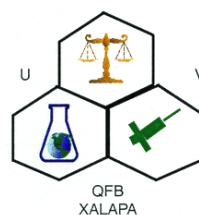


UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
BIOLÓGICA



Manual de Prácticas para Biología Molecular Aplicada

Elaborado por:

M.C. CLARA ELENA YERENA AGUILAR

M.C. JUANA RAMÍREZ AGUILERA

Xalapa, Ver.

2018

INDICE

	Página
Introducción	3
Práctica No. 1 Extracción de ADN en muestras sanguíneas	4
Práctica No. 2 Cuantificación de ADN por espectrofotometría con luz UV . .	12
Práctica No. 3 Electroforesis de ADN en gel de agarosa	15
Práctica No. 4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de la región polimórfica <i>DraI</i> del CYP2E1	23
Práctica No. 5 Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (R.F.L.P.) para la determinación del genotipo de la región <i>DraI</i> del CYP2E1	32
Práctica No. 6 Electroforesis en gel de poliacrilamida	40
Práctica No. 7 Extracción de ADN en muestras de saliva por la técnica de Chelex	47
Práctica No. 8 Determinación del alelo mutado *2 del CYP2D6 mediante PCR tetraprimer	52
Práctica No. 9 Extracción y cuantificación de ADN en muestras endocervicales	61
Práctica No. 10 Detección de Virus de Papiloma Humano en muestras endocervicales	67
Práctica No. 11 Electroforesis de proteínas	78
Práctica No. 12 Detección de las variantes alélicas del CYP2C9 mediante PCR en tiempo real.	90
Anexo 1 Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002.	99
Anexo 2 Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial.....	115

INTRODUCCIÓN

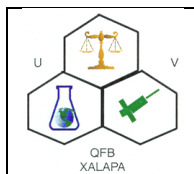
El diagnóstico molecular ha tenido un amplio desarrollo en todo el mundo y se ha convertido en una herramienta que está revolucionando todas las áreas de la medicina. Con el apoyo de estas nuevas tecnologías las ciencias médicas, que en algún tiempo tuvieron como propósito la curación y/o prevención las enfermedades, ahora tienen un enfoque predictivo y personalizado, gracias al estudio molecular de los ácidos nucleicos tanto del ser humano como de los agentes patógenos, de sus productos, así como de las interacciones entre ellos.

Esta nueva orientación diagnóstica tiene importantes y amplias aplicaciones en distintos estados patológicos como por ejemplo:

- Enfermedades infecciosas En la identificación de microorganismos, detección de mutaciones y valoración de resistencia a los agentes terapéuticos.
- Enfermedades neoplásicas En la identificación de genes causales y de susceptibilidad para distintos tipos de cáncer.
- Enfermedades crónicas. Como las alteraciones cardiovasculares, diabetes mellitus, etc.
- Enfermedades hematológicas En el diagnóstico e identificación de portadores de anemias hemolíticas hereditarias, coagulopatías y especialmente en leucemias, en las que permite valorar el pronóstico del paciente, su respuesta al tratamiento, así como la enfermedad residual mínima.
- Patologías mentales Como la esquizofrenia, el trastorno bipolar, autismo, etc.

Para la comunidad académica y estudiantil de la facultad de Química Farmacéutica Biológica representa un gran reto, a la vez que oportunidad, el poder incursionar en esta área y colocarse a la vanguardia de las universidades que están implementando estas técnicas y desarrollando proyectos de investigación bajo el enfoque de la medicina genómica.

Por lo antes expuesto en el plan de estudios de la carrera de QFB se incorporó por primera vez la experiencia educativa de Biología Molecular Aplicada. En este manual se describen las prácticas que corresponden a este curso, con el cual los alumnos del área terminal clínica se introducen al campo del diagnóstico molecular.



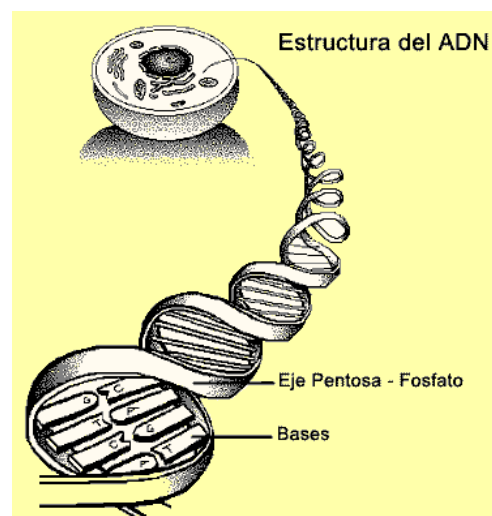
PRACTICA No. 1
EXTRACCIÓN DE ADN EN MUESTRAS SANGUÍNEAS

Objetivo

Que el alumno comprenda el fundamento de la extracción de ADN a partir de células sanguíneas y lo aplique para realizar correctamente los distintos pasos que se requieren para obtener muestras de ADN de buena calidad.

Sustento Teórico

El ADN fue aislado en 1869 de esperma de salmón y de pus de heridas abiertas por Friedrich Miescher. Dado que lo encontró solamente en los núcleos, Miescher denominó a este compuesto nucleína. *A posteriori* se le cambió a ácido nucleico y por último a ácido desoxirribonucleico (ADN). Robert Feulgen, en 1914, describió un método para revelar por tinción el ADN, basado en el colorante fucsina.



Se encontró, utilizando este método, la presencia de ADN en el núcleo de todas las células eucariotas, específicamente en los cromosomas. Durante los años 20, el bioquímico P.A. Levene analizó los componentes del ADN. Encontró que contenía cuatro bases nitrogenadas: citosina, timina, adenina, y guanina; el azúcar desoxirribosa; y un grupo fosfato. Concluyó que la unidad básica (nucleótido) estaba compuesta de una base pegada a un azúcar y que el fosfato también estaba pegado al azúcar y queda su idea de la estructura del nucleótido el cual es realmente la unidad fundamental (monómero) del ácido nucleico (polímero).

Existen cuatro nucleótidos que integran el ADN: uno con **citosina** (C), uno con **guanina** (G), uno con **adenina** (A), y uno con **timina** (T),

Nucleótidos

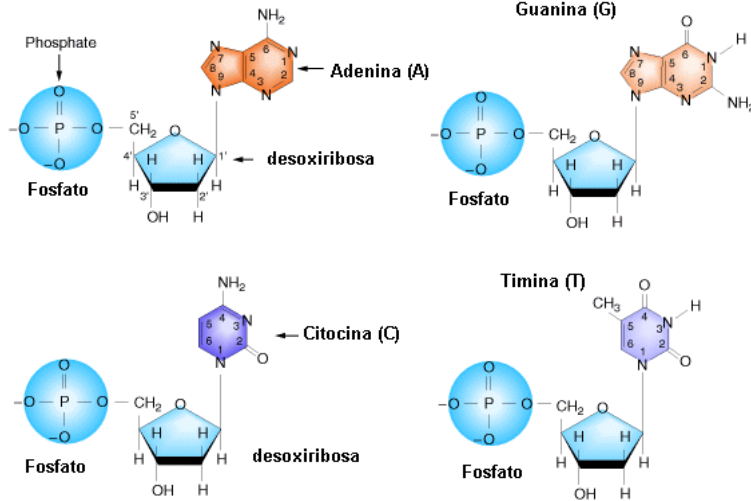
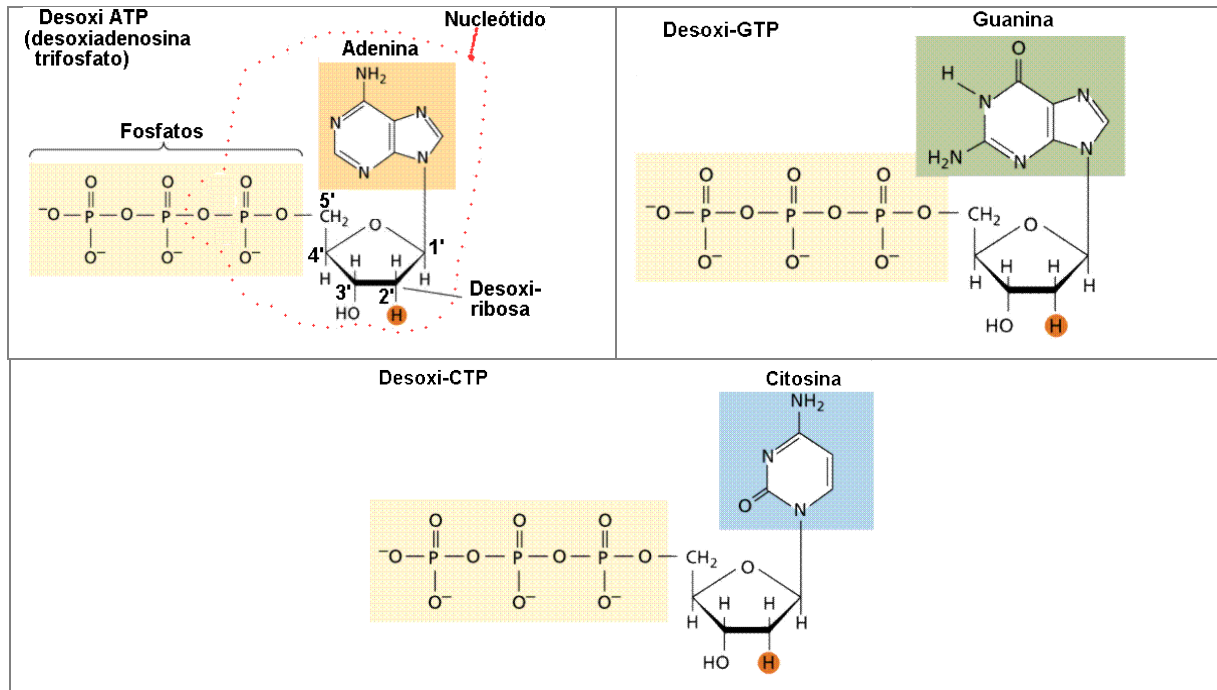
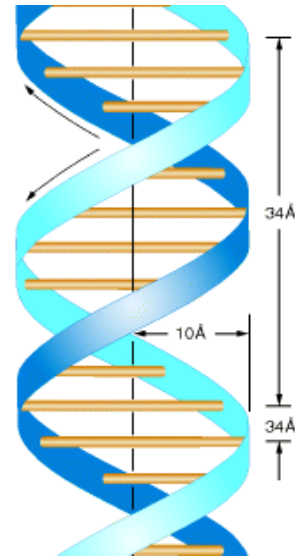


Imagen modificada de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

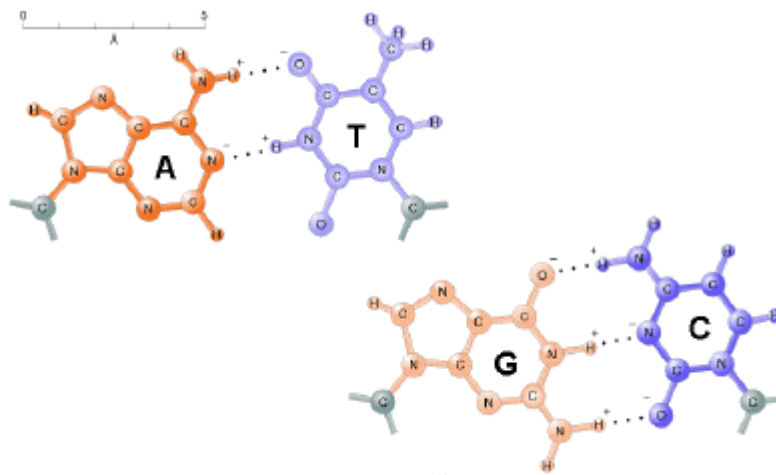
Aquí se muestran 3 de ellos en su forma "activa", como trifosfatos, antes de entrar en la molécula de ADN, se debe recordar que el nucleótido allí tiene un solo fosfato.



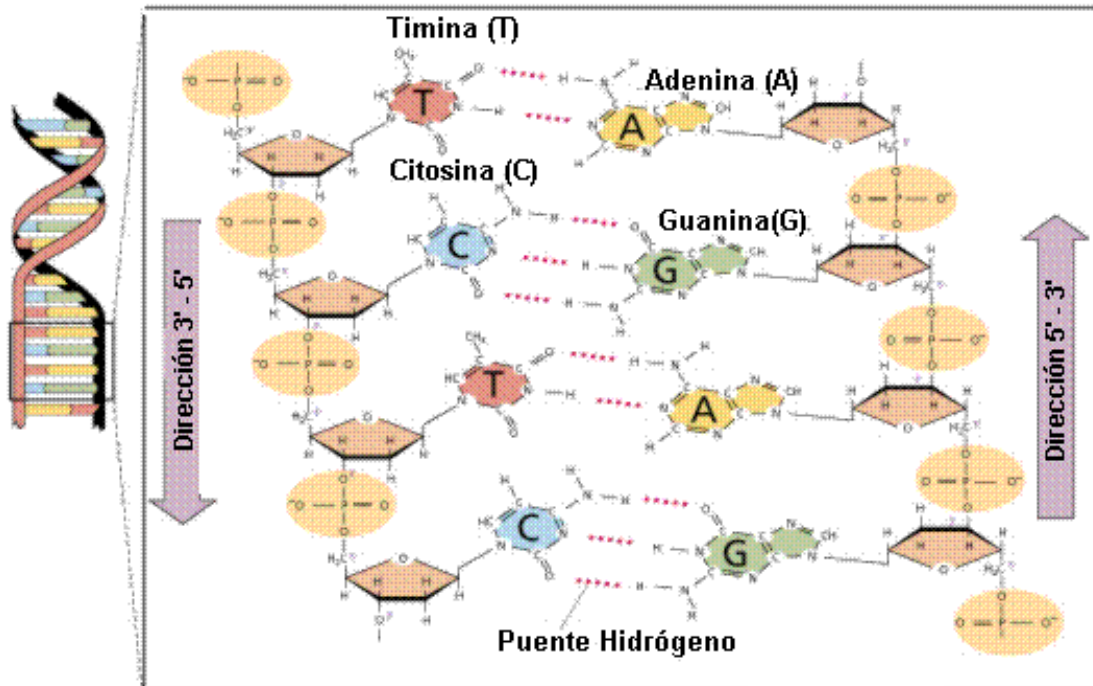
El ADN es una doble hélice, con las bases dirigidas hacia el centro, perpendiculares al eje de la molécula (como los peldaños de una escalera caracol) y las unidades azúcar-fosfato a lo largo de los lados de la hélice (como las barandas de una escalera caracol). Las hebras que la conforman son complementarias, deducción realizada por Watson y Crick a partir de los datos de Chargaff, A se aparea con T y C con G, el apareamiento se mantiene debido a la



acción de los puentes de hidrógeno entre ambas bases; una purina con doble anillo siempre se aparea con una pirimidina con un solo anillo en su molécula. Las purinas son la Adenina (A) y la Guanina (G) y las Pirimidinas son la Citosina (C) y la Timina (T).



Las bases son complementarias, con A en un lado de la molécula únicamente encontramos T del otro lado, lo mismo ocurre con G y C. Si conocemos la secuencia de bases de una de las hebras, conocemos su complementaria.



En cada extremo de una doble hélice lineal de DNA, el extremo 3'-OH de una de las hebras es adyacente al extremo 5'-P (fosfato) de la otra. En otras palabras, las dos hebras son antiparalelas, es decir, tienen una orientación diferente. En el esqueleto azúcar-fosfato del ADN los grupos fosfato se conectan al carbono 3' de la molécula de desoxirribosa y al carbono 5' de la siguiente, uniendo azúcares sucesivos. La prima (') indica la posición del carbono en un azúcar. Por convención, la secuencia de bases de una hebra sencilla se escribe con el extremo 5'-P a la izquierda.

Todas las células contienen ADN en sus núcleos y también lo podemos encontrar dentro de otros compartimentos celulares diferentes al núcleo, como las mitocondrias y los cloroplastos. Para los estudios genéticos en los seres humanos, el tejido generalmente seleccionado para extraer ADN es la sangre (leucocitos). Existen diversas técnicas para la obtención de ADN que van desde métodos automatizados y equipos de reactivos comerciales, hasta métodos manuales con reactivos preparados en cada laboratorio.

La extracción de ADN celular se basa en el hecho de que los iones salinos son atraídos hacia las cargas negativas del ADN, permitiendo su disolución y posterior extracción de la célula. Se empieza por lisar las células mediante un detergente, vaciándose su contenido molecular en una solución amortiguadora en la que se disuelve el ADN. En ese momento, el amortiguador contiene ADN y toda una variedad

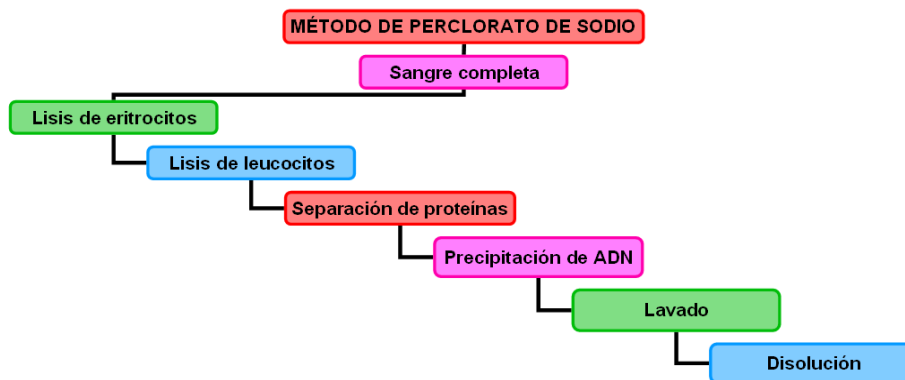
de restos moleculares: ARN, carbohidratos, proteínas y otras sustancias en menor proporción. Las proteínas asociadas al ADN, de gran longitud, se habrán fraccionado en cadenas más pequeñas y separadas de él por acción del detergente. El ADN se separa de la mezcla mediante precipitación para su posterior lavado y disolución.

Método del perclorato de sodio

En 1978, Graham describió el método del perclorato de sodio para la extracción de ADN. Es un método con una buena eficiencia en el rendimiento y pureza del producto, además de un bajo costo, por lo que es utilizado para la realización de esta práctica.

En esta técnica el primer paso es destruir los eritrocitos con un choque hipotónico para separar a los leucocitos. Posteriormente se lisan los leucocitos con detergentes para liberar el ADN y se precipitan las proteínas con solución saturada de cloruro de sodio. Se separa el ADN de la mezcla mediante precipitación con isopropanol para finalmente lavarlo y resuspenderlo en solución amortiguadora, quedando listo para su utilización.

Extracción de ADN



Material

1. Material necesario para extracción de sangre
2. Tubos de centrifuga de 15 ml, de polipropileno, fondo cónico, estériles

3. Tubos de centrifuga de 50 ml, de polipropileno, fondo cónico
4. Material de cristalería
5. Tubos Eppendoff de 1.5 ml

Reactivos

1. Solución amortiguadora de lisis I (1)
2. Solución amortiguadora de lisis II (2)
3. SDS al 10 % (3)
4. Perclorato de sodio 5 M (4)
5. NaCl 6 M (5)
6. Isopropanol absoluto
7. Etanol al 70 %
8. Solución amortiguadora TE (6)

Equipo

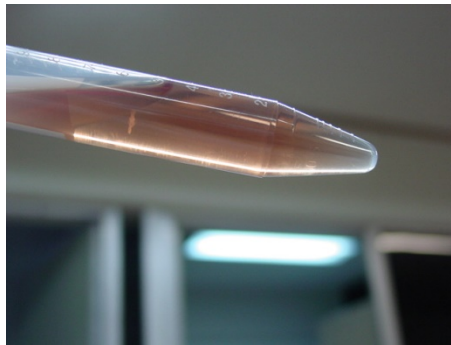
1. Centrifuga refrigerada con velocidad hasta 14,000 rpm y cabezales múltiples.
2. Rotor
3. Baño de agua con control de temperatura
4. Pipetas automáticas de 0 a 20 μ l, 20-200 μ l, 200 a 1000 μ l
5. Espectrofotómetro UV-Vis

Procedimiento

1. Recolectar 5 ml de sangre periférica en tubos con E.D.T.A.
2. En tubos de centrifuga de polipropileno, estériles, con capacidad de 15 ml y fondo cónico, colocar 3 ml de sangre y adicionar 11 ml de la solución amortiguadora de lisis I a 4 °C (reactivo 1). Mezclar por inversión cuidadosamente y proceder a centrifugar a 4,500 rpm a 4° C durante 10 minutos.
3. Decantar cuidadosa y rápidamente el sobrenadante a otro tubo, sin levantar el botón formado que es el necesario para la extracción del ADN.
4. Resuspender el botón obtenido con 2.25 ml de solución amortiguadora de lisis II (reactivo 2), 62.5 μ l de SDS al 10 % (reactivo 3) y 550 μ l de perclorato de sodio 5

M (reactivo 4). Agitar durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación mecánica.

5. Adicionar a cada tubo 1 ml de NaCl 6 M (reactivo 5); agitar muy fuerte con la mano durante 15 segundos y centrifugar a 3,500 rpm por 30 minutos a 4° C.
6. Recuperar el sobrenadante en otro tubo de centrifuga de 15 ml estéril, adicionar 3.5 ml de isopropanol absoluto a 4°C, tapar los tubos y mezclar suavemente en posición horizontal hasta la formación de las hebras de ADN



7. Desechar el líquido cuidadosamente y posteriormente pasar el ADN obtenido a un tubo Eppendoff de 1.5 ml. Lavarlo 2 veces con etanol al 70 %, teniendo precaución en el lavado.
8. Finalmente resuspender el ADN con 150 µl de solución amortiguadora TE, incubándolo a 37° C por una hora.
9. La solución de ADN obtenida se conserva a 4°C.

Normas:

Durante esta práctica se deberá observar la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 (anexo 1), ya que la sangre y sus componentes están clasificados como Residuos Peligrosos Biológicos infecciosos; deberá procederse a su identificación y envasado, almacenamiento temporal, recolección y transporte externo, tratamiento y disposición final, de acuerdo a lo estipulado en esta norma vigente.

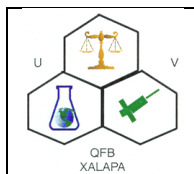
Preguntas:

1. ¿Qué utilidad tiene hacer una extracción de ADN?

2. Al realizar esta práctica ¿de cuál de los componentes sanguíneos se obtiene el ADN? ¿cómo se separan?
3. ¿Cuál es la función del NaCl durante la extracción?
4. ¿Cuál es la función del isopropanol durante la extracción?
5. Describe un método para extracción de ADN distinto al utilizado en esta práctica

Bibliografía

1. LOZANO JA, GALINDO JD, GARCÍA-BORRÓN JC, MARTÍNEZ-LIARTE JH, PEÑAFIEL R Y SOLANO F (2000). Bioquímica y Biología Molecular para Ciencias de la Salud. 2ª. Ed, McGraw-Hill Interamericana.
2. SAMBROOK J Y RUSSELL DW (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed, Vols 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
3. Tusié M, Zentella A. Técnicas aplicadas al estudio del ADN. En Más J. Diagnóstico Molecular en Medicina. México: El Manual Moderno, S.A.; 2004. p. 48-69.
4. ZAVALA J (2005) Manual de técnicas básicas de biología molecular, Universidad Autónoma de Yucatán
5. Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo. Diario oficial. Lunes 17 de febrero de 2003.



PRACTICA No. 2

CUANTIFICACIÓN DE ADN POR ESPECTROFOTOMETRÍA CON LUZ UV

Objetivo

Que el alumno realice la cuantificación de la concentración de una muestra de ADN, mediante la aplicación del método de medición por espectrofotometría con luz ultravioleta, interpretando los resultados.

Sustento teórico

Cuando se obtiene ADN de una muestra es importante conocer su concentración para utilizarlo de manera adecuada, existiendo dos métodos para ello. Si la muestra es pura (no contiene cantidades significativas de contaminantes como proteínas, fenol, agarosa o incluso otros ácidos nucleicos), su medición mediante espectrofotometría de la luz UV absorbida por las bases nitrogenadas es la más adecuada. Por el contrario, si la cantidad de ADN o ARN es muy pequeña, o si la muestra contiene grandes cantidades de impurezas, la estimación de los ácidos nucleicos se puede llevar a cabo por la intensidad de fluorescencia emitida por compuestos como el bromuro de etidio.

En esta práctica se cuantificará la cantidad de ADN mediante espectrofotometría. Se tomarán lecturas de la Densidad Óptica (D.O.) a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. Debido a los anillos presentes en las bases nitrogenadas del ADN, esta molécula tiene absorbancia máxima a 260 nm. Una D.O.260 de 1.0, corresponde a 50 µg/mL de ADN de doble cadena, a 33 µg/mL de ADN cadena sencilla, a 20-30 µg/mL de oligonucleótidos entre 20 a 40 bases y a 40 µg/mL de RNA. La abundancia de proteínas residuales en el extracto se determina midiendo absorbancia a 280 nm. La relación entre las medidas a 260 y 280 (D.O.260:D.O.280) proporciona un estimado de la pureza de la muestra. Un buen ADN (calidad y pureza)

es aquel cuyo A260/A280 es entre 1.7 y 2.0. Valores por debajo de este rango son un indicativo de contaminación con proteínas o fenol.

Material

- Tubos Eppendoff de 1.5 ml
- Celdas de cuarzo

Equipo

- Microcentrífuga con velocidad hasta 14,000 rpm
- Pipetas automáticas de 2 a 20 μ l y de 200 a 1000 μ l
- Espectrofotómetro UV-Vis

Procedimiento

Una vez obtenido el ADN de cada muestra proceder a su cuantificación de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Prender el espectrofotómetro 15 minutos antes de iniciar las lecturas.
2. Si la solución de ADN presenta turbidez o residuos, centrifugarla 5 minutos a 10,000 rpm y pasar el sobrenadante a un tubo Eppendoff nuevo estéril.
3. Ajustar el espectrofotómetro para lectura de ADN de doble cadena a 260/280 nm con una precisión de 0.001
4. Colocar en una celda de cuarzo perfectamente limpia 990 μ l de agua destilada y ajustar el espectrofotómetro a 0
5. Sacar la celda y agregar 10 μ l de la solución de ADN a los 990 μ l de agua destilada
6. Mezclar perfectamente el contenido de la celda con la pipeta automática de 1000 μ l
7. Leer la muestra en el espectrofotómetro a 260 y 280 nm.
8. Anotar las lecturas de concentración, lectura a 260 nm, lectura a 280 nm y el radio.
9. Calcular la concentración de ADN en μ g/ μ l, así como la cantidad total de ADN obtenido, a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{ADN } (\mu\text{g/ml}) = F \times \Delta_{260} \times \text{Dilución de la muestra}$$

$$F = 50$$

Normas

Durante esta práctica se deberá observar la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 (anexo 1), ya que la sangre y sus componentes (en este caso la solución de ADN) están clasificados como Residuos Peligrosos Biológicos infecciosos; deberá procederse a su identificación y envasado, almacenamiento temporal, recolección y transporte externo, tratamiento y disposición final, de acuerdo a lo estipulado en esta norma vigente.

Preguntas

1. ¿Qué utilidad tiene realizar la cuantificación del ADN obtenido?
2. Para el cálculo de la concentración de ADN ¿por qué se utiliza el factor de 50?
3. ¿Por qué se efectúan lecturas a 260 y 280 nm?
4. ¿Cómo se obtiene el radio y que significado tiene su valor?
5. Compara los resultados obtenidos mediante la lectura directa en el espectrofotómetro y por cálculo. Interpreta los resultados.

Bibliografía

1. SAMBROOK J Y RUSSELL DW (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed, Vols 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. Tusié M, Zentella A. Técnicas aplicadas al estudio del ADN. En Más J. Diagnóstico Molecular en Medicina. México: El Manual Moderno, S.A.; 2004. p. 48-69.
3. ZAVALA J (2005) Manual de técnicas básicas de biología molecular, Universidad Autónoma de Yucatán
4. Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo. Diario oficial. Lunes 17 de febrero de 2003.



PRACTICA No. 3
ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA

Objetivo

Que el alumno aplique el fundamento de la electroforesis en gel de agarosa para la estimación de la integridad y concentración de muestras de ADN.

Sustento Teórico

La electroforesis es una de las técnicas más empleadas en bioquímica y biología molecular, para separar y en ocasiones purificar macromoléculas, especialmente proteínas y ácidos nucleicos, que difieren en tamaño, carga o conformación. La carga neta negativa, producto de los grupos fosfatos en el ADN y el ARN, resulta en una migración de las moléculas hacia el ánodo cuando se aplica un campo eléctrico (Fig. 1).

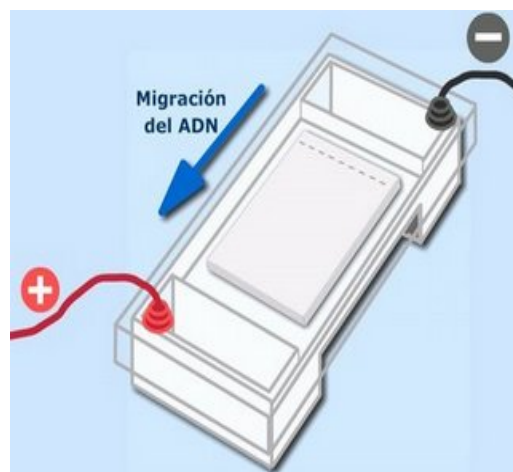


Fig. 1. Electroforesis ADN

Sin embargo la matriz, formada por la agarosa (un polisacárido ramificado de unidades de D-galactosa y 3,6-anhidro-galactosa altamente hidrofóbico), en la sales del tampón, ofrece una resistencia al movimiento. Los fragmentos de ADN lineal migran a través del gel de agarosa con una movilidad inversamente proporcional al \log_{10} de su masa molecular; las moléculas lineales de mayor tamaño tendrán dificultad para pasar por los poros de la matriz, quedándose en la región superior del gel, mientras que los fragmentos de menor tamaño se movilizarán con facilidad, alcanzando la parte inferior del gel, situándose más cerca del polo positivo, adoptando una apariencia similar a un

código de barras. Cada barra contiene un fragmento de ADN de un tamaño determinado.

Entre los diferentes factores que afectan la movilidad de los fragmentos de ADN en el gel de agarosa que pueden optimizarse para la separación de los fragmentos, está la concentración de agarosa. Dependiendo de la concentración de agarosa en el gel, la matriz de agarosa permitirá la separación efectiva de diferentes tamaños de ADN durante la electroforesis (Tabla 1), en consecuencia, la masa molecular relativa puede ser calculada utilizando un marcador de ADN de peso molecular conocido, como referencia. Sin embargo existen otros factores que influyen en el grado de resolución de los geles de agarosa. La conformación de las moléculas afecta la migración. El ADN de plásmidos migra en orden de velocidad desde el más rápido al más lento, de acuerdo a si está en forma superenrollada, lineal o circular abierta.

% de Agarosa en el gel	ADN (kb)
0,6	20-1,0
0,7	10-0,8
0,8	7-0,5
1,3	4-0,2

Tabla 1. Rango de separación de moléculas lineales de ADN doble cadena en electroforesis en geles de acuerdo al porcentaje de agarosa.

El voltaje es otro factor que influye en la velocidad de migración del ADN, a mayor voltaje una migración más rápida; sin embargo el calor generado produce que el gel se derrita además de desmejorar la resolución de la separación de las moléculas.

Los geles de agarosa en corrida horizontal (figura 2) son utilizados para separar fragmentos entre 100 pb hasta 20 kb. Para la separación de moléculas de menor tamaño se utilizan geles de poliacrilamida y para moléculas mayores a 0,1 Mb hasta 2 Mb se han diseñado los sistemas de electroforesis de campo pulsado (Pulse Field Gel Electrophoresis o PFE) y electroforesis de campos invertidos (Field Inverted Gel Electrophoresis, FIGE), ambos realizados en geles de agarosa de alta concentración (agarosa 1,5% a 2 %).

Previa a la colocación de la muestra en los pozos del gel, se mezcla con el tampón de carga, compuesto por un reactivo que incrementa la densidad, como el glicerol o la sacarosa, y uno o dos colorantes que permitan hacer el seguimiento de la corrida en tiempo real. Generalmente se utiliza el azul de bromofenol y el cilenio cianol, los cuales están cargados negativamente y migran, dependiendo de la concentración de la agarosa en el gel, a un peso molecular equivalente a 5 kb y 300 pb de ADN doble cadena respectivamente en gel.

El método más práctico utilizado para la visualización del ADN separado en geles de agarosa es la tinción con el colorante fluorescente bromuro de etidio (BrEt), el cual contiene grupos planares tricíclicos que se intercalan entre las bases del ADN, sin especificidad de secuencia. Bajo estas condiciones, el colorante aumenta su fluorescencia, de modo que emite luz visible (color naranja) cuando es excitado por radiación ultravioleta. Su sensibilidad es de aproximadamente 30 pg de ADN por banda, dependiendo del grosor de la matriz en el que se esté visualizando. Debido a las propiedades mutagénicas, teratogénicas y carcinogénicas del bromuro de etidio, es necesario realizar el procedimiento con guantes.

El registro del resultado de la electroforesis se visualiza mediante la exposición a la luz UV del gel teñido con BrEt. Se utiliza un aparato de fotodocumentación para digitaliza la imagen.

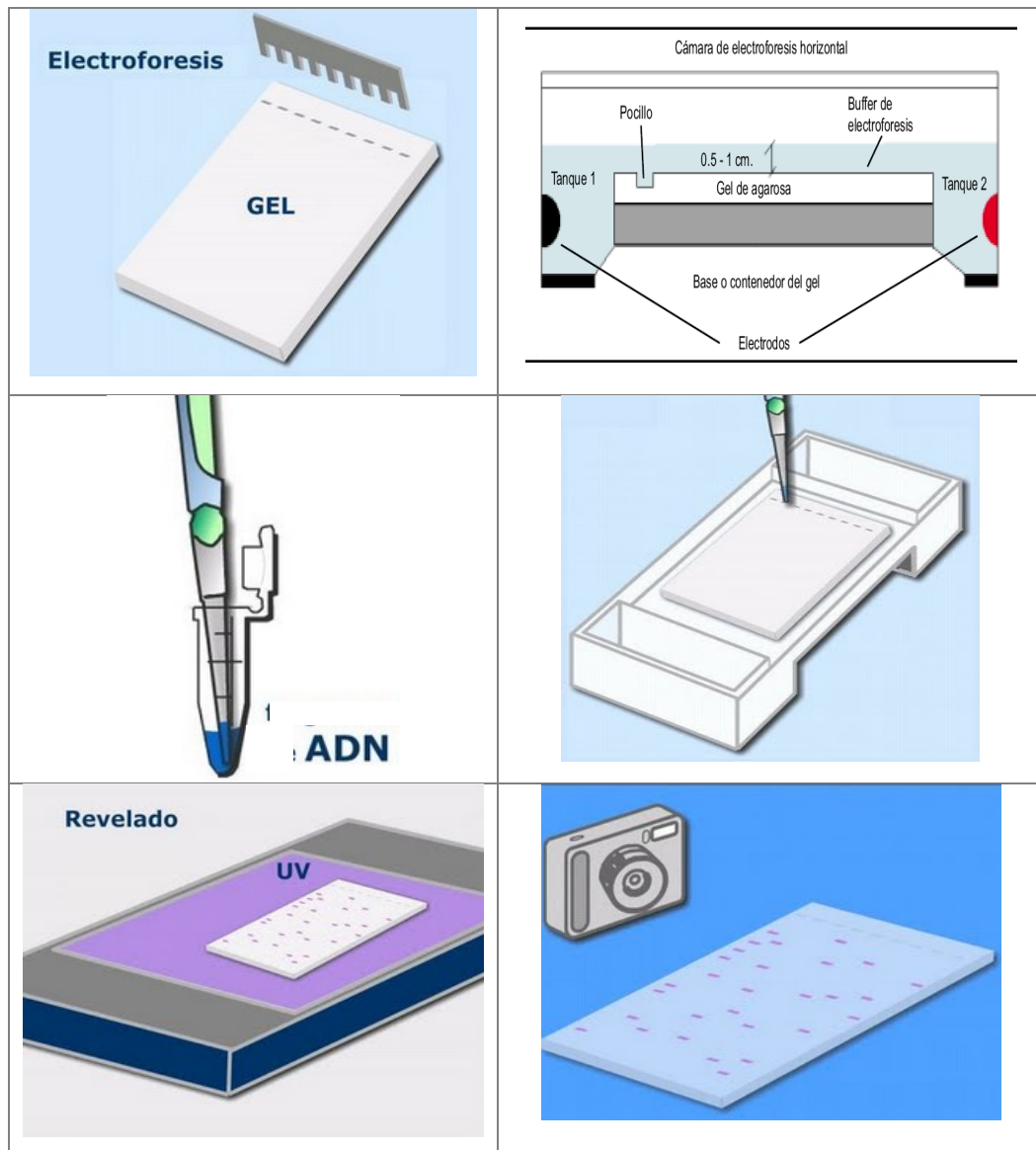


Figura 2. Procedimiento para electroforesis horizontal

La electroforesis de ADN es útil para comparar patrones de bandas de diferentes muestras biológicas. Así por ejemplo se puede usar para comparar muestras de individuo sano frente a individuo enfermo, para la identificación de ácidos nucleicos de agentes infecciosos o para la obtención de un fragmento determinado de ADN que, una vez localizado en el gel, puede ser extraído para análisis posteriores.

Estimación de la concentración de ADN por visualización.

El método indirecto más recomendable para la determinación de la concentración de ADN en una muestra es mediante la visualización de un gel de electroforesis en el cual se colocan muestras con concentraciones conocidas. En este método la estimación se realiza contrastando intensidades de luz entre las muestras, lo cual se realiza visualmente o con el auxilio de algún programa computacional que contraste intensidades de color.

Material

- Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- Tubos de centrifuga de 50 ml, de polipropileno, fondo cónico
- Papel de aluminio
- Espátula de plástico
- Bandejas de plástico para teñido

Reactivos

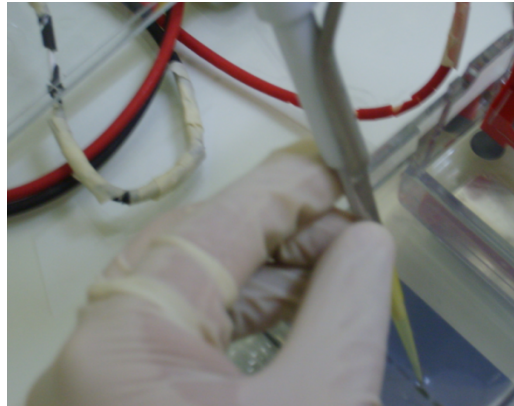
- Agarosa
- TAE 1X (9)
- Azul de bromofenol
- Bromuro de etidio 10 μ g/ μ l

Equipo

- Balanza analítica
- Horno de microondas
- Cámara de electroforesis horizontal con fuente de poder
- Pipetas automáticas de 2 a 20 μ l, 200 a 1000 μ l
- Transiluminador
- Fotodocumentador

Procedimiento

1. Preparar una solución de agarosa al 1.5 %. Para ello pesar 0.3 g de agarosa y colocarla en un matraz Erlenmeyer, agregar 20 ml de TAE 1X y fundirla en horno de microondas por 20 segundos.
2. Colocar los separadores en la cámara de electroforesis y vaciar la agarosa fundida. Colocar el peine en la hendidura correspondiente y dejar enfriar a temperatura ambiente durante 20 a 30 minutos (hasta que se haya solidificado).
3. Retirar el peine y llenar la cámara con TAE 1X hasta la marca.
4. Preparar las muestras mezclando 4 μ l de DNA y 0.5 μ l de azul de bromofenol y colocarlas en los pozos.



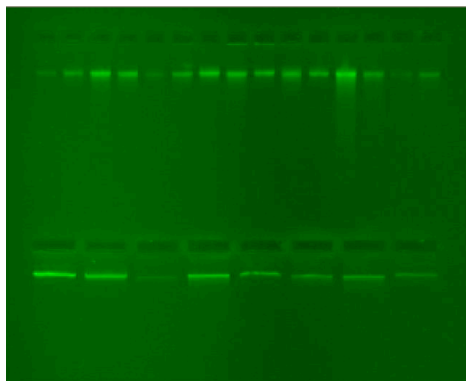
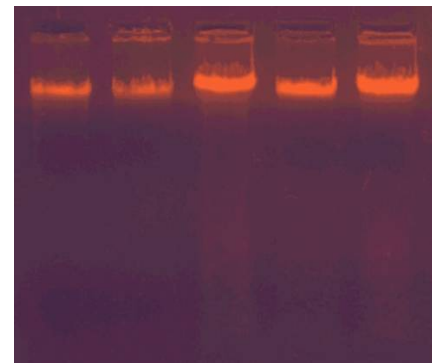
5. Tapar la cámara y encender la fuente de poder. Hacer el corrimiento a 80-100 volts durante aproximadamente 45 minutos.
6. Sacar el gel de la cámara de electroforesis y teñirlo colocándolo a temperatura ambiente durante 30 a 45 minutos en buffer TAE 1X adicionado de bromuro de etidio, a una concentración de 0.5 μ g/ml.



7. Lavar el gel en agua destilada durante 10 minutos.
8. Realizar otro lavado del gel en agua destilada durante 5 minutos
9. Visualizar los resultados en el transiluminador con luz ultravioleta, procediendo a digitalizar la imagen del gel.



Observación de las bandas de ADN después de electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %



Normas

Durante esta práctica se deberá observar la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 (anexo 1), ya que la sangre y sus componentes (en este caso la solución de ADN) están clasificados como Residuos Peligrosos Biológicos infecciosos; deberá procederse a su identificación y envasado, almacenamiento

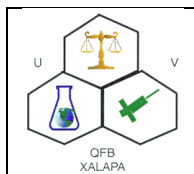
temporal, recolección y transporte externo, tratamiento y disposición final, de acuerdo a lo estipulado en esta norma vigente.

Preguntas:

1. ¿Qué es la electroforesis?
2. ¿En que se basa la electroforesis del ADN?
3. ¿Por qué la matriz del gel de agarosa ofrece resistencia al paso de las moléculas de ADN?
4. ¿Cómo deben prepararse los geles de agarosa para separar con buena resolución fragmentos de ADN de distintos tamaños?
5. ¿Cuáles son las funciones de los tampones de electroforesis como el TAE 1X?
¿Qué otros tampones de electroforesis son frecuentemente usados en laboratorio?
6. ¿Con qué propósito se mezcla la solución de ADN con el tampón de carga?
¿Cuáles son las funciones de cada uno de de los componentes, el glicerol, el azul de bromofenol?
7. ¿Cómo se valora la integridad y la concentración del ADN con esta técnica?

Bibliografía

1. LOZANO JA, GALINDO JD, GARCÍA-BORRÓN JC, MARTÍNEZ-LIARTE JH, PEÑAFIEL R Y SOLANO F (2000). Bioquímica y Biología Molecular para Ciencias de la Salud. 2ª. Ed, McGraw-Hill Interamericana.
2. SAMBROOK J Y RUSSELL DW (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed, Vols 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
3. Tusié M, Zentella A. Técnicas aplicadas al estudio del ADN. En Más J. Diagnóstico Molecular en Medicina. México: El Manual Moderno, S.A.; 2004. p. 48-69.
4. ZAVALA J (2005) Manual de técnicas básicas de biología molecular, Universidad Autónoma de Yucatán
5. Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo. Diario oficial. Lunes 17 de febrero de 2003.



UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA

PRACTICA No. 4

***Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación
de la región polimórfica Dral del CYP2E1***

Objetivo

Que el alumno obtenga la amplificación de un fragmento de ADN mediante la realización de la técnica de PCR, explique e interprete los resultados.

Sustento Teórico

El desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) es uno de los avances tecnológicos de mayor impacto en las técnicas de Biología Molecular y debido a sus múltiples aplicaciones constituye un importante progreso en el área de diagnóstico e identificación molecular. Una de sus mayores ventajas corresponde a la simplicidad de la reacción y a la relativa facilidad en los pasos de manipulación del material de trabajo, permitiendo la adopción de la técnica de PCR en diversos ámbitos.

La técnica de PCR es un proceso de síntesis *in vitro* de ADN, en el cual se copia una hebra complementaria a partir de una mezcla compleja de material, usualmente llamada ADN templado, extendiéndose en dirección 3'→5' a partir de un iniciador, cebador o "primer". Se utiliza para amplificar un fragmento definido de ADN y con ella se consiguen millones de copias de la secuencia específica en pocas horas, ya que la amplificación por ciclos sucesivos, es un proceso de multiplicación exponencial, que genera suficiente producto que puede acumularse y ser visualizado. Una sola molécula puede generar más de un billón de copias de si misma, luego de 30 ciclos de replicación exponencial. La cantidad necesaria, en principio necesitaría sólo una molécula de ADN, aunque habitualmente se toman cantidades alrededor de un microgramo. La molécula de ADN es muy estable, por lo que puede ser recogida generalmente, sin métodos purificadores, a partir de productos biológicos diversos,

como tejidos frescos, incluidos en parafina, esperma, lavados bronquiales, material de mucosas tomado con torunda, pelos, sangre, extendidos citológicos, material desecado de momias, entre otros.

La técnica de PCR fue descubierta en el año 1983 por Kary Mullis y por ella le fue concedido el premio Nobel. Con la PCR se realiza *in vitro* el proceso de replicación del ADN. Está basado en la acción de la polimerasa, que como se sabe es la enzima que dirige la síntesis de ADN, y desde una cadena simple de ADN sintetiza la complementaria.

Para hacer la reacción se debe de aportar: el ADN a copiar, en cantidad habitual de un microgramo. Además del templado, se requiere el conocimiento de las secuencias de ADN que flanquean al fragmento a ser amplificado, conocido como ADN blanco; a partir de esta información se pueden diseñar y sintetizar químicamente dos oligonucleótidos iniciadores. Cada uno de estos oligonucleótidos es complementario al extremo 3' de la hebra de ADN de la secuencia blanco, un oligonucleótido para cada una de las dos hebras del ADN los *primers*, o cebadores, que se alinearán a las cadenas simples de ADN. También se requieren grandes cantidades de los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos necesarios para el ADN a amplificar (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), la Taq DNA polimerasa, que es la enzima de la bacteria de las aguas termales denominada *thermus aquaticus*, ya que vive a más de 70°C y su temperatura óptima de actuación es a 72°C, pero es estable a temperaturas superiores a 90°C, que son necesarias para realizar la desnaturalización del ADN. La utilización de esta enzima ha permitido la automatización de la PCR, porque se puede suministrar desde el principio todos los elementos en un mismo tubo de ensayo.

La primera reacción consiste en la desnaturalización del DNA, separándose las dos cadenas por ruptura de los enlaces de hidrógeno a una temperatura de 95° C (figura 1).



Figura 1. Desnaturalización del ADN.

Con esta primera etapa, la región de ADN que será específicamente amplificada (secuencia blanco o diana) se hace accesible a los iniciadores.

La segunda reacción consiste en la hibridación de estas cadenas con los denominados oligonucleótidos iniciadores o *primers*, que son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del ADN. Para ello se baja la temperatura y las condiciones serán tales que sobre todo se facilitará la unión de los *primers* a las cadenas. Los cebadores, presentes en exceso en la mezcla de reacción, se ubican específicamente mediante hibridación por complementariedad de bases con la secuencia blanco. Los oligonucleótidos alineados actúan como iniciadores para la síntesis del ADN, dado que proveen del grupo hidroxilo 3' libre para la ADN polimerasa. Estos iniciadores no deben ser complementarios entre sí, para que no se hibriden entre ellos, y deben corresponder a los extremos de la porción de DNA que queremos amplificar. Esta reacción suele hacerse entre 40 y 70° C que se calcula mediante una formula sencilla, $T_m = 4(n^\circ \text{ de pares GC}) + 2(n^\circ \text{ de pares AT})$ (figura 2). La precisión en la temperatura de esta fase es crítica y está definida por la T_m de cada cebador. Cada sistema de PCR debe optimizarse tomando en cuenta este parámetro. Si la temperatura esta muy por debajo del T_m pueden generar productos de ADN adicionales al blanco específico o pueden no producir ningún producto amplificado si son muy elevadas.



Figura 2. Hibridación con anillamiento de los cebadores

La tercera reacción se efectúa a 72° C, temperatura a la que la polimerasa lleva a cabo su acción, concretamente la Taq DNA polimerasa que va actuar engarzando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde (figura 3).

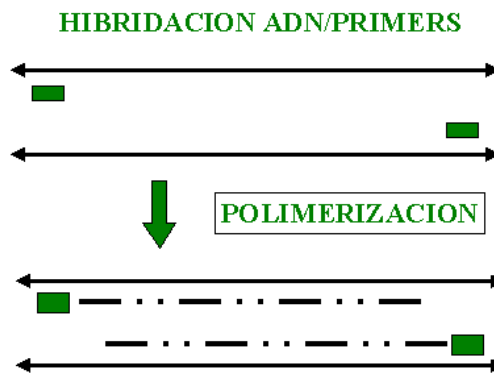


Figura 3. Polimerización por actuación de la Taq polimerasa

En esencia un ciclo de amplificación está constituido por tres reacciones que se hacen a temperaturas distintas (figura 4)

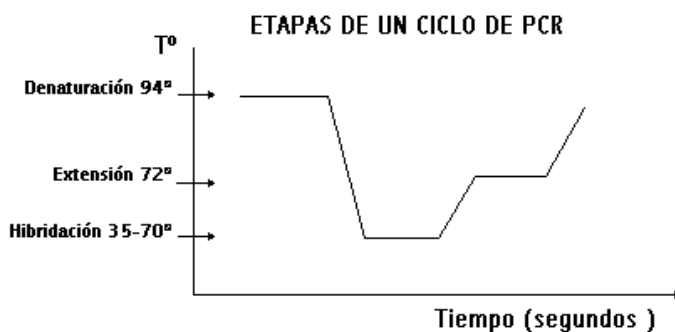


Figura 4. Etapas y temperaturas de un ciclo de PCR

Estas tres reacciones constituyen un ciclo. Normalmente se realizan 30 ó 40 ciclos en los cuales los fragmentos de cadena de ADN pequeños, los situados entre los *primers*, se habrán amplificado mucho más en número que los de cadena larga iniciales. El ADN sintetizado posee los sitios de anclaje para los oligonucleótidos, sirviendo como templado para los sucesivos ciclos de PCR.

Cada sistema de PCR sigue el mismo principio básico, sin embargo la secuencia de los oligonucleótidos, los componentes de la mezcla de reacción, así como las temperaturas y los tiempos de cada paso de un ciclo son específicos.

CYP2E1

Existen una gran variedad de enzimas polimórficas involucradas en el metabolismo de xenobióticos (Quiñones, 2006), dentro de las cuales se encuentra el CYP450. Siendo este el sistema metabolizador más importante, responsable de la oxidación de numerosos compuestos endógenos (endobióticos) y exógenos (xenobióticos) (Orellana, 2004), dentro de este sistema podemos encontrar a la CYP2E1, enzima toxicológicamente importante, de gran interés para la medicina industrial y medio ambiental ya que tiene un papel importante en la biotransformación de diversos xenobióticos por el amplio espectro de compuestos químicos que metaboliza, más de 70 compuestos orgánicos tales como alcoholes, aldehídos, éteres, ácidos grasos, cetonas, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, dialquilnitrosaminas, etilcarbamatos, solventes halogenados o fármacos, son metabolizados por el CYP2E1 (Yerena, 2005).

Aproximadamente de un 5 a 10 por ciento de los xenobióticos como fármacos, plaguicidas, carcinógenos y derivados del petróleo son oxidados por la vía del CYP450 (sobre todo CYP2E1 y CYP3A4) produciendo metabolitos tóxicos, que en algunos casos puede ser eliminado en la orina o la bilis (Corcoran, 1998).

En esta práctica se amplificará la región específica del ADN para el sitio *DraI* I del gen *CYP2E1*, localizado en el intrón 6, de acuerdo al método descrito por Hirvonen y col (1993), que genera un fragmento de 373 pb.

Material

- Tubos Eppendoff de 0.65 ml estériles
- Puntas para micropipeta estériles
- Baño de hielo
- Papel Parafilm
- Pipetas automáticas de 0.1 a 2.5 μ l, 2 a 20 μ l, 20-200 μ l, 200 a 1000 μ l
- Papel de aluminio
- Espátula de plástico

Reactivos

- Equipo de reactivos para PCR
- Primers para el sitio polimórfico *DraI*: 5'-AGT-CGA-CAT-GTG-ATG-GAT-CCA-3' y 5'-GAC-AGG-GTT-TCA-TCA-TGT-TGG-3'
- Agua inyectable estéril
- Agarosa
- TAE 1X
- Azul de bromofenol
- Bromuro de etidio 10 μ g/ μ l
- Marcador de 100 pares de bases

Equipo

- Termociclador

- Transiluminador
- Fotodocumentador
- Microcentrífuga
- Vortex
- Balanza analítica
- Horno de microondas
- Cámara de electroforesis horizontal con fuente de poder

Procedimiento

En baño de hielo, preparar una mezcla de reactivos (pool) de acuerdo al número de muestras a trabajar, considerando que para cada muestra se requieren las siguientes cantidades de reactivos:

Componente	Volumen	Concentración final
Solución de MgCl ₂ 25 mM	1.2 µl	1.5 mM
Solución buffer 10 X libre de MgCl ₂	2.0 µl	1.0X
Mezcla de nucleótidos para PCR (10 mM cada uno)	0.4 µl	200 µM cada uno
Oligonucleótidos del CYP2E1 para Dnal (sentido)	0.8 µl	0.8 µM
Oligonucleótidos del CYP2E1 para Dnal (antisentido)	0.8 µl	0.8 µM
Taq polimerasa	0.1 µl	1.25 u
ADN molde	variable	0.5 a 1 µg
Agua libre de nucleasas para un volumen final de	20 µl	

En un microtubo de 0.65 ml colocar el pool de reactivos y el ADN molde, mezclando bien con la misma pipeta. Colocarlo en el termociclador bajo el siguiente programa:

1. 3 minutos a 94° C Desnaturalización del ADN
2. 1 minuto a 94° C Desnaturalización final
3. 1 minuto a 60° C Alineación
4. 1 minuto a 72° C Elongación de la cadena
5. Repetir 35 ciclos a partir del punto 2

6. 7 minutos a 72°C Elongación final
7. ∞ 4°C

Una vez terminada la reacción proceder a verificar la obtención de los fragmentos requeridos de 373 pb mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, tal como se realizó en la práctica No. 3, colocando en el primer pozo el marcador de pares de bases.

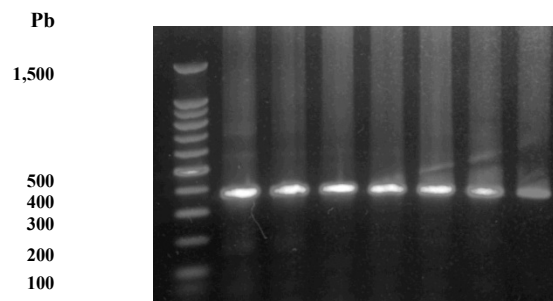


Figura 5. Gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio en donde se observan los fragmentos de 373 pb para *DraI*

Normas

Durante esta práctica se deberá observar la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 (anexo 1), ya que la sangre y sus componentes (en este caso la solución de ADN) están clasificados como Residuos Peligrosos Biológicos infecciosos; deberá procederse a su identificación y envasado, almacenamiento temporal, recolección y transporte externo, tratamiento y disposición final, de acuerdo a lo estipulado en esta norma vigente.

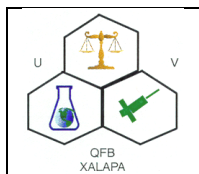
Preguntas:

1. ¿En que se basa la reacción de PCR?
2. ¿Qué son los oligonucléidos?
3. ¿Para que se agrega cloruro de magnesio?
4. Durante la PCR ¿Qué sucede en la fase de desnaturalización?
5. Durante la PCR ¿Qué sucede en la fase de alineación?
6. Durante la PCR ¿Qué sucede en la fase de elongación?

7. ¿Por qué el EDTA inhibe la reacción enzimática?

BIBLIOGRAFÍA

1. CORCORAN GB, MITCHELL JR, VAISHNAV YN, EC DE HORNING. Evidenciar que acetaminophen y forma de N-hydroxyacetaminophen un intermedio arylating del campo común, N-acetilo-p-benzoquinoneimine. *Mol de Pharmacol.* 1998; 18: 536-542
2. HIRVONEN A, HUSGAFVEL-PURSIAINEN K, ANTTILA S, KARJALAINEN A, VAINIO H. The human CYP2E1 gene and lung cancer: DraI and RsaI restriction fragment length polymorphisms in a Finnish study population. *Carcinogenesis* 1993; 14: 85-88.
3. ORELLANA M, GUAJARDO V. Cytochrome P450 activity and its alteration in different diseases. *Rev Méd Chil* 2004; 132: 85-94.
4. QUIÑONES L, LEE K, VARELA N, ESCALA M, GARCÍA K, GODOY LORETO, CASTRO A, SOTO J, SAAVEDRA I, CÁCERES D. Farmacogenética del cáncer: Estudio de variaciones genéticamente determinadas en la susceptibilidad a cáncer por exposición a xenobióticos. *Rev Méd Chile* 2006; 134: 499-515.
5. SAMBROOK J Y RUSSELL DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed, Vols 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
6. TUSIÉ M, ZENTELLA A. Técnicas aplicadas al estudio del ADN. En Más J. *Diagnóstico Molecular en Medicina*. México: El Manual Moderno, S.A.; 2004. p. 48-69.
7. YERENA C, ET AL. Influencia del polimorfismo del CYP2E1 sobre el riesgo de intoxicación aguda por exposición a plaguicidas. *Bioquímica* 2005; 30:68-75.
8. ZAVALA J (2005) *Manual de técnicas básicas de biología molecular*, Universidad Autónoma de Yucatán



PRACTICA No. 5

Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (R.F.L.P.) para la determinación del genotipo de la región DraI del CYP2E1

Objetivo

Que el alumno aplique los principios metodológicos básicos del uso de enzimas de restricción para la determinación del genotipo de la región DraI del CYP2E1 en muestras de ADN mediante la técnica de RFLP.

Sustento Teórico

Aproximadamente el 99.9% de la secuencia del ADN de dos individuos diferentes es la misma. Una proporción significativa de las diferencias encontradas en los individuos, es decir, sus diferencias fenotípicas y/o susceptibilidades a ciertas enfermedades, radica en el 0.1% de variación; a este tipo de variaciones genéticas se les conoce como polimorfismos genéticos, los cuales representan diferentes formas en las secuencias de ADN.

Las aplicaciones del estudio de los polimorfismos son diversas; por un lado sirven para tratar de explicar el origen de las poblaciones y así reconstruir parte de la historia evolutiva. Por otro, tienen gran aplicación en campos como la medicina forense y en el estudio de las enfermedades multigénicas. Su estudio ha servido de pauta para la creación de nuevas disciplinas como la ecogenética y la farmacogenética; la primera define las bases genéticas de las diferencias individuales en respuesta a los factores ambientales, mientras que la segunda se centra en la definición de las diferencias individuales en respuesta a un tratamiento farmacológico.

POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SENCILLO (SNP)

Como se mencionó, los polimorfismos se distinguen terminológicamente de las mutaciones por su frecuencia. Las diferentes formas de los polimorfismos (llamados “alelos”) son más frecuentes que las mutaciones, esto es, en una frecuencia mayor al

1%. La gran mayoría de los SNP's tienen dos alelos los cuales están representados por una sustitución de una base por otra. En las poblaciones, este tipo de alelos se clasifican en alelo principal o "silvestre" y alelo raro o mutante, clasificación basada en la frecuencia observada en las poblaciones. Debido a que los humanos son diploides, un individuo puede tener uno de tres genotipos: homocigoto para el alelo más frecuente, heterocigoto, u homocigoto para el alelo menos frecuente.

ENZIMA DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción son endonucleasas que reconocen una secuencia entre 4-12 bp en ADNds. El sitio de reconocimiento se llama sitio de restricción, y la enzima rompe un enlace fosfodiéster en la hebra de arriba y otro enlace fosfodiéster en la hebra complementaria.

Estas enzimas se encuentran en muchas especies de bacterias, donde funcionan in vivo como parte de un sistema de restricción y modificación (sistema R/M). Este sistema es análogo a un sistema inmune, y le permite distinguir a la bacteria entre su propio ADN y el ADN exógeno, siendo este último degradado por la enzima de restricción. El DNA propio no es reconocido por sus enzimas de restricción, puesto que previamente lo ha modificado por metilación a través de la acción de una metiltransferasa (enzima que transfiere grupos metilo desde S-adenosilmetionina a bases específicas) (Quiñones et al. 1999; Harvey, 2003).

El nombre de cada enzima de restricción está asignado según el origen bacteriano de la misma. La nomenclatura utilizada para denominar estas enzimas consiste en (Harvey, 2003):

- 1°. Tres letras que corresponden al nombre científico del microorganismo (Ej. *Deinococcus radiophilus* (*Dra*)); y por ello las tres primeras letras del nombre se escriben en cursiva.
- 2°. La cepa o estirpe si la hubiese (Ej. EcoR, aislada de la cepa "RY13" de *E. coli*)
- 3°. En números romanos, un número para distinguir si hay más de una endonucleasa aislada de esa misma especie. No confundir con el tipo de enzima de restricción.
- 4°. Todas deberían llevar delante una R de restricción o un M de metilasa según la función de la enzima, pero generalmente se omite.

ENZIMA DE RESTRICCIÓN *Dra1*

La bacteria precursora de esta enzima es la *Deinococcus radiophilus*, es una enzima que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos (5'-AGT-CGA-CAT-GTG-ATG-GAT-CCA-3' y 5'-GAC-AGG-GTT-TCA-TCA-TGT-TGG-3') dentro de una molécula de ADN y cortar el ADN en el llamado sitio o diana de restricción TTT▼AAA.

AAA▲TTT

El polimorfismo *Dra1* en el intrón 6 del gene suprime un sitio de restricción para la enzima *Dra1* debido a un transversión de adenina a timina en la base 7,668 (Hu et al., 1997), esta variante alélica es llamada " alelo mutado, C raro" o CYP2E1*6 y se encuentra en el genotipo de personas Homocigotas mutadas, cuando no se presenta esta transversión encontramos el "alelo silvestre" que se encuentra en el genotipo de personas Homocigotas silvestres, si se encuentra la presencia de ambos alelos el genotipo se conoce como Heterocigoto.

Para identificar los genotipos mencionados anteriormente la enzima *Dra1* muestra tres patrones de corte distintos que pueden ser observados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%. El genotipo de una persona heterocigota, en la que aparece una banda superior (373 pb), una banda media (240 pb) y una inferior (133 pb); luego está la persona homocigota silvestre en la que se encuentran la banda media (240 pb) y la inferior (133 pb) y por último el genotipo de una persona homocigota mutada que corresponde a la variante alélica en la que aparece sólo la banda superior (373 pb). Esta genotipificación permite definir la velocidad de transcripción y el grado de actividad de la enzima CYP2E1, e identificar así a las personas que en teoría son más susceptibles al estrés oxidativo (Quiñones, 2002).

CYP2E1

Se han descrito diversos polimorfismos para el gen *CYP2E1*. En esta práctica se determinará el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción mediante la enzima *Dra1*. Este sitio polimórfico está localizado en el intrón 6 y es causado por mutación en la posición ⁷⁷⁶⁸*CYP2E1* T-A dando origen a dos posibles alelos: C (raro, mutado) y D (frecuente, silvestre), generando el patrón genotípico CC, CD y DD.

El CYP2E1 es una de las más abundantes isoformas del citocromo P-450 y representa el 7% de todas las isoformas CYP450 expresadas en el hígado, aunque se ha demostrado experimentalmente que no se restringe al tejido hepático, pues se encuentra también en otros tejidos como el pulmón y riñón. Se ha visto que la naturaleza polimórfica de su gen es significativa para las diferencias interindividuales en la toxicidad a sus sustratos; por ello, la asociación del polimorfismo genético del CYP2E1 y la susceptibilidad a los daños producidos por exposición a tóxicos han recibido una atención creciente.

En el gen CYP2E1 se han descrito varias mutaciones puntuales; entre las más importantes están *RsaI* y *PstI* que se encuentran ligadas y *DraI* que causa una sobreexpresión del gen (Yerena, 2005). La variante alélica que detecta la enzima *DraI* muestra tres patrones distintos, el genotipo de una persona heterocigota, homocigota silvestre y por último el genotipo homocigoto mutado. Esta genotipificación presenta variantes alélicas de diferentes velocidades de transcripción dentro de la población, lo que significa que algunas personas tienen un gen cuya variante alélica tiene mayor velocidad de transcripción y, por lo tanto, mayor actividad enzimática. (Quiñones, 2002).

Varios sitios polimórficos son encontrados en el gen *CYP2E1*. El polimorfismo *DraI* en el intrón 6 del gene suprime un sitio de restricción para la enzima *DraI* debido a un transversión de adenina a timina en la base 7.668, que se llama " alelo C raro " o CYP2E1*6 (Hu *et al.*, 1997).

a) TÉCNICA DE RFLP (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción)

El estudio de los polimorfismos de este tipo consiste en el análisis en cuanto a número y tamaño de los fragmentos de ADN al ser digeridos con distintas enzimas de restricción (Figura 1). Los patrones de bandas resultantes se generan por la presencia o ausencia de los sitios de corte de la enzima producidos por mutaciones: cambios, deleciones o inserciones de bases. Por lo tanto, la variabilidad está dada por las distintas tallas de los fragmentos que se originan al digerir con las mencionadas

enzimas el material genómico o un fragmento amplificado del genoma, de manera que un sitio de restricción polimórfico o una delección o inserción entre dos sitios de corte será detectado como un polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción generados a nivel fenotípico.

La técnica consta de las siguientes etapas: digestión del ADN con enzimas de restricción; separación por electroforesis de los fragmentos resultantes de la digestión; transferencia de los fragmentos separados a membranas de nitrocelulosa e hibridación con sondas moleculares radiactivas y exposición de la membrana a un filme de rayos X (Cornide *et al.*, 2002).

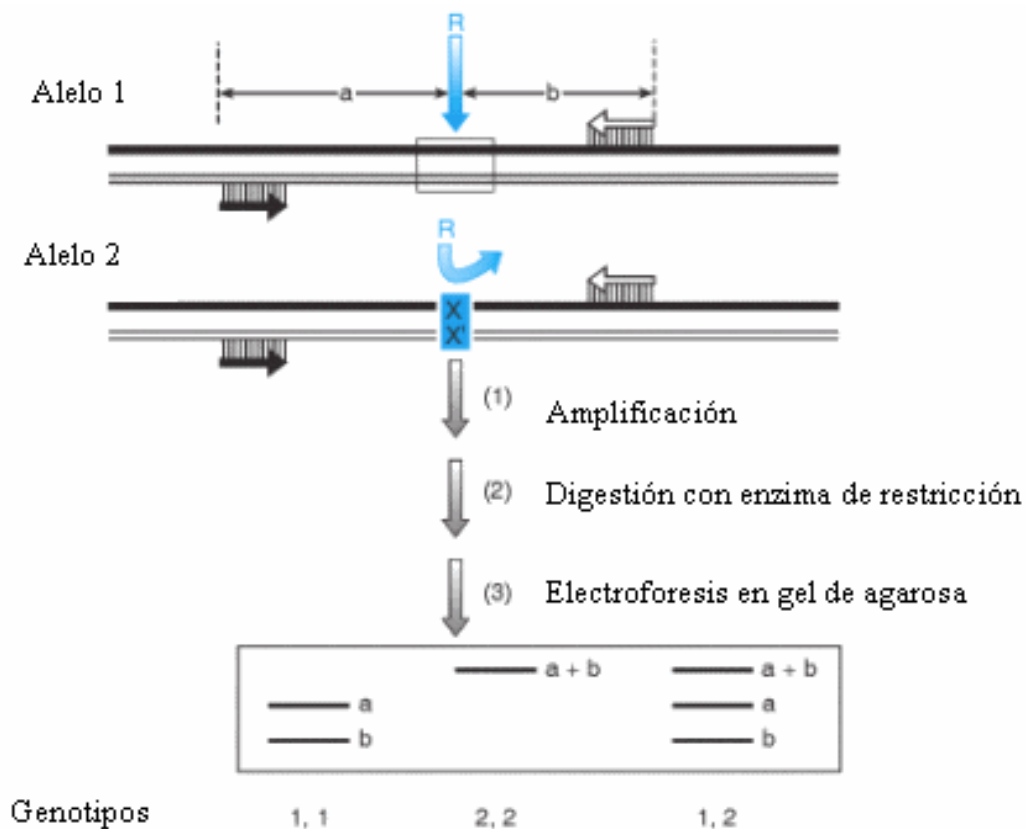


Figura 1: Representación esquemática del principio genético del RFLP. Genotipo 1,1 (Homocigoto silvestre), 2,2 (Homocigoto mutado) 1,2 (Heterocigoto).

Material

1. Pipetas automáticas de 0.1 a 2.5 μ l, 2 a 20 μ l, 20-200 μ l, 200 a 1000 μ l
2. Puntas para micropipeta estériles
3. Matraz Erlenmeyer de 250 ml
4. Papel de aluminio
5. Papel Parafilm
6. Espátula de plástico
7. Tubos Eppendoff de 0.65 ml estériles
8. Baño de hielo

Reactivos

1. Agua inyectable estéril
2. Enzima de restricción *DraI*
3. Albúmina bovina sérica acetilada
4. Solución amortiguadora B
5. Agarosa
6. TAE 1X
7. Azul de bromofenol
8. Bromuro de etidio 10 μ g/ μ l
9. Marcador de 100 pares de bases

Equipo

1. Baño de agua con control de temperatura
2. Transiluminador
3. Fotodocumentador
4. Microcentrífuga
5. Vortex
6. Balanza analítica
7. Horno de microondas
8. Cámara de electroforesis horizontal con fuente de poder

Procedimiento

Digerir el producto de PCR con la enzima de restricción *DraI*, bajo las siguientes condiciones:

En baño de hielo elaborar una mezcla de reactivos (pool) de acuerdo al número de muestras a trabajar y a los reactivos especificados en la siguiente tabla:

Componente	Volumen
Solución buffer 10X	2 μ l
Albúmina bovina sérica acetilada (10 μ g/ μ l)	0.2 μ l
Producto de PCR correspondiente	3 μ l
Enzima de restricción <i>DraI</i> , 10 u/ μ l	0.5 μ l
Agua estéril desionizada para un volumen final de	20 μ l

En un microtubo de 0.65 ml colocar el producto de PCR y el pool de reactivos. Incubarlo a 37°C por tres horas.

Una vez terminada la reacción proceder a verificar los patrones de corte de los fragmentos correspondientes mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

Observar los resultados en el transiluminador y hacer la interpretación de acuerdo a la siguiente tabla:

Patrones de corte de la enzima de restricción *DraI*

Patrón de corte	Resultado
240 pb 133 pb	DD (homocigoto silvestre)
373 pb 240 pb 133 pb	CD (heterocigoto)
373 pb	CC (homocigoto mutado)

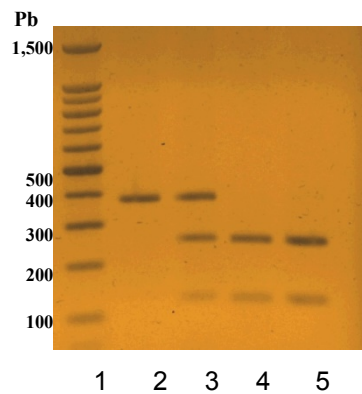


Figura 2. Gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio en donde se observan los patrones de corte para *DraI*. En el carril 1 se observa el marcador de 100 pb, en el 2 un patrón de homocigoto mutado, en el 3 de heterocigoto y en el 4 y 5 homocigoto silvestre

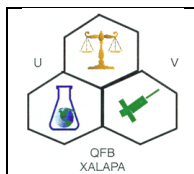
Normas

Durante esta práctica se deberá observar la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 (anexo 1), ya que la sangre y sus componentes (en este caso la solución de ADN) están clasificados como Residuos Peligrosos Biológicos infecciosos; deberá procederse a su identificación y envasado, almacenamiento temporal, recolección y transporte externo, tratamiento y disposición final, de acuerdo a lo estipulado en esta norma vigente.

Por otra parte la investigación del área médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales. Estas normas están contenidas en la DECLARACION DE HELSINKI DE LA ASOCIACION MEDICA MUNDIAL (anexo 3), la cual también debe observarse al realizar esta práctica.

Preguntas

1. ¿Qué son las enzimas de restricción, cómo actúan?
2. Explica la nomenclatura que se utiliza para las enzimas de restricción
3. ¿En que consiste el RFLP?



PRACTICA No. 6
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis se define como el movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico. La movilidad de las partículas está determinada de forma proporcional al voltaje aplicado y la carga neta de la molécula y de forma inversamente proporcional a la fricción de la molécula; esta última depende de la forma y el tamaño de la misma. La relación entre estas variables está representada en la siguiente ecuación:

$$\text{Movilidad de la molécula} = \frac{(\text{voltaje aplicado})(\text{carga neta de la molécula})}{\text{Fricción de la molécula (forma y tamaño)}}$$

Durante una electroforesis el voltaje se mantiene constante por lo que la movilidad de la molécula dependerá de su carga, forma y tamaño: a mayor carga neta, la molécula migrará más rápido; a su vez, a mayor fricción, la movilidad será menor.

Las muestras de ADN pueden ser visualizadas por medio de geles no desnaturizantes de Acrilamida-bisacrilamida. Esta técnica permite la visualización de menores cantidades de ADN en comparación con los geles de agarosa, además de que el rango de separación es mayor y permite una mejor resolución entre fragmentos de peso molecular semejante.

Los geles de poliacrilamida constituyen un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas, dado que reúnen una serie de propiedades idóneas: transparencia, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos. La matriz de poliacrilamida se forma por copolimerización de dos compuestos, la acrilamida y la bis-acrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por la tetrametiletiléndiamina (TEMED) y el persulfato de amonio. El radical persulfato activa al TEMED, el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice. Las cadenas de poliacrilamida son entrecruzadas al azar por la bisacrilamida, formándose así una red de porosidad bastante uniforme, que puede ser

regulada variando las condiciones de la reacción y las concentraciones de los monómeros.

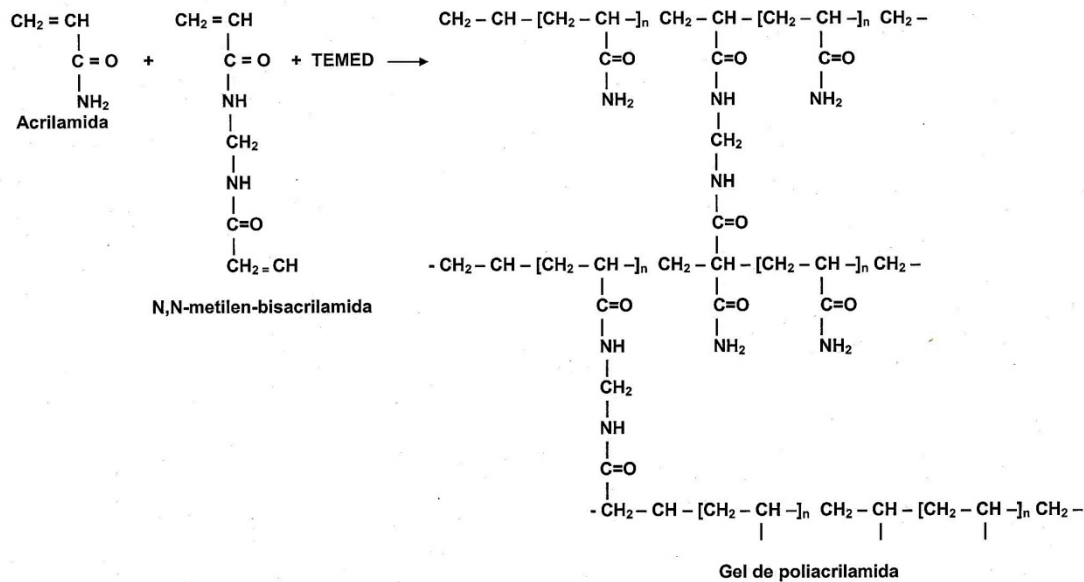


Figura 1. Esquema polimerización de la acrilamida

El equipo que se utiliza en la electroforesis de geles de poliacrilamida difiere del equipo utilizado en los geles de agarosa. Para los geles de PAGE se requiere de un equipo de electroforesis vertical que presenta dos reservorios separados para las soluciones de corrida, de un soporte para formar los geles, de separadores para los cristales en donde se polimerizan los geles y de peines que presentan un menor espesor que el que se utiliza en los geles de agarosa.

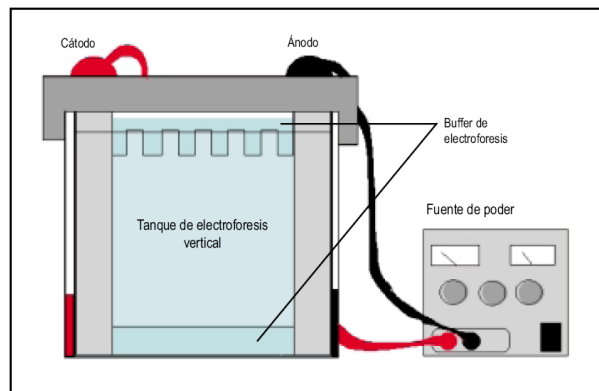


Figura 2. Sistema de electroforesis vertical ensamblado

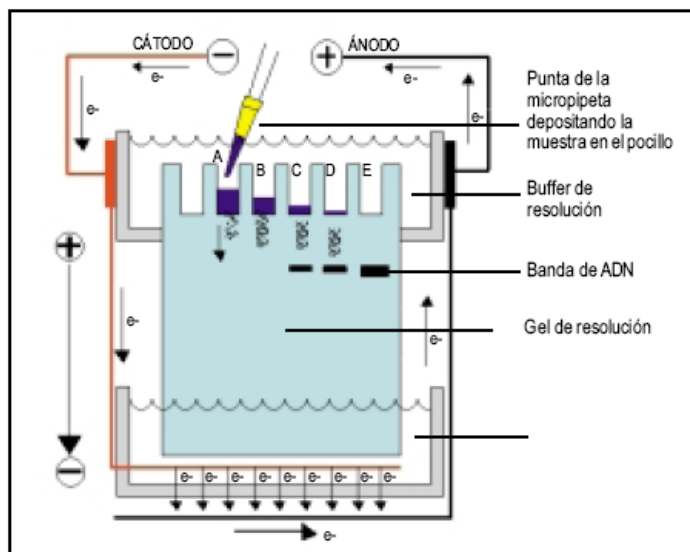


Figura 3. Interior de una cámara de electroforesis vertical para ADN en operación. A: Durante el depósito de la muestra de ADN mezclada con el buffer de muestra. B-D: Aplicación del voltaje y migración del ADN a través del gel poliacrilamida. E: Las moléculas de ADN se agrupan en la matriz formando una banda que puede ser visualizada por fluorescencia tificando el ADN con bromuro de etidio y aplicando luz ultravioleta.

Material

1. Matraz Erlenmeyer de 50 ml
2. Tubos de centrifuga de 50 ml, de polipropileno, fondo cónico
3. Bandejas de plástico para teñido

Reactivos

1. Solución de Acrilamida/bisacrilamida 29:1 (14)
2. Buffer TBE (Tris-borato-EDTA) 5x y 1X (11,12)
3. Persulfato de amonio al 10 %
4. TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametiletilendiamina)
5. Azul de bromofenol
6. Marcador de pb
7. Bromuro de etidio 10 μ g/ μ l

Nota: la acrilamida es **neurotóxica**. Al pesar el reactivo sólido debe usarse guantes y mascarilla. Limpie cualquier residuo de acrilamida en la balanza y sus alrededores, pues la inhalación es tan nociva como el contacto con la piel. Al preparar geles es necesario usar guantes e igualmente, limpiar cualquier derrame.

Los sobrantes de solución de monómeros no deben ser vertidos en el desagüe, es mejor polimerizarlos y descartarlos en forma de gel, ya que el polímero pierde la toxicidad.

Equipo

1. Cámara de electroforesis vertical con aditamentos y fuente de poder
2. Pipetas automáticas de 2 a 20 μ l, 200 a 1000 μ l
3. Transiluminador
4. Fotodocumentador

Muestras

Las obtenidas de la digestión con enzima de restricción en la práctica anterior.

Procedimiento

1. Colocar el soporte para preparar los geles sobre una superficie plana y ponerle las gomas de hule en la parte inferior. Los vidrios para preparar los geles deben limpiarse perfectamente con alcohol al 70 % y dejar secar.
2. Alinear los vidrios (uno grande y uno pequeño) y fijarlos dentro del marco correspondiente. Colocarlos en el soporte, alineándolos bien con la goma inferior.
3. Llenar el espacio de los geles con agua destilada para verificar que no haya fugas, en cuyo caso deberán armarse nuevamente. Eliminar el agua destilada.
4. Preparar una solución de poliacrilamida al 10 %. Para 9 ml de mezcla (cantidad suficiente para dos geles), añadir:

5.094 mL de agua destilada

2.997 mL de poliacrilamida 29:1

0.9 mL de TBE 5x

72 μ L de persulfato de amonio

9 μ L de TEMED

El TEMED, debe agregarse al final e inmediatamente después de adicionarlo, vaciar la mezcla en las placas previamente armadas para, al final, colocar los peines y dejar solidificar.

5. Retirar los peines, quitar los vidrios con geles del soporte y lavar los pozos con TBE 1X.

6. Hacer el montaje de los vidrios con los geles en el soporte de los electrodos, el vidrio pequeño debe ir hacia adentro. Inmediatamente deslizarlos dentro de la cámara, cuidando que queden bien alineados en la parte inferior y fijarla con los seguros. Llenar la cámara interior con TBE 1X
7. Preparar las muestras mezclando 10 μl de producto de restricción y 0.5 μl de azul de bromofenol. Colocarlas en los pozos. En uno de los pozos colocar 5 μl de marcador de pb
8. Colocar la cámara dentro del tanque y agregar un poco de buffer de corrida. Tapar el tanque, conectarla y encender la fuente de poder. Hacer el corrimiento a 80-100 volts durante aproximadamente 45 minutos.
9. Sacar los geles de la cámara de electroforesis y teñirlos colocándolos a temperatura ambiente durante 30 a 45 minutos en buffer TBE 1X adicionado de bromuro de etidio, a una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$.
10. Lavar el gel en agua destilada durante 5 minutos.
11. Visualizar los resultados en el transiluminador con luz ultravioleta, procediendo a digitalizar la imagen del gel.

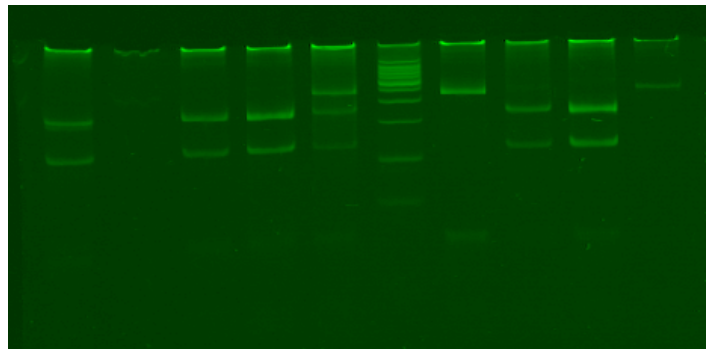


Figura 4. Ejemplo de corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida

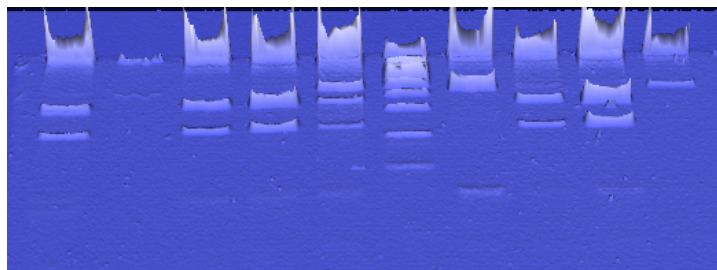


Figura 5. Vista en 3D de un corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida

Normas

Durante esta práctica se deberá observar la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 (anexo 1), ya que la sangre y sus componentes (en este caso la solución de ADN) están clasificados como Residuos Peligrosos Biológicos infecciosos; deberá procederse a su identificación y envasado, almacenamiento temporal, recolección y transporte externo, tratamiento y disposición final, de acuerdo a lo estipulado en esta norma vigente.

Por otra parte la investigación del área médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales. Estas normas están contenidas en la DECLARACION DE HELSINKI DE LA ASOCIACION MEDICA MUNDIAL (anexo 3), la cual también debe observarse al realizar esta práctica.

Preguntas

1. ¿Qué es la poliacrilamida?
2. ¿Cuál es la función del TEMED?
3. ¿En que casos es mejor utilizar geles de poliacrilamida y en cuáles de agarosa?
4. ¿Cómo se interpretan los resultados de esta electroforesis?

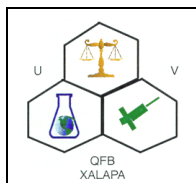
Bibliografía

1. SAMBROOK J Y RUSSELL DW (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed, Vols 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. TUSIÉ M, ZENTELLA A. Técnicas aplicadas al estudio del ADN. En Más J. Diagnóstico Molecular en Medicina. México: El Manual Moderno, S.A.; 2004. p. 48-69.
3. YERENA C, ET AL. Influencia del polimorfismo del CYP2E1 sobre el riesgo de intoxicación aguda por exposición a plaguicidas. Bioquímica 2005; 30:68-75.
4. ZAVALA J (2005) Manual de técnicas básicas de biología molecular, Universidad Autónoma de Yucatán
5. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. DoH Oct2008
6. Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo. Diario oficial. Lunes 17 de febrero de 2003.

4. ¿Qué función tiene la albúmina acetilada en esta reacción?
5. ¿Qué secuencia corta la enzima *DraI*?
6. ¿Qué es un sitio polimórfico?
7. ¿Qué importancia tiene determinar este genotipo?

Bibliografía

1. CHECA M. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 2007; 20(3): 213-221.
2. HARVEY F. Molecular cell biology. 5. ed.: - New York: W. H. Freeman and Co., 2003.
3. HU Y, OSCARSON M, JOHANSSON I, YUE QY, DAHL ML, TABONE M, ARINCÒ S, ALBANO E, INGELMAN-SUNDBERG M. Genetic polymorphism of human CYP2E1: Characterization of two variant alleles. Mol Pharmacol 1997; 51: 370-376.
4. QUIÑONES L, BERTHOU F, VARELA N, SIMON B, GIL L, LUCAS D. Ethnic susceptibility to lung cancer: differences in CYP2E1, CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms between French Caucasian and Chilean populations. Cancer Lett 1999; 141: 167-171
5. QUIÑONES L. Factores Genéticos en la Patogénesis. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Medwave. Año 2, No. 11, Edición Diciembre 2002.
6. SAMBROOK J Y RUSSELL DW (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed, Vols 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
7. TUSIÉ M, ZENTELLA A. Técnicas aplicadas al estudio del ADN. En Más J. Diagnóstico Molecular en Medicina. México: El Manual Moderno, S.A.; 2004. p. 48-69.
8. YERENA C, ET AL. Influencia del polimorfismo del CYP2E1 sobre el riesgo de intoxicación aguda por exposición a plaguicidas. Bioquímica 2005; 30:68-75.
9. ZAVALA J (2005) Manual de técnicas básicas de biología molecular, Universidad Autónoma de Yucatán
10. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. DoH Oct2008
11. Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo. Diario oficial. Lunes 17 de febrero de 2003.



PRACTICA No. 7

**EXTRACCIÓN DE ADN EN MUESTRAS DE SALIVA POR LA TÉCNICA DE
CHELEX**

Objetivo

Que el alumno aplique un método para la extracción de ADN en células del epitelio bucal contenidas en la saliva, con el fin de que desarrolle las habilidades necesarias para la obtención del ADN y comprenda su fundamento.

Sustento teórico

La efectividad en la aplicación de una reacción de amplificación de ADN o ARN depende principalmente de la calidad del material de partida para el análisis. En primer lugar es imprescindible la selección adecuada de la fuente del material genético del organismo a identificar.

El origen del material genético a evaluar puede ser variado. En el caso de bacterias y parásitos la fuente ideal es el cultivo del organismo. Sin embargo, no siempre es posible tener un cultivo por razones técnicas y/o biológicas, en consecuencia se debe obtener una muestra que contenga al microorganismo o su genoma, como muestras de suelos, biopsias, sangre, suero o saliva. Para el análisis de genotipos humanos en el diagnóstico de enfermedades hereditarias, determinación de filiación e investigaciones forenses, se aísla ADN a partir de muestras de sangre o de células fetales provenientes del líquido amniótico en el caso del diagnóstico prenatal. Sin embargo, la altísima sensibilidad de las técnicas de amplificación de ADN *in vitro* permiten ampliar la fuente del ADN a todo tipo de muestras que contengan células del individuo; células del epitelio bucal son utilizadas rutinariamente en el análisis de perfiles genéticos humanos.

Una vez seleccionada la fuente de ADN, la muestra debe ser sometida a un

proceso de extracción de ácidos nucleicos con el fin de preservarlos y evitar la acción degradativa de enzimas u otros compuestos presentes inicialmente en la misma; así como eliminar sustancias que interfieran o inhiban de alguna manera la reacción de amplificación. El protocolo de procesamiento previo de la muestra depende exclusivamente del tipo y origen de la misma, así como de la calidad del material que se desea obtener. En general, los métodos de preparación de muestras buscan degradar proteínas y extraer el ADN. Las proteínas son desnaturalizadas o degradadas enzimáticamente y posteriormente separadas de los ácidos nucleicos. Luego de descartar las proteínas, el ADN puede extraerse por separación del precipitado proteico o con extracción fenólica.

Obtención de ADN a partir de epitelio bucal

El epitelio bucal está en constante regeneración y sus células son reemplazadas continuamente. Aprovechando esta propiedad, este protocolo permite extraer ADN genómico de células provenientes la capa más superficial del epitelio estratificado que se desprenden y se encuentran en la saliva. La proteinasa K rompe enlaces peptídicos, lo que permite digerir las proteínas que se encuentren junto al ADN en el lisado celular.

El Chelex-100 es una resina que preferentemente captura iones metálicos polivalentes en soluciones. El efecto de esta sustancia es prevenir a través de su acción quelante la ruptura del ADN a altas temperaturas, catalizada por los iones involucrados en las muestras de trabajo.

Aspectos éticos

Es importante saber que, siempre que se trabaje con muestras de origen humano debe existir un Consentimiento Informado del sujeto al cual se le extrae la muestra. El Consentimiento Informado es un proceso mediante el cual un sujeto confirma voluntariamente su deseo de participar en un estudio en particular, después de haber sido informado sobre todos los aspectos de éste que sean relevantes para que tome la decisión de participar. El Consentimiento Informado se documenta por medio de

un formulario donde se registra por escrito la información del estudio y la manifiesta aceptación del individuo en participar, confirmando el conocimiento de su contenido. Este documento es firmado y registra la fecha de su elaboración.

Material

1. Recipientes herméticos de boca ancha
2. Vaso de precipitado
3. Tubos Eppendoff de 1.5 ml estériles
4. Guantes y cubrebocas
5. Una gradilla para tubos Eppendorf
6. Puntas para pipeta

Reactivos

1. Etanol al 100 %
2. Chelex al 10 %
3. Proteinasa K (20 mg/ml)
4. Isopropanol absoluto
5. Etanol al 70 %
6. Solución amortiguadora TE (Tris-HCl pH 8.0 10 mM, EDTA pH 8.0 1 mM)
7. Agua desionizada estéril (Milli Q)

Equipo

1. Parrilla
2. Baño de agua con control de temperatura, termoblock o estufa
3. Pipetas automáticas de 2 a 20 μ l, 20-200 μ l, 200 a 1000 μ l
4. Espectrofotómetro UV-Vis
5. Centrífuga refrigerada con velocidad hasta 14,000 rpm y cabezal para tubos Eppendorf
6. Microcentrífuga
7. Vortex

Procedimiento

1. Recolectar una muestra de saliva escupiendo tres veces en un recipiente de boca ancha. Adicionar a la muestra de saliva aproximadamente 1 ml de etanol al 100%, mezclar suavemente y pasar a un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
2. Centrifugar a 14,000 rpm. por 3 min. y eliminar el sobrenadante.
3. Con una punta azul para micropeta, a la que se le ha recortado aproximadamente 0.5 cm de la punta, adicionar 200 μ l de perlas de Chelex al 10%, de tal forma que cubran totalmente el botón de las células.
4. Agregar 2 μ l de proteinasa K (20mg/dl).
5. Agitar suavemente con vortex.
6. Incubar a 56°C por un mínimo de 30 minutos. En caso de que no se haya digerido la muestra agitar con vortex y volver a incubar por 15 a 30 minutos más.
7. Agitar con vortex y centrifugar a 14,000 rpm por 3 minutos.
8. Incubar en agua hirviendo por 8 minutos.
9. Centrifugar a 14,000 rpm por 3 minutos.
10. Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5 ml adicionándole 300 μ l de isopropanol frío a cada muestra, mezclar bien e incubar a -20° C ó -70°C durante 1 hora.
11. Centrifugar los tubos durante 20 min. a 13,000 rpm a una temperatura de 4° C
12. Desechar el sobrenadante y lavar el botón de ADN con etanol al 70% dos veces centrifugando 5 min. a 13,000 rpm en cada lavado.
13. Secar el botón y resuspenderlo en 100-300 μ L de solución amortiguadora TE o Agua MiliQ incubándolo a 37° C por una hora, sacar y conservar a 4°C.
14. Hacer la cuantificación del DNA obtenido de la misma manera que para el DNA sanguíneo.

Normas

Durante esta práctica se deberá observar la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 (anexo 1), ya que la sangre y sus componentes (en este caso la solución de ADN) están clasificados como Residuos Peligrosos Biológicos infecciosos; deberá procederse a su identificación y envasado, almacenamiento

temporal, recolección y transporte externo, tratamiento y disposición final, de acuerdo a lo estipulado en esta norma vigente.

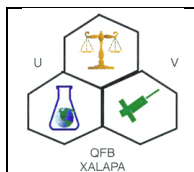
Por otra parte la investigación del área médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales. Estas normas están contenidas en la DECLARACION DE HELSINKI DE LA ASOCIACION MEDICA MUNDIAL (anexo 3), la cual también debe observarse al realizar esta práctica.

Preguntas

1. Al realizar la recolección de la muestra ¿cuál es la función del etanol?
2. ¿Qué es el Chelex, cómo actúa?
3. ¿Cuál es la función de la incubación a altas temperaturas?
4. ¿Para que se agrega la proteinasa?
5. Compara los pasos y reactivos utilizados en el aislamiento de ADN en sangre (Práctica 1) y los empleados en esta práctica ¿Qué diferencias y similitudes observas?

BIBLIOGRAFÍA

1. SAMBROOK J Y RUSSELL DW (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed, Vols 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. TUSIÉ M, ZENTELLA A. Técnicas aplicadas al estudio del ADN. En Más J. Diagnóstico Molecular en Medicina. México: El Manual Moderno, S.A.; 2004. p. 48-69.
3. ZAVALA J (2005) Manual de técnicas básicas de biología molecular, Universidad Autónoma de Yucatán
4. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. DoH Oct2008
5. Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo. Diario oficial. Lunes 17 de febrero de 2003.



UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA

PRACTICA No. 8

Determinación del alelo mutado *2 del CYP2D6 mediante PCR tetraprimer

Objetivo

Que el alumno aplique la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en su variante tetraprimer para la identificación de la presencia del alelo mutado *2 del CYP2D6.

Sustento teórico

El citocromo P450 constituye una superfamilia de enzimas involucradas en el metabolismo oxidativo de compuestos endógenos como: esteroides, ácidos grasos o vitaminas liposolubles (A y D), y en el metabolismo de xenobióticos entre los que se encuentran drogas muy diversas, carcinógenos, pesticidas, alcaloides, etc.

En el caso concreto del hombre, se han secuenciado 57 genes y 47 pseudogenes pertenecientes a 18 familias de esta enzima. Los pseudogenes son genes defectivos que no originan proteínas funcionales y que se consideran como una reminiscencia de duplicaciones de genes en los que una de las copias ha degenerado y perdido su función.

Entre los múltiples miembros de la superfamilia del citocromo P450, se considera que varias enzimas de las familias CYP2 y CYP3 tienen una importancia particularmente importante en el metabolismo de los fármacos. Cada una tiene características diferentes que determinan si el análisis de variaciones puede ofrecer un beneficio clínico, ayudando a la selección del tratamiento o de las dosis adecuadas.

La familia 2 del CYP450 comprende al menos cinco subfamilias. Originalmente se la conocía como "familia inducible por fenorbital", sin embargo se ha comprobado que la mayoría de los genes inducidos por este compuesto principalmente se encuentran en las subfamilias 2B y 2C. En la subfamilia 2D a la fecha, sólo se ha

encontrado la enzima CYP2D6, la cual se expresa en el hígado principalmente y no es posible inducir su producción (Santiago et al., 2002; Ruiz, 2008).

Características generales de CYP2D6

Es un polipeptido de 497 aminoácidos, su papel en el metabolismo de fármacos es muy amplio. Los sustratos de esta isoenzima son bases lipofílicas con un átomo de nitrógeno protonado. La reacción de hidroxilación se lleva a cabo a una distancia de 5 a 7 Å del átomo de nitrógeno. Tiene gran afinidad por los alcaloides, y la expresión de esta isoenzima a diferencia de otras CYP no es regulada por hormonas (Ingelman-Sonberg, 2004).

Su estructura se ha definido muy bien utilizando cristalografía de rayos X. Se demostró que el sitio de actividad se localiza por encima de la cavidad del grupo hemo, y contiene muchos residuos importantes que se ven implicados en el reconocimiento y unión del sustrato, incluyendo Asp-310, Glu-216, Phe-483 y Phe-120. La estructura cristalina ayuda a explicar como Asp-301, Glu-216 y Phe-483 actúan como sustrato uniendo los residuos, y sugiriendo el papel de Phe-120 que controla la orientación del anillo aromático que se presenta en la mayoría de los sustratos con respecto al grupo hemo.

Estructura del gen CYP2D6

El gen de CYP2D6 se localiza en el cromosoma 22q13.1 al final de CYP2 en dirección 3', cerca de los pseudogenes CYP2D8P y CYP2D7P. Hasta la fecha se han descrito más de 70 variantes, diferenciándose unas de otras por un cambio en la secuencia de bases, inserciones cortas y deleciones, o por grandes reordenamientos como deleciones y duplicaciones de todo el gen. Tiene un tamaño de 14,724 bases y esta conformado por 9 exones (Figura 3.).

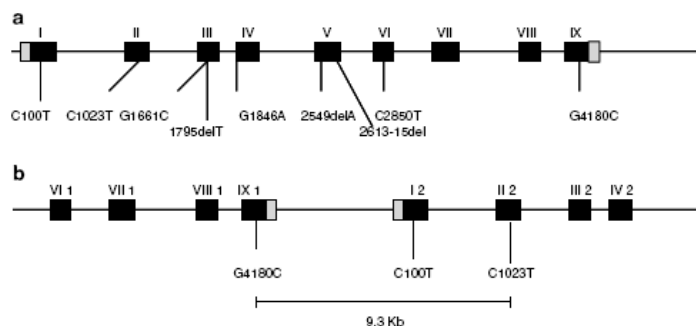


Figura 1. Estructura del gen CYP2D6. (a) representación esquemática de una región del cromosoma 22 con una duplicación de CYP2D6; (b) las cajas negras representan los exones.

Polimorfismos de CYP2D6

Estas variantes, como ya se mencionó líneas arriba, resultan de mutaciones puntuales, deleciones o adiciones, reordenamientos de genes y supresión o duplicación de la totalidad de genes; en consecuencia, hay un aumento, reducción o pérdida total de su actividad. Por otra parte, se ha observado que distintas alteraciones del gen CYP estarían involucradas en la aparición de efectos colaterales, incompatibilidad y/o variación en la eficacia terapéutica de más de 30 compuestos farmacéuticos.

La subfamilia CYP2D presenta un gen único y cuatro pseudogenes. El polimorfismo CYP2D6 fue el primer alelo asociado con un defecto en el metabolismo de drogas y que se relacionó específicamente con una alteración en la expresión de un CYP. CYP2D6 representa aproximadamente el 2% del total del contenido hepático, aunque también se expresa en duodeno y cerebro. (Santiago et al., 2002).

CYP2D6 muestra variabilidad interindividual que, en consecuencia, ha originado que las poblaciones se hayan dividido en diferentes fenotipos de acuerdo a la capacidad que presentan para metabolizar los fármacos (Figura 4), y se clasifican en: Metabolizador Pobre (MP), Intermedio (MI), Rápido (MR) y Ultrarrápido (MUR) (Ruiz W, 2008).

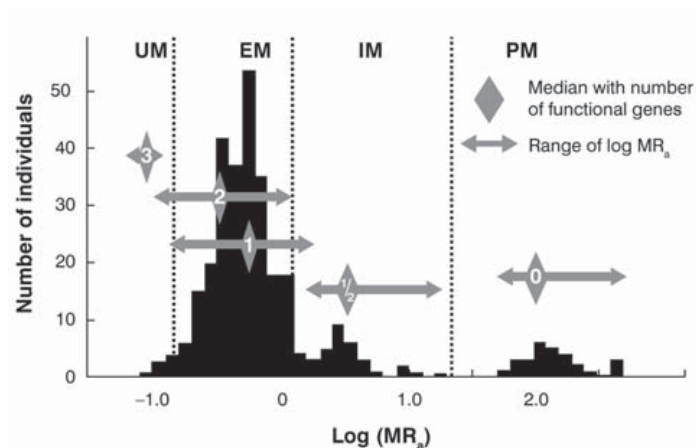


Figura 2. Fenotipos de CYP2D6 Tomada de Bernard et al., 2006

El fenotipo del MR es el que se expresa mayoritariamente, por lo que se le ha considerado “normal.” El fenotipo del ML tiene deficiencias en los dos alelos de la isoenzima CYP2D6, como resultado metaboliza los fármacos a un ritmo más lento; lo anterior conduce a que se acumulen niveles altos de fármaco no metabolizado, los cuales son sustratos de CYP2D6, esto genera una incidencia mayor para eventos adversos e interacciones medicamento-medicamento y una baja afinidad del fármaco para activar CYP2D6.

El fenotipo MUR es causado por la duplicación, multiplicación o amplificación de genes CYP2D6 activos principalmente el alelo CYP2D6*2, y también entre otros incluye CYP2D6*1. Individuos con este fenotipo pueden dar lugar a una pérdida de la eficacia terapéutica a una dosis estándar, por lo que requerirán dosis más altas para conseguir el efecto terapéutico.

Las personas que son heterocigotos para un defecto del alelo CYP2D6 a menudo muestran un fenotipo de MI; este fenotipo tiene un espectro de actividad metabólica amplio que puede ir desde MI hasta MR. Para establecer que fenotipo tiene cada individuo, se administra un fármaco sonda que será un sustrato para CYP 2D6 y que permite medir el metabolito.

CYP2D6*2

Se han encontrado numerosos subtipos de CYP2D6 en los diversos estudios del alelo *2, el cual no retarda la actividad catalítica para los sustratos típicos de CYP2D6,

incluyendo debrisoquina, esparteína y dextrometorfano, pero se han encontrado numerosas variantes que se deben a la sustitución de dos aminoácidos (R296C y S486T). La identificación del alelo *2 es complicada debido a la gran variación que hay de este, por ello se han investigado cuidadosamente las sustituciones, adiciones e inserciones en este alelo. En esta práctica se determina la mutación C2938T, localizada en el exón 5.

Técnicas utilizadas para la identificación del polimorfismo del CYP2D6

Bodin y colaboradores utilizaron la PCR en tiempo real dúplex para la determinación de CYP2D6; inicialmente probaron TaqMan MGB para mejorar la especificidad de la reacción, y posteriormente utilizaron el método dúplex para la coamplificación de CYP2D6 y un gen de referencia al mismo tiempo, con lo cual se aumenta la reproducibilidad y se disminuye el costo del análisis.

En los estudios de Guerrero y colaboradores se utilizó la técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que consiste en PCRs anidadas y el análisis posterior de los fragmentos de restricción de longitud variable utilizando enzimas de restricción.

Otra técnica para la detección de mutaciones específicas dentro de un gen de interés, es a través de la amplificación por PCR - alelo específico, en la cual los oligonucleótidos que se utilizan en reacciones en paralelo son específicos para hibridar con las variantes de los alelos. En este caso solo los oligonucleótidos que se hibridan con la secuencia objetivo producen una amplificación.

PCR tetra primer

Esta técnica utiliza un juego de 4 oligonucleótidos (primers) en una sola reacción de PCR para hacer la diferenciación de los alelos y sus genotipos (homocigotos y heterocigotos). La amplificación de los 2 alelos específicos tiene lugar en dirección opuesta con un primer exterior y otro interior. Cada primer interno se une específicamente con cada uno de los alelos con SNP e incluye un desfase en la posición 2 en la dirección 3'. Esta metodología permite la amplificación de alelos específicos y marcadores codominantes que son aplicables a progenies largas. Los marcadores codominantes están encargados de la amplificación específica de alelos

recesivos heterocigotos, los cuales no pueden ser amplificados con otras técnicas (Rubio et al., 2008).

Esta técnica permite amplificar simultáneamente múltiples segmentos de ADN y ha sido una de la más empleada para la identificación de CYP2D6.

Micromatrices

DNA-chips, chips genéticos o biochips. Genéricamente todos son denominados micromatrices o *microarrays* (MA) y pueden ser acondicionados sobre membranas, vidrios o superficies sólidas no porosas. Existen marcas registradas que utilizan bases de geles acuosos 3D, asegurando que este medio permite la interacción máxima entre las fases reactivas. Cada uno de los soportes descritos admite distinto número de coordenadas (grillas) y en consecuencia de zonas de reacción.

Las secuencias a analizar, que actúan como sondas, hibridizan en forma específica con las bases complementarias fijadas en el soporte y deben llevar una marca fluorescente o radioactiva antes de ser aplicadas a la superficie de la matriz. Generalmente se utilizan como sondas gADN, cADN o ARN, aunque también es posible aplicar esta nanotecnología al estudio de la expresión de proteínas.

En esta práctica utilizará una PCR tetraprimer que utiliza un juego de 4 oligonucleótidos (primers) en una sola reacción, para hacer la diferenciación de los alelos y sus genotipos (homocigotos y heterocigotos). Se amplificará una región específica del gen *CYP2D6*, localizada en el exón 5, que genera un fragmento de 1106 pb (primers 3 y 4new) que sirve como control interno de la calidad de la PCR, a la vez de ser utilizado como templado para la amplificación alelo específica subsecuente. Para ésta etapa se utilizarán los primer's U2wt y L2mut, los cuales producen un fragmento de 854 pb para el alelo *2 (C2938T) y uno de 281 pb para el alelo silvestre (*1), de acuerdo al método descrito por Hersberger (2000).

Material

1. Tubos Eppendoff de 0.65 ml estériles
2. Puntas para micropipeta estériles
3. Baño de hielo

4. Papel Parafilm
5. Pipetas automáticas de 0.1 a 2.5 μ l, 2 a 20 μ l, 20-200 μ l, 200 a 1000 μ l
6. Papel de aluminio
7. Espátula de plástico

Reactivos

1. Equipo de reactivos para PCR
2. Primers:

Primer 3:	5' GCG GAG CGA GAG ACC GAG GA ^{3'}
Primer 4 new:	5' GGTCCGGCCCTGACACTCCTTCT ^{3'}
Primer U2 wt:	5' AAT GAT GAG AAC CTC C ^{3'}
Primer L2 mut:	5' GCC ACC ACT ATG CA ^{3'}

3. Agua inyectable estéril
4. Agarosa
5. TAE 1X
6. Azul de bromofenol
7. Bromuro de etidio 10 μ g/ μ l
8. Marcador de 100 pares de bases

Equipo

1. Termociclador
2. Transiluminador
3. Fotodocumentador
4. Microcentrífuga
5. Vortex
6. Balanza analítica
7. Horno de microondas
8. Cámara de electroforesis vertical con fuente de poder

Procedimiento

En baño de hielo, preparar una mezcla de reactivos (pool) de acuerdo al número de muestras a trabajar, considerando que para cada muestra se requieren las siguientes cantidades de reactivos:

Componente	Volumen	Concentración final
Solución de MgCl ₂ 25 mM	1.2 µl	1.5 mM
Solución buffer 10 X libre de MgCl ₂	2.0 µl	1.0X
Mezcla de nucleótidos para PCR (10 mM cada uno)	0.4 µl	200 µM cada uno
Primer 3	0.8 µl	0.8 µM
Primer 4new	0.8 µl	0.8 µM
Primer U2 wt	1.2 µl	1.2 µM
Primer L2 mut	1.2 µl	1.2 µM
Taq polimerasa	0.15 µl	1.25 u
ADN molde	variable	0.5 a 1 µg
Agua libre de nucleasas para un volumen final de	20 µl	

En un microtubo de 0.65 ml colocar el pool de reactivos y el ADN molde, mezclando bien con la misma pipeta. Colocarlo en el termociclador bajo el siguiente programa:

1. 10 minutos a 94° C Desnaturalización del ADN

PRIMERA SERIE DE 20 CICLOS

2. 30 segundos a 94° C Desnaturalización final
3. 30 segundos a 63° C Alineación
4. 60 segundos a 72° C Elongación de la cadena

SEGUNDA SERIE DE 27 CICLOS

5. 30 segundos a 94° C Desnaturalización final
6. 30 segundos a 46° C Alineación
7. 60 segundos a 72° C Elongación de la cadena
8. 7 minutos a 72°C Elongación final
9. ∞ 4°C

Una vez terminada la reacción llevar a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida con los productos de PCR obtenidos, tal como se describe en la práctica No. 6, colocando en el primer pozo el marcador de pares de bases.

Observar los resultados y hacer su interpretación.

Normas

Durante esta práctica se deberá observar la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 (anexo 1), ya que la sangre y sus componentes (en este caso la solución de ADN) están clasificados como Residuos Peligrosos Biológicos infecciosos; deberá procederse a su identificación y envasado, almacenamiento temporal, recolección y transporte externo, tratamiento y disposición final, de acuerdo a lo estipulado en esta norma vigente.

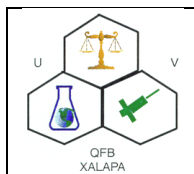
Por otra parte la investigación del área médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales. Estas normas están contenidas en la DECLARACION DE HELSINKI DE LA ASOCIACION MEDICA MUNDIAL (anexo 3), la cual también debe observarse al realizar esta práctica.

Preguntas:

1. ¿Qué es la farmacogenómica?
2. ¿Qué importancia tiene el CYP2D6 dentro de la farmacogenómica?
3. ¿A que se refiere el término de metabolizador pobre o lento?
4. ¿Cuál es la diferencia entre una PCR simple y una tetraprimer?
5. ¿Por qué en esta práctica se deben realizar dos series de ciclos?
6. En esta práctica ¿cómo se diferencia un homocigoto silvestre de un homocigoto mutado y de un heterocigoto?

Bibliografía

1. ARAYNE SM, SULTANA N, BIBI Z. Role of cytochrome P450 in drug interactions. *Nutrition & Metabolism* 2008; 5: 27.
2. HERSBERGER M, MARTI-JAUN J, RENTSCH K, HÄNSELER E. Rapid Detection of hte CYP2D6*3, CYP2D6*4, and CYP2D6*6 Alleles by Tetra-Primer PCR and of the CYP2D6*5 Allele by Multiplex Long PCR. *Clinical Chemeistry* 2000; 46: 1072-1077.
3. INGELMAN-SUNDBERG M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *The Pharmacogenomics Journal* 2005; 5: 6–13.
4. SANTIAGO C, BANDRÉS F, GÓMEZ-GALLEGO F. Polimorfismos De Citocromo P450: Papel Como Marcador Biológico. *Medicina del Trabajo* 2002; 11: 130-140.
5. RUÍZ WILSON M. Polimorfismos del gen CYP2D6: pequeños cambios, grandes consecuencias. *Infórmate* 2008; 3: 1-5.
6. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. DoH Oct2008
7. Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo. Diario oficial. Lunes 17 de febrero de 2003.



PRACTICA No. 9

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN EN MUESTRAS ENDOCERVICALES

Objetivo

Que el alumno lleve a cabo la metodología para la obtención de ADN en muestras de células endocervicales, con el fin de utilizarlo para el diagnóstico molecular del virus del papiloma humano (VPH).

Sustento teórico

Comparando la precisión diagnóstica de los estudios citológicos e histológicos con los resultados obtenidos con las técnicas de detección de Biología Molecular, hoy sabemos que el diagnóstico microscópico de infección por el VPH es altamente específico, aunque no muy sensible (Baleriola *et al.*, 2008; Sumalee *et al.*, 2008).

Diagnóstico Citológico

El frotis citológico PAP, es una técnica de tinción aplicada para la observación morfológica de células recolectadas del cuello uterino y la vagina. Esta prueba puede mostrar la presencia de infección, inflamación, células anormales, o cáncer. Esta técnica fue propuesta en 1942 por George Nicholas Papanicolaou, de ahí su nombre, y es el método utilizado más ampliamente para la detección oportuna de cáncer. Tomando en cuenta la multifocalidad de las infecciones por VPH, el frotis es superior a la biopsia porque permite el estudio de grandes áreas del mismo sitio en una sola muestra. Además, puede estudiar al mismo tiempo órganos múltiples del aparato genital y no necesita técnicas de fijación o tinción especiales.

El segundo método utilizado en casos donde el PAP haya salido con morfología anormal es la colposcopia. La colposcopia debe efectuarse posterior a una citología anormal. La biopsia está dirigida para el diagnóstico histológico confirmatorio, así como en la visualización de la extensión de la enfermedad. La colposcopia es útil para

determinar la extensión y localización de la enfermedad, evaluar la zona de transformación, permitir la toma de muestra por biopsia con mayor efectividad para el diagnóstico histológico y dar seguimiento a las lesiones intraepiteliales escamosas tratadas previamente, pero tiene poca efectividad en lesiones endocervicales. Su ventaja es que es muy económico y rápido. Pero tiene una gran desventaja, se necesita suficiente experiencia por parte del que analiza los tejidos, ya que la interpretación del resultado dependerá de lo que se observe bajo el microscopio, por lo que tiene un bajo porcentaje de confiabilidad y no es sensible (Tirrell Martin, 2008).

Diagnóstico Molecular del VPH

La biología molecular proporciona hoy en día herramientas básicas para estudiar los genes implicados en los patrones de progresión del cáncer y en la supresión tumoral. El mejor conocimiento de los procesos que gobiernan el crecimiento y la diferenciación celulares ha revolucionado el diagnóstico de las neoplasias malignas. Para hacer uso de las herramientas de biología molecular es necesaria la extracción de ADN o ARN en su caso.

Anteriormente en todo el mundo se llevo a cabo un periodo fijo de vigilancia de mujeres por medio de un tamizaje de citología cervical basado en la tinción de células epiteliales (Papanicolaou), o citología de base líquida constituyendo uno de los más exitosos programas de tamizaje de cáncer. Sin embargo, por falta de sensibilidad de la citología cervical, además de la falta de consenso internacional con respecto a la sensibilidad de la citología clásica para la detección de áreas histológicas sospechosas, han sido introducidas nuevas estrategias de análisis basadas en técnicas de la biología molecular aplicadas a la identificación de VPH para la detección de CaCu (Koidl C. *et al.*, 2008).

Extracción de ADN

El procedimiento básico de la extracción del ADN puede dividirse en 5 pasos, algunos se utilizan simultáneamente dependiendo del protocolo a utilizar.

1. Ruptura de las células:

- a) Detergentes: Los detergentes aniónicos se utilizan básicamente para extraer ADN de parásitos, células en cultivo y tejido, siendo el dodesil sulfato de sodio (SDS) uno de los más usados para la ruptura de la membrana celular.
 - b) Enzimas: Se utilizan especialmente para la extracción de ADN bacteriano, total o plasmídico, siendo la lisozima la enzima de elección. La lisozima actúa desestabilizando la pared celular de las bacterias Gram negativas, ya que rompe las uniones glucosídicas entre los polisacáridos N-acetil (NAG) y el ácido N-acetilmurámico (NAM).
 - c) Agentes desnaturalizantes: Se utilizan para extraer ADN de diferentes tipos celulares y tejidos, siendo el cloruro de guanidina uno de los más empleados.
2. Eliminación de proteínas:

Se lleva a cabo mediante el uso de enzimas proteolíticas tales como la proteinasa K. algunos protocolos de extracción realizan la lisis con detergentes como el SDS en presencia de la proteinasa K en un solo paso. Adicionalmente la digestión se acompaña del uso de sal disódica del ácido etilén-diamino-tetraacético (EDTA) para inhibir la acción de las DNAsas.
 3. Eliminación de ARN: Se realiza mediante la digestión de ARN con ARNasas como la ribonucleasa A de páncreas de bovino. Este paso en algunos protocolos se lleva a cabo después de la extracción del ADN.
 4. Eliminación de proteínas: la desproteinización se lleva a cabo con solventes orgánicos tales como el fenol y el cloroformo, los cuales tienen la propiedad de desnaturalizar las proteínas. El fenol debe ser bidestilado, equilibrado y protegido contra la oxidación mediante la adición de 8-hidroxiquinolina. Por su parte, al cloroformo se le adiciona alcohol isoamílico en proporción 24:1 volumen a volumen (v: v) con el fin de prevenir la producción de espuma y facilitar la separación de las fases acuosas y orgánicas. Estos solventes se utilizan en una relación de 1:1 (v: v) de la muestra que se pretende limpiar, quedando las proteínas desnaturalizadas en la interfase y el ADN en la fase acuosa. Generalmente se recomienda realizar la extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y, finalmente, una última extracción con cloroformo-alcohol isoamílico para limpiar toda traza de fenol.
 5. Concentración del ADN

Se logra mediante la precipitación con etanol en presencia de cationes monovalentes en concentraciones desde 0.1 a 0.5 M. el etanol en la presencia de estos cationes induce un cambio estructural en el ADN que causa la agregación y precipitación del mismo. Adicionalmente, con este tratamiento se remueven los residuos de fenol y cloroformo del paso anterior. Entre las sales más utilizadas se encuentran el acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de amonio y cloruro de litio.

El procedimiento de extracción de ADN a partir de muestras biológicas tiene un impacto significativo sobre la sensibilidad y reproducibilidad de la prueba de diagnóstico molecular. En la actualidad existen kits comerciales de extracción de ADN o el total de los ácidos nucleicos los cuales son utilizados para remover proteínas y otras sustancias inhibitorias de las muestras (Dauphin LA et al., 2008).

Material

1. Material necesario para recolección de muestras biológicas endocervicales:
cepillos citrobrush
2. Aplicadores de madera
3. Guantes y cubrebocas
4. Tubos Eppendoff de 1.5 ml

Reactivos

1. Solución amortiguadora salina homogenizada estéril (0.4M NaCl, 10mM tris-HCl pH 8 y 2mM EDTA pH 8.0).
2. SDS al 20 %
3. NaCl 6 M
4. Proteinasa K 20mg/ml.
5. Isopropanol absoluto
6. Etanol al 70 %
7. Solución amortiguadora TE (Tris-HCl pH 8.0 10 mM, EDTA pH 8.0 1 mM)

Equipo

1. Centrífuga refrigerada con velocidad hasta 14,000 rpm y cabezales múltiples.
2. Rotor
3. Vortex
4. Baño de agua con control de temperatura
5. Pipetas automáticas de 0 a 20 μ l, 20-200 μ l, 200 a 1000 μ l
6. Espectrofotómetro UV-Vis

Procedimiento

1. Con ayuda de aplicadores de madera, despegar del cepillo el material obtenido y pasarlo a un tubo Eppendorf de 1.5 ml
2. Centrifugar durante 10 minutos a 4,500 rpm y a 4°C. Decantar el sobrenadante.
3. Adicionar al material biológico proveniente de endocérvix 400 μ l de solución amortiguadora salina homogenizada estéril (0.4M NaCl, 10mM tris-HCl pH 8 y 2mM EDTA pH 8.0), mezclando de 10 – 15 seg.
4. Agregar 80 μ L de SDS al 10% (concentración final 2%) y 8 μ L de proteinasa K 20mg/ml (concentración final 400 μ g/ml); mezclar bien e incubar a 55-65° C por 1 hora.
5. Adicionar 300 μ L de NaCl 6 M (NaCl saturado en agua), mezclar en vortex 30 segundos a la máxima velocidad y centrifugar a 13,000 rpm durante 30 min.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 ml adicionándole el mismo volumen de isopropanol a cada muestra, mezclar bien e incubar a -20° C durante 1 hora.
7. Centrifugar los tubos durante 20 min. a 13,000 rpm a 4° C
8. Desechar el sobrenadante y lavar el botón de DNA con etanol al 70% dos veces centrifugando 5 min. a 10,000 rpm. durante cada lavado.
9. Secar el botón y resuspenderlo en 100-300 μ L de solución amortiguadora TE incubándolo a 37° C por una hora.
10. La solución de ADN obtenida se conserva a 4°C.
11. Hacer la cuantificación del DNA obtenido de la misma manera que para el DNA sanguíneo.

Normas

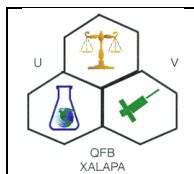
Durante esta práctica se deberá observar la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 (anexo 1), ya que las muestras endocervicales están clasificadas como Residuos Peligrosos Biológicos infecciosos; deberá procederse a su identificación y envasado, almacenamiento temporal, recolección y transporte externo, tratamiento y disposición final, de acuerdo a lo estipulado en esta norma vigente.

Preguntas

1. ¿Qué precauciones deben tenerse al tomar la muestra para obtener resultados confiables?
2. ¿Cuál es la función del SDS en esta práctica?
3. ¿Para que se agrega la proteinasa K?
4. ¿Por qué es necesario lavar el ADN obtenido con etanol al 70 %?
5. ¿Cuál es la composición del buffer TE?

Bibliografía

1. Baleriola C. et al., "Comparison of a novel HPV test with the hybrid capture II (hc II) and reference PCR method shows high specificity and positive predictive value for 13 high - risk human papillomavirus infections. J of Clin Virol, 2008.
2. [Dauphin LA, Moser BD, Bowen MD](#). Evaluation of five commercial nucleic acid extraction kits for their ability to inactivate Bacillus anthracis spores and comparison of DNA yields from spores and spiked environmental samples. J Microbiol Methods. 2008 Sep 13. [Epub ahead of print] PMID: 18824041 [PubMed - as supplied by publisher]
3. Koidl C, Bozic M, Hadzisejdic I, Grahovac M, Grahovac B, Kranewitter W, Marth E, Kessler HH. Comparison of molecular assays for detection and typing of human papillomavirus. Am J Obstet Gynecol. 2008 Aug;199(2):144.e1-6.
4. Sumalee Siriaunkgul et al. HPV genotyping in cervical cancer in Notherm Thailand Adapting the liner array HPV assay for use on paraffin - embedded tissue. Gynecologic Oncology, 2008; 108: Pp. 555-60.
5. Tirell Martin J. Do women comply with recomendations for PAP smears following colposcopy? A retrospective study. J. Mid Womens Health, 2008; Vol. 53: Pp. 138-142.
6. ZAVALA J (2005) Manual de técnicas básicas de biología molecular, Universidad Autónoma de Yucatán
7. Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo. Diario oficial. Lunes 17 de febrero de 2003.



PRACTICA No. 10

Detección de Virus de Papiloma Humano en muestras endocervicales

Objetivo

Que el alumno aplique la reacción en cadena de la polimerasa para la determinación de la presencia del virus del papiloma humano en muestras de tejido endocervical.

Sustento teórico

El Virus del papiloma humano (VPH) constituye el agente etiológico de transmisión sexual más frecuente del mundo. Actualmente la evidencia epidemiológica relaciona al VPH con el cáncer del cérvix. Por ello el estudio de los papilomavirus humanos (VPHs) es de enorme importancia médica ya que se encuentran presentes en más del 90% de los tumores genitales malignos asociados a CaCu, ocupando el primer lugar en incidencia y mortalidad en la mujer mexicana (Lazcano-Ponce *et al.*, 2001).

El cáncer invasor del cuello del útero (CaCu) es un problema de salud pública, se estima que cada año se diagnostican 500 000 casos nuevos en el mundo, es responsable de 275 000 muertes anuales, de las cuales 78% ocurren en los países en desarrollo, donde es la causa principal de muerte por cáncer en mujeres (Schiffman *et al.*, 2007; Bosch FX 2003, 2008). Son los países latinoamericanos los que informan las tasas de incidencia más altas. Dentro de éstos, México ocupa el primer lugar de mortalidad por esta enfermedad (Carrillo *et al.*, 2004).

En México una de cada 10 mujeres es portadora del VPH, según estadísticas del Instituto Nacional de Cancerología de la SSA. En los análisis de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se indica que desde la edad madura hasta la vejez, una de las principales causas de muerte en las mujeres es el cáncer, y las cardiopatías en los hombres. Asimismo, dentro del grupo de tumores malignos que afectan a ambos sexos, el cáncer de pulmón, tráquea y bronquios, tiene mayor incidencia en los varones y, los de tipo ginecológico, en la población femenina (INEGI: 2005).

El virus de Papiloma humano (VPH) es un grupo de virus que infecta epitelios y mucosas del ser humano y se clasifica en tipos de acuerdo con homologías en su material genético. En la actualidad, se reconocen más de 230 tipos diferentes (Fuessel Haws *et al.*, 2004). Por los trabajos de Muñoz *et al.*, 2003 se conocen distintos genotipos del VPH. Un total de 15 fueron clasificados en tipos de alto riesgo oncogénico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82); 3 de probable alto riesgo oncogénico (26, 53 y 66), y 12 de bajo riesgo oncogénico (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y 88).

La infección por VPH tiene su iniciación en las células basales del epitelio estratificado escamoso, donde a partir de la combinación de factores celulares en combinación con la región reguladora no codificante, se inicia la transcripción de los oncogenes E6 y E7 (Tomison *et al.*, 2008).

El VPH infecta la capa basal del tejido epidérmico y el virus experimenta tres etapas. Dentro de la capa basal y la primer capa suprabasal epidermal, el DNA viral es propagado hasta que haya cerca de 50-100 copias en cada célula. Durante la segunda etapa, la etapa de mantenimiento, la replicación viral es llevada a cabo en sincronía con el ciclo celular de la célula huésped, solo ocurre en la fase S del ciclo celular de la célula huésped. Tanto en la primera como en esta segunda etapa el ADN del HPV se mantiene como un plásmido episomal en el núcleo de las células infectadas. La tercera y etapa final, es el estado vegetativo de la replicación viral, la etapa vegetativa solo se desarrolla en tejidos diferenciados terminales, e incluye ambas un incremento en el número de copias del genoma viral, tanto como la expresión de genes tardíos y el ensamblado del nuevo virus. El requerimiento de la diferenciación celular para que el ciclo viral sea completo ha sido un impedimento para el estudio completo de la replicación del VPH.

Los papilomavirus tienen una organización genómica común. Una sola de las dos cadenas de ADN puede codificar para la producción de proteínas virales, sin embargo los tres marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés Open Reading Frame) con los que cuenta, son utilizados por el virus para la síntesis proteica. Los ORF pueden ser separados en tres regiones: 1) la región URR (por Upstream Regulatory Region) contiene elementos reguladores de la replicación y de la transcripción; 2) una región precoz o "E" (del inglés Early), y 3) una región tardía o "L" (por Late). La URR tiene un

tamaño variable según el tipo de VPH y contiene el origen de la replicación viral y lo esencial en cuanto a señales de regulación de la expresión de su propio genoma (promotores, activadores, supresores, etc.) (Figura 1). La región E representa el 50 % del genoma y contiene 6 ORF (E1 a E7), que codifica proteínas implicadas en la estimulación de la proliferación celular (E5, E6 y E7), la replicación del propio ADN viral (E1 y E2) o la regulación de la transcripción del genoma viral (E2), así como otra proteína, E4, expresada a todo lo largo de la fase tardía del ciclo viral y que interviene en la maduración de la partícula viral (Figura 1). Sólo 5 de ORF (E1, E2, E4, E5, E6, y E7) se encuentran en todos los papilomavirus; la región L comprende dos genes presentes en la totalidad de los papilomavirus que codifican las proteínas estructurales o de la cápside L1 y L2, respectivamente (Syrjanen KJ y Syrjanen ST, 2000).

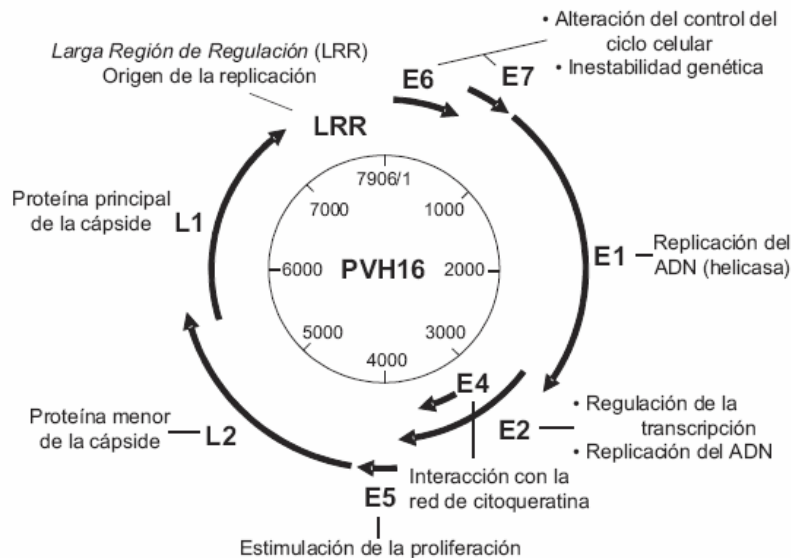


Figura 1. Estructura del Genoma viral del Virus VPH 16

Los genes tempranos (E) se expresan cuando el virus entra en la célula del huésped y codifican funciones importantes para establecer la infección e iniciar la replicación viral. E1 y E2 desempeñan un papel destacado en la replicación del ADN vírico y en la conservación del episoma (estado latente). E2 también es importante para la regulación de la región larga de control, y la represión del promotor p53. E4 está implicado en la desestabilización de la estructura de citoqueratina para la liberación de partículas virales (Syrjanen KJ y Syrjanen ST, 2000).

E5, E6 y E7 tienen actividad que estimula la proliferación celular. La célula huésped recibe el estímulo de iniciar la fase en la que se replica su propio ADN, lo que conduce a la producción de enzimas necesarias para la síntesis del ADN. A continuación se replica el ADN viral. E5 es una oncoproteína que interacciona con factores de crecimiento y actúa de mediadora en señales mitógenas activando la (MAP) (proteína activadora de mitógenos) cinasa. Los oncogenes E6 y E7 están implicados en la transformación maligna debido a sus interacciones con proteínas celulares que regulan la progresión del ciclo celular. E6 interacciona con la proteína supresora tumoral p53 y bloquea su actividad, lo que produce resistencia a la apoptosis (muerte celular programada) y aumento en la inestabilidad cromosómica. E7 interacciona y degrada otra proteína supresora tumoral, la pRB (proteína del retinoblastoma), lo que produce una cascada de actividad. El resultado neto es la aneuploidia (generación de múltiples cromosomas de las células que expresan E7, lo que contribuye a la oncogénesis).

Los genes tardíos (L) se expresan para encapsular el virión. Codifican las proteínas de la cápside viral (L1 y L2), cuya expresión normalmente se retrasa hasta después de la amplificación del ADN viral. Sin embargo, la expresión génica tardía desaparece o disminuye sustancialmente en lesiones oncogénicas de alto grado. A continuación se muestran en la tabla 2 las funciones más importantes de las proteínas virales presentes en los VPH's (Syrjanen KJ y Syrjanen ST, 2000).

Región larga de control (URR).

Además del origen de la replicación, en esta región también se encuentran los elementos que regulan la expresión de los oncogenes virales, entre ellos encontramos la caja TATA y CAAT, por lo que se dice que tienen los elementos en *cis* para la regulación de la transcripción, cuenta con secuencias de ADN que son blanco de factores proteicos virales y celulares, posee entonces sitios de unión para la proteína viral E2 que funciona como activador y represor de la transcripción viral (Jastreboff y Cymet, 2002).

Posee un intensificador tejido-específico el cual es activado en células epiteliales de origen humano, sin embargo esta actividad es sólo dependiente de factores transcripcionales celulares y no de proteínas virales. Se han descrito sitios de unión

para otros factores celulares los cuales juegan un papel funcional en la regulación transcripcional de los VPH, notablemente se pueden mencionar: NF-1, SP-1, AP-1, el receptor de glucocorticoides, así como sitios de unión para Octa y YY1 que son otros factores celulares que interfieren de manera negativa en la expresión de ARN's tempranos.

Genes tempranos (E): Proteínas E1 y E2

E1 Es una fosfoproteína de 68 kDa, homólogo funcional del antígeno T grande de SV40, que está involucrada de manera muy importante en la iniciación y elongación durante la fase replicativa del ADN. E1 se asocia como trímero o hexámero a sus sitios de unión con baja afinidad y especificidad, presenta actividad de helicasa y NTPasa. Además, E1 puede interactuar con la histona H1 56, lo que sugiere que E1 promueve el inicio de la replicación alterando la estructura de la cromatina viral y la ruptura del nucleosoma en la horquilla de replicación. E1 también interactúa con las subunidades p70 y p180 de la ADN polimerasa alfa-primasa y la recluta al origen de la replicación (Peña and Laimins, 2002).

El producto complemento del marco de lectura de E2, es una proteína de 50 kDa, la cual posee una estructura conservada de tres dominios. La proteína E2, es un transactivador transcripcional esencial para la replicación del ADN in vitro. Se une como un dímero con alta afinidad a su sitio de unión en el genoma viral, incluyendo varios sitios en el origen de replicación. Además, E2 se une a la proteína E1 y, como E2 presenta una afinidad de unión al ADN y especificidad más fuerte, puede reclutarla al origen de replicación. Una vez que la primera molécula de E1 se une al origen de replicación a través de E2, se libera a la proteína E2 del origen para permitir que E1 pueda multimerizar en una forma competente para la replicación.

Uno de los dominios está localizado en el extremo N-terminal, con una longitud de 200 aminoácidos y una función de trans-activación. El otro dominio con una longitud de entre 90-100 aa está en el extremo C-terminal, es esencial para la dimerización y la unión al ADN. Una región flexible llamada región de bisagra separa el dominio transactivador del dominio de unión al ADN, esta región varía entre los tipos virales por su tamaño y su secuencia de aa, se cree que posee una función meramente estructural, dando unión y flexibilidad a los dominios.

Proteína E4

El marco de lectura de E4 está localizado en la región de expresión temprana, pero se expresa como un gen tardío en una infección productiva. En general, la proteína E4 no está muy conservada entre los distintos papilomavirus. La forma principal de la proteína E4 es una proteína en fusión E1-E4 de 17 kDa y una especie de 16 kDa que carece de 5 aminoácidos de E1 y algunos residuos de E4. Estos 5 aminoácidos de E1 son de gran importancia para la interacción de las proteínas E4 con filamentos intermedios de citoqueratinas.

La proteína de fusión E1-E4 de VPH1 y VPH16 se expresa en lesiones que van desde NICI hasta NICIII, y puede llegar a comprometer entre un 20 y un 30 % del total de las proteínas celulares. La proteína E1-E4 forma una red de filamentos citoplasmáticos que colocalizan específicamente con redes de filamentos intermedios de citoqueratina y, solamente E1-E4 de VPH 16 puede provocar un colapso total de la red de filamentos. Esto sugiere que la ruptura de la matriz de citoqueratina podría relacionarse con la liberación de los viriones (Syrjanen KJ y Syrjanen ST, 2000).

Proteína E5.

El gen E5, cuya expresión es inhibida por la proteína E2 en BPV, codifica para una proteína hidrofóbica de 10 kDa, que se expresa, en cultivos organotípicos, fuertemente en las capas basal y granular.

La proteína E5 es la principal proteína transformante en papilomavirus bovino. En contraste, la proteína E5 de Papilomavirus Humano presenta una baja actividad transformante. Esta proteína puede: a) causar transformación tumorigénica en queratinocitos de ratón y humanos, b) estimular el crecimiento en células de ratón y en queratinocitos humanos inmortalizados, independientemente de una superficie de anclaje y, c) estimula el crecimiento de cultivos primarios de células epiteliales de riñón de rata en cooperación con E7 de VPH 16.

Por otra parte, la proteína E5 se asocia con una ATPasa dependiente de H (+) unida a una membrana que forma parte del complejo de uniones-Gap. Además, E5 también interactúa con la subunidad formadora de poros de 16 kDa de la ATPasa vacuolar dependiente de H (+) (V-ATPasa), provocando que el complejo de Golgi presente un pH alcalino.

Proteína E6

La proteína E6, es considerada una oncoproteína, al igual que E7, es una pequeña proteína básica de 151 aminoácidos que se localiza en la matriz nuclear. La principal característica estructural de E6 es la presencia de 2 “dedos de zinc”, que están conservados entre todos los tipos de VPH’s. La proteína E6 de papilomavirus de alto riesgo, presenta funciones similares a las de E1B de Adenovirus y antígeno T grande de SV40, aunque no existe tiene la homología clara en la secuencia de los aminoácidos de estas tres proteínas virales, pueden formar complejos con p53 (Thomas *et al.*, 2002).

Genes tardíos (L): Proteínas L1 y L2

Como ya se menciona, todos los VPH’s tienen dos marcos de lectura tardíos, uno designado L1, que codifica para la más abundante de las proteínas estructurales con un peso molecular de aproximadamente 54-58 kDa. El segundo designado como L2, codifica para una proteína menos abundante de peso molecular entre los 63-78 kDa. Ambas proteínas son sintetizadas en el citoplasma de los queratinocitos diferenciados, esta expresión no aparenta estar asociada con un estado particular de diferenciación celular (Syrjanen KJ y Syrjanen ST, 2000). Poco después de la síntesis, son transportados al núcleo donde se llevan a cabo el ensamblaje viral. El transporte de las proteínas L1 y L2 al núcleo, es mediado por una Señal de Localización Nuclear (SLN). Típicamente la SLN es una secuencia corta de 8 a 10 aa conteniendo una alta proporción de cargas positivas (lisinas y argininas).

En imágenes de microscopía electrónica de la cápside de VPH, se observa la proteína L1 formando capsómeros pentaméricos que incluyen un agujero central en cada uno de ellos. En las resoluciones de estas imágenes, la localización de la proteína L2 no puede ser claramente definida. Sin embargo se han propuesto una serie de funciones para esta proteína: forma un complejo L1-L2 en el citoplasma participando entonces en el transporte de L1 al núcleo (Jastreboff-Cymet, 2003)

Los métodos basados en la amplificación de ADN (PCR) muestran un gran potencial como herramienta diagnóstica, considerada hoy en día imprescindible en el Laboratorio de Biología molecular e Ingeniería Genética, el objetivo de esta técnica es la amplificación directa de un gen o un fragmento de DNA, o indirecta de un ARN (En este caso a través de su DNA complementario, o cDNA), presentes en mezclas de muy

diversas fuentes, sin necesidad de una purificación previa de la muestra integra original. Su utilidad es que, tras la amplificación, resulta mucho más fácil identificar con una alta probabilidad virus o bacterias causante de una enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado. Estos usos derivados de la amplificación han hecho que se convierta en una técnica muy extendida, con el consiguiente abaratamiento del equipo necesario para llevarla a cabo.

En esta práctica la amplificación del genoma viral se realiza en ADN extraído de muestras endocervicales mediante PCR utilizando los oligonucléotidos universales para VPH MY09 5'CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC-3' para el sentido y MY11 5'GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG 3' para el antisentido, los cuales generan un fragmento de 450 pb en presencia del gen del virus en la región L1. Se utilizan oligonucleótidos para *Rsa*I como control.

Material

1. Matraz Erlenmeyer de 250 ml
2. Tubos de centrifuga de 50 ml, de polipropileno, fondo cónico
3. Papel de aluminio
4. Espátula de plástico
5. Tubos Eppendoff de 0.65 ml estériles
6. Puntas para micropipeta estériles
7. Baño de hielo

Reactivos

1. Equipo de reactivos para PCR
2. Primers para el HPV : MY09 5'CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC-3' para el sentido y MY11 5' GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG 3' para el antisentido
3. Primers control para *Rsa* I
4. Agua inyectable
5. Agarosa
6. TAE 1X
7. Azul de bromofenol
8. Bromuro de etidio 10 µg/µl

9. Marcador de 100 pares de bases

Equipo

1. Termociclador
2. Transiluminador
3. Fotodocumentador
4. Microcentrífuga
5. Vortex
6. Balanza analítica
7. Horno de microondas
8. Cámara de electroforesis horizontal con fuente de poder
9. Pipetas automáticas de 0 a 20 μ l, 20-200 μ l

Procedimiento**1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

En baño de hielo, preparar una mezcla de reactivos (pool) de acuerdo al número de muestras a trabajar, considerando que para cada muestra se requieren las siguientes cantidades de reactivos:

Componente	Volumen	Concentración final
Solución de MgCl ₂ 25 mM	1.5 μ l	1.5 mM
Solución buffer 10 X libre de MgCl ₂	2.5 μ l	1.0X
Mezcla de nucleótidos para PCR (10 mM cada uno)	0.5 μ l	200 μ M cada uno
Oligonucleótidos del HPV MY09 sentido	5 μ l	0.8 μ M
Oligonucleótidos del HPV MY11 antisentido	5 μ l	0.8 μ M
Oligonucleótidos de <i>Rsa</i> I sentido.	1 μ	0.8 μ M
Oligonucleótidos de <i>Rsa</i> I antisentido.	1 μ	0.8 μ M
Taq polimerasa	0.125 μ l	1.25 u
ADN molde	variable	0.5 a 1 μ g
Agua libre de nucleasas para un volumen final de	25 μ l	

En un microtubo de 0.65 ml colocar el DNA molde y el pool de reactivos. Agregar 15 μ l de aceite y colocarlo en el termociclador bajo el siguiente programa:

1. 5.0 minutos a 94°C Desnaturalización del ADN
2. 1.0 minutos a 94°C Desnaturalización final
3. 1.0 minutos a 55°C Alineación
4. 1.0 minuto a 72°C Elongación de la cadena
5. Repetir 40 ciclos a partir del punto 2
6. 10 minutos a 72°C Elongación final
7. ∞ 4°C

2. Electroforesis

Una vez terminada la reacción proceder a verificar la obtención de los fragmentos de 450 pb mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Los primer control deben dar un fragmento de 510 pb.

3. Interpretación

La amplificación del fragmento de 450 pb indica la presencia del virus de papiloma humano en la muestra analizada.

Normas

Durante esta práctica se deberá observar la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 (anexo 1), ya que la sangre y sus componentes (en este caso la solución de ADN) están clasificados como Residuos Peligrosos Biológicos infecciosos; deberá procederse a su identificación y envasado, almacenamiento temporal, recolección y transporte externo, tratamiento y disposición final, de acuerdo a lo estipulado en esta norma vigente.

Por otra parte la investigación del área médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales. Estas normas están contenidas en la DECLARACION DE HELSINKI DE LA ASOCIACION MEDICA MUNDIAL (anexo 3), la cual también debe observarse al realizar esta práctica.

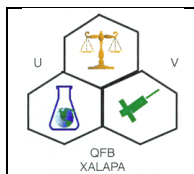
Preguntas

1. ¿Qué importancia tiene la detección de VPH en muestras endocervicales?
2. Explica la estructura del genoma viral del VPH

3. ¿A que se refiere el termino de “oligonucleótidos universales” para el VPH?

Bibliografía

1. Bosch FX. A scientific response to prevent cervical cancer in the world Vaccine 26S (2008)
2. Bosch FX. Epidemiology of human papillomavirus infections: New options for cervical cancer prevention. *Salud Publica Mex* 2003; 45 suppl 3:S326-S339.
3. Carrillo Adela, Mohar Alejandro, Meneses Abelardo. Usefulness of combining universal oligonucleotides in detecting human papillomavirus in cervical cancer and premalignant lesions. *Salud pública Méx*, Jan./Feb. 2004, vol.46, no.1, p.7-11.
4. Fuessel Haws AL, He Q, Rady PL, Zhang L, Grady J, Hughes TK, Stisser K, Konig R and Tying SK. Nested PCR with the PGM09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples, *J. Virol. Meth.* 122 (2004), pp. 87–93.
5. Hea, Peter L. Radyc, Lifang Zhangb, James Gradyb, Thomas K. Hughesa, Kendra Stissera, Rolf Koniga, Stephen K. Tyinga, C., Nested PCR with the PGM09/11 and GP5+/6+ primer sets improves detection of VPH DNA in cervical samples. *Journal of Virological Methods* 122 (2004) 87–93.
6. INEGI: www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/capsulas/2005/sociodemograficas/tumores.asp?c=1585.
7. Jastreboff A, Cymet T. Role of human papillomavirus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *J. Medicine* 2002;78 225-8.
8. Lazcano-Ponce E, Herrero R, Nubia Muñoz, Cruz A, Shah KV, Alonzo P, Hernández P, Salmeron J, and Hernández M. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. 2001 *J. Cancer*: 91, 412-420.
9. Manos, M. M., Y. Ting, D. K. Wright, A. J. Lewis, T. R. Broker, And S. M. Wolinsky. 1989. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cells* 7:209-214.
10. Muñoz N, Bosch FX, Sanjosé S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348: 518-27.
11. Peña Loren del Mar and Laimins Laimonis A. Regulation of human papillomavirus gene expression in the vegetative life cycle. 2002 Elsevier Science.
12. Schiffman Mark, Philip E Castle, Jose Jeronimo, Ana C Rodriguez, Sholom Wacholder. 2007 Human papillomavirus and cervical cancer *Lancet* ; 370: 890–907.
13. Syrjanen Kary J and Syrjanen Stina M. Papillomavirus infections in human pathology. 2000 Ed. Chichester, New York pgs.11-51.
14. Thomas M, Pim D, and Banks L. Human papillomavirus E6 protein interactions. 2002 *E Science*.
15. Thomison John, Thomas Laurie K, Shroyer Kenneth R. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma *Human Pathology* (2008) 39, 154–166
16. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. DoH Oct2008
17. Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo. Diario oficial. Lunes 17 de febrero de 2003.



PRACTICA No. 11
ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Objetivo

Que el alumno realice un corrimiento electroforético en condiciones reductoras para separar una mezcla de proteínas

Sustento teórico

La electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida (PAGE, 'polyacrilamide gel electrophoresis') es sin duda alguna una de las técnicas más ampliamente usada para caracterizar mezclas complejas de proteínas. La electroforesis en poliacrilamida es un método conveniente, rápido y económico a nivel de muestra pues se requieren sólo cantidades del orden de microgramos de proteína.

Las proteínas presentan una carga eléctrica neta si se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoeléctrico y por eso tienen la propiedad de desplazarse cuando se someten a un campo eléctrico. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa más rápida será la migración. Empleando geles de sílice o de acetato de celulosa y aplicando las proteínas en una zona estrecha en torno a los electrodos se pueden determinar diferencias de carga neta (carga total/masa) entre proteínas. Este método se denomina electroforesis zonal. La matriz de poliacrilamida no es un buen soporte para este método pues la migración de las proteínas en su seno no sólo es proporcional a la carga neta sino también al tamaño y forma de las proteínas. Una ventaja importante de los geles de poliacrilamida es que son químicamente inertes, transparentes y estables en un rango amplio de pHs, temperatura y fuerza iónica.

Algunas características destacables de la electroforesis en geles de poliacrilamida son:

a) Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador ('crosslinking'), la bis-acrilamida en presencia de un iniciador y un catalizador. Como iniciador se suele utilizar TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y como catalizador el ión persulfato ($S_2O_8^{2-}$) que se añade en forma de persulfato amónico. En algunas situaciones, como por ejemplo en el isoelectroenfoco en el que la presencia de persulfato puede interferir con la electroforesis se emplean riboflavina y TEMED.

b) Las soluciones de acrilamida se desgasifican pues el oxígeno es un inhibidor de la polimerización. Además, durante la polimerización se libera calor que podría provocar la formación de burbujas en el seno del gel.

c) La velocidad de polimerización viene determinada por la concentración de persulfato (catalizador) y TEMED (iniciador).

d) La porosidad del gel la determina las proporciones relativas de poliacrilamida y bis-acrilamida, siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida vs. acrilamida se use.

e) El porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida determina el rango de separación del gel. Habitualmente los geles se denominan en función del % de acrilamida/bisacrilamida que contienen. Así, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango de 5 a 10%. Un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de gran tamaño.

f) En función del estado de las proteínas (nativo o desnaturalizado) a lo largo del proceso electroforético éstas se clasifican en electroforesis nativas o desnaturalizantes:

1) una electroforesis desnaturalizante, la más común, es la que somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturalización (pérdida de la estructura tridimensional). En esta situación la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero no a su forma. El agente desnaturalizante más empleado es el dodecilsulfato de sodio o SDS, un detergente.

2) una electroforesis nativa es la que somete a las proteínas a migración sin desnaturalización. En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Además se mantienen en ciertos casos las interacciones entre subunidades y entre proteínas, separándose los complejos. Los sistemas tampón (buffer) empleados en estos caso son: tris-glicina (rango de pH 8.3 a 9.5), tris-borato (rango de pH 7.0 a 8.5) y tris-acetato (rango de pH 7.2 a 8.5).

La electroforesis en geles de acrilamida se puede realizar empleando sistemas de uno o más tampones, en estos casos se habla de sistemas tampón continuos o discontinuos. En los sistemas discontinuos el primer tampón asegura la migración de todas las proteínas en el frente de migración, provocándose la acumulación de todas las que se han cargado en el pocillo. La separación realmente comienza a partir del momento en el que el frente de migración alcanza la frontera del segundo tampón. El primer gel ('stacking') es de mayor poro (menor porcentaje de acrilamida+bisacrilamida) y tiene un pH más ácido que el segundo gel que es el que realmente separa las proteínas. Este sistema es especialmente adecuado para analizar muestras diluidas sin perder resolución.

Existen numerosos dispositivos en el mercado para hacer electroforesis en geles de acrilamida. Es la electroforesis de proteínas más ampliamente usada. Su nombre significa la electroforesis en geles de poliacrilamida que se realiza en presencia de SDS ('SDS-polyacrilamide gel electrophoresis'). Fue descrito por Laemmli. Se trata de un tipo de electroforesis desnaturizante en la que las muestras se desnaturizan por calor en presencia de agentes desnaturizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturiza y recubre a la proteína con cargas netas negativas), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas. En general se emplean sistemas de dos tampones (discontinuos). Este sistema permite la separación de volúmenes relativamente grandes de muestra sin pérdida de resolución. La concentración se produce por isotacoforesis de la muestra en el primer gel ('stacking'). El efecto de estrechamiento de las bandas se basa en el hecho de que los iones glicinato, relativamente cargados negativamente (en el depósito de tampón superior) tienen una movilidad electroforética inferior que los complejos de proteínas-SDS que a su vez tienen menor movilidad que los iones Cl⁻ de los tampones de carga en el gel de apilamiento ('stacking'). Cuando se conecta la diferencia de potencial todas las especies han de migrar a la misma velocidad para mantener el circuito eléctrico. Los iones glicinato sólo se pueden desplazar a la misma velocidad que los iones Cl⁻ si hay una región de 'field strenght'. 'Field strenght' es inversamente proporcional a la conductividad que es a su vez proporcional a la concentración, El resultado es que las tres especies de interés ajustan sus concentraciones de forma que $[Cl^-] > [proteína-SDS] > [glicinato]$. Como sólo hay una pequeña concentración de proteína-SDS las tres

se concentran en una banda muy delgada entre las fronteras de migración del Cl⁻ y del glicinato. Cuando el glicinato alcanza el borde del gel de separación adquiere una mayor carga en el nuevo medio, con un pH superior, e incrementa su movilidad. A partir de ese momento la interfase entre el glicinato y el Cl⁻ deja atrás a los complejos de proteína-SDS que se desplazarán a su propia velocidad. El SDS es un detergente de acción desnaturalizante que se une a las cadenas polipeptídicas desnaturalizadas con una relación de 1.4 g de SDS por g de proteína, uniéndose aproximadamente una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena. Esta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo. La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional sólo a la masa de la proteína pues todas tienen la misma carga por unidad de masa. Se puede entonces determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos. Las movilidades de las proteínas en los geles de SDS-PAGE son funciones lineales del logaritmo de su peso molecular.

Detección de proteínas en el gel

Las proteínas que se han separado en un gel de poliacrilamida (u otros soportes) pueden ser detectadas por diferentes métodos, entre los que destacan los colorantes y la tinción con plata.

Colorantes

La tinción con azul de Coomasie permite detectar hasta 0.2 a 0.6 mg de proteína, y es cuantitativo (lineal) hasta 15 a 20 mg. Se emplea habitualmente en soluciones de metanol-acético y se destiñe por difusión en soluciones de isopropanol-acético.

Tinción con plata

Es una alternativa a la tinción rutinaria de geles de proteínas (así como de ácidos nucleicos y lipopolisacáridos) por su facilidad de uso y su gran sensibilidad (entre 50 y 100 veces más sensible que la tinción con Azul de Coomasie). Es una técnica de tinción especialmente recomendable para la tinción de geles bidimensionales y de isoelectroenfoque.

Detección de proteínas radiactivas mediante autorradiografía

La autorradiografía es una técnica de detección de moléculas marcadas radiactivamente que emplea emulsiones fotográficas sensibles a la partícula radiactiva o a la luz producida por una molécula intermediaria. La emulsión que contiene plata es sensible a la radiación particulada (alfa, beta) o electromagnética (radiación gamma, luz), de forma que se precipita en forma de plata metálica. El revelado de la emulsión revelará en forma de precipitados oscuros la región en la que se localizan las proteínas radiactivas.

Cuando las proteínas se marcan con isótopos como P32 o I125 que emiten respectivamente radiación beta fuerte o radiación gamma, con una gran capacidad de penetración, una gran cantidad de partículas atraviesan el gel y la película sin provocar la precipitación de la plata. En esas condiciones es necesario exponer durante períodos de tiempo más largos para conseguir una buena señal. Con la finalidad de reducir el tiempo de exposición, e incrementar la señal, se emplean las llamadas pantallas amplificadoras. Se trata de unas placas de plástico recubiertas de un material plástico o cerámico denso que tiene una gran capacidad de captar emisiones radiactivas, y que como consecuencia de la captura de una partícula radiactiva emite fotones que al impactar en la película fotográfica provocarán la precipitación de plata.

Las placas autorradiográficas permiten la cuantificación de la señal, mediante densitometrado de las bandas empleando un scanner. Existen en el mercado numerosos programas desarrollados al efecto. Sin embargo este método adolece de una limitación muy importante y es la falta de linealidad de respuesta de la película en un rango mínimamente amplio de diferencias de intensidad. Así pues es útil para detectar diferencias de intensidad pero debido a su pronta saturación no sirve en rangos amplios.

Para solventar este problema se han desarrollado algunos métodos alternativos que se basan en la utilización de pantallas de materiales cerámicos que tienen la propiedad de capturar las partículas radiactivas, y por ello cargarse de energía, que liberan específicamente cuando se irradian con luz de una determinada longitud de onda. Las pantallas de captación de radiación presentan una respuesta lineal en la

captura y emisión de energía en un rango de 5 a 6 órdenes de magnitud (permiten diferenciar una señal entre 1 y 10^5).

Detección de proteínas radiactivas mediante fluorografía

Las proteínas marcadas con isótopos de emisión más débil como H3, C14 o S35 se detectan mucho más fácilmente si se impregna el gel con una solución de centelleo y posteriormente se expone ante película fotográfica (autoradiográfica). Los componentes de la solución de centelleo responden emitiendo fotones a la captura de una partícula radiactiva. Las emisiones beta débiles son incapaces de atravesar todo el espesor de la muestra y por ello no pueden llegar a impresionar la película sino existen moléculas centelleadoras próximas que emitan fotones que sí abandonan la muestra.

Material

- Tubos Eppendoff de 0.65 ml estériles
- Puntas para micropipeta estériles
- Pipetas automáticas de 0.1 a 2.5 μ l, 2 a 20 μ l, 20-200 μ l, 200 a 1000 μ l
- Espátula de plástico
- Vaso de precipitados de 250 ml
- Matraz Erlenmeyer de 50 ml
- Bandejas de plástico para teñido

Reactivos

- Buffer para muestras
- Solución de Acrilamida/bisacrilamida 29:1
- Buffer de corrida 1X pH 8.3
- Buffer pH 6.8
- Buffer pH 8.8
- SDS al 10 %
- Persulfato de amonio al 10 %
- TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametiletildiamina)
- Marcador de P.M.
- Etanol al 70 %

- Solución de Azul de Coomasie
- Solución de desteñido

Nota: La acrilamida es neurotóxica. Al pesar el reactivo sólido debe usarse guantes y mascarilla. Limpiar cualquier residuo de acrilamida en la balanza y sus alrededores, pues la inhalación es tan nociva como el contacto con la piel. Al preparar geles es necesario usar guantes e igualmente limpiar cualquier derrame.

Los sobrantes de solución de monómeros no deben ser vertidos en el desagüe, es mejor polimerizarlos y descartarlos en forma de gel, ya que el polímero pierde la toxicidad.

Equipo

- Parrilla eléctrica
- Cámara de electroforesis vertical con aditamentos y fuente de poder
- Transiluminador
- Fotodocumentador
- Microcentrífuga

Procedimiento

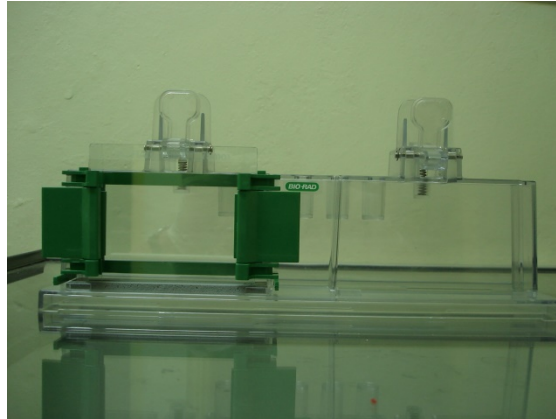
PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA SDS-PAGE.

1. Determinar el volumen (μl) que contengan 100 μg de proteína (volumen 1).
2. En un tubo Eppendoff colocar el 50% del volumen 1 y agregar un volumen igual de buffer para muestra.
3. Colocar el tubo en agua hirviendo por 5 min y centrifugar 15 seg a 3000 r.p.m.
4. Del sobrenadante, tomar el volumen que contenga la cantidad de proteínas en μg que se desea cargar en el carril del gel correspondiente a esa muestra.

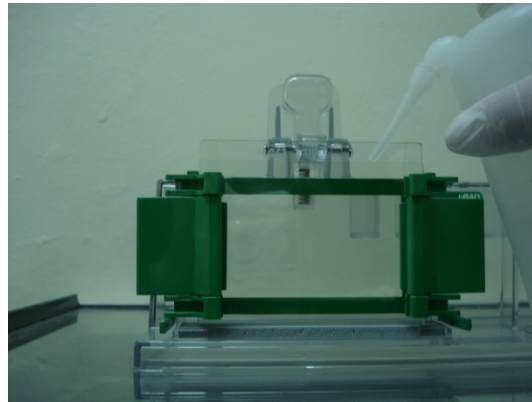
PREPARACIÓN DE GELES PARA SDS-PAGE

1. Limpiar vidrios y peines con alcohol al 70%, para eliminar impurezas. Secar al aire.
2. Colocar el soporte para preparar los geles sobre una superficie plana y ponerle las gomas de hule en la parte inferior.

3. Alinear los vidrios (uno grande y uno pequeño) y fijarlos dentro del marco correspondiente. Colocarlos en el soporte, alineándolos bien con la goma inferior.



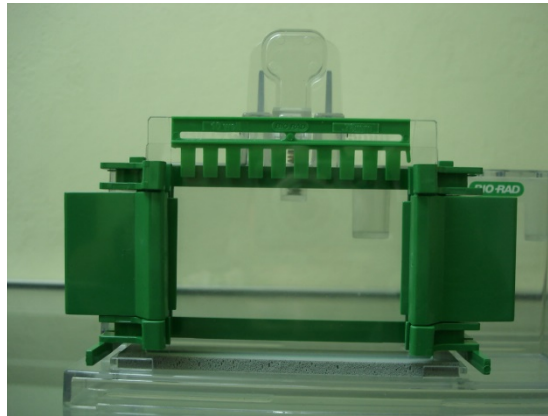
4. Llenar el espacio de los geles con agua destilada para verificar que no haya fugas, en cuyo caso deberán armarse nuevamente. Eliminar el agua destilada por decantación.



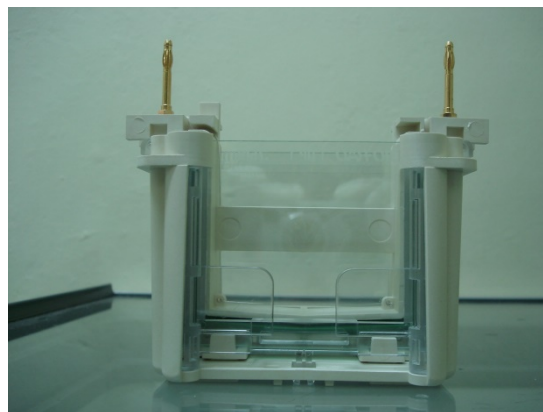
5. Agregar el gel de resolución (inferior), hasta 3/4 de la altura del vidrio delantero. Evitar la formación de burbujas.



6. Llenar con agua.
7. Dejar que gelifique (20-30 min).
8. Retirar el agua por decantación.
9. Agregar el gel de concentración (superior) hasta el borde y enseguida colocar el peine rápidamente, evitando burbujas.

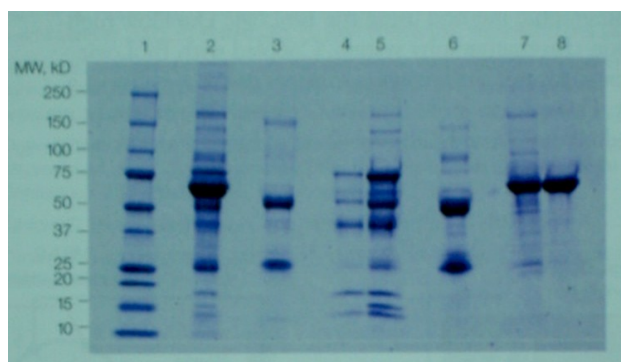


10. Dejar gelificar (20-30 min).
11. Retirar los peines y lavar los pozos con buffer de corrida 1 X.
12. Hacer el montaje de los vidrios con los geles en el corazón del sistema, el vidrio pequeño debe ir hacia adentro. Inmediatamente deslizarlos dentro de la cámara, cuidando que queden bien alineados en la parte inferior y fijarla con los seguros.



13. Llenar la cámara con buffer de corrida 1X
14. Cargar las muestras en cada uno de los pozos. En un carril cargar 5 μ l del marcador de P.M.
15. Colocar la cámara dentro del tanque y agregar un poco de buffer de corrida.

- Tapar el tanque, conectarla y encender la fuente de poder. Hacer el corrimiento a 100 volts.
16. Cuando el frente de corrida este a 1 cm del final del gel apagar la fuente de poder.
17. Teñir el gel con azul de Coomasie
18. Visualizar los resultados en el transiluminador, procediendo a digitalizar la imagen del gel.



PREPARACIÓN DE GELES

GEL INFERIOR:

(Nota: Este volumen es suficiente para preparar 2 geles)

% GEL	AGUA BIDEDESTILADA (ml)	ACRILAMIDA/BISACRILAMIDA	BUFFER pH 6.8 (ml)	SDS al 10% (ml)
6	5.4	2.0	2.5	100
8	4.7	2.7	2.5	100
10	4.1	3.3	2.5	100
12	3.4	4.0	2.5	100
14	2.7	4.7	2.5	100

Colocar al vacío por 15 minutos.

Adicionar 20 μ l de TEMED y 120 μ l de APS (persulfato de amonio)

GEL SUPERIOR

% GEL	AGUA BIDEDESTILADA (ml)	ACRILAMIDA/BISACRILAMIDA	BUFFER pH 6.8 (ml)	SDS al 10% (ml)
4	6.1	1.3	2.5	100

Colocar al vacío por 15 minutos.

Adicionar 20 μ l de TEMED y 120 μ l de APS (persulfato de amonio)

PREPARACIÓN DE BUFFER DE CORRIDA 1X Ph 8.3

Tris base 3 g
 Glicina 14.4 g
 SDS 1 g

Aforar a 600 ml con agua desionizada.

TINCIÓN CON AZUL DE COOMASIE

- Solución de Azul de Coomasie: 0.2 g de azul Coomasie en 90 ml de metanol: agua 1:1 v:v y 10 ml de ácido acético glacial.
- Tinción: sumergir el gel en 5 vol. de colorante al menos 1 h con agitación suave (el máximo se consigue en 3 h).
- Destinción: hacer cambios repetidos de 10% acético en 20% metanol:agua. Se puede conseguir muy rápidamente mediante electroforesis.

Normas

Durante esta práctica se deberá observar la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 (anexo 1), ya que la sangre y sus componentes (en este caso la solución de ADN) están clasificados como Residuos Peligrosos Biológicos infecciosos; deberá procederse a su identificación y envasado, almacenamiento temporal, recolección y transporte externo, tratamiento y disposición final, de acuerdo a lo estipulado en esta norma vigente.

Por otra parte la investigación del área médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales. Estas normas están contenidas en la DECLARACION DE

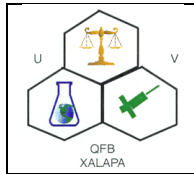
HELSINKI DE LA ASOCIACION MEDICA MUNDIAL (anexo 3), la cual también debe observarse al realizar esta práctica.

Preguntas

1. ¿Por qué se utilizan dos tipos de gel?
2. ¿Cuál es el propósito de colocar la muestra a ebullición?
3. ¿De qué depende la velocidad de migración de las proteínas?
4. ¿De que depende la cantidad de acrilamida/bisacrilamida a utilizar?
5. Interpreta los resultados

BIBLIOGRAFÍA

1. Davis L, Kuehl M, Battey J. Basic Methods in Molecular Biology. (2004) Second Edition. Apleton and Lange.
2. García P.H. (2000) Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo diagnóstico*. 1(2): 31-34.
3. Walter M.J. Methods in Molecular Biology. (2005) Volumen 1. Proteins. Human Press. Clifton New Jersey.
4. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. DoH Oct2008
5. Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002. Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo. Diario oficial. Lunes 17 de febrero de 2003.



UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA

PRACTICA No. 12

Detección de las variantes alélicas del CYP2C9 mediante PCR en tiempo real.

Objetivo

Que el alumno reconozca la importancia de los genotipos de la variante CYP2C9 y aplique la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) para su identificación.

Sustento Teórico

Se han descrito diversas variantes alélicas de CYP2C9, de las cuales las 3 más representativas y que se presentan con mayor frecuencia son: CYP2C9*1 considerada la variante silvestre (Arg144Ile359), CYP2C9*2 (Cys144Ile359) y CYP2C9*3 (Arg144Leu359). Estas 2 últimas variantes codifican para enzimas con menor actividad enzimática. Los portadores del alelo CYP2C9*2 presentan una actividad enzimática del 12% respecto a la variante silvestre, mientras que CYP2C9*3, la enzima solo presenta una actividad del 5% (Fricke-Galindo *et al.*, 2015).

Los portadores de polimorfismos CYP2C9*2 y CYP2C9*3, cuando son tratados con dosis estándar de un fármaco que sea sustrato de la enzima afectada, suelen presentar niveles plasmáticos más elevados, cifras de aclaramiento más bajas y un incremento en la frecuencia y severidad de reacciones adversas medicamentosas al uso de dicho fármaco (Martínez *et al.*, 2006).

La PCR cuantitativa se realiza en un termociclador con capacidad de hacer incidir sobre cada muestra un haz de luz de una longitud de onda determinada y de detectar la fluorescencia emitida por el fluorocromo excitado. Este termociclador es un aparato con capacidad para calentar y enfriar rápidamente las muestras, de modo que se aprovechen las cualidades fisicoquímicas de los ácidos nucleicos y las enzimáticas de la ADN polimerasa.

El proceso de PCR, por lo general, consiste en una serie de cambios de temperatura que se repiten 25-40 veces, llamados ciclos, cada uno con un mínimo de tres etapas: la primera, en torno a los 95 °C, permite la separación de los ácidos nucleicos de doble cadena; la segunda, a una temperatura en torno a los 50-60 °C, permite el alineamiento de los cebadores al ADN molde; la tercera, a 68-72 °C, facilita la polimerización por parte de la ADN polimerasa. Dado el pequeño tamaño de los fragmentos amplificados usualmente en este tipo de PCR puede omitirse el último paso, pues la enzima es capaz de amplificar durante la rampa entre la temperatura de alineamiento y la de desnaturalización. Además, algunos termocicladores añaden a cada ciclo unos segundos a otra temperatura, por ejemplo 80 °C, a fin de reducir el ruido por la presencia de dímeros de cebadores cuando se emplea un colorante inespecífico. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros, tales como la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes y desoxirribonucleótidos (dNTPs) en la reacción o la temperatura de unión de los cebadores.

Podemos clasificar las técnicas de PCR cuantitativa según el empleo de fluorocromos no específicos o bien de sondas moleculares dependientes de la secuencia.

En las técnicas basadas en fluorocromos inespecíficos se detecta la generación exponencial de ADN de doble cadena empleando un fluorocromo que se une inespecíficamente a aquel. Un ejemplo de colorante que permite esta detección es el SYBR Green (Verde SYBR) que, excitado mediante luz azul ($\lambda_{\text{max}} = 488 \text{ nm}$) emite luz verde ($\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$). Posee la ventaja de requerir solo un par de cebadores para efectuar la amplificación, lo que abarata su coste; sin embargo, solo es posible amplificar un producto en cada reacción.

Las técnicas basadas en sondas específicas utilizan al menos un oligonucleótido marcado fluorescentemente. Típicamente esta sonda está unida a dos fluorocromos e hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo (forward) y el inverso (reverse); esto es, en el amplicón. De este modo, cuando la sonda está intacta, presentan una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Dicha FRET no se

produce cuando los dos fluorocromos están distantes debido a la degradación de la sonda mediante la actividad 5'-3' exonucleasa de la ADN polimerasa, o bien debido a la separación física de los fluorocromos por un cambio en la conformación de la sonda. Esto permite monitorizar el cambio del patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen.

Material

1. Pipetas automáticas de 0.1 a 2.5 ml, 2 a 20 ml, 20-200 ml, 200 a 1000 ml
2. Puntas para micropipeta estériles
3. sello adhesivo p/ termociclador piko
4. Espátula de plástico
5. Tubos Eppendoff de 0.2 ml estériles
6. placas blancas de 96 pozos, para termociclador piko 96 pozos thermo scientific.
7. Baño de hielo

Reactivos

1. AGUA INYECTABLE ESTÉRIL
2. TAQMAN FAST ADVANCE MMIX
3. OLIGONUCLEOTIDOS
 - 5'-GTATTTTGGCCTGAAACCCATA-3' CYP2C9*2 Sentido
 - 5'-GGCCTTGGTTTTTCTCAACTC-3' CYP2C9*2 antisentido
4. SECUENCIAS DE HIBRIDACIÓN.

*CYP2C9*2/CYP2C9*1*

56-FAM/CATTGAGGA/ZEN/CCGTGTTCAAGAGGAA /3IABkFQ/
5TEX615/CCCGCTGCCTTGTGGAGGAGTTGAG/3BHQ_2/

Equipo

1. Centrifuga clinica
2. Vortex
3. Campana de flujo laminar

Procedimiento

En baño de hielo, preparar una mezcla de reactivos (pool) de acuerdo al número de muestras a trabajar, considerando que para cada muestra se requieren las siguientes cantidades de reactivos:

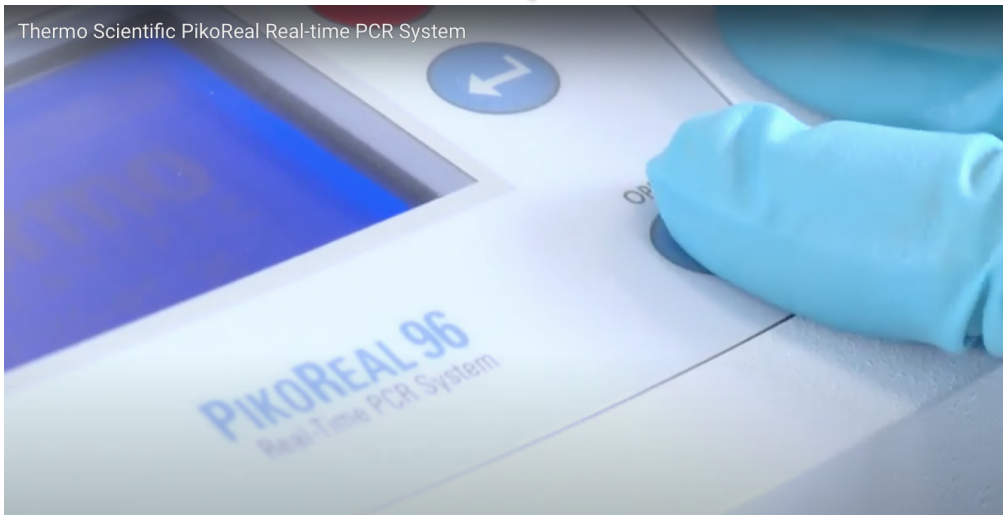
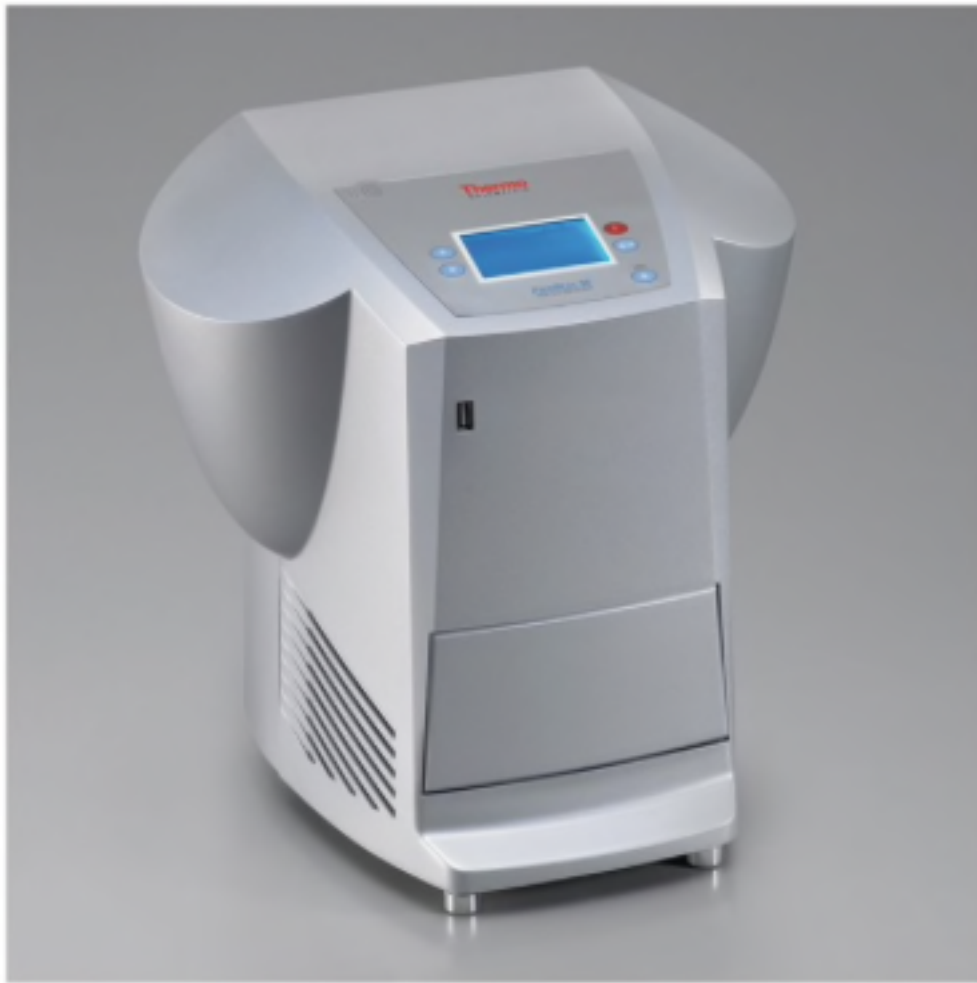
Componente	Volumen	Concentración final
-TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X)	5 µL	1X
-Secuencias de hibridación 10 uM FAM/CATTGAGGACCGTGTTCAGAGGAA	0.2 µL	0.2uM

-Secuencias de hibridación 10uM TEX 640 -CCCCTGCCTTGTGGAGGAGTTGAG	0.2 µL	0.2uM
-oligo antisentido 10uM CYP2C9*2 Sentido	0.5µL	0.5uM
-oligo antisentido 10uM CYP2C9*2 antisentido	0.5 µL	0.5uM
-Agua libre de nucleasa	2.6 µL	
-ADN	1 µL (100ng)	10-100ng
Volumen Total por reaccion	10 µL	—

En un microtubo de 0.2 ml colocar el pool de reactivos y el ADN molde, mezclando bien con la misma pipeta. Colocarlo en las placas blancas, centrifugar 2500 rpm por 3 min. Revisar que no lleve burbujas y colocarlo en termociclador PIKO REAL, bajo el siguiente programa:

Initial denaturation 95 °C for 10 min
 Amplification (45 cycles)
 Denaturation 95 °C for 5 s
 Annealing at 67 °C for 10 s
 Extension at 72 °C for 15 s
 Melting curve 20°C 40°C to 85°C.

Una vez teniendo el programa se procede a colocar las muestras en el termociclador Piko Real, el cual se muestra a continuación.

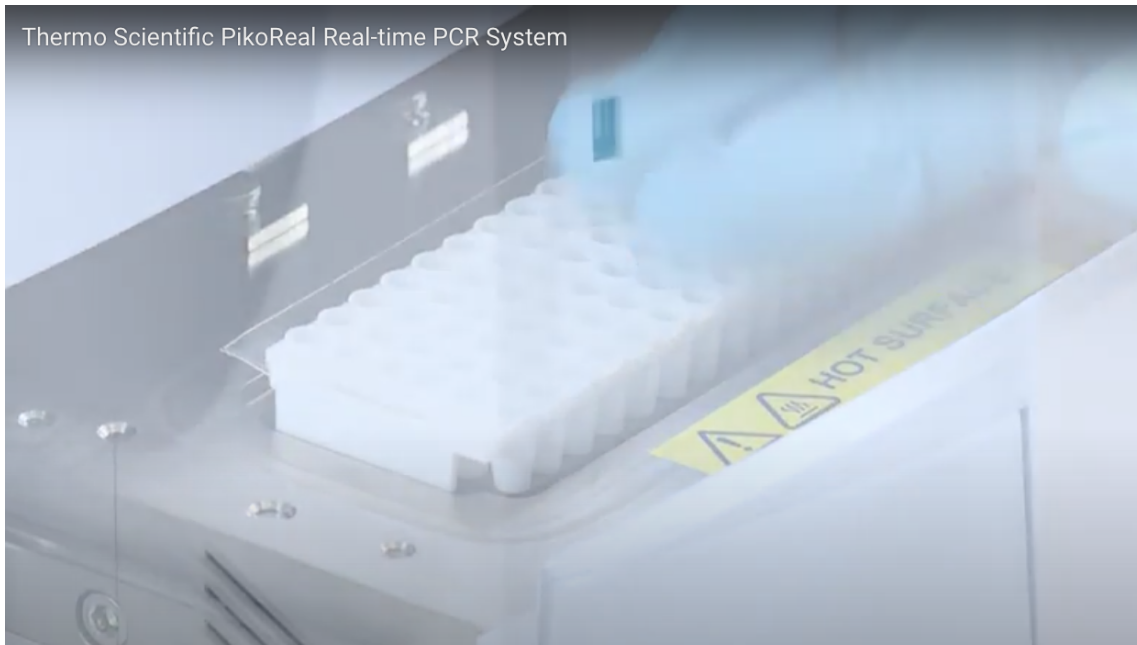


Thermo Scientific PikoReal Real-time PCR System



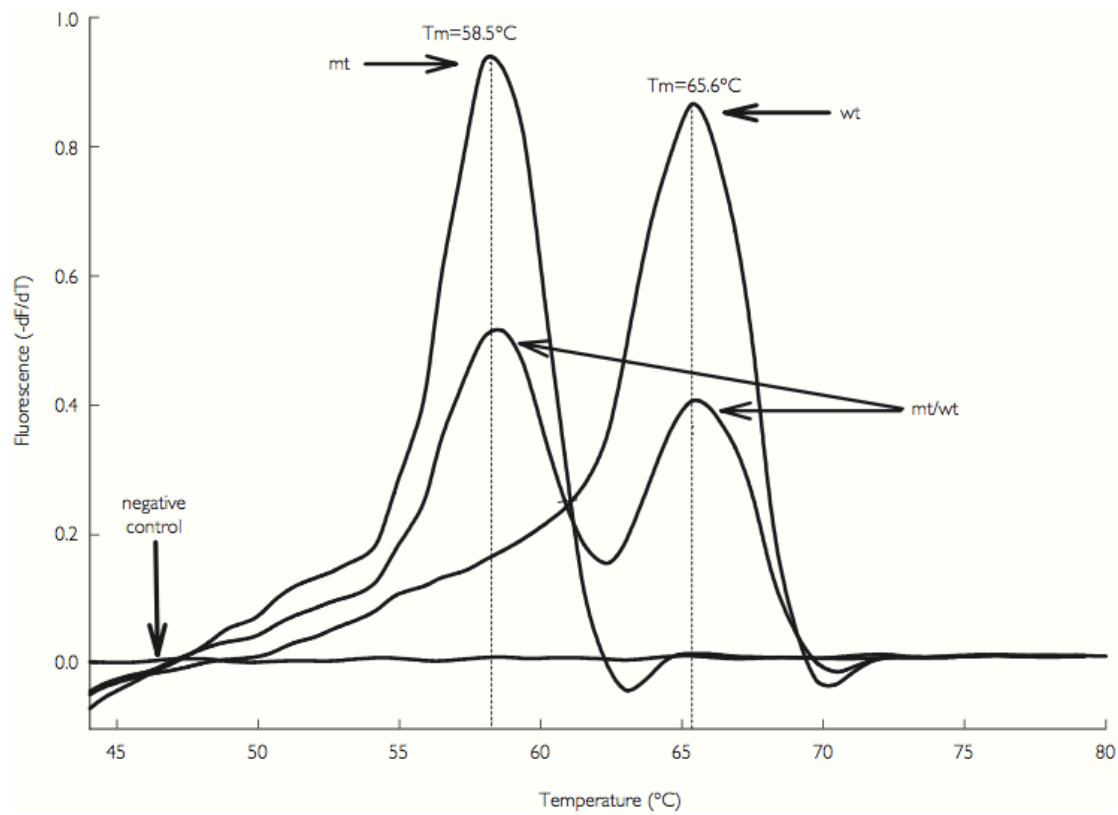
Thermo Scientific PikoReal Real-time PCR System







Una vez terminada la reacción proceder a verificar el Análisis de la curva de fusión de la variante CYP2C9 * 2 en los diferentes genotipos del CYP2C9. Como se muestra en la figura.



Análisis de la curva de fusión de la variante CYP2C9 * 2 en los diferentes genotipos del CYP2C9. Para un análisis más fácil de los picos de fusión, se representa la curva de temperatura de fusión como el primer derivado negativo de la fluorescencia frente a la temperatura (- dF / dT). En presencia de ADN de tipo salvaje (wt), las sondas de hibridación forman una coincidencia exacta con el objetivo, dando como resultado una mayor estabilidad del complejo y la Tm más alta (65,6 ° C). Se observó una menor Tm en el caso de la falta de coincidencia (58,5 °C), que denota la variante CYP2C9 * 2 (mt). Las muestras heterocigotas (mt / wt) mostraron dos picos de fusión distintos a Tm de 58,5 ° C y 65,6 ° C. El control negativo sin plantilla no muestra ninguna señal fluorescente.

Questionario

- 1.- ¿Que es PCR en tiempo Real?
- 2.- Conceptos importantes en PCR en tiempo Real
- 3.- Que significa **Baseline?**
- 4.-Que significa **Threshold**
- 5.- Que significa **No-template Control (NTC)**
6. Que significa **Quantification cycle (CQ o CT)**

Referencias.

1. Fricke-Galindo, I., Céspedes-Garro, C., Rodrigues-Soares, F. *et al.* Interethnic variation of *CYP2C19* alleles, 'predicted' phenotypes and 'measured' metabolic phenotypes across world populations. *Pharmacogenomics J* **16**, 113–123 (2016). <https://doi.org/10.1038/tpj.2015.70>.
2. Martínez C et al. Farmacogenómica clínica de CYP2C8 y CYP2C9: conceptos generales y aplicación al uso de AINE. *Farmacia Hospitalaria* 2006; 30: 240-248.
3. Sambrook, Joseph y David W. Russel (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed. edición). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-576-5.
4. Zipper, H. et al. (2004). «Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications.» *Nucleic Acids Res.* 32, e103. PMID 15249599

ANEXO 1.

NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

CASSIO LUISELLI FERNANDEZ, Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Medio Ambiente y Recursos Naturales, y ERNESTO ENRIQUEZ RUBIO, Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización, de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en lo dispuesto en los artículos 32 bis fracciones I, II, IV, V y 39 fracciones I, VIII y XXI de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4 de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 5 fracciones V, VI y XIX, 15, 36, 37, 37 Bis, 150, 151, 151 Bis, 160 y 171 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente; 3 fracciones XIII y XIV, 13, apartado A) fracción I, 45, 116, 117, 118, 128, 129 y 393 de la Ley General de Salud; 38 fracción II, 40, fracciones I, III, V, IV, X y XI, 41, 43, 44 y 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 1o., 2o. y 4o. fracciones II, III y IV, 5o., 6o. y 58 del Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente en materia de Residuos Peligrosos; 2 fracción I incisos a) y c), y 7o. y 66 del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 10 del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Prestación de Servicios de Atención Médica; 28, 31 fracción II, 33 y 34 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 8 fracción V del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales; 2 literal C fracción II del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud y 2, fracciones I, II, III, VII, VIII y IX, 7 fracción XVI, y 12 fracción VI del Decreto por el que se crea la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, ordenan la publicación en el **Diario Oficial de la Federación** de la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo, y

CONSIDERANDO

Que en cumplimiento a lo establecido en la fracción I del artículo 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, con fecha 1 de noviembre de 2001 se publicó en el **Diario Oficial de la Federación**, con carácter de proyecto la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-087-ECOL-SSA1-2000, Protección ambiental- Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-Infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo, mismo que fue

elaborado de manera conjunta con la Secretaría de Salud, con el fin de que dentro de los 60 días naturales siguientes a su publicación, los interesados presenten sus comentarios ante el Comité Consultivo Nacional de Normalización para la Protección Ambiental, sito en bulevar Adolfo Ruiz Cortines número 4209, piso 5o., colonia Jardines en la Montaña, código postal 14210, Delegación Tlalpan, Distrito Federal o se enviaron al correo electrónico o al fax que se señalaron. Durante el citado plazo, la Manifestación de Impacto Regulatorio correspondiente estuvo a disposición del público en general para su consulta en el citado domicilio, de conformidad con el artículo 45 del citado ordenamiento.

Que en el plazo de los 60 días antes señalado, los interesados presentaron sus comentarios al proyecto en cuestión, los cuales fueron analizados por el citado Comité, realizándose las modificaciones procedentes al mismo. La Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales publicó las respuestas a los comentarios recibidos en el **Diario Oficial de la Federación** el día 20 de enero de 2003.

Que habiéndose cumplido con el procedimiento establecido en la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, el Comité Consultivo Nacional de Normalización para la Protección Ambiental aprobó la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo, misma que abroga a su similar NOM-087-ECOL-1995 y su aclaración publicada en el citado órgano informativo el 12 de junio de 1996, Que establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que presten atención médica, actualizando el año de su expedición. Por lo expuesto y fundado se expide la siguiente:

**NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-087-ECOL-SSA1-2002,
PROTECCION AMBIENTAL-SALUD AMBIENTAL-RESIDUOS
PELIGROSOS BIOLOGICO-INFECCIOSOS- CLASIFICACION Y
ESPECIFICACIONES DE MANEJO
INDICE**

0. Introducción
1. Objetivo y campo de aplicación
2. Referencias
3. Definiciones y terminología
4. Clasificación de los residuos peligrosos biológico-infecciosos
5. Clasificación de los establecimientos generadores de residuos peligrosos biológico-infecciosos
6. Manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos
7. Grado de concordancia con normas y lineamientos internacionales y con

las normas mexicanas tomadas como base para su elaboración

8. Bibliografía

9. Observancia de esta Norma

Apéndice normativo

0. Introducción

La Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, define como residuos peligrosos a todos aquellos residuos que por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables y biológico-infecciosas, que representan un peligro para el equilibrio ecológico o el ambiente; mismos que serán manejados en términos de la propia ley, su Reglamento y normas oficiales mexicanas que expida la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales previa opinión de diversas dependencias que tengan alguna injerencia en la materia, correspondiéndole a la citada SEMARNAT su regulación y control.

Con fecha de 7 de noviembre de 1995, se publicó en el **Diario Oficial de la Federación** la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995, Que establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que presten servicios de atención médica.

Los establecimientos de atención médica son regulados por la Secretaría de Salud por lo que en la revisión de la norma mencionada, se incluye a los representantes del sector.

Esta revisión consideró las características de los diferentes tipos de unidades médicas que prestan atención a poblaciones rurales.

Los residuos peligrosos biológico-infecciosos se han venido manejando en términos de las regulaciones ambientales antes señaladas, sin embargo fue necesario actualizar la NOM-087-ECOL-1995, tomándose en consideración las experiencias y competencias de los sectores involucrados en su cumplimiento, con el fin de que sus disposiciones sean operativas y adecuadas para proteger el medio ambiente y la salud de la población en general.

1. Objetivo y campo de aplicación

La presente Norma Oficial Mexicana establece la clasificación de los residuos peligrosos biológico-infecciosos así como las especificaciones para su manejo.

Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria para los establecimientos que generen residuos peligrosos biológico-infecciosos y los prestadores de servicios a terceros que tengan relación directa con los mismos.

2. Referencias

Norma Oficial Mexicana NOM-052-ECOL-1993, Que establece las

características de los residuos peligrosos, el listado de los mismos y los límites que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente, publicada en el **Diario Oficial de la Federación** el 22 de octubre de 1993. Esta Norma contiene la nomenclatura en términos del Acuerdo Secretarial publicado el 29 de noviembre de 1994, por el cual se actualiza la nomenclatura de 58 normas oficiales mexicanas.

3. Definiciones y terminología

Para efectos de esta Norma Oficial Mexicana, se consideran las definiciones contenidas en la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, su Reglamento en materia de Residuos Peligrosos, la Ley General de Salud, sus Reglamentos, y las siguientes:

3.1 Agente biológico-infeccioso

Cualquier microorganismo capaz de producir enfermedades cuando está presente en concentraciones suficientes (inóculo), en un ambiente propicio (supervivencia), en un hospedero susceptible y en presencia de una vía de entrada.

3.2 Agente enteropatógeno

Microorganismo que bajo ciertas circunstancias puede producir enfermedad en el ser humano a nivel del sistema digestivo, se transmite vía oral-fecal.

3.3 Bioterio

Es un área o departamento especializado en la reproducción, mantenimiento y control de diversas especies de animales de laboratorio en óptimas condiciones, los cuales son utilizados para la experimentación, investigación científica y desarrollo tecnológico.

3.4 Carga útil

Es el resultado de la sustracción del peso vehicular al peso bruto vehicular.

3.5 Centro de acopio

Instalación de servicio que tiene por objeto resguardar temporalmente y bajo ciertas condiciones a los residuos peligrosos biológico-infecciosos para su envío a instalaciones autorizadas para su tratamiento o disposición final.

3.6 Cepa

Cultivo de microorganismos procedente de un aislamiento.

3.7 Establecimientos generadores

Son los lugares públicos, sociales o privados, fijos o móviles cualquiera que sea su denominación, que estén relacionados con servicios de salud y que presten servicios de atención médica ya sea ambulatoria o para internamiento de seres humanos y utilización de animales de bioterio, de acuerdo con la tabla 1 del presente instrumento.

3.8 Irreconocible

Pérdida de las características físicas y biológico-infecciosas del objeto para no ser reutilizado.

3.9 Manejo

Conjunto de operaciones que incluyen la identificación, separación, envasado, almacenamiento, acopio, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos.

3.10 Muestra biológica

Parte anatómica o fracción de órganos o tejido, excreciones o secreciones obtenidas de un ser humano o animal vivo o muerto para su análisis.

3.11 Organos

Entidad morfológica compuesta por la agrupación de tejidos diferentes que concurren al desempeño de un trabajo fisiológico.

3.12 Prestador de servicios

Empresa autorizada para realizar una o varias de las siguientes actividades: recolección, transporte, acopio, tratamiento y disposición final de residuos peligrosos biológico-infecciosos.

3.13 Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI)

Son aquellos materiales generados durante los servicios de atención médica que contengan agentes biológico-infecciosos según son definidos en esta Norma, y que puedan causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.

3.14 Sangre

El tejido hemático con todos sus elementos.

3.15 SEMARNAT

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

3.16 SSA

Secretaría de Salud.

3.17 Separación

Segregación de las sustancias, materiales y residuos peligrosos de iguales características cuando presentan un riesgo.

3.18 Tejido

Entidad morfológica compuesta por la agrupación de células de la misma naturaleza, ordenadas con regularidad y que desempeñan una misma función.

3.19 Tratamiento

El método físico o químico que elimina las características infecciosas y hace irreconocibles a los residuos peligrosos biológico-infecciosos.

4. Clasificación de los residuos peligrosos biológico-infecciosos

Para efectos de esta Norma Oficial Mexicana se consideran residuos peligrosos biológico-infecciosos los siguientes:

4.1 La sangre

4.1.1 La sangre y los componentes de ésta, sólo en su forma líquida, así como los derivados no comerciales, incluyendo las células progenitoras, hematopoyéticas y las fracciones celulares o acelulares de la sangre resultante (hemoderivados).

4.2 Los cultivos y cepas de agentes biológico-infecciosos

4.2.1 Los cultivos generados en los procedimientos de diagnóstico e investigación, así como los generados en la producción y control de agentes biológico-infecciosos.

4.2.2 Utensilios desechables usados para contener, transferir, inocular y mezclar cultivos de agentes biológico-infecciosos.

4.3 Los patológicos

4.3.1 Los tejidos, órganos y partes que se extirpan o remueven durante las necropsias, la cirugía o algún otro tipo de intervención quirúrgica, que no se encuentren en formol.

4.3.2 Las muestras biológicas para análisis químico, microbiológico, citológico e histológico, excluyendo orina y excremento.

4.3.3 Los cadáveres y partes de animales que fueron inoculados con agentes enteropatógenos en centros de investigación y bioterios.

4.4 Los residuos no anatómicos

Son residuos no anatómicos los siguientes:

4.4.1 Los recipientes desechables que contengan sangre líquida.

4.4.2 Los materiales de curación, empapados, saturados, o goteando sangre o cualquiera de los siguientes fluidos corporales: líquido sinovial, líquido pericárdico, líquido pleural, líquido Céfal-Raquídeo o líquido peritoneal.

4.4.3 Los materiales desechables que contengan esputo, secreciones pulmonares y cualquier material usado para contener éstos, de pacientes con sospecha o diagnóstico de tuberculosis o de otra enfermedad infecciosa según sea determinado por la SSA mediante memorándum interno o el Boletín Epidemiológico.

4.4.4 Los materiales desechables que estén empapados, saturados o goteando sangre, o secreciones de pacientes con sospecha o diagnóstico de fiebres hemorrágicas, así como otras enfermedades infecciosas emergentes según sea determinado por la SSA mediante memorándum interno o el Boletín Epidemiológico.

4.4.5 Materiales absorbentes utilizados en las jaulas de animales que hayan sido expuestos a agentes enteropatógenos.

4.5 Los objetos punzocortantes

4.5.1 Los que han estado en contacto con humanos o animales o sus muestras biológicas durante el diagnóstico y tratamiento, únicamente: tubos

capilares, navajas, lancetas, agujas de jeringas desechables, agujas hipodérmicas, de sutura, de acupuntura y para tatuaje, bisturís y estiletes de catéter, excepto todo material de vidrio roto utilizado en el laboratorio, el cual deberá desinfectar o esterilizar antes de ser dispuesto como residuo municipal.

5. Clasificación de los establecimientos generadores de residuos peligrosos biológico-infecciosos

5.1 Para efectos de esta Norma Oficial Mexicana, los establecimientos generadores se clasifican como se establece en la tabla 1.

TABLA 1

NIVEL I	NIVEL II	
Unidades hospitalarias de 1 a 5 camas e instituciones de investigación con excepción de los señalados en el Nivel III. Laboratorios clínicos y bancos de sangre que realicen análisis de 1 a 50 muestras al día. Unidades hospitalarias psiquiátricas. Centros de toma de muestras para análisis clínicos.	Unidades hospitalarias de 6 hasta 60 camas; Laboratorios clínicos y bancos de sangre que realicen análisis de 51 a 200 muestras al día; Bioterios que se dediquen a la investigación con agentes biológico-infecciosos, o Establecimientos que generen de 25 a 100 kilogramos al mes de RPBI.	Unid cam Ceni expe infe Labo sang 200 Esta 100

5.2 Los establecimientos generadores independientes del Nivel I que se encuentren ubicados en un mismo inmueble, podrán contratar los servicios de un prestador de servicios común, quien será el responsable del manejo de los residuos peligrosos biológico-infecciosos.

6. Manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos

6.1 Los generadores y prestadores de servicios, además de cumplir con las disposiciones legales aplicables, deben:

6.1.1 Cumplir con las disposiciones correspondientes a las siguientes fases de manejo, según el caso:

- a)** Identificación de los residuos.
- b)** Envasado de los residuos generados.
- c)** Almacenamiento temporal.
- d)** Recolección y transporte externo.
- e)** Tratamiento.
- f)** Disposición final.

6.2 Identificación y envasado

6.2.1 En las áreas de generación de los establecimientos generadores, se deberán separar y envasar todos los residuos peligrosos biológico-infecciosos, de acuerdo con sus características físicas y biológicas

infecciosas, conforme a la tabla 2 de esta Norma Oficial Mexicana. Durante el envasado, los residuos peligrosos biológico-infecciosos no deberán mezclarse con ningún otro tipo de residuos municipales o peligrosos.

TABLA 2

TIPO DE RESIDUOS	ESTADO FISICO	ENVASADO
4.1 Sangre	Líquidos	Recipientes h
4.2 Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Sólidos	Bolsas de poli
4.3 Patológicos	Sólidos	Bolsas de poli
	Líquidos	Recipientes h
4.4 Residuos no anatómicos	Sólidos	Bolsas de poli
	Líquidos	Recipientes h
4.5 Objetos punzocortantes	Sólidos	Recipientes rígidospolipro

a) Las bolsas deberán ser de polietileno de color rojo traslúcido de calibre mínimo 200 y de color amarillo traslúcido de calibre mínimo 300, impermeables y con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, además deberán estar marcadas con el símbolo universal de riesgo biológico y la leyenda Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (Apéndice Normativo), deberán cumplir los valores mínimos de los parámetros indicados en la tabla 3 de esta Norma Oficial Mexicana.

Las bolsas se llenarán al 80 por ciento (80%) de su capacidad, cerrándose antes de ser transportadas al sitio de almacenamiento temporal y no podrán ser abiertas o vaciadas.

TABLA 3

PARAMETRO	UNIDADES	ESPECIFICACIONES
Resistencia a la tensión	Kg/cm ²	SL: 140 ST: 120
Elongación	%	SL: 150 ST: 400
Resistencia al rasgado	G	SL: 90 ST: 150

SL: Sistema longitudinal. ST: Sistema transversal.

6.2.2 Los recipientes de los residuos peligrosos punzocortantes deberán ser rígidos, de polipropileno color rojo, con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, que permitan verificar el volumen ocupado en el mismo, resistentes a fracturas y pérdidas

de contenido al caerse, destructibles por métodos físicos, tener separador de agujas y abertura para depósito, con tapa(s) de ensamble seguro y cierre permanente, deberán contar con la leyenda que indique "RESIDUOS PELIGROSOS PUNZOCORTANTES BIOLÓGICO-INFECCIOSOS" y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico (Apéndice Normativo).

a) La resistencia mínima de penetración para los recipientes tanto para punzocortantes como para líquidos, debe ser de 12.5 N (doce punto cinco Newtons) en todas sus partes y será determinada por la medición de la fuerza requerida para penetrar los lados y la base con una aguja hipodérmica calibre 21 x 32 mm mediante calibrador de fuerza o tensiómetro.

b) Los recipientes para los residuos peligrosos punzocortantes y líquidos se llenarán hasta el 80% (ochenta por ciento) de su capacidad, asegurándose los dispositivos de cierre y no deberán ser abiertos o vaciados.

c) Las unidades médicas que presten atención a poblaciones rurales, con menos de 2,500 habitantes y ubicadas en zonas geográficas de difícil acceso, podrán utilizar latas con tapa removible obotes de plástico con tapa de rosca, con capacidad mínima de uno hasta dos litros, que deberán marcar previamente con la leyenda de "RESIDUOS PELIGROSOS PUNZOCORTANTES BIOLÓGICO-INFECCIOSOS".

6.2.3 Los recipientes de los residuos peligrosos líquidos deben ser rígidos, con tapa hermética de polipropileno color rojo o amarillo, con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, resistente a fracturas y pérdidas de contenido al caerse, destructible por métodos físicos, deberá contar con la leyenda que indique " RESIDUOS PELIGROSOS LIQUIDOS BIOLÓGICO-INFECCIOSOS" y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico (Apéndice Normativo)

En caso de que los residuos líquidos no sean tratados dentro de las instalaciones del establecimiento generador, deberán ser envasados como se indica en la tabla 2 de esta Norma Oficial Mexicana.

6.3 Almacenamiento

6.3.1 Se deberá destinar un área para el almacenamiento temporal de los residuos peligrosos biológico-infecciosos.

Los establecimientos generadores incluidos en el Nivel I de la tabla 1 de esta Norma Oficial Mexicana, quedan exentos del cumplimiento del punto 6.3.5 y podrán ubicar los contenedores a que se refiere el punto 6.3.2 en el lugar más apropiado dentro de sus instalaciones, de manera tal que no obstruyan las vías de acceso.

6.3.2 Los residuos peligrosos biológico-infecciosos envasados deberán almacenarse en contenedores metálicos o de plástico con tapa y ser

rotulados con el símbolo universal de riesgo biológico, con la leyenda "RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO-INFECCIOSOS".

6.3.3 El periodo de almacenamiento temporal estará sujeto al tipo de establecimiento generador, como sigue:

(a) Nivel I: Máximo 30 días.

(b) Nivel II: Máximo 15 días.

(c) Nivel III: Máximo 7 días.

6.3.4 Los residuos patológicos, humanos o de animales (que no estén en formol) deberán conservarse a una temperatura no mayor de 4°C (cuatro grados Celsius), en las áreas de patología, o en almacenes temporales con sistemas de refrigeración o en refrigeradores en áreas que designe el responsable del establecimiento generador dentro del mismo.

6.3.5 El área de almacenamiento temporal de residuos peligrosos biológico-infecciosos debe:

a) Estar separada de las áreas de pacientes, almacén de medicamentos y materiales para la atención de los mismos, cocinas, comedores, instalaciones sanitarias, sitios de reunión, áreas de esparcimiento, oficinas, talleres y lavanderías.

b) Estar techada, ser de fácil acceso, para la recolección y transporte, sin riesgos de inundación e ingreso de animales.

c) Contar con señalamientos y letreros alusivos a la peligrosidad de los mismos, en lugares y formas visibles, el acceso a esta área sólo se permitirá al personal responsable de estas actividades.

d) El diseño, construcción y ubicación de las áreas de almacenamiento temporal destinadas al manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos en las empresas prestadoras de servicios, deberán ajustarse a las disposiciones señaladas y contar con la autorización correspondiente por parte de la SEMARNAT.

e) Los establecimientos generadores de residuos peligrosos biológico-infecciosos que no cuenten con espacios disponibles para construir un almacenamiento temporal, podrán utilizar contenedores plásticos o metálicos para tal fin, siempre y cuando cumplan con los requisitos mencionados en los incisos a), b) y c) de este numeral.

6.3.6 Los residuos peligrosos biológico-infecciosos podrán ser almacenados en centros de acopio, previamente autorizados por la SEMARNAT. Dichos centros de acopio deberán operar sistemas de refrigeración para mantener los residuos peligrosos biológico-infecciosos a una temperatura máxima de 4°C (cuatro grados Celsius) y llevar una bitácora de conformidad con el artículo 21 del Reglamento en materia de Residuos Peligrosos de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente. El tiempo de estancia de los residuos en un centro

de acopio podrá ser de hasta treinta días.

6.4 Recolección y transporte externo

6.4.1 La recolección y el transporte de los residuos peligrosos biológico-infecciosos referidos en esta Norma Oficial Mexicana, deberá realizarse conforme a lo dispuesto en los ordenamientos jurídicos aplicables y cumplir lo siguiente:

- a)** Sólo podrán recolectarse los residuos que cumplan con el envasado, embalado y etiquetado o rotulado como se establece en el punto 6.2 de esta Norma Oficial Mexicana.
- b)** Los residuos peligrosos biológico-infecciosos no deben ser compactados durante su recolección y transporte.
- c)** Los contenedores referidos en el punto 6.3.2 deben ser desinfectados y lavados después de cada ciclo de recolección.
- d)** Los vehículos recolectores deben ser de caja cerrada y hermética, contar con sistemas de captación de escurrimientos, y operar con sistemas de enfriamiento para mantener los residuos a una temperatura máxima de 4°C (cuatro grados Celsius).

Además, los vehículos con capacidad de carga útil de 1,000 kg o más deben operar con sistemas mecanizados de carga y descarga.

e) Durante su transporte, los residuos peligrosos biológico-infecciosos sin tratamiento no deberán mezclarse con ningún otro tipo de residuos municipales o de origen industrial.

6.4.2 Para la recolección y transporte de residuos peligrosos biológico-infecciosos se requiere la autorización por parte de la SEMARNAT. Dicho transporte deberá dar cumplimiento con los incisos a), b), d) y e) del numeral 6.4.1 de esta Norma Oficial Mexicana.

6.5 Tratamiento

6.5.1 Los residuos peligrosos biológico-infecciosos deben ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos y deben hacerse irreconocibles para su disposición final en los sitios autorizados.

6.5.2 La operación de sistemas de tratamiento que apliquen tanto a establecimientos generadores como prestadores de servicios dentro o fuera de la instalación del generador, requieren autorización previa de la SEMARNAT, sin perjuicio de los procedimientos que competan a la SSA de conformidad con las disposiciones aplicables en la materia.

6.5.3 Los residuos patológicos deben ser incinerados o inhumados, excepto aquellos que estén destinados a fines terapéuticos, de investigación y los que se mencionan en el inciso 4.3.2 de esta Norma Oficial Mexicana. En caso de ser inhumados debe realizarse en sitios autorizados por la SSA.

6.6. Disposición final

Los residuos peligrosos biológico-infecciosos tratados e irreconocibles, podrán disponerse como residuos no peligrosos en sitios autorizados por las autoridades competentes.

6.7 Programa de contingencias

Los establecimientos generadores de residuos peligrosos biológico-infecciosos y los prestadores de servicios deberán contar con un programa de contingencias en caso de derrames, fugas o accidentes relacionados con el manejo de estos residuos.

7. Grado de concordancia con normas y lineamientos internacionales y con las normas mexicanas tomadas como base para su elaboración

7.1 Esta Norma Oficial Mexicana no concuerda con ninguna Norma Internacional por no existir referencia en el momento de su elaboración, ni existen normas mexicanas que hayan servido de base para su elaboración.

8. Bibliografía

8.1 Althaus H, Sauerwald M, Schrammeck E. Hygienic aspects of waste disposal Zbl Bakt Mikr Hyg, I Abt Orig B. 1983; 178:1-29.

8.2 Anglin AM Collmer JE. Loving TJ. Beltran KA. Coyner BJ. Adal K. Jagger J. Sojka NJ, Farr BM. An outbreak of needlestick injuries in hospital employees due to needles piercing infectious waste containers. Infect Control Hosp Epidemiology 1995; 16:570-6.

8.3 Belkin NL. Medical Waste a minimal Hazard. Infect Control Hosp Epidemiol 1993; 13:75-76.

8.4 Brenniman GR. Allen RJ. Impact of repackaging hazardous (infectious) hospital waste on the indoor air quality of a hospital. Science of the Total Environment. 1993; 128:141-9.

8.5 Birnaum D. Medical Waste Applied Epidemiology. Letters to the Editor. Infect Control Hosp Epidemiol 1993; 14:7-8.

8.6 Cimino JA. Health and safety in the solid waste industry. Am J Public Health 1975; 65:38-46.

8.7 Collins CH. Treatment and disposal of clinical and laboratory waste. Med Lab Sci 1991; 48:324-31.

8.8 Crow S. Infectious waste. Infect Control Hosp Epidemiology 1984; 5:149-50.

8.9 Crow S. Dissolving the problem of infectious medical waste. Infect Control Hosp Epidemiology. 1996; 17:434-7.

8.10 Daschner FD. Chemical Disinfection of medical waste. Infect Control Hosp Epidemiology 1993; 14:306.

8.11 Daschner FD. Disinfection of Medical Waste. Letters to the Editor authors reply Infect Control Hosp Epidemiology 1993; 14:306.

8.12 Daschner FD. The Hospital and Pollution: Role of the Hospital Epidemiologist in Protecting the Environment. In Wenzel R. Prevention and

Control of Nosocomial Infection. Third edition William & Wilkins USA 1997; pag. 595-605.

8.13 Decker MD and Schaffer W. The relationship between the Hospital and the Community in Hospital Infection Bennnett JV and Brachman editors. Philadelphia 1998. Fourth edition Lypincott-Raven Press. pag 181-188.

8.14 Gardner JS, Favero MS. CDC Guideline for handwashing and hospital environmental control, 1985. Infect Control Hosp Epidemiology 1986; 7:231-33.

8.15 Gerberding JL. Limiting the risks of health care workers. In Sande MA and Volberding PA. The Medical Management of AIDS. W.B. Saunders Company. United States. Fifth edition 1997; pag. 75-85.

8.16 Gerberding JL. Management of occupational exposures to blood-borne viruses, N Engl J Med 1995; 332:444-51.

8.17 G.P. Youmans P. y Paterson H. Sommers. Manual de Infectología. Ed. Interamericana McGraw-Hill 1982; pág. 15.

8.18 Henderson DK et al. Risk for occupational transmission of HIV-1 associated with clinical exposures. Ann Intern. Med 1990; 113:740-746.

8.19 Honeycutt TW. Disinfection off Medical waste. Infect Control Hosp Epidemiol. 1993; 14:305-6.

8.20 Infective Waste in Occupational Health; section seven in Friede A, O'Carrol PW, Nicola RM, Teustch MW. in CDC Prevention Guidelines. Williams and Wilkins USA, 1997; pag. 1266-70.

8.21 Jager E, Xander L, Ruden H. Hospital wastesI. Communication: microbiological investigations of hospital wastes from various ward of a big and of smaller hospitals in comparison to household refuse Zbl Hyg. 1989; 188:343-364.

8.22 Keene JH. Medical Waste: A Minimal Hazard. Infect Control Hosp Epidemiol 1991; 12:682-5.

8.23 Ley General de Salud publicada en el **Diario Oficial de la Federación** el 7 de febrero de 1984 (última reforma 4 de junio de 2002).

8.24 Makosfshy D. Cone JE. Installing needle disposal boxes closer to the bedside reduces needle-recapping rates in hospital units. Infect Control Hosp Epidemiol. 1993; 14:140-4.

8.25 Mc Veigh P. OR nursing and environmental ethics. Medical Waste reduction, reuse and recycling. Today's OR-Nurse. 1993; 15:13-8.

8.26 Mose JR, Reinhaler F. Microbial contamination of hospital waste and household refuse. Zbl Bakt Mikr Hyg, I Abt Orig B. 1985:181-98-110.

8.27 Organización Panamericana de la Salud. Manual de Prevención y Control de Infecciones Hospitalarias en la serie HSP-UNI/Manual Operativo PALTEX, 1996, 4: pág. 87-90.

8.28 Petithory JC. De Loye J. Guesnu M. Pariente P. Milgram M. Tardy

M. Provoost JP. Prevention of AIDS transmission by syringes and needles in France and Africa. [French] Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine. 1989; 173(4):415-9.

8.29 Resnick et al. Stability and inactivation of HTLV III/LAV under clinical and laboratory environments JAMA 1986; 255:1887-1891.

8.30 Rutala WA, Sarubbi FA. Management of Infectious Waste from Hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol 1983; 4:198-201.

8.31 Rutala WA, Weber DJ. Infectious Waste. N Engl J Med 1991; 325:58378-582.

8.32 Rutala WC, Mayhall G. The Society for Hospital Epidemiology of America; Medical Waste Infect Control Hosp Epidemiology. 1991; 12:38-48.

8.33 Strain BA and Groschel DHM. Laboratory Safety and Infectious Waste management. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC editors. Manual of Clinical Microbiology. ASM Press Washington D.C. Fifth edition 1995; pag. 75-85.

8.34 Streed SA. The Medical Waste Condrum Revisited. Infect Control Hosp Epidemiol 1992; 13:385-6.

8.35 Thornton J, McCally M, Orris P, Weinberg J. Hospital and plastics. Dioxin prevention and medical waste incinerators. Public Health Reports. 1996; 111:299-313.

8.36 Volkow P, Jacquemin B, Vilar-Compte D, Castillo JR. Contact with blood and body fluids of hospital syringes. Implications for regulated medical waste. Salud Pública de México.

8.37 Volkow P, Rangel-Frausto S, Ponce de León Rosales S. Basura hospitalaria: comentarios sobre sus riesgos y su regulación. Enf Infec y Microbiol 1999; 19:1-4.

8.38 Weber DJ, Rutala WA. Environmental Issues and Nosocomial Infection in Wenzel R. Prevention and Control of Nosocomial Infection. Third edition William & Wilkins USA 1997; pag. 492-514.

8.39 Weinstein S, Kotilainen HR, Moore D, Gantz N. Microbiologic contamination of hospital trash from patients on isolation precautions versus standard care. Am J Infect. Control 1988; 16:76.

8.40 Who/PEP/RUD/94.1. General. Managing Medical Wastes in Developing Countries World Health Organization 1994.

8.41 Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Control Sanitario de la Disposición de Organos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos publicado en el **Diario Oficial de Federación** el 20 de febrero de 1985.

8.42 Censo de Universo de Trabajo 1999/INEGI/estimaciones CONAPO.

9. Observancia de esta Norma

9.1 La SEMARNAT, a través de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente y la SSA, a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios en el ámbito de sus respectivas atribuciones y competencias, vigilarán del cumplimiento de la presente Norma Oficial Mexicana de conformidad con las Bases de Colaboración que celebren entre SSA y SEMARNAT, mismas que se publicarán en el **Diario Oficial de la Federación**. Las violaciones a la misma se sancionarán en los términos de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, y su Reglamento en materia de Residuos Peligrosos, la Ley General de Salud y sus Reglamentos, así como los demás ordenamientos jurídicos aplicables.

9.2 Los gobiernos del Distrito Federal, de los estados y de los municipios, podrán realizar actos de vigilancia para la verificación del cumplimiento de esta Norma Oficial Mexicana, previa la publicación en el **Diario Oficial de la Federación** de los Acuerdos de Coordinación que se celebren con la SEMARNAT.

9.3 Dentro del marco de los Acuerdos de Coordinación para la Descentralización Integral de los Servicios de Salud, las entidades federativas verificarán el cumplimiento de esta Norma Oficial Mexicana.

TRANSITORIOS

PRIMERO.- Provéase la publicación de esta Norma Oficial Mexicana en el **Diario Oficial de la Federación**.

SEGUNDO.- La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor a los 60 días posteriores al de su publicación en el **Diario Oficial de la Federación**.

TERCERO.- Los establecimientos generadores de residuos peligrosos biológico-infecciosos deben cumplir con la fase de manejo señalada en el punto 6, a los 90 días posteriores al de la entrada en vigor de la presente Norma, tiempo en el cual seguirá surtiendo sus efectos legales en lo conducente la NOM-087-ECOL-1995.

CUARTO.- La presente Norma Oficial Mexicana **ABROGA a su similar NOM-087-ECOL-1995**, Que establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que presten atención médica, publicada en el **Diario Oficial de la Federación** el 7 de noviembre de 1995 **y su aclaración** publicada en el citado órgano informativo el 12 de junio de 1996.

México, Distrito Federal, a los veintidós días del mes de enero de dos mil tres.- El Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Medio Ambiente y Recursos Naturales, **Cassio Luiselli Fernández.-**

Rúbrica.- El Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización, de Regulación y Fomento Sanitario, **Ernesto Enríquez Rubio**.- Rúbrica.

APENDICE NORMATIVO
SIMBOLO UNIVERSAL DE RIESGO BIOLOGICO



BIOLOGICO-INFECCIOSOS

**RESIDUOS
PELIGROSOS**

Fecha de publicación: 17 de febrero de 2003

[Si quiere obtener una copia del texto completo, presione aquí](#)



ANEXO 2.

Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial **Recomendaciones para guiar a los médicos en la investigación biomédica** **en personas**

Adoptada por la 18 Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio de 1964 y enmendada por la 29 Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, octubre de 1975, la 35 Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, octubre de 1983 y la 41 Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, septiembre de 1989.

Introducción

Es misión del médico salvaguardar la salud de las personas. Su conocimiento y conciencia están dedicados al cumplimiento de esta misión. La Declaración de Ginebra de la Asociación Médica Mundial vincula al médico a la aseveración: «La salud de mi paciente será mi empeño principal», y el Código internacional de Ética Médica declara que «cuando un médico proporcione una asistencia médica que pudiera tener un efecto de debilitamiento del estado físico y mental del paciente el médico deberá actuar únicamente en interés del paciente». La finalidad de la investigación biomédica que implica a personas debe ser la de mejorar los procedimientos diagnósticos, terapéuticos y profilácticos y el conocimiento de la etiología y patogénesis de la enfermedad.

En la práctica médica actual, la mayoría de los procedimientos diagnósticos, terapéuticos o profilácticos implican riesgos. Esto rige especialmente en la investigación biomédica.

El progreso médico se basa en la investigación que, en última instancia, debe apoyarse en parte en la experimentación realizada en personas. En el campo de la investigación biomédica, debe efectuarse una diferenciación fundamental entre la investigación médica en la cual el objetivo es esencialmente diagnóstico o terapéutico para los pacientes y la investigación médica cuyo objetivo esencial es puramente científico y que carece de utilidad diagnóstica o terapéutica directa para la persona que participa en la investigación.

Deben adoptarse precauciones especiales en la realización de investigaciones que puedan afectar al medio ambiente, y debe respetarse el bienestar de los animales utilizados en la investigación. Puesto que es esencial que los resultados de las pruebas de laboratorio se apliquen a seres humanos para obtener nuevos conocimientos científicos y ayudar a la humanidad enferma, la Asociación Médica Mundial ha preparado las siguientes recomendaciones como guía para todo médico que realice investigaciones biomédicas en personas. Esta guía debería revisarse en el futuro. Debe destacarse que las normas tal como se describen constituyen únicamente una guía para los médicos de todo el mundo. Los médicos no quedan exonerados de las responsabilidades penales, civiles y éticas que recogen las leyes de sus propios países.

I. Principios básicos

1. La investigación biomédica que implica a personas debe concordar con los principios científicos aceptados universalmente y debe basarse en una experimentación animal y de laboratorio suficiente y en un conocimiento minucioso de la literatura científica.

2. El diseño y la realización de cualquier procedimiento experimental que implique a personas debe formularse claramente en un protocolo experimental que debe presentarse a la consideración, comentario y guía de un comité nombrado especialmente, independientemente del investigador y del promotor, siempre que este comité independiente actúe conforme a las leyes y ordenamientos del país en el que se realice el estudio experimental.

3. La investigación biomédica que implica a seres humanos debe ser realizada únicamente por personas científicamente cualificadas y bajo la supervisión de un facultativo clínicamente competente. La responsabilidad con respecto a las personas debe recaer siempre en el facultativo médicamente cualificado y nunca en las personas que participan en la investigación, por mucho que éstas hayan otorgado su consentimiento.

4. La investigación biomédica que implica a personas no puede llevarse a cabo lícitamente a menos que la importancia del objetivo guarde proporción con el riesgo inherente para las personas.

5. Todo proyecto de investigación biomédica que implique a personas debe basarse en una evaluación minuciosa de los riesgos y beneficios previsibles tanto para las personas como para terceros. La salvaguardia de los intereses de las personas deberá prevalecer siempre sobre los intereses de la ciencia y la sociedad.

6. Debe respetarse siempre el derecho de las personas a salvaguardar su integridad. Deben adoptarse todas las precauciones necesarias para respetar la intimidad de las personas y reducir al mínimo el impacto del estudio sobre su integridad física y mental y su personalidad.

7. Los médicos deben abstenerse de comprometerse en la realización de proyectos de investigación que impliquen a personas a menos que crean fehacientemente que los riesgos involucrados son previsibles. Los médicos deben suspender toda investigación en la que se compruebe que los riesgos superan a los posibles beneficios.

8. En la publicación de los resultados de su investigación, el médico está obligado a preservar la exactitud de los resultados obtenidos. Los informes sobre experimentos que no estén en consonancia con los principios expuestos en esta Declaración no deben ser aceptados para su publicación.

9. En toda investigación en personas, cada posible participante debe ser informado suficientemente de los objetivos, métodos, beneficios y posibles riesgos previstos y las molestias que el estudio podría acarrear. Las personas deben ser informadas de que son libres de no participar en el estudio y de revocar en todo momento su

consentimiento a la participación. Seguidamente, el médico debe obtener el consentimiento informado otorgado libremente por las personas, preferiblemente por escrito.

10. En el momento de obtener el consentimiento informado para participar en el proyecto de investigación, el médico debe obrar con especial cautela si las personas mantienen con él una relación de dependencia o si existe la posibilidad de que consientan bajo coacción. En este caso, el consentimiento informado debe ser obtenido por un médico no comprometido en la investigación y completamente independiente con respecto a esta relación oficial.

11. En el caso de incompetencia legal, el consentimiento informado debe ser otorgado por el tutor legal en conformidad con la legislación nacional. Si una incapacidad física o mental imposibilita obtener el consentimiento informado, o si la persona es menor de edad, en conformidad con la legislación nacional la autorización del pariente responsable sustituye a la de la persona. Siempre y cuando el niño menor de edad pueda de hecho otorgar un consentimiento, debe obtenerse el consentimiento del menor además del consentimiento de su tutor legal.

12. El protocolo experimental debe incluir siempre una declaración de las consideraciones éticas implicadas y debe indicar que se cumplen los principios enunciados en la presente Declaración.

II. Investigación médica combinada con asistencia profesional (Investigación clínica)

1. En el tratamiento de una persona enferma, el médico debe tener la libertad de utilizar un nuevo procedimiento diagnóstico o terapéutico, si a juicio del mismo ofrece una esperanza de salvar la vida, restablecer la salud o aliviar el sufrimiento.

2. Los posibles beneficios, riesgos y molestias de un nuevo procedimiento deben sopesarse frente a las ventajas de los mejores procedimientos diagnósticos y terapéuticos disponibles.

3. En cualquier estudio clínico, todo paciente, inclusive los de un eventual grupo de control, debe tener la seguridad de que se le aplica el mejor procedimiento diagnóstico y terapéutico confirmado.

4. La negativa del paciente a participar en un estudio jamás debe perturbar la relación con su médico.

5. Si el médico considera esencial no obtener el consentimiento informado, las razones concretas de esta decisión deben consignarse en el protocolo experimental para conocimiento del comité independiente (v. Principios básicos, punto 2).

6. El médico podrá combinar investigación médica con asistencia profesional, con la finalidad de adquirir nuevos conocimientos médicos, únicamente en la medida en que

la investigación médica esté justificada por su posible utilidad diagnóstica o terapéutica para el paciente.

III. Investigación biomédica no terapéutica que implique a personas (Investigación biomédica no clínica)

1. En la aplicación puramente científica de la investigación médica realizada en personas, es deber del médico seguir siendo el protector de la vida y la salud de la persona participante en la investigación biomédica.
2. Las personas participantes deben ser voluntarios, o bien personas sanas o pacientes cuya enfermedad no esté relacionada con el protocolo experimental.
3. El investigador o el equipo investigador debe suspender la investigación si estimasen que su continuación podría ser dañina para las personas.
4. En investigaciones en el hombre, el interés de la ciencia y la sociedad jamás debe prevalecer sobre consideraciones relacionadas con el bienestar de las personas.

CONAMMED