|  |
| --- |
| **GUÍA DE PRÁCTICA DE LABORATORIO** |
| **PERÍODO ACADÉMICO** | 2023-2S |
| **ASIGNATURA** | Biología molecular | **SEMESTRE:** 6to | **PARALELO:** A |
| **NOMBRE DEL DOCENTE** | Mgt. Felix Falconi Ontaneda |
| **NÚMERO DE PRÁCTICA** | 12 | **FECHA:**  | **HORA:** 17:00-20:00 | **DURACIÓN:** 3 |
| **NOMBRE DE LOS ESTUDIANTES.** | **NÓMINA** |
| 1. Acosta Cáceres Melany Sarahi
 | 1. Pomagualli Pucha Jomayra Vanesa
 |
| 1. Acosta Tenelema Marcela Carolina
 | 1. Quezada Vega Karen Vanessa
 |
| 1. Amores Garzón Jonathan Israel
 | 1. Quilligana Urrutia Lorena Estefanía
 |
| 1. Ashqui Agualsaca Kerly Graciela
 | 1. Raza Aulla Doménica Salome
 |
| 1. Balladares Hidalgo Micaela Alexandra
 | 1. Reyes Bayas Angie Viviana
 |
| 1. Barragán Lara Patricio Xavier
 | 1. Ríos Palma Heidi Lissette
 |
| 1. Borja Coba Malena Salome
 | 1. Saltos Michilena Anahely Arai
 |
| 1. Caiza Moya Sulay Maricela
 | 1. Samaniego Álvarez Angie Nicole
 |
| 1. Carrasco Chiluisa Escarlet Nicole
 | 1. Silva Villa Cinthya Dayana
 |
| 1. Carvajal Inca Grace Dayana
 | 1. Silva Hidalgo Lizbeth Estefanía
 |
| 1. Castillo Jiménez María Belén
 | 1. Tapia Jacome Priscila Mikaela
 |
| 1. Cedeño Jiménez José Andrés
 | 1. Tarco Tarco Mónica Esperanza
 |
| 1. Espinoza Espinoza Tanya Aracelly
 | 1. Tirado Martínez Wendy Anahi
 |
| 1. Guamán Roldan Tamia Jamilexs
 | 1. Tuapanta Yupa Johanna Estefanía
 |
| 1. Hernández Grijalva Jessica Ana
 | 1. Vaquilema Anilema María Alicia
 |
| 1. Iglesias Vera Axel Alexander
 | 1. Vargas Mites Helens Mailyn
 |
| 1. Inguillay Guagcha Elvis Estiven
 | 1. Vélez Arévalo Talitacum Yolanda
 |
| 1. Noboa Ríos Jessica Lisbed
 | 1. Vizuete Parra Oliver Daniel
 |
| 1. Osorio Quinatoa Allison Nayeli
 | 1. Yucta Concha Erick Joel
 |
| 1. Parra Parra Alisson Melina
 | 1. Zambrano Cáceres Laura Estefanía
 |
| 1. Pinduisaca Pinta Sandra Verónica
 |  |
| **LUGAR DE LA PRÁCTICA** | Lab E301 Laboratorio de Química, Toxicología y Forense |
| **TÍTULO DE LA UNIDAD** | DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA VIRUS |
| **TEMA DE LA PRÁCTICA** | Diagnóstico molecular de HPVProtocolo de diagnostico |
| **RESULTADO DE APRENDIZAJE** |
| Aplica los protocolos de diagnóstico molecular mediante el uso de técnicas probadas para el diagnóstico de enfermedades virales |
| **OBJETIVO GENERAL** | Comprender la técnica de diagnóstico de HPV |
| OBJETIVOS ESPECÌFICOS: |
| Aplicar la técnica de PCR en el diagnóstico de HPV |
| **MARCO TEÓRICO** |
| El virus del papiloma humano (VPH) es un virus ADN que pertenece a la familia Papillomaviridae que origina la infección de transmisión sexual (ITS) más frecuente en todo el mundo. En general se adquiere por vía sexual pero también se puede contraer verticalmente de madre a hijo, por contacto con la mucosa cervical durante el parto, por vía transplacentaria y menos frecuentemente por transmisión horizontal durante la infancia.En España, la prevalencia de infección por el VPH en mujeres sexualmente activas en la población general alcanza el 14% aunque puede variar según el grupo de edad estudiado y los factores de riesgo asociados. A partir de los 40 años, la cifra es más baja, aproximadamente entre el 5-6%.El VPH infecta específicamente las células basales del epitelio escamoso del cuello del útero, aprovechando la división celular activa de esta zona para su replicación.En la capa superior del epitelio, se forman los típicos coilocitos, células multinucleadas y células con el núcleo aumentado de tamaño. Estos cambios citopáticos son claramente visibles con la tinción de Giemsa o Papanicolau (citología) en los cepillados cervicales que es la muestra idónea para la detección del virus en relación con la patología cervical que ocasiona.En la mayoría de los casos, la infección por VPH es asintomática, transitoria y puede pasar desapercibida; en otros, las manifestaciones clínicas son muy diversas y comprenden desde simples verrugas y otros procesos benignos, hasta el desarrollo de neoplasias anogenitales tan severas como el cáncer de cuello de útero (CCU), anal (CA), de pene, vagina e incluso en otros sitios anatómicos distantes como la orofaringe y la cavidad oral (CCO), en general.Se han identificado más de 100 genotipos de VPH, y se estima que aproximadamente 40 de estos, se pueden encontrar en el área genital y anal. Las manifestaciones benignas, condilomas o verrugas genitales están ocasionados por los genotipos no oncogénicos 6 y 11 (VPH6, VPH11). Estos mismos genotipos son los causantes también de la papilomatosis respiratoria recurrente (PRR). Esta es una enfermedad infrecuente pero que, sin embargo, la recurrencia de papilomas en vías respiratorias puede conducir a la muerte en los niños y adolescentes que la padecen |
|  |
| **MATERIALES Y MÉTODOS** |
| **Equipos** | **Materiales** | **Reactivos** |
| CentrifugaCongeladorTermocicladorSistema de electroforesis | PipetasPuntas para pipetasTubos EppendorfTubos para PCR | dNTPsPrimersTamponesMuestra de ADN |
| **PROCEDIMIENTO / TÉCNICA:** |
| Obtener ADN de muestrasPreparar el master mixUsar los siguientes primersPrimers used for detection and genotyping of human papillomavirus (HPV) 16 and 18

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Primer** | **Primer Sequence (5'-3')** | **Target** | **Amplicon (bp)** |
| PC03PC04 | ACACAACTGTGTTCACTAGCCAACTTCATCCACGTTCACC | β-globin | 110 |
| GP5+GP6+ | TTTGTTACTGTGGTAGATACTACGAAAAATAAACTGTAAATCATATTC | L1 | 150 |
| TS 16 | GGTCGGTGGACCGGTCGATGGCAATGTAGGTGTATCTCCA | E6 HPV 16 | 96 |
| TS18 | CCTTGGACGTAAATTTTTGGCACGCACACGCTTGGCAGGT | L1 HPV 18 | 115 |
| C16E7 | GGGGAATTCGCATGGAGATACACCTACATTCGGGCTCGAGTGGTTTCTGAGAACAGATGG | E7 HPV 16 | 297 |
| C18E7 | GGATCCGCATGGACCTAAGGCAACATTGAATTCGCTGCTGGGATGCACACCA | E7 HPV 18 | 318 |

Programar el termocicladorCondiciones del programa de la PCR

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Primer** | **Inicio** | **Desnaturalización Hibridación Extensión****35 ciclos** | **Ext-Final** |
| PC03/PC04 | 94°C, 4min | 94°C, 30 s | 54°C, 45 s | 72°C, 30 s | 72°C, 7 min |
| GP5+/GP6+ | 94°C, 4min | 94°C, 30 s | 45°C, 45 s | 72°C, 30 s | 72°C, 7 min |
| TS 16TS18C16E7C18E7 | 94°C, 4min | 94°C, 45 s | 58°C, 45 s | 72°C, 30 s | 72°C, 7 min |

Analizar la amplificación en un gel de electroforesis |
| **RESULTADO (Gráficos, cálculos, etc.)** |
|  |
| **OBSERVACIONES** |
| * Los estudiantes deben tener cuidado al momento de manejar los equipos de laboratorio ya que son muy delicados.
 |
| **CONCLUSIONES** |
| La alta frecuencia de HPV de alto riesgo oncogénico, en lesiones de alto y bajo grado surge como buena explicación para las altas incidencias de cáncer cervicouterino en nuestro medio. El diagnóstico precoz con las técnica de PCR puede prevenir significativamente el tratamiento oportuno para evitar la progresión de cáncer. |
| **RECOMENDACIONES** |
| * Utilizar la vestimenta de bioseguridad para manejar los equipos y materiales del laboratorio de biología molecular.
* Hacer uso de las normas de bioseguridad para evitar contaminarse así mismo, a los demás, o al trabajo que se esté realizando.
* Seguir las instrucciones dadas por el profesor y en la presente guía
* Leer las instrucciones de los reactivos utilizados.
 |
| **BIBLIOGRAFÍA/WEBGRAFÍA** |
| * Biología molecular Salazar Montes Adriana Mc Graw Hill Interamericana Editores
* Biología molecular Gómez Marín Jorge Enrique Corporación para Investigaciones Biológicas
* Biología molecular y celular Chandart Nalini Wolters Kluwer Health
* https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/,
* https://www.scopus.com/search/form.uri?display=basic
 |
| **Mgs. Ximena Robalino F.****DIRECTORA DE CARRERA** | **Ing. Félix Falconí O., Mgs****DOCENTE** |