



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

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

**PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

**Validación de hallazgos por NGS mediante la secuenciación dirigida de variantes
patogénicas en individuos con sospecha de enfermedades raras.**

POR ACTIVIDADES VINCULADAS A LA PROFESIÓN

**QUE PRESENTA
ALICIA ITZEL OSALDE RODRIGUEZ
2193031017**

ASESORES

DR FRANCISCO MARTÍN BARAJAS OLMOS

**ASESOR EXTERNO
CFR. 12035540**

M.M.S RUTH SOTO CASTOR

**ASESORA INTERNA UAM-X
NO. ECON. 24789**

25/11/24

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	1
2. LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL SERVICIO SOCIAL	2
3. MARCO INSTITUCIONAL	3
Misión	3
Visión	3
Compromiso social	3
4. OBJETIVO GENERAL	3
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	4
5. ACTIVIDADES DESARROLLADAS	4
5.1 Diseño de oligonucleótidos	5
5.2 Extracción de DNA	6
5.3 Estandarización de oligonucleótidos	7
5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	7
5.5 Electroforesis	8
5.6 Purificación de Productos de PCR	9
5.7 Lectura y análisis de electroferogramas	9
6. VINCULO DE ACTIVIDADES DESARROLLADAS CON LOS OBJETIVOS DE FORMACIÓN DEL PLAN DE ESTUDIO	10
REFERENCIAS	11

RESUMEN

Las enfermedades raras o de baja prevalencia son un grupo amplio y variado de trastornos que afectan a un número reducido de personas se caracterizan por su, baja prevalencia e incidencia, multidiscapacidad, su diversidad, heterogeneidad y su difícil diagnóstico y más del 70% de las enfermedades raras son de origen genético, producto de mutaciones patogénicas, heredadas o de novo.

Los pacientes se enfrentan a un tardío diagnóstico, falta de conocimiento médico y falta de tratamientos esto debido a la baja prevalencia de personas afectadas, que trae complicaciones graves en el manejo y tratamiento para los pacientes, familiares y médicos tratantes. Se necesita por lo tanto de un enfoque multidisciplinario y del uso de tecnologías como lo son la secuenciación de nueva generación para recibir un diagnóstico médico de precisión.

La aplicación de tecnologías de nueva generación para la caracterización molecular de este tipo de enfermedades permitirá establecer una relación genotipo-fenotipo más precisa, identificando genes asociados a la etiología de cada una de las enfermedades en concreto, beneficiando por ende a los pacientes y sus familias.

En este proyecto se validaron los hallazgos obtenidos por secuenciación de nueva generación mediante la secuenciación dirigida de variantes patogénicas en individuos con sospechas de enfermedades raras, esto se realizó mediante técnicas de biología molecular con el fin de poder ofrecer un asesoramiento genético.

Las técnicas de biología molecular que se emplearon fueron la extracción de ADN de pacientes y familiares, iniciando con el diseño de oligonucleótidos para delimitar la zona que se desea amplificar, la reacción en cadena de la polimerasa y la estandarización de la misma, la electroforesis y purificación de ADN.

Los resultados obtenidos validaron las variantes adquiridas por secuenciación de siguiente generación y se identificó que las variantes de los pacientes fueron heredadas un 50% por madre o padre y un 50% de novo.

Palabras Clave: enfermedades raras, secuenciación de nueva generación, PCR, variantes genéticas y diagnóstico molecular.

1. INTRODUCCIÓN

En este reporte final de servicio social me dispongo a informar sobre las labores que desempeñe distribuidas en un periodo de seis meses iniciando el 19 de febrero del 2024 y terminando el 19 de agosto del 2024.

Realice el servicio social en el Instituto Nacional de Medicina Genómica en el Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas (LIEM), en donde se realizan diversas actividades de investigación científica en Medicina Genómica y áreas afines para contribuir a la salud de la población de México, dentro de las cuales se encuentran las relacionadas con las enfermedades de baja prevalencia o enfermedades raras aplicando técnicas de biología molecular.

Las actividades que lleve a cabo consisten en la aplicación de procedimientos de laboratorio para la validación de hallazgos por NGS (Secuenciación de nueva generación), mediante la secuenciación dirigida de variantes patogénicas en individuos con sospecha de enfermedades raras con el fin de poder proporcionar apoyo al personal médico para el diagnóstico temprano de los pacientes, evitando los desafíos a los que se enfrentan los médicos tratantes que limitan el obtener un diagnóstico al paciente conocida como la odisea diagnóstica.

Las enfermedades de baja prevalencia mejor conocidas como enfermedades raras son un grupo de patologías que afectan la calidad de vida de los pacientes y familiares. Es por eso que en fechas recientes se ha buscado visibilizar su existencia, así como su pronto diagnóstico. Por lo que es necesario el trabajo en conjunto de profesionales que ayuden a acelerar el diagnóstico de certeza (Millán & García, 2022).

Las Enfermedades Raras son un problema prioritario y creciente en salud pública. Su diagnóstico es un desafío y para su manejo es fundamental el diagnóstico de precisión (Cortes, 2022).

2. LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL SERVICIO SOCIAL

El Instituto Nacional de Medicina Genómica "INMEGEN" es una Institución Nacional de Salud en México dedicada a la atención médica, enseñanza e investigación científica en medicina genómica y áreas afines, a través del desarrollo de proyectos de investigación básica, clínica, médica y de genómica poblacional y de la vinculación con otras instituciones con la finalidad de contribuir al avance del conocimiento científico, el desarrollo tecnológico y el diagnóstico molecular. Las actividades realizadas en este servicio social se llevaron a cabo en el Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas en donde se realizan actividades de investigación en genómica.

El INMEGEN se encuentra ubicado en Periférico Sur No. 4809 Colonia Arenal Tepepan, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México, el laboratorio se encuentra en cuarto piso en el edificio principal.

3. MARCO INSTITUCIONAL

Misión

Contribuir al cuidado de la salud de los mexicanos desarrollando Investigación científica de excelencia y formando recursos humanos de alto nivel, que conduzcan a la aplicación médica del conocimiento genómico a través de una cultura innovadora, tecnología de vanguardia y alianzas estratégicas, con apego a principios éticos universales.

Visión

Ser líder indiscutible en México y uno de los principales polos de desarrollo de la medicina genómica en el mundo, abarcando la Investigación científica, la formación de recursos humanos, la Innovación tecnológica y el desarrollo de bienes y servicios.

Compromiso social

Actuar con integridad, de manera personal o en equipo y con respeto en el desarrollo de sus actividades cotidianas, para buscar las metas y el éxito del Instituto, contribuyendo simultáneamente al bienestar de la sociedad. Lo anterior, conlleva a observar los siguientes valores institucionales:

Excelencia: Distinguirse por su alto grado de responsabilidad, atendiendo a su propia formación, con el fin de hacer un trabajo de calidad superior, que lo haga digno de aprecio y estimación en la realización de sus funciones.

Integridad: Actuar con rectitud, honestidad, honradez y transparencia, de manera congruente, sin engaños, ni falsedades en la realización de sus funciones.

Creatividad: Mantener una actitud constructiva, considerando la mejora continua y la innovación.

Responsabilidad: Cumplir con oportunidad, eficiencia y eficacia las tareas inherentes a sus funciones, mismas que serán atendidas con diligencia y conocimiento.

Lealtad: Ajustar su actuación al compromiso personal con los objetivos del INMEGEN, de tal modo que se refleje y fortalezca el conjunto de logros del Instituto.

Respeto: Consideración y tolerancia a las diferencias entre las personas.

Solidaridad: Cooperar activamente con los compañeros de otras áreas, promoviendo el trabajo en equipo.

Legalidad: Conocer y cumplir la normativa aplicable a las actividades relativas a su ámbito de competencia.

4. OBJETIVO GENERAL

Validar las variantes patogénicas identificadas por secuenciación de siguiente generación en pacientes con sospechas de enfermedades raras.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ▮ Aplicar técnicas de biología molecular como: Extracción de DNA de una muestra de sangre de los familiares en primer o segundo grado de por lo menos 20 pacientes.
- ▮ Diseñar los oligonucleótidos específicos para las regiones que contienen la variante patogénica de los 20 pacientes y estandarización de las condiciones de amplificación de las reacciones en cadena de la polimerasa y purificación de los productos de amplificación para secuenciación por método capilar de los pacientes y los familiares.
- ▮ Analizar los resultados de secuenciación y reporte de los mismos.
- ▮ Identificar si las variantes fueron heredadas del padre o de la madre

5. ACTIVIDADES DESARROLLADAS

Durante las actividades desarrolladas en el período de servicio social se contribuyó en procedimientos de laboratorio que proporcionaron apoyo en el diagnóstico de 20 pacientes con sospecha de enfermedades raras y de sus familiares. La duración de las actividades fue de 480 horas distribuidas en un periodo de seis meses iniciando el día 19 de febrero del 2024 y terminando el 19 de agosto de 2024.

Para el diagnóstico de pacientes con sospechas de enfermedades raras se requirió la extracción de muestras de ADN de pacientes y familiares además de realizar el diseño de 20 pares de oligonucleótidos para su estandarización. Se amplificó por PCR la región de las variantes patogénicas, el producto se verificó por electroforesis en un gel de agarosa para su purificación y su envío a secuenciación y se analizaron los electroferogramas correspondientes a los pacientes y sus familiares.



Figura 1. Lugar de trabajo en donde se desarrollaron las actividades realizadas en el Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas.

5.1 Diseño de oligonucleótidos

Se realizó el diseño de los oligonucleótidos de amplificación y secuenciación con la herramienta bioinformática, Franklin by genoox (<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>) y Varsome versión 12.2.0 (<https://varsome.com/>), las cuales fueron utilizadas para obtener la secuencia o fragmento específico que deseamos delimitar como zona blanco y Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), esta herramienta se utilizó para generar los pares de oligonucleótidos para la secuencia objetivo usando como temperatura promedio entre 59°C y 61°C, así como también se utilizó la herramienta PCR in silico (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>), para verificar su fiabilidad.

Para el diseño de los oligonucleótidos se tuvo en cuenta que la distancia de Forward y Reverse fuera de al menos 100 pares de bases a la variante pues de no ser así no se obtendrán resultados óptimos de la secuenciación y no se podrían analizar los electroferogramas.



Figura 2. Varsome herramienta utilizada para el diseño de los oligonucleótidos.

5.2 Extracción de DNA

En términos generales, la extracción se compone de tres fases: 1. Disrupción de paredes y membranas celulares que permiten la liberación del ADN, en una fase acuosa que luego es separada de los restos celulares por centrifugación. 2. Eliminación de proteínas y otros componentes celulares, que son removidos de la fase acuosa con solventes orgánicos 3. Limpieza y purificación del ADN, que permanece en la fase acuosa, precipita junto al etanol y posteriormente es purificado y suspendido en un buffer adecuado (Olivares, 2020).

Se realizó la extracción de DNA siguiendo el protocolo (GENTRA PUREGENE KIT QIAGEN).

Se centrifugó la sangre total en el vacutainer a 3500 rpm durante 15 minutos, en la centrifuga Alegra™ 25 R Centrifuge, se extrajo el plasma de cada muestra, se transfirió la sangre remanente y se agregaron 5 ml de solución de lisis RBC (Red Blood Cell) para mejorar el rendimiento.

Después de esto se llevó a un volumen final de 14 ml con solución de lisis RBC y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se realizó un segundo lavado con 5 ml de solución de lisis RBC y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. Se quitó el exceso de solución de lisis RBC, con el sobrenadante remanente y se mezcló en el vórtex. Se resuspendió el botón de células blancas con el sobrenadante remanente y se agregaron 3 ml de Cell Lysis Solution (WLCB).

Se agregaron 15 ml de solución de precipitación de proteínas (PP) y se mezcló con vórtex durante 30 segundos y se dejó reposar 15 minutos, se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos. Se transfirió por decantación el sobrenadante en un tubo nuevo de 15 ml. Se agregó isopropanol al 100% en una relación de 1:1 al sobrenadante y se agitó por inversión, se centrifugó a 3500 rpms durante 15 minutos.

Se desechó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70%, se lavó el botón por inversión varias veces y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar el botón a temperatura ambiente colocando el tubo inclinado boca abajo. El DNA se resuspendió en 300 µl de buffer TE. Finalmente se cuantificó la concentración del DNA en el Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer.



Figura 3. Pasos principales empleados para la Extracción de ADN.

5.3 Estandarización de oligonucleótidos

Para realizar la estandarización de los oligonucleótidos o estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se armonizaron los tres pasos que son la desnaturalización, la hibridación y la elongación, así como, ajustar la cantidad reactivos: H₂O, Buffer, Mg, DNTP's, Oligo 1, Oligo 2 y enzima y por último las condiciones en el termociclador Gene Amp PCR System 9700.

5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para cada PCR individual de pacientes y familiares se descongelaron los reactivos que se emplean para la PCR: DNA, Mg, Buffer, DNTP's, Primer's y H₂O excepto la enzima polimerasa, se etiquetaron los tubos a utilizar.

Las muestras de DNA se cuantificaron en espectrofotómetro Nanodrop y se diluyeron a 50 ng/ul. Para estimar la pureza del ADN se considera la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, si la relación es menor indican la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenol (Velazquez, 2014).

Después se procedió a realizar los cálculos para 50 µL. Se colocaron las muestras en el termociclador Gene Amp PCR System 9700, programado con las condiciones de amplificación establecidas previamente en la estandarización.

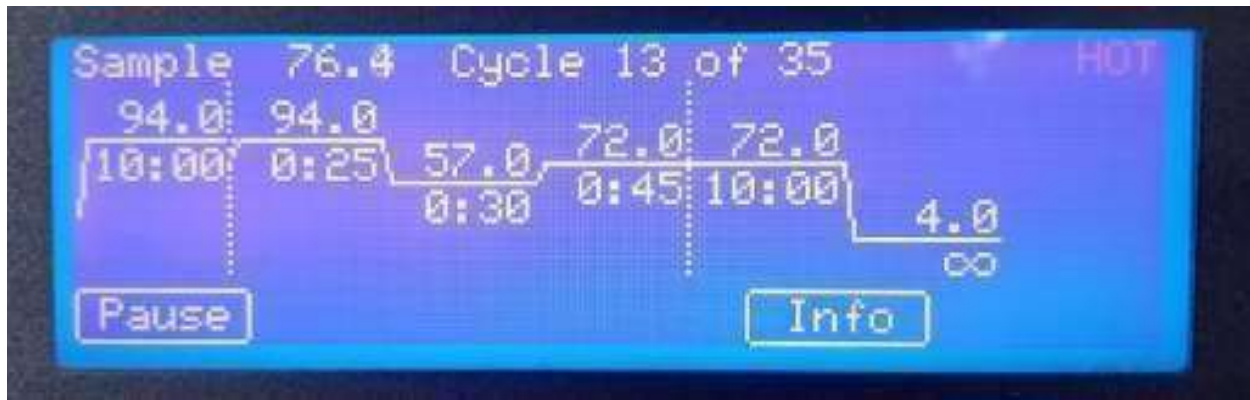


Figura 4. Condiciones del termociclador para los pares de oligonucleótidos de paciente que presenta variante asociada a herencia autosómica dominante.

5.5 Electroforesis

Todos los productos de PCR amplificados fueron verificados por medio de geles de agarosa al 2%. Un gel de agarosa se prepara mezclando la cantidad apropiada de polvo de agarosa con una solución de sustancia amortiguadora (buffer), calentándose hasta disolver la agarosa y después vertiendo el gel derretido sobre una placa (Acosta, 2014).

Cargamos muestras en los pocillos

Por cada pozo se utilizó:

- | Red gel 5.0 μ L
- | Producto de PCR 5.0 μ L
- | Buffer de carga 2.0 μ L
- | Las muestras se corrieron a un voltaje de 70V por una hora

Los geles fueron visualizados en el fotodocumentador para la observación de las bandas de ADN.



Figura 5. Electroforesis: Cargado de muestras “productos de PCR” en pozos de gel de agarosa.

5.6 Purificación de Productos de PCR

La purificación del ADN se llevó a cabo siguiendo el protocolo QIAquick PCR Purification kit.

Se colocó la columna en el tubo de colección de 2 μL y se etiquetó una columna y dos tubos eppendorf limpios y estériles de 1.5 μL por muestra, se adicionaron cinco volúmenes de buffer PB por cada volumen de producto de PCR y se mezclaron con la pipeta.

Para la unión se transfirió toda la muestra a la columna y se centrifugó por un minuto a 13,000 rpm se descartó el filtrado y se regresó la columna al tubo de recolección.

Para el lavado se adicionaron 750 μL de buffer PE al centro de la columna y se centrifugó a 13,000 rpm y se descartó el filtrado se adicionaron 500 μL de buffer PE y se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto se descartó el filtrado, se repitió una vez más el mismo paso y se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm durante cinco minutos, para colocar la columna en un tubo nuevo estéril.

Para la elusión se agregaron 30 μL de agua libre de nucleasas al centro de la columna y el agua fue precalentada a 52° C, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 rpm durante un minuto y finalmente descartamos la columna y cuantificamos el producto de purificación.

En los casos en los que no fue posible quitar el bandeado se realizó la purificación de ADN por medio de corte de banda.

5.7 Lectura y análisis de electroferogramas

Los productos amplificados fueron secuenciados mediante la metodología de Sanger, la secuenciación fue realizada en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por la Red de apoyo a la investigación (RAI). Luego los archivos producto de esta secuenciación en formato ab1 se analizaron de forma manual a través del visualizador de electroferogramas Geospiza FinchTV Version 1.4.0.y el programa Pick4. Se consideraron para el análisis las secuencias de óptima calidad, que permitieran identificar claramente las variantes en pacientes con sospechas de enfermedades raras y sus familiares.

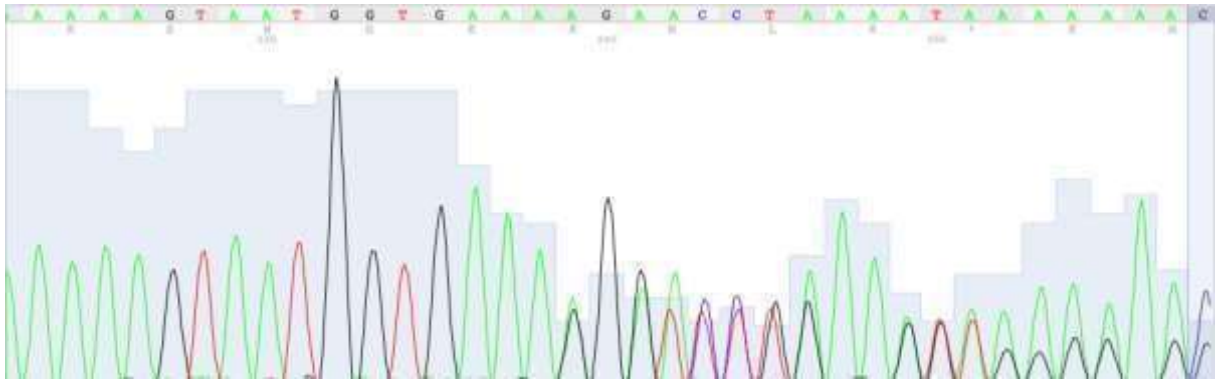


Figura 6. Electroferograma de paciente en formato AB1 que presenta la variante asociada a enfermedad autosómica recesiva GA-G.

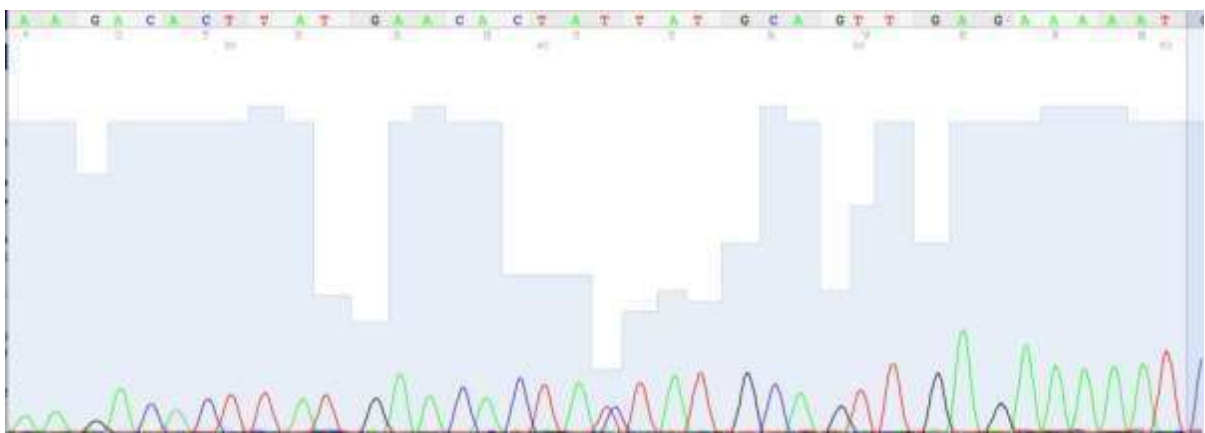


Figura 7. Electroferograma de paciente en formato AB1 que presenta, la variante asociada a enfermedad autosómica dominante, [T/C].

6. VINCULO DE ACTIVIDADES DESARROLLADAS CON LOS OBJETIVOS DE FORMACIÓN DEL PLAN DE ESTUDIO

Las actividades elaboradas en este proyecto me aportaron conocimientos necesarios para mi formación profesional y fui capaz de realizar actividades científicas, con una perspectiva multidisciplinaria pues se adquirieron conocimientos y habilidades que me servirán de base para el ámbito profesional y laboral, en lo referente al aplicar técnicas de biología molecular como lo son el diseño de oligonucleótidos, extracción de DNA, la reacción en cadena de la polimerasa, electroforesis y purificación de ADN. Además, conocimientos teóricos y habilidades en lo que respecta a documentación de datos como el diseño de filogramas, la creación y edición de bases de datos y el análisis de electroferogramas.

La realización de este Servicio Social en el Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas contribuyó al diagnóstico de pacientes con sospecha de enfermedades raras mediante técnicas de biología molecular. De esta forma se

adquirieron conocimientos que favorecieron al alumno en su formación profesional pues puede aplicar los conocimientos adquiridos no sólo en áreas de la salud, sino que también tienen el potencial de ser aplicadas a problemas asociados con otros campos de la biología.

Adquirí los conocimientos necesarios que me permitieron la adquisición de fortalezas para mi formación académica y profesional en lo referente a nuevos conocimientos esenciales, experiencias, habilidades, competencias y metodologías que le permitieron participar en el diagnóstico de pacientes con sospechas de enfermedades raras y de esta forma permitir a los médicos tratantes dar un asesoramiento genético una vez que el diagnóstico de certeza es realizado.

Aprendí al realizar las actividades que el trabajo implementado fue de suma importancia pues al hablar de muestras de pacientes que están esperando un diagnóstico se deben tomar en cuenta los tiempos y la calidad en todo el proceso de laboratorio debido a lo relevante del proporcionar un diagnóstico pues de esto dependen acciones que impactaran en la vida del paciente y sus familiares por lo cual las actividades realizadas deberán ser trabajadas de la mejor manera. En conclusión las actividades realizadas fueron cumplidas de una manera adecuada y satisfactoria y obtuve una actitud crítica y una concepción científica.

Lo más importante de esta experiencia es que pude prestar un servicio que fue benéfico para los pacientes con sospechas de enfermedades raras y sus familiares y cumplí con los objetivos de formación de la licenciatura.

REFERENCIAS

Acosta Lucas, K. C. (2014). Establecimiento de una metodología para la extracción y purificación de ADN genómico de *Gmelina arborea* Roxb.

<https://repositorio.uteq.edu.ec/server/api/core/bitstreams/e1b3072a-8a4e-4d1b-859f-bf03ccae04f5/content>.

Cortes, F. M. (2022). Medicina de precisión de enfermedades raras. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 33(2), 148-153.

Millán, J. M., & García-García, G. (2022). Genetic Testing for Rare Diseases. *Diagnostics*, 12(4), 809.

Olivares, M. S. (2020). *Estudio de metodologías de extracción y purificación de ADN de alimentos para amplificación por PCR* (Master's thesis).

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, 1-26.



DR FRANCISCO MARTÍN BARAJAS OLMOS

**ASESOR EXTERNO
CFR. 12035540**



M.M.S RUTH SOTO CASTOR

**ASESORA INTERNA UAM-X
NO. ECON. 24789**