



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DEPARTAMENTO  
EL HOMBRE Y SU AMBIENTE  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL POR ACTIVIDADES  
RELACIONADAS A LA PROFESIÓN  
PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIADA EN BIOLOGÍA

**CAMBIOS EN EL METILOMA EN PACIENTES CON TRASTORNOS  
EN LA CONDUCTA ALIMENTARIA POR ABUSO SEXUAL**

**QUE PRESENTA LA ALUMNA:  
JIMENA HERNANDEZ OROZCO  
2193069708**

**ASESOR INTERNO:  
DR. JORGE CASTRO MEJÍA  
13817**

**ASESOR EXTERNO:  
DRA. ALMA DELIA GENIS MENDOZA**

## Resumen

Realice mi servicio social en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) en el Laboratorio de genómica de enfermedades psiquiátricas, a través de actividades teóricas y prácticas relacionadas con cambios en el metiloma en pacientes con trastornos en la conducta alimentaria por abuso sexual, además de eso también se trabajó en el procesamiento de muestras que eran traídas desde el "Hospital psiquiátrico infantil Navarro".

La epigenética es el estudio de los cambios que activan o inactivan los genes sin cambiar la secuencia del ADN, a causa de la edad y la exposición a factores ambientales (alimentación, ejercicio, medicamentos y sustancias químicas). Estos cambios modifican el riesgo de enfermedades y a veces pasan de padres a hijos (Thaler y Steiger, 2017)

El modelo epigenético es capaz de explicar la interacción existente entre dos factores, el ambiental y el genético, y su efecto en el desarrollo de los Trastornos de la Conducta Alimentaria (TCA) (Thaler y Steiger, 2017)

En cuanto a las muestras recolectadas en el Navarro, se procesaban y separaban en plasma, boffy coat y rojos, se hacía la extracción de ADN y cuantificación.

**Título del proyecto:** Cambios en el metiloma en pacientes con trastornos en la conducta alimentaria por abuso sexual (estudio teórico)

**Lugar de realización:** Laboratorio de genómica de enfermedades psiquiátricas del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)

## Marco institucional de INMEGEN

### a) Misión

Contribuir a la salud de la población de México, mediante la investigación, la formación de recursos humanos, así como la vinculación con el sector productivo para acelerar el acceso a bienes y servicios innovadores que elevan los niveles en la calidad de vida de los mexicanos e impulsen una cultura de prevención que ayude a disminuir los costos en salud. Todo esto regido por investigación de punta para desarrollar nuevas tecnologías enfocadas en la detección oportuna de las enfermedades más frecuentes en México.

### b) Visión

Hacia el año 2024, el INMEGEN será el referente nacional e internacional de investigación, desarrollo de políticas públicas e innovación en la salud preventiva. Sentando precedente de cómo la investigación en genómica

puede tener un impacto directo en la toma de decisiones que cambien el panorama de las enfermedades que más afectan a México.

### c) Objetivos

#### General:

Ser el espacio donde el conocimiento y la aplicación de la ciencia genómica se potencian para crear soluciones para el beneficio de la salud en México. El INMEGEN se consolidará como un referente nacional e internacional en la investigación, formación de recursos humanos y desarrollo de soluciones innovadoras que impulsarán políticas públicas para la prevención de las enfermedades de mayor incidencia en México.

#### Específicos:

- Formar recursos humanos líderes en investigación y en la traslación del conocimiento dentro del campo de las ciencias “ómicas”, sus aplicaciones biomédicas y medicina de precisión, a través de la cooperación interinstitucional con Universidades Nacionales e Internacionales.
- Coordinar las acciones para garantizar el correcto funcionamiento de los equipos biotecnológicos, biomédicos, de laboratorio y tecnologías de la comunicación y telecomunicaciones.
- Contribuir al desarrollo de la Bioinformática en el INMEGEN a través del desarrollo de herramientas web públicas, aplicadas a la cobertura en salud.
- Establecer alianzas con instituciones dedicadas a la investigación, así como académicas y con el sector industrial, con el fin de incrementar la capacidad para proveer soluciones metodológicas de diagnóstico, pronóstico y manejo clínico en materia de medicina genómica para todas las especialidades del Sector Salud.
- Priorizar las líneas de investigación enfocadas a la prevención y la identificación de riesgos de las condiciones de salud que más aquejan a nuestra población, como lo son: Diabetes Mellitus, Hipertensión, Cardiopatías, Enfermedad Psiquiátricas y Neurológicas y Cáncer.
- Desarrollar investigación científica y tecnológica aplicada a la medicina genómica y de precisión orientada a la solución de los problemas de salud pública de México, con énfasis en los aspectos preventivos de las enfermedades.

## Introducción

Decidí realizar mi servicio social en el estudio de la relación que pueda existir entre abuso sexual y un TCA. Este proyecto está evaluado y dictaminado en el Hospital Psiquiátrico Infantil Dr. Juan N. Navarro, donde se colectaron 44 pacientes de las cuales se obtuvieron 3 tipos de muestras diferentes (sangre, orina y heces) a través de la residente en psiquiatría Fernanda Cuervo, quien realizaba las evaluaciones y obtenía las muestras. Mismas que yo llevaba al laboratorio para su procesamiento.

La epigenética se refiere a los cambios heredables sin alteraciones en la secuencia de nucleótidos y modifican en la estructura y condensación de la cromatina, afectando la expresión genética y el fenotipo, las modificaciones epigenéticas más estudiadas son la metilación del ADN y modificaciones de histonas (García et al., 2012). La mayoría de los estudios publicados que examinan las alteraciones epigenéticas en los TCA se centran en el papel de la metilación del ADN, mecanismo influenciado por diversos factores ambientales. La metilación del ADN implica la adición de un grupo metilo a las regiones genómicas en las que la citosina es seguida por una guanina, comúnmente llamadas islas CpG (Thaler y Steiger, 2017). La epigenética trata de explicar cómo diversos factores ambientales pueden "activar" la preexistente vulnerabilidad genética a cierto trastorno.

Durante años, la etiología de los TCA fue atribuida a factores ambientales. A día de hoy, se sabe que éstos influyen en el desarrollo de los TCA pero que no causan estos trastornos por sí solos, entrando en juego otros factores como los genéticos; diferentes estudios han otorgado importancia a estos factores genéticos en los TCA, estimando una heredabilidad del 28-84% (Bulik, 2005). El modelo epigenético es capaz de explicar la interacción existente entre dos factores, el ambiental y el genético, y su efecto en el desarrollo de los Trastornos de la Conducta Alimentaria (TCA). Específicamente, en esta última década se ha prestado especial atención a mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN, mecanismo influenciado por diversos factores ambientales que tiende a reducir la expresión génica (Thaler y Steiger, 2017).

Se han reportado diferentes genes asociados a los TCA, como lo son (5-HT<sub>2A</sub>-LPR) el cual está asociado con bulimia nerviosa, el gen de la monoamina oxidasa ha sido también implicado en la obesidad y como gen de riesgo de padecer algún TCA (Urwin & Nunn, 2005) en el gen 5-HT<sub>2A</sub> se localiza en la región cromosómica 13q14–21, los genes UCP-2 y UCP-3 se localizan en la región cromosómica 11q13 los cuales son

candidatos para conferir vulnerabilidad biológica en la anorexia nerviosa (González et.,al 2003)

El abuso sexual es uno de los factores de riesgo para generar un TCA, según diferentes estudios, entre el 20% y el 50% de pacientes con TCA han sufrido un abuso sexual (Nolasco et.,al 2021)

Durante años, la etiología de los TCA fue atribuida a los factores ambientales, tanto anteriores como posteriores al nacimiento (estrés, abuso infantil). Hoy en día, se sabe que estos influyen en el desarrollo de los TCA, pero no causan estos trastornos por si solos, entrando en juego otros factores como los genéticos (Bulik, 2005)

### Objetivo general

Realizar un análisis teórico sobre los cambios en el metiloma que pueden existir en pacientes con trastornos de la conducta alimentaria por abuso sexual.

### Objetivos específicos

- Investigar los cambios del metiloma tras la relación de TCA y abuso sexual
- Analizar que genes están más expuestos a la modificación del metiloma, mediante los sitios CPGs en pacientes con diagnóstico de TCA y abuso sexual

### Criterios de inclusión

Se invito a participar a niñas con diagnóstico de TCA o conductas alimentarias de riesgo, que hayan referido tener abuso sexual. Se buscaron en la clínica de PAINAVAS, que es un Programa de Atención Integral a Niños y Adolescentes Víctimas de Abuso Sexual, del Hospital Psiquiátrico Infantil "Navarro", a las cuales se les solicito 3 tipos de muestras, una muestra de sangre, orina y heces, para después poder analizarlas y obtener el metiloma y ADN.

### Criterios de exclusión

Pacientes que no deseen donar las muestras biológicas  
Pacientes cuyos padres no aceptaron que su hija participara en el estudio

### Procedimiento

Se les invito a participar

1. Firma de consentimiento de los padres y asentimiento de las menores de edad

2. Aplicación de cuestionarios, contestados por las madres, con el motivo de saber si ellas también habrían sufrido algún tipo de abuso, se dividirán en dos grupos, madres que sufrieron abuso y un TCA, y madres que no sufrieron abuso, pero si un TCA
  3. Obtención de muestras biológicas
    - Muestra de sangre: Se extrajo sangre mediante punción venosa periferia de las participantes, guardando estas muestras en tubos Vacutainer de 5 mL, obteniendo 4 ml de sangre.
    - Muestra de orina: En un frasco de 50 mL se les pidió dar 20 mL de orina
- Muestra de heces: Para esta última muestra se les dio un tubo donde guardaron dicha muestra, la cual es solicitada que sea del tamaño de una almendra

### Resultados (con respecto a la población reclutada)

- De los 44 pacientes, el sexo predominante es la mujer, siendo solamente 1 hombre el reclutado para el proyecto
- La distribución por edades de la población fue de 14.4
- 25 (56.81%) de los pacientes tienen escolaridad de secundaria, siendo la más sobresaliente, 14 (31.81%) de los pacientes estudia el bachillerato, 4 (9.09%) la primaria y solamente 1 (2.27%) paciente no estudia
- Hospitalización es el servicio por donde entraron 34 (77.27%) de los pacientes reclutados, 6 (13.63%) entraron por urgencias y 4 (9.09%) por consulta externa

### Características demográficas de las muestras

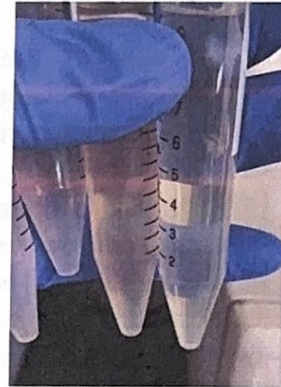
		N-44	Porcentaje %
<b>Sexo</b>	Mujer	43	97.72%
	Hombre	1	2.27%
<b>Edad (años)</b>	Media	14.4	
	DE	+/- 1.85	
<b>Escolaridad</b>	Primaria	4	9.09%
	Secundaria	25	56.81%
	Bachillerato	14	31.81%
	No estudia	1	2.27%
<b>Servicio</b>	Hospitalización	34	77.27%
	Urgencias	6	13.63%
	Consulta externa	4	9.09%

Los pacientes con cuidadores con antecedentes de abuso sexual antes de los 18 años reportaron mayor variedad de alteraciones en la conducta alimentaria, así como mayor reporte de estrés postraumático y episodio depresivo grave.

## Actividades

### 1. Extracción de ADN

La extracción de ADN requiere una serie de etapas básicas. En primer lugar, tiene que romperse la membrana plasmática para poder acceder al núcleo de la célula, y posteriormente romperse también la membrana nuclear para dejar libre el ADN, para obtener la ruptura de estas membranas se utilizan detergentes y surfactantes. La lisis de las células se consigue mediante la adición de tampones con concentraciones elevadas de iones que ayudan a romper la estructura tridimensional de macromoléculas como las proteínas y que forman parte de su estructura celular. La adición de un detergente como el SDS (Dodecil Sulfato Sódico) es necesaria a menudo para eliminar las membranas. Generalmente, el ADN se encuentra asociado a proteínas, por lo que se suele añadir proteasas al tampón de extracción, a la vez que usamos el acetato (amónico o sódico) para precipitar dichas proteínas. El ADN es insoluble en alcohol, por lo que se puede precipitar con etanol frío o isopropanol y recuperar mediante un proceso de centrifugación. El sedimento o pellet resultante se puede re-suspender posteriormente en agua o tampón tras ser secado completamente. La confirmación de la presencia de ADN se lleva a cabo mediante electroforesis en un gel de agarosa y que posteriormente se tiñe con Gel Red o Midori Green y observación con luz UV. También se puede detectar directamente al espectrofotómetro mediante espectro de absorción de 200 a 350nm. El ADN purificado se cuantifica con un espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 260nm de longitud de onda. O midiendo directamente las concentraciones en un Nanodrop (Tuya, 2016) Para la extracción de ADN se utilizaron las muestras obtenidas de las pacientes, se tomó una muestra de sangre utilizando un tubo de EDTA; posteriormente se va a extraer ADN de esa muestra. Se usará el método de sal del kit comercial Gentra Puregene Blood (Qiagen, Germantown, MD, EE. UU.) La calidad y la integridad de la extracción de ADN se evaluará mediante un análisis con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermofisher, Waltham, MA, EE.UU.) (Nolasco, et.,al 2021)



## 2. Metilación



La metilación del ADN es un proceso epigenético que participa en la regulación de la expresión génica de dos maneras, directamente al impedir la unión de factores de transcripción, e indirectamente propiciando la estructura "cerrada" de la cromatina. El ADN presenta regiones de 1000-1500 pb ricas en dinucleótidos CpG ("islas CpG"), que son reconocidas por las

enzimas ADN-metiltransferasas, las cuales, durante la replicación del ADN metilan el carbono 5 de las citosinas de la cadena recién sintetizada, manteniéndose así la memoria del estado metilado en la molécula hija de ADN. En general se considera que la metilación es un proceso unidireccional, de esta manera, cuando una secuencia CpG adquiere metilación de *novo*, esta modificación se hace estable y es heredada como un patrón de metilación clonal (Mesa, 2006)

Para el análisis de metilación, el ADN se convertirá con bisulfito utilizando un EZ Kit de metilación de ADN (Zymo Research, Irvine, CA, EE. UU.). El ADN convertido será hibridado con Infinium Mmethylation EPIC BeadChip (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.)

Las intensidades de fluorescencia del microarray MethylationEPIC se transformará en archivos idat, que se filtrarán con la tubería ChAMP (v.2.18) [18] para R (v. 4.0) software. Se eliminó el control de calidad: (1) sondas con un valor de detección de  $p > 0,01$ , (2) sondas con  $< 3$  cuentas en al menos el 5% de las muestras por sonda, (3) sondas no CpG. (4) sondas multihit, (5) sondas ubicadas en el cromosoma X e Y, y (6) individuos con discrepancia de sexo en sus datos de genotipificación. Los datos se convertirán de metilación filtrados en valores B, que se normalizarán utilizando el método BMIQ (Beta-Mixture Quantile Normalization) (Nolasco, et.,al 2021)

Se hicieron otras actividades durante los 6 meses de servicio social, las cuales fueron, separación de buffy, rojo y plasma, lavado celular y cuantificación.

### 1. Separación

Esta separación de buffy coat, plasma y rojos, sucede en 6 tubos de sangre provenientes del "Hospital psiquiátrico Infantil Navarro", la sangre entera es centrifugada 15 min a 4500 rpm, los componentes se separan por la diferencia de

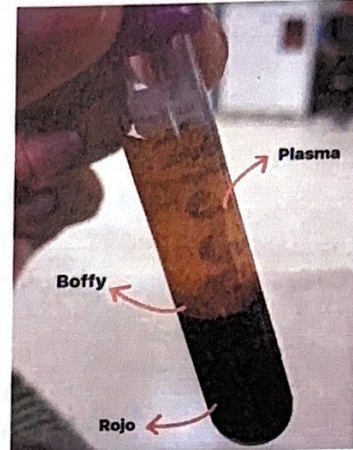


densidad de cada uno de ellos, terminado el tiempo se separa el plasma en 10 tubos eppendorf, de la misma manera se separa el buffy coat y los globulos rojos, de los cuales se van a obtener dos muestras de cada uno.

**Plasma:** Es el componente líquido de la sangre en el que están suspendidos los glóbulos rojos, los leucocitos y las plaquetas.

**Buffy coat o capa leucocitaria:** Componente intermedio obtenido de una unidad de sangre total por centrifugación a alta velocidad que contiene la mayoría de los leucocitos y plaquetas de esa unidad.

**Globulos rojos:** Tipo de glóbulo sanguíneo (célula de la sangre) que se produce en la médula ósea y se encuentra en la sangre. Los eritrocitos contienen una proteína llamada hemoglobina, que transporta oxígeno desde los pulmones a todas las partes del cuerpo.



## 2. Lavado celular (RBC)



Este método se utiliza para aislar los leucocitos de la sangre total, se empieza por utilizar dos tubos de sangre (los cuales ya pasaron por el proceso de separación) este método sucede gracias a un reactivo principal, que es la solución de lisis de eritrocitos (RBC). La solución de lisis de glóbulos rojos lisa selectivamente los eritrocitos dejando los leucocitos. Los leucocitos resultantes pueden ser fácilmente lisados y procesados cuando se aísla ácido nucleico con

los kits de aislamiento de ARN y ADN de BI: EZ-RNA (Cat. no. 20-400-10), EZ-DNA (Cat. no. 20-600-50), o con cualquier otro método para aislamiento de ácido nucleico de sangre entera (MedicalExpo, s.f)

Para realizar este método se ocupan dos tubos de sangre previamente ya separados, a estos se les agregan 3 ml de RBC y ambos tubos se vierten en un solo tubo falcon de 15 ml, después se les da un pequeño vortex, se incuba la muestra por 10 min y se mete a la centrifugadora por 15 min a 4000 rpm. Terminado el tiempo se sacan de la centrifuga y se desecha el sobrenadante y se agrega solución de RBC hasta los 6 ml del tubo, se mantiene 10 min en

temperatura ambiente y se vuelve a centrifugar por el mismo tiempo y con las mismas revoluciones. Nuevamente terminado el tiempo se vuelven a sacar de la centrifuga se desecha el sobrenadante y finalmente se agregan 3-4 ml de lisis celular.

### 3. Cuantificación

Para este método se utilizó un NanoDrop® de Thermo Fisher el cual es capaz de determinar las concentraciones promedio de los ácidos nucleicos de ADN o ARN presentes en una mezcla, así como su pureza.

Cada molécula absorbe la energía radiante a una longitud de onda específica, a partir de la cual es posible extrapolar la concentración de un soluto en una solución (Website Thermo Scientific, s.,f) Durante el proceso de extracción, las muestras de ácido nucleico se pueden contaminar con otras moléculas (proteínas, compuestos orgánicos, etc).

Una de las ventajas de usar el análisis espectrofotométrico es la capacidad de determinar la pureza de la muestra usando la relación de absorbancia a 260nm y 280nm ( $A_{260}/280$ ): **ADN puro:**  $A_{260}/280 \sim 1.8$

Estas proporciones se usan para evaluar la presencia de contaminantes después del proceso de aislamiento de ácido nucleico, ya que las proteínas y fenol absorben a 280 nm (absorbancia < 1.6). Si la relación es > 2.1, indica contaminación del ADN con ARN.

Otra relación a tener en cuenta es  $A_{260}/230$ , que debería > 2.0. Si fuese inferior se debería a contaminación por compuestos orgánicos: EDTA, TRIzol, derivados de guanidina, fenoles, sales caotrópicas o hidratos de carbono (mas adelante se podrán ver unas muestras ya analizadas) (Website Thermo Scientific, s.,f)

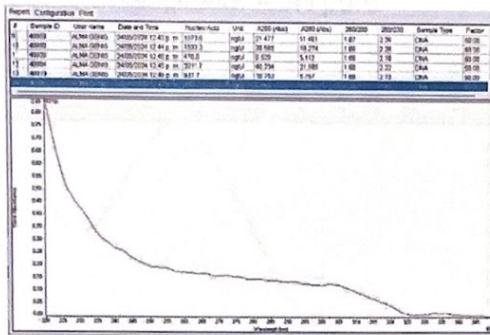


### Vínculo de las actividades desarrolladas con los objetivos de formación del plan de estudios

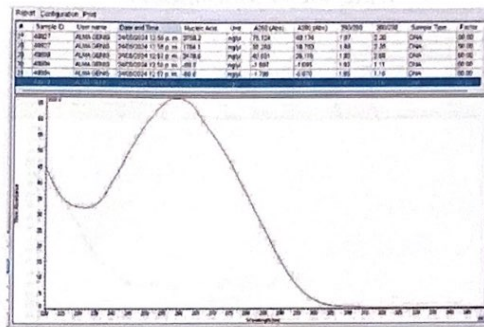
El conocimiento adquirido durante los seis meses de servicio social ayudo a que se reforzara el conocimiento previamente adquirido durante algunos módulos los cuales fueron "Conocimiento y sociedad" utilizando el método científico como fundamento para la práctica profesional. Se llevo a cabo la metodología de la

investigación en los distintos campos del conocimiento, "Historias de vida" en el cual es importante comprender las historias de vida de los seres vivos y su aplicación en el diagnóstico de las condiciones que afectan a la productividad de una población, "Procesos celulares fundamentales" y "Plagas y enfermedades de un recurso natural", en los cuales obtuvimos una concepción científica, mediante la identificación y estudio de problemas relacionados con los procesos biológicos fundamentales que rigen las interrelaciones de los seres vivos y su medio ambiente, enfatizando el proceso salud-enfermedad enmarcado dentro del contexto social vigente.

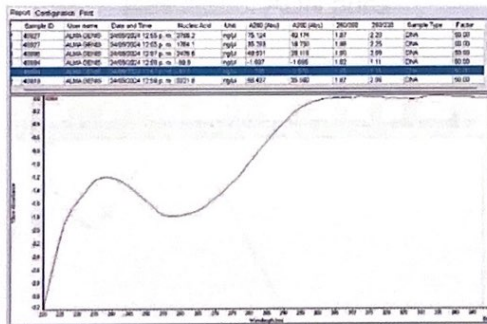
**Anexos (Resultados de muestras)**



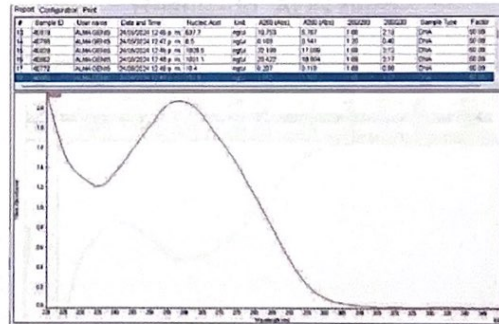
ID del sujeto: 40796  
 Nucleic acid: 8.5  
 260/280: 1.20  
 Resultado: ADN y puro



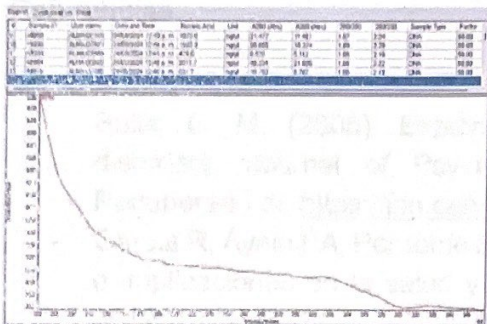
ID del sujeto: 40919  
 Nucleic acid: 3321.8  
 260/280: 1.87  
 Resultado: ADN puro



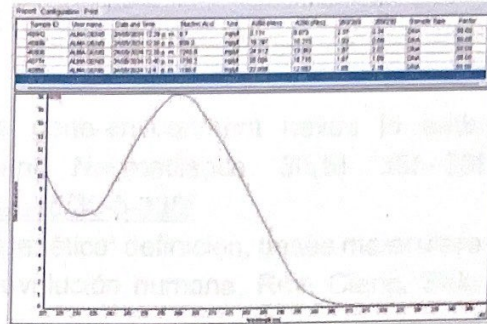
ID del sujeto: 40984  
 Nucleic acid: -89.8  
 260/280: 1.85  
 Resultado: ADN puro



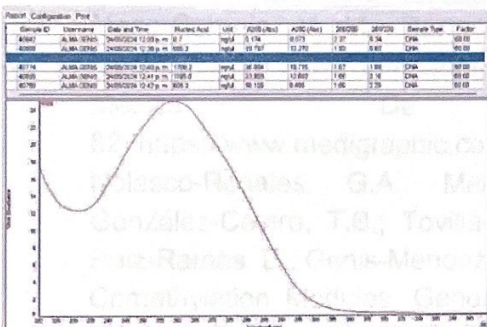
ID del sujeto: 40808  
 Nucleic acid: 102.2  
 260/280: 1.85  
 Resultado: ADN puro



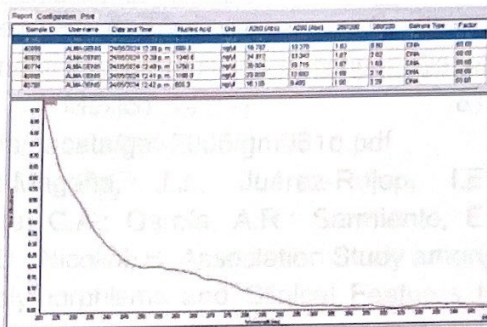
ID del sujeto: 40792  
 Nucleic acid: 8.5  
 260/280: 1.20  
 Resultado: ADN puro



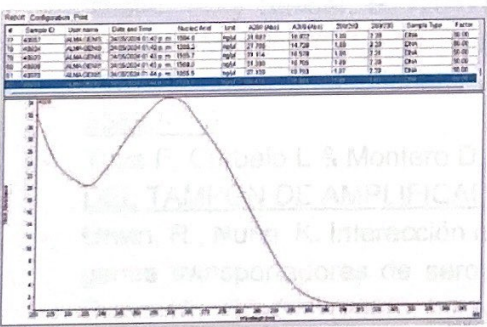
ID del sujeto: 40798  
 Nucleic acid: 805.3  
 260/280: 1.90  
 Resultado: ADN puro



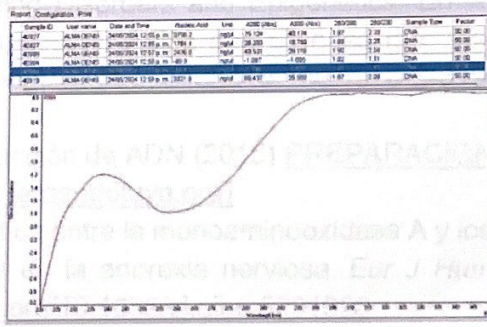
ID del sujeto: 40936  
 Nucleic acid: 1245.6  
 260/280: 1.87  
 Resultado: ADN puro



ID del sujeto: 40642  
 Nucleic acid: 8.7  
 260/280: 2.37  
 Resultado: ADN puro



ID del sujeto: 40935  
 Nucleic acid: 1723.7  
 260/280: 1.88  
 Resultado: ADN puro



ID del sujeto: 40982  
 Nucleic acid: -83.9  
 260/280: 1.85  
 Resultado: ADN puro

## Referencias

- Bulik, C. M. (2005). Exploring the gene-environment nexus in eating disorders. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 30(5), 335–339. Recuperado de <https://jpn.ca/vol30-issue5/30-5-335/>
- García R, Ayala PA, Perdomo SP. Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Rev. Cienc. Salud* 2012; 10 (1):59-71.
- González-Yanes, C., Sánchez-Margalet, V. La pancreastatina, un péptido derivado de la cromogranina A, inhibe la leptina y mejora la expresión de UCP-2 en adipocitos aislados de rata. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 2749–2756 (2003). <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3346-7>
- Mesa-Cornejo, V. M., Barros-Núñez, P., & Medina-Lozano, C. (2006). Metilación del ADN: marcador diagnóstico y pronóstico de cáncer. *Gaceta Médica De México*, 142(1), 81–82. <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2006/gm061o.pdf>
- Nolasco-Rosales, G.A.; Martínez-Magaña, J.J.; Juárez-Rojop, I.E.; González-Castro, T.B.; Tovilla-Zarate, C.A.; García, A.R.; Sarmiento, E.; Ruiz-Ramos, D.; Genis-Mendoza, A.D.; Nicolini, H. Association Study among Comethylation Modules, Genetic Polymorphisms and Clinical Features in Mexican Teenagers with Eating Disorders: Preliminary Results. *Nutrients* 2021, 13, 3210. <https://doi.org/10.3390/nu13093210>
- **RBC - Reactivo en solución by Biological Industries | MedicalExpo.** (n.d.). <https://www.medicalexpo.es/prod/biological-industries/product-121629-876013.html>
- Thaler, L., y Steiger, H. (2017). Eating Disorders and Epigenetics. En R. Delgado-Morales (Ed.), *Neuroepigenomics in Aging and Disease* (pp. 93–103). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-53889-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-53889-1_5)
- Tuya F, Curbelo L & Montero D. Extracción de ADN (2016) **PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE AMPLIFICACIÓN (fernandotuya.org)**
- Urwin, R., Nunn, K. Interacción epistática entre la monoaminoxidasa A y los genes transportadores de serotonina en la anorexia nerviosa. *Eur J Hum Genet* **13**, 370–375 (2005). <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201328>
- Website Thermo Scientific: Manual NanoDrop® 1000 Spectrophotometer: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nd-1000-v3.8-usersmanual-8%205x11.pdf>