

**INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE**  
**Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales**

**Sustentabilidad y tecnología**

**PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)**  
**Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I**



ITESO, Universidad  
Jesuita de Guadalajara

**4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I**

**Estandarización e implementación de una técnica costo efectiva para la  
identificación de la variante p.S549N del gen *CFTR* en muestras de pacientes  
con fibrosis quística**

**PRESENTAN**

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Biotecnología, Abril Ixchel Muñoz Zúñiga

Profesor PAP: Dra. Lourdes del Carmen Rizo de la Torre

Tlaquepaque, Jalisco, mayo de 2022

# ÍNDICE

## Contenido

REPORTE PAP.....	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional.....	2
Resumen .....	0
1.    Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional .....	0
1.1    Entendimiento del ámbito y del contexto .....	1
1.2    Caracterización de la organización .....	6
1.3    Identificación de la(s) problemática(s) .....	7
1.4. Planeación de alternativa(s) .....	8
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora.....	14
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos.....	23
1.7. Bibliografía y otros recursos .....	24
1.8. Anexos generales .....	26
2. Productos.....	29
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia .....	32
3.1 Sensibilización ante las realidades .....	32
3.2 Aprendizajes logrados .....	33
3.3 Inventario de competencias Inicial (ingreso del PAP) e Inventario de competencias Final (salida al PAP).....	33

## REPORTE PAP

### Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

*Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son experiencias socio-profesionales de los alumnos que desde el currículo de su formación universitaria- enfrentan retos, resuelven problemas o innovan una necesidad sociotécnica del entorno, en vinculación (colaboración) (co-participación) con grupos, instituciones, organizaciones o comunidades, en escenarios reales donde comparten saberes.*

*El PAP, como espacio curricular de formación vinculada, ha logrado integrar el Servicio Social (acorde con las Orientaciones Fundamentales del ITESO), los requisitos de dar cuenta de los saberes y del saber aplicar los mismos al culminar la formación profesional (Opción Terminal), mediante la realización de proyectos profesionales de cara a las necesidades y retos del entorno (Aplicación Profesional).*

*El PAP es un proceso acotado en el tiempo en que los estudiantes, los beneficiarios externos y los profesores se asocian colaborativamente y en red, en un proyecto, e incursionan en un mundo social, como actores que enfrentan verdaderos problemas y desafíos traducibles en demandas pertinentes y socialmente relevantes. Frente a éstas transfieren experiencia de sus saberes profesionales y demuestran que saben hacer, innovar, co-crear o transformar en distintos campos sociales.*

*El PAP trata de sembrar en los estudiantes una disposición permanente de encargarse de la realidad con una actitud comprometida y ética frente a las disimetrías sociales. En otras palabras, se trata del reto de “saber y aprender a transformar”.*

*El Reporte PAP consta de tres componentes:*

*El primer componente refiere al ciclo participativo del PAP, en donde se documentan las diferentes fases del proyecto y las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo de este y la valoración de las incidencias en el entorno.*

*El segundo componente presenta los productos elaborados de acuerdo con su tipología.*

*El tercer componente es la reflexión crítica y ética de la experiencia, el reconocimiento de las competencias y los aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.*

## Resumen

El presente PAP consiste en la estandarización e implementación de una técnica costo efectiva para la identificación de la variante p.S549N del gen *CFTR* en muestras de pacientes con fibrosis quística. Se extrajo el ADN por el método de extracción DTAB/CTAB de las muestras control para el proceso de ARMS-PCR. Para la visualización de los resultados de la PCR se optó por utilizar la técnica de electroforesis en poliacrilamida con tinción de plata. Se estandarizó la técnica de ARMS-PCR para la detección de la variante patogénica p.S549N y p.G551D; y se logró realizar el procedimiento de ARMS-PCR de la variante p.G551D para 237 muestras, de las cuales una muestra resultó positiva para esta mutación.

### 1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional

El PAP es una experiencia de aprendizaje y de contribución social integrada por estudiantes, profesores, actores sociales y responsables de las organizaciones, que de manera colaborativa construyen sus conocimientos para dar respuestas a problemáticas de un contexto específico y en un tiempo delimitado. Por tanto, la experiencia PAP supone un proceso en lógica de proyecto, así como de un estilo de trabajo participativo y recíproco entre los involucrados.

Este proyecto se lleva a cabo de forma experimental y presencial en el Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) en el área de Medicina Molecular, bajo la supervisión de la Dra. Lourdes del Carmen Rizo de la Torre. El proyecto tiene como objetivo general estandarizar una técnica costo efectiva para la identificación de la variante p.S549N del gen *CFTR* en muestras de pacientes con fibrosis quística. El estudio también comprende los siguientes objetivos específicos:

- Establecer condiciones de PCR alelo específica para la variante p.S549N.
- Identificar variante p.S549N en muestras seleccionadas de pacientes.
- Identificar variante p.G551D en muestras seleccionadas de pacientes.

En las primeras dos semanas del proyecto se estandarizaron las condiciones para la PCR alelo específica. Posteriormente se les realizó la identificación de la variante p.G551D en 237 muestras de ADN que se conservan en la colección de muestras de pacientes con fibrosis quística.

## 1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

La fibrosis quística (FQ) es un trastorno autosómico recesivo potencialmente mortal. Los síntomas se pueden presentar desde la etapa neonatal, con íleo meconial que causa obstrucción intestinal. En la infancia se presentan frecuentemente problemas respiratorios (tos, neumonías), desnutrición y retraso en el crecimiento y en algunas ocasiones, insuficiencia pancreática exocrina que se suele presentar con diarrea y esteatorrea; la enfermedad es progresiva, los pacientes de mayor edad se pueden presentar acropaquia (**Figura 1**), pólipos nasales, sinusitis, o incluso asmáticos [1].

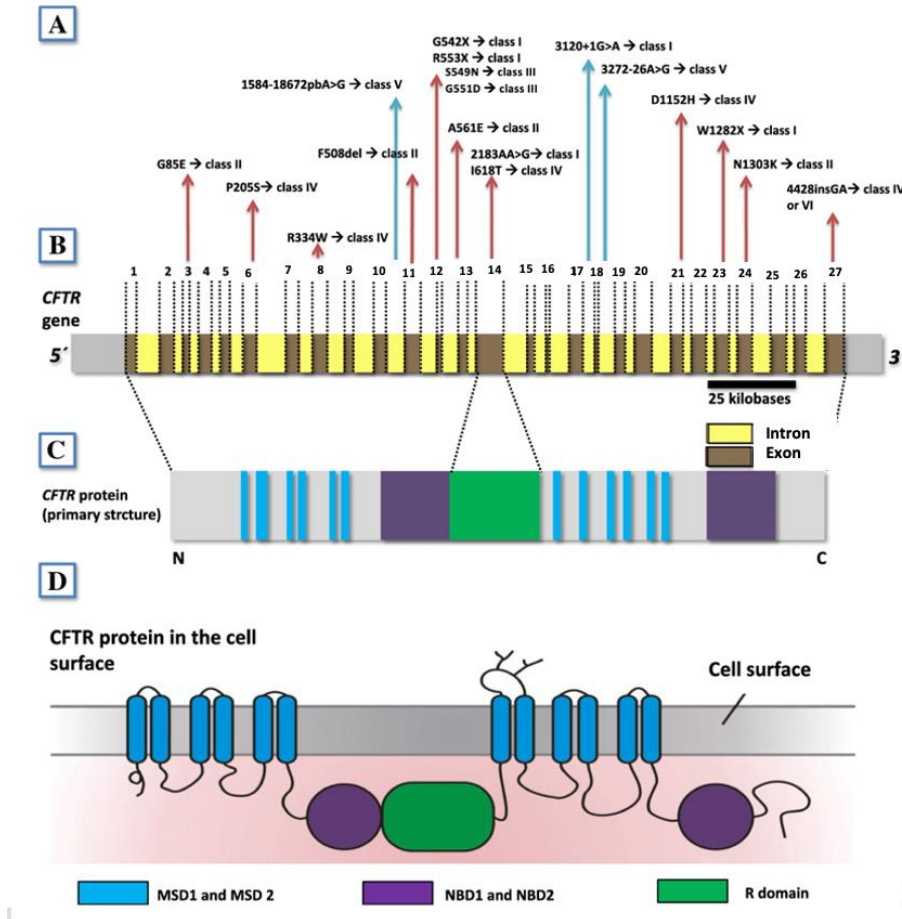


**Figura 1. Acropaquia [1]**

Esta enfermedad está ocasionada por variantes en el gen regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (*CFTR* localizado en el cromosoma 7q31.2), que es el responsable de la codificación para un canal de cloro. Tanto la variante p.S549N como la p.G551D son variantes de clase III, cuya patología consiste en errores en la apertura del canal. Existe un fármaco específico, Ivacaftor, para el tratamiento de pacientes con fibrosis quística portadores de la variante p.S549N, que demuestra su eficacia al erradicar infecciones de *Pseudomonas* y normalización de las concentraciones de cloro en sudor en estos pacientes [2].

En la figura 2 se puede observar la estructura de la proteína CFTR. Se destacan las mutaciones y su localización en los intrones y exones del gen. Así como en su forma en mRNA que muestra las secuencias que producen los diferentes dominios de la proteína CFTR en la membrana [3]. Las variantes patogénicas p.S549N y p.G551D se encuentran en el

dominio NBD1, que es uno de los principales dominios que regula del flujo en el canal de cloro [4].



**Figura 2. Gen CFTR.** – A. Variantes más frecuentes en el gen CFTR. B. Gen CFTR con intrones (amarillo) y exones (café). C. mRNA que muestra las secuencias que producen los diferentes dominios de la proteína CFTR en la membrana. D. CFTR en la membrana con sus constituyentes [3].

Se conocen más de 1,800 mutaciones para *CFTR*. En la población caucásica hay un índice en recién nacidos con una variación patogénica de 1 en 2,000. Aunque no hay un índice reportado para la población Latino Americana, en México la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística (AMFQ) tiene un índice estimado de 1 en 8,000 recién nacidos con esta condición [5].

La población mexicana tiene una estructura genética compleja, en donde el componente genético amerindio representa del 30.3% al 68.6%, el europeo del 30% al 65.6% y el africano del 2.2% al 6.3% [6]. Es por esto por lo que México tiene un amplio espectro de variaciones de *CFTR*, incluso algunas que solo se presentan en mexicanos, por lo que la identificación de las variantes en este gen en México se vuelve compleja. En poblaciones caucásicas el análisis de cinco de las variantes más comunes en Europa (p.F508del, p.G542X, p.N1303K, p.R553X y p.G551D) han logrado la detección del 98% de los alelos afectados, mientras que en México el mismo análisis sólo logró caracterizar el 50% de los alelos. En poblaciones con alta heterogeneidad, como es el caso de México, se deben aplicar diferentes técnicas para la identificación de las variantes patogénicas en los alelos [5].

En México hay nueve variantes reportadas como las más frecuentes: p.F508del (38.6%), p.G542X (6.1%), p.S549N (2.1%), p.N1303K (1.9%), c.3849+10kbC>t (1.3%), p.R334W (1.1%), c.621+1G>T (0.2%), p.R553X (0.2%), p.G551D (0.2%) [7] [8] [9].

#### *Extracción de ADN*

Existen distintas técnicas para lograr una extracción de una muestra de ADN (Tabla 1).

**Tabla 1. Comparación de técnicas de extracción de ADN**

Técnica	Características	Referencia
KIT comercial “GeneCatcher Blood kit”	Permite una extracción rápida y eficiente de ADN genómico a partir de sangre periférica humana. La tecnología se basa en microesferas magnéticas y no requiere el uso de centrifugación. Promete un ADN purificado con alta pureza. Utilizar kits aumenta el costo de la extracción.	[10]
Miller	Consiste en la purificación de ADN por precipitación de las proteínas a altas concentraciones de sal. El protocolo	[11, 12, 5, 9]

	<p>involucra una digestión inicial con SDS-proteínasa K, seguido de una adición de altas concentraciones salinas. Se centrifuga y después se precipita el ADN con isopropanol. La utilización de la proteínasa K puede hacer el proceso mas largo y costoso comparado a si se usan otros agentes para las soluciones.</p>	
<p>KIT comercial “HIGH Pure PCR Template Preparation Kit”</p>	<p>Esta técnica se basa en un kit que contiene dos componentes principales: una solución de lisis y una para la precipitación de proteínas. Se comprende de un tubo filtro y un tubo colector. Se requiere de incubación para degradar la muestra y seguir el protocolo especificado en el kit. El resultado es una pureza relativamente buena, aunque resulta una técnica más costosa que la de DTAB/CTAB, pero en menor tiempo, ya que las soluciones ya vienen preparadas.</p>	<p>[12]</p>
<p>DTAB (Bromuro de (1-dodecíl) trimetilamonio)/ CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio)</p>	<p>La técnica consiste en la adición de buffer de lisis que se prepara con DTAB. La desproteínización se realiza con la adición de cloroformo y se añade CTAB como agente extractivo que produce disgregación de las membranas celulares y la desnaturalización de proteínas. Este protocolo de extracción brinda buenos beneficios ya que produce mejores valores de concentración y pureza a bajo costo.</p>	<p>[12] [13] [14]</p>

### Identificación de variantes patogénicas

Existen diversas técnicas para encontrar variantes patogénicas en muestras de ADN genómico (Tabla 2).

**Tabla 2. Comparación de técnicas de identificación de variantes patogénicas**

Técnica	Características	Referencia
PCR-RFLP's (por sus siglas en inglés <i>polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism</i> )	La PCR-RFLP se aprovechan los sitios de restricción de una enzima bacteriana. Una serie de cuatro a ocho nucleótidos en donde una enzima hace un corte. Una sola diferencia de base puede hacer que la enzima no haga el corte. Si en una sección de ADN no existe corte, esto resulta en un polimorfismo. Si no hay corte resultará como una sola banda en la electroforesis, mientras que el corte con la enzima resultaría en dos bandas.	[15]
PCR-ARMS (por sus siglas en inglés <i>Amplification refractory mutation system - Polymerase chain reaction</i> )	La técnica se basa en usar un <i>primer</i> específico que permita la amplificación de ADN sólo cuando el alelo contiene la mutación. De esta manera se puede tener un resultado positivo de amplificación sólo cuando existe la variación que se busca.	[16]
Secuenciación	La secuenciación de ADN permite conocer el orden de los nucleótidos de un fragmento de ADN provenientes de una PCR. Para este proceso se necesitan nucleótidos modificados (ddNTPs con marcaje fluorescente); los cuales producirán cadenas de ADN en	[17]

	diferentes longitudes, posteriormente serán separados por tamaño utilizando electroforesis.	
qRT-PCR ( <i>quantitative Real Time</i> - PCR)	Este método mide la acumulación de productos de PCR a través de una sonda fluorogénica de doble marca. A diferencia de otros métodos de PCR no requiere manipulación posterior de las muestras, lo que da ensayos más rápidos y con mayor rendimiento, aunque con mayor costo que otros.	[18]

Por lo tanto, en el presente proyecto se planea identificar la variante patogénica p.S549N en muestras de pacientes con fibrosis quística en la población del occidente de México. Para esto se utiliza la técnica de ARMS-PCR, y la técnica de electroforesis con tinción de nitrato de plata para visualización de fragmentos amplificado. Para realizar este proceso es necesaria la extracción de ADN de las muestras de sangre periférica de los pacientes.

La identificación de la variante patogénica es un acompañamiento para derechohabientes del IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social) y sus familiares, que han sido diagnosticados con fibrosis quística. Al día de hoy se tienen alrededor de 440 muestras de pacientes y sus familiares con diagnóstico molecular incompleto. En este PAP se realiza el proceso para la detección de la variante p.S549N.

## 1.2 Caracterización de la organización

Este proyecto se llevará a cabo en la División de Medicina Molecular del CIBO (Centro de Investigación Biomédica de Occidente), ubicado en Sierra Mojada #800, Independencia Oriente, Sector Libertad 44340, Guadalajara, Jalisco. Este Centro pertenece al IMSS, Institución con mayor presencia, el más grande en su género en América Latina, en la atención a la salud y protección de los mexicanos desde 1943. En él se combina la investigación y la práctica médica. También administra recursos para el retiro de sus

derechohabientes y les brinda tranquilidad y estabilidad ante cualquier riesgo especificado en la Ley del Seguro Social [19].

La misión del CIBO es generar conocimientos para explicar fenómenos biológicos a través del método científico con el propósito de: entender mecanismos de enfermedades, desarrollar tecnología para su aplicación en la medicina y formar profesionales de la investigación de la salud. La visión del Centro es ser la entidad de excelencia para el desarrollo de la investigación y difusión de los resultados, para la solución de problemas en los procesos de atención a la salud y para la formación de recursos altamente calificados en el ámbito de la investigación científica biomédica [20].

El proyecto que se establece está al mando de la doctora Lourdes del Carmen Rizo de la Torre, quien es una investigadora asociada de la División de Medicina Molecular del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social. La Dra. Rizo de la Torre es Investigadora de nivel 1 en el Sistema Nacional de Investigadores con grado de doctorado en Genética Humana del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara. Su tesis versó sobre la “Estimación de frecuencias genotípicas de variantes en genes modificadores de hemoglobinopatías y su relación sobre las características hematológicas y bioquímicas en pacientes mestizos mexicanos con talasemia beta” en mayo de 2017.

### 1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

Cuando se tiene la sospecha de FQ en los derechohabientes del IMSS, se realizan pruebas confirmatorias, la cuantificación de cloruros en sudor es el estándar de oro para el diagnóstico de esta patología, cuando se confirma el diagnóstico de FQ, se realiza un estudio genético para identificar las variantes patogénicas que causan esta enfermedad. Del mismo modo, a los familiares de los pacientes también se les ofrece la identificación de las variantes al tratarse de una enfermedad hereditaria. Con esto se puede tener una mejor idea de cómo tratar los síntomas y también llevar un conteo en el país de las variantes patogénicas de esta enfermedad. Al día de hoy hay alrededor de 440 muestras de pacientes y sus familiares sin

un diagnóstico molecular, o bien, con diagnóstico molecular incompleto. Para esto se están realizando pruebas específicas para las 8 variantes más frecuentes de fibrosis quística en México. En este PAP se realiza el proceso de ARMS-PCR para la detección de la variante p.S459N.

#### 1.4. Planeación de alternativa(s)

##### *Extracción de ADN por el método DTAB/CTAB*

Se opta por este método de extracción con una solución buffer, DTAB/CTAB ya que da una buena resolución de las bandas en el gel, lo que indica que hay una cantidad y calidad aceptable de la muestra de ADN. Además, no se presentan contaminantes en el ADN y la cantidad de ADN que se recupera es óptima [14].

La técnica consiste en la obtención de ADN de leucocitos que provienen de muestras de sangre periférica colectada con EDTA (ácido etilendiaminotetracético). La muestra se lleva a dos o tres veces su volumen con una solución de lisis de eritrocitos para separar leucocitos. Posteriormente la técnica comprende la adición de DTAB (Bromuro de (1-dodecil) trimetilamonio) para obtener la desnaturalización y lisis de membranas leucocitarias [21]. Se agrega cloroformo para eliminar la porción orgánica [13]. Después para la precipitación de ADN se añade CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio), como agente extractivo que produce la disgregación de las proteínas de las membranas celulares y la desnaturalización de las proteínas de empaquetamiento del ADN, lo que permite obtener una extracción limpia de ADN [14]. Por último, el ADN se recupera por precipitación de etanol y NaCl y se procede a realizar dos lavados con etanol al 70%, para eliminar los excesos de sales. Se agrega TE (Tris-HCl y EDTA) para disolver el ADN [13]. Por último, para fines de este proceso se realizará una medición en Nanodrop de la concentración y se diluirá hasta 100 ng/μl.

##### *Identificación de variaciones patogénicas*

Para el proyecto se utilizó el proceso de ARMS-PCR para la detección de mutaciones puntuales. Se optó por esta técnica con base en el presupuesto disponible ya que es económica, rápida y lo suficientemente flexible para adaptarse a cualquier variación genética comparada con herramientas como la PCR alelo específica (AS-PCR), análisis de fusión de

alta resolución (HRMA), polimorfismo de conformación monocatenario de PCR (PCR-SSCP), análisis de restricción introducido por cebador de PCR (PCR-PIRA), y PCR en tiempo real [22].

La ARMS-PCR, a diferencia de una PCR común, es un método para detectar cualquier mutación que involucra un cambio en un solo nucleótido o deleciones cortas, en este caso, la detección de la variante patogénica p.S549N.

La técnica se basa en usar un *primer* específico que permita la amplificación de ADN sólo cuando el alelo contiene la variante y otro oligonucleótido que hibrida en presencia del alelo silvestre. Se utilizan dos reacciones diferentes por cada muestra, de esta manera se puede tener un resultado positivo de amplificación sólo cuando existe la variación que se busca [16].

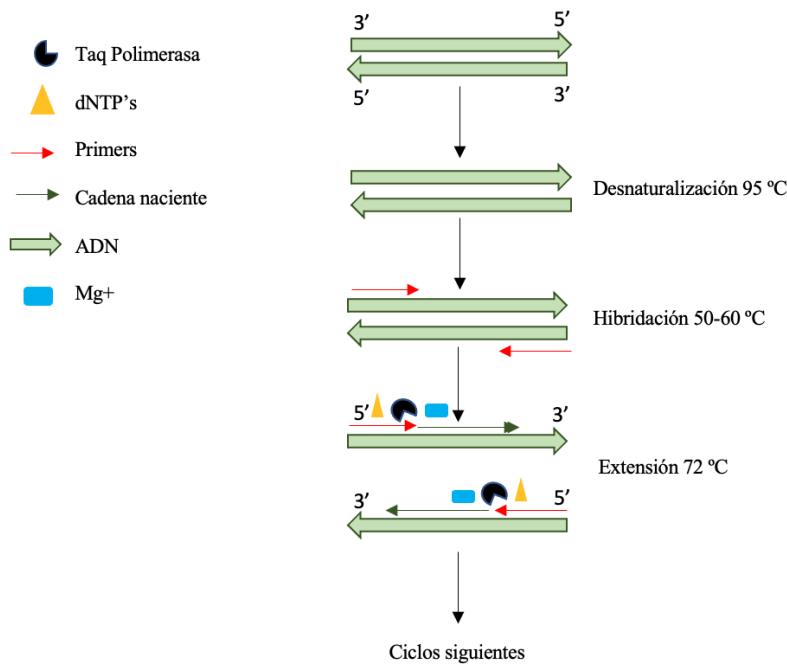
El proceso de PCR es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante ciclos repetidos. Para esto es necesaria la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar cadenas de ADN, utilizando como molde el ADN de pacientes. Para este proceso es importante marcar punto de inicio y fin de la cadena que se va a sintetizar, esto lo marcan los oligonucleótidos específicos (*primers*) para el fragmento que se busca amplificar. Los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), son necesarios para formar la nueva cadena de ADN. El buffer en la reacción funciona como una solución amortiguadora (pH=8) con una concentración final en la reacción de 1X. Es importante también el magnesio, que funciona como un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción [23].

Una vez lista la reacción se utiliza un termociclador que mantiene un sistema homogéneo en la temperatura y tiempo en cada ciclo, en los cuales ocurren tres etapas principales (Figura 3) [23]:

- *Desnaturalización*: en donde sucede el rompimiento de las uniones de las cadenas. Generalmente se lleva a cabo el proceso a 95 °C durante 20-30 segundos. El tiempo

es relativo a la cantidad de uniones entre guaninas y citosinas presentes. Con las cadenas separadas se procede al siguiente paso.

- *Hibridación*: en esta etapa ocurre la alineación de los *primers*/oligonucleótidos con el extremo 3' del ADN molde. Para esto es importante tomar en cuenta la temperatura *melting* (TM) óptima a la que trabajan los *primers*, generalmente es de 50 a 60 °C.
- *Extensión*: En esta última etapa del proceso, la enzima polimerasa actúa sobre la unión del oligonucleótido-ADN molde y comienza a agregar dNTP's complementarios para crear el ADN complementario, en la dirección 5'-3'. La temperatura óptima es la que se indique para la polimerasa utilizada, por lo general 72 °C.



**Figura 3. Pasos de un ciclo de PCR**

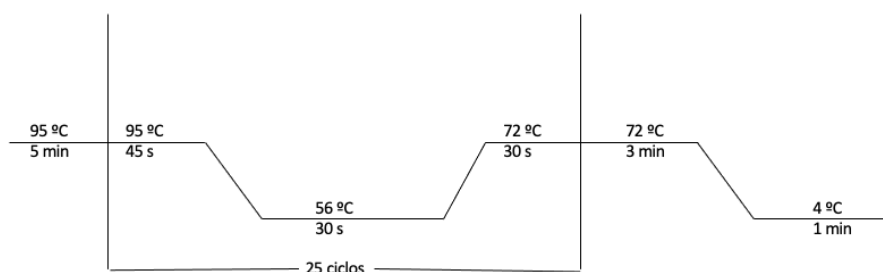
Para corroborar que exista amplificación se escoge un set de oligonucleótidos específicos en el proceso, en este caso HGH (*Human Growth Hormone*), ya que se encuentra en el fragmento a amplificar. Una vez lista la reacción se utilizará el termociclador para llevar a cabo el proceso y que se mantenga homogéneo el sistema con las temperaturas óptimas para los oligonucleótidos específicos de la variante patogénica.

Para este proceso se utilizarán los siguientes *primers forward* y *reverse* para llevar a cabo la amplificación (Tabla 3):

**Tabla 3. Oligonucleótidos p.S549N**

Primer	Fragmento	Longitud	Tm (°C)
Forward	5'- TAA AAT TTC AGC AAT GTT GTT TTT GAC C -3'	28 pb	54.1
Reverse (variante)	5'- ATT CTT GCT CGT TGA CCT CCC T -3'	22 pb	58.4
Reverse (wt)	5'- ATT CTT GCT CGT TGA CCT CCC CT -3'	23 pb	60.4

Tomando en cuenta las temperaturas de alineación de los *primers* (Tabla 3) se diseña el siguiente termograma de la Figura 4, para llevar a cabo el proceso en el termociclador marca *Applied Biosystems* modelo 2400:



**Figura 4. Termograma para p.S549N inicial**

Se planea identificar el siguiente fragmento de 276 pb en la que el cambio es de una sola par de base de guanina para el alelo silvestre a adenina para la variación patológica en la posición 1646, en el exón 12 del gen *CFTR* (c.1646G>A):

TAAAATTTGAGCAATGTTGTTTTGACC AACTAAATAAATTGCAATTTGAAATAATGGAGATGCAATGTTCAAAA  
 ATTTCAACTGTGGTTAAAGCAATAGTGTGATATATGATTACATTAGAAGGAAGATGTGCCTTTCAAATTCAGA  
 TTGAGCATACTAAAAGTGACTCTCTAATTTTCATTTTTGGTAATAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGA  
 CAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGGAATCACACTGAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAAT

Es necesario visualizar el resultado de la PCR por un proceso de electroforesis para el cual existen dos matices de gel muy comunes, el de agarosa y el de poliacrilamida. En el presente proyecto, se optó por utilizar matriz de gel de poliacrilamida, ya que tiene ventajas sobre utilizar agarosa. El poder de resolución es mayor en poliacrilamida y es por eso por lo que se usa para ADN, ya que puede separar las moléculas cuyas longitudes difieren en tan sólo 0.1%, es decir, 1 pb (par de base) en 1000 pb. Además, la poliacrilamida puede retener más ADN en una sola banda, hasta 10 µg. Aunque es más difícil de preparar que la agarosa, es mejor para la resolución de las bandas de ADN [24].

Una vez completada la reacción de PCR, se carga la muestra, añadiéndole un colorante, a la matriz de gel sumergida en una solución acuosa de electrolitos. Se procederá a correrla a 200 V por 45 minutos, de manera que la carga negativa de ADN migre hacia el electrodo positivo [25].

Al finalizar este proceso, el gel se tiñe utilizando una solución fijadora que contiene ácido acético al 0.5%, alcohol absoluto al 10% diluido en 1 L de agua. Posteriormente se aplica una solución de tinción, nitrato de plata al 0.2% en solución fijadora. Por último, se revela utilizando una solución de hidróxido de sodio al 3% en agua, dando como resultado las bandas de ADN visibles e interpretables para cada muestra.

Para llevar a cabo el proyecto se presenta un plan de trabajo (Tabla 4). En este se muestran las actividades a realizar, los recursos y el tiempo necesario para completarlas, de igual manera la semana en la que se concretarán.

**Tabla 4. Actividades previstas para la realización del proyecto**

NOMBRE	RECURSOS	TIEMPO (días)	ENERO		FEBRERO				MARZO				ABRIL			MAYO	
			Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11	Semana 12	Semana 13	Semana 14	Semana 15
Revisión y actualización de bibliografía y redacción de proyecto.	PC, BD, AL, TI	16															
Documentación y bases teóricas de la PCR alelo específica.	PC, AL, TI	1															
Capacitación en el uso y manejo de herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias	PC, AL, TI	1															
Elaboración de base de datos.	PC, TI, BD	2															
Selección e identificación de muestras.	TI, BD	2															
Extracción, cuantificación, validación de integridad y elaboración de alícuotas de trabajo de ADN genómico de muestras de pacientes con fibrosis quística.	TI, BD, RA, BT, CF	2															
Estandarización de PCR alelo específica en muestras de pacientes con genotipos conocidos e identificación de controles.	CF, RP, TI, CE, RE, BD	6															
Identificación de la variante p.S549N en muestras de pacientes con fibrosis quística	CF, RP, TI, CE, RE, BD	18															
Identificación de la variante p.S549N en muestras de familiares de pacientes con fibrosis quística	CF, RP, TI, CE, RE, BD	9															
Análisis de resultados.	AL, TI, PC	3															

La Tabla 5 muestra el significado de las abreviaturas utilizadas para referir los recursos necesarios de cada actividad previamente planteada.

**Tabla 5. Significado de las abreviaturas utilizadas para identificar los recursos en el cronograma**

Recursos Utilizados	
Abreviatura	Significado
PC	Equipo de cómputo personal
BD	Banco de ADN
AL	Asesoría Dra. Lourdes Rizo
TI	Trabajo Individual
CF	Centrifuga
BT	Baño Termostático Seco
TC	Termociclador
RP	Reactivos PCR
RA	Reactivos Extracción de ADN
CE	Cámara de electroforesis
RE	Reactivos electroforesis

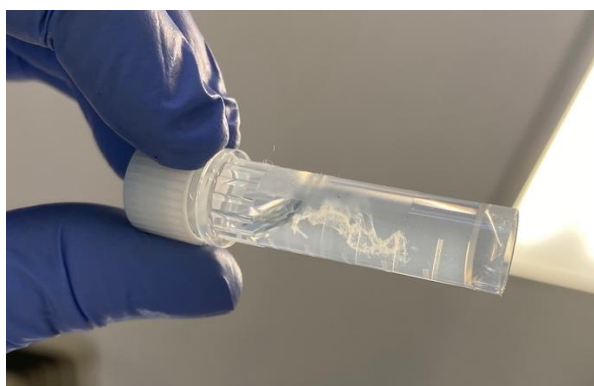
### 1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

#### *Extracción de ADN*

El proceso para la detección de la variante patogénica comienza con una extracción de ADN del paciente o sus familiares. Se realizó este proceso para la obtención de ADN de individuos que se utilizarán como muestras control (positivo y negativo).

El proceso inició con una extracción de 3-5 mL de sangre periférica en tubos con EDTA. Se transfirió a un tubo de 50 mL y se agregaron a la muestra alrededor de 14 mL de buffer de lisis (cloruro de amonio y bicarbonato de amonio 10:1) y se mezcló, se refrigeró por 30 minutos y posteriormente se centrifugó 20 minutos a 4°C por 4500 RPM y se decantó, se obtuvo de esta manera el botón de leucocitos. El botón formado se resuspendió y se pasó a un microtubo, se procedió a centrifugar a 4,500 RPM por 5 minutos. Se agregaron 600 µl de DTAB para resuspender el botón y se colocó la muestra en un baño termostático seco a 68 °C por 15 minutos. Posteriormente se agregaron 900µl de cloroformo y se agitó por 5 minutos. Se centrifugó por 10 minutos a 12,000 RPM, de la fase acuosa resultante se pasaron 300 µl a dos microtubos y a cada uno se agregaron 150µl de CTAB y 900µl de agua destilada y se mezclaron suavemente hasta observar la precipitación del ADN (Figura 5).

Posteriormente se centrifugó a 12,000 RPM por 12 minutos, se decantó y se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de NaCl 1.2 M y 750  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto frío y se agita vigorosamente 10 segundos para desprender el botón. Se centrifugó a 10,000 RPM por 10 minutos, se decantó y se procedió a los lavados para quitar el exceso de sales. Se agregaron 1000  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% frío y se centrifugó a 12,000 RPM durante 5 minutos, esto se repitió dos veces. Se coloca la muestra en un baño termostático seco a 40 °C durante 30 minutos y después se le agregaron de 100 a 300 según el tamaño del botón. Por último, se agitó de manera manual para deshacer el botón y se cuantificó en el NanoDrop.



**Figura 5. Precipitación de ADN**

Al cuantificar el ADN del control positivo dio como resultado una concentración de 1284  $\text{ng}/\mu\text{L}$  mientras que el control negativo una concentración de 246  $\text{ng}/\mu\text{L}$  y se utilizó la ecuación 1 para hacer la dilución a 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$  para cada muestra, concentración óptima para proceder con la identificación de la variante patogénica.

$$C1 C2 = V1 V2$$

**Ecuación 1. Fórmula de concentración**

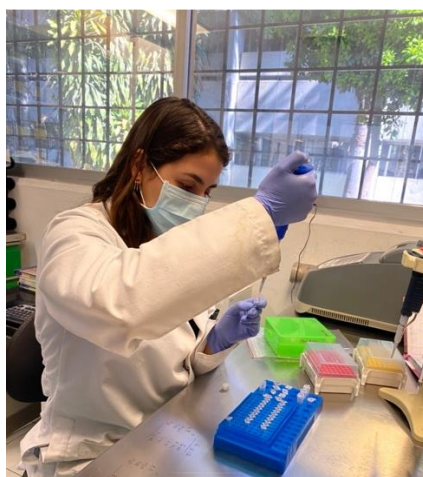
#### *Identificación de variante patogénica*

Se inició con la estandarización del proceso al ser *primers* de nuevo diseño (Tabla 3). Para esto, se realizan soluciones previas para agilizar el proceso. La solución de dNTP's está compuesta de 10  $\mu\text{L}$  de dATP's (desoxiadenosina trifosfato), 10  $\mu\text{L}$  de dGTP's (desoxiguanosina trifosfato), 10  $\mu\text{L}$  de dTTP's (desoxitimidina trifosfato), 10  $\mu\text{L}$  de dCTP's (desoxicitidina trifosfato) y 60  $\mu\text{L}$  de agua. La solución de PCR MIX previa de 1 mL incluye:

144  $\mu\text{L}$  de buffer 10X, 52  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 nM, 30  $\mu\text{L}$  de la solución de dNTP's, y 774  $\mu\text{L}$  de agua.

Al momento del proceso se hizo el PT mix que es una mezcla que incluye por cada reacción PCR a realizar: 0.5  $\mu\text{L}$  de *primer forward* universal, 0.5 de  $\mu\text{L}$  *primer reverse* (ya sea para identificar la variante o el *wildtype*), 0.1  $\mu\text{L}$  de mezcla de *primers forward* y *reverse* para HGH (hormona humana del crecimiento) que se utilizó como control de amplificación, 0.1  $\mu\text{L}$  de Taq Polimerasa y 1.8  $\mu\text{L}$  de agua.

Posteriormente en cada tubo para PCR (figura 6) se agregaron 8.5  $\mu\text{L}$  de PCR mix, 3  $\mu\text{L}$  de PT mix (ya sea PT MIX A para el alelo silvestre o PT MIX B para el alelo variante) y 1  $\mu\text{L}$  de ADN muestra (100  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ). Dos reacciones por muestra se ingresaron al termociclador marca LABNET, modelo Multigene con un programa previamente establecido (Figura 4) y el resultado se interpretó por el proceso de electroforesis.



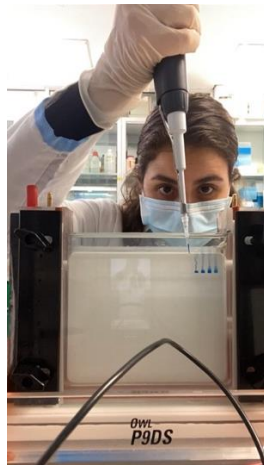
**Figura 6. Elaboración de proceso de PCR**

### *Electroforesis*

Para este proceso de electroforesis se comenzó limpiando los vidrios y separadores de plástico que servirán como molde para la matriz de gel. Una vez limpios, se acomodaron dentro de una bolsa de plástico y se ajustaron con ayuda de una estructura de plástico para que se amolde perfectamente el gel. En un frasco se agregaron 30 mL de poliacrilamida (29

acrilamida: 1 bisacrilamida) al 6%, se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de TEMED (tetrametiletilendiamina) y 300  $\mu\text{L}$  de PSA (persulfato de amonio) al 10%. Se mezcló y se vertió entre los vidrios previamente acomodados, se colocó el peine para formar los carriles del gel y se dejó solidificar 15 minutos verificando que no se formaran burbujas. Una vez sólido el gel se quitó el peine y se lavó con agua destilada, se colocó el gel dentro de la cámara de electroforesis y se ajustó correctamente, después se llenó la cámara de buffer TBE 1X (Tris-ácido bórico-EDTA). A las muestras se les agregaron 2  $\mu\text{L}$  de jugo azul (mezcla de azul de bromofenol, xilen-cianol y glicerol), se cargaron en los pocillos del gel (Figura 7) y se corrió a 200 V por 45 minutos.

Al finalizar este proceso se tiñó el gel. Se desmontó el gel de entre los vidrios y se puso en una tina metálica y se le agregó una solución fijadora, que contiene ácido acético al 0.5% y alcohol al 10% diluido en agua, hasta que se cubrió el gel por 10 minutos y se retiró. Posteriormente se aplicó una solución de tinción, nitrato de plata al 0.2% en solución fijadora, igual hasta que se cubrió el gel por 5 minutos y se retiró. Después, se agregó agua destilada por 3 minutos hasta cubrir el gel y se retiró. Por último, se reveló utilizando una solución de hidróxido de sodio al 3% en agua, el tiempo necesario para observar las bandas de ADN, dando un resultado visible e interpretable para cada muestra.



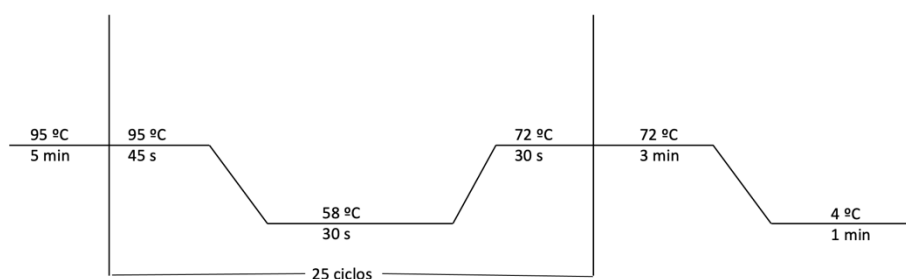
**Figura 7. Elaboración de proceso de electroforesis**

Primero se utilizó el termograma diseñado de manera teórica (Figura 4) y se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 8):

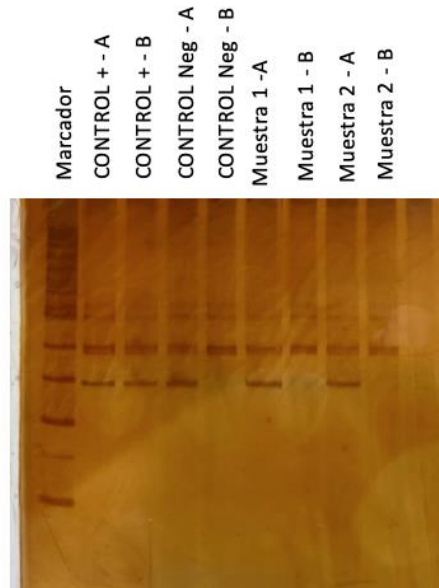


**Figura 8. Proceso de estandarización de variante p.S549N**

Con esta prueba se ingresaron los tubos A y B para cada muestra, es decir con el PT MIX A (*primer silvestre*) y PT MIX B (*primer variante*). Se pudo observar (figura 8) que las líneas eran muy tenues, por lo que se optó por aumentar la temperatura de alineación de 56 °C a 58 °C (figura 9) dando un mejor resultado (figura 10).



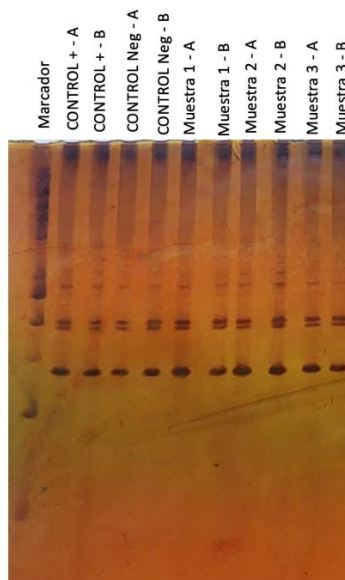
**Figura 9. Termograma para p.S549N estandarizado**



**Figura 10. Gel con proceso estandarizado p.S549N**

En este gel (figura 10) se pudieron observar líneas con mayor intensidad y se concluyó que el proceso se estandarizó bajo esas condiciones (figura 9).

Debido a una contaminación en los reactivos no fue posible seguir trabajando con la variante p.S549N. Se observaron todas las muestras como positivas incluso el control negativo (figura 11). Se concluyó que los *primers* silvestre y variante podrían estar contaminados entre sí.



**Figura 11. Contaminación en variante p.S549N**

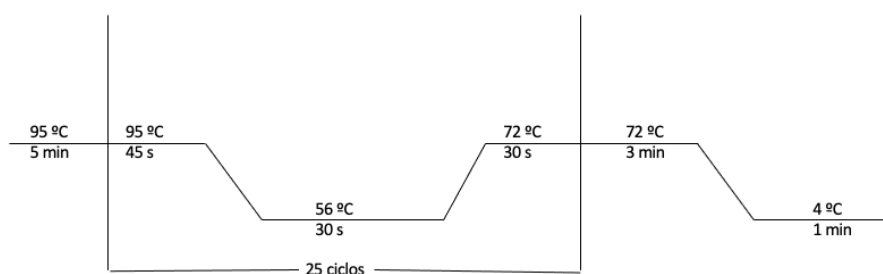
Por tanto, se optó por cambiar de mutación (p.G551D), para la que se llevó a cabo exactamente el mismo proceso, pero con oligonucleótidos (tabla 6), reactivos y un programa nuevo en el termociclador (figura 12) que variaba la temperatura y los tiempos con base en temperaturas óptimas para esto oligonucleótidos específicos para p.G551D con los que se trabajó.

**Tabla 6. Oligonucleótidos p.G551D**

Primer	Fragmento	Longitud	Tm (°C)
Forward	5'- TAA AAT TTC AGC AAT GTT GTT TTT GAC C -3'	28 pb	54.1
Reverse (variante)	5'- AGC TAA AGA AAT TCT TGC TCG TTG CT -3'	26 pb	57.3
Reverse (wt)	5'- GCT AAA GAA ATT CTT GCT CGT TGC C -3'	25 pb	57.1

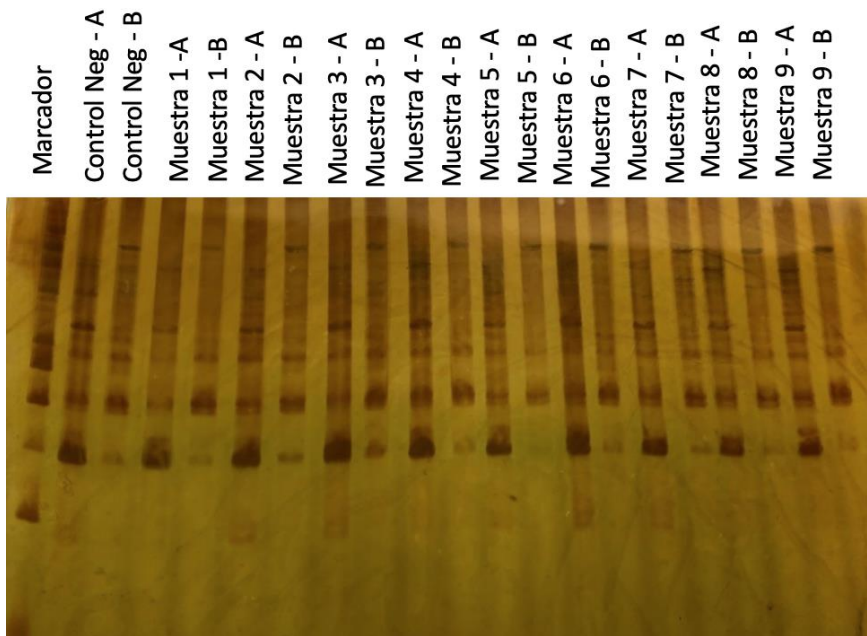
Se identifica el siguiente fragmento para p.G551D de 285 pb en la que el cambio es de una sola par de base de guanina para el silvestre a adenina para la variación patogénica:

TAAAATTTGAGCAATGTTGTTTTGACC AACTAAATAAATTGCAATTTGAAATAATGGAGATGCAATGTTCAAAA  
 ATTTCAACTGTGGTTAAAGCAATAGTGTGATATATGATTACATTAGAAGGAAGATGTGCCTTTCAAATTCAGA  
 TTGAGCATACTAAAAGTGACTCTCTAATTTTCATTTTTGGTAATAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGA  
 CAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGGAATCACACTGAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTTCTTTAGC



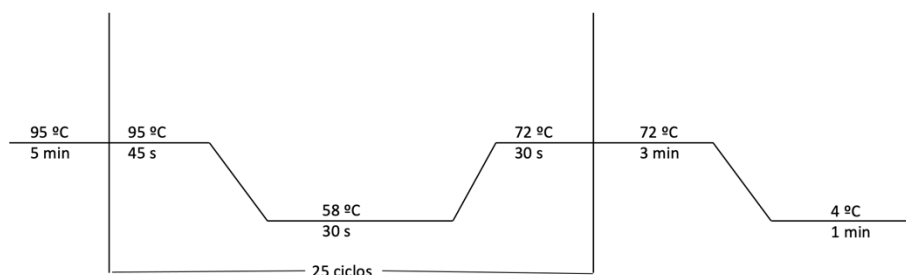
**Figura 12. Termograma para p.G551D inicial**

Se llevó a cabo la PCR para nueve muestras y un control negativo con una temperatura de alineación de 56 °C (figura 13).



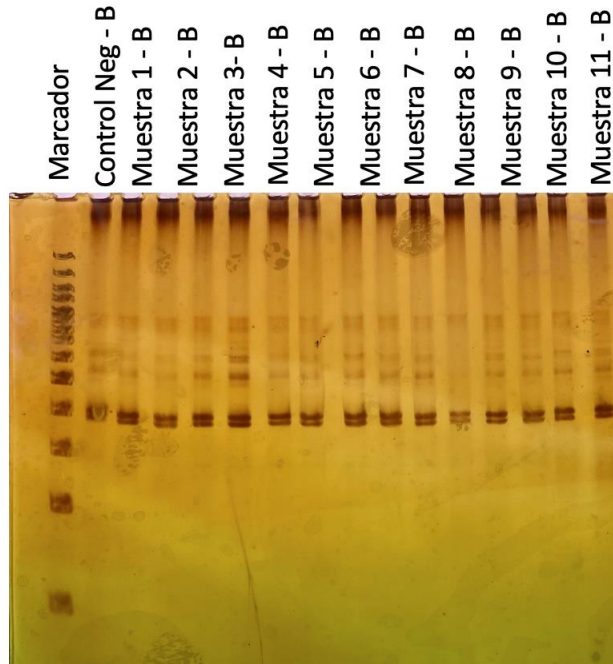
**Figura 13. Estandarización variante p.G551D**

Se puede observar que, a esta temperatura de alineación, 56 °C, existían muchos falsos positivos para el alelo B (*primer* variante), por lo que se decidió aumentar la temperatura para que así fuera aún más específica la hibridación de los *primers* con el ADN. Por tanto, se consiguió la estandarización de la técnica con el termograma ideal para estos oligonucleótidos (figura 14).



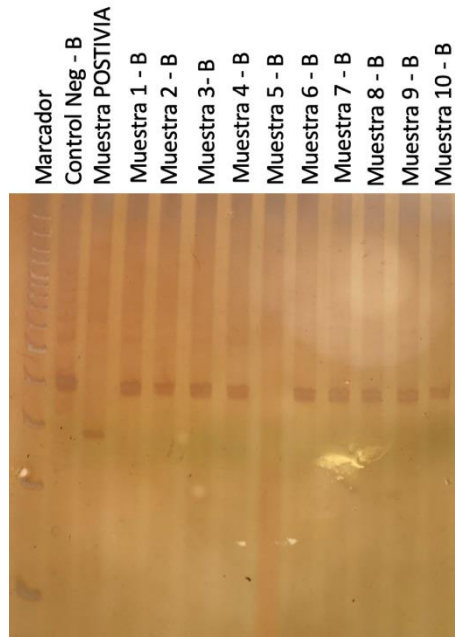
**Figura 14. Termograma para p.G551D estandarizado**

Una vez estandarizada la técnica se decidió usar sólo el alelo variante (B) ya que es una alternativa costo efectiva, al tratarse de una variante no tan frecuente (figura 15).



**Figura 15. Gel alelos B para p.G551D**

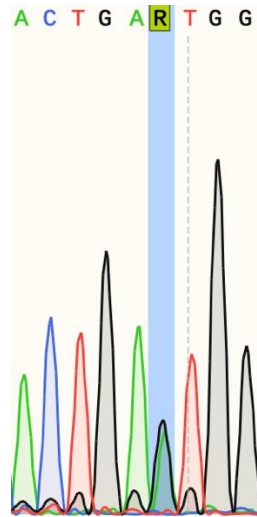
Con el ADN ya diluido a  $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$  se procedió a realizar un ARMS-PCR para 237 muestras en reacciones de 21 muestras por gel. En el cual sólo se tuvo 1 muestra positiva de 237 para la variante p.G551D (figura 16).



**Figura 16. Gel con muestra positiva p.G551D**

En el tercer carril del gel (figura 16) se pudo observar la única muestra positiva registrada para la variante p.G551D. Mientras que para la muestra 5 se puede observar que el ADN está degradado. La muestra positiva nos indica que el método de ARMS-PCR para la detección de la variante p.G551D es un método viable y costo efectivo.

Como método adicional de validación de la variante patológica p.S549N se secuenció la muestra control en la que se pueden observar en el electroferograma (Figura 17) un cambio de guanina por adenina con una sobre posición de los picos en el área señalada.



**Figura 17. Electroferograma de variante patológica p.S549N**

### 1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

La experiencia PAP me permitió explorar el área de investigación y poner en práctica mis conocimientos teóricos para resolver problemáticas reales que me ocurrieron durante el semestre y aprender de las resoluciones. La experiencia también me permitió lograr los objetivos planteados y poder aportar a la toma de decisiones del proyecto de manera respetuosa y aprender de mis propios errores, lo cual llevó a un mayor avance en cuanto a los resultados.

Se obtuvieron resultados muy valiosos ya que se logró la estandarización de la identificación de dos variantes patológicas para fibrosis quística (p.G551D y p.S549N) utilizando la técnica de ARMS-PCR. Para la extracción del ADN para la PCR se utilizó la técnica de extracción

de CTAB/DTAB y para la visualización de los resultados de la PCR se utilizó la tinción de nitrato de plata. Se logró el tamizaje de la variante p.G551D para 237 muestras, de las cuales una resultó positiva.

Se contempla que la técnica de ARMS-PCR se puede estandarizar para otras variantes y así tener un proceso costo efectivo para la detección de otras variantes patogénicas de fibrosis quística. Del mismo modo, se sugiere comprobar cada estandarización por secuenciación para tener un resultado más certero de que el método es el correcto.

### 1.7. Bibliografía y otros recursos

- [1] J. C. Davies. Cystic fibrosis. *British Medical Journal*, vol. 335, n° 7632, pp. 1255-1259, 2007.
- [2] A. Strang, A. Fischer y A. Chidekel. Pseudomonas eradication and clinical effectiveness of ivacaftor in four Hispanic patients with S549N. *Pediatr Pulmonol*, pp. E37-E39, 2017.
- [3] L. Bonadia, F. de Lima Marson, J. Ribeiro, I. Paschoal, M. Pereira, A. Ribeiro y C. Bertuzzo. CFTR genotype and clinical outcomes of adult patients carried as cystic fibrosis disease. *Gene*, pp. 183-190, 2014.
- [4] H. Yu, B. Burton, J. Worley, C. Huang, D. Cao, J. Johnson y F. Van Goor. Ivacaftor potentiation of multiple CFTR channels with gating mutations. *Journal of Cystic Fibrosis*. *Journal of Cystic Fibrosis*, pp. 237-245, 2012.
- [5] M. Chávez, E. Yokoyama, J. L. Lezana, A. Carnevale, M. Macías, R. Viguera, M. López y L. Orozco. CFTR allelic heterogeneity in Mexican patients with cystic fibrosis: implications for molecular screening. *Revista de Investigación Clínica*, vol. 62, n° 6, pp. 546-552, 2010.
- [6] J. Salazar-Flores, F. Zuñiga-Chiquette, R. Rubi-Castellano, J. Álvarez-Miranda, A. Zetina-Hernández, V. Martínez-Sevilla, F. González-Andrade, D. Corach, C. Vullo, J. Álvarez, J. Lorente, P. Sánchez-Diz, R. Herrera, R. Cerda-Flores, J. Muñoz-Valle. Admixture and genetic relationships of Mexican Mestizos regarding Latin American and Caribbean populations based on 13 CODIS-STRs. *HOMO - Journal of Comparative Human Biology*, vol. 66, pp. 44-59, 2015.
- [7] R. Velázquez, J. Zielenski, L. Tsui, L. Chávez y L. Orozco. Spectrum of CFTR mutations in Mexican cystic fibrosis patients: identification of five novel mutations (W1098C, 846deIT, P750L, 4160insGGGG and 297-1G→A). *Hum Genet*, 2000;106:360-. *Hum Genet*, pp. 360-365, 2000.
- [8] A. Rojas-Martínez, E. Villareal-Castellanos, J. Cantú, F. Sánchez-Anzaldo, J. Saiki y C. Villalobos-Torres. Analysis of 16 cystic fibrosis mutations in Mexican patients. *Am J Med Genet*, pp. 69:380-383, 1997.

- [9] M. Chávez-Saldaña, E. Yokoyama, J. Lezama, A. Carnevale, M. Macías y R. Viguera. CFTR allelic heterogeneity in Mexican patients with cystic fibrosis: implications for molecular screening. *Rev Invest Clin*, pp. 546-552, 2010.
- [10] 13 Diciembre 2007. [En línea]. Available: GeneCatcher™ gDNA Automated Blood Kit Número de catálogo: CS2111096.
- [11] D. Chacon y L. Griffiths. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*, pp. 1-9, 2014.
- [12] A. Checa. Secuenciación convencional (Sanger). 2017. [En línea]. Available: <https://conogasi.org/articulos/secuenciacion-convencional-sanger/>.
- [13] E. Martín, M. Moreno, G. Silenzi y M. Bonano. Comparación de métodos de extracción de ADN para el género *Astylus* (Coleoptera: Melyridae). *Acta zoológica lilloana*, pp. 55-65, 2017.
- [14] S. Gustinich. Un método rápido para la extracción de ADN genómico de alta calidad a partir de sangre humana completa. *BioFeedBack*, vol. 11, nº 3, pp. 297-230, 1991.
- [15] N. Grandon, M. Moreno y J. Gieco. Puesta a punto del método de extracción de ADN con CTAB en alfalfa. Anillaco, La Rioja, 2008.
- [16] National Human Genome Research Institute. 27 abril 2022. [En línea]. Available: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Restriction-Fragment-Length-Polymorphism>.
- [17] S. Little. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Curr Protoc Hum Genet*, vol. 9, nº 9, 2001.
- [18] C. Heid, J. Stevens, J. Livak y P. Williams. Real Time Quantitative PCR. *Genome Research*, pp. 986-994, 1996.
- [19] IMSS - Conoce el IMSS. Gobierno de México, 2022. [En línea]. Available: <http://www.imss.gob.mx/conoce-al-imss>.
- [20] Ciencia IMSS. IMSS, 2022. [En línea]. Available: <https://www.cienciaimss.org/index.php>.
- [21] A. Macías. Identificación de Marcadores Genéticos Asociados a un Desenlace Desfavorable en Pacientes con Peritonitis Secundaria no Apendicular con y sin Trastornos de la Nutrición. 2011. [En línea]. Available: <https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/14062/1/testtt.pdf>.
- [22] R. Alyethodi, U. Singh, S. Kumar, A. Rani, D. Rajib, S. Gyanendra, R. Sengar y B. Prakash. T-ARMS PCR genotyping of SNP rs445709131 using thermostable strand displacement polymerase. *BMC Research Notes volume*, 2018.
- [23] T. de Dios, C. Ibarra y C. Velasquillo. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, vol. 2, nº 2, pp. 70-78, 2013.
- [24] M. R. Green y J. Sambrook. Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harb Protoc*, vol. 12, 2020.
- [25] W. Suza, L. Donald, M. Hanneman y D. Namuth. PCR and Gel Electrophoresis. *Iowa State University - Digital Press*, 2022.

## 1.8. Anexos generales

**Tabla 7. Frecuencias de los genotipos identificados en pacientes con fibrosis quística**

<b>Frecuencia de Genotipos</b>		
<b>Genotipos</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
F508del/Otra	79	33.3%
Otra/Otra	144	60.8%
F508del/G542X	1	0.4%
R553X/Otra	2	0.8%
G542X/Otra	8	3.4%
G551D/Otra	1	0.4%
c.3849+10KbC>T/Otra	1	0.4%
F508del/S549N	1	0.4%

**Tabla 8. Frecuencias de los alelos identificados en pacientes con fibrosis quística y el promedio de electrolitos en sudor que presentan dichos alelos**

<b>Alelos</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>Cloruros promedio</b>
F508del	81	17.1%	76.5 mmol/L
Otra	379	80.0%	90.1 mmol/L
S549N	1	0.2%	100.0 mmol/L
G542X	9	1.9%	92.1 mmol/L
R553X	2	0.4%	77.5 mmol/L
c.3849+10KbC>T	1	0.2%	80.0 mmol/L
G551D	1	0.2%	100.0 mmol/L

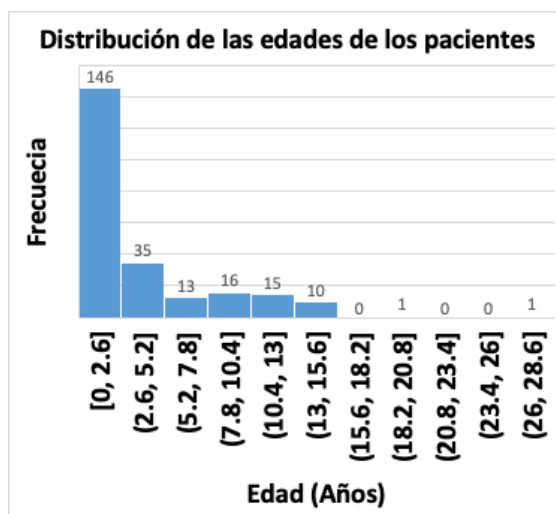
**Tabla 9. Estadísticas generales para edad y electrolitos en sudor**

<b>Estadísticas Generales</b>				
	<b>DE</b>	<b>Media</b>	<b>Mediana</b>	<b>Moda</b>
<b>Edad (Años)</b>	4.6	3.5	1.0	4
<b>Cloruros (mmol/L)</b>	23.0	80.6	90	100

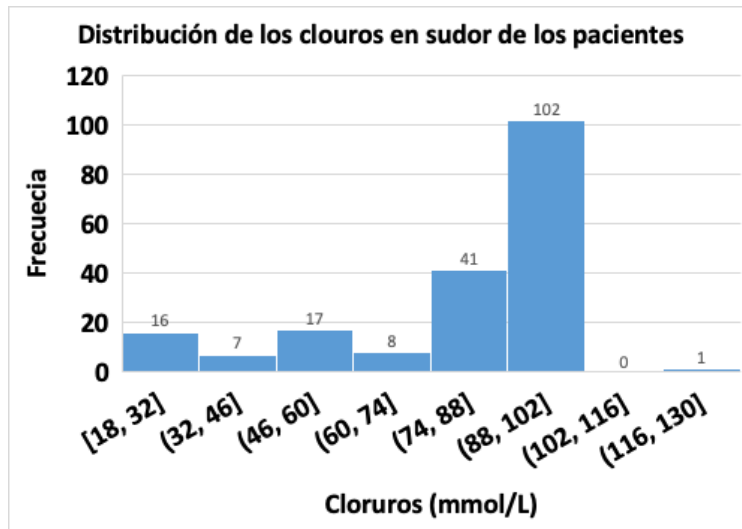
**Tabla 10. Estadísticas de genotipo por sexo**

<b>Genotipo por sexo</b>				
<b>Genotipo</b>	<b>F (Conteo)</b>	<b>M (Conteo)</b>	<b>F (%)</b>	<b>M (%)</b>
F508del/Otra	38	40	48.7%	51.3%
Otra/Otra	68	75	47.6%	52.4%
F508del/G542X	0	1	0.0%	100.0%
R553X/Otra	2	0	100.0%	0.0%
G542X/Otra	7	2	77.8%	22.2%
G551D/Otra	1	0	100.0%	0.0%
c.3849+10KbC>T/Otra	1	0	100.0%	0.0%
F508del/S549N	1	0	100.0%	0.0%

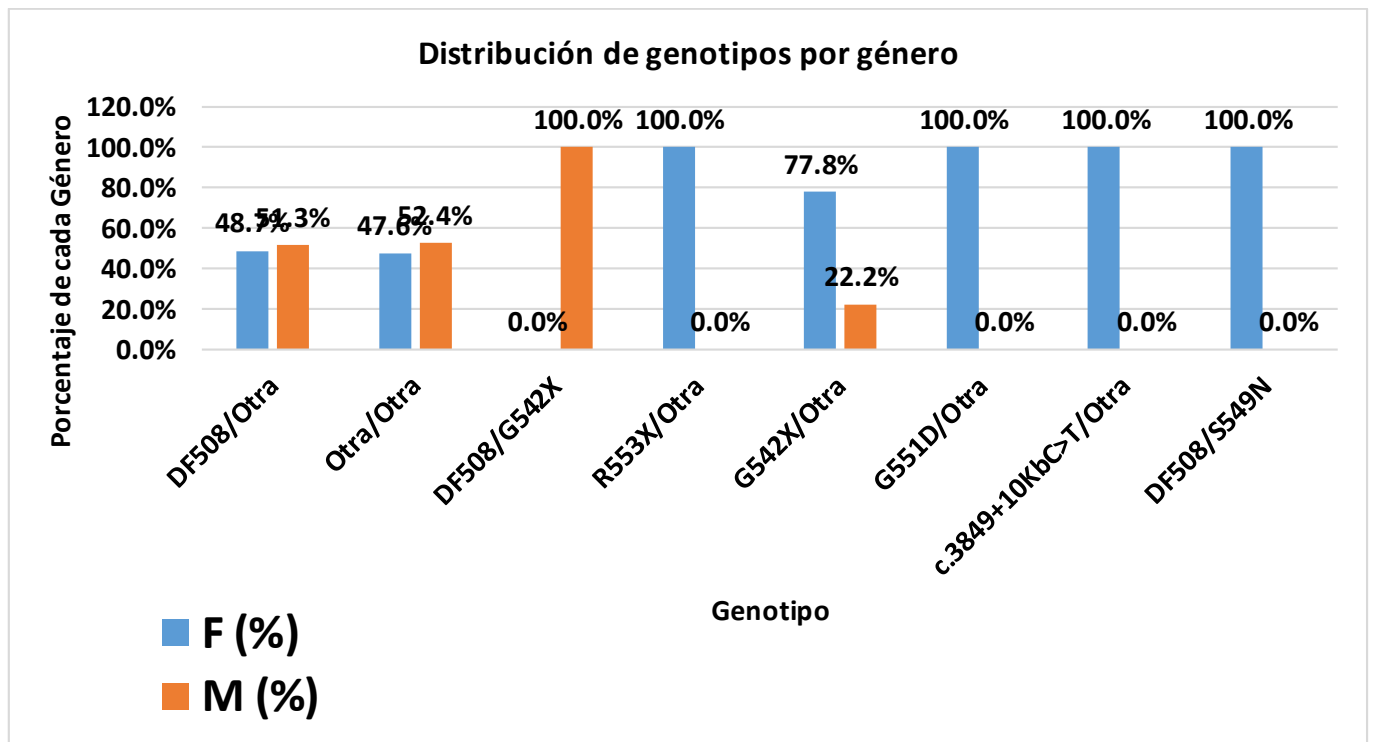
**Gráfica 1. Distribución de las edades de pacientes con fibrosis quística**



Gráfica 2. Distribución de los electrolitos en sudor de pacientes con fibrosis quística



Gráfica 3. Distribución de genotipos por género



## 2. Productos

### Producto 1

Nombre y código del PAP	4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I
Nombre del proyecto	Estandarización e implementación de una técnica costo efectiva para la identificación de la variante p.S549N del gen <i>CFTR</i> en muestras de pacientes con fibrosis quística
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Tamizaje de la variante p.G551D efectuado a pacientes con fibrosis quística. Realizada para el Centro de Investigación Biomédica de Occidente del IMSS en el cual se dirigió el proceso de ARMS-PCR para la detección de esta mutación a 237 pacientes.
Autores:	Abril Ixchel Muñoz Zúñiga

**Tabla 11. Tamizaje de variante patogénica p.G551D**

FOLIO	GÉNERO	GENOTIPO	EDAD (año)	EDAD (mes)	CLORUROS (mmol/L)	RESULTADO
1	F	F508del/Otra	5		80	Negativo
2	F	Otra/Otra		7	18	Negativo
3	F	Otra/Otra	3		85	Negativo
4	M	F508del/Otra	10		75	Negativo
5	F	F508del/Otra	1	11	78	Negativo
6	F	F508del/Otra		4	100	Negativo
7	M	Otra/Otra		9	100	Negativo
8	M	F508del/G542X		7	90	Negativo
9	M	Otra/Otra		9	43	Negativo
10	M	F508del/Otra	9		62	Negativo
11	F	Otra/Otra	1	5	32	Negativo
12	F	Otra/Otra		4	100	Negativo
13	F	Otra/Otra		2	100	Negativo

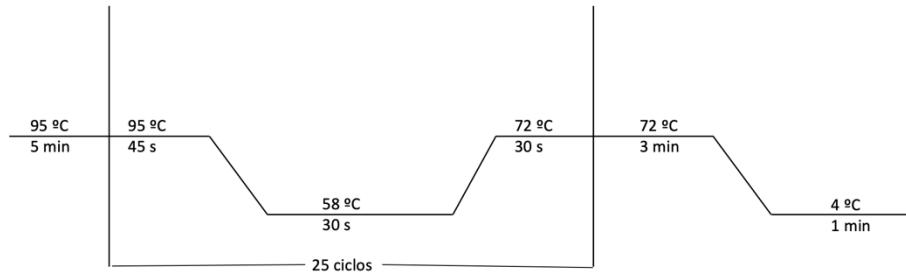
14	F	Otra/Otra	1	4	63	Negativo
15	M	F508del/Otra	1		95	Negativo
16	M	DF508/Otra	10		100	Negativo
17	F	Otra/Otra		9	95	Negativo
18	F	Otra/Otra		6	100	Negativo
19	F	DF508/Otra		2	58	Negativo
20	F	Otra/Otra	1	5	100	Negativo
21	M	Otra/Otra	6		64	Negativo
22	M	DF508/Otra			90	Negativo
23	F	DF508/Otra	2		90	Negativo
24	M	Otra/Otra	6		58	Negativo
25	F	Otra/Otra	19		75	Negativo
26	M	Otra/Otra	4		90	Negativo
27	M	DF508/Otra		5	100	Negativo
28	M	Otra/Otra	5		95	Negativo
29	F	Otra/Otra	9	5	100	Negativo
30	M	Otra/Otra		3	80	Negativo

Documento de Excel completo: [https://iteso01-my.sharepoint.com/:x:/g/personal/ib718868\\_iteso\\_mx/EQtCtyzyQ\\_pOloB1IJQiUwcBjbIVoKKAfc2BRszG4Czs7Q?e=G3XbG1](https://iteso01-my.sharepoint.com/:x:/g/personal/ib718868_iteso_mx/EQtCtyzyQ_pOloB1IJQiUwcBjbIVoKKAfc2BRszG4Czs7Q?e=G3XbG1)

### Producto 2

Nombre y código del PAP	4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I
Nombre del proyecto	Estandarización e implementación de una técnica costo efectiva para la identificación de la variante p.S549N del gen <i>CFTR</i> en muestras de pacientes con fibrosis quística
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Termograma estandarizado para detectar la variante p.G551D utilizando la técnica de ARMS-PCR, indicando las temperaturas y los tiempos necesarios para llevar a cabo el proceso. Se realizó para el Centro de Investigación Biomédica de Occidente del

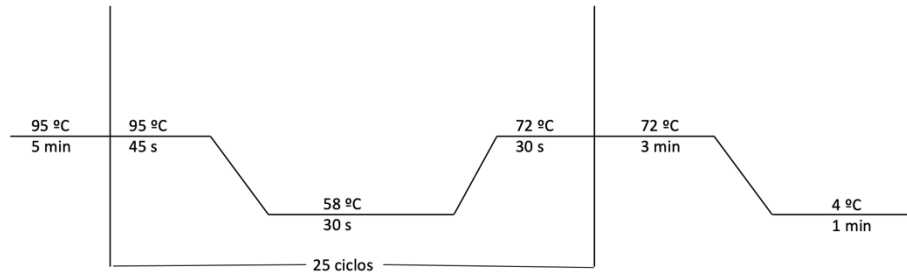
	IMSS, para implementarse como técnica de rutina en la búsqueda de variantes patogénicas frecuentes de <i>CFTR</i> .
Autores:	Abril Ixchel Muñoz Zúñiga



**Figura 18. Termograma para p.G551D estandarizado**

*Producto 3*

Nombre y código del PAP	4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I
Nombre del proyecto	Estandarización e implementación de una técnica costo efectiva para la identificación de la variante p.S549N del gen <i>CFTR</i> en muestras de pacientes con fibrosis quística
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Termograma estandarizado para detectar la variante p.S549N utilizando la técnica de ARMS-PCR, indicando las temperaturas y los tiempos necesarios para llevar a cabo el proceso. Se realizó para el Centro de Investigación Biomédica de Occidente del IMSS, para implementarse como técnica de rutina en la búsqueda de variantes patogénicas frecuentes de <i>CFTR</i> .
Autores:	Abril Ixchel Muñoz Zúñiga



**Figura 19. Termograma para p.S549N estandarizado**

### 3. Reflexión crítica y ética de la experiencia

El RPAP tiene también como propósito documentar la reflexión sobre los aprendizajes en sus múltiples dimensiones, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto para compartir una comprensión crítica y amplia de las problemáticas en las que se intervino.

#### 3.1 Sensibilización ante las realidades

Para mí fue muy impactante ver distintas realidades, ya que la fibrosis quística es una enfermedad que se controla, pero no tiene cura. Creo que fue mi primera experiencia tan fuerte en la que me tocaba vivir una realidad así de primera mano, los pacientes en su mayoría eran menores a los 10 años y era muy difícil para mí observar las caras de los papás ante un resultado positivo. De igual manera verlos enterarse de que los fármacos específicos para las mutaciones no los ofrece el IMSS y tienen que buscarlos por su cuenta, por lo general son costosos y son medicamentos que necesitan para alargar la esperanza de vida. Siempre traté de ser muy amable con ellos mientras se les tomaba la muestra, pero la verdad es que me sentí muy impotente frente a su verdadero problema. Espero algún día con lo que sé y con mis conocimientos que iré adquiriendo en mi carrera poder ayudar a tener fármacos accesibles en el país, así como condiciones más dignas para todos los pacientes.

### 3.2 Aprendizajes logrados

Me logré desarrollar de manera personal sensibilizándome frente a la realidad que se vive día con día en el servicio de salud mexicano. Conseguí vivir un poco también la responsabilidad de tener que realizar las pruebas PCR de una manera profesional, cuidadosa y ética ya que de eso depende el fármaco que necesitan para tu tratamiento. Fue mi primer acercamiento a un equipo laboral de trabajo y aprendí a desarrollarme en grupo y a trabajar para un propósito todos. Me sentí muy bien porque al final me supe adaptar y trabajé siempre dando mi mejor esfuerzo. Desarrollé también habilidades en el ámbito de la investigación y me di cuenta de todo el esfuerzo que conlleva la estandarización de las técnicas. Asimismo, me integré muy bien con mi grupo de trabajo y logre formar relaciones que conservare para toda la vida, me llevo una muy bonita experiencia.

### 3.3 Inventario de competencias Inicial (ingreso del PAP) e Inventario de competencias Final (salida al PAP).

Competencias nuevas

Competencias potencializadas

	Competencia	Evidencia	Relevancia/Fortaleza*
Categorizar los elementos, si es un conocimiento, una habilidad, una actitud,	Conocimientos	Diseñé múltiples PCR para casos de laboratorio, así como para casos teóricos  Hice PCR para más de una muestra a la vez	Podría aportar un diseño de PCR que ayude a estandarizar el proceso de identificación de una mutación específica en el gen CFTR  Eficientiza el trabajo
		Electroforesis	Se corrieron electroforesis en la clase de bioquímica (proteínas) y en genética (ADN) para entonces  Comprobar una amplificación positiva o negativa del fragmento con la variante p.549 N en pacientes con fibrosis quística

			reconocer que hubo una amplificación positiva  Preparé geles para el procedimiento	Puedo llevar a cabo el proceso completo sola
		Conocimientos sobre las variaciones genéticas	3 exámenes parciales con la temática de variaciones genéticas en la asignatura de Ingeniería Genética	Poder interpretar resultados y entender el proceso que se lleva a cabo para identificar la variante en cuestión
		Secuenciación	Secuencie la muestra control del procedimiento	Poder utilizar método para detectar mutaciones
	Habilidades	Utilizar equipo de laboratorio	10 semestres en diferentes asignaturas utilizando material de laboratorio correctamente  Utilice nuevos equipos que no había usado en ITESO	Poder llevar a cabo los procesos necesarios como PCR, electroforesis y de ser necesario secuenciación  Tengo más conocimientos en el laboratorio
		Cálculos de reactivos y concentraciones	10 semestres en diferentes asignaturas utilizando estos cálculos	Poder preparar los reactivos necesarios para los pasos necesario al llevar a cabo un proceso en el laboratorio
		Técnicas en el laboratorio	Trabajé en el proyecto sola y aprendí nuevas técnicas para desarrollarlo de una mejor manera y más rápido	Considero que tengo más experiencia ya en el laboratorio y ya me siento con más capacidad

	Actitudes	Liderazgo	Suelo liderar los equipos en los que pertenezco	Puedo llevar a cabo las riendas de un proyecto ya sea sola o en equipo
		Responsabilidad	Cumplo en tiempo y forma con las cosas que se me solicitan	El trabajo que realice será de calidad y pueden confiarme proyectos importantes
		Iniciativa	Intento ver que se necesita después y puedo ir llevándolo a cabo sin necesidad de que lo pidan	Llevar a cabo mis actividades de forma más rápida y eficiente
		Trabajo en equipo	Forme parte de un proyecto en equipo todo el semestre	Puedo trabajar en otros equipos en otros proyectos de una mera formal y profesional

Aprendí mucho sobre nuevas técnicas de laboratorio y cómo hacer más eficiente el proceso para trabajar con un mayor número de muestras y a mayor velocidad, para conseguir mejores resultados. Adquirí un conocimiento nuevo, que es la secuenciación. Pero sobre todo pude trabajar muy bien en equipo para lograr un mismo objetivo.