



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Informe Final del Proyecto de Investigación para el Servicio Social

SECUENCIACIÓN SANGER DE REGIONES GENÓMICAS METILADAS CON TÉCNICA DE BISULFITO EN MUESTRAS DE MADRES CON DIABETES GESTACIONAL

Que presenta la alumna

Aleysha Daniela Santana Guzman

Matrícula

2212033999

Asesora Interna

Dra. Norma Angélica Noguez Méndez

No. Eco. 17902

Asesora Externa

Dra. Vilma Carolina Bekker Méndez

No. de cédula: 2794848

Lugar de realización: Unidad de Investigación Biomédica, Hospital de Infectología, CMN "La Raza" IMSS.

Fecha de inicio: 01/10/25

Fecha de término: 01/04/26

Introducción

La diabetes gestacional (DG) es una de las complicaciones metabólicas más frecuentes del embarazo y representa un importante problema de salud pública. Se caracteriza por la intolerancia a los carbohidratos y resistencia a la insulina que se manifiestan durante el segundo o tercer trimestre de la gestación, provocando hiperglucemia y alteraciones metabólicas tanto en la madre como en el feto (Del Rosario *et al.*, 2023). A nivel global, se estima que afecta a uno de cada seis nacimientos, mientras que en México su prevalencia es cercana al 14% en mujeres embarazadas (Robles *et al.*, 2024; Parra *et al.*, 2025). Esta condición incrementa el riesgo de complicaciones obstétricas y se asocia con una mayor probabilidad de desarrollar diabetes tipo 2 en etapas posteriores (Tamayo *et al.*, 2022).

En los últimos años, se ha propuesto que los mecanismos epigenéticos, particularmente la metilación del ADN, desempeñan un papel importante en la regulación de genes implicados en el metabolismo y la respuesta a la insulina. En este contexto, el gen SLC16A11 ha sido identificado como un factor de riesgo relevante para diabetes tipo 2 en población latinoamericana (Vujkovic *et al.*, 2020; Mahajan *et al.*, 2022), lo que sugiere que su regulación epigenética podría estar implicada en la fisiopatología de la diabetes gestacional.

La metilación del ADN es una modificación epigenética que regula la expresión génica mediante la adición de grupos metilo en citosinas de dinucleótidos CpG, lo que puede conducir a la represión transcripcional. Su estudio ha cobrado especial relevancia debido a su participación en diversos procesos biológicos y su potencial como biomarcador en enfermedades metabólicas.

Para el análisis del estado de metilación, la conversión con bisulfito es considerada el método de referencia, ya que permite diferenciar citosinas metiladas de no metiladas mediante cambios químicos específicos. Posteriormente, la secuenciación de Sanger facilita la identificación de estos cambios a nivel de nucleótido (Lavoro *et al.*, 2025; Deharvengt *et al.*, 2020).

Sin embargo, a pesar de los avances en el estudio de la epigenética, la evidencia sobre los patrones de metilación en genes asociados al riesgo metabólico, como SLC16A11, en el contexto de la diabetes gestacional, es aún limitada. Por ello,

resulta necesario aplicar metodologías moleculares que permitan evaluar de manera precisa estas modificaciones.

En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo generar regiones genómicas metiladas mediante conversión con bisulfito y secuenciación de Sanger en muestras de madres con diabetes gestacional, con el fin de contribuir al entendimiento de los mecanismos epigenéticos implicados en esta enfermedad.

Planteamiento del problema y justificación

La diabetes gestacional presenta una prevalencia mundial estimada entre el 9 y el 20 % (Robles *et al.*, 2024). En México, cerca del 14 % de las mujeres embarazadas desarrollan esta condición (Parra *et al.*, 2025), lo que incrementa significativamente el riesgo de complicaciones maternas y perinatales, como preeclampsia, parto prematuro, macrosomía, hipoglucemia neonatal y muerte perinatal. Además, tanto la madre como el recién nacido tienen mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedades metabólicas a futuro, entre ellas obesidad y diabetes tipo 2.

A pesar de los avances en el diagnóstico y manejo clínico de la DG, aún persisten importantes interrogantes en la comprensión de los mecanismos moleculares que participan en su desarrollo. Por ello, ha surgido un especial interés en la relación entre las modificaciones epigenéticas, especialmente la metilación del ADN, dado a su papel regulador en la expresión de genes clave relacionados con la sensibilidad a la insulina, la inflamación y el metabolismo de la glucosa. Sin embargo, la evidencia sobre los patrones de metilación en genes específicos asociados al riesgo metabólico, como el gen SLC16A11, sigue siendo limitada en población con diabetes gestacional.

En este contexto, resulta relevante analizar el estado de metilación de dicho gen, ya que podría contribuir a una mejor comprensión de los procesos epigenéticos implicados en la DG y, potencialmente, a la identificación de biomarcadores útiles para su diagnóstico o seguimiento.

Objetivo General

Generar y secuenciar regiones genómicas metiladas con técnica de bisulfito en muestras de madres con diabetes gestacional.

Objetivos específicos

1. Extraer ADN a partir de un botón celular proveniente de sangre periférica de muestras de madres con diabetes gestacional.
2. Aplicar técnica de bisulfito en las regiones de interés.
3. Amplificar regiones genómicas metiladas con técnica de bisulfito en muestras de madres con diabetes gestacional.
4. Visualizar los fragmentos de las regiones genómicas metiladas de interés mediante electroforesis en geles de agarosa.
5. Secuenciar por técnica de Sanger las regiones metiladas y no metiladas de interés.

Antecedentes

Diabetes gestacional

La diabetes gestacional es la alteración metabólica más común durante el embarazo y su prevalencia ha mostrado un incremento sostenido a nivel global. Se estima que 21,1 millones de nacidos vivos en 2021 se asociaron con diabetes materna, de estos, el 10,6% se debió a diabetes mellitus pregestacional tipo 1 (DM1) y tipo 2 (DM2), el 9,1% se debió a DM1 o DM2 detectadas por primera vez en el embarazo y el 80,3% se debió a diabetes gestacional (DG) (Robles *et al.*, 2024). De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud Pública (2025) en México se registran aproximadamente 14 casos de diabetes gestacional por cada 100 mujeres embarazadas.

Se define como una alteración metabólica caracterizada por intolerancia a los carbohidratos y resistencia a la insulina, que conduce a hiperglucemia de diversa magnitud y suele manifestarse durante el segundo o tercer trimestre del embarazo (Del Rosario *et al.*, 2023).

Desde el punto de vista fisiopatológico, el embarazo induce un estado de resistencia a la insulina mediado principalmente por hormonas placentarias como el lactógeno placentario humano, el cortisol y la progesterona. En condiciones normales, el organismo materno compensa este efecto mediante un incremento en la secreción de insulina por las células β pancreáticas; sin embargo, cuando esta respuesta es insuficiente, se produce hiperglucemia, dando lugar al desarrollo de diabetes gestacional (Lowe *et al.*, 2016). Este proceso se asocia además con alteraciones en la señalización de la insulina y disfunción de las células β , lo que contribuye al desequilibrio metabólico.

Diversos estudios han documentado que esta enfermedad trae consigo grandes repercusiones que inciden negativamente en la salud tanto de la madre gestante como del feto o bebé, desencadenando múltiples complicaciones futuras a corto y largo plazo afectando directamente la calidad de vida (Tamayo *et al.*, 2022).

Epigenética

En biología, la epigenética hace referencia a los cambios heredables en la expresión génica que no se deben a cambios en la propia secuencia del ADN. Determina la

expresión génica de una determinada célula y por tanto su diferenciación, es fundamental en el desarrollo del ser humano, de modo que alteraciones en la maquinaria epigenética causan diversas enfermedades, entre las que se incluye el cáncer. Estas modificaciones estructurales en las regiones del genoma ocurren por la metilación del ADN o de las histonas cromosómicas, u otros mecanismos como modificaciones epigenéticas no programadas bajo la influencia de factores ambientales no controlados, que pueden dar lugar a alteraciones de la salud (Jouve, 2020).

Metilación de ADN

La modificación epigenética más estudiada en humanos es la metilación del ADN. Diversos estudios han demostrado que la metilación del ADN juega un papel crucial en la regulación de varios procesos biológicos, incluido el desarrollo embrionario, la impronta genómica y la inactivación del cromosoma X (XCI) (Lavoro *et al.*, 2025). Estas funciones explican por qué las alteraciones en los patrones de metilación se asocian con múltiples enfermedades, lo que ha impulsado el desarrollo de métodos cada vez más precisos para su análisis.

El mecanismo de metilación del ADN consiste en la transferencia enzimática de un grupo metilo (-CH₃) a la posición carbono-5 de la base de citosina por las enzimas metiltransferasas de ADN (DNMT) dentro del dinucleótido de citosina-guanina (CpG), lo que conduce a la formación de 5-metilcitosina (5mC) (Saini *et al.*, 2023). Esta modificación ocurre de forma natural en organismos procariontes y eucariontes. En mamíferos somáticos, aproximadamente el 70% a 80% de los dinucleótidos CpG en el genoma están metilados (Analysis and performance assessment of whole-genome, 2021).

Dentro del genoma existen regiones conocidas como islas CpG (CGI, *CpG islands*), definidas como tramos de alrededor de 1 kb con alta densidad de dinucleótidos CpG y ubicadas con frecuencia en el extremo 5' de los genes. Representan los promotores del 50–60% de los genes humanos y, a diferencia del patrón general de metilación, suelen mantenerse no metiladas para permitir la adecuada expresión génica (Li *et al.*, 2022).

Diversos estudios han demostrado que alteraciones en los patrones de metilación del ADN se asocian con múltiples enfermedades, incluyendo trastornos metabólicos. En este sentido, la metilación se ha propuesto como un potencial biomarcador, lo que ha impulsado el desarrollo de metodologías específicas para su análisis.

Gen SLC16A11

En la diabetes gestacional, la susceptibilidad a la enfermedad está influenciada por la interacción entre factores genéticos y epigenéticos que modulan la respuesta metabólica. En este contexto, el gen SLC16A11 ha sido identificado como un importante factor de riesgo en poblaciones latinoamericanas.

SLC16A11 codifica un transportador involucrado en el metabolismo energético, particularmente a nivel hepático. Variantes en este gen se han asociado con alteraciones en el metabolismo de lípidos y parámetros como glucosa y lipoproteínas, lo que sugiere su participación en la homeostasis metabólica (Kimura *et al.*, 2021). A nivel mecanístico, su disfunción favorece la acumulación de triglicéridos en el hepatocito, generando lipotoxicidad que interfiere con la señalización de la insulina y contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina (Aguilar-Salinas & Tusie-Luna, 2023).

Este efecto es particularmente relevante en la diabetes gestacional, donde la resistencia a la insulina se encuentra aumentada de manera fisiológica. Por lo anterior, el análisis del estado de metilación de regiones genómicas de genes como SLC16A11 mediante técnicas moleculares específicas representa una herramienta clave para comprender los mecanismos epigenéticos implicados en la diabetes gestacional.

PCR punto final o convencional y PCR Anidada

En estudios enfocados en el análisis de metilación del ADN, diversas metodologías han sido empleadas para mejorar la especificidad y sensibilidad en la detección de secuencias de interés. Entre ellas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio que permite la producción (amplificación) rápida de millones a miles de millones de un segmento específico de ADN, que así se podrá estudiar en mayor detalle. (National Human Genome Research Institute, 2025).

Esta técnica se dirige a fragmentos específicos de ADN dentro de una muestra y los amplifica mediante ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación y extensión. Para ello, emplea la Taq polimerasa, una ADN polimerasa termoestable aislada de *Thermus aquaticus*, que mantiene su actividad enzimática a pesar de la exposición repetida a altas temperaturas (Khehra *et al.*, 2025). Debido a su alta sensibilidad, se usa en el diagnóstico de infecciones bacterianas y virales, así como en la detección de alteraciones genéticas.

En situaciones donde la cantidad de ADN es limitada o existe riesgo de amplificación inespecífica, se han desarrollado variantes como la PCR anidada. Esta consiste en dos rondas consecutivas de amplificación utilizando dos juegos de cebadores diferentes (externos e internos), lo que incrementa significativamente la especificidad y sensibilidad del método. Su aplicación ha sido especialmente relevante en el análisis de ADN tratado con bisulfito y en muestras con baja concentración, donde se requiere una mayor precisión en la detección de secuencias específicas, como se ha documentado en estudios recientes enfocados en biomarcadores epigenéticos (Li *et al.*, 2021).

Técnica de bisulfito

La capacidad de detectar y cuantificar la metilación del ADN de forma eficiente y precisa se ha vuelto esencial para el estudio del cáncer, la expresión génica, las enfermedades genéticas y muchos otros aspectos importantes de la biología. El primer uso para secuenciar 5-metilcitosina dentro del ADN fue realizado por Frommer y sus colegas marcando un punto de inflexión en el estudio de la epigenética. El tratamiento del ADN con bisulfito modifica químicamente las citosinas no metiladas a uracilo; las citosinas metiladas permanecen sin cambios. Después de la conversión de bisulfito, la PCR sensible al metilo o la secuenciación de ADN pueden distinguir entre citosinas no metiladas y metiladas (5mC), que aparecen como timinas y citosinas en la secuencia amplificada resultante, respectivamente (Lavoro *et al.*, 2025).

Gracias a su alta sensibilidad y capacidad tanto cualitativa como cuantitativa, este método se consolidó como el “estándar de oro” para la detección de metilación a nivel de base individual (Saini *et al.*, 2023), además de que sirve como principio fundamental para muchos métodos derivados para interpretar mejor la metilación del ADN.

A pesar de su alta sensibilidad y resolución a nivel de base individual, esta técnica implica condiciones químicas agresivas que pueden inducir fragmentación del ADN y reducir su calidad, lo que representa un desafío técnico en etapas posteriores como la amplificación por PCR.

Secuenciación de Sanger

El progreso en la investigación epigenética se ha complementado con los avances en las técnicas de secuenciación del ADN. Sanger y colaboradores propusieron el método de secuenciación enzimática, la primera versión se publicó en 1975; ésta fue mejorada y sustituida por el método conocido como de terminación de la cadena, que se convirtió en el método más utilizado para la secuenciación de ADN y se sigue utilizando en la actualidad. Este método se basa en la síntesis enzimática de ADN con una ADN polimerasa y en presencia de nucleótidos modificados, dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs) que carecen del hidroxilo en el carbono 3' del azúcar, que es esencial para que se pueda llevar a cabo el enlace fosfodiéster entre los nucleótidos durante la síntesis de la cadena de ADN (Ongay & Códiz, 2021).

La reacción de secuencia con los ddNTPs marcados con fluorocromos se realiza por termociclado. Los ddNTPs actúan como terminadores, lo que produce fragmentos de ADN de distintos tamaños. Estos se introducen a los capilares por electroinyección y son separados mediante electroforesis capilar; la fluorescencia es detectada conforme pasan las moléculas por la ventana de detección y se determina la secuencia. El resultado se presenta como un electroferograma (Deharvengt et al., 2020). La detección de señales fluorescentes permite reconstruir la secuencia nucleotídica, lo que facilita la identificación de cambios derivados de la conversión con bisulfito y, por ende, el análisis de patrones de metilación.

En conjunto, estos métodos resultan fundamentales para el análisis de patrones de metilación, resaltando su relevancia para el desarrollo del presente Informe de investigación.

Metodología

Tipo de estudio

El presente estudio es de enfoque cuantitativo, con un diseño no experimental, de tipo descriptivo y de corte transversal.

Población de estudio

Mujeres con diagnóstico de diabetes gestacional, atendidas en el servicio de Ginecología del Hospital “La Raza”, a quienes se les invitó a participar y las personas que aceptaron se les entregó carta de consentimiento informado para toma de sangre periférica.

Lugar de estudio

El procedimiento del proyecto se llevó a cabo en la Unidad de Investigación Biomédica del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional “La Raza” del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Recolección de muestras de sangre periférica

Para la realización de este estudio fue de interés la obtención de DNA de sangre periférica. La sangre fue obtenida por venopunción por personal de laboratorio para su posterior procesamiento.

1. Separación de células mononucleares, mediante Ficoll-Lymphoprep (Botón celular)

Para el procesamiento de las muestras, se partió de sangre periférica recolectada en un tubo con tapa lila (el color indica que contiene EDTA y se utiliza principalmente para pruebas hematológicas). Posteriormente, el tubo se colocó en una gradilla y se separó el suero, el cual se trasvasó cuidadosamente a un tubo Eppendorf hasta llenarlo; este se etiquetó con el nombre de la muestra (Diabetes Gestacional), folio y fecha.

En un tubo Falcon se colocó 3 mL de Ficoll, un medio de gradiente de densidad utilizado para aislar células mononucleares de sangre periférica, que permite su separación en función de su densidad durante la centrifugación. Al tubo original con tapa lila se le añadió 2 mL de PBS (solución amortiguadora de fosfatos), cuyo

propósito es lavar la muestra y mantener la osmolaridad fisiológica de las células, evitando la lisis celular. La suspensión se homogeneizó para obtener una mezcla uniforme de eritrocitos con la solución amortiguadora.

Esta mezcla se transfirió lentamente al tubo Falcon con Ficoll, procurando depositarla por las paredes para impedir la mezcla de fases, lo cual garantiza una correcta separación celular. El tubo se centrifugó nuevamente a 3,500 rpm durante 15 minutos a 4 °C para permitir la formación del gradiente: los eritrocitos se depositaron en el fondo, el Ficoll quedó en la zona media y las células mononucleares formaron una capa intermedia.

Tras la centrifugación, se retiró cuidadosamente la fase superior y se extrajo la capa intermedia correspondiente a las células mononucleares, evitando extraer los eritrocitos. Esta fracción se transfirió a un segundo tubo Falcon. A continuación, se le agregaron 2 mL de PBS para lavar la muestra, se homogeneizó y se centrifugó a 3,500 rpm durante 5 minutos con el objetivo de eliminar impurezas y residuos del Ficoll.

Posteriormente se decantó el sobrenadante, se adicionaron nuevamente 2 mL de PBS y la suspensión se dividió en dos tubos Eppendorf, que se rotularon y taparon. Ambos se sometieron a una centrifugación final durante 5 minutos a 3,500 rpm. Una vez concluido este proceso, se decantó el sobrenadante procurando no desechar el botón celular, que contiene el pellet de células recuperadas. Finalmente, los tubos se taparon y se almacenaron a -80°C para su conservación hasta su procesamiento posterior.

2. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó utilizando el kit *Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega)*. El procedimiento inició a partir de un botón celular (obtenido en el procedimiento anterior) en 200 µL de PBS. A esta suspensión se le añadieron 200 µL de Nuclear Lysis Solution, reactivo encargado de romper las membranas celulares y nucleares para liberar el contenido intracelular, incluida la fracción genómica. La mezcla se homogeneizó 20 veces (con pipeta de 1000µL).

Posteriormente, se agregaron 10 µL de proteínasa K, una enzima que degrada proteínas celulares y nucleasas que pudieran fragmentar el ADN, facilitando la obtención de un extracto más limpio. La muestra se llevó al vortex y se incubó a 56 °C durante 10 minutos, se mezcló en el vortex cada 3 minutos hasta lograr la completa disgregación del botón celular. Una vez concluida esta etapa, la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Después, se añadieron 1.5 µL de RNasa, cuya función es degradar el ARN residual para evitar contaminación. La muestra se mezcló invirtiendo el tubo 2-5 veces y se incubó a 37 °C durante 15 minutos, para después dejarla a temperatura ambiente. La mezcla se llevó al vortex para homogeneizar, se bajó el volumen en una mini centrífuga y el lisado resultante se transfirió a la columna de purificación.

La columna se centrifugó a 13,000 rpm durante 3 minutos, descartando el filtrado. Después se realizaron cuatro lavados consecutivos con 650 µL de Column Wash Solution, reactivo diseñado para eliminar sales, proteínas y otros contaminantes que pudieran afectar la pureza del ADN. Cada lavado se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 minuto. Al finalizar, la columna se secó mediante centrifugación por 2 minutos (en colector seco) y se incubó en la campana de extracción por 5 minutos para evaporar el restante.

Posteriormente, la columna se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se añadieron 200 µL de agua libre de nucleasas, utilizada para eluir el ADN purificado sin riesgo de degradación. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente; posteriormente, el eluato se volvió a colocar en la columna y se centrifugó a 13,000 rpm durante 4 minutos hasta el volumen bajara. Finalmente, se cuantificó la concentración de ADN en un Espectrofotómetro de microvolumen (NanoDrop) y las muestras se almacenaron entre -20 y -70 °C hasta su análisis.

3. Técnica de bisulfito

Para esta técnica se utilizó el *Kit EZ DNA Methylation-Lightning™* (Zymo Research). Para iniciar el procedimiento, se mezclaron 20 µL de ADN con 130 µL de Lightning Conversion Reagent, reactivo incluido en el kit y responsable de promover la conversión química mediante bisulfito. La mezcla se homogeneizó en vortex, se bajó

el volumen y se llevó al termociclador con los siguientes ciclos de acuerdo al protocolo del kit:

98°C- 8 min

54°C- 60 min

4°C - Mantenimiento indefinido (hold)

Posteriormente, se preparó una columna Zymo-Spin™ IC con 600 µL de M-Binding Buffer en tubo recolector, solución cuya función es promover la unión del ADN modificado a la membrana de la columna. A continuación, se colocó el contenido (150 µL) del tubo de PCR en la columna que contiene el *Binding Buffer* y se mezcló por inversión para favorecer la interacción del ADN con el material sólido. La columna se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 segundos a 1 minuto y el filtrado se descartó.

Después, se añadió M-Wash Buffer, cuya función es eliminar sales y subproductos de la reacción de bisulfito, centrifugando durante 1 minuto. Posteriormente, se agregaron 200 µL de L-Desulphonation Buffer, reactivo que permite eliminar los grupos sulfonados derivados del tratamiento con bisulfito, estabilizando las bases convertidas. La columna se dejó a temperatura ambiente durante 15–20 minutos. Luego, la columna se centrifugó a velocidad máxima (14,000 rpm) durante 1 minuto.

Se realizaron dos lavados adicionales con 200 µL de M-Wash Buffer, centrifugando nuevamente a 10,000 por 1 minuto. Finalmente, la columna se trasladó a un tubo limpio de 1.5 mL y el ADN se eluyó con 22 µL de Elution Buffer, solución que permite recuperar el ADN purificado desde la membrana. La elución se completó con una centrifugación de 2 minutos, obteniendo así el ADN tratado con bisulfito y listo para la posterior amplificación por PCR.

4. Reacción de PCR

En este caso, se utilizó un *master mix* para PCR, el cual es una solución concentrada que incluye todos los componentes necesarios para la reacción, como la enzima ADN polimerasa, los dNTPs (desoxirribonucleótidos), el tampón de reacción y MgCl₂, junto con la polimerasa ADN-Taq. Se emplearon los iniciadores PROM, diseñados y adquiridos por personal de la unidad, y las muestras de ADN

obtenidas en el procedimiento anterior. Primero se realizó el cálculo para preparar una mezcla que incluye *master mix*, primers, agua libre de nucleasas y ADN; las cantidades dependieron de la concentración de cada muestra, determinada previamente mediante NanoDrop. También se añadió un control negativo, que contenía únicamente agua en la misma cantidad de ADN utilizada en las reacciones experimentales. Cada mezcla se homogeneizó en vortex y posteriormente se centrifugó brevemente antes de colocarse en el termociclador T100™ Thermal Cycler Bio-Rad.

Los resultados de la PCR se verificaron mediante electroforesis basada en gel, se visualizaron y documentaron las bandas bajo luz UV y en el equipo The Gel Doc XR+ System de BIO-RAD. Se consideró una sola banda brillante y específica para cada muestra, como una amplificación de PCR exitosa.

5. Reacción de Secuenciación

Antes de realizar la reacción de secuenciación fue necesaria la extracción y purificación de los productos de PCR para eliminar componentes residuales que pudieran interferir con los resultados. Para ello se utilizó el *MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen)*, el cual emplea un procedimiento basado en unión, lavado y elución. El tampón de unión se añadió directamente al producto de PCR y la mezcla se aplicó a la columna MinElute. Este buffer contiene un indicador de pH que permite verificar que las condiciones sean óptimas para la unión del ADN. En condiciones de alta salinidad, los ácidos nucleicos se adsorben a la membrana de sílice; posteriormente, las impurezas se eliminaron mediante lavados y el ADN purificado se eluyó con un pequeño volumen de buffer de baja salinidad o agua, quedando listo para la reacción de secuenciación.

El procedimiento de la reacción de secuenciación fue similar al de la PCR; sin embargo, en este caso los dNTPs del mix están marcados con fluorescencia, además de que se utilizaron iniciadores SeQmeth. Se realizaron los cálculos necesarios para preparar una mezcla por reacción (una para Forward y otra para Reverse), que incluyó: BigDye, agua libre de nucleasas, ADN y primers Forward y Reverse, para un volumen final de 20 µL. Las cantidades dependieron de las concentraciones determinadas previamente. En esta reacción no se añadió control negativo pero sí se incluyó un control positivo.

Las muestras se llevaron al termociclador con los siguientes ciclos:

96°C - 1 min.

96°C - 10 seg.

50°C - 4 min.

25 ciclos

Volumen Final: 20µL

Posterior a esto, las muestras fueron sometidas al procedimiento de purificación mediante perlas magnéticas. Para ello, se añadieron 45 µL de SAM™ (Sample Analysis Mix o Magnetic Bead Solution) la cual es una mezcla que contiene perlas magnéticas y sustancias que permiten que el ADN se pegue a esas perlas y 10 µL de *Terminator Solution* la cual elimina las moléculas que podrían interferir en la secuenciación a cada muestra, y se mezclaron en vortex durante 30 minutos. Al finalizar este proceso, las muestras se enviaron al Laboratorio de secuenciación ubicado en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social para su proceso de secuenciación.

Resultados

Se logró la separación exitosa de células mononucleares a partir de sangre periférica de mujeres con diagnóstico de diabetes gestacional, obteniéndose un botón celular visible tras el gradiente de densidad con Ficoll.

Posteriormente, se realizó la extracción de ADN genómico y su cuantificación mediante espectrofotometría (NanoDrop 2000C). Las concentraciones obtenidas oscilaron entre 5.8 y 26.5 ng/μL, con valores de pureza (260/280) entre 1.85 y 2.54. Si bien valores cercanos a 1.8 indican una adecuada pureza del ADN, algunos valores elevados (>2.2) sugieren posible presencia de ARN o interferencias en la medición, lo que podría afectar la precisión de la cuantificación (Tabla 1).

Folio	Concentración ADN (ng/μL)	Pureza (A260/280)
A0101B	20.5	2.06
A0405C	12.5	2.11
A0051D	24.3	1.85
A0101D	18.9	2.21
A0103D	21.1	2.74
A0153D	15.1	2.29
A0269D	12.2	2.36
A0348D	12.8	2.29
A0393D	15.2	1.98
A0394D	19.4	2.00
A0614D	8.9	2.05
A0074I	25.2	2.33
A0338I	11.9	2.19
A0269I	22.7	2.48
A0591I	10.6	2.09

B0302D	14.5	2.08
B0332D	17.2	2.54
B0356D	17.9	2.09
B0368D	13.1	2.24
B0369D	12.2	2.26
B0375D	11.3	2.07
B0382D	14.2	2.46
B0385D	14.2	2.46
B0402D	12.2	2.26
B0406D	23.7	2.27
B0429D	15.7	2.31
B0439D	5.8	3.43
B0446D	5.9	3.41
B0471D	26.5	2.00
B0472D	13.5	2.25

Tabla 1. Concentración y pureza del ADN genómico extraído de muestras de sangre periférica de mujeres con diabetes gestacional, determinadas mediante espectrofotometría (NanoDrop 2000C).

Posteriormente las muestras A0101B, A0405C, A0051D, A0101D, A0103D, A0153D, A0393D, A0394D, A0614D, A0074I, A0269I fueron sometidas a tratamiento con bisulfito utilizando el Kit EZ DNA Methylation-Lightning™. Tras este procedimiento, se observó una disminución de la concentración de ADN, con valores entre 6.2 y 12.8 ng/μL. Asimismo, los valores de pureza (A260/280) oscilaron entre 1.10 y 2.38, evidenciando variabilidad en la calidad del ADN posterior al tratamiento (Tabla 2).

Folio	Concentración ADN (ng/μL)	Pureza (A260/280)
A0101B	10.8	1.92
A0405C	6.2	1.85
A0051D	11.5	1.70
A0101D	9.3	1.88
A0103D	8.9	1.10
A0153D	8.9	1.95
A0393D	7.0	1.76
A0394D	8.1	1.82
A0614D	7.5	2.38
A0074I	12.4	1.90
A0269I	12.8	1.75

Tabla 2. Concentración y pureza del ADN posterior al tratamiento con bisulfito utilizando el kit EZ DNA Methylation-Lightning™.

Con el ADN tratado con bisulfito, se llevó a cabo la amplificación mediante PCR utilizando primers PROM. Sin embargo, ninguna de las muestras mostró bandas visibles en gel de agarosa al 2%, lo que indica ausencia de amplificación específica bajo las condiciones empleadas.

A pesar de la falta de amplificación observable, las muestras fueron sometidas a reacción de secuenciación a una concentración de 10 ng/μL y un volumen final de 20 μL, estas muestras también fueron llevadas para sus análisis de secuenciación, no obstante, los resultados enviados por el Centro Médico Nacional Siglo XXI, indicaron que no se obtuvo secuenciación.

Con el fin de evaluar la integridad del ADN y descartar que la ausencia de amplificación se debiera a degradación del material genético, se realizó una PCR convencional dirigida al gen constitutivo β-actina. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa, observándose bandas con un tamaño aproximado de 450 pb, correspondientes al producto esperado.

El control negativo no presentó amplificación, lo que confirma la ausencia de contaminación en la reacción. Asimismo, se observó variabilidad en la intensidad de las bandas entre muestras, lo que podría reflejar diferencias en la cantidad o calidad del ADN. Adicionalmente, se detectó una señal difusa en regiones de bajo peso molecular, posiblemente asociada a productos inespecíficos o degradación parcial del ADN (Figura 1).

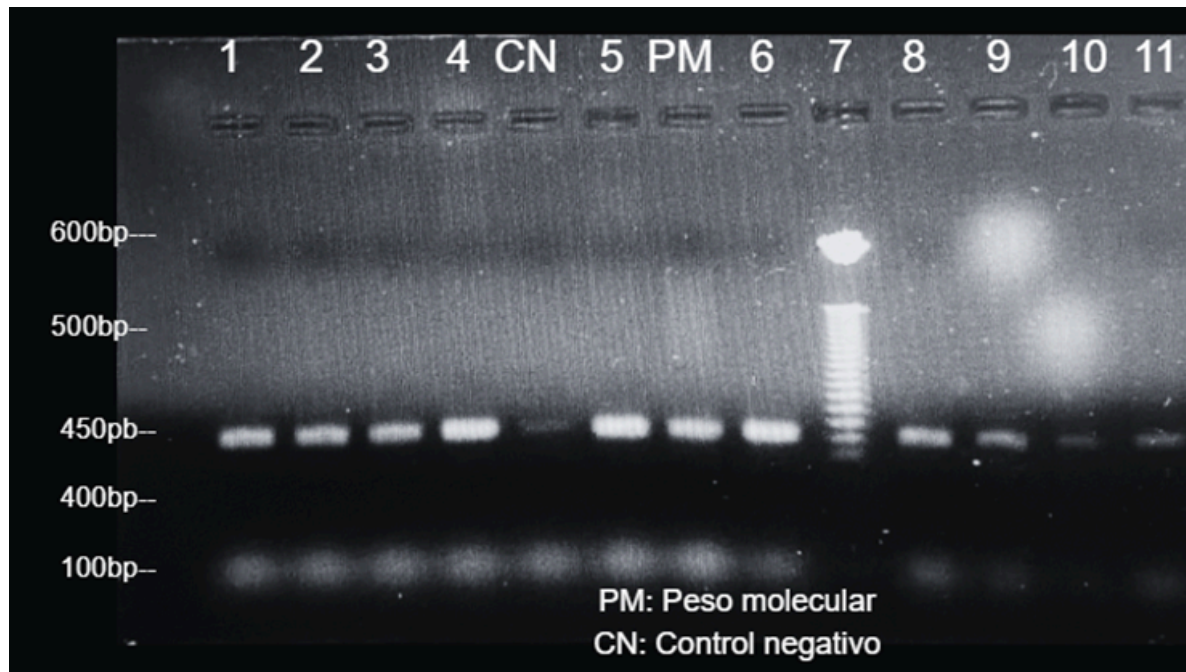


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR del gen β -actina. Se observan bandas de aproximadamente 450 pb en las muestras analizadas, correspondientes al tamaño esperado del amplicón. El marcador de peso molecular (PM) se utilizó para estimar el tamaño de los fragmentos. El control negativo (CN) no presentó amplificación. Se observa variación en la intensidad de las bandas entre muestras y una señal difusa en regiones de bajo peso molecular.

Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio evidencian las dificultades asociadas al análisis de ADN tratado con bisulfito, particularmente en la etapa de amplificación por PCR. A pesar de que el ADN genómico inicial presentó concentraciones y niveles de pureza adecuados, la ausencia de amplificación en las muestras tratadas sugiere que el procesamiento posterior afectó su integridad y su eficiencia como molde.

La amplificación exitosa del gen constitutivo β -actina confirmó que el ADN genómico original se encontraba íntegro y en condiciones adecuadas para su amplificación. Esto sugiere que la ausencia de amplificación en las regiones de interés no se debió a una degradación inicial del ADN, sino probablemente a efectos derivados del tratamiento con bisulfito.

Desde un punto de vista molecular, la conversión con bisulfito implica la sulfonación, desaminación y desulfonación de citosinas no metiladas a uracilos, lo que introduce cambios en la secuencia y somete al ADN a condiciones químicas agresivas que favorecen su fragmentación. Este proceso no solo reduce la longitud de los fragmentos disponibles, sino que también disminuye la complejidad de la secuencia, afectando la eficiencia de alineación de los iniciadores y, en consecuencia, la amplificación por PCR. En concordancia con lo anterior, Grunau *et al.* (2001) reportan que el tratamiento con bisulfito provoca degradación del ADN y disminuye su complejidad, especialmente cuando se trabaja con bajas concentraciones. Este comportamiento es consistente con lo observado en este estudio, donde las muestras mostraron una disminución en la concentración y variabilidad en la pureza posterior al tratamiento.

Por otra parte, se consideró la posibilidad de contaminación en los reactivos, particularmente en el agua libre de nucleasas empleada en las reacciones de PCR, como una posible causa de la falta de amplificación. Sin embargo, esta hipótesis fue descartada al no observarse amplificación en los controles negativos, lo que indica que no existía contaminación detectable en el sistema.

Adicionalmente, se planteó la necesidad de ajustar la concentración del ADN utilizado en la reacción de secuenciación. Inicialmente, las muestras fueron

procesadas a una concentración de 10 ng/μL, sin obtener resultados detectables. Posteriormente, se sugirió incrementar progresivamente la concentración hasta 60 ng/μL; no obstante, debido a limitaciones de tiempo del periodo de mi servicio, no fue posible reportar este ajuste. Aun así, este comportamiento es consistente con lo reportado en la literatura, que indican la necesidad de concentraciones mayores de ADN tratado con bisulfito para obtener resultados confiables.

En este contexto, la falta de amplificación limita la obtención de datos de secuenciación, lo que impide establecer conclusiones definitivas sobre los patrones de metilación en las muestras analizadas.

En conjunto, los resultados destacan que, si bien la conversión con bisulfito es una herramienta fundamental para el análisis de metilación, su implementación implica retos técnicos significativos. La optimización de variables como la cantidad de ADN inicial, las condiciones de conversión y los parámetros de amplificación resulta esencial para mejorar la eficiencia del análisis y garantizar la obtención de resultados confiables en estudios epigenéticos.

Beneficio Social

El presente proyecto aporta un beneficio social relevante al contribuir al entendimiento de los mecanismos epigenéticos asociados a la diabetes gestacional, una condición de alta prevalencia en México y con importantes repercusiones en la salud materna y neonatal.

Si bien no fue posible obtener secuencias de las regiones metiladas, los resultados generados permiten identificar y documentar las limitaciones técnicas del análisis de ADN tratado con bisulfito, lo cual es fundamental para la optimización de metodologías en estudios futuros. Este conocimiento contribuye indirectamente al desarrollo de herramientas más precisas para el estudio de biomarcadores epigenéticos, que podrían emplearse en el diagnóstico oportuno, seguimiento y prevención de enfermedades metabólicas.

Asimismo, el trabajo realizado fortalece las capacidades técnicas en biología molecular dentro del entorno institucional, promoviendo la mejora continua de los procesos experimentales y fomentando la investigación en áreas prioritarias de salud pública. A largo plazo, estos avances pueden favorecer la generación de estrategias más efectivas para la atención y control de la diabetes gestacional, impactando positivamente en la calidad de vida de la población.

Conclusión

El presente estudio permitió evidenciar las limitaciones técnicas asociadas al análisis de metilación del ADN mediante conversión con bisulfito y secuenciación de Sanger. Aunque el ADN genómico inicial presentó condiciones adecuadas de concentración y pureza, el tratamiento con bisulfito afectó su integridad, lo que se reflejó en la ausencia de amplificación por PCR en las regiones de interés.

La amplificación exitosa del gen constitutivo β -actina confirmó la viabilidad del ADN original, por lo que las fallas observadas se atribuyen principalmente a la degradación y a la reducción de la complejidad del ADN tratado con bisulfito. Asimismo, se identificó que la concentración de ADN es un factor determinante para la obtención de productos amplificables y, por ende, para el éxito de la secuenciación.

Aunque no fue posible completar el análisis de las regiones metiladas, los hallazgos obtenidos aportan evidencia relevante sobre la necesidad de optimizar las condiciones experimentales, particularmente en las etapas de conversión con bisulfito y amplificación por PCR. Estos resultados subrayan la importancia de un adecuado control de calidad del ADN tratado y de la estandarización de las condiciones de trabajo, con el fin de mejorar la reproducibilidad y la eficiencia en estudios de metilación y análisis epigenético.

Actividades realizadas y metas alcanzadas

Durante el desarrollo del presente proyecto se lograron cumplir parcialmente los objetivos planteados, destacando principalmente la ejecución de las etapas iniciales del análisis molecular. En primer lugar, se llevó a cabo la separación exitosa de células mononucleares a partir de muestras de sangre periférica mediante gradiente de densidad con Ficoll, obteniendo botones celulares adecuados para su procesamiento.

Posteriormente, se realizó la extracción de ADN genómico, obteniéndose concentraciones y niveles de pureza aceptables para su uso en técnicas posteriores, lo que confirmó la eficiencia del procedimiento de aislamiento. Asimismo, se logró implementar la técnica de conversión con bisulfito, evidenciando cambios en la concentración y calidad del ADN, consistentes con lo reportado en la literatura para este tipo de tratamiento.

Adicionalmente, se ejecutaron las etapas de amplificación por PCR y análisis por electroforesis, incluyendo la estandarización de condiciones experimentales y el uso de controles adecuados. La amplificación del gen constitutivo β -actina permitió confirmar la integridad del ADN genómico inicial y validar el correcto funcionamiento del sistema de PCR.

Finalmente, se llevaron a cabo los procedimientos de preparación para secuenciación por el método de Sanger, incluyendo la purificación de productos y el envío de muestras para su análisis, cumpliendo con las actividades establecidas en el calendario de trabajo.

En conjunto, estas actividades permitieron adquirir y consolidar competencias en técnicas de biología molecular aplicadas al análisis epigenético, así como identificar los principales retos metodológicos asociados al estudio de ADN tratado con bisulfito.

Recomendaciones

Con base en los resultados obtenidos y las limitaciones identificadas durante el desarrollo del estudio, se proponen las siguientes recomendaciones para optimizar futuros análisis de metilación del ADN:

1. Incrementar la concentración inicial de ADN previo al tratamiento con bisulfito, ya que este proceso genera degradación significativa del material genético, lo que puede comprometer su posterior amplificación.
2. Optimizar las condiciones de la conversión con bisulfito, evaluando variables como tiempo de incubación y cantidad de ADN de entrada, con el fin de minimizar la fragmentación y mejorar la recuperación del ADN tratado.
3. Diseñar y validar primers específicos para ADN tratado con bisulfito, considerando la reducción en la complejidad de la secuencia, lo cual puede afectar la eficiencia de alineamiento y amplificación.
4. Evaluar la integridad del ADN posterior al tratamiento, mediante técnicas adicionales (por ejemplo, electroforesis previa a PCR), con el fin de determinar su viabilidad como molde.
5. Aumentar la concentración de ADN en la reacción de secuenciación, idealmente en un rango superior al utilizado en este estudio, para mejorar la calidad de las lecturas obtenidas.
6. Considerar métodos alternativos o complementarios, como secuenciación de nueva generación o PCR en tiempo real específica para metilación, que podrían ofrecer mayor sensibilidad y resolución.

Adicionalmente, con base en lo reportado por Li y Tollefsbol (2011), se sugieren las siguientes consideraciones metodológicas:

1. Emplear ADN de alta calidad y en cantidades superiores a 1 µg, particularmente cuando se trabaja con muestras clínicas, con el fin de garantizar resultados confiables tras la conversión con bisulfito.
2. Incorporar un tratamiento extendido con proteinasa K, que favorezca la eliminación de proteínas residuales y mejore la accesibilidad del ADN al bisulfito; por ejemplo, mediante incubación prolongada a 37 °C.

1. Se puede incorporar una digestión adicional del ADN mediante una endonucleasa insensible a la metilación por restricción antes de la modificación por bisulfito, lo que ayuda a reducir el recocido de la cadena de ADN tras la desnaturalización.
2. Considerar la inmovilización del ADN en matrices de agarosa de bajo punto de fusión, estrategia que disminuye la pérdida de material genético durante el proceso de conversión, especialmente en muestras con baja concentración.

La implementación de estas estrategias permitirá mejorar la eficiencia experimental y favorecer la obtención de resultados confiables en estudios futuros relacionados con epigenética y metilación del ADN.

Referencias Estilo APA (7ª edición)

1. Aguilar-Salinas, C. A., & Tusie-Luna, T. (2023). The role of SLC16A11 variations in diabetes mellitus. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 32(5), 445–450. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000914>
2. Al Aboud, N. M., Tupper, C., & Jialal, I. (2023). Genetics, epigenetic mechanism. In *StatPearls Publishing*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532999/>
3. Analysis and performance assessment of whole-genome bisulfite sequencing pipelines for DNA methylation analysis. (2021). *Frontiers in Genetics*, 12, 841661. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.841661>
4. Davie, J. R., Sattarifard, H., Sudhakar, S. R. N., Roberts, C.-T., Beacon, T. H., Muker, I., Shahib, A. K. & Rastegar, M. (2025). Basic Epigenetic Mechanisms. In *Neuroepigenetics mechanisms in health and disease* (pp. 1–49). Springer https://doi.org/10.1007/978-3-031-75980-2_1
5. Deharvengt, S. J., Petersen, L. M., Jung, H.-S., & Tsongalis, G. J. (2020). Nucleic acid analysis in the clinical laboratory. In W. Clarke & M. A. Marzinke (Eds.), *Contemporary practice in clinical chemistry* (4th ed., pp. 215–234). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815499-1.00013-2>
6. Del Rosario, V. M., Lino, E. D., Moreira, J. X. & Durán, Y. E. (2023). Prevalencia asociada a la diabetes gestacional a nivel Latinoamérica. *MQRInvestigar*, 7(1), 2582–2595. <https://doi.org/10.56048/mqr20225.7.1.2023.2582-2595>
7. Espinosa-Villatoro, E. (2021). Proceso de metilación [Figura 1]. *Revista ConCiencia*. https://www.researchgate.net/figure/Figura-3-Proceso-de-metilacion-del-ADN_fig2_349608233
8. Zymo Research (s.f). *EZ-DNA Methylation-Lightning™ Kit*. The fastest bisulfite conversion. [_d5030t_d5030_d5031_ez_dna_methylation-lightning_kit.pdf](https://www.zymoresearch.com/~/media/Files/Products/EZ-DNA_Methylation-Lightning_Kit/EZ-DNA_Methylation-Lightning_Kit.pdf)
9. Jouve, N. (2020). La epigenética: Sus mecanismos y significado en la regulación génica. *Cuadernos de Bioética*. Departamento de Biotecnología y Biomedicina. <https://vlex.es/vid/epigenetica-mecanismos-significado-regulacion-864999114>
10. Khairil Mokhtar, N. F., El Sheikha, A. F., Azmi, N. I., & Mustafa, S. (2020). Potential authentication of various meat-based products using simple and efficient DNA extraction method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10183>
11. Khehra, N., Padda, I. S., & Zubair, M. (2025). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *StatPearls Publishing*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
12. Kimura, Y., Higuchi, I., Kobayashi, M., Furugen A., Narumi K., Suzuki Y., Miyoshi H., Nakamura A., Atsumi T., Iseki K. (2021). The association between SLC16A11

- haplotype and lipid metabolism in patients with type 2 diabetes. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2020.100376>
13. Lavoro, A., Ricci, D., Gattuso, G., Longo, F., Spoto, G., Venera, A. C., Vitale, V., Chiara, M., Falzone, L., Libra, M., & Candido, S. (2025). Recent advances on gene-related DNA methylation in cancer diagnosis, prognosis, and treatment: A clinical perspective. *Clinical Epigenetics*, 17(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s13148-025-01884-2>
 14. Li, J., Jiang, C., Li, R., Chen, X., & Li, W. (2022). Large-scale manipulation of promoter DNA methylation reveals context-specific transcriptional responses and stability. *Genome Biology*, 23, 263. <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02728-5>
 15. Li, Y., Tollefsbol, T. O. (2021). Advances in bisulfite-based DNA methylation analysis techniques. *Clinical Epigenetics*, 13, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01040-1>
 16. Ling, C., & Rönn, T. (2022). Epigenetics in human obesity and type 2 diabetes. *Nature Reviews Endocrinology*, 18(3), 151–165. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00579-2>
 17. National Human Genome Research Institute. (2025). *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Reacci%C3%B3n-en-cadena-de-la-polimerasa-PCR>
 18. Ongay-Larios, L., & Códiz, G. (2021). Secuenciación de ADN por el método de terminación de la cadena de Sanger. *Facultad de Medicina UNAM*, 45, 23-34. <https://biosensor.facmed.unam.mx/mensajebioquimico/wp-content/uploads/2021/06/6-Ongay-Larios-secuenciacion.pdf>
 19. Parra, S., Hurtado, E., Ángeles, A., Lazcano, E.C. (2025). *Hablemos de diabetes gestacional*. Instituto Nacional de Salud Pública. <https://www.insp.mx/informacion-relevante/hablemos-de-diabetes-gestacional>
 20. Powe, C. E., Allard, C., Battista, M. C., Doyon, M., Bouchard, L., Ecker, J. L., Perron, P., & Florez, J. C. (2016). Heterogeneous contribution of insulin sensitivity and secretion defects to gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 39(6), 1052–1055. <https://doi.org/10.2337/dc15-2558>
 21. Robles, E., Domo, D., Chango, A., Estrada, L., Yugcha, G., & Calderón, M.F. (2024). Diabetes gestacional: Una revisión sistemática. *Revista Medicina*, 25(1), 14–21. <https://doi.org/10.23878/medicina.v25i1.1240>
 22. Saini, A., Rawat, Y., Jain, K., & Mani, I. (2023). State-of-the-art techniques to study epigenetics. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 197, 23–50. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2023.02.004>

23. Tamayo, G., Tamayo, D., Bauza, J., Vázquez, G., De La Rosa, J., Santana, R., & García Díaz, Y. (2022). Incidencia y factores de riesgo de la diabetes gestacional. *Acta Médica del Centro*, 16(1), 79–89. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2709-79272022000100079&script=sci_arttext&tlng=en
24. Vujkovic, M., Keaton, J. M., Lynch, J. A., Miller, D. R., Zhou, J., Tcheandjie, C. & Million Veteran Program. (2020). Discovery of 318 new risk loci for type 2 diabetes and related vascular outcomes among 1.4 million participants. *Nature Genetics* 52, 680–691. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0637-y>