

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 II



ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara

4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos II

**Identificación de variantes en genes modificadores de hemoglobina fetal en
muestras de individuos de población general del occidente de México.**

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ingeniería en Biotecnología, Abril Ixchel Muñoz Zúñiga

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

Tlaquepaque, Jalisco, diciembre de 2022

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP.....	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	2
Resumen	4
1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional	4
1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto.....	5
1.2 Caracterización de la organización	8
1.3 Identificación de la(s) problemática(s)	9
1.4. Planeación de alternativa(s)	9
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora.....	11
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos.....	18
1.7. Bibliografía y otros recursos	18
1.8. Anexos generales	18
2. Productos.....	27
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia	28
3.1 Sensibilización ante las realidades	28
3.2 Aprendizajes logrados	28

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 proyecto “Identificación de variantes en genes modificadores de hemoglobina fetal en muestras de individuos de población general del occidente de México” tiene como objetivo identificar la presencia de variantes en genes relacionados al nivel de hemoglobina fetal en muestras de individuos de población general. Para desarrollar el proyecto se llevó a cabo el tamizaje de 17 SNV de cuatro genes, una región intergénica y un pseudogen mediante PCR tiempo real, también se realizó una base de datos en la que se incluyeron los genotipos identificados junto con el perfil hematológico de cada paciente. Esta base servirá como grupo de referencia cuando se estudien enfermedades en las que la hemoglobina fetal es un parámetro hematológico de interés como anemias de células falciformes y betatalasemias. De igual manera se reportaron por primera vez frecuencias de las 17 variantes para población mexicana sin una patología.

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 construir 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.

El presente proyecto se lleva a cabo de forma experimental y presencial en el Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) en la División de Medicina Molecular, bajo la supervisión de la Dra. Lourdes del Carmen Rizo de la Torre. El proyecto tiene como objetivo general identificar variantes en genes modificadores de hemoglobina fetal en muestras de individuos de población general. El estudio también comprende los siguientes objetivos específicos:

- Realizar una base de datos de pacientes candidatos para el grupo de referencia con parámetros hematológicos.
- Realizar PCR en tiempo real para 17 variantes a 73 muestras de pacientes.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

La hemoglobina es una proteína globular dentro de los glóbulos rojos que aporta oxígeno a los tejidos periféricos y transporta dióxido de carbono y protones de los tejidos hacia los pulmones. En mujeres el valor normal es de 13-18 g/dl y en hombres de 12-16 g/dl [1].

La estructura de la hemoglobina es cuaternaria, con 4 cadenas polipeptídicas (Figura 1), dos α (de 144 aminoácidos) y dos β (contiene 146 aminoácidos). Ambos tipos de cadenas tienen estructuras secundarias (alfa-hélices) y terciarias muy similares [2].

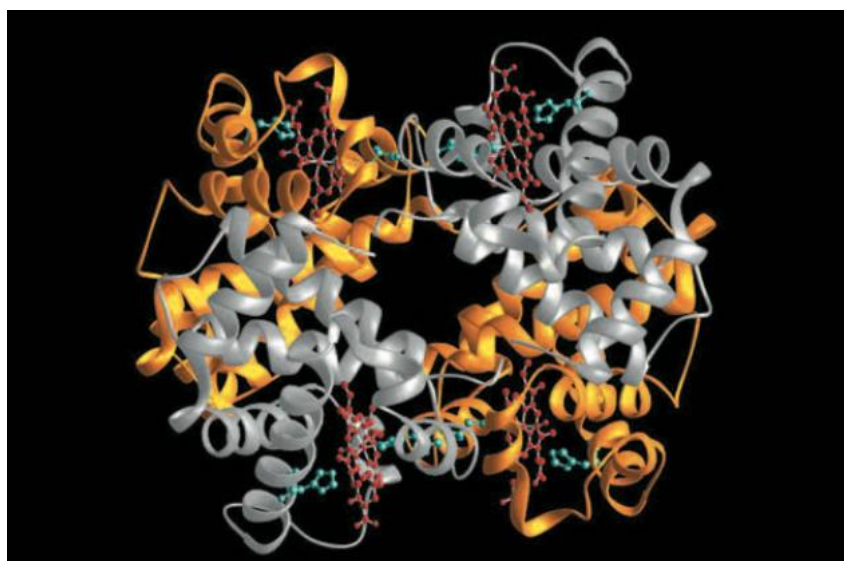


Figura 1. Estructura de hemoglobina adulta. Cuenta con dos subunidades α (amarillo) y dos β (gris). Cada cadena tiene un grupo hemo (rojo) y las histidinas (turquesa) [3].

Los genes globínicos se localizan en dos familias de genes, tipo alfa (α) y no alfa o beta (β) en 16p13.3 y 11p.15.4 respectivamente. La combinación de los productos de estos genes da lugar a los diferentes tipos de hemoglobinas normales en el adulto y su expresión depende de la etapa en el desarrollo del humano y del tejido de hematopoyesis. En el período embrionario, entre las semanas 4 y 5, se expresa el gen *HBZ*, del cluster α que codifica para las cadenas zeta (ζ) y el gen *HBE1* del cluster β que codifica para las cadenas épsilon (ϵ) y ambas conforman la Hb Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$). Entre las semanas 6 a 7 se reemplazan las unidades ζ por α sintetizando la Hb Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$); estas hemoglobinas embrionarias se producen en saco vitelino. Posteriormente el hígado fetal constituye el sitio de hematopoyesis y comienza

la síntesis de HbF a partir de la semana 7, ésta se compone de cadenas α y γ ($\alpha_2\gamma_2$). Del periodo embrionario al fetal pueden encontrarse otras combinaciones entre las cadenas de ambas etapas como Hb Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$), mencionada anteriormente, y la Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$) (Figura 2) [4].

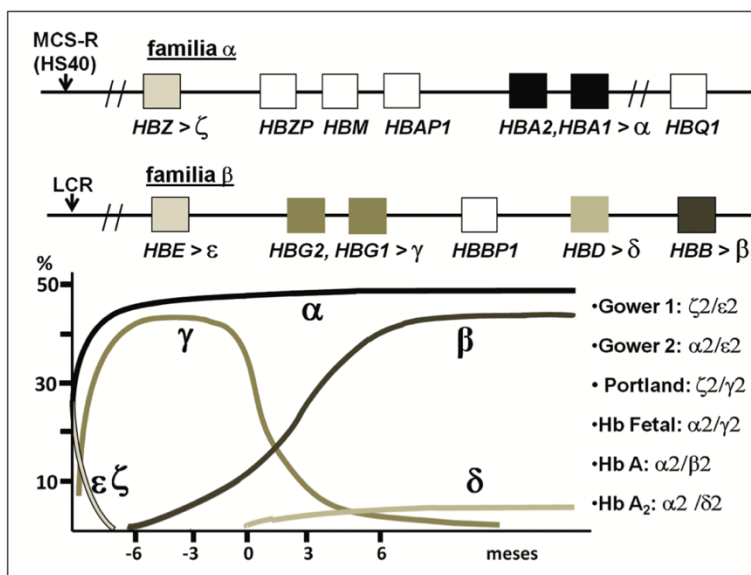


Figura 2. Esquema de las familias de genes de α - y β -globina. Se describen las isoformas de la hemoglobina (Hb) de las cadenas α y β durante las etapas del desarrollo [4].

Al momento del nacimiento se minimiza la expresión de las cadenas γ y se expresan los genes HBB para las cadenas β , y HBD para las cadenas δ . Las cadenas α y β generan la Hb A, que conforma el 97% de la Hb total circulante desde los 6 meses de vida. La combinación de las cadenas α y δ dan lugar a la Hb A₂, que representa de un 2-3% de la Hb total circulante. El resto corresponde a la expresión residual de los genes que codifican para las cadenas γ para la formación de HbF con valores inferiores a 2 % [4].

La hemoglobina fetal (HbF), que tiene más afinidad por el oxígeno que la HbA, representa un 80% del contenido hemoglobínico de un recién nacido. En condiciones normales este porcentaje decrece hasta un 5% en los primeros 6 meses y a los 10 meses el bebé tiene los porcentajes hemoglobínicos de un adulto [2].

Existen dos grupos de genes que codifican para las hemoglobinas: los genes de globina similar a α en el cromosoma 16 (*HBA1* y *HBA2*) y los genes similares a β en el cromosoma 11 (*HBG1* y *HBG2*). Las mutaciones en estos genes pueden causar persistencia hereditaria de hemoglobina fetal (PHHF), hemoglobinopatías estructurales y talasemias [1].

El cambio de hemoglobina fetal a adulta está influenciada por factores transcripcionales y por elementos que actúan en *cis*. Mutaciones puntuales en uno u otro se asocian con una mayor expresión de ese gen. El gen *BCL11A*, que codifica para la subunidad BCL11A, proteína tipo dedos de zinc, es un regulador del silenciamiento de los genes que expresan cadenas γ . Por otra parte, el gen *KLF1*, que codifica para el factor de transcripción eritroide 1 tipo Kruppel, también actúa como represor de la expresión de los genes γ . Del mismo modo *HBS1L-MYB* es un locus ubicado en 6q23 que se asocia con una variación del 20-45% de HbF [5].

La β -talasemia es una enfermedad genética autosómica recesiva causada por defectos en la producción de hemoglobina adulta (HbA, $\alpha_2\beta_2$). Se ha demostrado que la reactivación de la expresión de la globina γ es una estrategia para tratar esta enfermedad. La subunidad de hemoglobina beta del pseudogen *HBBP1* está asociada con la HbF elevada en pacientes. Se sugiere que *HBBP1* tiene un papel positivo en la expresión de globina γ , esto puede ayudar a tratar pacientes con esta condición [6].

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es un trastorno hematológico derivado de la proliferación descontrolada de células precursoras del linaje linfoide en la médula y en sitios extramedulares [7]. Para esta enfermedad el incremento de niveles de HbF en estos pacientes se asocia con un buen pronóstico ya que indica respuesta al tratamiento con fármacos inhibidores de las DNMT (Azacitidine) y HDACi (Entinostat) [8]. En otro estudio llevado a cabo por Stromper en 2019 se identificó que pacientes a quienes se les indujo elevación de HbF mediante administración de Decitabina lograron remisión parcial o completa y presentaban un valor de HbF mayor al 1.9%, lo cual se presenta como potencial biomarcador para la respuesta al tratamiento [9].

Actualmente la HbF juega un papel importante en los estudios recientes para distintas enfermedades. Al día de hoy se desconocen los rangos de hemoglobina fetal en población pediátrica sana y por consecuencia se desconocen también las frecuencias de las variantes en la población mexicana. Es por esto que el presente proyecto plantea identificar 17 variantes en seis regiones reguladoras para un grupo de población de referencia de 73 pacientes.

1.2 Caracterización de la organización

El presente PAP se lleva 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 y el más grande en su género en América Latina, en la atención a la salud y protección de los mexicanos desde 1943. En el IMSS 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 [10].

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 [11].

El proyecto que se establece está al mando de la doctora Lourdes del Carmen Rizo de la Torre, quien es 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)

El presente PAP se deriva de la tesis doctoral titulada “Relación de variantes en genes reguladores de la síntesis de gammas globinas con el aumento de hemoglobina fetal en pacientes pediátricos del Occidente de México con Leucemia Linfoblástica Aguda”, llevada a cabo por el doctorante Francisco Javier Borrayo López en junio de 2022. Para realizar la tesis es importante tener comparativo entre pacientes con leucemia e individuos sanos. Hoy en día se desconocen los rangos de la hemoglobina fetal en población pediátrica sin alteraciones hematológicas y por esto también se desconocen las frecuencias de estas variantes en la población mexicana. Este proyecto de aplicación profesional planea determinar si existe una relación entre los rangos de hemoglobina fetal y la presencia de variantes de un solo nucleótido en población sin alteraciones hematológicas. Cabe mencionar que las muestras que se analizaron durante este PAP ya tenían determinaciones previas de los parámetros hematológicos: hemoglobina fetal (HbF), conteo de leucocitos, conteo de eritrocitos, basofilos, eosinofilos, monocitos, neutrofilos, linfocitos, hemoglobina (Hb), hematocrito (HTC), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CCMH), plaquetas, volumen plaquetario medio (MPV).

Para este proyecto se planean identificar 17 variantes en seis regiones reguladoras en genes modificadores de hemoglobina fetal para un grupo de población de referencia de 73 pacientes. Para lograr el objetivo se realizará un proceso de PCR en tiempo real para cada variante.

1.4. Planeación de alternativa(s)

Existen diversas técnicas para encontrar variantes patogénicas en muestras de ADN genómico (Tabla 1).

Tabla 1. 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.	[12]
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.	[13]
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 diferentes longitudes, posteriormente serán separados por tamaño utilizando electroforesis.	[14]
qRT-PCR (<i>quantitative Real Time - PCR</i>)	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.	[15]

Para el presente proyecto se planea utilizar la técnica de PCR en tiempo real para la detección de las 17 variantes en 73 pacientes. Se opta por esta técnica ya que se tiene el equipo y los reactivos necesarios para realizarla. Este método, 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 [16].

Para la PCR en tiempo real se utiliza una sonda de oligonucleótidos de tecnología TaqMan®, que contiene un colorante fluorescente informador en el extremo 5' y uno extintor en el extremo 3'. Mientras la sonda no hibrida el colorante extintor reduce la fluorescencia emitida por el colorante informador utilizando la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). Una vez que la sonda hibrida con la secuencia de ADN, la actividad de la DNA polimerasa retira extintor y esto aumenta la fluorescencia, en cada ciclo se separan moléculas de colorante informador de la sonda lo que aumenta la intensidad de la

fluorescencia [17]. Para llevar a cabo cada reacción es necesario agregar agua grado biología molecular, una sonda específica que contenga los alelos diana (silvestre, polimórfico), ADN molde y PCR master mix (Taq polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y buffer de reacción) [18].

El plan de trabajo del proyecto se presenta en la Tabla 2). En ella 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 2. Actividades previstas para la realización del proyecto

NOMBRE	RECURSOS	TIEMPO (días)	AGOSTO				SEPTIEMBRE				OCTUBRE				NOVIEMBRE				DIC	
			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	Semana 16		
Revisión y actualización de bibliografía y redacción de proyecto.	PC, TI, AL	16																		
Identificación de muestras y elaboración de base de datos	BD, PC	5																		
Selección de muestras y elaboración de las diluciones de ADN genómico.	BD, TI	2																		
Identificación de variantes en genes modificadores de hemoglobina fetal mediante PCR en tiempo real	RP, TC, TI	20																		
Validación y análisis de resultados	PC, AL	5																		
Elaboración de productos (gráficos, tablas, modelos explicativos, modelos predictivos)	PC, TI, AL	2																		
Presentación de resultados ante personal y estudiantes de la División de Medicina Molecular del CIBO	PC, TI, AL	2																		
Planeación de la Presentación Final	PC, TI	6																		

La Tabla 3 muestra el significado de las abreviaturas utilizadas para referir los recursos necesarios de cada actividad previamente planteada.

Tabla 3. Significado de las abreviaturas utilizadas para identificar los recursos en el cronograma

Recursos Utilizados	
<i>Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
PC	Equipo de computo personal
BD	Banco de ADN
AL	Asesoría Dra. Lourdes Rizo
TI	Trabajo Individual
TC	Termociclador
RP	Reactivos PCR

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

Para llevar a cabo el proyecto se utilizó la técnica de PCR en tiempo real, la cual consiste en utilizar un par de sondas TaqMan® una marcada con el fluorocromo VIC y otra FAM (correspondientes cada una a un alelo específico: silvestre o polimórfico) en el extremo 5' ambas con un apagador en el extremo 3'. Cuando la sonda híbrida con el DNA diana la actividad de la polimerasa retira al apagador del extremo 3' permitiendo que este emita un haz de luz en respuesta a la excitación por luz lo que indica una amplificación positiva para dicha sonda [17].

Para cada reacción se agregó agua grado biología molecular, una sonda específica para la variante que se busca (que contenga los dos alelos, silvestre y polimórfico), ADN molde y PCR master mix (Taq polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y buffer de reacción) [18].

Para lograr genotipificar las 73 muestras de ADN se utilizó una placa óptica de la marca Applied Biosystems con 96 pocillos de 0.1 mL cada uno. Se trabajó dentro de una campana de flujo laminar, con gradillas frías y con la luz apagada debido a que la sonda es fotosensible y termolábil. A cada pocillo se le agregaron 3 µL de agua grado biología molecular, 4 µL de *Genotyping Master Mix* de la marca Applied Biosystems, 0.2 µL de la sonda TaqMan (Tabla 4) y 1 µL del ADN del paciente; dando un total de 8.2 µL de reacción por pocillo (figura 3).

Tabla 4. Sondas TaqMan utilizadas para la genotipificación de los pacientes de referencia

Gen	SNV (Single Nucleotide Variation)	Sustitución	Tipo de variantes	Sondas Taqman®
<i>BCL11A</i>	rs6706648	C>T	Intrónica	C_2069773_10
	rs4671393	A>G	Intrónica	C_25926414_10
	rs4895441	A>G	Intergénica	C_3119890_10
	rs766432	C>A	Intrónica	C_1025980_10
	rs11886868	C>T	Intrónica	C_11363852_10
	rs7557939	G>A	Intrónica	C_2069774_10
	rs1427407	T>G	Intrónica	C_8899456_10
<i>HBS1L-MYB</i>	rs7599488	C>T	Intrónica	C_189382502_10
	rs7776054	A>G	Intergénica	C_29432461_10
	rs28384513	T>G	Intergénica	Custom
	rs9399137	T>C	Intergénica	C_30488126_20
	rs9402686	G>A	Intergénica	C_2737531_10
	rs1320963	A>G	Intergénica	C_9676658_10
<i>KLF1</i>	rs3817621	G>C	Upstream	C_3281953_10
<i>HBG2</i>	rs7482144	C>T	Promotor	Custom
<i>HBG1</i>	rs368698783	G>A	Promotor	Custom
<i>HBBP1</i>	rs10128556	C>T	Intrónica	C_30114237_10



Figura 3. Preparación de las reacciones en placa dentro de campana de flujo laminar.

Una vez lista la reacción para la genotipificación, se cubrieron los pocillos de la placa con las tapas ópticas (figura 4), y se introdujo en el termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System* marca Applied Biosystems (figura 5). La información de cada sonda se cargó previamente en la computadora del termociclador, de modo que al ingresar cada placa se selecciona la sonda con la que se trabaja para que comience el proceso de PCR (figura 6).

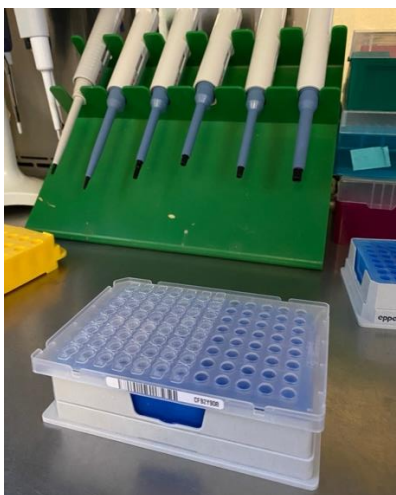


Figura 4. Placa con tapas ópticas

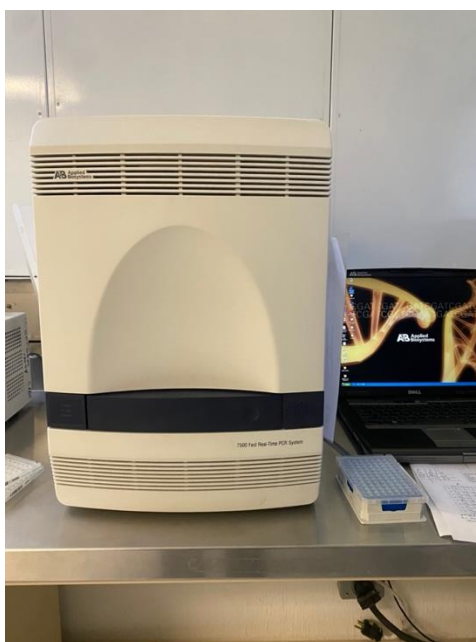


Figura 5. Termociclador 7500 *Fast Real-Time PCR System* marca Applied Biosystems

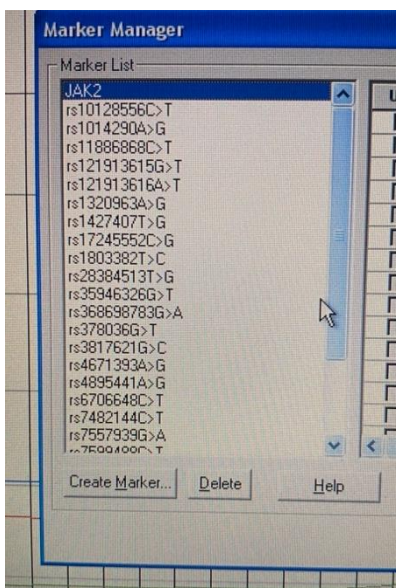


Figura 6. Selección de sonda para PCR en tiempo real

Se corrió el programa de AD (*Allelic Discrimination*) y AQ (*Allelic Quantification*) para cada Variante. El programa de AD nos indica la distribución de las muestras que se introdujeron de acuerdo al genotipo presente. Se agrupan los homocigotos silvestres en el eje X, los homocigotos mutados en el eje Y, los heterocigotos entre estos dos grupos y los indefinidos se muestran con una “X” (muestras que no amplificaron o el blanco sin ADN) (figura 7).

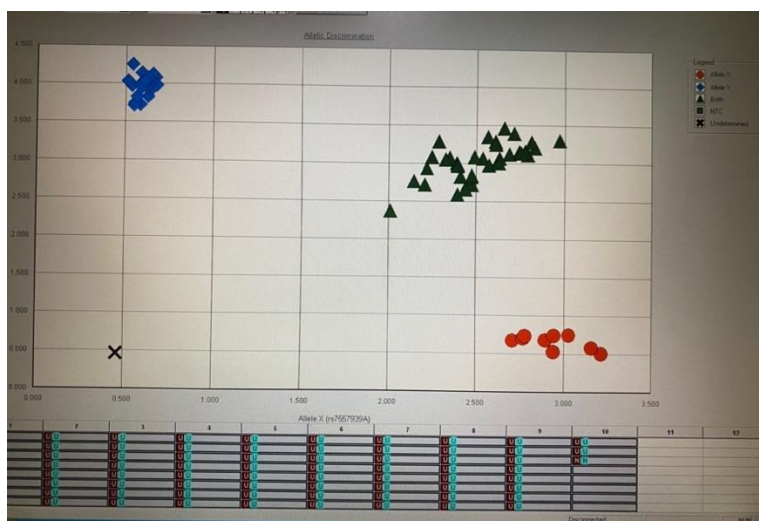


Figura 7. Distribución de las muestras en Allelic Discrimination (AD). Homocigotos silvestres en el eje X en rojo. Homocigotos mutados en el eje Y en azul. Heterocigotos entre los homocigotos en color verde militar. Muestras indefinidas o blanco de ADN se muestra con una “X”.

En el programa de AQ, se presentan resultados dependiendo de la amplificación de la muestra. Las etiquetas VIC y FAM indican la amplificación del alelo porlimórfico o silvestre según la sonda. Cuando amplifica sólo VIC (curva color verde), se interpreta que esa muestra de ADN sólo contiene alelos silvestres o mutados (homocigoto) dependiendo la sonda con la que se esté trabajando (figura 8a). Lo mismo cuando sólo amplifica FAM (curva color rojo), se interpreta como homocigoto (figura 8b). Por otro lado, cuando ambas curvas VIC y FAM (curvas color roja y verde, respectivamente) se amplifican, se interpreta como un heterocigoto (contiene ambos alelos) para esa variante (figura 8c).

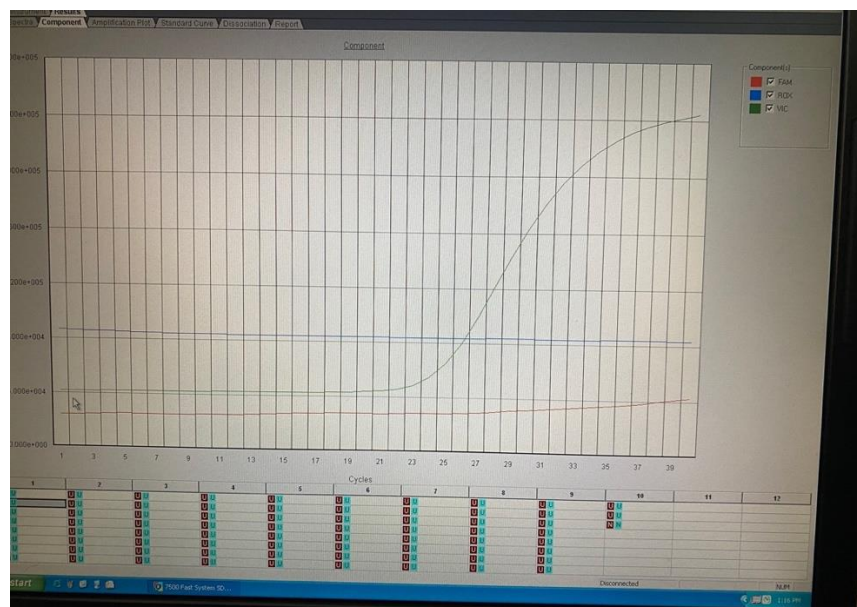


Figura 8a. AQ amplificación de VIC. Se muestra solo la amplificación de la curva verde que representa VIC. Por lo que sería considerado como un homocigoto.

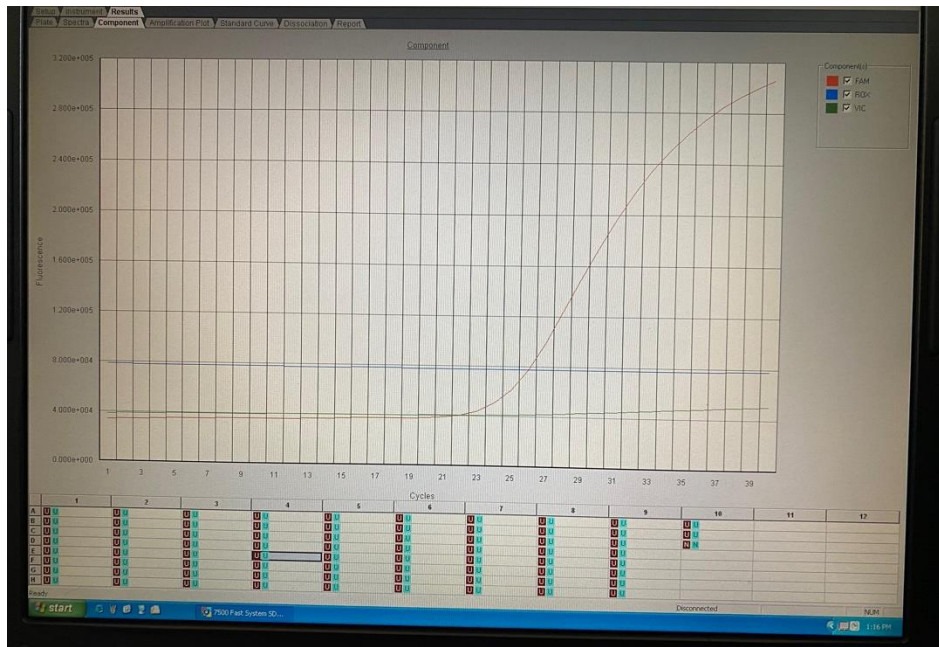


Figura 8b. AQ amplificación de FAM. Se muestra solo la amplificación de la curva roja que representa FAM. Por lo que sería considerado como un homocigoto.

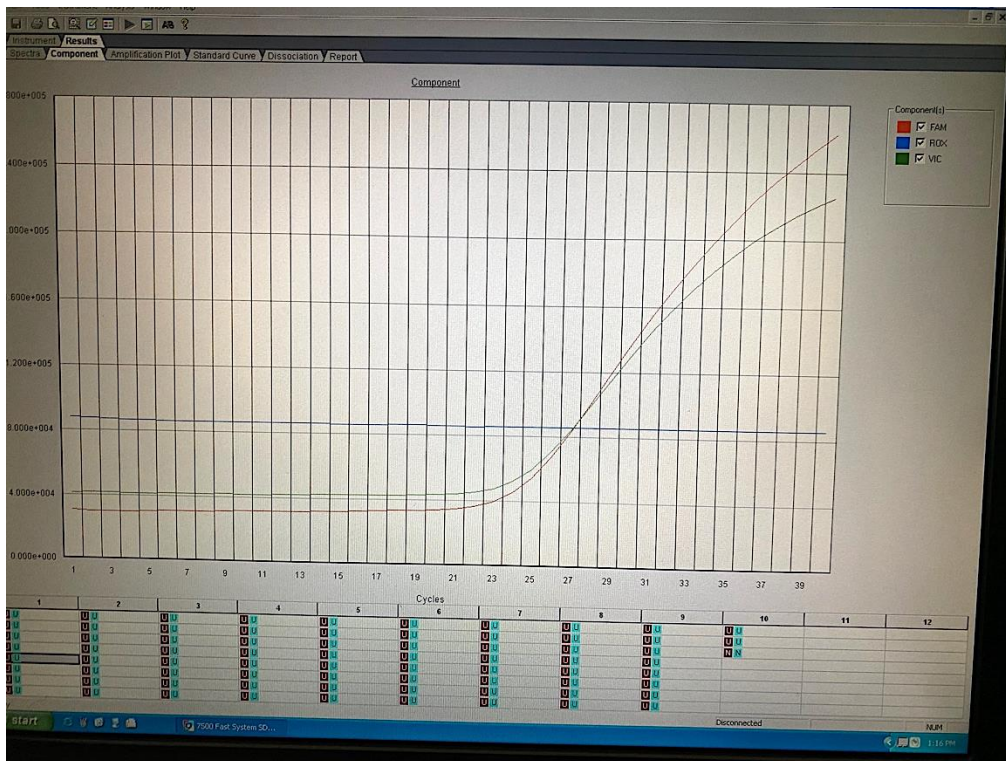


Figura 8c. AQ amplificación de VIC y FAM. Se muestra solo la amplificación de la curva roja y verde que representa FAM y VIC respectivamente. Por lo que sería considerado como un heterocigoto.

Al interpretar los resultados de la PCR en tiempo real se lograron genotipificar 73 muestras de pacientes para 17 variantes en seis regiones reguladoras de la hemoglobina fetal.

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

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

Se obtuvieron resultados valiosos ya que se logró el tamizaje de 17 variantes para 73 pacientes que servirá como grupo de referencia cuando se estudien enfermedades en las que la hemoglobina fetal es un parámetro hematológico de interés como anemias de células falciformes y betatalasemias. De igual manera se reportaron por primera vez frecuencias de las 17 variantes para población mexicana sin una patología.

Se contempla que en la siguiente etapa del proyecto se podría aumentar el tamaño de muestra, así como incluir individuos adultos sanos. También sería así como analizar la distribución de estas frecuencias por región y ascendencia de la población estudiada.

1.7. Bibliografía y otros recursos

- [1] N. Brandan, M. V. Aguirre y C. E. Giménez. Hemoglobina. *Cátedra de Bioquímica - Facultad de Medicina UNNE*, 2008.
- [2] S. Barrial, Hemoglobinopatías estructurales: tipos, causas y tratamiento. Sevilla, España, 2021.
- [3] A. I. Alayash, Oxygen Therapeutics: Can we tame haemoglobin?. *Nature*, vol. 3, pp. 152-159, 2004.
- [4] V. Varela y K. Scheps, Regulación de expresión de genes de la familia de β -globina humana, útil en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para tratamiento de hemoglobinopatías. *Medicina Buenos Aires*, nº 76, pp. 383-389, 2016.
- [5] A. Wilber, A. Nienhuis y D. Persons. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities. *Blood Journal*, vol. 117, nº 15, pp. 3945-3953, 2014.

- [6] M. Shuang-Ping, X. Hai-Rui, G. Xu-Xia, Y. Jing-Min, Y. Nakamura, R. Kurita, S. Xian-Min, C. Hong-Yan y L. Da-Ru. Long noncoding RNA HBBP1 enhances γ -globin expression through the ETS transcription factor ELK1. *Biochem Biophys Res Commun*, n° 552, pp. 157-163, 2021.
- [7] T. Terwilliger y M. Abdul-Hay. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review. *Blood Cancer Journal*, vol. 7, n° 6, p. 577, 2017.
- [8] K. Press, N. Uy, J. Keefer, S. Gore, H. Carraway, S. Sakoian y T. Prebet. Clinical evaluation of combined azacitidine and entinostat on the induction of fetal hemoglobin in patients with acute myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes. *Leukemia & Lymphoma*, vol. 59, n° 3, pp. 755-757, 2018.
- [9] J. Stomper y M. Lübbert. Can we predict responsiveness to hypomethylating agents in AML?. *Semin Hematol*, vol. 56, n° 2, pp. 118-124, 2019.
- [10] IMSS - Conoce el IMSS. Gobierno de México, 2022. [En línea]. Available: <http://www.imss.gob.mx/conoce-al-imss>.
- [11] Ciencia IMSS. IMSS, 2022. [En línea]. Available: <https://www.cienciaimss.org/index.php>.
- [12] National Human Genome Research Institute. 27 abril 2022. [En línea]. Available: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Restriction-Fragment-Length-Polymorphism>.
- [13] S. Little. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Curr Protoc Hum Genet*, vol. 9, n° 9, 2001.
- [14] A. Checa. Secuenciación convencional (Sanger). 2017. [En línea]. Available: <https://conogasi.org/articulos/secuenciacion-convencional-sanger/>.
- [15] C. Heid, J. Stevens, J. Livak y P. Williams. Real Time Quantitative PCR. *Genome Research*, pp. 986-994, 1996.
- [16] C. Heid, J. Stevens y K. Livak. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, vol. 6, n° 10, pp. 986-994, 1996.
- [17] ThermoFisher Scientific. What is Real-Time PCR (qPCR)?. 2022. [En línea]. Available: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html>. [Último acceso: 2022].
- [18] P. Aguilera, M. Ruiz, M. Graciela, B. Pineda y M. Chánez. Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología. Ciudad de México, 2014.

1.8. Anexos generales

Tabla 5. Comparación de medianas y rangos de parámetros hematológicos entre hombres y mujeres.

	Total n=73		Hombres n=45		Mujeres n=28	
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango
Edad (años)	9	4.5-14	9	4.5-13.5	10.5	4.25-15
HbF (%)	1.48	0.99 -2.11	1.53	1.11-1.97	1.46	0.82-2.32
Leucocitos (cel/ μ L)	6880	5540-8370	6880	5350-8400	6660	5587.5-8232.5
Eritrocitos (millones/ μ L)	4.77	4.47-5.10	4.79	4.55-5.08	4.66	4.33-5.02
Hb (g/dL)	13.6	12.55-14.6	13.5	12.55-14.85	13.95	12.1-14.53
HTC (%)	40.7	36.95-43.75	40.5	36.95-44.1	40.09	37.08-43.28
VCM (fL)	85	81.7-89	84.1	79.7-88.5	86.7	82.6-91.93
HCM (pg/cel)	28.8	27.55-29.75	28.7	27.35-29.6	28.9	27.75-31.13
CCMH (%)	33.5	32.9-34.55	33.7	33-34.55	33.35	32.73-34.65
Plaquetas (miles/ μ L)	274	206-324	278	215-324	269.5	184-327.75
VPM (fL)	9.4	8.75-10.5	9.4	8.8-10.6	9.35	8.55-10.43
Neutrófilos (cel/ μ L)	3096	2510.5-3963.5	3067	2331.5-3826	3229	2768.75-4625.25
Linfocitos (cel/ μ L)	2440	2032-3306.5	3030	2065-3529	2284	1913.75-2995.75
Monocitos (cel/ μ L)	457	342-652	510	352-693.5	421.5	328-573
Eosinófilos (cel/ μ L)	213	121.5-394	237	140.5-392.5	178	102.5-451.5
Basófilos (cel/ μ L)	19	0-40	20	0-40	0	0-31.5

HbF: hemoglobina fetal; Hb: hemoglobina; HTC: hematocrito; VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular medio; CHCM: concentración hemoglobina corpuscular medio; VPM: volumen plaquetario medio; DE: desviación estándar.

Por medio de una prueba variantes independientes por U de Mann-Whitney se demostró que no existe diferencia significativa entre las medianas de hombres y mujeres para todas las variables.

Tabla 6. Tabla de frecuencias genotípicas

			wt/wt (frecuencia)	wt/mut (frecuencia)	mut/mut (frecuencia)	MXL	
						wt	mut
<i>BCL11A</i>	rs6706648	C > T	48 (0.66)	24 (0.33)	1 (0.01)	0.96	0.04
	rs4671393	A > G	2 (0.03)	25 (0.34)	46 (0.63)	0.76	0.24
	rs4895441	A > G	48 (0.66)	23 (0.31)	2 (0.03)	0.79	0.21
	rs766432	C > A	1 (0.01)	23 (0.32)	29 (0.67)	0.25	0.75
	rs11886868	C > T	26 (0.36)	38 (0.52)	9 (0.12)	0.62	0.38
	rs7557939	G > A	26 (0.36)	38 (0.52)	9 (0.12)	0.62	0.38
	rs1427407	T > G	4 (0.06)	20 (0.27)	49 (0.67)	0.23	0.77
<i>HBS1L</i> <i>-MYB</i>	rs9399137	C > T	53 (0.73)	18 (0.25)	2 (0.03)	0.85	0.15
	rs9402686	A > G	48 (0.66)	23 (0.32)	2 (0.03)	0.84	0.16
	rs7776054	T > G	54 (0.74)	18 (0.25)	1 (0.01)	0.79	0.21
	rs7599488	T > C	0 (0.00)	54 (0.74)	19 (0.26)	0.45	0.55
	rs28384513	G > A	39 (0.53)	31 (0.43)	3 (0.04)	0.80	0.20
	rs1320963	A > G	25 (0.34)	41 (0.56)	7 (0.10)	0.59	0.41
<i>KLF1</i>	rs3817621	G > C	47 (0.64)	24 (0.33)	2 (0.03)	0.79	0.21
<i>HBG2</i>	rs7482144	C > T	48 (0.66)	25 (0.34)	0 (0.00)	0.80	0.20
<i>HBG1</i>	rs368698783	G > A	48 (0.66)	25 (0.34)	0 (0.00)	0.81	0.19
<i>HBBP1</i>	rs10128556	C > T	47 (0.64)	23 (0.32)	3 (0.04)	0.81	0.19

Tabla 7. Tabla de frecuencias alélicas

			MXL			
			wt	mut	wt	mut
<i>BCL11A</i>	rs6706648 *	C > T	0.82	0.18	0.96	0.04
	rs4671393 *	A > G	0.20	0.80	0.76	0.24
	rs4895441	A > G	0.82	0.18	0.79	0.21
	rs766432	C > A	0.17	0.83	0.25	0.75
	rs11886868	C > T	0.62	0.38	0.62	0.38
	rs7557939	G > A	0.62	0.38	0.62	0.38
	rs1427407	T > G	0.19	0.81	0.23	0.77
<i>HBS1L</i> <i>-MYB</i>	rs9399137	C > T	0.85	0.15	0.85	0.15
	rs9402686	A > G	0.82	0.18	0.84	0.16
	rs7776054	T > G	0.86	0.14	0.79	0.21
	rs7599488	T > C	0.37	0.63	0.45	0.55
	rs28384513	G > A	0.75	0.25	0.80	0.20
	rs1320963	A > G	0.62	0.38	0.59	0.41
<i>KLF1</i>	rs3817621	G > C	0.81	0.19	0.79	0.21
<i>HBG2</i>	rs7482144	C > T	0.83	0.17	0.80	0.20
<i>HBG1</i>	rs368698783	G > A	0.83	0.17	0.81	0.19
<i>HBBP1</i>	rs10128556	C > T	0.80	0.20	0.81	0.19

*Diferencias significativas en frecuencias alélicas entre poblaciones utilizando la prueba χ^2 ($p < 0.05$)

Comparación de las frecuencias determinadas por PCR en tiempo real de la población de 73 individuos sanos contra las frecuencias reportadas de población en Los Ángeles, California con ascendencia mexicana (MXL).

La comparación entre genotipos y porcentaje de HbF se realizó mediante las pruebas de comparación de medianas Kruskal Wallis para comparar los tres genotipos (wt/wt, wt/mut y mut/mut) y se analizaron por U de Mann Whitney al agruparse por modelo dominante (wt/mut + mut/mut vs wt/wt). No se observó asociación entre alguna de las variantes en genes modificadores con el porcentaje de HbF en individuos sin alteración hematológica del occidente de México.

Posteriormente se analizó si existe diferencia entre los parámetros hematológicos de acuerdo con el genotipo para cada variante, a continuación se muestran mediante gráficas aquellos parámetros en los que se observó diferencia significativa $p < 0.05$.

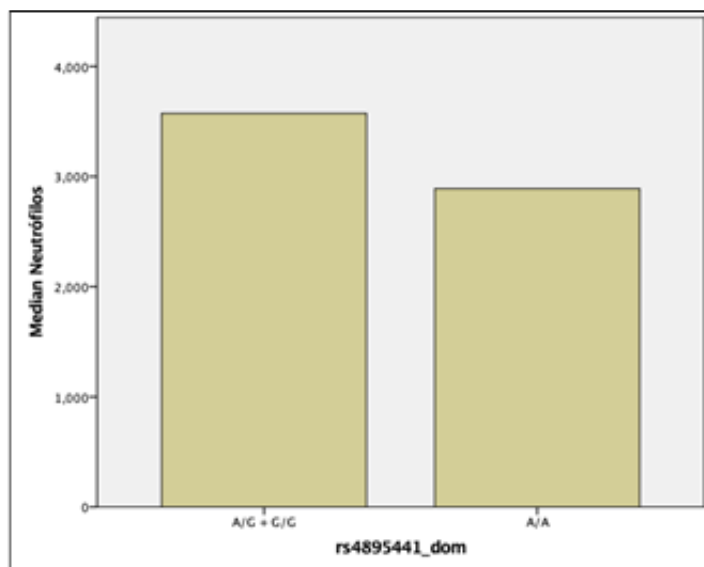


Figura 9. Gráfica de comparación de medias de neutrófilos con base en presencia del SNV (rs4895441) en gen *BCL11A*

La mediana para la variante es de 3573.0 cel/μL con un rango intercuartilar de 2953.0 – 4455.0 cel/μL. La media para la variante silvestre es de 2890.0 cel/μL con un rango de 2391.3 – 3624.3 cel/μL.

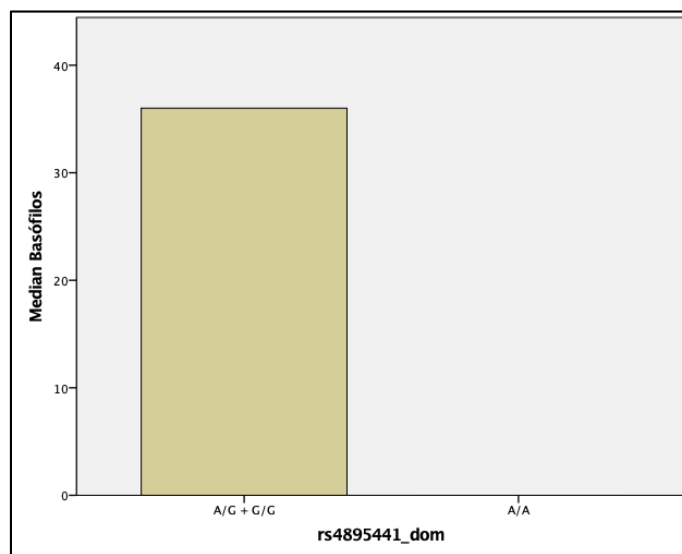


Figura 10. Gráfica de comparación de medias de basófilos con base en precencia del SNV (rs4895441) en gen *BCL11A*

La mediana para la variante es de 36.0 cel/ μ L con un rango de 0.0 – 60.5 cel/ μ L. La media para la variante silvestre es de 0.0 cel/ μ L con un rango de 0.0 – 33.0 cel/ μ L.

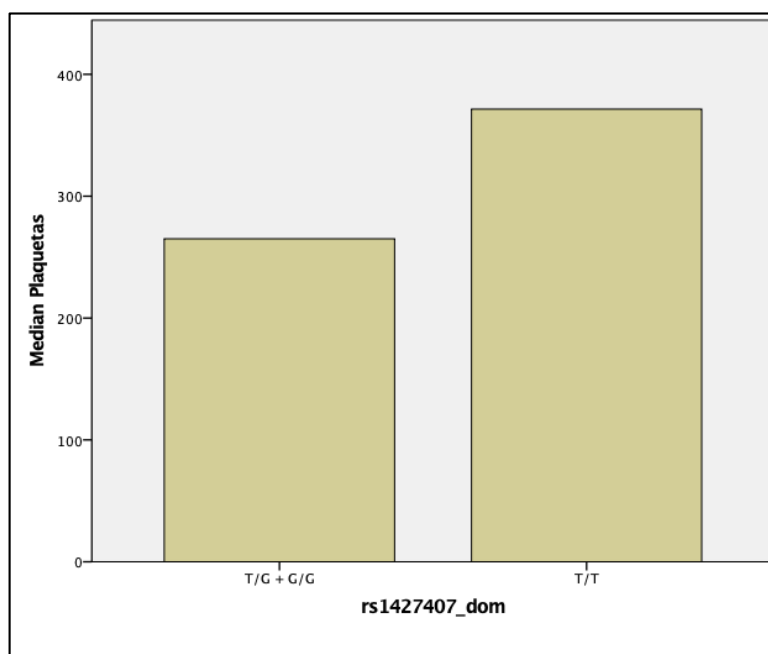


Figura 11. Gráfica de comparación de medias de plaquetas con base en precencia del SNV (rs1427407) en gen *BCL11A*

La mediana para la variante es de 265.0 cel/ μ L con un rango de 199.5 – 320.5 cel/ μ L. La media para la variante silvestre es de 371.5 cel/ μ L con un rango de 320.8 – 573.0 cel/ μ L.

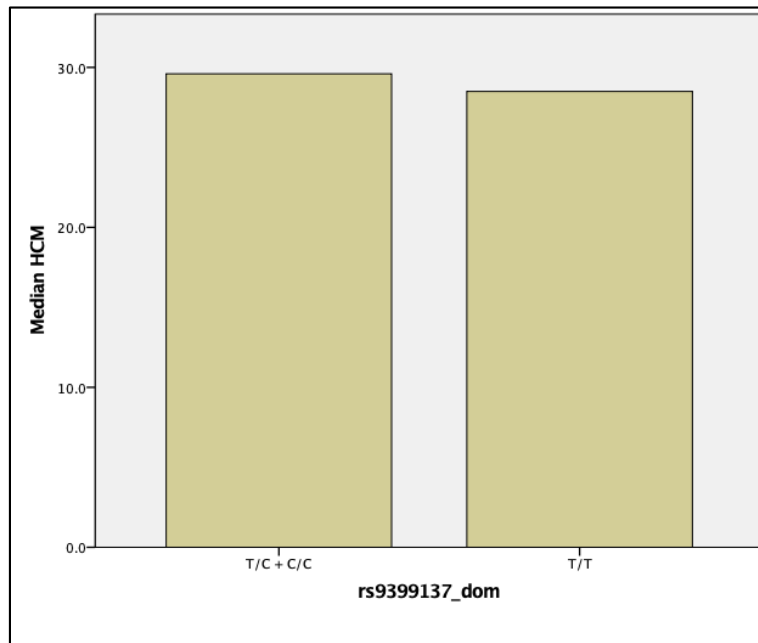


Figura 12. Gráfica de comparación de medias de HCM con base en presencia del SNV (rs9399137) en gen *HBS1L-MYB*

La mediana para la variante es de 29.6 cel/ μ L con un rango de 28.7 – 31.1 cel/ μ L. La media para la variante silvestre es de 28.5 cel/ μ L con un rango de 27.4 – 29.4 cel/ μ L.

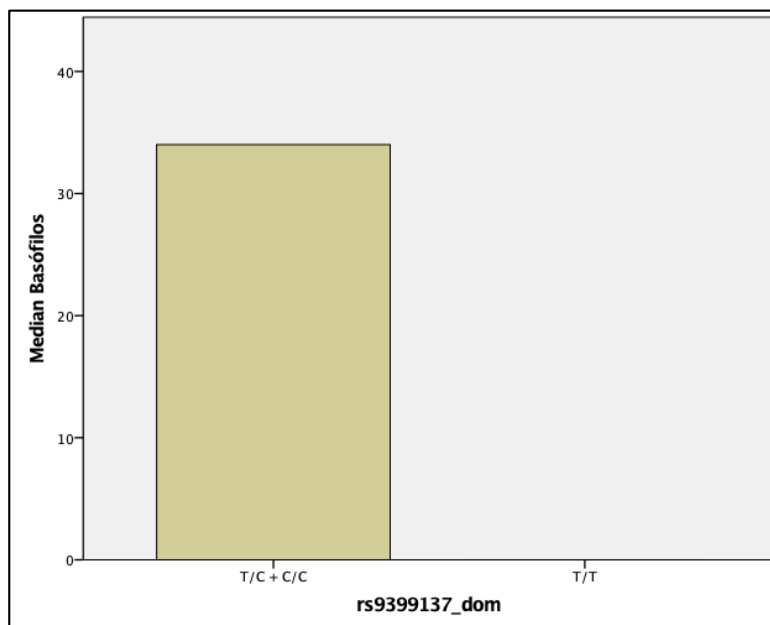


Figura 13. Gráfica de comparación de medias de basófilos con base en presencia del SNV (rs9399137) en gen *HBS1L-MYB*

La mediana para la variante es de 34.0 con un rango de 2.5 – 60.8 cel/ μ L. La media para la variante silvestre es de 0.0 cel/ μ L con un rango de 0.0 – 39.5 cel/ μ L.

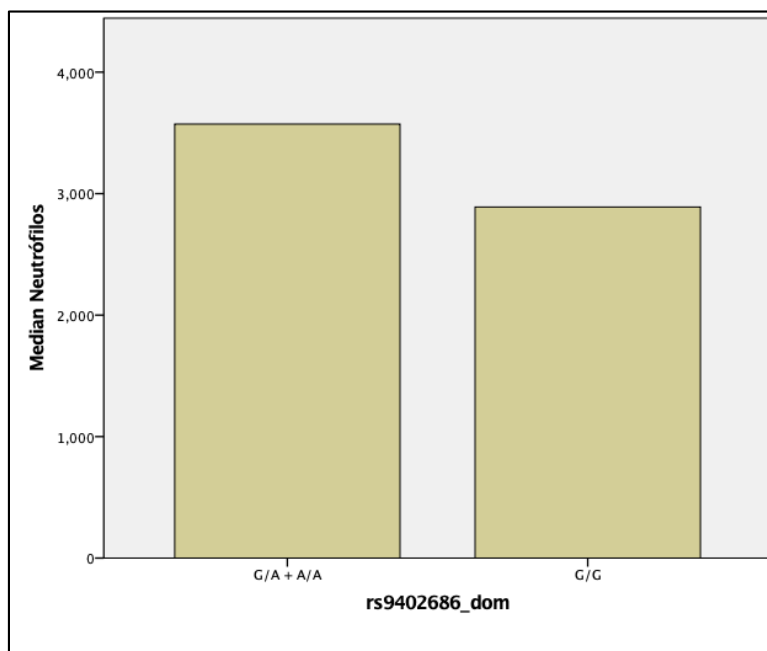


Figura 14. Gráfica de comparación de medias de neutrófilos con base en presencia del SNV (rs9402686) en gen *HBS1L-MYB*

La mediana para la variante es de 3573.0 cel/μL con un rango de 2953.0 – 4455.0 cel/μL. La media para la variante silvestre es de 2890.0 cel/μL con un rango de 2391.3 – 3624.3 cel/μL.

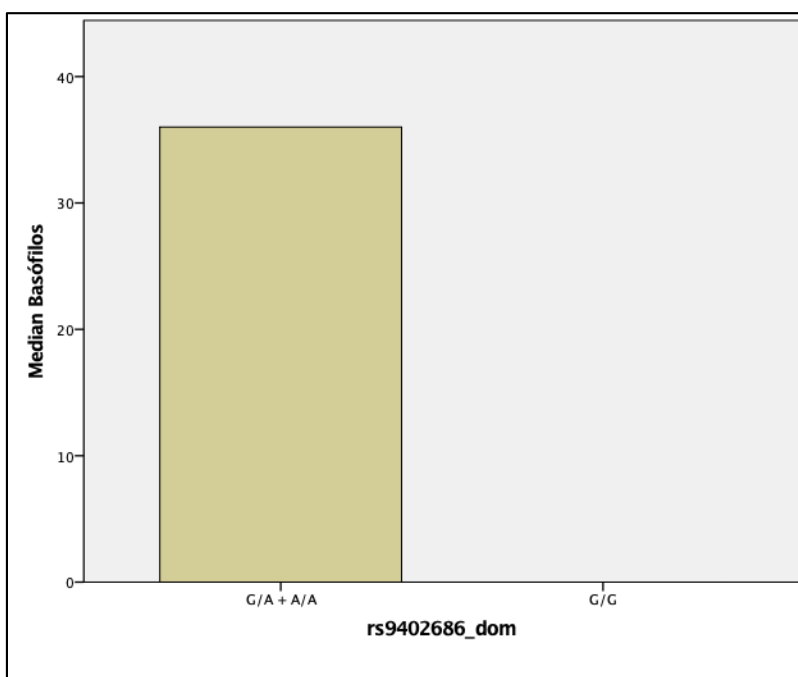


Figura 15. Gráfica de comparación de medias de basófilos con base en presencia del SNV (rs9402686) en gen *HBS1L-MYB*

La mediana para la variante es de 36.0 cel/μL con un rango de 0.0 – 60.5 cel/μL. La media para la variante silvestre es de 0.0 cel/μL con un rango de 0.0 – 33.0 cel/μL.

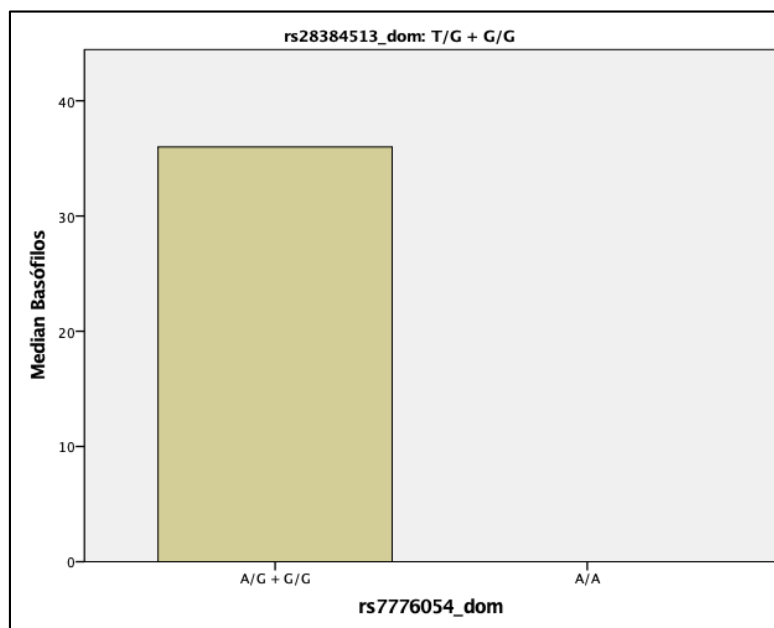


Figura 16. Gráfica de comparación de medias de basófilos con base en presencia del SNV (rs7776054) en gen *HBS1L-MYB*

La mediana para la variante es de 36.0 cel/ μ L con un rango de 10.0 – 61.0 cel/ μ L. La media para la variante silvestre es de 0.0 cel/ μ L con un rango de 0.0 – 39.3 cel/ μ L.

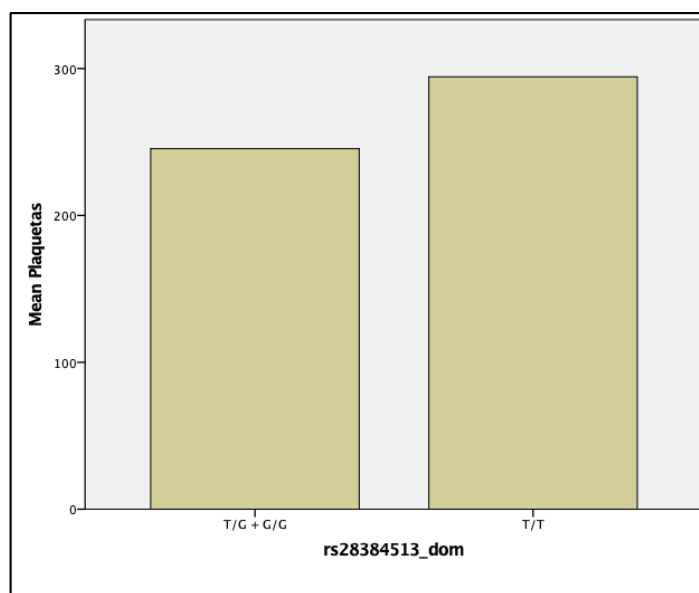


Figura 17. Gráfica de comparación de medias de plaquetas (cel/ μ L) con base en presencia del SNV (rs28384513) en gen *HBS1L-MYB*

La mediana para la variante es de 260.5 cel/ μ L con un rango de 201.0 – 289.0 cel/ μ L. La media para la variante silvestre es de 302.0 cel/ μ L con un rango de 201.0 – 342.0 cel/ μ L.

2. Productos

Producto 1

Nombre y código del PAP	4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos II
Nombre del proyecto	Identificación de variantes en genes modificadores de hemoglobina fetal en muestras de individuos de población general del occidente de México.
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Tamizaje de las 17 variantes y parámetros hematológicos del los 73 individuos sin alteración hematológica. Realizada para el Centro de Investigación Biomédica de Occidente del IMSS en el cual se dirigió un proceso de PCR en tiempo real para la detección de las 17 variantes en 73 pacientes.
Autores:	Abril Ixchel Muñoz Zúñiga

Tabla 8. Parámetros hematológicos y genotipificación de 73 pacientes para grupo de referencia

EDAD	SEXO	HbF%	LEUCOS cel/ μ L	ERITOCITOS millones/ μ L	Hb g/dL	HTC%	VCMfL	HCM pg/cel	CCMH%
6	M	1.85	5300	4.68	12.5	36.3	78	26.7	34.4
2	M	1.83	12400	4.72	14.2	42.1	89	30.1	33.7
13	M	1.69	9700	4.58	13.3	39.7	87	29	13.5
14	M	1.33	7300	4.65	14.5	43.1	93	31.2	33.6
8	M	0.83	8400	4.62	13.3	40.7	88	28.8	32.7
15	M	1.12	8900	5.38	16	47.1	88	29.7	34
16	M	1.35	6900	5.01	14.4	44.5	89	28.7	32.4
3	F	3.3	7400	4.33	11.8	35.9	83	27.3	32.9
9	M	1.1	3600	4.86	11.4	36.3	75	23.5	31.4
10	F	2.3	8800	3.06	10.7	33.9	111	35	31.6
12	M	2.28	7800	4.85	14.1	42.1	87	29.1	33.5
2	M	2.55	10500	4.46	12.7	37.7	85	28.5	33.7
14	F	1.44	5500	4.64	15.2	52.8	92	32.8	35.5
2	M	1.68	6900	4.77	11.8	35.6	74.6	24.7	33.1
12	M	1.04	8400	5.4	15.4	44.1	82	28.5	34.9
5	M	1.15	10100	4.68	12.6	36.7	78	26.9	34.3
6	M	0.96	6300	4.12	10.9	33.6	82	26.5	32.4
3	F	5.98	7900	4.43	11.7	35.4	80	26.4	33.1
16	M	2.8	5000	5.12	15.12	44.1	86	29.7	34.5
14	M	3.2	5400	5.19	15.5	45.5	88	29.9	34.1
2	M	1.86	7900	4.92	13.7	39	79	27.8	35.1
11	F	1.65	3190	4.67	13.5	41.2	88.2	28.9	32.8
10	M	1.54	7250	4.94	13.9	41.5	84	28.1	33.5

Documento de Excel completo: https://iteso01-my.sharepoint.com/:x/g/personal/ib718868_iteso_mx/EThdbTWldJtBiG1SepUidlUBKKX/Y6RyOxAKy3MIUegyDlw?e=NoP8oX

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 impactante ver distintas realidades. Ya que de primera mano me tocó vivir el reto que representa la escasez de recursos en este centro de investigación. De igual manera fue fuerte enterarme que el IMSS no dispone de los fármacos suficientes para tratar distintas enfermedades. Me sentí impotente al no poder hacer nada frente a estas situaciones y saber que solo pude contribuir con el trabajo que me tocó realizar. Espero algún día con lo que se y con los 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

Logré desarrollarme de manera personal, el sensibilizarme 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. Fue mi primer acercamiento a un equipo laboral de trabajo, aprendí a desarrollarme en grupo y a trabajar por un propósito en común. Me sentí 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 el genotipificar una población de referencia. Asimismo, me integré bien con mi grupo de trabajo y logré formar relaciones que conservaré 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).

En color verde: Competencias nuevas

En color azul: Competencias potencializadas

Categorizar los elementos, si es un conocimiento, una habilidad, una actitud,	Competencia		Evidencia	Relevancia/Fortaleza*
	Conocimientos	Conocimientos de PCR	Realice mi PAP anterior con ARMS-PCR en la cual estandarice la técnica <u>Aprendí a realizar PCR en tiempo real que hizo este tamizaje mucho más sencillo</u>	Podría aportar un diseño de PCR que ayude a estandarizar el proceso de identificación de las diferentes variantes en la población a estudiar. <u>Eficientiza el trabajo</u>
		Conocimientos sobre las variaciones genéticas	Además de mis conocimientos en el tema gracias a las clases del ITESO el PAP pasado pude trabajar en esta rama de mi carrera en el CIBO	Poder interpretar resultados y entender el proceso que se lleva a cabo para identificar las variantes en cuestión
		En escritura y redacción	Clases de COE y experiencia previa redactando un RPAP anterior	Para poder redactar un RPAP a la altura del proyecto
		<u>Análisis de perfiles hematológicos</u>	<u>Se incluyó el perfil hematológico de los pacientes en el mismo excel que el tamizaje</u>	<u>Ahora tengo más conocimientos cuando se trata de enfermedades que tengan relación con los niveles hematológicos de los pacientes.</u>

	Habilidades	Utilizar equipo de laboratorio	10 semestres en diferentes asignaturas utilizando material de laboratorio correctamente y una experiencia previa ya en el laboratorio del CIBO	Poder llevar a cabo los procesos necesarios para la identificación de dichas variantes.
		Trabajo en equipo	Proyectos en equipo realizados en múltiples ocasiones en el ITESO	Podre colaborar con responsabilidad y de una manera amena con el estudiante de doctorado con el que realizaré el proyecto
		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 manera 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 entender los parámetros hematológicos de los pacientes. Pero sobre todo pude trabajar muy bien en equipo para lograr un mismo objetivo.