



SOLICITUD DE TÉRMINO DE SERVICIO SOCIAL

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
	8	1	2020		15	2	2021

Datos del Alumno

Nombre : **Brandon Michel San Luis Ramirez**

Matricula : **2152029208** Licenciatura : **Química Farmacéutica Biológica**

Domicilio : **Calle Niños Héroe s/n, Col. San Salvador Cuauhtenco, Del. Milpa Alta**

Teléfono : **5558626938** Celular : **5574441046**

Correo Electrónico : **brandonsanluisramirezgmail.com** CURP : **SARB960814HDFNMR03**

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : **Estandarizaci,on de un método de extracción y purificación de DNA de muestras de exudado cervicovaginal de mujeres embarazadas**

Lugar donde se realizó el Servicio Social : Laboratorio de Genética Molecular N-103 UAM-X y Unidad de Vinculación Científica de la Facultad de Medicina UNAM-Imagen

Dependencia : **Pública**

Entidad Federativa : **Distrito Federal**

Municipio : **Tlalpan** Localidad : **El Arenal**

Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	21	10	2019		21	4	2020

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: **3.- Público** Tipo: **1.- Externo**

Orientación: **10.- Otros**

FIRMAS

<p></p> <p>Dr. Alberto Ortega Vazquez 35583 Asesor Interno <small>Nombre, firma y No. Económico</small></p>	<p></p> <p>Dra. Noemí Meraz Cruz 5627331 Asesor Externo <small>Nombre, firma y No. Económico</small></p>
<p></p> <p>Brandon Michel San Luis Ramirez Alumno <small>Nombre, firma</small></p>	<p></p> <p>M. en C. Alma E. Ibarra Cázares 32807 Vo. Bo. de la Comisión <small>Nombre y firma de la persona que autoriza</small></p>



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Instituto Nacional de
Medicina Genómica
MÉXICO

Ciudad de México a 19 febrero de 2021

Oficio No: INMG-DED-SFA-053-2021

Asunto: Carta de término de Servicio Social

Mtra. María Elena Contreras Garfías

Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco
Presente.

Por este medio hago constar que el estudiante **Brandon Michel San Luis Ramírez**, con número de matrícula **2152029208**, alumno de la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, ha concluido satisfactoriamente una estancia académica de servicio social bajo la tutoría de la Dra. Noemí Meraz Cruz, Profesora Titular Adjunta de Tiempo Completo de la Unidad de Vinculación Científica Facultad de Medicina UNAM-Inmegen.

El periodo de su estancia fue del 21 de octubre de 2019 al 21 de abril de 2020, cubriendo un total de 480 horas en un periodo de seis meses.

Agradeciendo de antemano su atención a la presente, le envío un cordial saludo.

Atentamente



Lic. Alejandra Elizabeth Rangel Barajas
Responsable del Programa de Participación Estudiantil

C.c.p. Dra. Noemí Meraz Cruz.- Profesora Titular Adjunta de Tiempo Completo del Inmegen y Ttutora del alumno.-Presente.





SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Instituto Nacional de
Medicina Genómica
MÉXICO

Periférico Sur No. 4809, Col. Arenal Tepepan, CP. 14610, Alcaldía Tlalpan, CDMX
Tel: 55 5350 1900 www.inmegen.gob.mx



México, D.F. a 21 de Enero de 2021

DR. Juan Esteban Barranco Florido
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos
Presente.

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que el (la) alumno(a):

Brandon Michel San Luis Ramirez

Matrícula 2152029208 concluyó el proyecto de Servicio Social:


Estandarización de un método de extracción y purificación de DNA de muestras de exudado cervicovaginal de mujeres embarazadas

Que se realizó en: Unidad de vinculación Científica Facultad de Medicina UNAM-Inmegen y Laboratorio de Genética Molecular N-103

Ubicado en: Periférico sur 4809, Arenal Tepepan, Tlalpan CDMX

Del 21-October-2019 al 21-Abril-2020 bajo mi asesoría Cubriendo un total de 480 horas.

ATENTAMENTE


Dr. Alberto Ortega Vázquez
35583
Nombre y firma del asesor

c.c.p. Mtra. María Elena Contreras Garfias Director (a) de la División de CBS UAM-X

México, D.F. a 21 de Enero de 2021

DR. Juan Esteban Barranco Florido
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos
Presente.

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que el (la) alumno(a):

Brandon Michel San Luis Ramirez

Matrícula 2152029208 concluyó el proyecto de Servicio Social:

Estandarización de un método de extracción y purificación de DNA de muestras de exudado cervicovaginal de mujeres embarazadas

Que se realizó en: Unidad de vinculación Científica Facultad de Medicina UNAM-Inmegen y Laboratorio de Genética Molecular N-103

Ubicado en: Periférico sur 4809, Arenal Tepepan, Tlalpan CDMX

Del 21-October-2019 al 21-Abril-2020 bajo mi asesoría Cubriendo un total de 480 horas.

ATENTAMENTE



Dra. Noemí Meraz Cruz

Nombre y firma del asesor

Cédula profesional (**sólo asesor externo**)

5627331

c.c.p. Mtra. María Elena Contreras Garfias Director (a) de la División de CBS UAM-X



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura: Química Farmacéutica Biológica

Estandarización de un método de extracción y purificación de DNA de muestras de exudado cervicovaginal de mujeres embarazadas

Proyecto genérico: Evaluación de productos relacionados con la salud

Número de proyecto: FM-DI/064/2019

Lugar de realización: Laboratorio N-103 Planta Piloto UIDIS de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco y Unidad de Vinculación Científica de la Facultad de Medicina UNAM-INMEGEN

Presenta:

Brandon Michel San Luis Ramírez

Matricula: 2152029208

Asesor interno: Dr. Alberto Ortega Vázquez
No. económico 35583

Asesor externo: Dra. Noemí Meraz Cruz
Cédula profesional No.5627331

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Introducción	1
2. Resumen	2
3. Objetivos.....	2
3.1 Objetivo general	2
3.2 Objetivos específicos	2
4. Metodología	3
4.1 Búsqueda bibliográfica de los dos métodos de la extracción y purificación de DNA.	3
5. Colecta de la Muestra.....	3
5.1 Selección de pacientes	3
5.2 Técnica para la colecta de muestra	4
6. Protocolos de Extracción y Purificación de DNA	4
7. Desarrollo de las técnicas.....	5
7.1 Método de extracción cloroformo-alcohol isoamílico.....	6
7.2 Método de extracción comercial (<i>kit MoBio PowerSoil</i>)	7
8. Análisis cuantitativo (Espectrofotométrico)	8
9. Análisis cualitativo (Electroforesis por gel de agarosa).....	10
10. Discusión	11
11. Objetivos y metas alcanzadas	13
12. Conclusión	13
13. Recomendaciones	13
14. Bibliografía.....	14

1. Introducción

El parto pretérmino (PP) se define como aquel que ocurre después de las 20 semanas de gestación y antes de finalizar las 37 semanas, de acuerdo a la semana de gestación en que se realice el nacimiento, será la severidad del daño. La amenaza de PP en ocasiones está asociado a la presencia de contracciones uterinas regulares, asociadas también a modificaciones cervicales que ocurren en el mismo periodo de tiempo. Se sabe que el PP es un síndrome multifactorial y, frecuentemente, no es posible identificar la causa para que se presente. Sin embargo, la influencia que tienen factores como la genética, el riesgo epigenético y ambiental continúan en investigación (Quirós et al, 2016).

El PP representa un problema obstétrico y de salud pública, este contribuye hasta en un 70% a la mortalidad perinatal mundial, con alta morbilidad neonatal tanto inmediata como a largo plazo, manifestada esta última por secuelas (sobre todo neurológicas) que generan un gran costo para las familias, la sociedad, las instituciones y los gobiernos (Ramírez-Calvo et al, 2019). En México la tasa de PP es del 8.6%, siendo el 35% de estos los que ocurren de forma espontánea sin factores de riesgo asociados (Ramírez-Calvo et al, 2019).

Cabe destacar que investigaciones recientes detallan que la genética materna y fetal y las interacciones genético-ambientales, juegan un papel determinante en la duración de la gestación, los factores ambientales, incluido el microbioma, son los contribuyentes más importantes al PP (Strauss et al, 2018). El estudio del microbioma humano mediante la combinación de análisis metagenómicos y metatranscriptómicos permite una comprensión más acertada de las interacciones moleculares dentro de los microorganismos y su papel en la salud y la enfermedad humana. De estos análisis combinados también es posible la identificación de posibles genes que pueden asociarse con la salud y la enfermedad. Estos genes podrían explorarse como un objetivo potencial para tratar enfermedades asociadas al microbioma (Fettweis et al, 2019). Para un análisis metagenómico es importante la calidad de la obtención de DNA, el desarrollo de métodos moleculares ha creado la necesidad de implementar técnicas simples, eficientes y menos costosas para la extracción de este ácido nucleico. El aislamiento de DNA genómico debe cumplir con parámetros óptimos para su estudio genómico, obtener DNA con alto peso molecular, intacto y con el menor número de contaminantes es esencial para la aplicación de técnicas moleculares tales como RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción), hibridización, PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), electroforesis, DNA microarreglos y construcción de bibliotecas genómicas, entre otras. La selección de la entidad de estudio, el método de colecta y la extracción de DNA integran la fase inicial y fundamental para la preparación de bibliotecas de DNA, y aseguran el éxito en estudios de genómica (Tarqui et al, 2019).

2. Resumen

En el presente trabajo de investigación se llevó a cabo una búsqueda exhaustiva dentro de la literatura científica para lograr proponer un método de extracción y purificación de DNA, teniendo como punto de partida muestras de exudado cervicovaginal de mujeres embarazadas, tratando de que este método se pudiera realizar de una manera sencilla y eficiente para posteriores estudios relacionados. La propuesta fue comparar dos protocolos ya reportados en la literatura, un método de extracción tradicional (Cloroformo-Alcohol Isoamílico) y un método de extracción comercial (*kit MoBio PowerSoil*), además de estudiar las ventajas y desventajas que ofrece cada uno. Cabe destacar que para poder saber cuál de los dos protocolos planteados es el más idóneo, se debe realizar un análisis cuantitativo y cualitativo, estos deben cumplir ciertos criterios establecidos para poder asegurar la eficiencia del método de extracción y purificación del DNA. El método idóneo propuesto para trabajar con muestras de exudado cervicovaginal es mediante el *kit MoBio PowerSoil*, ya que este ofrece grandes beneficios como el hecho de que incluya el material necesario para todo el procedimiento, un menor tiempo para procesar la muestra y es relativamente sencillo de realizar. Pero depende principalmente de la infraestructura del laboratorio.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

- ✓ Proponer un método sencillo y eficiente para la extracción y purificación de DNA a partir de exudado cervicovaginal de mujeres embarazadas.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Estandarizar la técnica de colecta de muestra de exudados cervicovaginales de mujeres embarazadas.
- ✓ Colectar 20 muestras de exudados cervicovaginales de mujeres embarazadas en diferentes trimestres de gestación.
- ✓ Estandarizar el método de extracción de DNA a partir de 20 muestras de exudados cervicovaginales de mujeres embarazadas, utilizando el *kit MoBio PowerSoil*.
- ✓ Realizar el análisis cuantitativo de DNA de muestras de exudados cervicovaginales de mujeres embarazadas mediante espectrofotometría (NanoDrop).
- ✓ Realizar el análisis cualitativo de DNA de muestras cervicovaginales de mujeres embarazadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.
- ✓ Iniciar con la creación de un banco de DNA de muestras de exudados cervicovaginales de mujeres embarazadas.

4. Metodología

4.1 Búsqueda bibliográfica de los dos métodos de la extracción y purificación de DNA.

Para la realización de esta revisión bibliográfica se utilizaron diferentes herramientas de información tales como: Pubmed (*Nacional Center Biotechnology Information, NCBI*), guías de usuario de métodos moleculares, manual de técnicas moleculares, artículos de libre acceso en la red, etc.

5. Colecta de la Muestra

Para la realización de los dos métodos de extracción de DNA es importante considerar el siguiente método de colecta de la muestra para asegurar las condiciones ópticas de la misma para su posterior tratamiento.

5.1 Selección de pacientes

La toma de muestra se debe realizar bajo las consideraciones éticas establecidas por el Comité de Ética correspondiente.

La colecta de los exudados cervicovaginales de mujeres embarazadas se debe realizar de acuerdo a las recomendaciones de los criterios de inclusión y exclusión como a continuación se citan:

Inclusión:

- Mujeres de 18 a 36 años de edad en etapa de gestación a lactancia en las que se obtenga una muestra de DNA.
- Casos: Mujeres y sus productos con PP espontáneo.
- Controles: Mujeres y sus productos con parto espontáneo a término ambos, que acepten participar libremente en el estudio mediante la firma de la carta de consentimiento informado.

Exclusión:

Mujeres que hayan cursado su embarazo con:

- Gestación múltiple
- Preclamsia
- Sangrado vaginal
- Anomalías anatómicas uterinas
- Trombofilias
- Incompetencia cervicovaginal
- Virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV)/SIDA
- Enfermedades autoinmunes
- Placenta previa
- Diabetes gestacional
- Cáncer
- Polihidramnios
- Hábitos de tabaquismo y/o alcoholismo y/o toxicomanía

Eliminación:

- Madres que no acepten de forma voluntaria colaborar con el estudio

5.2 Técnica para la colecta de muestra

En un estudio realizado por Ashford et al. 2018 se detalla una metodología para llevar a cabo la colecta de muestras de exudados cervicovaginales.

Las pacientes se deben colocar en una posición ginecológica y se debe introducir un espéculo para visualizar el cuello uterino. Se tiene que recoger la muestra cervicovaginal barriendo el cuello uterino 360 grados con un hisopo de dacrón, este se tiene que mantener en el lugar durante 30 segundos para maximizar la saturación. Al retirar el hisopo, se obtiene una muestra vaginal haciendo un barrido de 360 grados en la cavidad vaginal / fondo de saco posterior. A continuación, se coloca el hisopo en el recipiente patentado, presionar firmemente contra la pared interior del tubo de recolección para asegurar la máxima filtración de fluido en el recipiente que debe contener una solución fisiológica para el aislamiento de DNA presente en la muestra y se asegura la tapa del vial. Todas las muestras se refrigeran inmediatamente y se transportan al laboratorio dentro de un lapso no mayor a 6 horas, donde se almacenan a -20 °C durante un mínimo de 24 horas. Para continuar con el proceso, las muestras se descongelan a 4 °C. Para el almacenamiento a largo plazo, se deben almacenar a -80 °C.

6. Protocolos de Extracción y Purificación de DNA

En esta investigación se revisaron dos métodos de extracción, uno tradicional que emplea solventes orgánicos (**cloroformo-alcohol isoamílico**) y un método comercial (**kit MoBio PowerSoil**), claramente la eficacia de cada protocolo varía con respecto al tipo de muestra a tratar. En esta investigación se analizó cada uno de los métodos para proponer cual método podría ser más idóneo, teniendo como punto de partida muestras de exudado cervicovaginal de mujeres embarazadas. La elección del método de extracción es un paso fundamental en los métodos moleculares y depende de la muestra bajo estudio, la cantidad de muestra disponible y su estado de conservación, la técnica que se aplica posteriormente, así como la infraestructura de los laboratorios, los recursos económicos y tiempo para obtener resultados. Independientemente del método seleccionado es recomendable encontrar un equilibrio entre pureza y rendimiento de acuerdo a la aplicación posterior. Se han diseñado métodos de extracción con el objetivo de eliminar potenciales riesgos para sus posteriores tratamientos. Existen también métodos tradicionales que emplean solventes orgánicos para realizar soluciones y el protocolo dura algunas horas o hasta varios días. Los protocolos tradicionales de extracción orgánica están basados en la solubilidad del DNA en agua y de los lípidos en cloroformo-alcohol isoamílico. Inicialmente, las células son disgregadas con detergentes para lisar las membranas y posteriormente debe producirse una digestión proteica con proteinasa K para la inactivación de las nucleasas celulares que podrían digerir el DNA. Esto asegura que la cantidad de DNA intacto obtenido sea la máxima. Subsecuentemente, el cloroformo-alcohol isoamílico es adicionado para separar del DNA los lípidos y las proteínas remanentes.

El DNA es purificado por precipitación con una mezcla de sales y etanol, y finalmente solubilizado en amortiguador de Tris y EDTA. La extracción de los ácidos nucleicos requiere la homogeneización de los tejidos y el lisado de las células. La homogeneización y la lisis celular deben ser lo suficientemente fuertes para disgregar el tejido y romper las membranas celulares pero suave para preservar los ácidos nucleicos (Janecka, et al., 2015).

A la fecha, se han incluido kits comerciales que ayudan a la extracción de DNA, evitan contaminaciones por manipulación ya que reducen el tiempo de extracción, sin embargo, los kits comerciales son mucho más costosos pero aseguran resultados de DNA íntegro y puro. Los kits de extracción utilizan matrices inorgánicas compactas cargadas positivamente capaces de retener varios microgramos de DNA y separarlos del resto de las biomoléculas, de esta forma se puede obtener un extracto libre de inhibidores. Los kits se venden en presentación de membranas de sílice o perlas magnéticas, las primeras están formadas de una resina y las segundas consisten de un centro de hierro recubierto por resina. La membrana esta insertada dentro de un microtubo de polipropileno y las microesferas se encuentran suspendidas en una solución amortiguadora. Durante la extracción, el DNA cargado negativamente se absorbe o une a la matriz selectiva de manera reversible y se mantiene unido a ésta durante la remoción de lípidos, proteínas y metabolitos secundarios posteriormente la molécula se libera de la matriz. Los kits también incluyen soluciones de lisis, unión y lavado que no contienen fenol ni cloroformo para extraer proteínas, tampoco requieren etanol para precipitar el DNA. Las muestras biológicas (muestras de biopsia de tejido, muestras de fluidos corporales, raspados de tejido, etc.) deben prepararse no solo para extraer y concentrar el DNA, sino también para eliminar proteínas, lípidos, polisacáridos y otros posibles inhibidores. La extracción de DNA consiste en el aislamiento, la purificación y la concentración de ácidos nucleicos en un producto eluido, y ahora se encuentran disponibles muchos sistemas comerciales que reemplazan los métodos internos en muchos laboratorios. Los diferentes hallazgos están corroborados por varios estudios previos que comparan los métodos de extracción de ácidos nucleicos manuales y comerciales en biología molecular. Se ha encontrado que los métodos de extracción manual eran comparables o menos sensibles que los métodos automatizados. Además, los resultados varían según las muestras analizadas (suspensiones microbianas puras o muestras biológicas). A pesar del uso de partículas magnéticas en todos los procedimientos automatizados evaluados, se sabe que sus rendimientos son desiguales (Yera et. al, 2009).

7. Desarrollo de las técnicas

En la **Fig. 1** y en la **Fig. 2** se describen de manera general los métodos sugeridos para llevar a cabo la extracción y purificación de DNA a partir de muestras de exudados cervicovaginales de mujeres embarazadas; se pretende detallar un método tradicional (**cloroformo-alcohol isoamílico**) y un método comercial (**kit MoBio PowerSoil**), que permitan identificar las características que ofrece cada uno, así como las ventajas y desventajas.

7.1 Método de extracción cloroformo-álcool isoamílico

De acuerdo al Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular Segunda edición (2019) se debe asegurar que el usuario utilice guantes en todo momento y que el área a trabajar se encuentre completamente estéril. El procedimiento puede tener modificaciones a conveniencia del usuario.

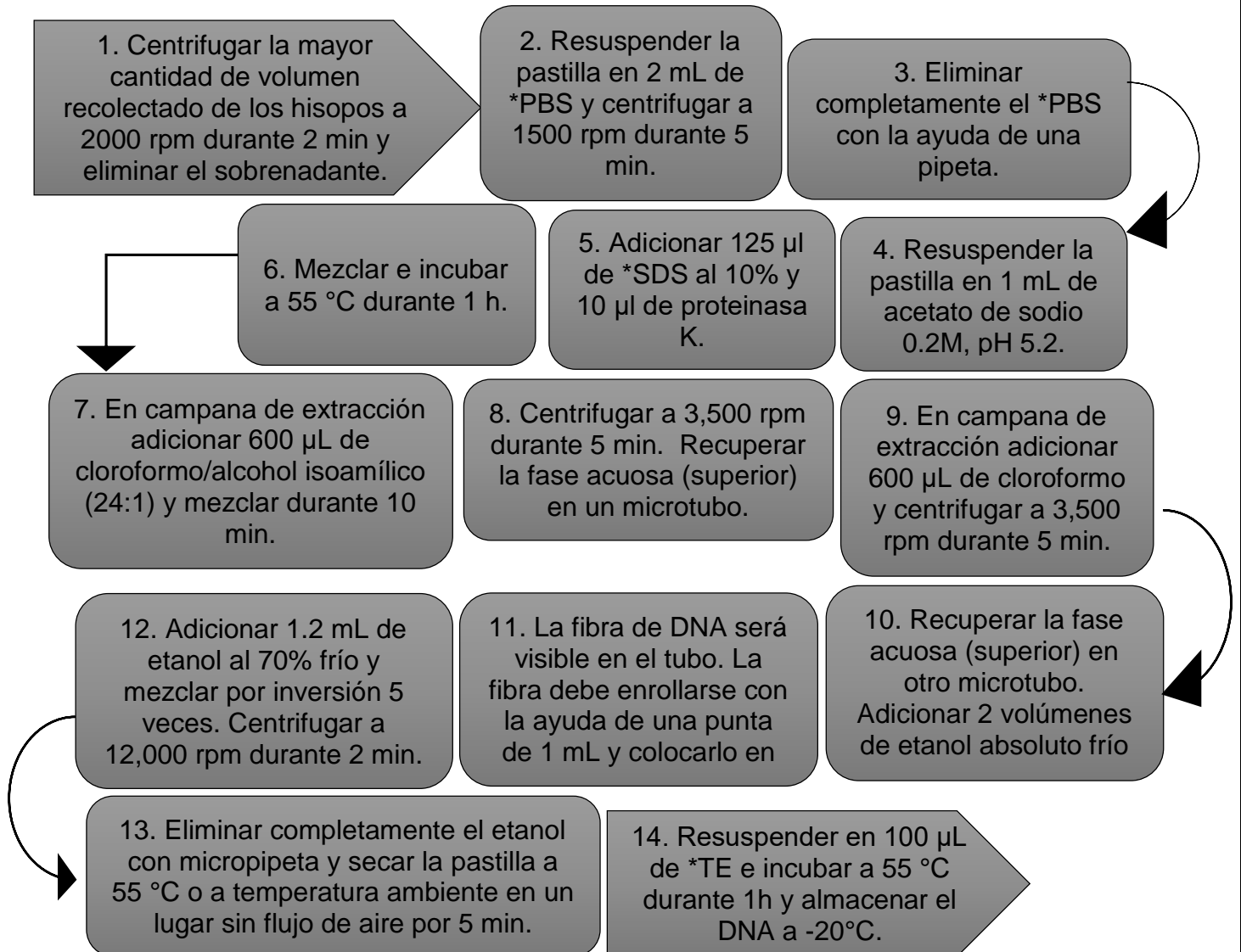


Fig.1. Diagrama de flujo para el aislamiento de DNA con cloroformo-álcool isoamílico. *Dodecil Sulfato Sódico (SDS), Buffer Fosfato Salino (PBS), Tris-EDTA (TE).

7.2 Método de extracción comercial (*kit MoBio PowerSoil*)

Fettweis et al. 2019, detallaron un estudio acerca del microbioma vaginal y el parto prematuro en el cual se llevó a cabo el aislamiento de DNA por medio del *kit MoBio PowerSoil* teniendo como punto de partida muestras de exudados cervicovaginales. La guía de usuario del *kit MoBio PowerSoil* detalla la metodología a seguir para el aislamiento de DNA, la cual se muestra a continuación:

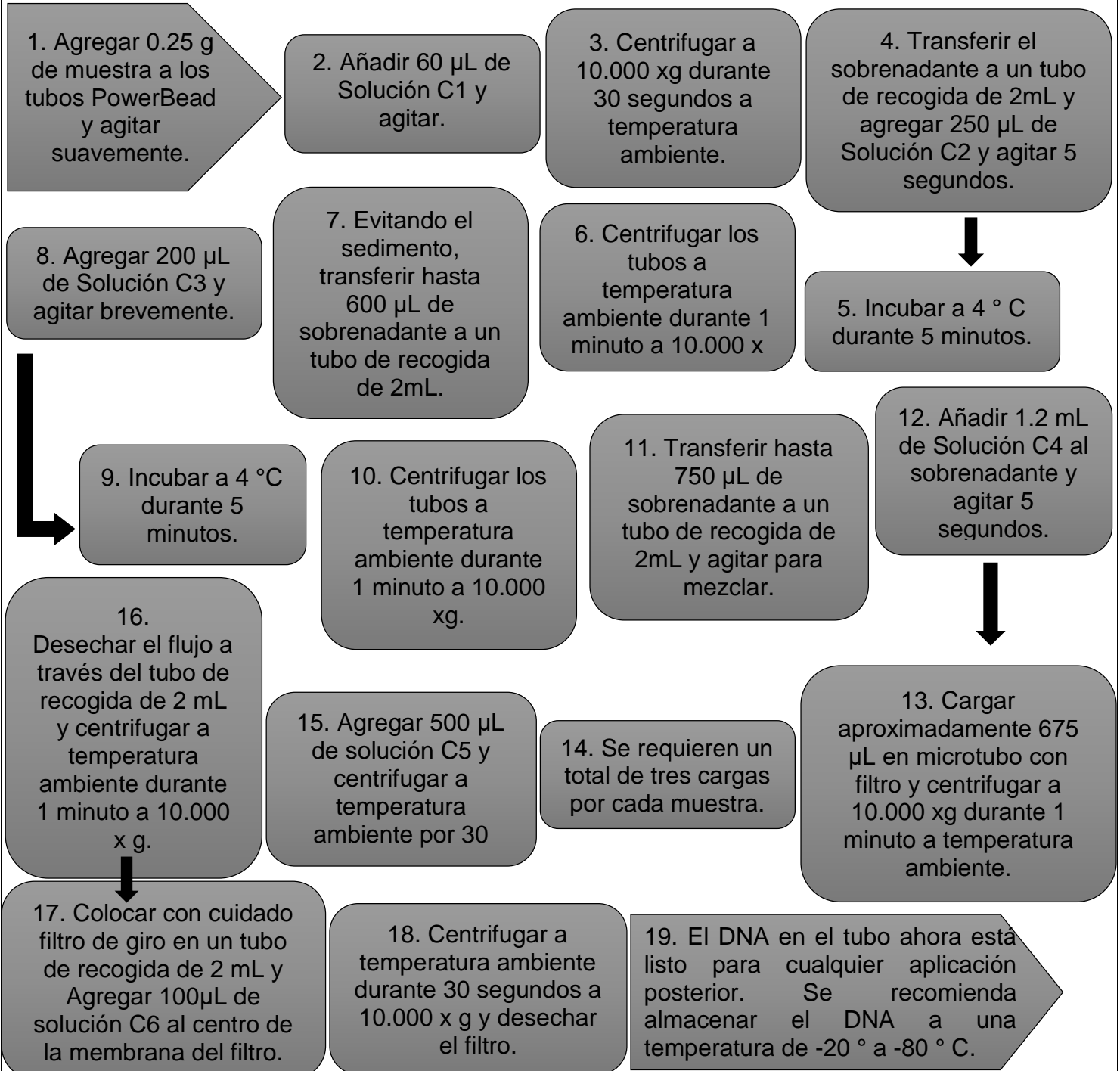


Fig. 2. Diagrama de flujo para el aislamiento de DNA con el *kit MoBio PowerSoil*.

Al elegir el método de extracción de DNA es importante realizar una evaluación detallada sobre las ventajas y desventajas que ofrece cada uno, principalmente si se trata de un método tradicional o un método comercial, en la **Tabla 1.** podemos observar de manera general las características que tiene cada método.

Tabla 1. *Ventajas y desventajas de los métodos tradicionales y comerciales de extracción y purificación de DNA.*

Condición	Métodos tradicionales	Métodos comerciales
Material inicial	Miligramos o gramos.	De 50 a 250 mg como máximo.
Uso de sustancias toxicas	En la mayoría de los protocolos.	Se evita utilizarlas.
Tiempo de proceso	Hasta varios días debido a los numerosos pasos a desarrollar.	Menor a 3 horas.
Integridad	Se requiere experiencia para evitar que el DNA se fragmente.	Generalmente se obtienen moléculas de DNA de alto peso molecular.
Rendimiento	Varios microgramos, aunque puede incluir moléculas de DNA fragmentadas.	Varios nanogramos pero en su mayoría con moléculas de DNA integras.
Inhibición enzimática	Los reactivos utilizados para la extracción fácilmente se acarrean con la muestra e interfieren con aplicaciones posteriores.	Poco frecuente si se siguen los pasos y cantidades recomendadas por el fabricante.
Automatización	Poco factible por los múltiples pasos y el uso de solventes corrosivos.	Altamente recomendable.
Costo	Bajo	Alto

Modificado de Velázquez, L. P. A., MdCA, M., & Romero, A. C. (2014). Extracción y purificación de DNA.

Una vez que el DNA ha sido aislado de manera exitosa se deben de realizar procedimientos que comprueben la calidad y cantidad de DNA obtenido. Para lo cual se requiere hacer un análisis cuantitativo y un análisis cualitativo.

8. Análisis cuantitativo (Espectrofotométrico)

Fundamento: Las longitudes de onda que se utilizan para evaluar la pureza relativa y la concentración de una muestra de DNA son 260 nm y 280 nm. Las proteínas absorben luz UV a 280 nm, debido en gran parte al anillo aromático del triptófano, la fenilalanina y la tirosina. Las bases nitrogenadas que forman parte de la estructura del DNA tienen la propiedad de absorber luz UV, con un máximo de absorción a 260 nm. De este modo la concentración de la muestra de DNA se calcula teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260nm.

Mientras que la relación de absorbancias A260/280 y A260/230 se utilizan para evaluar la pureza de las muestras que debe cumplir con ciertos criterios (**Tabla 2.**). La relación de las absorbancias es la que nos permite saber la pureza de la muestra, se sabe que la relación 260/280 es estable y nos indica un valor ideal de pureza entre 1.8 y 2.1 si el valor fuera menor sabríamos que existe contaminación. En cuanto a la relación 230/260 es más variables y sabemos que a 230nm se absorben contaminantes como carbohidratos, lípidos y cloroformo, por lo que se considera que un DNA es puro cuando la relación 230/260 tiene un valor entre 2 y 2.2, (Ríos-Sánchez et. al, 2016).

Tabla 2. *Parámetros y criterios de validez para el análisis cuantitativo.*

Técnica de análisis	Análisis	Parámetros	Criterios de validez
Espectrofotometría	A260/280	Pureza	≥1.8-2.1 Pureza óptima
			≥1.6-1.7 Pureza aceptable
			<1.6 DNA contaminado con compuestos aromáticos
	A260/230	Pureza	>2.1 DNA contaminado con RNA
			>2-2.2 Pureza óptima
			>1.8 Pureza aceptable
			<1.8 DNA contaminado con sales, fenol, hidratos de carbono...
			<1.5 DNA altamente contaminado con sales, fenol, hidratos de carbono...

Tomado de “Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de DNA. (Universidad de Salamanca). www.bancoadn.org”

9. Análisis cualitativo (Electroforesis por gel de agarosa)

Fundamento: La electroforesis es un método de separación basado en la movilidad de las biomoléculas en una fase líquida sometida a un campo eléctrico. Las moléculas que posean carga negativa migrarán hacia el polo positivo de un aparato electroforético y viceversa. La inclusión de una matriz sólida, además de la fase líquida, permite agregar un nuevo punto de separación y versatilidad en la electroforesis. De esta manera, no solo las biomoléculas pueden ser separadas por su carga, sino también por su tamaño podemos separar fragmentos de DNA y RNA, además de visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. Existen ciertos parámetros y criterios establecidos que comprueban si el análisis cualitativo demostró que el DNA se encuentra de forma óptima (**Tabla 3.**). Se puede además extraer del gel los fragmentos de DNA que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones (Peña-Castro et. al, 2013).

Tabla 3. *Parámetros y criterios de validez establecidos para el análisis cualitativo.*

Técnica de análisis	Parámetro	Criterios de validez
Electroforesis en gel de agarosa	Integridad del DNA	Banda definida en la parte superior del gel. Integridad alta
		Presencia simultánea de la banda en la parte superior del gel y un pequeño <i>smear</i> (frotis). Integridad adecuada
		Ausencia de banda definida y presencia de <i>smear</i> concentrado en la parte superior del gel. Parcialmente degradado
		<i>Smear</i> concentrado en la parte inferior del gel. Totalmente degradado

Tomado de “Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de DNA.”. (Universidad de Salamanca). www.bancoadn.org”

Es de gran importancia asegurarnos de que los ácidos nucleicos extraídos cumplen con los parámetros establecidos tanto de forma cuantitativa como cualitativa, la extracción de DNA íntegro y sin contaminantes es esencial para tener éxito en la obtención de datos genéticos, es el primer paso en la lista de técnicas moleculares que nos llevarán a comprender mejor y conservar la diversidad biológica a partir del conocimiento de genes y genomas que anteriormente era inaccesible para le

ecología y la evolución. Por otro lado, la cuantificación juega un papel importante para técnicas de análisis posteriores, por ejemplo, considerando que para una reacción de PCR se requieren de 10 a 200 ng debemos obtener al menos, 5 ng/ μ L de DNA en cada muestra, si se recuperaron 50 μ L, el rendimiento neto de la extracción sería de 0.25 μ g. Concentraciones menores dificultan la estandarización de la PCR u otras técnicas (Velázquez et. al, 2014).

10. Discusión

La colecta de la muestra y su manejo adecuado son indispensables para una extracción del DNA exitosa. Una colecta y manejo apropiado de la muestra permite obtener DNA íntegro y sin contaminantes. Las consideraciones más importantes para almacenar muestras de microbioma son reducir los cambios en la microbiota original desde la recolección de la muestra hasta el procesamiento y mantener las condiciones de almacenamiento consistentes para todas las muestras en un estudio. Las condiciones de almacenamiento de muestras no siempre son consistentes entre laboratorios debido a las aplicaciones posteriores y las limitaciones de recursos (Dorothy y Hofstaedter, 2017). A lo largo del tiempo se han diseñado distintos protocolos con la finalidad de obtener una cantidad y calidad de DNA adecuados, así como garantizar la eliminación de inhibidores potenciales que dificulten el tratamiento posterior de la molécula. Los métodos tradicionales, desarrollados en los años 50, utilizaban solventes orgánicos para separar a las proteínas del DNA y, una vez suspendido en la fase acuosa, aislarlo por precipitación con etanol, como se utiliza en el protocolo **cloroformo-alcohol isoamílico**. Estos métodos requieren la preparación de soluciones y la extracción se lleva desde unas horas hasta varios días por los numerosos pasos que deben realizarse, esta es una de sus principales desventajas. En general, los protocolos tradicionales consisten de cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del DNA. En ocasiones, la extracción con cloroformo no suele ser tan efectiva debido a que pueden quedar residuos, dado que estos exhiben una solubilidad similar al DNA y por lo tanto no son removidos eficientemente durante el proceso de extracción menciona (Sandoval-Arias, 2014) en un estudio de Extracción de DNA humano mediante dos métodos para la tipificación forense a partir de muestras fecales. A partir de los años 90 se introdujeron al mercado kits de extracción que utilizan matrices inorgánicas compactas cargadas positivamente capaces de retener varios microgramos de DNA y separarlos del resto de las biomoléculas (Velázquez et al, 2014). La selección correcta de un método de extracción depende de múltiples factores principalmente si se trata de un método tradicional o uno comercial ya que cada uno presenta sus ventajas y desventajas generales (**Tabla 1.**). Se han reportado diversos métodos de extracción que son relativamente sencillos y de bajo costo; una de ellas es el método de extracción ya mencionado (cloroformo-alcohol isoamílico), considerado uno de los más eficaces para cualquier tipo de muestra.

Por otro lado, se encuentran disponibles a nivel comercial otros productos para purificar el DNA, como es el caso del *kit MoBio PowerSoil* que cuenta con todos los materiales necesarios para realizar una extracción muy sencilla y en corto tiempo, aunque son reproducibles y se obtiene material de alta pureza y peso molecular, la principal limitante del uso de estos métodos es el costo; una técnica de extracción ideal es aquella que posee un número limitado de pasos, mínima utilización de disolventes peligrosos, requerimiento limitado de equipos y que sea relativamente económica. La extracción de DNA debe dar como resultado un DNA en condiciones óptimas para su posterior uso en procesos como son secuenciación, análisis de diversidad genética y estudio de patrones evolutivos. Mientras más estandarizado esté el proceso de extracción, la posibilidad de que existan errores en estas técnicas se minimiza y a su vez se maximiza la eficiencia del trabajo realizado (Ríos-Sánchez et al, 2016). La calidad del DNA purificado es un punto clave en la aplicación de diversas técnicas moleculares.

Los principales parámetros analizados después de una extracción son la pureza, la cantidad y la integridad; el análisis cuantitativo y cualitativo deben cumplir los criterios establecidos (**TABLA 2** y **3**) para así poder asegurar la eficiencia del método de extracción y purificación del DNA.

Mediante una búsqueda exhaustiva en la literatura científica se propone emplear el protocolo comercial con el *kit MoBio PowerSoil* como un protocolo estándar robusto y alternativo para la extracción de DNA de fluidos humanos en futuros estudios de metagenómica a gran escala. Sin embargo, se enfatiza que el desempeño de los protocolos de extracción probados en muestras fecales en un estudio realizado por (Yang et. al en 2020) debe evaluarse para su uso en otras muestras relacionadas con humanos (por ejemplo, saliva, piel, exudados, etc.) debido a la composición microbiana, así como las propiedades físicas y químicas de tales muestras. Por otro lado muchos estudios han demostrado cómo los diferentes procesos experimentales afectan los resultados y cómo la extracción de DNA afecta especialmente la caracterización cuantitativa de los componentes enfatizando la necesidad de un protocolo robusto y estandarizado para el perfil de la microbiota vaginal y así permitir una verdadera comparación entre los estudios. Es claro, que la confiabilidad de los resultados depende inicialmente de la calidad y cantidad de la muestra, se debe adecuar el método de aislamiento de DNA teniendo en cuenta el protocolo que se pretende utilizar, ya sea un método tradicional o comercial, este debe estar en óptimas condiciones. Se podría decir que el método idóneo para trabajar con muestras de exudado cervicovaginal es mediante el *kit MoBio PowerSoil* ya que este ofrece grandes beneficios como el hecho de que incluya el material necesario para todo el procedimiento, un menor tiempo para procesar la muestra y es relativamente sencillo de realizar. Pero depende de la infraestructura del laboratorio. Este proyecto tuvo como finalidad poder contribuir a la elección de un protocolo para el aislamiento de DNA, que este sea de gran utilidad para futuras investigaciones y así poder generar buenos resultados, teniendo como referencia los métodos moleculares utilizados en la actualidad (Ríos-Sánchez et al, 2016).

11. Objetivos y metas alcanzadas

Esta investigación demostró con base a una búsqueda exhaustiva dentro de la literatura científica una metodología idónea para la extracción y purificación de DNA de muestras de exudado cervicovaginal mediante una comparación de un protocolo comercial y uno tradicional. También, se consideró el método de recolección y almacenamiento de las muestras como parte fundamental para llevar a cabo de manera exitosa el aislamiento de DNA. El *kit MoBio PowerSoil* fue el método propuesto para ser utilizado en posteriores investigaciones similares por las características que ofrece.

12. Conclusión

El método comercial con el *kit MoBio PowerSoil* tiene más ventajas para la extracción de DNA de muestras de exudado cervicovaginal, por lo que este es el método que se propone como idóneo para ser utilizado en futuros estudios relacionados. Debido a la emergencia sanitaria por el nuevo coronavirus (SARS-COV2) iniciada en el mes de febrero en México del año 2020, este proyecto no se pudo llevar a cabo como fue planteado en su origen. La idea era recabar información de la literatura, buscando el método idóneo por diferentes características que se adecuara a la extracción y purificación de DNA extraído de muestras de exudado cervicovaginal de mujeres embarazadas y llevarlo a cabo de forma práctica en la Unidad de Vinculación Científica de la Facultad de Medicina en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). A causa del cierre obligatorio de instituciones públicas y privadas, se tomó la determinación de realizar solamente la primera parte del proyecto planteado, realizando una búsqueda exhaustiva en la literatura científica, para analizar ventajas y desventajas de algunos métodos de purificación de DNA reportados.

13. Recomendaciones

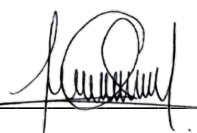
- Un buen protocolo de recolección de muestras de exudado cervicovaginal, facilita su posterior análisis, por tal motivo, se recomienda utilizar las medidas necesarias para evitar la contaminación de dichas muestras.
- Si las muestras recolectadas no se utilizan lo antes posible se recomienda mantener las muestras a temperaturas bajas con el fin de mantener la muestra en buen estado.
- Teniendo en cuenta la cantidad de muestra obtenida se recomienda adecuar el método de extracción y purificación de DNA con el *kit MoBio PowerSoil* a conveniencia del usuario.
- Si se desea almacenar el material genético obtenido, se recomienda mantenerlo a temperaturas bajas ya establecidas para evitar su degradación.

14. Bibliografía

1. Fettweis, J. M., Serrano, M. G., Brooks, J. P., Edwards, D. J., Girerd, P. H., Parikh, H. I., Huang, B., Arodz, T. J., Edupuganti, L., Glascock, A. L., Xu, J., Jimenez, N. R., Vivadelli, S. C., Fong, S. S., Sheth, N. U., Jean, S., Lee, V., Bokhari, Y. A., Lara, A. M., Mistry, S. D., ... Buck, G. A. (2019). The vaginal microbiome and preterm birth. *Nature medicine*, 25(6), 1012–1021. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0450-2>
2. Quirós González, G., Alfaro Piedra, R., Bolívar Porras, M., & Solano Tenorio, N. (2016). Amenaza de parto pretérmino. *Revista Clínica de la Escuela de Medicina de la Universidad de Costa Rica*, 6(1), 75-80.
3. Ramírez-Calvo, J. A., Lara-Guerrero, K. P., Velázquez-Torres, B., Gallardo-Gaona, J. M., Acevedo-Gallegos, S., & Camarena-Cabrera, D. M. (2019). Guía de práctica clínica. Prevención de parto pretérmino. *Perinatol Reprod Hum*, 33, 23-36.
4. Strauss JF y col. (2018). Parto prematuro espontáneo: avanza hacia el descubrimiento de la predisposición genética. *A.m. J. Obstet. Gynecol* 218 ,294–314.
5. Tarqui-Terrones, K., Silva-Molina, J. I., Beltrán-Fabián, M., Zevallos-Vara, S., & Mayta-Huatuco, E. (2019). Comparación de métodos de extracción de ADN de *Giardia* spp. medidos por PCR convencional. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 36, 423-432.
6. Velázquez, L. P. A., Martínez, M. D. C. A., & Romero, A. C. (2014). Extracción y purificación de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 1*.
7. Ríos-Sánchez, E., Calleros, E., González-Zamora, A., Rubio, J., Martínez, O. C., Martínez, A., ... & Pérez-Morales, R. (2016). Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. *Acta universitaria*, 26(4), 56-65.
8. Peña-Castro, J. M., Gregorio-Ramírez, O., & Barrera-Figueroa, B. E. (2013). Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educación química*, 24(2), 237-246.
9. Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN. (Octubre, 2020). (Universidad de Salamanca).2-10. www.bancoadn.org
10. Velázquez, L. P. A., Martínez, M. D. C. A., & Romero, A. C. (2014). Extracción y purificación de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 1*.
11. Dorothy, K. C., E, Hofstaedter. (2017). Optimizing methods and dodging pitfalls in microbiome research. *BioMed Central*.
12. Sandoval-Arias, S. M. (2014). Extracción de ADN humano mediante dos métodos para la tipificación forense a partir de muestras fecales en papel FTA. *Revista Tecnología en Marcha*, 27(4), ág-14.
13. Ashford, K., Chavan, N. R., Wiggins, A. T., Sayre, M. M., McCubbin, A., Critchfield, A. S., & O'Brien, J. (2018). Comparison of Serum and Cervical Cytokine Levels throughout Pregnancy between Preterm and Term Births. *AJP reports*, 8(2), e113–e120. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1656534>
14. World Leader in Soil DNA & RNA Isolation®. © 2014 MO BIO Laboratories, Inc. All Rights Reserv

15. Janecka, A., Adamczyk, A., & Gasińska, A. (2015). Comparison of eight commercially available kits for DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Analytical biochemistry*, 476, 8-10.
16. Yera, H., Filisetti, D., Bastien, P., Ancelle, T., Thulliez, P. y Delhaes, L. (2009). Evaluación multicéntrica comparativa de cinco métodos comerciales para la extracción de ADN de toxoplasma del líquido amniótico. *Revista de microbiología clínica* , 47 (12), 3881–3886. <https://doi.org/10.1128/JCM.01164-09>
17. Yang, F., Sun, J., Luo, H., Ren, H., Zhou, H., Lin, Y., Han, M., Chen, B., Liao, H., Brix, S., Li, J., Yang, H., Kristiansen, K. y Zhong, H. (2020). Evaluación de protocolos de extracción de ADN fecal para estudios metagenómicos. *GigaScience* , 9 (7), g1aa071. <https://doi.org/10.1093/gigascience/g1aa071>

Vo. Bo. del (la) o los (las) asesores (as) respecto a los contenidos académicos



Nombre y firma del asesor interno
Cargo: Profesor Asociado “D” TC
No. económico 35583



Dra. Noemi Meraz Cruz

Nombre y firma del asesor externo
Cargo: Profesora titular TC
Cédula profesional No.5627331