gene.

Servicios

- Agua, energía eléctrica.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Amortiguador de carga 5X

50mM Tris p H 8

75Mm EDTA p H 8

0.5% SDS

10% Ficoll

30% Sacarosa

0.2% Naranja G, Xilen Cyanol y Azul de Bromofenol

Agua bidestilada cbp 100ml

Marcador de peso molecular

Marcador de 50bp	1 µL
Agua	9 µL
Solución de carga	5 µL

TBE 10X (Tris- Ácido bórico- EDTA)

Tris 1M	121.10 g
Ácido Bórico 1M	61.38 g
EDTA 50 mM	14.61 g
Agua bidestilada cbp	1000 mL

Gel de acrilamida al 10%

	5.0 mL (1 gel)
Agua bidestilada	27.88 mL
TBE 10X	5.0 mL
Acrilamida/bis acrilamida 29:1	16.6 mL
APS 10%	480 µL
TEMED	36 µL

Nota. La acrilamida es neurotóxica, usar guantes y cubrebocas para prepararla y evitar el contacto con piel o mucosas.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**185/330**

4.2 PROTOCOLO PARA IDENTIFICAR LA PRESENCIA DEL TRANSGEN PROTEÍNA CRY1AC EN DIFERENTES MUESTRAS DE MAÍZ POR MEDIO DE LA TECNICA DE ELISA.

OBJETIVO

Determinar la presencia de la proteína Cry1Ac en extractos de diferentes fuentes de maíz mediante la técnica de ELISA.

MÉTODOS

Cuantificación de la proteína del maíz

Material y equipo

Mortero con pistilo

Ultrasonicador

Espectrofotómetro

Pipetas automáticas de 20, 100, 200, 1000

Puntas para pipetas

Tubos Eppendorf de 1.5 mL

Material biológico

Maíz

Germen de maíz

Reactivos

Patrón de albúmina 1mg/mL

Reactivo de BIO-RAD para cuantificación de proteínas

Soluciones

PBS 1X

Procedimiento

1. Macerar aproximadamente 1g de granos de maíz en un mortero.

2. Tomar 200 mg y diluirlo con 200 µL de PBS

3. Homogenizar la muestra en el ultrasonicador (3 pulsos de 20 mAmpers/10 seg.)

4. Cuantificar la cantidad de proteínas que contienen las muestras de maíz, para realizar una dilución de la proteína del maíz que quede en una concentración de 30 µg de concentración, para utilizarla en la técnica de ELISA. Para ese fin realizar una curva estándar con el patrón de albúmina (1mg/mL), en el espectrofotómetro 50 µL de reactivo Bio-RAD y 200 µL de agua bidestilada de la siguiente forma:

Número del tubo	µL de Albúmina	Concentración	Absorbancia
1	2	2	
2	4	4	
3	8	8	
4	16	16	

5	32	32
Blanco	--	--
Problema 1	0.5	0.5

5.- La absorbancia se lee a 595 nm utilice la curva para realizar los cálculos.

Servicios

- Agua, energía eléctrica, vacío

TÉCNICA DE ELISA

MATERIAL Y EQUIPO

Matraz aforado de 1L

Autoclave

Probeta de 100 mL

Probeta de 500 mL

Tubos Falcon de 15 y de 50 mL

Placa para ELISA

Pipetas automáticas de 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL

Puntas para pipetas

Tubos Eppendorf de 1.5 mL

Material biológico

Solución de germen de maíz (30 µg/1 µL)

Suero de conejo anti-Cry1Ac

Reactivos

NaCl Sigma

KCl Sigma

Na_2HPO_4 Sigma

KH_2PO4 Sigma

Agua destilada y estéril

Na_2CO_3 Sigma

$NaHCO_3$ Sigma

Tween 20 Sigma

Leche en polvo descremada

Proteína Cry1Ac

Aticuerpo policlonal anti-Cry1Ac

Anticuerpo anti-conejo marcado con peroxidasa

Streptavidina-peroxidasa

OPD O-fenilendiamina

PBS 1x

Solución amortiguadora de carbonatos

Solución de PBS + 0.05% Tween 20

Solución amortiguadora de carbonatos adicionada con 3% de leche (solución de bloqueo)

Dilución del suero de conejo anti- Cry1Ac 1:500, 1:4000

Dilución del anticuerpo comercial anti-conejo 1:6000

Straptavidina-peroxidasa 1:2500

Solución amortiguadora de citratos pH 5

Procedimiento

1.- Sensibilizar la placa de ELISA

a) Adicionar 100 µL de la solución de la proteína Cry1Ac (1000 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng preparada en amortiguador de carbonatos) en cada pozo de la placa de ELISA como se indica en el diagrama, excepto en los dos pozos que servirán como testigos sin proteína Cry en estos pozos se colocaran 100 µL de solución amortiguadora de carbonatos.

b) Adicionar 100 µL de extracto de maíz palomero (con una concentración de proteínas de 30 µg/mL) en los pozos marcados en la placa.

c) Adicionar 100 µL de extracto de maíz cacahuazintle (con una concentración de proteínas de 30 µg/mL) en los pozos marcados en la placa.

d) Adicionar 100 µL de extracto de maíz de tortilla (con una concentración de proteínas de 30 µg/mL) en los pozos marcados en la placa.

e) Adicionar 100 µL del extracto del maíz problema en los pozos (muestras de maíz que llevó cada equipo de estudiantes a una concentración de 30 µg/mL de proteína).

c) Incubar durante 2 hr a 37 ºC

d) Lavar la placa de ELISA 5 veces con solución PBS/ Tween 0.05%

2.- Bloqueo de la placa de ELISA

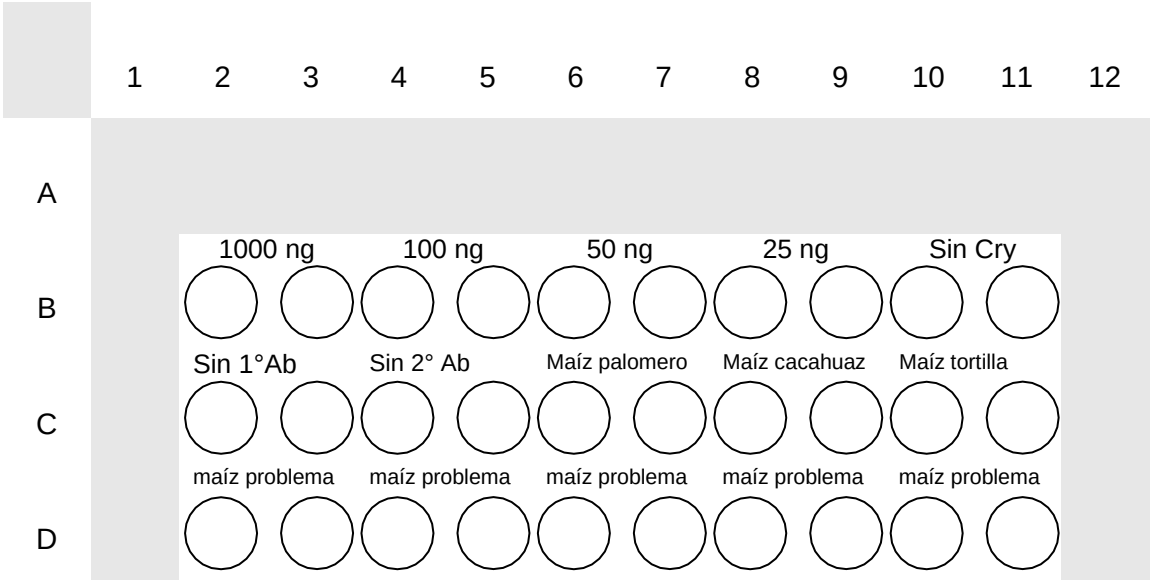
a) Colocar 100 µL de solución de bloqueo en cada uno de los pozos de la placa de ELISA.

b) Incubar durante toda la noche o bien 2 hrs. a 37 ºC.

c) Lavar la placa de ELISA 5 veces con solución PBS/ Tween 0.05%

3.- Adición del suero de conejo anti-Cry

a) Adicionar 100 µL de una dilución 1:4000 del suero de conejo anti-Cry1Ac en la placa de ELISA en todos los pozos exceptuando en los que se indica sin primer anticuerpo:



b) Adicionar a los pozos marcados “Sin Cry”, 100 µL de la dilución del suero de conejo 1: 500.

e) Incubar la placa de ELISA durante 2 hrs. a 37º C.

f) Lavar la placa de ELISA 5 veces con solución PBS/ Tween 0.05%

4.- Adición del anticuerpo comercial anti-conejo marcado con biotina.

a) Agregar 100 µL de la dilución 1:6000 del anticuerpo comercial a cada pozo de la placa de ELISA.

b) Incubar durante 1 hr a 37º C.

c) Lavar la placa de ELISA 5 veces con solución PBS/ Tween 0.05%

5.- Adición del complejo streptavidina-peroxidasa.

a) Agregar 100 µL de estreptavidina-peroxidasa (dilución 1:2500 en PBS/Tween 0.05%) a cada uno de los pozos.

b) Incubar 1hr a 37º C.

c) Lavar la placa de ELISA 5 veces con solución PBS/ Tween 0.05%

6.- Desarrollo del color

a) Agregar 100 µL de OPD O-fenilendiamina (0.4 mg/ml en amortiguador de citratos 0.03% de peróxido de hidrógeno) a cada uno de los pozos.

b) Incubar a temperatura ambiente y protegido de la luz durante 20 min.

7.- Lectura de los resultados

a) Colocar la placa de ELISA en el equipo Stat-Fax100 y se realiza la lectura a 450nm utilizando un filtro de 630 nm.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**192/330**

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

PBS.

Disolver 8 g de NaCl, 0.2 g de KCL, 1.44 g de Na_2HPO_4 y 0.24 g de KH_2PO_4, en 800 mL de agua destilada.

Llevar al aforo de 1 L.

Esterilizar durante 15 minutos a 121 ºC en autoclave.

Solución 0.2M de $NaCO_3$

Disolver 21.2 g de carbonato de sodio en 800 mL de agua destilada y llevar a 1000 mL.

Solución 0.2M de $NaHCO_3$

Disolver 16.8 g de bicarbonato de sodio en 800 mL de agua destilada y llevar a 1000 mL.

Amortiguador de CO_3

Mezclar 4.5 mL de una solución 0.2M de $NaCO_3$ con 8 mL de una solución 0.2M de $NaHCO_3$ y llevar a 50 mL con agua destilada.

Solución amortiguadora de CO_3 + 3% de leche descremada

Se disuelven 3g de leche en 100 mL de solución amortiguadora de CO_3.

Solución PBS + Tween 0.05%

Adicionar 50 µL de Tween en 100 mL de PBS.

Solución PBS/Tween 0.05%/ leche 0.02%

Disolver 0.02 g de leche descremada en 100 mL de solución PBS/Tween 0.05%.

Streptavadina-peroxidasa 1:2500:

Disolver 3.2 µL de estreptavadina- peroxidasa en 8 mL de solución PBS/Tween 0.05%.

OPD (O-fenilendiamina 0.04 mg/mL + 0.03% H_2O_2: (sustrato))

Pesar 0. 2 mg de O-fenilendiamina y disolver en 5 mL de amortiguador de citratos pH 5 y adicionar 1.5 µL de H_2O_2.

Diluciones del suero de conejo

1:500 Tomar 2 µL de suero de conejo y llevar hasta 1000 µL con solución PBS/Tween 0.05%/Leche 0.002%

1:4000 Tomar 125 µL de la dilución 1:500 y llevar hasta 1000 µL con solución PBS/Tween 0.05%/leche 0.002%

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**194/330**

4.3 PROTOCOLO PARA IDENTIFICAR LA PRESENCIA DEL TRANSGEN (proteína Cry1Ac) EN DIFERENTES MUESTRAS DE MAÍZ POR MEDIO DE LA TECNICA DE WESTERN BLOT.

OBJETIVO

Identificar el transgene Cry1Ac en diferentes fuentes de maíz utilizando el método de Western blot.

METODOLOGÍA:

Extracción de la proteína de maíz

Material y Equipo

- Microcentrífuga Eppendorf
- Vortex Genie
- Micropipetas Gilson
- Tubos Eppendorf
- Ultrasonicador
- Baño María

Material biológico:

- Maíz para tortilla
- Maíz palomero

- Maíz cacahuazintle

Reactivos

Amortiguador de lisis

Amortiguador de la muestra 5X

Amortiguador de corrida

Servicios

- Agua, energía eléctrica, vacío.

Procedimiento.

Extracción de las proteínas del maíz

1. Las semillas se germinan durante 48 hrs. en algodón humedecido con agua en la oscuridad a 20°C.

2. Cortar el germinado y macerar en 200 µL de amortiguador de lisis. Incubar 15 min a 4°C centrífugar a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C.

3. Cuantificar la proteína.

- Maíz para tortilla
- Palomero
- Cacahuazintle

4. Separar 20 µL del lisado y agregar 5 µL de amortiguador de la muestra 5X, hervir durante 5 minutos.

5. Separar las muestras en un gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) 12.5%

6. Transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa.

7. Realizar el inmunoblot utilizando un anticuerpo policlonal de conejo.

Servicios

- Agua, energía eléctrica, vacío

Electroforesis SDS-Page

La electroforesis SDS-PAGE se realiza de acuerdo al método de Laemmli, excepto que la concentración del gel concentrador es de 4.5% (apéndice 1). Las concentraciones finales en el gel separador son de 0.375 M Tris-HCl (Sigma) (pH 8.9), 0.1% p/v de SDS, y la concentración de acrilamida es de 12.5% p/v.

Los geles se polimerizan por la adición de 0.05% p/v de persulfato de amonio (Sigma) y tetrametiletileno-diamina (TEMED), (Sigma.) para el gel separador ó 0.1% de cada catalizador en el gel concentrador. El amortiguador de corrida (pH 8.3) contiene 0.025 M Tris, 0.192 M glicina. Se utilizan marcadores de peso preteñidos (Gibco) en el rango de 200 a 20 kDa. La electroforesis se realiza con un voltaje constante de 100V por 2 horas en una cámara vertical (ATTO).

1. Las proteínas separadas mediante electroforesis SDS-PAGE se transfieren a una membrana de nitrocelulosa en un aparato de transferencia semiseca, a

corriente constante de 125 mA durante 1.5 horas utilizando para este fin amortiguador de transferencia (apéndice 1).

2. La membrana de nitrocelulosa con las proteínas inmovilizadas se bloquea con albúmina bovina al 1% (p/v) en amortiguador TBS-Tween (apéndice 1) durante toda la noche a 4°C.

3.Incubar las membranas con el anticuerpo anti-Cry (1:750) diluído en TBS- BSA durante 1.5 horas con agitación constante.

4. Lavar las membranas 5 veces con TBS-Tween, cada lavado se realiza por 5 minutos.

5. Adicionar el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (1:7500) en TBS-BSA y se incuba en agitación durante 30 minutos.

6. Lavar las membranas 4 veces con TBS-Tween, cada lavado se realiza por 5 minutos, realizar 2 veces más con TBS (apéndice 1) por 5 minutos cada lavado

7. Revelar utilizando quimioluminiscencia (Pierce, U.S.A.).

Servicios

- Agua, energía eléctrica, vacío.

ANEXO PREPARACIÓN DE GELES Y REACTIVOS

Gel Separador al 12.5%

Acrilamida-Bisacrilamida 30 % solución stock	4.1 mL
Amortiguador del gel separador 0.375 M pH 8.8 solución stock	1.25 mL
SDS 10% solución stock	100 μL
Persulfato de amonio 1.5% solución stock	0.5 mL
Agua destilada	3.98 mL
TEMED	15 μL

Gel concentrador

Acrilamida-bisacrilamida 30 % solución stock	1.25 mL
Buffer gel concentrador 1.125M pH 6.8	2.50 mL
SDS 10% solución stock	100 μL
Persulfato de amonio 1.5% solución stock	0.50 mL
Agua destilada	5.60 mL
TEMED	15 μL

SOLUCIONES

Acrilamida-Bisacrilamida

Bisacrilamida	0.80 g
Acrilamida	30.0 g

Disolver en aproximadamente 40 mL de agua destilada, posteriormente se afora a 100 mL si es necesario. Almacenar a 4 °C.

Usar guantes, cubre bocas y goggles ya que son reactivos neurotóxicos.

Amortiguador del gel concentrador

Disolver 6.05 g de Tris en 40 mL de agua, ajustar el pH a 6.8 y aforar a 100 mL concentración final de 1.125 M. Almacenar a 4° C.

Amortiguador del gel separador

Disolver 36.3 g de Tris en 50 mL de agua, ajustar el pH a 8.8 y aforar a 100 mL Concentración final de 0.375 M. Almacenar a 4 °C.

Amortiguador de corrida 5X

Glicina	72.0 g
Tris	15.0 g
SDS	5.0 g

Disolver el SDS en 100 mL de agua destilada, posteriormente disolver los demás reactivos y aforar a 1 litro.

Amortiguador de Laemmli 5X

Tris 1 M pH 6.8	3.12 mL
SDS	1.00 g
Azul de bromofenol	0.005 g
Glicerol	5.00 mL
Agua milli Q	2.00 mL

Primero disolver el SDS en los 2 mL de agua y posteriormente agregar los demás reactivos.

Amortiguador de transferencia

Tris	3.02 g
Glicina	14.4 g
SDS	0.5 g

Se lleva a 700 mL con agua destilada y se ajusta el PH a 8.3, se afora a 800 mL y se agrega 200 mL de metanol.

TBS

NaCl 5 M solución stock	30 mL
Tris 1 M solución stock	20 mL

Aforar a 1 litro

TBS-Tween 20

500 mL de TBS más 500 μL de tween 20.

5. CUESTIONARIO.

1.- Defina que es un organismo genéticamente modificado y como se generan

2.- ¿Para que sirve identificarlos?

3.- Explique el fundamento de la técnica de PCR

4.- Explique el fundamento de la técnica de ELISA

5.- Explicar el fundamento de la técnica de Western blot.

6.- ¿Como interpreta los resultados de PCR, ELISA y Western blot?

7.- Explique las principales complicaciones que se pueden presentar al consumir alimentos transgénicos.

8- Indique 3 genes que se utilicen como reporteros en las construcciones de organismos transgénicos.

6. RESULTADOS ESPERADOS

Para la técnica de ELISA, se espera que el alumno obtenga una coloración amarilla en los pozos de los controles positivos y la intensidad se puede detectar por espectrofotometría a medida que se presente mayor coloración amarilla, la concentración del transgene es mayor.

Para la técnica de Western blot, se espera que se obtengan bandas intensas en los controles positivos, mientras que en los negativos no se deben obtener bandas después del proceso de revelado.

En la técnica de PCR se espera que la tinción con bromuro de etidio de los geles de acrilamida revele bandas en los carriles donde se ubiquen los controles positivos y no se esperan bandas en los controles negativos, los resultados se deben comparar con un marcador de peso molecular para productos de PCR.

7. . REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Recillas-Targa F: **Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals.** *Mol Biotechnol* 2006, **34:**337-354.

2. Coutelle C, Themis M, Waddington SN, Buckley SM, Gregory LG, Nivsarkar MS, David AL, Peebles D, Weisz B, Rodeck C: **Gene therapy progress and prospects: fetal gene therapy--first proofs of concept--some adverse effects.** *Gene Ther* 2005, **12:**1601-1607.

3. Bockamp E, Maringer M, Spangenberg C, Fees S, Fraser S, Eshkind L, Oesch F, Zabel B: **Of mice and models: improved animal models for biomedical research.** *Physiol Genomics* 2002, **11:**115-132.

4. Melo EO, Canavessi AM, Franco MM, Rumpf R: **Animal transgenesis: state of the art and applications.** *J Appl Genet* 2007, **48:**47-61.

5. Mikkola HK, Orkin SH: **Gene targeting and transgenic strategies for the analysis of hematopoietic development in the mouse.** *Methods Mol Med* 2005, **105:**3-22.

6. Velkov VV, Medvinsky AB, Sokolov MS, Marchenko AI: **Will transgenic plants adversely affect the environment?** *J Biosci* 2005, **30:**515-548.

7. Fortier M, Vachon V, Marceau L, Schwartz JL, Laprade R: **Kinetics of pore formation by the Bacillus thuringiensis toxin Cry1Ac.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1768:**1291-1298.

8. Romeis J, Meissle M, Bigler F: **Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control.** *Nat Biotechnol* 2006, **24:**63-71.

9. Varzakas TH, Arvanitoyannis IS, Baltas H: **The politics and science behind GMO acceptance.** *Crit Rev Food Sci Nutr* 2007, **47:**335-361.

10. Masri S, Rast H, Ripley T, James D, Green M, Jia X, Devlin RH: **Detection of genetically modified coho salmon using polymerase chain reaction (PCR) amplification.** *J Agric Food Chem* 2002, **50:**3161-3164.

11. Clark BW, Phillips TA, Coats JR: **Environmental fate and effects of *Bacillus thuringiensis* (Bt) proteins from transgenic crops: a review.** *J Agric Food Chem* 2005, **53:**4643-4653.

12. Huang HY, Pan TM: **Detection of genetically modified maize MON810 and NK603 by multiplex and real-time polymerase chain reaction methods.** *J Agric Food Chem* 2004, **52:**3264-3268.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**203/330**

PRACTICA 7. DETECCIÓN DEL POLIMORFISMO DE UN SOLO NUCLEÓTIDO R230C DEL GEN ABCA1, ASOCIADO CON UNA MAYOR SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 Y OBESIDAD

1. OBJETIVO

Que el alumno desarrolle experimentalmente la metodología que le permita detectar el SNP R230C.

2. INTRODUCCIÓN.

El alarmante incremento en la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 (DT2) y otras características asociadas como la obesidad, y distintas dislipidemias en la población en general han llegado a ser un reto para los sistemas de salud de todo el mundo, principalmente por el enorme impacto socio-económico de la enfermedad. En México en el año 2003, las estadísticas de la Secretaría de Salud registraron 59,119 muertes debidas a complicaciones por la diabetes mellitus, lo cual la coloca en la primera causa de mortalidad general; ya que concentra el 12,6 % de las muertes en ese año. Asimismo, la prevalencia de diabetes en México ha crecido diez veces en los últimos 25 años y actualmente es una de las más altas en todo el mundo (12.8%). Además, en México cerca del del 20% de los pacientes desarrollaron la enfermedad antes de los 45 años.

La diabetes es una enfermedad compleja y genéticamente heterogénea, por lo que la identificación y comprensión de sus bases genéticas representa una de las estrategias más prometedoras para instaurar mejores alternativas de tratamiento y de pronóstico para cada paciente, así como para entender la influencia de los factores ambientales en la patogénesis de la enfermedad. De ahí la enorme importancia que tiene que los alumnos conozcan las bases genéticas de la enfermedad y que además manejen la metodología que les permita realizar un escrutinio molecular de la presencia de variantes de secuencia en genes clave (p. ej. Abca1) asociados con un incremento en la susceptibilidad a desarrollar diabetes mellitus tipo 2, obesidad y síndrome matabólico, con el fin de informar a los individuos afectados las medidas preventivas. Este conocimiento permitiría un mejor manejo tanto de hábitos alimenticios como de ejercicio físico lo que podría llevar a los individuos portadores de susceptibilidad

genética a un retraso e inclusive, a que no se presente la enfermedad y como consecuencia una mejor calidad de vida.

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

3.1 La Diabetes Mellitus (DM)

La diabetes mellitus, es un grupo de enfermedades que se caracterizan por una alteración en el metabolismo de los carbohidratos, se manifiesta por una elevación de la glucemia y un conjunto de anormalidades metabólicas acompañadas de deterioro general del organismo como: la arteriosclerosis, la retinopatía, alteraciones de la función renal y la neuropatía. Afecta a unos 150 millones de personas en todo el mundo.

Se conocen dos grandes grupos de diabetes: 1) la diabetes insulinodependiente (DMID) y 2) la diabetes no insulinodependiente (DMNID). La primera aparece a una edad promedio de 12 años, no se relaciona a la obesidad, con tendencia a la perdida de peso, a la acidosis y con riesgo de desarrollar coma; Los pacientes requieren insulina, y en algunos casos es posible demostrar la presencia de autoinmunidad. La segunda (DMNID) aparece más tardíamente, a partir de los 30 años, es más frecuente, generalmente se presenta en personas obesas. Con el empleo de hipoglucemiantes orales es posible disminuir las complicaciones de la diabetes. Usualmente no se incluye a la insulina como parte del tratamiento de estos pacientes.

Diversos investigadores han aportado evidencia de los factores genéticos en la patogénesis de la diabetes mellitus (DM) por ejemplo: a) Los estudios en gemelos han demostrado una mayor proporción de concordancia para DT2 en los gemelos monocigóticos que en los gemelos dicigóticos [1, 2], b) Los análisis de segregación han demostrado que en la mayoría de las familias, la DM muestra un complejo patrón hereditario donde los parientes de primera generación tienen un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad que la población en general, c) La inactivación selectiva de diferentes genes en los modelos animales, causa resistencia a la insulina, daño en la secreción de la insulina y fenotipos diabéticos, d) El estudio del mapa genético del genoma completo ha demostrado la participación de diferentes regiones cromosómicas que confieren susceptibilidad a desarrollar diabetes.

3.2 Formas o variedades genéticas de la DM

2.2.1 Formas Monogénicas

Algunas formas de DM son el resultado de mutaciones en un solo gen y por eso se les llama monogénicas, mientras que otras (la mayoría) son de origen multifactorial o poligénicas. Las formas monogénicas representan aproximadamente sólo el 5% de los casos de DM y se originan por mutaciones en genes que codifican para: a) la insulina, b) el receptor de insulina, c) la enzima glucocinasa (GCK), d) los factores de transcripción (HNF-1α, HNF-1β, HNF-4α, NeuroD1/BETA2, o factor promotor de insulina-1, IPF) [3-7]. Estas formas monogénicas de DM no son insulinodependientes, son de aparición temprana (menor a 25 años) y de herencia autosómica dominante, por lo que se expresan en todos los individuos que presentan la mutación en una copia; las variedades anteriores generalmente se describen como diabetes tipo MODY (de las siglas en inglés: maturity-onset diabetes of the young). Otra forma monogénica de DM la ocasiona la mutación en genes mitocondriales heredado por línea materna, y está asociada a defectos en la fosforilación oxidativa y sordera p.ej síndrome MELAS [8]. Finalmente, se han descrito otras formas monogénicas de la DM son: la diabetes neonatal transitoria y la diabetes neonatal permanente. La transitoria se inicia en las primeras 6 semanas de vida y los pacientes se recuperan a los 18 meses. Es el resultado de la sobre expresión de un gen heredado en el locus 6p24 [9]. La diabetes neonatal permanente es un desorden autosómico recesivo raro que se origina por mutaciones en el gen EIFAK3 que codifica para una cinasa que funciona como factor de iniciación [10].

3.2.2 Formas poligénicas

De las formas poligénicas de DM, numéricamente las más importantes, se describen dos grandes grupos: la diabetes insulinodependiente, también llamada diabetes mellitus tipo 1 (DT1) y la diabetes no insulinodependiente o también llamada diabetes mellitus tipo 2 (DT2). La DT1 representa un 5-10% de todos los casos de DM, su gen principal de susceptibilidad se ubica en la región HLA del cromosoma 6. Aparece a una edad promedio de 12 años, sin obesidad, con tendencia a la perdida de peso, a la acidosis y un riesgo aumentado de desarrollar coma; los pacientes requieren insulina; se considera en general como resultado de una destrucción autoinmune de las células beta del páncreas.

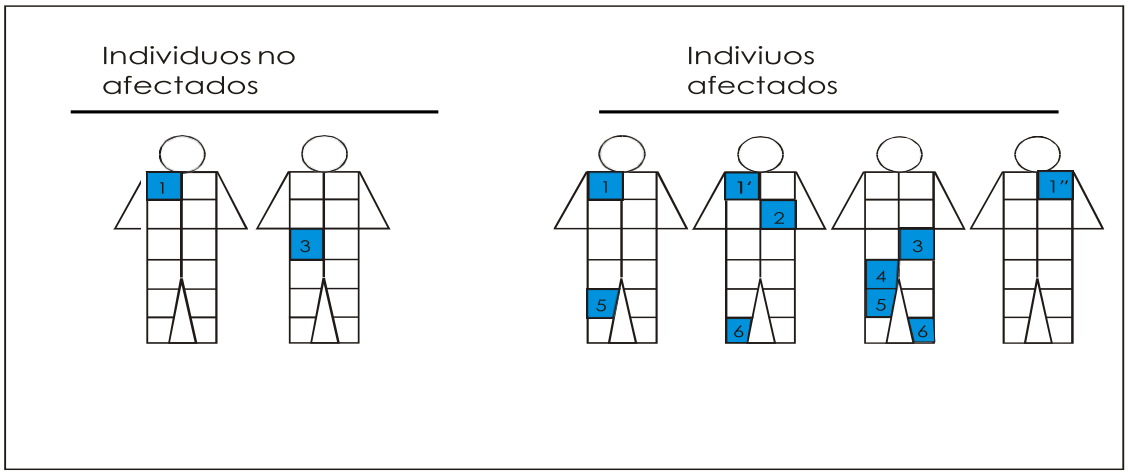


Figura 1. Complejidad genética de la diabetes. La DMT2 ocurre como resultado de una sutil alteración de varios genes (frecuentemente polimorfismos de un solo nucleótido o SNP´s). Diferentes genes de susceptibilidad (cuadros obscuros) están involucrados en el desarrollo de la enfermedad. El número y las combinaciones de los genes de susceptibilidad pueden ser distintos entre dos pacientes diabéticos. Los individuos sanos pueden portar genes de susceptibilidad y no desarrollar diabetes porque el efecto individual de cada gen no es suficiente para causar la expresión de la enfermedad. En la figura, el gen 1 participa como un gen susceptibilidad en individuos diferentes. Las mutaciones normalmente difieren entre los individuos y las poblaciones, que se representan con números y regiones distintas. En las formas monogénicas de DM uno de estos genes puede ser completamente responsable para el desarrollo de diabetes (variante 1''), ejemplos de esos genes son: la glucosinasa, el factor nuclear de hepatocitos y el factor transcripcional IPF-1 (tomado de Tusié Luna, 2005).

La DT2 es la forma más común de diabetes ya que representa aproximadamente el 90% de los casos. En general es el resultado de las alteraciones de varios genes, cada uno da un efecto parcial y aditivo, aunque se ha descrito que aproximadamente del (5-10% de los casos puede ser consecuencia de la alteración de solo un gen) [11]. Aparece más tardíamente (más de 45 años), generalmente se presenta en personas obesas; en los individuos afectados la disminución progresiva de la secreción de insulina por las células beta del páncreas genera resistencia periférica a la insulina ocasionando incremento en la demanda de esta hormona. En la DT2, variedad poligénica, los estudios de secuenciación y mapeo del genoma completo han demostrado la participación de diferentes mutaciones en regiones cromosómicas que confieren susceptibilidad a desarrollar DT2 (loci de susceptibilidad); el número y combinación de las mutaciones de estos genes de susceptibilidad normalmente son distintos entre diferentes individuos y también varían de una población a otra (p.ej.

entre la población mexicana y la asiática), aunque en una población dada habrá normalmente predominio de alguna (s) combinación (es). De tal forma que, el efecto de una mutación única en un gen de susceptibilidad no es suficiente para que se desarrolle DT2, sólo el efecto aditivo de estas mutaciones, en ciertas combinaciones, confieren la susceptibilidad genética (Figura 1). La enfermedad solo se desarrollará cuando ciertos factores de riesgo favorezcan la expresión, tal como la obesidad, el estilo de vida sedentario o las dietas ricas en grasas; así pues los factores ambientales juegan un importante papel favoreciendo o retrasando el desarrollo de la enfermedad, es importante indicar que el mecanismo específico por el cual estos factores afectan el metabolismo de la glucosa todavía no está bien comprendido.

3.3 Estrategias para definir los componentes genéticos de la DM

En la DM como en otras enfermedades poligénicas, se han realizado estudios de secuenciación de ADN, PCR convencional y PCR en tiempo real para desarrollar el mapeo genético, enfocado a detectar variantes de secuencia en el ADN. Los denominados polimorfismos de un solo nucleótido o SNP's (de sus siglas en inglés: Single Nucleotide Polymorphism) son las variaciones del genoma más frecuentes. Los estudios de asociación caso-control consisten en determinar la frecuencia de distintos SNPs entre individuos con DM y en individuos sanos, Los resultados se someten a análisis estadísticos para demostrar asociaciones significativas entre alguna(s) de esta(s) variantes y la susceptibilidad de desarrollar la enfermedad en diferentes poblaciones. Así pues; un individuo podrá poseer dos copias de la secuencia o gen "original" (homocigoto, genotipo T/T), una copia de la secuencia original y otra con la mutación (heterocigoto, genotipo T/C) o tener ambas copias con la variante (homocigoto, genotipo C/C) lo que origina diferentes combinaciones genotípicas. La importancia de los SNPs radica en que se postula que estas variaciones aportan en la actualidad los datos de mayor utilidad para el análisis genético de enfermedades poligénicas no-mendelianas en relación a la susceptibilidad de los individuos a desarrollar dichas enfermedades, así como las reacciones adversas a distintos medicamentos, además, cuando ocurren en regiones no codificantes, pueden servir como marcadores genéticos de genes vecinos relacionados con enfermedades.

3.4 Los genes y regiones cromosómicas que están asociadas al desarrollo de DMT2

3.4.1 Calpaína 10 (calp10)

El gen de la calpaína-10 presente en el brazo largo del cromosoma 2 se describió como un gen de susceptibilidad para la DT2 a través de estrategias de ligamiento genético. La calpaína-10, se expresa en todos los tejidos, se conocen 8 isoformas, producidas por procesamiento alternativo del ARNm y es un miembro de la familia de cisteína-proteasas dependientes de calcio no lisosómicas; procesa una variedad de sustratos involucrados con muchas funciones celulares incluidas la reconstrucción del citoesqueleto, enzimas que metabolizan glucosa, proliferación, diferenciación y transformación celular, y la apoptosis. Recientemente, se ha descrito que la calpaína participa en la regulación de la exocitosis de la insulina y en el recambio de glucosa mediada por insulina. Los SNP's que se han asociado con susceptibilidad a DT2 son: SNP-43, SNP-19, y SNP-63 en población Mexico-Americana [12]; y SNP-44 (variante intrónica G>A) con incremento del riesgo en 2.72 veces y SNP-110 (A>G) en población Mexicana [13]. Las variantes intrónicas tales como SNP-44 y SNP-43 probablemente alteran la regulación transcripcional del gen, mientras que otras variantes afectan la secuencia codificante Pro200Thr y Thr504Ala. Finalmente, es importante mencionar que el efecto de cada variante (SNP) es pequeña sobre el riesgo a desarrollar DT2, por lo tanto es importante establecer la contribución de varios SNP's (haplotipos) en un solo gen o locus e incluso evidenciar el papel de variaciones de secuencia en distintos genes.

3.4.2 abca1

Otro hallazgo reciente en cuanto a susceptibilidad a DT2 lo constituye el gen ABCA11 (de las siglas en inglés ATP-Binding Cassette transporter subfamilia A1) que codifica una proteína de membrana que funciona como transportador celular de colesterol; los estudios de este gen en ratones knock-out revelan que desempeña un papel importante en la biogénesis de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) al transportar el colesterol y los fosfolípidos intracelulares a un aceptor apolipoproteico. Su inactivación sugiere que la acumulación de colesterol intracelular resultante pudiera contribuir a una disfunción de las células beta en la DT2. Dado que en la diabetes mellitus se presenta un descenso de los niveles plasmáticos de HDL-C. Considerando

el papel de este tranportador en la célula beta pancreática productora de insulina, en cuanto al eflujo del colesterol, las variantes de secuencia que afecten su función pueden ser polimorfismos de riesgo para el desarrollo de la diabetes mellitus [14].

La DT2 se caracteriza por la incapacidad del páncreas para secretar suficiente insulina para satisfacer el aumento en la demanda metabólica (resistencia a la insulina), lo que en general se asocia con obesidad [15]. Un mecanismo para explicar esa disfunción es la acumulación tóxica de lípidos, lo que conduce a la apoptosis de las células beta y a la disminución progresiva de la secreción de insulina. Los triglicéridos y los ácidos grasos libres saturados como el palmitato, incrementan la producción de ceramida también puede inducir la disfunción y muerte de las células beta por apoptosis.

La alta frecuencia de la variante funcional R230C de ABCA1 en la población mexicana provee una excelente oportunidad de determinar asociaciones con niveles bajos de HDL-C, así como con otros rasgos clínicos y metabólicos como HDL bajo o síndrome metabólico [16] La asociación de la variante R230C con el índice de masa corporal en la población mexicana es más fuerte que la observada con los niveles bajos de HDL- C, además la variante es más frecuente en personas diabéticas con un incremento en el riesgo de cuatro veces con respecto a los que no la presentan [16].

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**210/330**

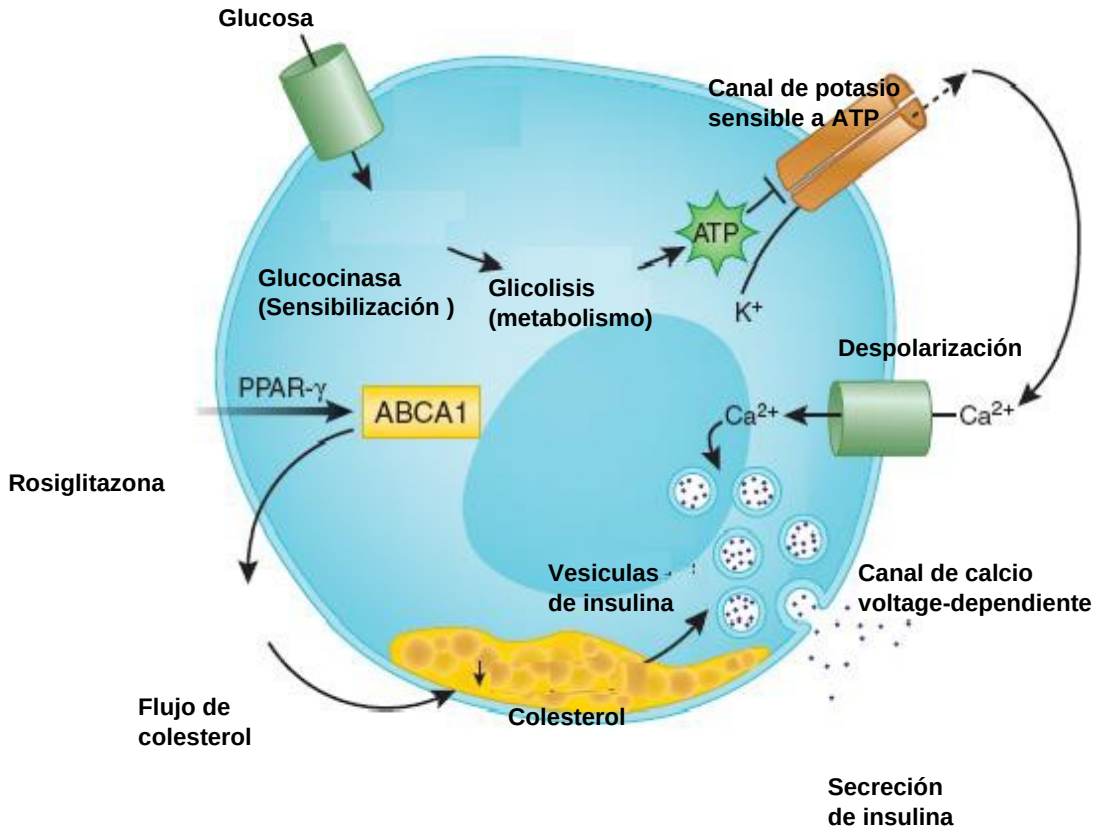


Figura 2. Vías involucradas en la secreción de insulina en las células β-pancreáticas. La vía "clasica" involucra un transportador de glucosa (conocido como transportador de glucosa 2, GLUT2), la entrada de la glucosa activa a la glucocinasa y al metabolizarse la glucosa vía la glucólisis se produce ATP, lo que permite el cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP. Lo anterior despolariza la membrana citoplasmática y abre los canales voltaje-dependientes de Ca^{++}, la entrada de Ca^{++} causa la exocitosis de insulina. Por otro lado, el ABCA1 en las células β es crítico para la secreción de insulina por la modulación de la homeostasis del colesterol intracelular. Este efecto es independiente del transportador de glucosa y del metabolismo de la glucosa. El incremento en la secreción mediada por el fármaco rosiglitazona (el cual activa PPAR-γ) requiere el ABCA1, lo que sugiere que la regulación de los niveles de colesterol en la membrana afecta la función de las células β en la diabetes mellitus tipo 2 (imagen modificada de Brunham et al, 2007).

3.5 Factores ambientales y su interacción con los componentes genómicos de la diabetes mellitus

Se ha discutido por muchas décadas la influencia del estilo de vida y los hábitos de la dieta en el comienzo y el progreso de la diabetes. Sin embargo, el mecanismo específico por el cual estos factores afectan el metabolismo de la glucosa no está bien comprendido. Se conoce que los ácidos grasos no-esterificados (NEFA) modifican la función de las células β-páncreas. Los NEFA aislados de islotes humanos pueden alterar la secreción de insulina y reducir el contenido de insulina de los islotes pancreáticos. Además, cuando se incrementa el nivel de glucosa, el efecto perjudicial de los NEFA en las celulas β-páncreas es mayor [17].

La prevalencia de diabetes en nuestro país ha crecido diez veces en los últimos 25 años, y actualmente es una de las más altas en todo el mundo (12.8%). En México alrededor de 2 de cada 10 pacientes desarrollan la enfermedad antes de los 40 años. Esto sugiere que la población mexicana muestra una alta susceptibilidad a desarrollar diabetes, tal vez debido a: el tipo y número de genes involucrados, la influencia de los factores ambientales como cambios en el estilo de vida, la migración de la zona rural a la urbana y la adquisición de hábitos dietéticos más occidentales.

3.6 Técnicas de biología molecular para el estudio de genes de susceptibilidad a diabetes mellitus

3.6.1 Extracción de ADN

Las técnicas que implican el análisis del ADN se han extendido en muchas áreas de la investigación. Desafortunadamente el transporte de las muestras del punto de la recolección implica riesgos y la posibilidad de degradación de la muestra debido a la variación en la temperatura, además que la sangre es un excelente medio de cultivo para diversos microorganismos. El ADN extraído también se puede degradar en el laboratorio, lo que origina problemas para el re-análisis de muestras [18].

En este protocolo se utiliza el papel FTA® para el almacenamiento de las muestras biológicas de sangre. Estas tarjetas se emplean en la identificación humana forense [19]. El proceso requiere de un lavado simple "in-situ", en donde las impurezas se eliminan y la muestra de ADN se conserva adherida en el papel. El almacenaje del material en estos papeles permite la reutilización del ADN en cualquier momento, además de espacio-eficiente de almacenaje a temperatura ambiente de las muestras y

un transporte barato de la muestra por correo o en equipaje personal. La facilidad de transporte y del almacenaje de muestras en seco hacen al papel un medio práctico para que los investigadores adquieran colecciones grandes de muestras de referencia [18].

2.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR ("Polymerase chain reaction"), es una técnica que desarrollo Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico. El método utiliza un par de oligonucleótidos sintéticos también conocidos como primers, iniciadores o cebadores, cada uno hibrida a una hebra del ADN blanco de doble cadena (dsADN), este par extiende una región que se puede reproducir exponencialmente. El primer hibridado actúa como un sustrato para la enzima ADN polimerasa (obtenida a partir de una bacteria llamada *Thermophilus aquaticus* o Taq) que sintetiza una hebra complementaria mediante la adición secuencial de desoxriboinucleótidos.

La secuencia de los oligonucleótidos iniciadores es responsable de la amplificación específica del fragmento deseado y para su diseño es indispensable conocer la secuencia del ADN blanco. Éste uno de los parámetros más importantes que determina la especificidad de la PCR, su elección y diseño debe ser muy cuidadoso. Idealmente, en cada 100 µL de la reacción, la concentración aceptable de cada oligonucleótido oscila entre 0.05 y 1.0 µM. el uso de concentraciones mayores favorece la amplificación de regiones inespecíficas y la formación de dímeros de oligonucleótidos.

La PCR es tan sensible que la amplificación puede iniciarse en teoría a partir de una sola molécula de ADN. Los genes de una sola copia en el genoma se pueden amplificar fácilmente. La concentración de ADN blanco en la reacción depende de la fuente utilizada, e idealmente se requieren aproximadamente 10^5 copias de ADN blanco, esto es, de 300 ng a 1 µg de ADN genómico humano. La enzima ADN polimerasa termoestable que más se utiliza para la PCR es la *Taq*. Su índice de error de incorporación es de 1 a 4 x 10^{-4} bases y amplifica sin dificultad segmentos de hasta 3000 pb [22].

La concentración de iones magnesio es importante en la especificidad de la reacción. Concentraciones muy altas conducen a una baja especificidad, dando como resultado productos indeseables, mientras que las concentraciones mínimas necesarias disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos. El ion Mg^{2+} se utiliza

como cofactor para la actividad enzimática de la mayoría de las ADN polimerasas. Para una reacción estándar se recomienda utilizar una concentración final de $MgCl_2$ entre 0.5 y 2.5 mM [22].

Al igual que el $MgCl_2$, las concentraciones mínimas necesarias de dNTP's disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos, mientras que las concentraciones muy altas disminuyen la especificidad de la reacción, por lo que la concentración de dNTP's también debe calibrarse. Concentraciones entre 20 y 200 µM proporcionan resultados óptimos, debiéndose igualar la concentración de cada uno de los cuatro dNTP's [22].

Teóricamente, en condiciones óptimas el nivel de amplificación del ADN en la PCR aumenta en forma exponencial con cada ciclo; sin embargo en la práctica, después de determinado número de ciclos, la amplificación se detiene gradualmente. Entra primero a una fase lineal y luego a una estacionaria, a la que se denomina fase de "meseta" se debe al agotamiento de la actividad enzimática y a la insuficiencia para llevar a cabo la extensión del número masivo de complejos ADN blanco- oligonucleótidos, presentes en los ciclos que anteceden a este fenómeno. Esto puede evitarse si se aumenta el tiempo de extensión en los últimos ciclos de la reacción o la cantidad de la enzima, aunque lo recomendable es ajustar el número de ciclos de tal manera que la amplificación se realice al obtenerse los niveles máximos de amplificación en una reacción que presente comportamiento lineal. El número de ciclos promedio oscila entre 20 y 30, dependiendo de la cantidad de ADN inicial. Las temperaturas de desnaturalización (92 a 98ºC) y extensión (70 a 74ºC) son generalmente estándares para todas las reacciones. La temperatura que tiene el efecto más crítico en la especificidad es la de alineación, la cual está determinada principalmente por la temperatura media de fusión (TM) de los oligonucleótidos. Los oligonucleótidos se aparean a una determinada temperatura de alineación por complementaridad al ADN blanco. El alto grado de complementaridad entre las bases nitrogenadas de los oligonucleótidos y del ADN blanco permite utilizar altas temperaturas de alineación, lo que favorece la especificidad de la reacción. Cuando la temperatura de alineamiento es muy baja existe mayor probabilidad de que los oligonucleótidos se apareen a regiones no específicas del ADN blanco y que también se extienden, toda vez que la polimerasa *Taq* posee actividad aún a bajas temperaturas. Utilizando temperaturas de hibridación entre 55 a 65ºC se reducen grandemente los sucesos de apareamiento inespecífico [19].

2.6.3 Electroforesis

Cerca del pH neutro, las moléculas de ADN tienen una carga negativa y por lo tanto migran hacia el electrodo positivo durante la electroforesis en gel. Debido a que la matriz del gel restringe la difusión aleatoria de las moléculas, las que tienen la misma longitud migran juntas como una banda cuyo ancho iguala al del carril en el que se colocó la mezcla de ADN original al inicio del corrimiento electroforético. Las moléculas más pequeñas se mueven más rápidamente que las grandes**,** de manera que las moléculas de diferentes tamaños migran como bandas distintivas [20].

Después de la electroforesis, es posible detectar las moléculas de ADN por medio de la tinción del gel con colorantes fluorescentes, como el bromuro de etidio, que se une al ADN y se intercala entre las pares de bases. La unión concentra al etidio en el ADN y también incrementa su fluorescencia intrínseca, como resultado, cuando el gel se ilumina con la luz ultravioleta, las regiones del gel que contienen ADN fluorescen con mayor intensidad que las regiones del gel sin ADN [21].

Se utilizan dos tipos alternativos de matrices de gel: la poliacrilamida y la agarosa. La poliacrilamida tiene una capacidad elevada de resolución pero solo puede separar las moléculas de ADN dentro de un intervalo de tamaño estrecho. Por lo tanto, la electroforesis a través de poliacrilamida puede diferenciar moléculas de ADN que solo difieren en un par de bases pero únicamente cuando la molécula tiene hasta algunos cientos de pares de bases. La agarosa tiene una potencia resolutiva menor que la poliacrilamida pero permite diferenciar moléculas de ADN que cuentan con decenas o incluso centenas de kilopares de bases [20].

2.6.4 Corte con endonucleasas de restricción

Las endonucleasas de restricción son enzimas que escinden las moléculas de ADN de doble hélice en sitios determinados por medio del reconocimiento de secuencias específicas. En los casos típicos las enzimas de restricción que se emplean en biología molecular reconocen secuencias cortas (4-8 pb), que por lo general son palíndromos, y las cortan en una posición determinada dentro de la secuencia [20]. La enzima de restricción BSP119I, corta el ADN en la siguiente secuencia:

5’….TT↓CGAA...3’
3’….AAGC↓TT…5’

2.6.5 Secuenciación. Método de terminación de cadena o método didesoxi de Sanger.

La caracterización de cualquier fragmento de ADN requiere la determinación de su secuencia de nucleótidos, Sanger y cols, crearon el método que mas se utiliza para determinar la secuencia exacta de nucleótidos de un fragmento de ADN de hasta ≈ 500 nucleótidos de longitud [21].

El método comienza desnaturalizando un fragmento de ADN de doble cadena, para generar hebras molde para la síntesis *in Vitro.* Un oligodesoxinucleótido sintético se utiliza como cebador para cuatro reacciones de polimerización separadas, cada una con una concentración baja de uno de los cuatro ddNTP (dideoxiribonucleótidos) además de una concentración alta de dNTP's (desoxiribonucleotidos) normales. En cada reacción, el ddNTP se incorpora al azar en las posiciones del dNTP correspondiente, lo que provoca la terminación de la polimerización en esas posiciones de la secuencia. La inclusión de marcadores fluorescentes de diferentes colores en cada uno de los ddNTP permite distinguir cada conjunto de fragmentos truncados. Así, todos los fragmentos truncados que terminen con G fluorecerán de un color (p. ej., amarillo) y los que terminan con A fluorecerán con otro color (p. ej., rojo) sin importar sus longitudes. Las mezclas de fragmentos truncados hijos de cada una de las cuatro reacciones se someten a electroforesis sobre geles de poliacrilamida especiales que pueden separar las moléculas de ADN de hebra simple que difieren en una longitud de un solo nucleótido. En las máquinas automatizadas de secuenciación se ubica un detector fluorescente que puede distinguir las cuatro marcas fluorescentes en el extremo de la región amplificada. La secuencia de la hebra molde de ADN original puede determinarse por el orden en el cual los diferentes fragmentos marcados pasaron por el detector fluorescente [21].

4. METODOLOGÍA*.*

4.1 Material y equipo.

- Muestras de sangre humana
- Controles positivos de ADN humano para el polimorfismo

4.1.2 Material de laboratorio.

- Guantes de látex
- Tubos Eppendorf de1.5 mL, nuevos y estériles
- Puntas para micropipetas: 10 µL, 200 µL, 1000 µL, nuevas y estériles

4.1.3 Equipo

- Balanza analítica, Scientech
- Cámara de electroforesis Bio-Rad
- Campana de flujo laminar, Veco
- Fuente de Poder Bio-Rad
- Microcentrífuga, Eppendorf 5415C
- Micropipetas Eppendorf: 2.0 µL, 10 µL, 20 µL, 100 µL, 1000 µL.
- Micropipetas Gilson: p20, p200, p1000.
- Microperforador, Harris
- Termociclador, Eppendorf
- Vortex Genie 2, Daigger
- Transiluminador.

4.1.4 Reactivos

- Ácido bórico, USB.
- Agua destilada estéril.
- Agua calidad Millipore.
- Acrilamida ICN.

- Amortiguador PCR 10X
- APS al 10%
- Bis acrilamida, Sigma.
- Bromuro de etidio, Sigma
- Cloruro de magnesio 25mM, Sigma.
- dNTP's (desoxirribonucleótidos de trifosfato), Pharmacia.
- Etanol al 70%.
- EDTA, Sigma.
- EDTA 0.5M pH 8.0
- Ficoll, Sigma
- Gelatina 20 mg/mL, Sigma.
- Marcador de peso de molecular 50 pb Promega
- Mezcla de Primers o cebadores Foward y Reverse 20 μM,

  Foward: GTC TGT GCA ATG GAT CAA AAT CA

  Reverse: GCT TCA GGA TGT CCA TGT TGG TTC
- Sacarosa, Sigma
- SDS (Lauril sulfato de sodio), Sigma
- Reactivo FTA comercial Whatman.
- Reactivo de lavado del papel FTA preparado en el laboratorio.
- Solución de carga sin colorante.
- Solución de acrilamida/bisacrilamida al 30%
- Taq polimerasa 5 U/μL (AmpliTaq DNA polimerase), Roche
- TEMED
- TBE 10X

- TBE 1X
- Tris, GibcoBRL
- Tris pH 8.0 2.0M

Servicios

Agua, energía eléctrica, vacío

4.2 Extracción de ADN.

4.2.1 Extracción de ADN por el método de papel FTA, CON el reactivo comercial:

- Limpiar perfectamente el área de trabajo con etanol al 70%, utilizar guantes y cubrebocas. Cerrar lo que permita la circulación del aire.
- Etiquetar sobre el papel FTA el nombre o la clave correspondiente.
- Limpiar perfectamente el área donde se va a realizar la punción con etanol al 70%, permitir que se evapore y con una lanceta estéril efectuar una punción sobre el dedo.
- Impregnar el papel FTA con las gotas de sangre procurando llenar toda el área delimitada por el círculo.
- Permitir que la sangre se seque.
- Rotular los tubos Eppendorf de 1.5 mL con la clave correspondiente.
- Hacer perforaciones en papel FTA impregnado con la sangre de 1.2 mm de diámetro.
- Colocar de 5 a 10 círculos de 1.2 mm del papel FTA con sangre dentro del tubo eppendorf, según su clave correspondiente.
- Adicionar 400 μL (8 gotas) del reactivo FTA comercial a cada tubo

- Agitar a temperatura ambiente a baja velocidad en el vortex por 5 minutos.
- Decantar con sumo cuidado el reactivo FTA, procurando limpiar con un papel absorbente limpio el remanente del reactivo de la boca del tubo.
- Adicionar 400 μL de agua destilada estéril libre de nucleasas a cada muestra.
- Lavar a temperatura ambiente a baja velocidad en el vortex por 5 minutos.
- Decantar con sumo cuidado el agua, procurando limpiar con un papel absorbente limpio el remanente del agua de la boca del tubo.
- Repetir el lavado una vez más con agua destilada libre de nucleasas.
- Retirar el agua con ayuda de una micropipeta y una punta de 1000 μL con mucho cuidado.
- Tapar los tubos con parafilm y realizar pequeñas perforaciones. Colocar los tubos en el termociclador a 55ºC durante 30 minutos hasta que no se observen residuos de agua.

4.2.2 Extracción de ADN por el método de papel FTA, utilizando el reactivo de lavado preparado en el laboratorio:

- Limpiar perfectamente el área de trabajo con etanol al 70%, utilizar guantes y cubrebocas. Cerrar lo que permita la circulación del aire.
- Etiquetar sobre el papel FTA el nombre o la clave correspondiente.
- Limpiar perfectamente el área donde se va a realizar la punción con etanol al 70%, permitir que se evapore y con una lanceta estéril efectuar una punción sobre el dedo.
- Impregnar el papel FTA con las gotas de sangre procurando llenar la toda el área delimitada por el círculo.
- Permitir que la sangre se seque.

- Rotular los tubos eppendorf de 1.5 mL con la clave correspondiente.
- Hacer perforaciones en papel FTA impregnado con la sangre de 1mm de diámetro.
- Colocar de 5 a 10 círculos de 1.2 mm del papel FTA con sangre dentro del tubo Eppendorf, según su clave correspondiente.
- Adicionar 200 μL del reactivo preparado en el laboratorio (duodecil sulfato de sodio 10% y EDTA 0.5M a pH 8.0).
- Agitar a temperatura ambiente a baja velocidad en el vortex por 5 minutos.
- Decantar con sumo cuidado el reactivo FTA, procurando limpiar con un papel absorbente limpio el remanente del reactivo de la boca del tubo.
- Adicionar 200 μL de agua destilada estéril libre de nucleasas a cada muestra.
- Lavar a temperatura ambiente a baja velocidad en el vortex por 5 minutos.
- Decantar con sumo cuidado el agua, procurando limpiar con un papel absorbente limpio el remanente del agua de la boca del tubo.
- Repetir el lavado una vez más con agua destilada libre de nucleasas.
- Retirar el agua con ayuda de una micropipeta y una punta de 1000 μL con mucho cuidado.
- Tapar los tubos con parafilm y realizar pequeñas perforaciones. Colocar los tubos en el termociclador a 55ºC durante 30 minutos hasta que sequen completamente.

4.3 Amplificación por PCR

- Preparar la mezcla de reacción como se indica en la tabla,se debe calcular la cantidad de cada reactivo de acuerdo con el número de reacciones a realizar.

Reactivo	**Para 1 reacción**	**Concentración por reacción**	**X reacciones**
H_2O calidad Millipore	14.65 μL	---------	
Amortiguador PCR 10X	2.0 μL	1 X	
25mM de $MgCl_2$	2.0 μL	2.5 μM	
5mM de dNTP's	1.0 μL	200 nM	
5 U/μL de Taq	0.1 μL	0.5 U	
Mezcla de oligonucleotidos Foward y Reverse	0.25 μL	250 nM	
Volumen total	20 μL		

- Preparar la mezcla de reacción en un tubo Eppendorf y posteriormente fraccionarla en alícuotas de 20 μL.
- Adicionar un círculo de papel FTA previamente tratado para la extracción del ADN. Por cada serie de reacciones se debe adicionar un control negativo al cual no se le adiciona papel FTA.
- Realizar la amplificación del gen en el termociclador Eppendorf de cuerdo con el siguiente programa de ciclaje:

1. 94 ºC por 5 minutos.
2. 55 ºC por 2 minutos.
3. 72 ºC por 2 minutos.
4. 94 ºC por 45 segundos.
5. Repertir del paso 2 al 4, 35 ciclos.
6. 55 ºC por 2 minutos.
7. 72 ºC por 5 minutos.
8. 20 º C por 50 minutos
9. Fin

4.4 Electroforesis en acrilamida

- Se preparará un gel de poliacrilamida al 10%.
- A cada tubo de la reacción de PCR, se le adicionar 10 μL de solución de carga, mezclar con ayuda de la micropipeta hasta obtener una mezcla homogénea.
- Adicionar 5 μL de la mezcla en cada pozo del gel de acrilamida (se utiliza un pozo por cada amplificación).
- En un tubo Eppendorf realizar una dilución 1:20 del marcador de peso molecular de 50 pb y adicionar 10μL de la solución de carga. Se adicionan 5μL de esta mezcla en un pozo del gel de acrilamida.
- Realizar el corrimiento electroforético a 170 volts por 60 minutos.
- Teñir el gel con bromuro de etidio por 2 minutos (6 μL de la solución 100 mg/mL, por cada 100 mL de agua destilada).
- Lavar el gel con agua destilada durante 2 minutos.
- Los resultados se visualizan en un transiluminador de luz UV acoplado al analizador de geles.

4.5 Corte con enzima de restricción.

- En un tubo Eppendorf preparar la mezcla de reacción para la digestión según el número de reacciones adicionando:

Reactivo	1 Rx	X Rx
Agua libre de nucleasas	3.5 μL	
Amortiguador Tango 10X	1.0 μL	
Endonucleasa Bsp119I	0.5 μL	

- Mezclar y separar la mezcla de reacción en alícuotas de 5 μL.
- Adicionar en un lugar alejado de donde se realiza la amplificación 5μL del producto de PCR. Mezclar suavemente y centrifugar por algunos segundos.
- Incubar la mezcla de reacción durante 2 horas a 37 ºC.
- Evidenciar la presencia del polimorfismo del gen realizando un corrimiento electroforético, tal como se realizo para observar la amplificación del gen.

4.6 Purificación de los amplicones a partir del gel de poliacrilamida.

- Cortar las bandas del gel de poliacrilamida con ayuda del transilumunador, un bisturí y la careta de protección contra la luz ultravioleta.
- Colocar las bandas en un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril y etiquetado, cubrir con la cantidad mínima necesaria de agua calidad millipore.
- Refrigerar los tubos por 3 días para permitir que el producto de PCR difunda.
- Separar la fase acuosa en un tubo nuevo y estéril.
- Adicionar al tubo donde permanece el gel 40 μL de acetato de sodio 3 M y 60 μL de agua estéril.
- Se centrifuga a 13 000 rpm por 10 minutos.
- La fase acuosa se recupera y se coloca en el tubo junto con la otra fase previamente separada.
- Adicionar dos volúmenes de etanol frío. Refrigerar por 45 minutos.
- Centrifugar nuevamente a 13 000 rpm durante 10 minutos y eliminar el sobrenadante.
- Cubrir el tubo con parafilm, realizar pequeñas perforaciones al parafilm con una aguja limpia y dejar secar por 24 horas a temperatura ambiente.

- El botón obtenido y seco se hidrata con 20 μL de agua calidad millipore y para cuantificar la cantidad de ADN utilizar 1μL y diluirlo en 200 μL de agua estéril.
- Evaluar la pureza del material obtenido, por electroforesis, utilizar 1μL, agregar 9 μL de agua y 5 μL de solución amortiguadora de carga.
- Medir la absorbancia en un espectrofotómetro a 260nm y envíar a secuenciar.

5. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

- **Lauril sulfato de sodio al 10% (SDS 10%).**

  Lauril sulfato de sodio……. 10 g

  Agua destilada cbp……..100 mL

- **Acetato de sodio 3M**

  Acetato de Sodio……..246.09 g

  Agua destilada cbp……...1000 mL

- **Marcador de peso de molecular**

  Marcador de peso molecular 50 bp…..……1 μL

  Agua destilada……...20 μL

- **Acrilamida/Bisacrilamida al 30%**

  Acrilamida……..…29 g

  Bisacrilamida……..…1 g

  Agua destilada cbp……100 mL

- **TBE 10X (Tris-ácido borico-EDTA)**

  Tris 1M…….....121.10 g

  Ácido bórico…….....61.38 g

  EDTA 50 mM……14.61 g

  Agua destilada cbp……..1000 mL

- **TBE 1X**

  TBE 10X……..100 mL

  Agua destilada cbp……..1000 mL

- **Preparación del gel de poliacrilamida al 10%**

  Agua destilada……2.24 mL

  Acrilamida/Bisacrilamida……...1.68 mL

  TBE 10X……1.0 mL

  APS al 10%.....80 μL

  TEMED……..…6 μL

- **Reactivo de lavado del papel FTA preparado en el laboratorio**

  SDS al 10%.....5 mL

  EDTA pH 8.0 0.5M……..20 mL

  Agua destilada estéril cbp……..50 mL

- **Amotiguador PCR 10X, libre de Mg^{++}**

  KCl 2.5 M……2 mL

  Tris pH 8.3 2.0 M……0.5 mL

  Gelatina 20 mg/mL……..0.5 mL

  Agua destilada estéril cbp…….....10 mL

- **Solución de carga sin colorante**

  EDTA pH 8.5 0.5 M……3.0 mL

  Tris pH 8.0 2.0 M……....0.5 mL

  SDS al 10%.....1 mL

  Ficoll……....2 g

  Sacarosa……...6 g

  Agua destilada cbp……20 mL

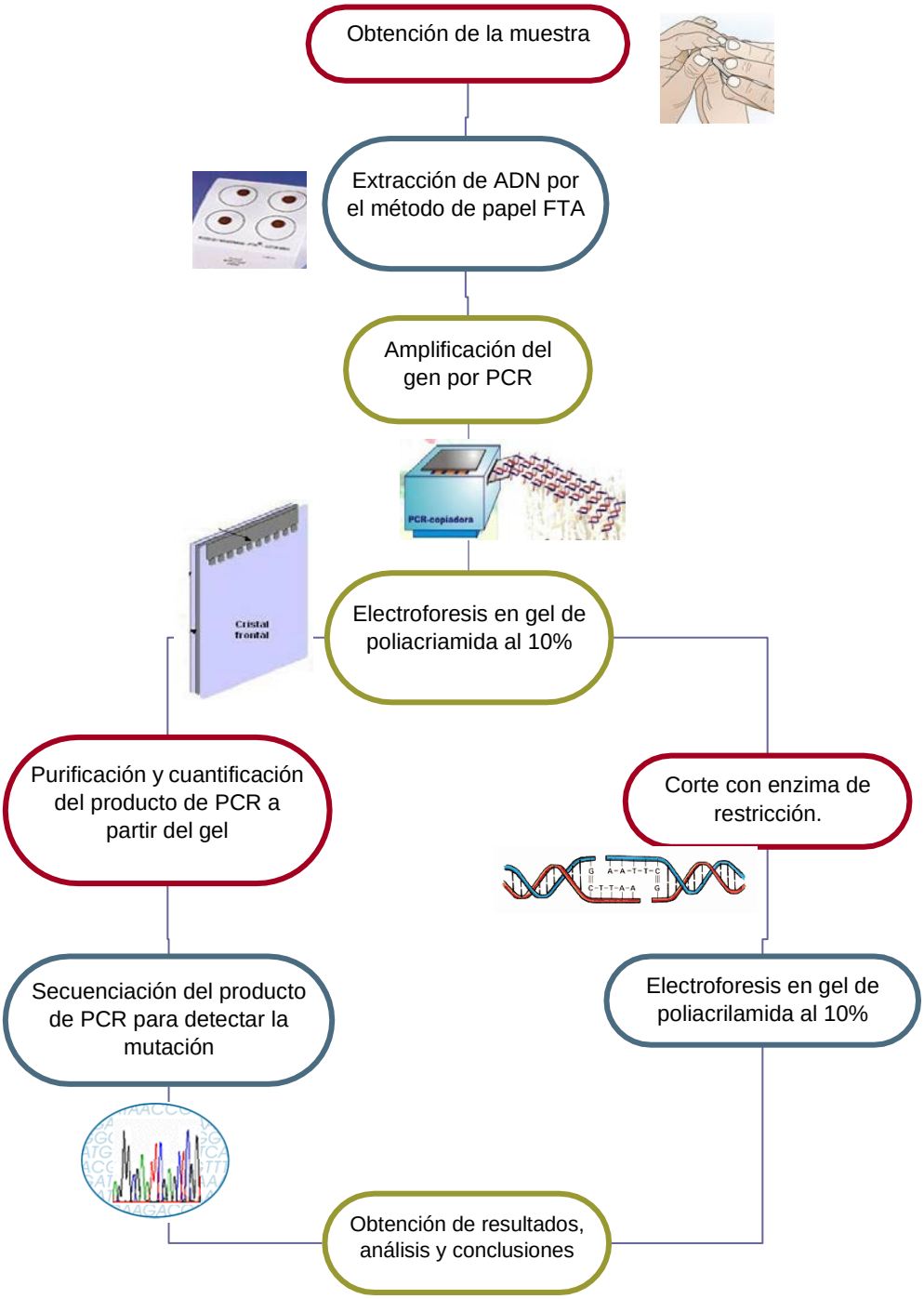
- **Persulfato de amonio al 10%.**

  Persulfato de amonio ……..…....1 g

  Agua destilada ……..…10 mL

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**227/330**

6. DIAGRAMA DE FLUJO



7. RESULTADOS ESPERADOS.

Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de controles negativos (Carriles 1-3) y amplificaciones con ADN de controles positivos con los polimorfismos (Carriles 4-6). Todas las muestras con ADN deben amplificar un producto de PCR de 135pb.

Figura 4. Corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 10% de los productos de PCR. Antes del corte con enzima de restricción (carriles 1, 3 y 5) y después del corte (carriles: 2, 4 y 6). Muestra homocigoto con el polimorfismo R230C (1, 2), muestra heterocigoto del polimorfismo R230C (3, 4) y muestra que no presenta el polimorfismo homocigoto con R230C (5, 6). Carril 7, control negativo sin ADN. Las muestras que no presentan el SNP se cortaran en 2 fragmentos de restricción una de 110pb y otro de 25pb.

8. CUESTIONARIO.

1. ¿Qué es la diabetes mellitus tipo 2?

2. ¿Qué factores predisponen el desarrollo de diabetes?

3. Describa las características de las formas monogénica y poligénica de la DM.

4. ¿Qué mecanismos de toxicidad afectan a la célula beta pancreática?

5. ¿Qué ventajas y/o desventajas ofrece el método de extracción de ADN por la técnica de papel FTA?

6. ¿Qué es una enzima de restricción?

7. ¿Qué es un SNP?

8. Explique las ventajas y desventajas de conocer si un individuo posee genes de susceptibilidad al desarrollo de diabetes mellitus.

9. Indique porque se considera la DT2 una entidad genéticamente heterogénea?

10. Explique como influyen los hábitos alimenticios y el ejercicio en el desarrollo de diabetes.

9. MANEJO DE RESIDUOS

1. El material punzocortante (jeringas o agujas) empleado para la extracción de sangre se desechará en el contenedor rojo ubicado en el área de confinamiento de residuos.
2. Los sobrantes y desechos de sangre líquida o sus componentes se inactivarán con una solución de hipoclorito de sodio al 7% de cloro libre. Esta solución se adicionará a la sangre líquida o sus componentes para alcanzar una concentración final de cloro libre del 0.7%, se incubará a temperatura ambiente por 30 minutos y se verterá al drenaje.
3. Los residuos con fenol:cloroformo y alcohol isoamílico se colocarán en un recipiente de vidrio color ambar y se confinarán en el área de residuos.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barnett AH, Eff C, Leslie RD, Pyke DA: **Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs**. *Diabetologia* 1981, **20**(2):87-93.
2. Newman B, Selby JV, King MC, Slemenda C, Fabsitz R, Friedman GD: **Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins**. *Diabetologia* 1987, **30**(10):763-768.
3. Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M, Bell GI: **Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1)**. *Nature* 1996, **384**(6608):458-460.

4. Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, Boriraj VV *et al*: **Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3)**. *Nature* 1996, **384**(6608):455-458.

5. Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, Lindner T, Yamagata K, Ogata M, Tomonaga O *et al*: **Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY**. *Nature genetics* 1997, **17**(4):384-385.

6. Malecki MT, Jhala US, Antonellis A, Fields L, Doria A, Orban T, Saad M, Warram JH, Montminy M, Krolewski AS: **Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus**. *Nature genetics* 1999, **23**(3):323-328.

7. Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M, Sun F, Lesage S, Stoffel M, Takeda J, Passa P *et al*: **Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus**. *The New England journal of medicine* 1993, **328**(10):697-702.

8. Goto Y, Nonaka I, Horai S: **A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies**. *Nature* 1990, **348**(6302):651-653.

9. Temple IK, Shield JP: **Transient neonatal diabetes, a disorder of imprinting**. *Journal of medical genetics* 2002, **39**(12):872-875.

10. Delepine M, Nicolino M, Barrett T, Golamaully M, Lathrop GM, Julier C: **EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome**. *Nature genetics* 2000, **25**(4):406-409.

11. Bell GI, Polonsky KS: **Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function**. *Nature* 2001, **414**(6865):788-791.

12. Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE *et al*: **Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus**. *Nature genetics* 2000, **26**(2):163-175.

13. del Bosque-Plata L, Aguilar-Salinas CA, Tusie-Luna MT, Ramirez-Jimenez S, Rodriguez-Torres M, Auron-Gomez M, Ramirez E, Velasco-Perez ML, Ramirez-Silva A, Gomez-Perez F *et al*: **Association of the calpain-10 gene with type 2**

diabetes mellitus in a Mexican population. *Molecular genetics and metabolism* 2004, **81**(2):122-126.

14. Daimon M, Kido T, Baba M, Oizumi T, Jimbu Y, Kameda W, Yamaguchi H, Ohnuma H, Tominaga M, Muramatsu M *et al*: **Association of the ABCA1 gene polymorphisms with type 2 DM in a Japanese population**. *Biochemical and biophysical research communications* 2005, **329**(1):205-210.

15. Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Timmins JM, Reuwer AQ, Vasanji Z, Marsh BJ, Rodrigues B, Johnson JD, Parks JS *et al*: **Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment**. *Nature medicine* 2007, **13**(3):340-347.

16. Villareal A, Hudgel D, Roth T: **Improvement of obstructive sleep apnea after radiation therapy of vocal cord carcinoma**. *Sleep Med* 2007, **9**(1):46-47.

17. Dubois M, Kerr-Conte J, Gmyr V, Bouckenooghe T, Muharram G, D'Herbomez M, Martin-Ponthieu A, Vantyghem MC, Vandewalle B, Pattou F: **Non-esterified fatty acids are deleterious for human pancreatic islet function at physiological glucose concentration**. *Diabetologia* 2004, **47**(3):463-469.

18. Smith LM, Burgoyne LA: **Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA databasing paper**. *BMC ecology* 2004, **4**:4.

19. Vanek D, Hradil R, Budowle B: **Czech population data on 10 short tandem repeat loci of SGM Plus STR system kit using DNA purified in FTA cards**. *Forensic science international* 2001, **119**(1):107-108.

20. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C.A., Krieger M., Scout Mattew., Zipursky SL, Darnell J. Biología Celular y Molecular. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Santa Fe de Bogota, Colombia. 2005. pp: 371-373.

21. Watson JD, Baker TA, Bell SP., Gann A, Levine M, Losick R. Biología Molecular del Gen. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 2006. pp: 689-695.

22. Tusie-Luna MT. **Genes and type2 diabetes mellitus.** *Arch Med Res* 2005, **36**(3):210-222.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**232/330**

PRACTICA 8. ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO

1. OBJETIVO

Que el alumno desarrolle diferentes metodologías para detectar errores innatos del metabolismo.

2. INTRODUCCIÓN.

Hoy en día se admite que prácticamente todas las enfermedades tienen una causa molecular. Cualquier enfermedad, incluyendo las conocidas tradicionalmente, cursa en mayor o menor medida con alteraciones en la estructura, propiedades, metabolismo o función de las biomoléculas. Los transtornos se traducen en disfunciones tisulares o celulares, temporales o permanentes, cambios en el medio interno, variaciones en la función de órganos y sistemas lo que se refleja en forma de enfermedad.

Garrod en 1908 introdujo por primera vez el concepto de individualidad química. La herencia mendeliana de rasgos característicos, incluye aquellos asociados con enfermedades, ha alcanzado un nuevo nivel de entendimiento con base en los principios modernos de expresión génica, aunado al conocimiento del metabolismo de las diferentes especies de ARN y de las proteínas. Se conocen mas de 300 diferentes perfiles en alteraciones de algún metabolito asociadas con alteraciones ya identificadas en los genes, la estructura de las proteínas, o en su función [1]

De de las alteraciones más frecuentes debidas a mutaciones en diferentes clases de proteínas están:

- Defectos enzimáticos (fenilcetonuria).
- Defectos en el metabolismo de las purinas (Lesch-Nyhan).
- Enfermedades de almacenamiento lisosómico (Tay Sachs, mucopolisacaridosis).
- Defectos en las proteínas receptoras (hipercolesterolemia familiar).
- Defectos en el transporte de membrana (fibrosis quística).

Las enfermedades metabólicas son aquellas patologías causadas por anormalidades en sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo. Las anormalidades pueden ser congénitas o adquiridas. Las congénitas se originan por alteraciones genéticas que dan lugar a enzimas defectuosas (errores innatos del metabolismo). Mientras que las adquiridas se deben a enfermedades de órganos endocrinos o a la falla de órganos metabólicamente activos. En las enfermedades metabólicas el diagnóstico precoz es importante para dar un tratamiento efectivo y evitar en muchos casos deterioro mental.

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

Mecanismos patológicos clásicos en los errores innatos del metabolismo.

- Acumulación de sustratos en una reacción catabólica bloqueada alcanzando concentraciones tóxicas.
- Producción de compuestos secundarios tóxicos a través de una vía normalmente menor.
- Deficiencia de un producto secundario en una vía anabólica.
- Pérdida de la regulación con sobreproducción de intermediarios a niveles tóxicos

Dentro de los errores innatos del metabolismo se encuentran las enfermedades de almacenamiento lisosomal o enzimopatías lisosomales, se caracterizan por un déficit enzimático específico, la excreción de metabolitos por la orina y la acumulación de los compuestos no degradados en diferentes órganos y tejidos que ocasionan la disfunción de éstos. Tienen un patrón de herencia autosómico recesivo, excepto para la enfermedad de Fabry y la enfermedad de Hunter en las que el patrón de herencia está ligado al cromosoma X. Estas enfermedades tienen una baja incidencia en general. Su importancia radica en que sumadas todas, representan un problema de salud, por la pobre calidad de vida de esos pacientes, así como su fallecimiento prematuro, motivo por el es importante evitar los nacimientos de nuevos niños afectados realizando una detección oportuna. En estas enfermedades es común detectar al menos un bloqueo metabólico como defecto primario, por lo que la investigación de la variabilidad genética ha contribuido al avance en los conocimientos de las vías metabólicas, de la fisiología y la biología humana, además del papel de los organelos celulares.

El progreso al principio fue lento, pero se aceleró en la década de los 50 con el desarrollo de nuevas tecnologías, como son: los métodos cromatográficos, las técnicas electroforéticas de separación de proteínas, la enzimología con una gran variedad de sustratos, incluidos los marcados con isótopos radiactivos. Las técnicas de cultivos celulares incrementaron progresivamente la capacidad de detectar nuevos errores innatos del metabolismo y analizar sus consecuencias metabólicas. El desarrollo de la tecnología del ADN proporcionó, además la posibilidad de descifrar directamente las causas de los errores innatos del metabolismo, es decir las mutaciones y al integrar esos conocimientos con los de la bioquímica metabólica y la biología celular, permitió comprender cómo se alteran la síntesis, la modificación postraduccional, el procesamiento y la localización de numerosos productos genéticos clínicamente relevantes y las consecuencias que esto acarrea para el individuo.

Como ejemplos de estas alteraciones metabólicas están: la fenilcetonuria, la tirosinemia, la alcaptonuria, el albinismo y las diferentes mucopolisacaridosis entre otras.

3.1 Fenilcetonuria

La fenilcetonuria fue la primer enfermedad genética descubierta, se debe a la deficiencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa, esa alteración origina que la fenilalanina se degrade en una ruta metabólica alterna que genera fenilpiruvato, un compuesto que es neurotóxico y afecta gravemente al cerebro durante el crecimiento y desarrollo. Los efectos de la acumulación de fenilpiruvato causan oligofrenia que se caracteriza por un cociente intelectual inferior a 20. Una deficiencia en el metabolismo de la fenilalanina puede producir alcaptonuria, otra enfermedad hereditaria que genera orinas negruzcas y cálculos renales.

En 1953 se estableció que la fenilcetonuria se puede tratar de forma efectiva con una manipulación nutricional adecuada a la necesidad de cada individuo; a este tratamiento se le denomino terapéutica nutricional. El infante destinado de por vida a discapacidad motora y cognoscitiva puede ahora rescatarse con una prescripción nutricional que se inicie tempranamente en el desarrollo y de forma individualizada. El análisis de los analitos y macromoléculas a partir de sus fluidos biológicos se utiliza para desarrollar el plan terapéutico y para evaluar la eficacia de la intervención [1].

El sueño de muchos de los individuos con fenilcetonuria es una cura permanente, actualmente se han desarrollado terapias con células modificadas genéticamente y

viables, en particular terapia génica con el transplante de células de hígado, troncales de embriones o células hematopoyéticas para el tratamiento de la fenilcetonuria [2].

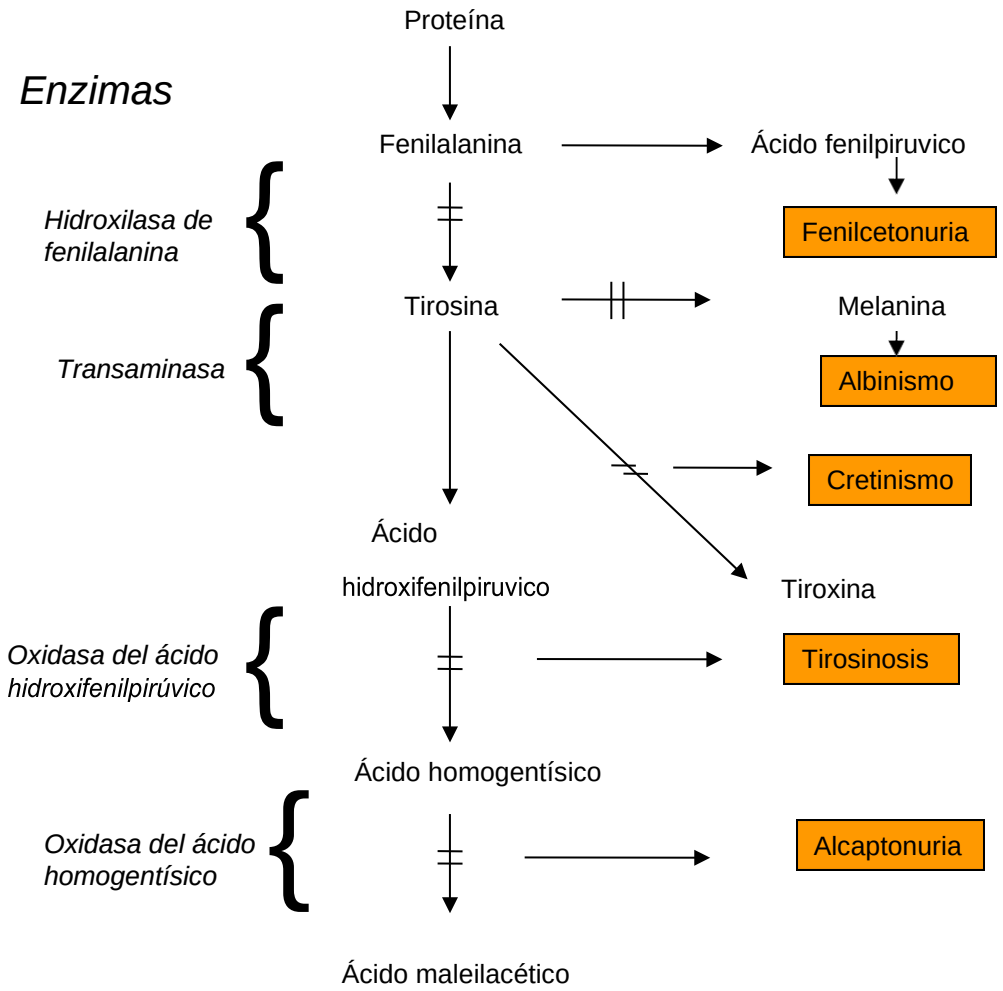


Figura 1. **Metabolismo de la fenilalanina**. Las flechas cruzadas por una doble línea indican un bloqueo de la enzima que esta al lado izquierdo y los cuadros indican la enfermedad metabólica con la que se asocia el bloqueo.

3.2 Tirosinemia (Tirosinosis)

La tirosina es un aminoácido semiesencial en humanos, se obtiene de la hidrólisis de las proteínas de la dieta o de la hidroxilación de la fenilalanina. La tirosina se anaboliza para la producción de catecolaminas y melaninas o bien se degrada en el citoplasma de los hepatocitos. La tirosinemia tipo 1 es una enfermedad autosómica recesiva, cuya causa es la deficiencia de la enzima fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH), los síntomas clínicos incluyen disfunción hepática, cirrosis, carcinoma hepatocelular, síndrome renal de Fanconi y neuropatía periférica. Se caracteriza por hipertirosinemia, tirosiluria y valores elevados de succinilacetona en plasma y orina. El gen humano de la FAH se ha clonado y mapeado en el cromosoma 15, existe una gran heterogeneidad genética y se han descrito más de 30 mutaciones, se estima que la incidencia en la población mundial es de 1/100,000.

En 1940 Moss y Schoenheimer estudiando ratas determinaron que la fenilalanina se hidroxilaba a tirosina. La primera aplicación fue determinar el grado de bloqueo de la hidroxilación en pacientes con fenilcetonuria. Estos análisis se utilizan para analizar la producción de tirosina en sujetos normales y en pacientes con errores innatos del metabolismo [3].

3.3 Alcaptonuria (Homogentisicaciduria)

Es una enfermedad en la que se presenta la deficiencia de la enzima homogentisiato-1,2 dioxigenasa (HGD), es un raro trastorno hereditario en el cual la orina se torna de color negro-marrón con la exposición al aire. Los síntomas pueden abarcar artritis progresiva, especialmente de la columna, obscurecimiento de la oreja, puntos oscuros sobre la esclerótica y la córnea.

Los estudios de genealogía permitieron establecer a los ancestros de esta enfermedad en las localidades geográficas originales del distrito de Kysuce en Eslovaquia. Esta enfermedad se encuentra codificada en el brazo largo del cromosoma 3 del humano y después de clonar a la enzima HGD se han identificado 9 mutaciones en estos pacientes [4]. Cuando la enzima tiene mutaciones no funciona rompiendo el anillo bencénico de la tirosina, esta deficiencia origina que se acumule el ácido homogentísico, que a su vez produce un pigmento negro castaño en los tejidos,

córnea negra, sordera, cálculos renales, y artropatía, los pacientes sufren de dolores en las articulaciones y en la columna vertebral. Se puede heredar como un carácter autosómico recesivo [5].

3.4 Albinismo

Los melanocitos son las células que producen pigmentos en el cabello y la epidermis del ojo, son los responsables de la pigmentación de la piel. Este pigmento se obtiene con la síntesis estrictamente regulada de la melanina en los organelos denominados melanosomas mismos que se transportan por procesos dendríticos y se transfieren al cabello que va creciendo, o a los queratocitos que es donde la melanina protege del daño que la luz UV produce al ADN. Se han implicado mas de 130 genes en el desarrollo y función de este tipo celular y estas alteraciones se han asociado al albinismo pero también al vitiligo y al síndrome de Hermansky-Pudlak [6].

El albinismo es un grupo de enfermedades genéticas en la que se presenta una ausencia congénita de la pigmentación de ojos, piel y pelo en los seres humanos, se origina por la mutación en los genes involucrados en la producción de melanina. En los individuos albinos se encuentra alterada la función de la enzima tirosinasa, por lo que no se transforma la tirosina en melanina y se presenta este transtorno que es hereditario. Se transmite de diferentes formas: autosómica recesiva, autosómica dominante o ligada al cromosoma X.

3.4.1 El albinismo negativo a la tirosinasa

Esta enfermedad se hereda de forma autosómica recesiva simple, los pacientes presentan un déficit de pigmentación en el fondo del ojo, sus iris tienen un color gris transparente o azulado, la pupila muestra un color rojizo durante los primeros años de vida que se ennegrece en periodos posteriores, se presenta fotofobia, agudeza visual inferior a lo normal, la piel y el pelo presentan menor pigmentación, la exposición a la luz solar provoca eritema y aparición de pecas.

3.4.2 Albinismo positivo a la tirosinasa

Este trastorno también recibe el nombre de Albinoidismo y Leucomelanopatía hereditaria, se hereda de forma autosómica recesiva simple, se caracteriza por pigmentación amarillenta o rojiza de las estructuras oculocutáneas, los pacientes presentan neutropenia y menor resistencia a las infecciones, los pacientes desarrollan linfomas malignos.

3.4.3 Albinismo mutante amarillo

Se hereda de forma autosómica recesiva, los pacientes al exponerse a la luz ultravioleta producen melanina por lo que aumenta la producción de un pigmento de color amarillo sin que origine uno de color negro.

3.4.4 Albinismo oculocutáneo

Se caracteriza por la hipopigmentación del iris, reducción de la pigmentación retinal, hipoplasia foveal asociada a reducción de la agudeza visual, reducción de la visión estereoscópica, presentan cabello blanco que no obscurece con la edad. Es raro, se presenta en 1 de 17,000 nacimientos, los pacientes muestran diversos grados de agudeza visual y errores de refracción además de fototrofia. Se hereda como carácter recesivo [7].

3.4.5 Albinismo cutáneo

Se hereda de forma autosómica dominante, su fenotipo se limita a alteraciones en la coloración de piel y cabello sin alterar el ojo. Puede aparecer un mechón de pelo blanco, no es raro observar pigmentación parcial o completa durante la adolescencia o poco después, se desconoce el mecanismo que provoca la actividad melanogénica.

3.5 Mucopolisacaridosis

Las mucopolisacaridosis representan un grupo de enfermedades que devastan por atesoramiento (almacenamiento de metabolitos) lisosomal, afectan aproximadamente a 1 de cada 25,000 individuos. Los avances en bioquímica y genética en los últimos 25 años han permitido identificar a las enzimas hidrolasas causantes de las mucopolisacaridosis, con ello se han caracterizado a los genes involucrados. Esos avances han conducido al desarrollo específico y tratamientos para algunas de las mucopolisacaridosis, en forma de reemplazo de la enzima [8]. Poseen un espectro de manifestaciones sistémicas que incluyen: compromiso respiratorio, deformaciones esqueléticas, deterioro neurológico e intelectual, anormalidades cardiacas y problemas gastrointestinales. Las manifestaciones oculares son comunes y conducen a deterioro visual, opacidad de la cornea, retinopatía y glaucoma [9].

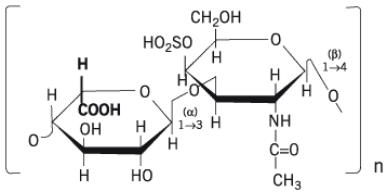


Figura 2 Unidad disacarídica repetitiva del sulfato de dermatán compuesta por (L-iduronato y sulfato de N-acetil-galactosamina)

Los mucopolisacáridos ácidos como el sulfato de dermatán (Figura 2), el sulfato de condroitina y el ácido hialurónico (Figura 3) son algunos de los principales componentes de los tejidos conectivos, se conocen seis trastornos diferentes en los que se presenta exceso de ellos y por lo tanto se excretan en la orina, dichos síndromes se clasifican en Mucopolisacaridosis I a la VII.

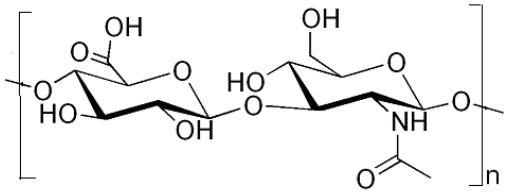


Figura 3 Unidad disacarídica del ácido hialurónico (disacárido compuesto por N-acetilglucosamina y ácido glucurónico).

3.5.1 Mucopolisacaridosis I

La mucopolisacaridosis tipo I o síndrome de Hurler. Se origina por la deficiencia de la enzima lisosomal α-L-iduronidasa. En su forma severa se conoce como enfermedad de Hurler, se manifiesta por deformidades del esqueleto y retardo en el desarrollo mental y motor. Los pacientes con la forma adulta (enfermedad de Scheie) son casi de estatura normal y no presentan retraso mental, los síntomas típicos son opacidad en la cornea, cambios esqueléticos. En la mayoría de los casos también esta involucrado el corazón, algunos pacientes con deficiencia de α-iduronidasa muestran síntomas intermedios entre Hurler y Scheie, los diferentes fenotipos se originan por mutaciones alelícas del gene de la α-iduronidasa (IDUA), es una enfermedad rara y su prevalencia es de 1:100,000, se trata con transplante de médula ósea, también se les administra la enzima α-iduronidasa, Aldurazyme esto conduce a una mejoría en la función pulmonar y en la movilidad de las articulaciones.

3.5.2 Mucopolisacaridosis II

También denominado síndrome de Hunter, es una enfermedad rara que se hereda como carácter recesivo y ligado al cromosoma X, la causa es la deficiencia de la enzima lisosomal iduronato-2-sulfatasa, conduce a una acumulación de glucosaminoglucanos en casi todos los tipos celulares y órganos. Las manifestaciones clínicas incluyen: la obstrucción de vías respiratorias, deformaciones esqueléticas, cardiomiopatía y en la mayoría de los pacientes alteraciones neurológicas. La muerte ocurre en la segunda década de la vida. Recientemente se ha intentado la terapia de reemplazo con enzima iduronato-2-sulfatasa recombinante humana, últimamente se han introducido infusiones intravenosas de idursulfase (iduronato-2-sulfatasa) que han mejorado muchos de los síntomas de los pacientes con MPS II [10].

3.5.3 Mucopolisacaridosis III

Las mucopolisacaridosis tipos IIIA, B, C, y D son un grupo de enfermedades de carácter recesivo causadas por mutaciones de uno de los cuatro genes que la enzima requiere para tener actividad de degradación lisosomal de sulfato de heparan. El almacenamiento lisosomal progresivo de sulfato de heparan resulta en las manifestaciones clínicas de la enfermedad, que se caracterizan por la degeneración

del sistema nervioso central. La MPS-IIIA y MPS-IIIB involucran deficiencias de sulfamidasa de sulfato de heparan (SGSH) y alfa N-acetilgucosaminidasa (NAGLU). Los genes SGSH y NAGLU se han clonado lo cual ha permitido estudiar las mutaciones. Se han detectado 62 mutaciones en la MPS-IIIA y un total de 86 para NAGLU, la mayoría de esas mutaciones se han asociado con fenotipos clínicos severos, se ha descrito que esas mutaciones tienen diferentes orígenes geográficos en Eslovaquia, lo anterior beneficiará el establecimiento del diagnóstico [11].

3.5.4 Mucopolicaridosis IV

La mucopolisacaridosis IV también conocida como enfermedad de Morquio, es un desorden de atesoramiento de metabolitos en los lisosomas de carácter autosómico recesivo, se origina por una deficiencia genética de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS; E.C.3.1.6.4.). La enzima GALNS se requiere para degradar el sulfato de keratan y el condroitin-6-sulfato (Figura 4). La acumulación de las substancias no degradadas en los lisosomas de los tejidos afectados conduce a una displasia ósea sistémica, las principales alteraciones incluyen: acortamiento del tronco y caja toráxica, curvatura espinal, inestabilidad de las vértebras cervicales. Los niveles de glucosaminoglicanos en los pacientes con MPS IVA son cercanos a los límites normales por lo que es difícil su diagnóstico, por lo tanto también se analizan los niveles de sulfato de queratina en orina y plasma. La detección de heterocigotos obligados por mediciones enzimáticas no es muy confiable porque existe traslape de GALNS en fibroblastos o leucocitos de fenotipo afectado y controles normales. La heterocigocidad genética de la mucopolisacaridosis IVa se ha facilitado por el aislamiento y la caracterización del ADNc que codifica para la GALNS humana. La terapia convencional es sintomática y se limita a procedimientos paliativos que no tienen impacto en la mortalidad. No existe un consenso de la efectividad del transplante de médula ósea. En el futuro, la terapia genética podría representar una enorme mejora terapeútica [12, 13].

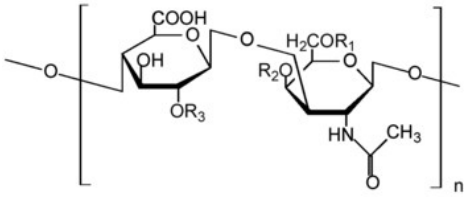


Figura 4 Unidad disacarídica del sulfato de condroitina formado por D-glucuronato y N-acetil galactosamina-4-sulfato

3.5.5 Mucopolisacaridosis VI

La Mucopolisacaridosis tipo VI (MPS VI), también denominada Síndrome de Maroteaux-Lamy, es una enfermedad por atesoramiento lisosomal de carácter autosómico recesivo, se origina por la deficiencia de la enzima N-acetilgalactosamina- 4-sulfatasa (4S), las mutaciones en el gene 4S son responsables de la deficiencia de esta enzima lo que conduce a la acumulación intralisosomal de los glucosaminoglicanos sulfato de dermatan y sulfato de condroitina parcialmente degradados. Se han identificado 45 mutaciones clínicamente relevantes en el gene 4S humano. También se han descrito 6 polimorfismos: dos substituciones de aminoácidos y 4 silenciosas. El modelaje molecular de esas mutaciones sugiere una estructura que ocasiona deficiencia vía desestabilización y reducción de la concentración de la proteína 4S, el escrutinio de los alelos para MPS-VI en toda la población es sumamente difícil [14].

3.5.6 Mucopolisacaridosis VII

El síndrome de Sly tiene dos formas de presentación, una con signos clínicos severos que normalmente se presentan en la vida intrauterina o en el periodo neonatal y la otra que muestra signos menos agresivos y que se presenta alrededor de los cuatro años.

La forma severa se caracteriza por: dismorfias, retardo motor y del desarrollo, opacidad corneal y hallazgos clínicos y patológicos de una enfermedad lisosomal. La de presentación tardía se caracteriza porque los pacientes con esta enfermedad tienen inteligencia normal pero presentan alteraciones esqueléticas progresivas. Aún no existen datos estadísticos sobre la frecuencia con la que se presenta este síndrome.

3.5.7 El diagnóstico de las mucopolisacaridosis y fenilcetonuria

Las pruebas de laboratorio que se utilizan para realizar el diagnóstico de estas patologías se pueden dividir en dos grupos: las preliminares que son cualitativas y un segundo grupo conformado por pruebas específicas entre las que encontramos la determinación de la actividad de las enzimas presuntamente comprometidas y las pruebas moleculares de índole genético. Dentro del primer grupo están las pruebas que se han desarrollado utilizando reactivos que al reaccionar con los Glucosaminoglicanos (GAGs) producen un precipitado (Albúmina ácida y el Cloruro de

Cetil Piridio -CPC); y aquellas que utilizan la reacción entre los GAGs y un reactivo de color que permiten determinar la presencia de estas moléculas cuando son excretadas en la orina, por ejemplo, el método colorimétrico basado en la reacción de los glucosaminoglicanos con el colorante azul de dimetilmetileno o azul de toluidina. Sin embargo, estas pruebas no permiten discriminar entre los diferentes tipos de GAGs por su baja especificidad, además de presentar un alto porcentaje de falsos positivos. No obstante, son importantes para complementar con otras pruebas sencillas como la cromatografía en capa fina, la electroforesis en gel de agarosa que permiten conocer de manera cualitativa o semicuantitativa los GAGs excretados.

Para el diagnóstico de fenilcetonuria los métodos que se utilizan de rutina incluyen la inhibición del crecimiento bacteriano auxotrofo diseñado por Robert Guthrie [15], pero también existen métodos espectrofotométricos, fluorométricos, inmunoensayo y espectrometría de masas con ionización de electrospray [16]. Finalmente, están los métodos que pueden detectar las mutaciones por PCR y RFLP-PCR.

4. METODOLOGÍA

4.1 PROTOCOLO PARA LA DETECCION DE ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO, PRUEBA DEL CLORURO FÉRRICO

4.1.1 Material y Equipo

- Micropipetas Gilson
- Tubos de ensaye de 13x100
- Gradilla
- Balanza analítica
- Matraz aforado de 100 mL

4.1.2 Reactivos

- Orina reciente
- Cloruro férrico

- Sulfato ferrroso amónico
- Ácido clorhídrico 0.02N

Servicios

Energía eléctrica, agua

4.1.3 Procedimiento

1. Preparación del reactivo de cloruro férrico. Disolver 1 g de $FeCl_3$ y 1 g de sulfato ferroso amónico y aforar a 100 mL con HCl 0.02N.
2. Adicionar 500 µL de reactivo de cloruro férrico en dos tubos.
3. Agregar 250 µL de orina problema en un tubo y 250 µL al otro.
4. Mezclar agitando vigorosamente y observar la coloración.
5. Observar después de 1 h
6. Para determinar la presencia de ácido homogentísico, se adicionan 1 ó 2 gotas del reactivo de cloruro férrico a 1 ml de orina, observar la aparición de un color azul.

4.1.4 Interpretación de los resultados:

Fenilcetonuria. Color verde inmediato o azul que se torna a amarillo

Tirosinemia. Color verde que desaparece en segundos

Alcaptonuria. Color azul o verde de pronta desaparición

Histidinemia. Color verde o azul verde

Enfermedad de jarabe de arce. Azul.

Una coloración diferente al tono del blanco de reactivos asociado a un color verde o azúl, indica que la prueba tamiz ha dado positiva para un transtorno del metabolismo

de la fenilalanina y requerirá de un análisis posterior de la actividad enzimática de cada una de las enzimas involucradas por ensayos más específicos como fluorometría. Otra posibilidad es analizar por PCR múltiple las diferentes mutaciones presentes en la muestra.

4.2 PROTOCOLO PARA LA DETECCION DE FENILCETONURIA POR LA PRUEBA DE GUTHRIE

4.2.1 Material

- Papel filtro especial (Shleicher & Schuell # 903) impreso en círculos guías.
- Cajas de Petri.
- Lancetas.
- Tijeras.
- Autoclave.

4.2.1.1 Material Biológico

- *Bacillus subtillis* cepa ATCC 6051 o ATCC 6633.

4.2.1.2 Reactivos

- Medio de cultivo BHI
- Solución de β-2-tienilalanina al 171 mg/dL.
- Soluciones de fenilalanina a diferentes concentraciones (2, 4, 8, 10, 12, 16 y 20 mg/dL)
- Tiras de papel filtro de 1.5 por 4 cm.

4.2.2 Recolección de Muestras

La sangre obtenida mediante punción, previa asepsia, del talón o del dedo se absorbe con el papel filtro especial para que llene completamente los círculos de aproximadamente 1 cm de diámetro.

4.2.3 Procedimiento

1. Las tiras de papel filtro con las muestras problema y con los controles de fenilalanina se colocan dentro de una caja Petri y se esterilizan con autoclave a 121°C por 3 minutos. La identificación se escribe con lápiz, para evitar que la tinta se

2. Preparar el medio de cultivo (150 mL), dejar enfriar y antes de solidificar (aproximadamente a 45°C) añadir la β-2-tienilalanina 0.3 mL (17 mg/dL), colocar en las cajas de Petri, dejar solidificar.

3. Cortar con la perforadora un disco de 0.3 cm de la mancha de sangre. Los círculos adicionales se conservan para otras pruebas subsecuentes, si fueran necesarias. Cortar con la perforadora los discos numerados de la tira de control de fenilalanina. Maneje los discos con pinzas estériles de punta fina.

4. Coloque los discos recortados en una caja de Petri estéril.

5. Sembrar la cepa de *Bacillus subtillis* en el medio de cultivo por estría masiva.

6. Colocar los discos de papel tanto controles como problemas procurando una distancia igual entre ellos, puede colocar en el centro la muestra problema.

7. Incubar a 37°C por 12 a 16 hrs. Después de 24 horas el desarrollo de las bacterias puede interferir con la interpretación de los resultados.

8. Compare las zonas de crecimiento que rodean a los discos de prueba con las zonas en torno de los discos de control y registre los resultados. Un halo de inhibición comparable a la zona del disco de 4 mg/dL, se considera probablemente positivo y requiere confirmación.

*4.2.4 Interpretación de los resultados***.**

La β-tienilalanina genera una inhibición del crecimiento del *Bacillus subtillis*, para su crecimiento el microorganismo requiere de la presencia de fenilalanina por lo que si la muestra impreganada en el disco contiene fenilalanina, dependiendo de su concentración se presentará mayor o menor inhibición del crecimento bacteriano.

4.3 PROTOCOLO PARA LA DETECCION DE MUCOPOLISACARIDOSIS POR LA MANCHA DE BERRY

4.3.1 Material

- Probetas
- Goteros
- Cronómetro
- Tiras de papel filtro
- Cajas Petri
- Tubos Eppendorf

4.3.2 Reactivos

- Orina reciente
- Azul de toluidina
- Acetona
- Agua destilada
- Ácido acético al 10%

Servicios

- Agua, energía eléctrica

Procedimiento

1. Preparación del azul de toluidina. Disolver 1 g de azul de toluidina en 400 mL de acetona y 100 mL de agua destilada

2. Colocar en una tira de papel filtro de 3X10 cm 25 µL de un patrón positivo (heparina) y a un lado 25 µL de la orina problema y dejar secar al aire.

3. Sumergirlo en el colorante durante 45 segundos.

4. Lavar dos veces en ácido acético al 10% y observar la coloración.

5. RESULTADOS ESPERADOS

Se considera positivo si en la muestra problema se presenta un punto púrpura sobre un fondo azul como en el patrón positivo.

6. CUESTIONARIO

Instrucciones. Conteste las siguientes preguntas:

1. ¿Por qué es necesaria la prueba en recién nacidos?
2. ¿Qué tratamientos existen en el manejo de los errores innatos del metabolismo?
3. ¿Cuál es el fundamento de la prueba de Guthrie para fenilcetonuria?
4. Esquematice las reacciones y el bloqueo enzimático de:

   a) fenilcetonuria

b) tirosinosis

c) albinismo

d) alcaptonuria

5. ¿Qué son los mucopolisacáridos ácidos, donde se sintetizan y cuál es su función?

6. ¿En qué casos diferentes a la MPS podemos encontrar cantidades elevadas de mucopolisacáridos ácidos?

7. ¿Qué pruebas existen para el diagnóstico de las MPS?

8. Anote el nombre de la ó las enzimas que se alteran en cada una de las mucopolisacaridosis.

6. MANEJO DE RESIDUOS

Los sobrantes y desechos de orina se inactivarán con una solución de hipoclorito de sodio al 7% de cloro libre. Esta solución se adicionará a la orina para alcanzar una concentración final de cloro libre del 0.7%, se incubará a temperatura ambiente por 30 minutos y se verterá al drenaje.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berry GT: **Metabolic profiling**. *Nestle Nutrition workshop series* 2008, **62**:55- 75; discussion 75-80.

2. Harding C: **Progress toward cell-directed therapy for phenylketonuria**. *Clinical genetics* 2008, **74**(2):97-104.

3. Matthews DE: **An overview of phenylalanine and tyrosine kinetics in humans**. *The Journal of nutrition* 2007, **137**(6 Suppl 1):1549S-1555S; discussion 1573S-1575S.

4. Srsen S, Muller CR, Fregin A, Srsnova K: **Alkaptonuria in Slovakia: thirty- two years of research on phenotype and genotype**. *Molecular genetics and metabolism* 2002, **75**(4):353-359.

5. Kalevski SK, Haritonov DG, Peev NA: **Alcaptonuria with lumbar disc prolapse: case study and review of the literature**. *Spine J* 2007, **7**(4):495- 498.

6. Goding CR: **Melanocytes: the new Black**. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2007, **39**(2):275-279.

7. Gronskov K, Ek J, Brondum-Nielsen K: **Oculocutaneous albinism**. *Orphanet journal of rare diseases* 2007, **2**:43.

8. Clarke LA: **The mucopolysaccharidoses: a success of molecular medicine**. *Expert reviews in molecular medicine* 2008, **10**(1):e1.

9. Ashworth JL, Biswas S, Wraith E, Lloyd IC: **Mucopolysaccharidoses and the eye**. *Survey of ophthalmology* 2006, **51**(1):1-17.

10. Wraith JE, Scarpa M, Beck M, Bodamer OA, De Meirleir L, Guffon N, Meldgaard Lund A, Malm G, Van der Ploeg AT, Zeman J: **Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy**. *European journal of pediatrics* 2008, **167**(3):267-277.

11. Yogalingam G, Hopwood JJ: **Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type IIIA and IIIB: Diagnostic, clinical, and biological implications**. *Human mutation* 2001, **18**(4):264-281.

12. Bouzidi H, Khedhiri S, Laradi S, Ferchichi S, Daudon M, Miled A: **[Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A syndrome): clinical, biological and therapeutic aspects]**. *Annales de biologie clinique* 2007, **65**(1):5-11.

13. Mikles M, Stanton RP: **A review of Morquio syndrome**. *American journal of orthopedics (Belle Mead, NJ* 1997, **26**(8):533-540.

14. Litjens T, Hopwood JJ: **Mucopolysaccharidosis type VI: Structural and clinical implications of mutations in N-acetylgalactosamine-4-sulfatase**. *Human mutation* 2001, **18**(4):282-295.

15. Baston H: **The Guthrie test. Midwifery basics**. *The practising midwife* 2002, **5**(3):32-35.

16. Clague A, Thomas A: **Neonatal biochemical screening for disease**. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2002, **315**(1-2):99-110.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**251/330**

PRACTICA 9. CULTIVO DE LINFOCITOS Y OBSERVACIÓN DE CARIOTIPO HUMANO

1. OBJETIVOS.

- Que el alumno desarrolle experimentalmente la metodología que se requiere para realizar un cultivo de linfocitos de sangre periférica.
- Que el alumno realice y observe preparaciones semipermanentes de células del cultivo de linfocitos para analizar las características de los cromosomas humanos.

2. INTRODUCCIÓN

El cultivo de células humanas y tejidos *in vitro* es un parte integral del trabajo del laboratorio en los estudios citogenéticos, esto permite tener células para observar a los cromosomas en preparaciones en metafase y obtener un buen diagnóstico. Las células que nos permiten observar esta característica son las que se dividen de forma espontánea como las de medula ósea y las gonadales, así mismo las líneas celulares de procesos cancerosos. En el caso de otro tipo de células como las sanguíneas, es necesario inducir la división celular de forma artificial utilizando un mitógeno y manteniendo las condiciones óptimas de crecimiento.

En este trabajo se presenta el protocolo para realizar el cultivo de células humanas con el fin de observar sus cromosomas para realizar un diagnóstico clínico adecuado, que sea parte de la formación académica del Laboratorio de Genética Clínica.

3. FUNDAMENTO TEÓRICO.

3.1 Cultivos celulares.

El cultivo celular es un conjunto de técnicas que permiten la presencia de las células *'in vitro*', manteniendo en lo posible sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

Existen diferentes tipos de cultivos, entre ellos los cultivos celulares primarios que se realizan colocando células en medio de cultivo, tomadas directamente de tejidos animales; en los cultivos primarios las células mantienen su viabilidad por un periodo de tiempo limitado y pueden reproducirse si se les proporcionan las condiciones adecuadas, como en el caso de los fibroblastos y las células sanguíneas. Así mismo, el subcultivo de un cultivo primario deriva en un cultivo secundario o terciario.

Las células pueden establecerse en forma de monocapa o en suspensión. El crecimiento en monocapa nos indica que las células se adhieren a un sustrato que puede ser una superficie plástica y en esa forma iniciar su proliferación, al respecto, muchas líneas celulares son anclaje dependiente, es decir no inician la proliferación hasta que se han adherido al sustrato. El crecimiento en suspensión es para aquellas células capaces de proliferar sin necesidad de adherirse al sustrato, independientes de anclaje, como en el caso de las células hematopoyéticas, algunas líneas celulares transformadas y de células procedentes de tumores.

3.2 Cultivo de Células Sanguíneas.

Uno de los tejidos humanos que más fácil de obtiene es la sangre periférica, lo que ha permitido el estudio síndromes clínicos de origen genético. En la muestra sanguínea las células que son de interés para realizar un cultivo son la nucleadas, es decir, los leucocitos que se dividen en cinco tipos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos monocitos y

linfocitos. De éstas formas diferenciadas de células, sólo los linfocitos se pueden inducir a dividirse bajo condiciones óptimas en cultivo.

3.2.1 Mitógenos.

Para que los linfocitos puedan iniciar la proliferación y se transformen en células mitóticamente activas en un cultivo celular es necesario exponerlas a algunos antígenos como es el caso del toxoide tetánico, el extracto de polen toxoide diftérico, así como algunos antígenos derivados de plantas como la concanavalina A y la fitohemaglutinina. Además se puede utilizar como mitógeno natural a la interleucina 2 (IL-2).

La fitohemaglutinina (PHA) es una mucoproteína extraída del frijol rojo *Phaseolus vulgaris*, aglutina tanto eritrocitos como leucocitos, se une a determinados oligosacáridos y estimula la mitosis en estos últimos; provocando un incremento en la síntesis de RNA de las células *in vitro* después de 24 horas de cultivo, asimismo se produce interleucina 2 (IL-2) como factor de crecimiento para los linfocitos que permite que el proceso mitótico continúe. Durante las siguientes 24 horas comienza la síntesis de ADN y la primera mitosis se presenta alrededor de las 48 horas.

La concanavalina A (Con A) es una proteína globular de origen vegetal, se obtiene a partir del frijol *Canavalia ensiformis (*variedad blanca); esta lectina es un excelente inductor de mitosis en los linfocitos, al fijarse específicamente a un receptor de superficie celular que contiene a los oligosacáridos manósidos.

3.2.2 Medio de cultivo

Para realizar un cultivo de linfocitos es necesario contar con un medio de cultivo que es una solución balanceada de sales y nutrientes como glucosa, con control de pH y adicionada con algunos aditivos como vitaminas. Entre los medios de cultivo que podemos utilizar se encuentran la solución de Hank´s (HBSS), el medio Eagle´s (MEM), medio esencial mínimo de Dulbecco y RPMI 1640. Este último es uno de los más utilizados, está suplementado con L-glutamina y necesita la adición de suero fetal de ternera entre un 10 y 20% como complemento.

3.2.3 Contaminación

Muchos microorganismos son capaces de crecer rápidamente en cultivos celulares de ahí que el mantener las condiciones de esterilidad es indispensable. Por lo tanto, para trabajar con cultivos celulares, estos se deben realizar en una campana de flujo laminar y utilizar antibióticos y fungicidas en el cultivo.

Los contaminantes bacterianos más comunes en los cultivos celulares son los estreptococos, los estafilococos y las enterobacterias como *E. coli*, por lo que los antibióticos de elección son la penicilina (100 U/mL) y la estreptomicina (100 µg/mL) que muestran una buena eficiencia en cultivos de 72 horas. En el caso de que los cultivos sean más prolongados es mejor utilizar kanamicina (100 µg/mL) y gentamicina (50 µg/mL) y si se sospecha de que pueda contaminarse con *Pseudomonas sp* el antibiótico a usar es la polimixina B (100 U/mL). Como antifúngicos es posible usar nistatina (50 µg/mL) y anfotericina B (2.5 µg/mL) que son efectivos en contra de *Candida sp* y *Aspergillus sp,* que son de los contaminantes más frecuentes en los cultivos celulares.

3.2.4 pH y temperatura

Los requerimientos de temperatura para un buen cultivo son de 37°C con un intervalo de 36 a 38°C, ya que temperaturas menores provocan que el progreso de cultivo sea lento y temperaturas mayores muerte celular.

Con respecto al pH un intervalo adecuado es entre 7 y 7.4 y es conveniente mantener los cultivos con una atmósfera parcial de CO_2 al 5%.

3.2.5 Colchicina

La colchicina es un alcaloide que se une específicamente con la tubulina que es el componente proteico de los microtúbulos que son los responsables de formar el huso mitótico, por lo que detiene o inhibe la división celular en metafase

3.3 Sincronización.

En un cultivo celular podemos tener células en todas las fases de la mitosis, por lo que existe un número limitado de células en metafase que nos permitan observar de manera clara a los cromosomas, por lo que es necesario lograr una sincronía en el cultivo. En este sentido, para mejorar dicha condición se adiciona un bloqueador químico como el metotrexato (MTX) en un estadio temprano del ciclo celular, este compuesto es un análogo del ácido fólico que tiene una alta afinidad por la enzima dihidrofolato reductasa que participa en la síntesis del ácido folínico por lo que este proceso se inhibe; el ácido folínico se requiere para la producción de timina y por lo tanto para la síntesis de ADN. Las células entonces se bloquean antes de la síntesis del ADN en G1/S, una vez que pasa el tiempo suficiente para que todas las células se detengan allí, se retira el bloqueo y todas seguirán el ciclo de forma sincronizada para poder observarlas a todas en metafase.

4. METODOLOGÍA

4.1 Siembra

Material y Equipo

- Tubos Vacuntainer® de 3 mL con heparina
- Tubos Falcon de 15 mL
- Pipetas graduadas de 5 mL
- Micropipetas Gilson
- Incubadora
- Campana de flujo laminar

Reactivos

- Medio de cultivo RPMI con L-glutamina
- Fitohemaglutinina 5 µg/mL
- Antibióticos
    - Penicilina 100 µg/mL
    - Estreptomicina 100 µg/mL
    - Nistatina 50 µg/mL
    - Colchicina 100 µg/mL

Servicios. Energía eléctrica, agua

Procedimiento

1. Tomar 3mL de sangre periférica en un tubo Vacuntainer® con heparina.
2. Colocar en un tubo Falcon de 15 mL, 4.5 mL de medio de cultivo RPMI suplementado con L-glutamina y adicionar 250 µL fitohemaglutinina, además de penicilina, estreptomicina y nistatina (100 µL de cada uno).
3. Al mismo tubo adicionar 400 µL de la muestra de sangre.
4. Mezclar suavemente e incubar durante 72 horas a 37°C.
5. Transcurridas 70 horas de iniciado el cultivo, adicionar 100 µL de colchicina, hasta completar 72 horas de incubación.

4.2 Cosecha

Material y Equipo

- Micropipetas Gilson
- Centrífuga
- Vortex
- Baño metabólico
- Pipetas graduadas de 10mL
- Pipetas Pasteur

Reactivos

- Cloruro de potasio 0.075M
- Fijador Metanol /Ácido acético 3:1

Servicios. Agua, energía eléctrica

Procedimiento

1. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, centrifugar los tubos con el cultivo a 1500 rpm durante 5 minutos.
2. Desechar el sobrenadante y adicionar al paquete celular agitando en vortex 8mL de cloruro de potasio 0.075M para realizar un choque hipotónico.
3. Incubar el tubo por 20 minutos a 37°C.
4. Centrifugar a 1500rpm por 10 minutos.
5. Eliminar el sobrenadante y adicionar al paquete celular lentamente y agitando en vortex 7mL de fijador metanol /ácido acético 3:1
6. Dejar la solución en reposo por 20 minutos.
7. Centrifugar a 1500rpm por 10 minutos

8. Eliminar el sobrenadante y adicionar al paquete celular nuevamente 7 mL de fijador metanol /ácido acético 3:1. Dejar en reposo 15 minutos.
9. Repetir los dos pasos anteriores dejando en reposo sólo 10 minutos.
10. Finalmente resuspender el botón en 0.5 mL de fijador.

4.3 Preparación de laminillas

Material y Equipo

- Portaobjetos
- Pipetas Pasteur
- Congelador

Reactivos

- Alcohol al 70%

Servicios. Agua, energía eléctrica

Procedimiento

1. Colocar en alcohol al 70% portaobjetos por 24 horas con la finalidad de tenerlos libres de grasa.
2. Glasear los portaobjetos, colocándolos en el congelador por 30 minutos.
3. Colocar de 5 a 6 portaobjetos juntos para gotear la suspensión del botón con el fijador desde una altura de 60 a 70 cm.
4. Dejar secar al aire las laminillas.

4.4 Tinción

Material y Equipo

- Pipetas Pasteur
- Microscopio óptico
- Aceite de inmersión

Reactivos

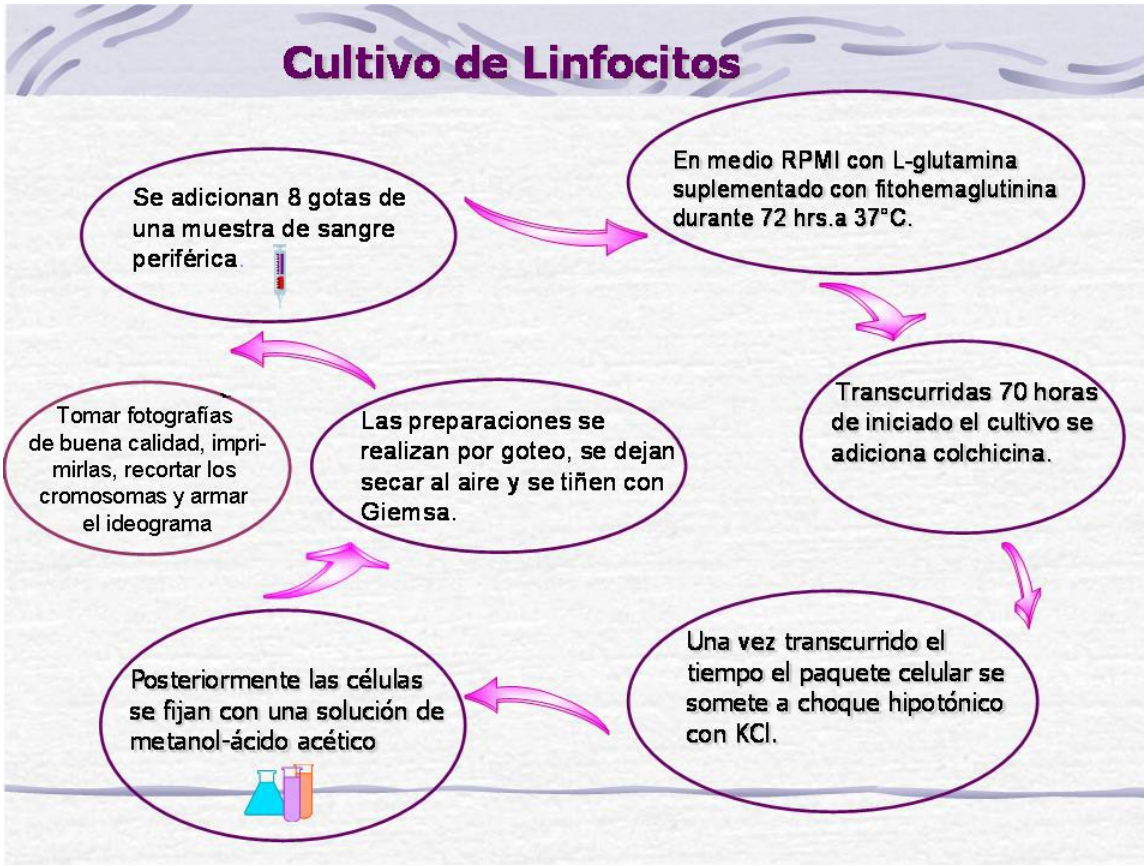
- Colorante de Giemsa 15%

Servicios. Agua, energía eléctrica

Procedimiento

- Cubrir las laminillas con el colorante de Giemsa durante 15 minutos.
- Eliminar el exceso de colorante con agua destilada y dejar secar al aire.
- Observar al microscopio a 40X y 100X.
- Analizar las características de los cromosomas en metafase.

5. DIAGRAMA DE FLUJO



6. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- Preparación de Penicilina

Penicilina	100 µg
Agua Bidestilada	1 mL

- Preparación de Estreptomicina

Estreptomicina	100 µg
Agua Bidestilada	1 mL

- Preparación de Nistatina

Nistatina	100 µg
Agua Bidestilada	1 mL

- Preparación de Colchicina

Colchicina	100 µg
Agua Bidestilada	1 mL

- Preparación de cloruro de potasio

KCl 0.075M	5.6 g
Agua Bidestilada cbp	1000 mL

- Preparación de metanol/ácido acético

Metanol	75 mL
Ácido acético	25 mL
	100 mL

7. CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es la importancia de poder realizar un cultivo celular?
2. ¿Qué factores deben controlarse en un cultivo celular?

3. ¿Qué función tiene y cuál es el mecanismo de acción de la fitohemaglutinina (PHA)?

4. ¿Qué otro reactivo emplearía si no contará con fitohemaglutinina?

5. ¿Por qué se utiliza heparina como anticoagulante para realizar un cultivo de linfocitos?

6. ¿Cuáles son las aplicaciones clínicas de un cultivo de linfocitos?

7. ¿Cuál es el mecanismo de acción de la colchicina?

8. ¿Cuál es la diferencia entre una solución hipotónica y una hipertónica?

9. Describa la nomenclatura de Denver para el armado de cariotipo

10. Describa la utilidad del armado de cariotipo

11. ¿Cuáles son los principales problemas en la identificación de cromosomas por este método?

12. Describa el significado de:

a) 46,XXA-, t(AqGq)+

b) 46,XY, t(Bp-;Dq-)pat

c) 46,XY Gs

d) 46,XYqi

e) 46,XX?22p-

f) 46,XY/47,XY,G+

8. MANEJO DE RESIDUOS

1. El material punzocortante (jeringas o agujas) empleado para la extracción de sangre se desechará en el contenedor rojo ubicado en el área de confinamiento de residuos.
2. Los sobrantes y desechos de sangre líquida o sus componentes se inactivarán con una solución de hipoclorito de sodio al 7% de cloro libre. Esta solución se adicionará a la sangre líquida o sus componentes para alcanzar una concentración final de cloro libre del 0.7%, se incubará a temperatura ambiente por 30 minutos y se verterá al drenaje.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍCAS

1. Barch MJ. **The act cytogenetics** laboratory manual. 2nd Ed. New York: Raven Press, Ltd; 1991.
2. Butler M. **Mammalian cell biotechnology**. New York: Oxford University Press; 1991.
3. Dallman JM, Lamb RJ**. Haematopoietic and lymphoid cell culture**. United Kingdom: Cambridge University Press; 2000.
4. De Robertis E. **Biología celular y molecular**.15° Ed. Buenos Aires: El Ateneo; 2008
5. Freshney RI. **Culture of animal cells: A manual of basic technique**. 3rd Ed. New York: Wiley-Liss Inc; 1994.
6. Hall NM, Raff M, Thomas G. **Cell growth**. **Control of cell size**. China: Cold Spring Habor Laboratory Press; 2004.
7. Jiménez LF, Merchant H. **Biología celular y molecular**. México: Pearson Educación; 2003.
8. Karp G. **Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos**. México: Mc Graw-Hill Interamericana Editores; 2003.
9. Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez-Uría M, Fraile B, Anadan R, Sáez F. **Biología celular.** 3° Ed. China: Mc Graw-Hill Interamericana Editores; 2007.
10. Pollard WJ, Walker MJ. **Basic cell culture protocols**. New Jersey: Humana Press Inc; 1997.
11. Rapley R. **The nucleic acid protocols handbook**. New Jersey: Humana Press Inc; 2000.
12. Rooney DE, Czepulkowski BH. **Human cytogenetics**. A practical approach. Washington: IRL Pres; 1986.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**264/330**

PRÁCTICA 10. IDENTIFICACIÓN HUMANA CON FINES DE EXCLUSIÓN DE PATERNIDAD

1. OBJETIVO

Que el alumno aplique las técnicas de biología molecular en la identificación humana y análisis de paternidad.

2. INTRODUCCIÓN

Toda persona es una combinación única e irrepetible, a excepción de los gemelos univitelinos, del patrimonio genético de sus progenitores y ancestros. El ácido desoxirribonucleico (ADN), proporciona identidad biológica a los individuos, posee características moleculares extraordinarias que permiten reconocer a una persona de entre todas las demás que habitan nuestro planeta.

Los organismos vivos, por sus características biológicas no pueden permanecer indefinidamente en la Tierra, se preservan como especies por medio de la reproducción [1]. El diseño de construcción de cada individuo queda delineado desde que el ADN contenido en el espermatozoide del padre se une al del óvulo de la madre. La reproducción humana no da como resultado productos con características idénticas, sino que introduce variabilidad, como respuesta a las exigencias de un ambiente con circunstancias nuevas y modificadas para poder sobrevivir. En otras palabras, la naturaleza no concentra riesgos manteniendo organismos biológicos inmutables, más bien diversifica su inversión introduciendo variedad en el momento de la concepción, misma que se concentra en una sola célula como la unidad fundamental de tamaño microscópico capaz de reproducción independiente y de generar un individuo completo.

La criminalística es uno de los campos del conocimiento que se ha enriquecido, gracias al desarrollo de los métodos de identificación humana molecular. Se encarga del análisis del indicio físico y tiene como objetivo la identificación de los involucrados así como la reconstrucción del hecho probablemente constitutivo de delito, de esta forma proporciona elementos suficientes al juzgador con el fin de la impartición de justicia.

La utilización del ADN para realizar análisis en el ámbito de la administración de justicia, ha adquirido importancia primordial en procesos civiles (demandas de paternidad) y penales en aquellos hechos delictivos que pueden dejar vestigios biológicos del autor sobre la víctima, el lugar o los instrumentos del delito, así como de la víctima, sobre el autor o sus pertenencias (delitos violentos, como el homicidio, o contra la libertad sexual de las personas); pero también es un elemento particularmente útil para la identificación de cadáveres (desastres o accidentes). Las características del ADN que lo hacen una herramienta sumamente eficaz son:

- *Es **inmutable**, ya que este material genético en un mismo individuo prácticamente no cambia a menos que se exponga a radiaciones o a agentes químicos extraordinariamente tóxicos.*
- *Presenta alta **variabilidad** y **diversidad** de características entre individuos (a excepción de los gemelos idénticos).*
- ***Perennidad**, dado que se encuentra presente desde antes de nacer hasta después de morir.*
- ***Se conoce el modo de herencia,** por lo que se pueden realizar estudios de paternidad, pruebas de parentesco reverso, linaje paterno y materno* [2].

Por lo anterior se ha incorporado una especialidad dentro de la medicina forense: La Genética Forense [3].

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

3.1 Genética Forense

La Genética forense se fundamenta en el estudio de la transmisión de los caracteres hereditarios y el análisis de la variabilidad genética humana aplicada a la resolución de problemas judiciales. Precisa la relación biológica entre los individuos con alto grado de certeza, como en los casos de parentesco; o bien, entre la evidencia biológica recuperada del lugar de los hechos y el o los probables responsables [4]. Por lo que la principal actuación de esta especialidad de las ciencias forenses se desarrolla en:

- Criminalística [5-7]
- Investigación de la paternidad: impugnación por parte del supuesto padre o reclamación por parte de la madre y/o del hijo.

También son de su competencia otras áreas de la identificación humana al margen del ámbito jurídico, como lo son, la identificación humana en los siguientes casos:

Personas desaparecidas [8-10].

Desastres [11-14].

Hechos históricos [15-19].

3.2 Historia de la identificación humana

La identificación humana posiblemente tuvo sus orígenes antes de la era cristiana, ya que existen evidencias de huellas humanas en las cavernas prehistóricas. Sin embargo fue en el año 700 cuando en China se utilizó la impresión de huellas con el fin de establecer identidad de documentos y de esculturas de arcilla, sin existir un sistema formal de clasificación.

Después de 1000 años el anatomista Marcello Malpighi de la Universidad de Bologna en 1686 analizó las características de las huellas digitales, que en ese momento no se consideraban como una herramienta para la identificación individual. En 1823 John Evangelist Purkinji, profesor de anatomía de la Universidad de Breslau en Checoslovaquia, publicó el primer artículo sobre la naturaleza de las huellas digitales, sugirió la elaboración de un sistema de clasificación basado en 9 tipos principales; sin embargo, no logro establecer el potencial de individualización de ese sistema.

La investigación dirigida a la identificación se ha enfocado en la criminalística. En 1883 Alphonse Bertillon con un método antropométrico logró identificar al primer criminal reincidente. Nueve años después Sir Francis Galton publicó el libro *Fingerprints,* donde describió la naturaleza de las huellas dactilares y su aplicación en la resolución de un crimen. Sin embargo, fue hasta 1901 cuando Sir Edward Richard Henry, jefe de Scotland Yard adoptó la identificación por huellas dactilares y reemplazó el sistema antropométrico.

3.3 Criterios convencionales de identificación humana

Las huellas dactilares se consideran importantes en la identificación de personas, ya que no existe el registro de dos personas en las que éstas sean idénticas, ni en los gemelos univitelinos. Aunado a éste sistema de identificación, los siguientes exámenes generales permiten la identificación de menores carentes de documentos, de enfermos con amnesia, de delincuentes, etc.

- Descripción de los rasgos fisonómicos
- Sexo: puede presentar complicaciones en casos de hermafroditismo
- Peso, talla y edad estimadas
- Sistema piloso: (color, forma y tipo de implantación, ausencia)
- Color de ojos y piel
- Marcas particulares: (cicatrices, defectos congénitos, tatuajes)
- Registro de la voz (frecuencia y amplitud de las vibraciones de las cuerdas vocales)
- Trazado caligráfico (haciendo comparación con escritos indubitados**)**

3.4 Técnicas Bioquímicas empleadas en la identificación humana

Estas técnicas se fundamentan en la comparación de diversos productos de expresión génica como: los grupos sanguíneos, las enzimas eritrocitarias, las proteínas plasmáticas y los antígenos de histocompatibilidad (HLA). Todos estos marcadores se transmiten siguiendo la herencia mendeliana.

3.4.1 Grupos sanguíneos

Karl Landstainer en 1900 descubrió los grupos sanguíneos humanos, fueron los primeros marcadores que se utilizaron. Un poco después Leone Lattes, profesor del Instituto de Medicina Forense en Turín, Italia desarrolló la primera prueba de anticuerpos para el sistema ABO. Además fue pionero en el empleo de este marcador en la resolución de una disputa matrimonial. En el libro *L'Individualità del sanguenella biologia, nella clinica, nella medicina legale* se analizaron tanto casos clínicos, como de paternidad, herencia y tipificación de manchas secas.

Los antígenos del sistema ABO también se encuentran en otras células y fluidos corporales (saliva, orina, semen, leche) de los individuos secretores. Al descubrimiento del sistema ABO, se agregaron otros grupos sanguíneos como lo son: el MNS, el RH, el Lewis**,** el Duffy, el Kidd, etc. Estos sistemas en conjunto presentan una probabilidad de exclusión de aproximadamente el 75 %.

3.4.2 Enzimas eritrocitarias

Las enzimas eritrocitarias se han utilizado como marcadores bioquímicos en la identificación de individuos. Las enzimas que presentan mayor polimorfismo son las siguientes: fosfatasa ácida eritrocitaria, fosfoglucomutasa, adenilato cinasa, transaminasa glutámico-pirúvica, adenosina deaminasa, esterasa D, fosfogluconato dehidrogenasa y la glioxilasa. La probabilidad de exclusión que se logra con estos marcadores es de aproximadamente el 61%.

3.4.3 Proteínas plasmáticas

Las proteínas más utilizadas como marcadores son: La transferrina, la alfa-1-antitripsina, el factor B del sistema properdina, la haptoglobina, las proteínas especificas de grupo Gc, el orosomucoide, los alotipos Gm y Km de las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas, la fracción C3 del complemento. La probabilidad de exclusión lograda con estos marcadores es de aproximadamente 71%.

3.4.4 Antígenos de histocompatibilidad (HLA):

Los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad codifican para los antígenos de histocompatibilidad (HLA) se ubican en los loci A, B, C, D, DR, DQ y DP del brazo corto del cromosoma 6. Los antígenos HLA-A, B y C se encuentran en todas las células nucleadas del organismo; en cambio los HLA-D y R se distribuyen en forma limitada sobre los linfocitos B, los macrófagos, los espermatozoides, las células de Langerhans, etc. Presentan en su conjunto una probabilidad de exclusión aproximada del 95 %

3.5 Biología del ADN

Cada individuo está formado por millones de células, las cuales por división celular se derivan del ovocito fertilizado. Estructuralmente nuestras células poseen dos compartimientos principales, el citoplasma y el núcleo. Una excepción son los eritrocitos humanos ya que no contienen núcleo. Dentro de este organelo se encuentran los cromosomas, estructuras en forma de bastón que acarrean el material genético.

Las células humanas contienen 23 pares de cromosomas, se hereda uno de cada par de la madre vía el ovocito y el otro del padre vía el esperma. Los varones heredan el cromosoma Y del esperma del padre, mientras que las mujeres heredan un cromosoma X. De manera, que cada persona XY es un varón o XX una mujer.

La mayoría del ADN (el 99.7%) es igual entre los individuos y solo el 0.3% constituye la variabilidad genética observada, en este sentido, el estudio de las variaciones entre los organismos se ha realizado por medio de los polimorfismos genéticos o marcadores moleculares, que son regiones de ADN no codificante, que al parecer no se encuentran sujetas a presión de selección, lo que permite una enorme variación que contribuye a la identificación humana.

El análisis detallado del genoma humano (Figura 1), ha permitido identificar diversas categorías de secuencias de ADN no funcional, muchas constituyen ADN altamente, moderadamente o poco repetido [20], que a su vez se clasifica de acuerdo a su disposición a lo largo del genoma o al tamaño de la unidad de repetición en dos grupos:

1) ADN repetitivo en tandem, son regiones con una secuencia común repetida de manera continua en un fragmento de ADN y constituyen el 10% del genoma y según la unidad de repetición se subdivide en tres tipos: ADN satélite, ADN minisatélite y ADN microsatélite.

2) ADN repetitivo disperso, constituye del 15-20% del genoma y consiste de secuencias de repeticiones intercaladas individualmente en forma de unidades sencillas que se distribuyen por diversos puntos del genoma y se divide en dos familias denominadas elementos intercalados cortos, formados por menos de 500 pb (SINE) y elementos intercalados largos, compuestos por más de 500 pb (LINE), que derivan de unos fragmentos de ADN transponibles que se han multiplicado hasta dar lugar a un cierto número de copias en nuestro genoma.

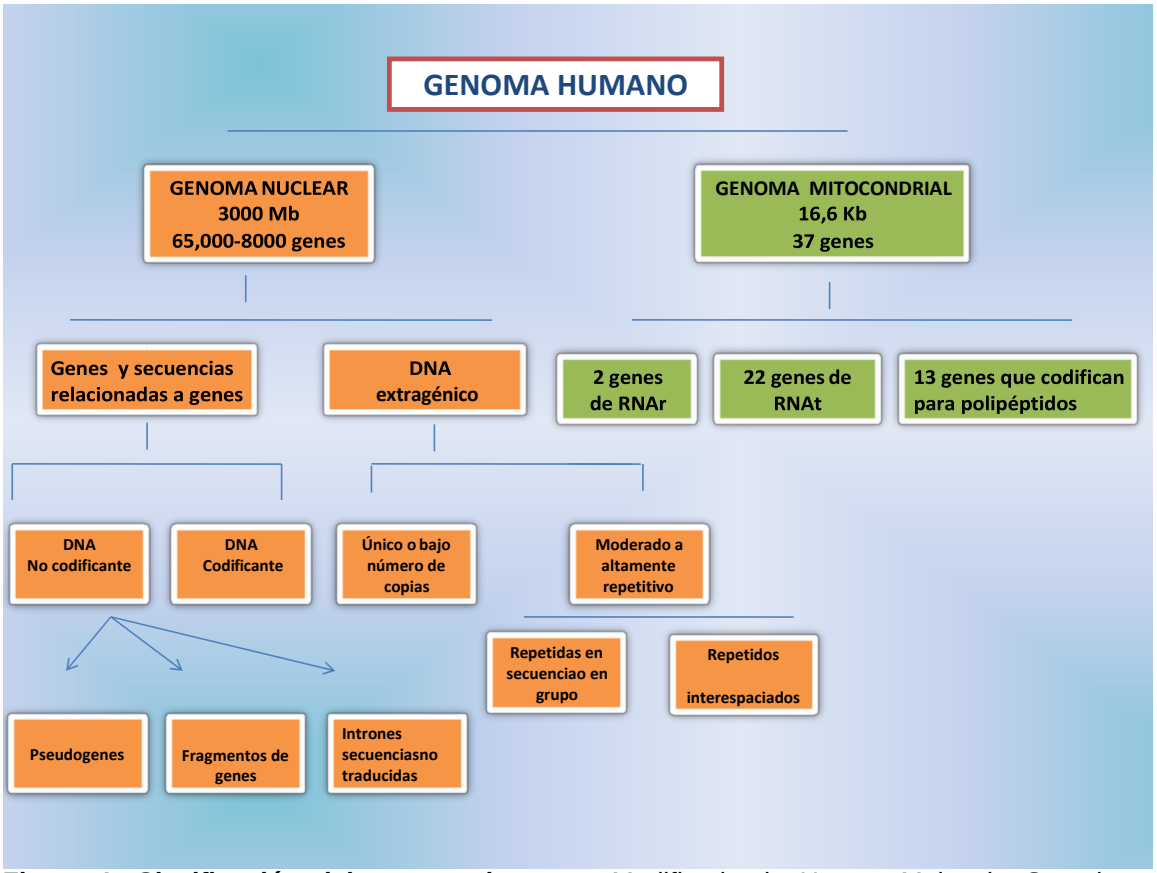


Figura 1. Clasificación del genoma humano. Modificada de Human Molecular Genetics, Strackan and Read (1998). P 148

Una categoría importante de ADN repetitivo es el ADN microsatélite, el cual está constituido por secuencias pequeñas de hasta 400 pb, lo que las hace ideales para el análisis por PCR. Estas secuencias también denominadas STR´s (del inglés *Short Tandem Repeats*) tienen una unidad de repetición que van de 2 a 7 pb [21] y se distribuyen ampliamente en el genoma [22]. Con base en la longitud, el número de repeticiones y la variabilidad que presentan estas secuencias se han denominado STRs simples, complejos y compuestos, o STRs con microvariabilidad baja, intermedia y alta [23].

Los polimorfismos pueden variar por la modificación de una sola base hasta cambios en el número y tamaño de las unidades de repetición y se reconocen dos tipos:

Polimorfismos de secuencia, se producen por el cambio de uno (mutación puntual) o más nucleótidos en una secuencia de ADN y están presentes en el ADN codificante.

Polimorfismos de longitud, presentes por la inserción o deleción de uno o más nucleótidos, es el más abundante del ADN repetitivo mini y microsatélite (Tabla 1).

Durante el desarrollo de los espermas y los ovocitos, los pares de cromosomas se separan, y cada uno se distribuye aleatoriamente al ovocito o al esperma. Esta segregación independiente de cromosomas, combinada con los eventos de recombinación (meiosis) durante el desarrollo de las células gaméticas, crea una gran variedad de combinaciones alélicas en ovocitos y espermas. Esto significa que incluso los hermanos son genéticamente diferentes, aunque menos diferentes que dos personas escogidas aleatoriamente de una población. Los únicos individuos genéticamente iguales son los gemelos idénticos, que se desarrollan a partir del mismo ovocito fertilizado

CLASE	**TAMAÑO DE LA UNIDAD REPETIDA**	**PRINCIPAL LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA**
DNA satélite *(Bloques de 100 Kb hasta varios Mb en longitud)* *Satélites 2 y 3*	5	*La mayoría, posiblemente todos los cromosomas*
Satélite 1 (rico en AT)	*25-48*	*Heterocromatina centromérica de la mayoria de los cromosomas y otras regiones heterocromáticas*
a (ADN alfoide)	*171*	*Heterocromatina centromérica de todos los cromosomas*
β *(familia Sau 3A)*	*68*	*Notablemente la heterocromatina centromérica de 1, 9, 13, 14, 15, 21, 22 y Y.*
ADN minisatélite *(Bloques frecuentemente en el rango de 0.1 a 20 Kb)* *Familia telomérica* *Familia hipervariable*	6 *9-24*	*Todos los telómeros* *Todos los cromosomas, frecuentemente cerca de los telómeros.*
ADN microsatélite *(Bloques frecuentemente menos de 150 pb)*	*1-4*	*Todos los cromosomas*

Tabla 1. Diferentes polimorfismos de ADN y su localización en los cromosomas. Modificado de Human Molecular Genetics, Strackan and Read (1998) P 195.

3.6 Técnicas moleculares utilizadas en la identificación humana

En 1985, por vez primera se resolvió un caso judicial gracias a la aplicación de técnicas donde se caracterizaron secuencias hipervariables en el ADN [5]. Los resultados obtenidos mediante el estudio de las huellas digitales genéticas (DNA- Fingerprinting) permitieron la aclaración de una disputa por inmigración en la Gran Bretaña [24]. Poco tiempo después, una corte civil inglesa aceptó la evidencia del ADN en un caso de paternidad discutida. Posteriormente en 1986 con la aplicación de estas técnicas se logró comprobar la inocencia del principal sospechoso en un caso de homicidio [25, 26]. A partir de 1987, las pruebas de ADN se admitieron como evidencia en las Cortes Criminales de La Gran Bretaña y de Estados Unidos.

En los primeros estudios se utilizaron fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas de restricción, separados por electroforesis y transferidos a una membrana, la cual se hibridizó con una "sonda", constituida por secuencias complementarias de las regiones variables, marcada radiactivamente (Sondas multilocus). La aplicación de la autorradiografía permitió observar bandas de localización desconocida dentro del genoma, características de cada individuo y se heredaban de padres a hijos [5, 24] (Figura 2).

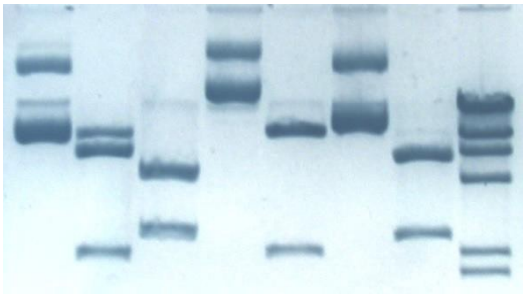


Figura 2. Electroforesis mostrando fragmentos RFLP que difieren en longitud. Laboratorio de Inmunología molecular, FES Zaragoza.

Aún cuando las bandas producidas por las sondas multilocus mostraban alta variabilidad de una persona a otra, los resultados se reproducían con dificultad, ya que las variables en el corrimiento electroforético (voltaje, tiempo, concentración del gel) afectaban la reproducibilidad e interpretación de los resultados.

Gracias al descubrimiento de regiones hipervariables del genoma con localización específica [27] se desarrollaron las sondas de locus único, lo que permitió estudiar una

zona conocida del genoma que se visualizaba como dos únicas bandas para la condición heterocigota, correspondientes cada una a un alelo heredado de cada progenitor.

El empleo de las sondas unilocus y multilocus resolvieron muchos de los inconvenientes experimentales, sin embargo su empleo en la genética forense estaba restringido, por requerir de ADN integro y de alto peso molecular, lo cual rara vez se obtiene en los cadáveres en proceso de descomposición, o en las manchas antiguas de fluidos biológicos o expuestas a condiciones ambientales adversas. Esta problemática se resolvió con el desarrollo de técnicas de amplificación o "copiado" de porciones de ADN mediante la "reacción en cadena de la polimerasa" (PCR), que permitió implementar sistemas de análisis de secuencias más pequeñas presentes en los microsatélites o STRs (Short Tandem Repeats), pero menos variables que las anteriores.

El desarrollo de esta técnica permitió detectar los polimorfismos en la secuencia nucleotídica de la región variable, además de las diferencias de longitud. A partir del descubrimiento de polimorfismos hipervariables en el ADN por Wyman and White [28] y de la posibilidad de emplearlos en identificación humana [5] la probabilidad de exclusión se incremento a más del 99.99 %.

3.7 La Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En el año de 1988 se desarrolló la técnica de amplificación de ADN de pequeñas regiones variables del genoma, a partir de 1700 células diploides, equivalentes a 10 nanogramos de ADN [29], esta técnica se conoce como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Consiste en la amplificación *in vitro* que permite sintetizar millones de copias idénticas de una secuencia única de ADN [30] y se basa en la facilidad que tiene la molécula de ADN para desnaturalizarse y renaturalizarse y la capacidad que tiene la enzima *Taq* polimerasa de síntesis de una nueva cadena tomando como molde cada una de las hebras de ADN desnaturalizado. La síntesis de ADN se inicia utilizando secuencias específicas de 20 a 30 nucleótidos complementarias al fragmento que se desea amplificar en combinación de una ADN polimerasa termoestable que incorpora los nucleótidos. La reacción se lleva a cabo en un termociclador (Figura 3), que realiza la separación, el acoplamiento y la síntesis de la cadena de ADN logrando un aumento exponencial de los fragmentos de ADN de interés.

Figura 3. Aparato de PCR en tiempo real

En la medicina legal la PCR ha enriquecido el análisis de la identificación de individuos a través de la tipificación de regiones cromosómicas con los *loci* STR secuencias de ADN altamente variables o polimórficas que se pueden detectar por PCR normal y por PCR en tiempo real. Los alelos de los *loci* STR se pueden diferenciar por el número de copias de la secuencia repetida presente en la región amplificada y se distinguen de otros utilizando detección radiactiva o fluorescente después de la separación electroforética (Figura 4).

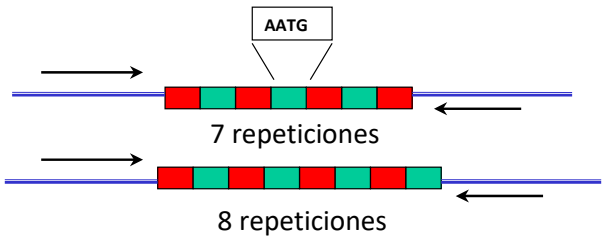


Figura 4. Repeticiones cortas en tandem (STRs) que indican una condición heterocigótica (7 u 8 repeticiones) en el *locus* analizado. El ADN puede ser la prueba determinante para establecer la identidad de una persona.

3.8 ***Genética de poblaciones****.*

Todos los marcadores genéticos se encuentran en la población en frecuencias particulares, se debe determinar la frecuencia con que cada marcador se presenta en una población para hacer mediciones de la fuerza que se tiene al asociar un tipo genético particular. Si el tipo genético encontrado en el lugar de los hechos esta presente en el 50% de la población, si el probable responsable exhibe ese tipo genético el valor de la evidencia es muy bajo. Si por el contrario, el tipo genético se encuentra en solo uno de un millón de personas, el hecho de que tanto la evidencia como el probable responsable tengan el mismo rasgo, adquiere una enorme significancia a favor de que la evidencia corresponde al probable responsable.

En el análisis forense se utilizan diversos marcadores. La forma de expresar la fuerza total de la concordancia genética es multiplicar las frecuencias individuales de los diferentes marcadores. A mayor número de marcadores empleados mayor es la fuerza de la concordancia genética, sólo si los marcadores en cuestión pasan ciertas pruebas genéticas y estadísticas. La primera, es que la población analizada se encuentre dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg. Esto significa que los alelos de un locus no muestran una correlación a priori con otro más. Por otro lado, los genotipos en diferentes loci deben perder correlación con cualquier otro en la población. A esto se le conoce como equilibrio de enlace, una de las formas en que la población puede desviarse del equilibrio de Hardy-Weinberg y/o del equilibrio de enlace es si un alto grado de subestructura está presente en la población debido a poblaciones distintas pero indetectables. Esto puede ocurrir si pequeños grupos dentro de una población muy grande tienden a aparearse preferencialmente, creando un grupo reproductivo relativamente aislado.

> *El modelo de Hardy-Weinberg establece la relación predecible entre las frecuencias alélicas y las frecuencias genotípicas en un locus en particular, aún si el genotipo no se ha observado en una muestra poblacional real.*
>
> *El equilibrio de enlace se define como una condición del estado de equilibrio de una población donde la frecuencia de un genotipo multilocus es el producto de la frecuencia de cada locus por separado, aún si el perfil no ha aparecido en una muestra poblacional real* [31].

3.8.1 Valoración de la fuerza de la evidencia

El propósito de la tipificación de ADN es probar la hipótesis de que una persona en particular es la fuente del material biológico que se encontró en el lugar de los hechos. La evidencia y la muestra de referencia se someten a una batería de pruebas de ADN. Una vez completas, el analista es capaz de determinar si la persona es o no la fuente biológica de la evidencia en cuestión.

Las tres conclusiones posibles que se derivan son:

1. Los perfiles son diferentes y entonces se debieron originar de diferentes fuentes (exclusión).
2. Con base en los resultados no es posible estar seguros de la prueba, si las muestras tienen el mismo tipo de ADN (inconcluso). Esto puede ocurrir por: la degradación, la contaminación, o falla en algunos aspectos del procedimiento.
3. Los perfiles son iguales y pudieron originarse de la misma fuente.

3.8.2 Determinación de la concordancia genética.

En los sistemas basados en PCR que se desarrollaron para uso forense, los marcadores de secuencia o longitud se detectan fácilmente como alelos discretos. Los genotipos de dos muestras son iguales o no. La ambigüedad se presenta solamente en situaciones en las que se detecta mezcla o muestras mínimas para los que el genotipo completo no puede deducirse.

Evaluación de los resultados:

Las muestras pueden exhibir concordancia bajo tres circunstancias:

1. Las muestras provienen de una fuente común, esto significa que la evidencia viene de la misma persona que donó la muestra de referencia.
2. La concordancia es una coincidencia: la evidencia proviene de otra persona que donó la muestra de referencia. La concordancia resulta de dos individuos, el donador de la referencia y el donador verdadero que por coincidencia comparte el mismo perfil genético en los marcadores genéticos analizados.
3. La concordancia es un accidente (error): la evidencia proviene de otra persona diferente del donador de la muestra de referencia pero ocurrió un error en la

recolección, en el procedimiento analítico o burocrático de forma que la evidencia y la muestra de referencia parecen tener el mismo perfil genético [31].

3.9 Pruebas de paternidad

La determinación de paternidad se basa en el hecho de si existen alelos compartidos entre el probable padre y el menor cuando se estudia una gran cantidad de marcadores genéticos. El resultado final de la prueba de paternidad es simplemente inclusión o exclusión. El fundamento de la paternidad es de que en ausencia de mutación, un niño recibe un alelo de cada progenitor en cada locus genético estudiado (Figura 5).

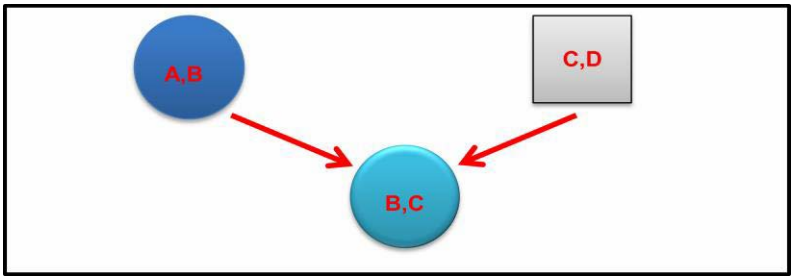


Figura 5. Patrón de herencia mendeliana. La madre posee los alelos A, B, el padre los alelos C y D. La madre contribuye con el alelo B y el padre con el alelo C en la niña

4. MÉTODOS

4.1 Extracción del ADN

Existen varias técnicas para extraer el ADN en el campo forense, debido a que la naturaleza del material biológico puede variar con frecuencia las cantidades son extremadamente bajas y la calidad del ADN muy pobre. Se han propuesto diferentes

formas de tratar el indicio en razón del soporte en el que se encuentra. La muestra testigo o de referencia requiere tratamientos especiales, ya que puede consistir en sangre, tejido, pelo, saliva hueso o diente.

Existen técnicas de extracción diferencial de ADN para los casos de violación (Differex), FTA Whatman para muestras de referencia consistentes en sangre y saliva; Chelex o ADN IQ para muestras en las que se presume que el soporte contiene inhibidores (sangre, semen o saliva en pantalón de mezclilla o en tierra), El kit Tissue and hair extraction se utiliza para la extracción de ADN de bulbos de folículos pilosos, etc.

4.1.1 Extracción de ADN de esperma, con el Kit DIFFEREX a partir de indicios de delitos sexuales.

Nota: asegúrese que la solución de lavado del ADN IQ sea fresca

Materiales y Equipo

Tubos Eppendorf de 1.5 mL

Vortex Genie

Thermomixer Eppendorf

Canastillas de centrifugación (spin basket)

Microcentrífuga Eppendorf

Micropipetas Gilson de: 20, 200 y 1000µL

Gradilla magnética

Soluciones y Reactivos

Solución de digestión

Proteinasa K Sigma10mg/mL

Agua destilada estéril

Solución de separación

DTT Sigma

Resina IQ

Amortiguador de lisis

Servicios. Agua, energía eléctrica

Procedimiento

1. Limpiar perfectamente el área que se utilizará en la extracción con hipoclorito al 1%.
2. Etiquetar tubos Eppendorf de 1.5 mL con la clave correspondiente a la muestra a trabajar.
3. Preparar la solución de digestión (color amarilla): por cada mL de amortiguador de digestión (color amarillo), agregar 27 μL de proteinasa K con una concentración de 10 mg/mL para tener una concentración final de 270 μg/mL. Mezclar y usar inmediatamente.
4. Colocar el soporte sólido que contiene el esperma en un tubo para microcentrifuga.
5. Adicionar 400 μL de la solución de digestión amarilla preparada en el paso número 3.
6. Cerrar el tubo y agitar en Vortex a alta velocidad por 30 segundos asegurarse de mantener el tubo Eppendorf en posición vertical mientras se agita.
7. Colocar el tubo a incubación de 56 ºC por una hora.
8. Colocar en un spin basket y en su interior el soporte sólido y centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm y 4ºC.

9. Retirar la canastilla para centrifugar (spin basket) con soporte sólido. Tomar 100 µL del sobrenadante, colocarlo en un microtubo nuevo y etiquetarlo como primera fracción femenina.
10. Colocar 27 µL de proteinasa K con una concentración de 10 mg/mL a la fracción que contiene el esperma (a los 300 µL restantes) e incubar una hora a 56ºC.
11. Colocar 100 µL de la solución de separación en un tubo para microcentrífuga limpio.
12. Transferir lentamente el remanente de la solución de digestión que contiene la fracción masculina en el tubo que contiene la solución de separación.
13. Tapar el tubo y centrifugar por 10 minutos a la máxima velocidad (14000 rpm) en una microcentrífuga a temperatura ambiente. Después de la centrifugación el tubo contendrá un botón pequeño ligeramente amarillo o blanco correspondiente al esperma, una solución de separación clara en la parte inferior y una solución de digestión color amarilla en la parte superior que contiene el ADN de las células epiteliales.
14. Remover y descartar el remanente de solución de digestión amarilla de la tapa del tubo con una micropipeta.
15. Remover la totalidad de la solución amarilla para la purificación del ADN epitelial, coloque esta solución en un tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo, etiquételo como segunda fracción femenina. La solución de separación puede removerse con el amortiguador amarillo.
16. Transferir 900 µL de agua sobre la solución de separación, lavar las paredes del tubo para remover cualquier remanente del amortiguador amarillo. Si en el remanente existe agua y la solución de separación no afectará los resultados, pero tener extremo cuidado de no perturbar el botón.
17. Esperar 30 segundos ó más y entonces remover y descartar la capa superior acuosa arriba de la tercera parte de la solución de separación y cualquier detrito celular cerca de la vecindad de las dos soluciones. Este paso de lavado diluye y remueve el amortiguador que contiene el ADN epitelial en la interfase y sobre las paredes del tubo. No perturbar el botón.
18. Realizar un segundo lavado repitiendo los pasos 13 y 14 dos veces más para un total de 3 lavados.

19. Para extraer ADN de la fracción espermática adicionar 200 µL del amortiguador de lisis del ADN IQ con DTT (1 µL de DTT por cada 100 µL de amortiguador de lisis). Agitar en Vortex brevemente. La solución de separación se disolverá completamente en el amortiguador de lisis y el esperma se lisará.
20. Agitar en Vortex por unos segundos e incubar a 56ºC por una hora.
21. Adicionar 7 µL de la resina mezcle y proceda con la purificación.
22. Adicionar 2 volúmenes de amortiguador de lisis con DTT (1 µL de DTT por cada 100 µL de amortiguador de lisis) a la solución amarillenta que contiene el ADN de las células epiteliales y mezclar. Adicionar 7 µL de la resina, mezclar y proceder con la purificación.
23. Agitar en Vortex por 3 segundos y dejar incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
24. Agitar con el Vortex por 2 segundos a alta velocidad y colocar el tubo en la gradilla magnética. La separación ocurre instantáneamente.
25. Remover con cuidado y descartar la solución sin perturbar la resina.
26. Adicionar 100 µL del amortiguador de lisis, remover el tubo de la gradilla magnética y agitar en el Vortex por 2 segundos a alta velocidad.
27. Regresar a la gradilla magnética y desechar el amortiguador de lisis.
28. Adicionar 100 µL del amortiguador de lavado preparado. Remover el tubo de la gradilla magnética y agitar en el Vortex por 2 segundos a máxima velocidad, regresar el tubo a la gradilla magnética y descartar la solución de lavado.
29. Repetir el paso 28 dos veces más. Asegúrese que toda la solución se descartó al final del tercer lavado.
30. Con las tapas abiertas de los tubos, secar al aire la resina por 5 minutos.
31. Adicionar 50 µL de amortiguador de elusión.
32. Cerrar las tapas, agitar en por 2 segundos a alta velocidad e incubar a 65ºC por 5 minutos.
33. Remover el tubo del bloque caliente y agitar por 2 segundos en el Vortex, inmediatamente colocar el tubo en la gradilla magnética.
34. Transferir la solución en un reservorio de conveniencia.

4.1.2. Extracción de ADN a partir de sangre en FTA®

Materiales y Equipo:

Guantes

Cubrebocas

Tubos Eppendorf de 1.5 mL

Micropipetas y puntas de 1 mL y de 200 μL

Agua destilada estéril libre de nucleasas

Bulbos o pipetas de transferencia estériles

Pipetas graduadas de 10 mL o tubos Falcon nuevos

Microperforador Harris (micropuncher)

Lancetas o sistema Vacutainer

Toallas absorbentes de papel

Thermomixer o Vortex

Tarjetas FTA

Soluciones y reactivos

Reactivo FTA

Agua destilada estéril

Servicios. Agua, energía eléctrica.

Procedimiento

1. Limpiar perfectamente el área de trabajo, usar guantes y cubrebocas, cerrar lo que permita la circulación de aire (puertas, ventanas, etc).

2. Etiquetar tubos Eppendorf de 1.5 mL con la clave correspondiente a la muestra a trabajar.
3. Colocar 5-10 fragmentos de 1.2 mm de diámetro de papel FTA con la muestra de sangre en un tubo Eppendorf de 1.5 mL previamente etiquetado.
4. Llevar las muestras al área de extracción de ADN y colocar 400 μL (8 gotas) del reactivo de FTA a cada tubo.
5. Incubar a temperatura ambiente y agitación (1000 rpm) durante 5 minutos en el thermomixer o en Vortex a baja velocidad durante el mismo tiempo
6. Decantar con sumo cuidado el reactivo de FTA, procurando limpiar el remanente del reactivo en la boca del tubo con un papel absorbente limpio.
7. Colocar 400 μL (8 gotas) de agua destilada estéril libre de nucleasas a cada muestra.
8. Incubar a temperatura ambiente y con agitación (1000 rpm) durante 5 minutos en el Thermomixer o en Vortex a baja velocidad por el mismo tiempo.
9. Decantar con sumo cuidado el agua, procurando limpiar el remanente del reactivo en la boca del tubo con un papel absorbente limpio.
10. Colocar 400 μL (8 gotas) de agua destilada estéril libre de nucleasas a cada muestra.
11. Incubar a temperatura ambiente y agitación (1000 rpm) durante 5 minutos en el Thermomixer.
12. Retirar con sumo cuidado el agua con una micropipeta con punta de 1000 μL.
13. Dejar secar los tubos a 60ºC en el termomixer durante 30 minutos, hasta que no queden residuos de agua.
14. La muestra está ADN embebida en el papel FTA esta lista para amplificarse por PCR.

4.1.3. Extracción de ADN a partir de pelo con el Kit (Tissue and hair extraction Kit)

Materiales y Equipo:

Guantes

Cubrebocas

Tubos Eppendorf de 1.5 mL

Micropipetas y puntas de 1 mL y de 200 μL

Agua destilada estéril libre de nucleasas

Bulbos o pipetas de transferencia estériles

Pipetas graduadas de 10 mL o tubos Falcon nuevos

Thermomixer Eppendorf o Vortex Genie

Soluciones y reactivos

Agua destilada estéril

Solución de digestión

Proteinasa K Sigma 10mg/mL

Agua destilada estéril

Solución de separación

DTT

Resina IQ

Servicios

Energía eléctrica, agua

Procedimiento

1. Limpiar perfectamente el área que se utilizará en la extracción con hipoclorito al 1%.
2. Etiquetar tubos Eppendorf de 1.5 mL con la clave correspondiente a la muestra a trabajar.
3. Observar el pelo al microscopio, identificar la presencia de bulbo y seccionar 0.5 cm a partir de la sección proximal.
4. Colocar el fragmento en tubos Eppendorf de 1.5 cm.
5. Lavar dos veces con agua destilada estéril y libre de nucleasas.
6. Dejar secar.
7. Preparar el amortiguador de incubación/Proteinasa K: Amortiguador de incubación hair and tissue: 800 µl; DTT 1M: 100 µL; Proteinasa K stock sol 100 µL (esta solución se prepara colocando 5.5 mL de amortiguador de incubación hair and tissue al frasco de proteinasa K que viene en el kit).
8. Adicionar 25 a 100 µL de la solución anterior por cada folículo piloso.
9. Incubar a 56ºC por 1 hora.
10. Colocar la muestra a temperatura ambiente y adicionar 2 volúmenes de amortiguador de lisis ADN IQ (preparado con 100 µL de amortiguador de lisis y 1 µL de DTT) y 7 µL de la resina ADN IQ.
11. Agitar en el Vortex por 3 segundos y dejar incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
12. Agitar con el Vortex por 2 segundos a alta velocidad y colocar el tubo en la gradilla magnética. La separación ocurre instantáneamente.
13. Remover cuidadosamente y descartar la solución sin perturbar la resina.
14. Adicionar 100 µL del amortiguador de lisis que contiene 1µL de DTT remover el tubo de la gradilla magnética y agitar en vortex por 2 segundos a alta velocidad.
15. Regresar el tubo a la gradilla magnética y desechar el amortiguador de lisis.

16. Adicionar 100 µL del amortiguador de lavado. Remover el tubo de la gradilla magnética y agitar en el Vortex por 2 segundos a máxima velocidad, regresar el tubo a la gradilla magnética y descarte la solución de lavado.
17. Repita el paso 16 dos veces más. Eliminar toda la solución al final del tercer lavado.
18. Con las tapas abiertas, secar al aire la resina por 5 minutos.
19. Adicionar 50 µL de amortiguador de elusión.
20. Cerrar las tapas, agitar con Vortex por 2 segundos a alta velocidad e incubar a 65ºC por 5 minutos.
21. Remover el tubo del bloque caliente y agitar por 2 segundos en vortex, inmediatamente colocar el tubo en la gradilla magnética.
22. Transferir la solución en un reservorio de conveniencia.

Nota: asegurarse de que la solución de lavado del ADN IQ se haya preparado recientemente.

4.1.4 Extracción de ADN a partir de tejido con el Kit (Tissue and hair extraction).

Materiales y Equipo:

Guantes

Cubrebocas

Tubos Eppendorf de 1.5 mL

Micropipetas y puntas de 1 mL y de 200 µL

Agua destilada estéril libre de nucleasas

Bulbos o pipetas de transferencia estériles

Pipetas graduadas de 10 mL o tubos Falcon nuevos

Thermomixer o Vortex

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**288/330**

Soluciones y reactivos

Agua destilada estéril

Solución de digestión

Proteinasa K 10mg/mL

Agua destilada estéril

Solución de separación

DTT

Resina IQ

Servicios. Agua, energía eléctrica

Procedimiento

1. Limpiar perfectamente el área que se utilizará en la extracción con hipoclorito al 1%.
2. Etiquetar tubos Eppendorf de 1.5 mL con la clave correspondiente a la muestra a trabajar.
3. Colocar aproximadamente 5 mg de tejido o menos perfectamente lavado, en un tubo de 1.5 mL. La cantidad de tejido depende de las condiciones y el tipo de muestra. Se pueden utilizar cantidades mayores de tejido (25mg), si el tejido se muele antes del tratamiento con proteinasa K, contienen altas cantidades de ADN, y el lisado queda muy viscoso e impiden la captura del ADN por la resina durante la separación magnética.
4. Preparar la solución amortiguadora de incubación/proteinasa K (Amortiguador de incubación hair and tissue: 800 µL, DTT 1M: 100 µL, Proteinasa K solución stock: 100 µL (esta solución se preparó colocando 5.5 mL de amortiguador de incubación hair and tissue al frasco de proteinasa K que viene en el kit)).
5. Adicionar de 50 a 100 µL de la solución anterior por cada mg de tejido.

6. Incubar a 56ºC por dos horas o toda la noche dependiendo del tipo de muestra. La mayoría de los tejidos se digerirán completamente en dos horas, pero los tejidos fijados con formalina o embebidos en parafina, se incuban por toda la noche.
7. Colocar la muestra a temperatura ambiente y adicionar 2 volúmenes de amortiguador de lisis (ADN IQ, preparado con 100 µL de amortiguador de lisis y 1 µLde DTT) y 7 µL de la resina ADN IQ, o bien colocar el lisado en el maxwell y esperar a que el equipo proporcione el ADN puro eluído.
8. Agitar en EL Vortex por 3 segundos y dejar incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
9. Agitar con el Vortex por 2 segundos a alta velocidad y colocar el tubo en la gradilla magnética. La separación ocurre instantáneamente.
10. Cuidadosamente, remover y descartar la solución sin perturbar la resina.
11. Adicionar 100 µL del amortiguador de lisis que contiene 1µL de DTT remover el tubo de la gradilla magnética y agitar en el vortex por 2 segundos a alta velocidad.
12. Regresar el tubo a la gradilla magnética y desechar el amortiguador de lisis
13. Adicionar 100 µL del amortiguador de lavado preparado. Remover el tubo de la gradilla magnética y agitar en el Vortex por 2 segundos a máxima velocidad, regrese el tubo a la gradilla magnética y descarte la solución de lavado.
14. Repetir los lavados dos veces más. Asegurarse de descartar toda la solución al final del tercer lavado.
15. Con las tapas abiertas, secar al aire la resina por 5 minutos.
16. Adicionar 50 µL de amortiguador de elusión.
17. Cerrar las tapas de los tubos y agitar en el Vortex por 2 segundos a alta velocidad y colocar a 65ºC por 5 minutos
18. Remover el tubo del bloque caliente y agitar por 2 segundos en el Vortex, inmediatamente coloque el tubo en la gradilla magnética.
19. Transfiera la solución en un reservorio de conveniencia.

4.1.5 Extracción de ADN a partir de tela con el Kit (Tissue and hair extraction)

Materiales y Equipo:

Guantes

Cubrebocas

Tubos Eppendorf de 1.5 mL

Micropipetas y puntas de 1 mL y de 200 μL

Agua destilada estéril libre de nucleasas

Bulbos o pipetas de transferencia estériles

Pipetas graduadas de 10 mL o tubos Falcon nuevos

Thermomixer o Vortex

Soluciones y reactivos

Agua destilada estéril

Solución de digestión

Proteinasa K 10mg/mL

Agua destilada estéril

Solución de separación

DTT

Resina IQ

Servicios. Energía eléctrica, agua

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**291/330**

Procedimiento

1. Limpiar perfectamente el área que se utilizará en la extracción con hipoclorito al 1%.
2. Etiquetar tubos Eppendorf de 1.5 mL con la clave correspondiente a la muestra a trabajar.
3. Colocar 4 mm^2 de tela impregnada con sangre en el tubo de 1.5 mL.
4. Preparar la solución de amortiguador de incubación/proteinasa K: amortiguador de incubación hair and tissue: 800 µL, DTT1M: 100 µL, Proteinasa K solución stock 100 µL (esta solución se prepara adicionando 5.5 mL de amortiguador de incubación hair and tissue al frasco de proteinasa K que viene en el kit).
5. Adicionar 100 µL de la solución anterior por cada fragmento de tela con sangre.
6. Incubar a 56ºC por 1 hora.
7. Colocar la tela en una canastilla de centrifugación (spin basket), centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos. Separar el spin basket con la tela. La muestra se encuentra ahora en el tubo.
8. Colocar la muestra a temperatura ambiente y adicionar 2 volúmenes de amortiguador de lisis (DNA IQ, preparado con 100 µl de amortiguador de lisis y 1 µL de DTT) y 7 µL de la resina DNA IQ, o bien colocar el lisado en el maxwell y esperar a que el equipo proporcione el ADN eluido puro.
9. Agitar en vortex por 3 segundos e incubar a temperatura ambiente por 5 min.
10. Agitar con vortex por 2 segundos a alta velocidad y colocar el tubo en la gradilla magnética. la separación ocurre instantáneamente.
11. Cuidadosamente, remover y descartar la solución sin perturbar la resina.
12. Adicionar 100 µL del amortiguador de lisis que contiene 1µL de DTT remover el tubo de la gradilla magnética y agitar en el Vortex por 2 segundos a alta velocidad.
13. Regresar el tubo a la gradilla magnética y desechar el amortiguador de lisis.
14. Adicionar 100 µL del amortiguador de lavado preparado. Remover el tubo de la gradilla magnética y agitar en el Vortex por 2 segundos a máxima velocidad, regrese el tubo a la gradilla magnética y descartar la solución de lavado.

15. Repetir el paso 14 dos veces más. Asegúrese que toda la solución se descartó al final del tercer lavado.
16. Abrir las tapas y permitir que la resina seque al aire por 5 minutos.
17. Adicionar 50 µL de amortiguador de elusión.
18. Cerrar las tapas, agitar en vortex por 2 segundos a alta velocidad e incubar a 65ºC por 5 minutos.
19. Remover el tubo del bloque caliente y agitar por 2 segundos en el Vortex, inmediatamente colocar el tubo en la gradilla magnética.
20. Transferir la solución en un reservorio de conveniencia.

4.2 *Cuantificación de ADN*

Las pruebas en el laboratorio forense deben considerar que el ADN extraído del indicio con el que se trabaja puede estar contaminado con ADN de cualquier microorganismo (sobre todo el obtenido de cadáveres en avanzado estado de putrefacción), lo que provocará una sobreestimación del ADN blanco, si se utilizan técnicas como la absorción UV o electroforesis, esto llevará al bajo o nulo rendimiento de la PCR. El estándar de oro de la cuantificación de ADN es la qPCR o PCR cuantitativa.

4.3. Amplificación de ADN (STR's)

El kit multiplex contiene las soluciones requeridas para llevar a cabo la amplificación: iniciadores, dNTP's, solución amortiguadora con magnesio, marcador alélico y solución de carga. El usuario deberá solicitar la polimerasa.

Material y Equipo

- Micropipetas
- Puntas para micropipeta estériles
- Hielo picado
- Tubos eppendorf 0.5 ml estériles.

- Termociclador
- Vortex
- Guantes

Soluciones y reactivos

- ADN problema de la madre, el hijo y supuesto(s) padre(s)
- Agua bidestilada estéril o agua calidad milipore
- Taq polimerasa cetus 5 U/µL
- Aceite mineral
- Kits STR´s promega monoplexes (LPL, vWA, F13B, FESFPS, TPOX, F13A01, TH01, CSF1PO) y multiplexes (D75820,D135317, D165539).

Servicios. Agua y energía electrica.

Procedimiento

1. Calcular la cantidad necesaria de ADN problema para generar soluciones que contengan 2.8 ng/mL.
2. Preparar una solución de 3ng/µL de la solución DNA K562 del kit promega como control positivo.
3. Descongelar los tubos del kit (10X amortiguador y 10X primers), agitar en vortex por 15 segundos y colocar en hielo.
4. Determinar el número de reacciones y marcar tubos Eppendorf estériles de 0.5 ml. y adicionar un control negativo (agregar una o dos reacciones extra a este número para compensar el error de pipeteo).
5. Calcular la cantidad requerida de mezcla maestra para cada reactivo de PCR multiplicando el volumen requerido para cada reactivo por el número total de reacciones:

Reactivos de la mezcla maestra							
Monoplex				Multiplex			
	Volumen por muestra (µl)	X Número de reacciones	Volumen final (µL)		Volumen por muestra (µL)	X Número de reacciones	Volumen final (µL)
Agua estéril	7.4			Agua estéril	7.4		
10x amortiguador	1.25			10x amortiguador	1.25		
10x primers (locus especifico)	1.25			10x primers (mezcla)	1.25		
Taq polimerasa cetus	0.1			Taq polimerasa cetus	0.1		
Vol. total	10			Vol. total	10		

6. Preparar la mezcla maestra adicionando los reactivos en un tubo eppendorf estéril de 0.5 mL, mezclar en Vortex y mantener en hielo.
7. Adicionar 10 µL de la mezcla maestra a cada tubo de 0.5 mL estéril previamente etiquetado y colocar sobre hielo.
8. Adicionar 50 µL de aceite mineral a cada tubo.
9. Afuera de la campana. Adicionar al tubo control positivo 2.5 µL de la solución de DNA K562 y como control negativo 2.5 µL de agua estéril.
10. Adicionar 2.5 µL de las soluciones de ADN problema (7ng) de cada muestra dentro de su tubo respectivo o 1 papel FTA con una aguja estéril.

Notas:

1. Adicionar el ADN o el papel FTA directamente en la fase acuosa y mantener sobre hielo.

2. Si el ADN problema se encuentra almacenado en amortiguador TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA [pH 7.5]), el volumen de la muestra no debe exceder el 20% de el volumen final de reacción. La eficacia de la amplificación por PCR y la calidad pueden alterarse por cambios en el pH (debido al Tris-HCl agregado) o por cambios en la concentración de magnesio (debido a quelación con el EDTA). Las muestras de ADN almacenadas o diluidas en agua desionizada estéril no están sujetas a esta precaución.

- Programar el termociclador según la región a amplificar y seguir el programa:

Protocolos de amplificación				
Locus STR	Incubación inicial	10 ciclos	20 ciclos	Extensión
FESFPS, HPRTB	96°C – 2 minutos	94°C- 1 minuto 60°C- 1 minuto 70°C- 1.5 minutos	90°C- 1 minuto 60°C- 1 minuto 70°C- 1.5 minutos	No
LPL, F13B, vWA, Multiplex (D16S539, D7S820, D13S317)	96°C - 2 minutos	94°C- 1 minuto 60°C- 1 minuto 70°C- 1.5 minutos	90°C- 1 minuto 60°C- 1 minuto 70°C- 1.5 minutos	60°C- 30 minutos
CSF1PO, F13A01, TPOX, TH01	96°C - 2 minutos	94°C- 1 minuto 64°C- 1 minuto 70°C- 1.5 minutos	90°C- 1 minuto 64°C- 1 minuto 70°C- 1.5 minutos	No

- Una vez que finalizó el programa, almacenar los amplicones a -20°C.

4.4 Electroforesis de los productos de PCR

Material y Equipo

- Micropipetas
- Puntas para micropipeta
- Tubos Eppendorf 0.5 mL
- Cámara de electroforesis vertical

Reactivos

- Amortiguador TBE 10X
- Acrilamida:bisacrilamida al 30% (29:1)
- TEMED
- Persulfato de amonio 10%.
- Solución de carga
- Agua bidestilada estéril
- Agua desionizada
- Bromuro de etidio 100 mg/mL

Servicios. Agua, energía eléctrica

Procedimiento

Nota. La acrilamida no polimerizada es **neurotóxica** y puede ser carcinogénica evite la inhalación y el contacto con la piel. Siempre use guantes y lentes de seguridad cuando trabaje con polvo o soluciones de acrilamida.

1. Preparar el gel de poliacrilamida al 10% de acuerdo a la siguiente tabla:

Gel 10 x 10 cm x 0.5 mm. Para el multiplex se deberán preparar 5 mL de un gel al 8% de 16 x 20 cm x 0.75 mm

REACTIVOS	8%	10%
Agua desionizada	17 mL	2.75 mL
Amortiguador TBE 10X	1.25 mL	0.5 mL
Acrilamida: bisacrilamida (29:1)	6.65 mL	1.66 mL
TEMED	20 µL	8 µL
Persulfato de amonio al 10%	175 µL	80 µL
Vol. Total	25 mL	5 mL

2. Cuidadosamente vacíe la solución de acrilamida entre las placas de vidrio.
3. Posicione el gel horizontalmente y remueva cualquier burbuja que se haya formado.
4. Inserte el peine entre las placas de vidrio.
5. Permita la polimerización por al menos una hora.

Notas:

- El gel puede almacenarse toda la noche en una toalla de papel saturada con agua desionizada y cubierta de plástico sobre el final de los pozos para prevenir que el gel se seque. Si no se utiliza espaciador en la parte final del gel, también esa parte debe estar protegida del secado de la misma forma que la parte superior.
- La concentración del gel y el tiempo de electroforesis están diseñados para placas de 16 x16 cm x 0.5 ó 0.75 mm monoplex y multiplex geles de 16 x 20 cm x 0.5 ó 0.75 mm.
- El tiempo de electroforesis es para un voltaje de 300 V.

6. Para el corrimiento electroforético de cada STR consulte la siguiente tabla:

STR	Tiempo de electroforesis (minutos)
LPL	90
vWA	100
F13B	100
TH01	110
TPOX	120
FESFPS	120
CSF1PO	140
F13A01	130
Multiplex	180

7. El azul de bromofenol y el xilen-cyanol corren a:

Gel	Azul de bromofenol (pb)	Xilen-cyanol (pb)
10%	30	110
8%	45	160

8. Preparar 0.5X TBE adicionando 15 mL de amortiguador TBE 10X a 285 mL de agua desionizada y llenar los pozos del gel.
9. Marcar un tubo y adicionar 1 µL de marcador molecular (100 o 50 pb), 19 µL de agua bidestilada estéril y 10 µL de solución de carga (cantidad suficiente para 2 pozos).
10. Marcar otro tubo y adicionar 3 µL de la escala alélica del STR y 2 µL de la solución de carga (por cada pozo).
11. Adicionar directamente a los productos de PCR 5 µL de solución de carga.
12. Cargar 8 µL de cada muestra a su respectivo pozo. Se recomienda poner marcador molecular en el primer y último pozo, mientras la escala alélica se recomienda entre cada muestra problema.

13. Correr la electroforesis en 0.5X TBE a 150 V por 20 min. y 300 V. Conociendo los intervalos de tamaño para cada locus (Tabla 2) y las características de migración de los colorantes, pare la electroforesis en el tiempo que requiere cada región y el locus de interés queda aproximadamente en la mitad del gel.
14. Teñir el gel con 20µL de una solución de bromuro de etidio 10mg/mL en 300 mL de agua desionizada (0.67µg/mL) por 2 minutos.
15. Lavar el gel en agua desionizada por 3 minutos.
16. Colocar el gel en el analizador de geles y capturar la imagen.

4.5 Análisis de los datos

Para facilitar la interpretación, los marcadores alélicos deben correrse en carriles adyacentes a cada muestra. La comparación directa entre los marcadores y las muestras amplificadas del mismo locus permite la asignación de los alelos.

Controles

Los carriles que contienen los controles negativos, deben estar libres de amplicones.

El control positivo es el ADN K562.

Compare las repeticiones de cada alelo del DNA K562 con el marcador alélico específico del locus.

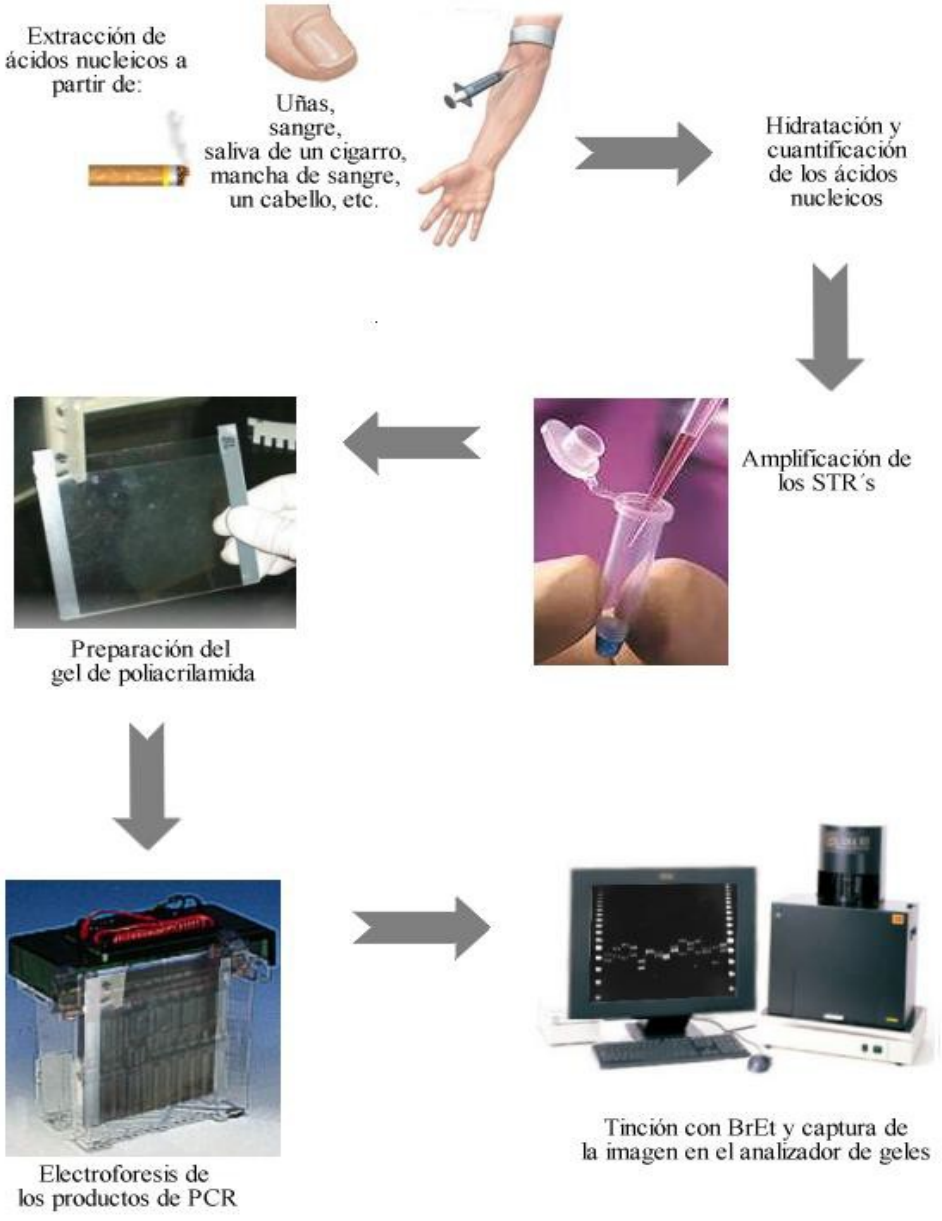
4.6 Marcadores pGEM®

Los marcadores de DNA pGEM® son estándares visuales que se usan para confirmar los intervalos de tamaños alélicos para los loci. Los marcadores consisten en 15 fragmentos de ADN con los siguientes tamaños (en pares de bases):

1 (2645), 2 (1605), 3 (1198), 4 (676), 5 (517), 6 (460), 7 (396), 8 (350), 9 (222), 10 (179), 11 (126), 12 (75), 13 (65), 14 (51), 15 (36).

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**300/330**

5. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA IDENTIFICACIÓN HUMANA



6. RESULTADOS ESPERADOS

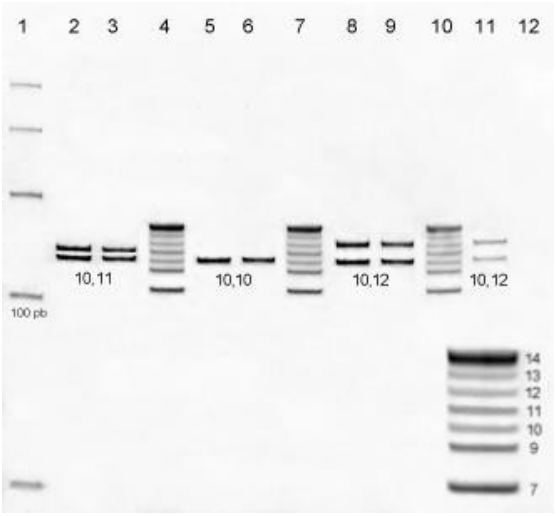


Figura 6. Electroforesis del locus LPL. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular 50 pb; los carriles 4, 7, 10 a la escala alélica; los carriles 2 y 3 a la madre (ADN solución y FTA respectivamente); carriles 5 y 6 al hijo; 8 y 9 al supuesto padre; el carril 11 control positivo y 12 control negativo.

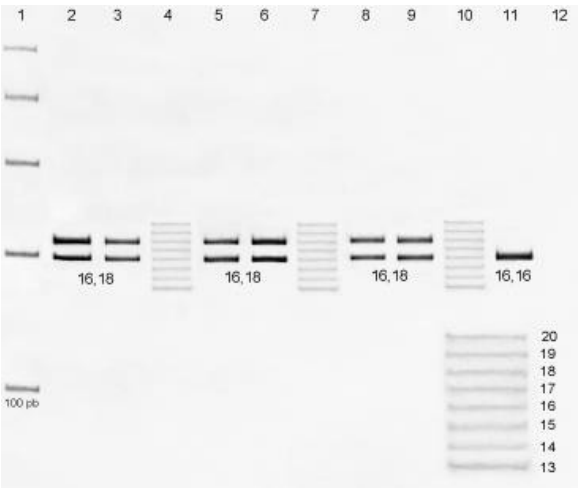


Figura 7. Electroforesis del locus vWA. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular 50 pb; los carriles 4, 7, 10 a la escala alélica; los carriles 2 y 3 a la madre (ADN solución y FTA respectivamente); carriles 5 y 6 al hijo; 8 y 9 al supuesto padre; el carril 11 control positivo y 12 control negativo.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**302/330**

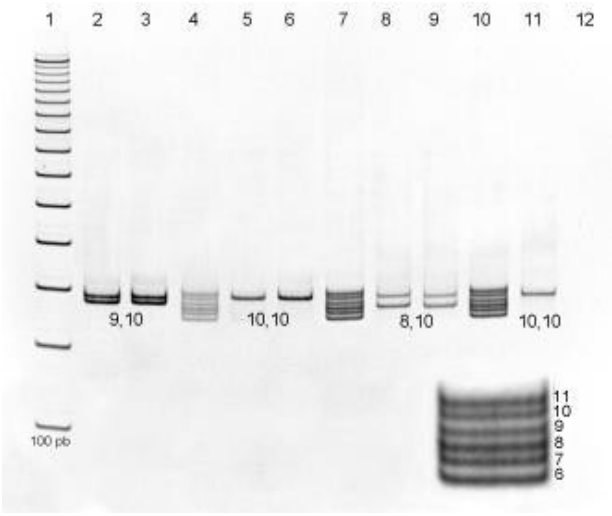


Figura 8. Electroforesis del locus F13B.

carril 1 corresponde al marcador de peso molecular 50 pb; los carriles 4, 7, 10 a la escala alélica; los carriles 2 y 3 a la madre (ADN solución y FTA respectivamente); carriles 5 y 6 al hijo; 8 y 9 al supuesto padre; el carril 11 control positivo y 12 control negativo.

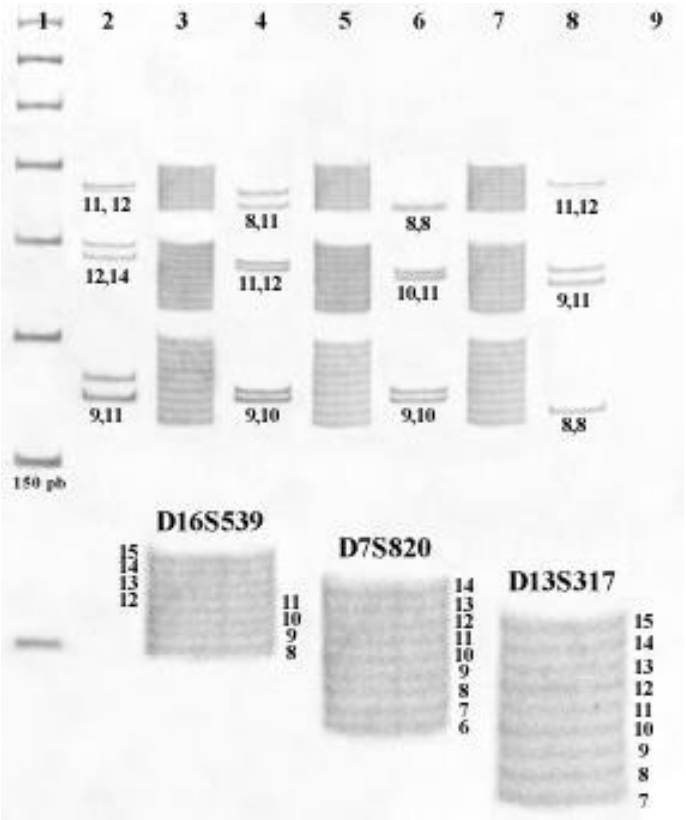


Figura 9. Amplificación y electroforesis del sistema Multiplex (locus D16S539, D7S820 y D13S317). La línea 1 corresponde al marcador molecular 50 pb; las líneas 3, 5, 7 a la escala alélica; las líneas 2 a la madre; 4 al hijo; 6 al supuesto padre; la línea 8 corresponde al control positivo y la 9 al control negativo.

Locus STR	Localización cromosomal	Sec. repetitiva 5´→3´	Longitud Escala alélica (pb)[1]	Alelos STR (# de repeticiones)[2]	Otros alelos conocidos	DNA K562[4] (+)
CSF1PO	5q33.3.34	AGAT[3]	295-327	7,8,9,10,11, 12,13,14,15	6	10, 9
D16S539	16q24.qter	AGAT[3]	264-304	5,8,**9**,10,11, 12,**13**,14,15	No	12,11
D7S820	7q11.21.22	AGAT[3]	215-247	6,7,8,9,10, 11,12,13,14	No	11, 9
D13S317	13q22.q31	AGAT[3]	165-197	7,8,9,10,11, 12,13,14,15	No	8,8
F13A01	6p24.3.p25.1	AAAG[3]	283-331	4,5,6,7,8,9,11, 12,13,14,15,16	3.2,10	5,4
F13B	1q31.q32.1	AAAT[3]	169-189	6,7,8,9,10,11	12	10,10
FESFPS	15q25.qter	AAAT[3]	222-250	7,8,9,10,11,12,13,14	No	12,10
HPRTB	Xq26	AGAT[3]	259-303	6,7,**8**,9,10,**11**, 12,13,**14**,15,16,**17**	No	13, 13
LPL	8p22	AAAT[3]	105-133	7,9,10,11,12,13,14	8	12,10
TH01	11p15.5	AATG[3]	179-203	5,6,7,8,9,10,11	9.3	9.3, 9.3
TPOX	2p25.1.pter	AATG[3]	224-252	6,7,8,9,10,11,12,13	No	9,8
vWA	12p12.pter	AGAT[3]	139-167	13,14,15,16, 17,18,19,20	11,21	16,16

Tabla 2. Información especifica para algunos locus (STR´s).

Tomada y modificada de www. promega.com.
[1]La longitud de cada alelo en la escala alélica se ha confirmado por análisis de secuencia.
[2]Los alelos en negrita están presentes en mayores cantidades que otros alelos. Esto simplifica la interpretación.
[3]Las secuencias repetitivas representan todas las cuatro posibles permutaciones.
[4]Alelos esperados para cada STR.

7. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

a) Determinación de los genotipos.

Se compara el tamaño de las bandas de los marcadores alélicos con los de las muestras analizadas, cada muestra puede presentar una o dos bandas que implican que se es homocigótico o heterocigótico respectivamente y el genotipo se representa por números que corresponden a las bandas del marcador alélico.

b) identificación humana.

Se espera que el indicio pertenezca o no al probable responsable.

c) Pruebas de paternidad

Una prueba de paternidad tiene dos posibles resultados:

1. El hombre analizado no es el padre cuando se muestran al menos dos exclusiones.
2. El hombre analizado es el padre. Los resultados se presentan en forma de Índice Combinado de Paternidad (ICP). Un valor mayor de 1000 es el estándar para establecer derechos paternales.

Inclusión

La paternidad se confirma con los marcadores genéticos. Estos alelos aparecen en pares y se heredan de cada progenitor al hijo. Para cada par de alelos, uno proviene del padre (alelo paterno) y el otro de la madre (alelo materno). Se espera que el padre biológico verdadero comparta el alelo paterno con el niño para cada marcador probado.

El índice de paternidad es un cociente de probabilidad, establece cuántas veces es mas probable que una persona reciba el alelo del hombre analizado en contra de la probabilidad de que el mismo alelo se haya heredado por cualquier otra persona aleatoria en la población.

El índice combinado de paternidad (ICP) es el producto que evalúa la información genética obtenida en todos los loci analizados. Indica si la evidencia ajusta mejor con la hipótesis de que el hombre estudiado es el padre o con la hipótesis de que alguien

más es el padre. Expresa el "ajuste" relativo de los datos genéticos a las hipótesis de paternidad o no paternidad.

Probabilidad de paternidad = (ICP)/ (ICP+1) *100.

Exclusión

Para cada par de alelos en los loci analizados, si se observa una incompatibilidad, inconsistencia o violación a la primera ley de Mendel en al menos dos marcadores la exclusión de paternidad es absoluta. No se requiere expresar en algoritmos matemáticos porque el índice de paternidad en los loci incompatibles es 0, por lo que el ICP será 0.

La probabilidad de paternidad obtenida se compara con los criterios de Hummel aceptados internacionalmente por la comunidad forense en 1971.

Valor	**Consideración**
>99.73%	Paternidad "prácticamente probada"
99-99.72%	Paternidad "extremadamente probable"
95-98.99%	Paternidad "muy probable"
90-94.99%	Paternidad "probable"
50-89.99%	Paternidad "más probable que no paternidad"
10-49.99%	"No paternidad más probable que paternidad"
5-9.99%	"Paternidad improbable"
1-4.99%	"Paternidad muy improbable"
<0.99%	Paternidad "prácticamente excluida"

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**306/330**

8. CUESTIONARIO

Instrucciones: Responda a las siguientes preguntas en una hoja anexa.

1. ¿Qué son los STRs?
2. ¿Qué significa polimorfismo de longitud?
3. ¿Por qué en los procesos de identificación humana y pruebas de paternidad no se estudian genes?
4. ¿Cuál es el fundamento criminalístico de la prueba de ADN?
5. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de la identificación humana mediante el análisis de ADN en comparación con dactiloscopia, antropología y odontología forense?
6. En el caso del estudio de un resto óseo presumiblemente perteneciente a una determinada persona desaparecida, ¿qué muestras de referencia solicitaría para llevar a cabo la confronta genética?
7. ¿Qué tipo de ADN y/o polimorfismo se analiza en restos antiguos correspondientes a hechos históricos, por qué?
8. ¿Cuál es el fundamento de las pruebas de paternidad mediante la aplicación del ADN?
9. ¿Cuáles son las ventajas que representa el análisis del ADN sobre otras disciplinas periciales en la identificación de víctimas de desastres?
10. ¿Qué son las bases forenses de datos genéticos?

9. MANEJO DE RESIDUOS

1. El material punzocortante (jeringas o agujas) empleado para la extracción de sangre se desechará en el contenedor rojo ubicado en el área de confinamiento de residuos.
2. Los sobrantes y desechos de sangre líquida o sus componentes se inactivarán con una solución de hipoclorito de sodio al 7% de cloro libre. Esta solución se adicionará a la sangre líquida o sus componentes para alcanzar una concentración final de cloro libre del 0.7%, se incubará a temperatura ambiente por 30 minutos y se verterá al drenaje.

10. ANEXOS

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Amortiguador TBE 10X**

TRIS	121.1 gr.
EDTA	18.6 gr.
Ácido bórico	61.83 gr.
Agua desionizada	Aforar a 1 litro

- **Acrilamida/bisacrilamida al 30%**

Acrilamida	29 gr.
Bis-acrilamida	1 gr.
Agua desionizada	Llevar a 100 ml.

- **Solución amortiguadora de carga**

TRIS 2M pH 8	500 µl
EDTA 0.5M pH 8	3 ml.
SDS 0.5%	1 ml.
Ficoll 10%	2 gr.
Sacarosa 30%	6 gr.
0.2% azul de bromofenol y xilen-cyanol	0.2%
Agua bidestilada estéril	Llevar a 20 ml.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lorente JA. (2004). Un detective llamado ADN. Ediciones Temas de Hoy, S.A. (T.H.). Paseo de Recoletos, 4.28001 Madrid.
2. Henke J and Henke L. Which Short Tandem Repeat Polymorphisms are required for Identification? Lessons from Complicated Kinship Cases. *Croat Med J* 2005, 46:593-597.
3. Martínez, B. (1999). La Prueba de ADN en Medicina Forense, Ed. Masson. Barcelona.
4. Manual Específico de Operación de Servicios Periciales en la Especialidad de Genética Forense. Coordinación General de Servicios Periciales. Procuraduría General de Justicia del D.F. (2004).
5. Jeffreys, AJ, Wilson V, and Thein SL. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 1985, 314:67-73.
6. Jeffreys AJ, Wilson V, and Thein SL. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 1985, 316:76-79.
7. Beckman KB, Abel KJ, Braun A, and Halperin E. Using DNA pools for genotyping trios. *Nucleic Acids Res* 2006, 34:3-8.
8. Lorente JA, Entrala C, Alvarez JC, Arce B, Heinrichs B, Lorente M, Carrasco F, Budowle B, Villanueva E. Identification of Missing Persons: The Spanish “Phoenix” Program. *Croat Med J* 2001, 42:267-270.
9. Bilge Y, Kedici PS, Alakoc YD, Ulkuer KU, and Ilkyaz YY. The Identification of a dismembered human body: a multidisciplinary approach. *Forensic Sci Int* 2003, 137:141-146.
10. Hochmeister MN, Budowle B, Borer UV, Rudin O, Bohnert M, Dirnhofer R. Confirmation of the identity of human skeletal remains using Multiplex PCR Amplification and Typing Kits. *J Forensic Sci* 1995, 40:701-705.
11. Budimlija ZM, Prinz MK, Zelson-Mundorff A, Wiersema J, Bartelink E, MacKinnon BL, Nazzaruolo SM, Estacio MJ, Hennessey RC. World Trade Center Human Identification Project. Experiences with individual body identification cases. *Croat Med J* 2003, 44:259-263.

12. Iwamura ES, Soares-Vieira JA, Muñoz DR. Human identification and analysis of DNA in bones. *Rev Hosp Clín Fac Med Sao Paulo* 2004, 59:383-388.

13. Alonso A, Martin P, Albarran C, Garcia P, Fernandez de Simon, J, Iturralde M, Fernandez-Rodriguez A, Atienza I, Capilla Garcia-Hirschfeld J, Martinez P, Vallejo G, García O, Garcia E, Real P, Alvarez D, León A, Sancho M. Challenges of DNA Profiling in Mass Disaster Investigations. *Croat Med J* 2005, 46:540-548.

14. Budowle B, Bieber FR, Eisenberg AJ. Forensic aspects of mass disasters: strategic considerations for DNA-based human identification. *Leg Med (Tokyo)* 2005, 7:230-243.

15. Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, and Sullivan K. Identification of the remains of the Romavov family by DNA analysis *Nat Genet* 1994, 6:130-135.

16. Ivanov, PL, Wadhams MJ, Roby RK, Holland MM, Weedn VW and Parsons, TJ. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat Genet* 1996,12:417-420.

17. Vernesi C, Di Benedetto G, Caramelli D, Secchieri E, Simoni L, Katti E, Malaspina P, Novelletto A, Marin VT, and Barbujani G. Genetic characterization of the body attributed to the evangelist Luke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:13460-13463.

18. Jehaes E, Pfeiffer H, Toprak Decorte R, Brinkmann B, Cassiman JJ. Mitocondrial DNA analysis of the putative heart of Louis XVII son of Louis XVI and Marie-Antoinette. *Eur J Hum Genet* 2001, 9:185-190.

19. Jeffreys AJ, Allen MJ, Hagelberg E, Sonnberg A. Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. *Forensic Sci Int* 1992, 56:65-76.

20. Klug WS and Cummings MR. (1999). Conceptos de Genética, 5a ed., Prentice May Ibérica. Madrid.

21. Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 1991, 49:746-756.

22. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44:388-396.

23. Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ and Gill P. Variation in short tandem repeat sequences--a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Int J Leg Med* 1994, 107:13-20.

24. Jeffreys AJ; Brookfield JFY and Semeonoff R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* 1985, 317:818-819.

25. Gill P and Werret DJ. Exclusion of a man charged with murder by DNA fingerprinting. *Forensic Sci Int* 1987, 35:145-148.

26. Wong Z; Wilson V; Patel I; Povey S and Jeffreys A J. Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Ann Hum Genet* 1987, 51:269-288.

27. Nakamura Y, Leppert N, O'Connell P,Wolf R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E and White R. Variable number of tandem repeat (markers) for human gene mapping. *Science* 1987, 235:1616-1622.

28. Wyman AR and White R. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1980, 77:6754-6758.

29. Saiki R K; Gelfand D H; Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich H A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 1988, 239:487-491.

30. Satz M, Leonardo and Alberto R Kornblihtt. La reacción en cadena de la polimerasa: El método y sus aplicaciones. *Ciencia Hoy* 1993, 4(23): 14-17.

31. Rudin N, Inman K. (2002). An Introduction to Forensic DNA Analisis. CRC Press. USA.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**311/330**

ABREVIATURAS.

ºC grados centigrados.

ADN ácido desoxirribonucleico.

ARNm ácido ribonucleico mensajero

cbp cuanto baste para

dsADN ácido desoxirribonucleico de doble cadena.

dNTP's desoxirribonucleótido trifosfatos

ddNTP's. 2' 3' didesoxirribonucleótido trifosfatos

DMT1 diabetes mellitus tipo 1

DMT2 diabetes mellitus tipo 2

µL microlitros.

µM micromolar.

mg miligramos.

mL mililitros.

µg microgramos.

mM milimolar.

M molar.

ng nanogramos.

nM nanomolar.

PCR reacción en cadena de la polimerasa.

pb pares de bases

rpm revoluciones por minuto

GLOSARIO

A

Ácido. Cualquier compuesto que pueda donar un protón (H^+). Los grupos carboxilo y fosfato son los principales grupos ácidos en las macromoléculas biológicas

A.F.I.S. Sistema automatizado de identificación de huellas dactilares.

Alelo: Una de las dos copias de cada gene que existen en el genoma, (exceptuando a los genes del cromosoma Y los cuales se presentan en una sola copia). Alelo también se refiere a las formas alternativas en que se puede presentar un gene en los individuos de una especie determinada.

ADN: Siglas de ácido desoxirribonucleico. Principal componente de la cromatina (cromosomas) material hereditario.

ADN de doble hélice. Estructura tridimensional más común para el ADN celular en el cual las dos hebras de polinucleótidos son antiparalelas y se entrelazan una alrededor de la otra con bases complementarias unidas por enlaces de hidrogeno

ADN genómico. Todas las secuencias de ADN que componen el genoma de una celula o de un organismo.

ADN polimerasa. Enzima que copia una hebra de ADN (hebra molde) para formar una hebra complementaria, que compone una nueva molécula de ADN de hebra doble. Todas las ADN polimerasas añaden desoxirribonucléotidos de a uno por vez en la dirección 5'→ 3' al 3' de un cebador corto preexistente de ADN o ARN.

Alelo. Una de dos o más formas alternativas de un gen. Las células diploides contienen dos alelos de cada gen, localizados en el sitio correspondiente (locus) sobre **cromosomas homólogos.**

Autosomas: Cualquier cromosoma diferente a los cromosomas sexuales X e Y. Las células somáticas humanas presentan 22 pares de autosomas (44 en total).

Amplificación: Proceso por el cual fragmentos de ADN que se pueden multiplicar, se involucra técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa PCR o clonación.

C

Cariotipo: Ordenamiento de la constitución cromosómica de un individuo basado en su número y morfología. En el caso de los humanos es 46 XX en el sexo femenino y 46 XY en el sexo masculino.

Cebador (Primer). Secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3'- hidroxilo libre que forma pares de bases con una hebra molde complementaria y actúa como punto de inicio por la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.

Complementario. 1) En referencia a dos secuencias de ácidos nucleicos o hebras que pueden formar pares de bases perfectos entre sí. 2) Describe regiones sobre dos moléculas en interacción (p. ej., una enzima y un sustrato) que coinciden en forma similar a un candado y su llave.

CODIS: Siglas de (Combined DNA Index System). Conjunto estándar de 13 marcadores STR utilizados por los laboratorios de investigación forense para obtener el perfil genético de una muestra biológica sometida a un análisis forense.

Clon: Población de células o moléculas de ADN idénticas que descienden de un solo progenitor.

Clonación: Introducción de ADN recombinante en una célula receptora.

Composición de bases: Frecuencia en que se presentan los residuos de las bases puricas y pirimídicas (adenina, guanina, citocina, timina o uracilo), dentro de la secuencia de los ácidos nucleicos.

Cromatina: Material del que están compuestos los cromosomas (ADN y proteínas).

Cromosoma : Unidad estructural del material genético, consiste de una sola cadena doble de ADN, la cual se asocia a proteínas, en procariontes se trata de una sola cadena de ADN doble la cual constituye casi todo el material genético. Se encuentran en el núcleo de las células o en la matriz de las mitocondrias.

Cromosomas sexuales: Cromosomas responsables del sexo de un individuo. En la especie humana se les designa por X e Y. Cualquier célula somática masculina lleva el par XY, y cualquier célula somática femenina lleva el par XX.

D

Diploide: Organismo que presenta dos juegos completos de material genético, presenta juegos completos de cromosomas homólogos y por ende de alelos. En la

especie humana 2n=46 (23 pares de cromosomas). Todas las células somáticas tienen 46 cromosomas.

E

Electroforesis: Separación de un grupo de moléculas por medio de su migración a través de una matriz polimérica, por medio de la aplicación de un campo eléctrico, la separación se realiza en función de la carga de la macromolécula y de su tamaño (peso molecular).

Enlace de hidrogeno. Interacción no covalente entre un átomo (comúnmente oxigeno o nitrógeno) portador de una carga parcial negativa y un átomo de hidrogeno por tador de una carga parcial positiva. Es particularmente importante para la estabilización de la estructura tridimensional de proteínas y la formación de **pares de bases** entre las hebras de ácidos nucleícos.

Enlace fosfodiéster. Enlace químico entre nucleótidos adyacentes en el ADN y el ARN; en realidad consiste en dos enlaces fosfoéster, uno en el extremo 5'del fosfato y otro en el extremo 3'.

Enzima de restricción (endonucleasa). Cualquier enzima que en moléculas de ADN de doble cadena reconoce y escinde una secuencia especifica corta, el sitio de restricción. Estas enzimas están difundidas ampliamente en las bacterias y funcionan para degradar el ADN foráneo incorporado por una célula bacteriana. Se utiliza in Vitro de manera habitual para generar ADN recombinante.

Equilibrio Hardy-Weinberg: Estado de una población ideal en que las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes a lo largo de las generaciones. Además, las frecuencias genotípicas están determinadas por las frecuencias génicas, mediante una expresión matemática bien determinada: en el caso de un gen o un marcador con-2 – solo 2 alelos, p^2 (homocigoto para un alelo), 2pq (heterocigoto), q^2 (homocigoto para el otro alelo), p y q son las frecuencias de los alelos en la población ideal.

Exón. Segmento de un gen eucarionte (o de su transcripto primario) que alcanza el citoplasma como parte de un mARN maduro, rRNA o molécula de tARN.

Expresión génica. Proceso global mediante el cual se convierte la información codificada en un gen en un **fenotipo** observable (por lo general la producción de una proteína).

F

Fenotipo. Características físicas y fisiológicas detectables de una célula u organismo determinadas por su **genotipo**.

Fragmentos de restricción: Fragmentos resultantes del rompimiento de una molécula de ADN con enzimas de restricción. Estos fragmentos pueden emplearse en la producción de moléculas de ADN recombinante, clonación de genes e identificación de especies.

G

Gen: Gen. Unidad física y funcional de herencia que transporta información de una generación a la siguiente. En términos moleculares, es la secuencia completa de ADN (incluidos exones, intrones y regiones no codificantes del control de la transcripción) necesaria para la producción de una proteína funcional o ARN.

Genoma: El conjunto de todo el material genético que tiene un organismo vivo en cada una de sus células.

Genotipo. Constitución genética completa de una célula individual u organismo, en la que generalmente se destacan alelos particulares en uno o más locus específicos.

H

Haploide: Se refiere al estado de una célula que contiene solo un juego de cromosomas cuyo número es igual al número cromosómico característico de una especie. Se representa por la letra **n**, y en la especie humana ese nº n es 23. Los gametos (óvulos y espermatozoides) son haploides al igual que las células bacterianas.

Haplotipo. Se define como la constitución genética de un cromosoma individual. El haplotipo se puede referir a un solo locus o a un genoma completo. En el caso de organismos diploides como el hombre, un haplotipo del genoma comprende solo un miembro del par de alelos en cada locus (es decir, la mitad de un genoma diploide).

Heterocigosidad: Proporción de individuos heterocigotos para un gen o un marcador genético. Este parámetro proporciona una idea de lo polimórfico que puede ser un gen o un marcador genético.

Heterocigoto: Individuo cuyo genotipo para un gen o marcador genético se caracteriza porque sus dos alelos son diferentes.

Homocigoto : Individuo cuyo genotipo para un gen o marcador genético se caracteriza porque sus dos alelos son iguales.

Hormona. Termino general para cualquier sustancia extracelular que induce respuestas específicas en las células diana.

I

Insulina. Hormona proteica producida por las células β del páncreas que estimula la captación de glucosa en las células musculares y lipídicas; actúa con el glucagón para contribuir a regular los niveles de glucosa en la sangre. La insulina también funciona como factor de crecimiento para muchas células.

Intrón. Parte de un transcripto primario (o el ADN que lo codifica) que se elimina por corte y emplame durante el procesamiento del ARN y que no está incluido en el mARN, tARN o rARN funcional maduro.

Isoforma. Una de las varias formas de la misma proteína cuya secuencia de aminoácidos difiere poco y con actividades casi siempre similares. Las isoformas pueden estar codificadas por diferentes genes o por un único gen cuyo transcripto primario sufre corte y empalme alternativo.

L

Locus/Loci (plural): Sitio especifico de localización de un gene dentro del cromosoma. Todos los alelos de un gen en particular ocupan el mismo locus.

M

Mapa genético: Representación física del orden en el que los genes están presentes en los cromosomas.

Marcador molecular: Fragmentos específicos de material genético, que se utilizan para la clasificación de organismos vivos.

Marcador genético: Cualquier secuencia de ADN codificante o no, que puede servir para caracterizar a un individuo en una población.

Mitocondria: Orgánelo celular que contiene en su matriz un tipo de ADN circular que se hereda a través de las mujeres exclusivamente. En análisis forense se emplean marcadores genéticos del ADN mitocondrial para rastrear linajes femeninos.

Mutación. En genética, modificación hereditaria permanente de la secuencia de nucleótidos en el ADN, por lo general en un único gen; suele producir una alteración en la función del producto génico.

N

Nucleósido: Molécula compuesta por una purina o pirimidina unidas a una pentosa que normalmente puede ser ribosa o desoxirribosa.

Nucleótido: Molécula compuesta por una purina o pirimidina unidas a una pentosa y a uno o más grupos fosfatos unidos por un enlace éster al residuo de azúcar.

O

Obesidad. Factor de riesgo conocido para enfermedades crónicas como: enfermedades cardíacas, diabetes, hipertensión arterial, ictus y algunas formas de cáncer. La evidencia sugiere que se trata de una enfermedad con origen multifactorial: genético, ambiental, psicológico entre otros. Es una acumulación excesiva de grasa en el cuerpo, que ocasiona hipertrofia general del tejido adiposo.

P

Par de bases. Asociación de dos **nucleótidos** complementarios en una molécula de ADN o ARN estabilizado por enlaces de hidrogeno entre las bases. La adenina se aparea con timina o uracilo y la guanina se aparea con citosina.

PCR: Siglas de Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)**.**Técnica para la amplificación especifica de un segmento de DNA dentro de una mezcla compleja por medio de varios ciclos de síntesis de DNA por la DNA polimerasa de Thermophilus a partir de pequeños cebadores de DNA. Seguidos por calentamiento para separa las cadenas complementarias y llevar a cabo un nuevo ciclo de síntesis

Perfil Genético: Conjunto de genotipos que muestra un individuo para un conjunto de marcadores (típicamente los 13 STR's que constituyen el CODIS).

Polimorfismo: Característica de un gen/marcador que presenta más de 1 alelo en una población. En el análisis forense se utilizan marcadores muy polimórficos.

Primer: Una secuencia corta de nucleótidos (oligonucleótido) usada en la reacción de PCR para iniciar la síntesis del ADN que se quiere amplificar.

R

RFLP: Siglas de "Restriction Fragment Length Polymorphism" (Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción). Diferencia polimórfica en la secuencia de ADN entre individuos que puede ser reconocida por endonucleasas de restricción.

S

Síndrome. En medicina, es un cuadro clínico o conjunto sintomático con cierto significado y que por sus características posee cierta identidad; es decir, un grupo significativo de síntomas y signos (elementos semiológicos), que concurren en tiempo y forma, caracterizando un estado morboso determinado.

Sitio de restricción: Secuencia específica del ADN que reconocen y cortan las enzimas de restricción. Muchas de estas secuencias son palindrómicas.

STR: Tipo de ADN repetitivo. Siglas de “Short Tandem Repeats” (Repeticiones Cortas en Tandem). Tipo de marcador polimórfico de ADN cuyos alelos consisten en variaciones en el número de veces que se repite consecutivamente una secuencia básica de nucleótidos de entre 2 y 7. En los análisis forenses se utilizan STR’s cuya secuencia básica es de 4 nucleótidos.

Sonda: Fragmento de ADN, ARN o anticuerpo marcado química o radioactivamente, se usa para localizar secuencias de nucleótidos o aminoácidos por hibridación.

Sustrato. Molécula que sufre una modificación en una reacción catalizada por una enzima.

V

VNTR: Tipo de ADN repetitivo. Siglas de “Variable Number of Tandem Repeats” (Número Variable de Repeticiones en Tandem). Tipo de marcador polimórfico de ADN cuyos alelos consisten en variaciones en el número de veces que se repite consecutivamente una secuencia básica de nucleótidos de entre 8 y 100 pb.

CRITERIOS DE EVALUACIÓN

La calificación se integrará de la siguiente forma:

Asistencia	0% pero deberá cubrir el 80%
Participación en clase	Se tomará en cuenta para subir la calificación final
Exámenes	40%
Cuestionarios	10%
Seminario de prácticas	10% (20 minutos)
Seminario final	10% (20 minutos + 10 preguntas)

Los aspectos a evaluar dentro de los seminarios: Organización, manejo de material didáctico, contenido, expresión oral y presentación personal.

10%	Trabajo de en equipo	Organización del trabajo durante la práctica)
	Limpieza	(Material y área de trabajo)
	Organización	(bata, muestra biológica, material para realizar la práctica, preparación de reactivos)
	Informes	10%

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**321/330**

REGLAMENTO DEL LABORATORIO DE GENÉTICA CLÍNICA

1.- El horario de entrada es el día viernes a las 7:00 hrs, se pasará lista a las 7:10 hrs, se considerará hasta las 7:15, después se considerará como falta, dos retardos equivalen a una falta. Se tendrá derecho a examen previo hasta 7:15.

2.- Se deberá contar con un mínimo de 80% de asistencia para tener derecho a calificación.

3.- Dentro del laboratorio es obligatorio el uso de bata blanca de algodón, manga larga y abotonada.

4.- Está prohibido comer, fumar y llevarse cualquier otro objeto a la boca durante el trabajo práctico.

5.- Está estrictamente prohibido: jugar, fumar, comer, beber y aplicarse maquillaje dentro del laboratorio.

6.- El alumno permanecerá en el laboratorio hasta la finalización de la práctica. Al alumno que salga del laboratorio sin la autorización de cualquiera de los asesores se le anulará la asistencia.

7.- Únicamente podrá estar sobre la mesa de trabajo un cuaderno de notas, los demás útiles permanecerán guardados hasta la finalización de la práctica.

8.- Cada equipo debe mantener su área de trabajo (mesa, bancos y piso) limpia; al finalizar la práctica no deben quedar papeles o cualquier otra basura en el laboratorio.

9.- Cada alumno es responsable de anotar todos los resultados en una libreta especial para el laboratorio (no importa el tipo ni el estilo).

10.- Se prohíbe el uso de teléfonos celulares y de audífonos.

11.-Durante el desarrollo de la práctica, esta prohibida la entrada de personas ajenas al grupo.

12.- Cuando se trabaje con muestras de sangre humana o con reactivos tóxicos es obligatorio el uso de guantes.

10.- Antes de cada práctica se realizará un examen basado en los puntos que se les proporcionaron, los que cubre el cuestionario de la sesión y el artículo de la antología correspondiente.

11.- Quien en sus exámenes previos no obtenga un promedio mínimo de 8.0 realizará un examen de bloques (2) y si no los aprueba, presentará el examen global que se aplicará al final de todas las prácticas. En dicho examen la calificación mínima aprobatoria es 6.0.

12.- Antes de cada práctica en el momento de pasar lista se entregará el cuestionario correspondiente a la sesión práctica, no se recibirán cuestionarios extemporáneos.

13.- El reporte de cada práctica se entregará por equipo en la siguiente sesión de laboratorio, en el momento de tomar asistencia. No se recibirán reportes atrasados.

14.- El reporte deberá contener:

a) Titulo	0.0 puntos
b) Objetivo	0.0 puntos
c) Introducción	1.0 punto
d) Método (diagrama de flujo)	0.0 puntos
e) Resultados	2.0 puntos
f) Análisis de resultados	3.5 puntos
g) Conclusiones	2.5 puntos
h) Bibliografía	1.0 punto

15.- No tendrán calificación de reporte las personas que tengan falta en la práctica correspondiente.

16.- Sólo habrá un examen global, y para que se puedan promediar todas las calificaciones se requiere que éstas sean aprobatorias.

17.- El alumno deberá traer una fotografía tamaño infantil reciente, en la segunda sesión de laboratorio.

18.- Antes de cada sesión se realizará un seminario previo a la práctica en donde el equipo que exponga deberá preparar material didáctico para su presentación y se encargará de exponer de forma clara y concisa los puntos que se le asignaron previamente, así como el fundamento de la práctica y sus aplicaciones, el equipo debe entregar copia de su material a los profesores en un CD, al final de su exposición.

19.- Al final de las sesiones prácticas se realizarán dos sesiones de seminarios en los que cada equipo preparará su exposición con material didáctico, fomentará el interés y la participación de sus compañeros, el equipo debe entregar copia de su material a los profesores en un CD, al final de su exposición.

20.- Cada equipo participará en la evaluación de los seminarios para lo cual se le proporcionará un formato que deberá llenar al final de cada seminario.

21.- Cada equipo es responsable de asegurar que esté disponible y a tiempo para su exposición el cañón, la computadora, el proyector o el equipo que requiera para realizar la misma.

22.- El equipo responsable de cada práctica deberá preparar con anticipación los reactivos y soluciones que requiera el desarrollo de la práctica.

ATENTAMENTE:

Profesores del Laboratorio de Genética.

Dra. Martha Legorreta Herrera

QFB Fco. Javier Parada García

Dra. Raquel Retana Ugalde

Mtra. Lourdes Vega Navarrete

MANEJO DE RESIDUOS

Los tubos, pipetas, puntas y demás materiales con los que se trabajó material biológico deberán desecharse en un recipiente que contenga hipoclorito de sodio al 10%.

Las agujas utilizadas deberán depositarse en el recipiente rojo de punzo cortantes.

Las jeringas contaminadas con sangre deberán descontaminarse en hipoclorito de sodio antes de desecharse en el contenedor de punzo cortantes.

Los residuos provenientes de reactivos tóxicos como cloroformo, fenol, acrilamida, bromuro de etidio, etc. Se etiquetarán y se enviarán a su almacenamiento para su posterior eliminación.

SIMULACROS DE EMERGENCIA Y SISMOS

Los alumnos y profesores deberán participar en los simulacros de emergencia de acuerdo con las siguientes instrucciones: al escuchar la alarma sísmica, inmediatamente deberán replegarse a los muros de sostén del edificio. Si se da la señal de evacuar el edificio, se debe hacer de forma rápida y ordenada, se seguirá la ruta de evacuación.

En caso de sismos, se procederá de igual forma que en los simulacros.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**325/330**

ANEXO 1 CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Información mínima que se debe proporcionar a los participantes en las prácticas de laboratorio o investigación científica

Instrucciones. A usted se le invita a participar en este estudio de investigación biomédica. Antes de decidir si participa o no debe conocer y comprender la siguiente información. Este proceso se conoce como consentimiento informado.

Es importante que se sienta con absoluta libertad de preguntar cualquier cosa que le ayude a aclarar sus dudas.

Una vez que haya comprendido de que se trata el estudio y si desea participar como voluntario, entonces se le pedirá que firme la carta de consentimiento informado, de la que se le entregará una copia firmada y fechada.

OBLIGACIONES DEL PROFESOR RESPONSABLE O INVESTIGADOR.

El investigador o profesor responsable del estudio debe cumplir con los lineamientos internacionesl que rigen la participación de humanos en cualquier investigación biomédica en particular: no utilizar presos de cárceles, militares, enfermos mentales, menores de edad sin autorización del padre o tutor.

La información que proporcione el investigador deberá ser en un lenguaje claro, entendible aún para una persona que no tenga conocimientos médicos.

El tratamiento que se aplique a los individuos que acepten voluntariamente participar en el estudio, nunca debe poner en riesgo su salud, su vida o su bienestar.

Los estudios fase I de un nuevo fármaco, se deben realizar en el país de origen del fármaco.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO (Indicar claramente las razones de carácter médico y social que existen para realizarlo).

SE REQUIEREN MUESTRAS DE SANGRE PARA LA OBTENCIÓN DE ADN Y UTILIZARLO EN LA AMPLIFICACIÓN DE DIFERENTES GENES O REGIONES ASOCIADAS CON SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA A DESARROLLAR DIFERENTES ENFERMEDADES.

SE REQUIEREN MUESTRAS DE SANGRE PARA INVESTIGAR EL DAÑO EN EL ADN.

SE REQUIEREN MUESTRAS DE SANGRE PARA AISLAR CÉLULAS PARA REALIZAR EL ANALISIS DE CROMOSOMAS

SE REQUIEREN MUESTRAS DE ORINA PARA DETECTAR METABOLITOS ALTERADOS EN ENFERMEDADES METABÓLICAS

OBJETIVO DEL ESTUDIO (Indicar claramente las aportaciones científicas/sociales del estudio)

Que el alumno conozca y realice las diferentes técnicas de biología molecular, bioquímicas y citológicas con fines diagnósticos o determinación de susceptibilidad genética a enfermedades crónico degenerativas, infecciosas o genéticas.

Con este estudio se conocerá si usted:

1. Puede desarrollar de forma adecuada la técnica descrita
2. Conocerá sus datos personales con respecto a la técnica utililizada.

CRITERIOS DE INCLUSION QUE DEBEN LLENAR LOS PARTICIPANTES

Todos los alumnos del modulo de Laboratorio de Genética Clínica.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN (causas por las cuales no pueden participar)

ANTECEDENTES MÉDICOS Y HÁBITOS (Se formularán preguntas personales para evaluar si existe algún riesgo para el participante)

RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO (Sólo si existen. En caso de haberlos anotar los que son predecibles, hacer la aclaración de que exite la posiboildad de riesgos impredecibles que escapan al conocimiento del investigador o profesor).

Mareos algunas personas los sufren durante la toma de sangre, hematomas.

ACLARACIONES.

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria
- No existe consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee
- No tendrá que pagar por que le realicen el estudio
- No recibirá remuneración por su participación

- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador sresponsable.
- La información obtenida en este estudio, así coo la identificación de cada particiánte, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores o profesores responsables.

Si considera que no existen dudas ni preguntas de su participación, puede, si así lo desea, firmar la carta de consentimiento informado que se anexa a este documento.

ANEXO II. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

LABORATORIO DE GENÉTICA CLÍNICA 8° SEMESTRE DE LA CARRERA DE QFB.

CARTA DE CONOCIMIENTO INFORMADO

Fecha:_____

Me han explicado claramente la justificación, los objetivos, los beneficios y los posibles riesgos del estudio:

"_____

_____"

Que dirije:_____quien funge como responsable, los cuales no representan ningún riesgo para mi salud y por lo tanto ACEPTO VOLUNTARIAMENTE participar en el

Yo_____He comprendido el contenido de ésta carta de consentimiento, mis dudas han sido resueltas y declaro libre y voluntariamente que acepto participar en este estudio. Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme de la presente investigación en el momento que lo desee. También puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en el estudio. Recibiré, si así lo solicito, los resultados de mi participación. Debo informar, tan pronto como sea posible, a los investigadores, de cualquier cambio importante que ocurra en mi estado de salud, incluyendo el consumo de medicamentos, suspensión o inicio de algún hábito (ej. Tabaquismo) o cambio de domicilio. Las muestras obtenidas sólo podrán ser utilizadas para los fines de este estudio.

Domicilio:_____

_____

Teléfono:_____

Correo electrónico:_____

_____ _____

Firma del Profesor o Investigador y fecha Firma del participante y fecha

_____ _____

Firma del testigo, parentesco y fecha Firma del testigo, parentesco y fecha

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML23	**25/06/2019**	1	**329/330**

ANEXO III. FORMATO PARA EVALUAR LAS PRESENTACIONES ORALES

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA QFB

LABORATORIO DE GENÉTICA CLÍNICA

TEMA:_____ FECHA:_____ EQUIPO:_____

1. **COMUNICACIÓN PARAVERBAL**: Conjunto de variaciones que se pueden dar en la forma de emitir el lenguaje hablado y que afectan al significado de éste.

¿El volumen de la voz fue adecuado?	
¿Se apreció fluidez verbal?	
¿La voz fue clara?	
¿El tiempo de la intervención verbal fue adecuado?	

2. **COMUNICACIÓN VERBAL**

Contenido:

¿Desarrollaron el tema de manera adecuada, cumplieron los objetivos?	
¿Consiguieron la atención de su audiencia?	
¿Motivaron a la audiencia?	
¿Realizaron un resumen intermedio y una conclusión intermedia?	
¿Realizaron una recapitulación y conclusión final?	

Audiencia:

¿Mostraron atención permanente a la audiencia?	
¿Utilizaron vocabulario apropiado a la audiencia?	
¿Observaron permanentemente a la audiencia?	
¿Utilizaron ejemplos apropiados a la audiencia?	

Preguntas

¿Escucharon atentamente las preguntas?	
¿Realizaron preguntas de forma clara?	

3. LOS RECURSOS DIDÁCTICOS

Transiciones: Organizan la exposición y anuncian lo que se dirá a continuación

¿Presentaron formato constante?	
¿Utilizaron no más de seis colores?	
¿La letra fue fácil de leer?	
¿Utilizaron gráficos o dibujos?	
¿Se plasmaron las ideas bien organizadas en las diapositivas?	
¿Presentaron una idea por diapositiva?	
¿Contenían información concreta, concisa y clara?	

Tiempo

¿Fueron puntuales para iniciar la exposición?	
¿Fueron puntuales para terminar la exposición?	
¿Hubo que reducir la exposición?	
¿Hubo que alargar la exposición?	

Apuntes y pizarrón

¿Leyeron frecuentemente los apuntes?	
¿Utilizaron gran parte de su tiempo para leer el tema?	
¿La utilización del pizarrón fue dinámica y espontánea?	
¿Utilizaron el pizarrón?	
¿Hablaron mientras escribían?	

4. PRESENTACIÓN PERSONAL DE LOS EXPOSITORES

EXCELENTE BUENA REGULAR MALA

CALIFICACIÓN FINAL _____