

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
Asociación de Variantes en los Genes ABCG2 y SLC2A9 con Niveles de
Ácido Úrico Sérico y Estrés Oxidativo en Pacientes Mexicanos con
Enfermedad Renal Diabética en el CIBO, Guadalajara Jalisco.**

PRESENTA

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Biotecnología. Mariana Fonseca Patiño

Profesor PAP: Dr. Francisco Mendoza Carrera

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	7
1.3 Identificación de la(s) problemática(s)	8
1.4. Planeación de alternativa(s)	9
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora.....	11
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos.....	29
1.7. Bibliografía y otros recursos	30
1.8. Anexos generales	33
2. Productos.....	35
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia	36
3.1 Sensibilización ante las realidades	36
3.2 Aprendizajes logrados	37

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 con código 4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I y titulado *Asociación de Variantes en los Genes ABCG2 y SLC2A9 con Niveles de Ácido Úrico Sérico y Estrés Oxidativo en Pacientes Mexicanos con Enfermedad Renal Diabética en el CIBO, Guadalajara Jalisco*, tuvo como objetivo general analizar la relación las variantes rs2231142 (del gen ABCG2) y rs1143634 (del gen IL1B) con la hiperuricemia, factor de riesgo para la enfermedad renal crónica. Para ello se realizó una genotipificación de 374 muestras de pacientes con diabetes mellitus a través de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa, para determinar las frecuencias alélicas y genotípicas, y evaluar su asociación con las concentraciones de ácido úrico y con otras variables de interés para la valoración del estado clínico de las personas con diabetes. Se encontró que la variante rs2231142 (del gen ABCG2) y rs1143634 (del gen IL1B) no se asociaron significativamente con la hiperuricemia.

Finalmente se realizó como producto final una hoja de trabajo en el programa de Excel en forma de plantilla en la cual es posible realizar un vaciado de datos a partir de códigos. Esta plantilla servirá para calcular las frecuencias alélicas y genotípicas de variantes genéticas que se deseen analizar y para reducir riesgos de errores de captura de los datos generados en experimentos futuros.

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 PAP se lleva cabo en el Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), dentro de la división de Medicina Molecular. El proyecto experimental forma parte de la investigación titulada

“Asociación de Variantes en los Genes *ABCG2* y *SLC2A9* con Niveles de Ácido Úrico Sérico y Estrés Oxidativo en Pacientes Mexicanos con Enfermedad Renal Diabética”.

La investigación previamente mencionada tiene como propósito analizar la asociación de variantes en los genes *ABCG2* y *SLC2A9* con los niveles de ácido úrico sérico y de estrés oxidativo en pacientes mexicanos con enfermedad renal diabética, específicamente las variantes para el gen *ABCG2* son rs2231142, rs10011796, rs2054576 y rs2231137 y las variantes para el gen *SLC2A9* son rs3775948, rs1014290, rs11722228 y rs7678287. La investigación es el protocolo de tesis de Gloria Elizabeth Vázquez Rivera, alumna del Doctorado en Genética Humana y quien actualmente lo está realizando bajo la dirección del Dr. Francisco Mendoza Carrera.

En el presente PAP, que es continuación de la investigación de doctorado, es un proyecto experimental que tiene como objetivo general analizar la relación la variante rs2231142 (del gen *ABCG2*) y rs1143634 (del gen *IL1B*) con la presencia de hiperuricemia, factor de riesgo para la enfermedad renal crónica.

Para lograrlo, se tienen como objetivos específicos:

- Realizar una amplificación por medio de técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de muestras de ácido desoxirribonucleico (ADN) pacientes con diabetes tipo 2.
- Visualizar los productos de PCR mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata.
- Realizar un corte enzimático de los productos de PCR con la enzima de restricción TaqI
- Identificar los cortes realizados en el producto de PCR, por medio de electroforesis en gel agarosa y tinción con el colorante fluorescente SYBR green^{MR}.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

Los riñones ayudan a mantener en equilibrio las concentraciones de sodio, potasio y calcio en el cuerpo, ya que son los órganos encargados de remover los desechos y exceso de agua

de la sangre en forma de orina. El proceso para lograrlo comienza en los tubos renales que se conectan a cada riñón. La orina recorre los riñones para pasar después a la uretra y finalmente a la vejiga; la orina se almacenará en esta última hasta que se retire del cuerpo [1]. Cuando los riñones dejan de realizar sus funciones se conoce como enfermedad renal crónica (ERC), la cual puede causar una concentración perjudicial de desechos dentro del cuerpo. Como su nombre lo indica, es una pérdida crónica porque se desarrolla de manera paulatina [2].

Cuando una persona padece ERC, el ácido úrico se acumula también en la sangre generando hiperuricemia. El ácido úrico es el último producto de las purinas en el metabolismo humano y, se forma a través de la enzima xantina oxidasa, la cual oxida a las oxipurinas [3]. Dentro del intestino la proteína ABCG2 (que codifica para el gen del mismo nombre), es responsable de secretar ácido úrico en la orina. Por su parte el gen ABCG2 pertenece a un grupo llamado ATP binding cassette, esta familia proporciona instrucciones para hacer proteínas que transportan moléculas a través de las membranas celulares [4].

Se han realizado varios estudios en poblaciones asiáticas respecto a las implicaciones de la variante genética rs2231142 del gen *ABCG2* en el aumento de ácido úrico en el cuerpo. Uno de ellos analizó a 25,245 pacientes con hiperuricemia y determinó que la presencia del alelo T, muestra una asociación significativa con el padecimiento tanto en hombres como mujeres. Además, se logró identificar los efectos de la relación significativa entre el índice de masa corporal alto y los pacientes que presentaban la variante [5].

Por su parte la variante rs1143634 ha mostrado una asociación con estrés oxidativo, enfermedad de Alzheimer, cáncer cervical, Artritis Reumatoide y diversos padecimientos. Sin embargo, aún no se tiene registro de su posible relación con hiperuricemia o enfermedad renal [6].

En México no se han realizado estudios similares, pese a tener un porcentaje alarmante de diabetes en adultos y niños mexicanos. La investigación realizada por la estudiante de doctorado Gloria Elizabeth Vázquez Rivera comenzó en marzo del año 2019 y se estima que concluirá a finales del año 2023. El enfoque de la investigación partió del interés de Gloria en la nutrición y sus implicaciones en el metabolismo. Poco a poco comenzó a especificarlo

en alimentos que generaran hiperuricemia y con ello las implicaciones del ácido úrico en el organismo. Fue así como con la ayuda del doctor Francisco Mendoza lograron definir el propósito de la investigación, la cual pretende obtener un panorama respecto a las implicaciones genéticas de la enfermedad renal crónica.

Por otra parte, los retos que ha enfrentado la doctorante Gloria Elizabeth Vázquez durante el proceso de experimentación consisten principalmente en la poca disposición de recursos como equipos, materiales y reactivos. Además, una de las grandes problemáticas que ha rodeado no solo a su proyecto, sino al CIBO de manera general es el recorte en el presupuesto destinado a investigaciones.

1.2 Caracterización de la organización

El Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) es parte del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y se localiza en la calle Sierra Mojada con número 800 en la colonia Independencia Oriente en Guadalajara Jalisco. Está a cargo de la Doctora en Ciencias Blanca Torres Mendoza, y consta de cinco divisiones principales: Genética, la cual cuenta con once investigadores; Inmunología, con seis investigadores; Investigación Quirúrgica, con dos investigadores y tres catedráticos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT); Medicina Molecular, con cinco investigadores y Neurociencias, con siete investigadores. Además, cuenta con un bioterio y dos laboratorios: Laboratorio de Apoyo a la Vigilancia e Investigación Epidemiológica y Laboratorio del Retrovirus Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) de Noroccidente [7].

El CIBO tiene como visión ser un centro de excelencia para el desarrollo de la investigación para la solución de problemas en los procesos de atención a la salud, así como la formación de recursos humanos altamente calificados en el ámbito de la investigación científica biomédica. Su misión, por su parte, es generar conocimientos para explicar los fenómenos biológicos a través del método científico, con el propósito de entender los mecanismos de enfermedad, desarrollar tecnología para la aplicación a la medicina institucional y formar profesionales de la investigación en salud [7]

La división de Medicina Molecular se encuentra a cargo del Doctor en Ciencias Guillermo Moisés Zúñiga González; en ella se llevará a cabo el presente PAP con la guía del Dr. Francisco Mendoza Carrera

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

La enfermedad renal crónica (ERC) es la pérdida paulatina de la función de los riñones, órganos responsables de eliminar los desechos y el exceso de agua en el cuerpo [8]. Su diagnóstico tardío, al igual que otras enfermedades crónicas no transmisibles, es uno de los principales problemas de este padecimiento [9]. En 2017, se reportó una prevalencia de la ERC del 12.2% en la población mexicana, lo que indica 51.4 muertes por cada 100 habitantes.

Dos de las principales causas de la ERC, son la diabetes y la presión arterial alta; en México se reportaron más de 150 mil muertes debido a la diabetes, lo cual representa al 14% del total de defunciones [10]. En la actualidad, cerca de 6.2 millones de mexicanos con diabetes tienen insuficiencia renal en sus distintas etapas, incluso sin saber que la padecen [9]. Si bien la ERC puede ser terminal, si es que se diagnostica en etapas tempranas, como es el caso del 98% de personas con ERC por diabetes en México, puede ser controlable e incluso reversible [9].

Además de su relación con la diabetes, se ha encontrado evidencia de la relación de ERC con variante genética encargadas de la síntesis de moléculas [11]. El presente PAP experimental pretende analizar la variante rs2231142, la cual tiene implicaciones en la concentración del ácido úrico, al realizar un cambio de base citocina (C) por una base adenina (A), resultando en un cambio en el codón codificante del aminoácido glutamina por una lisina (Q por K) [12].

Considerando que los análisis genéticos logran predecir si existe un mayor riesgo de padecer enfermedad renal crónica, los pacientes pueden prevenir su padecimiento mediante cambios en su estilo de vida, así como revisiones constantes. Si los pacientes toman responsabilidad a partir de conocer su estado de salud, pueden detectar los estados tempranos y, por ende, más controlables de la enfermedad.

1.4. Planeación de alternativa(s)

Se analizarán muestras de ADN de pacientes con ERC, así como pacientes de referencia que padecen diabetes. Para poder identificar las variantes genéticas rs2231142 y rs1143634 es necesario realizar una genotipificación para conocer y analizar el segmento de interés de ADN de las muestras de estos pacientes. Para ello existen distintas técnicas, las cuales se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Técnicas de genotipificación consideradas para la investigación

Técnica de genotipificación	Descripción	Ventajas y desventajas
PCR en tiempo real	Amplifica y simultáneamente cuantifica un segmento específico de AD [13].	Permite la detección y cuantificación de ADN al mismo tiempo, optimizando el tiempo.
PCR RFLP	Se amplifica una secuencia de ADN que hibrida a uno o más fragmentos de la digestión de la muestra ADN después de separarse por un gel de electroforesis [14].	Es una de las técnicas que requiere más tiempo y pasos, sin embargo, es la más económica.
PCR amplificación	Es una amplificación más selectiva del fragmento de ADN deseado utilizando primers para determinar en el proceso si está conformado por un alelo heterocigoto u homocigoto [15].	Gracias a los resultados que presenta desde la electroforesis, no es necesario realizar una digestión posterior.
Secuenciación	Las colonias con ADN recombinante aleatorio se recolectan, procesan y secuencian [16].	Pese a ser un método muy rápido y eficiente, representa un costo que supera el presupuesto tanto en equipo como reactivos para su realización.

Debido a que el centro de investigación (CIBO) no cuenta con el equipo necesario para realizar una técnica de secuenciación, esta opción fue descartada. La PCR amplificación se

tomó en cuenta para la genotipificación de las muestras, sin embargo, debido a que se contaba previamente con los reactivos para realizar PCR RFLP y PCR tiempo real, se optó por utilizar únicamente estas dos técnicas para la investigación.

Para el desarrollo del presente PAP se plantea el siguiente cronograma de actividades (Tabla 2), el cual proporciona la organización tanto en el centro de investigación CIBO como en la institución educativa ITESO.

Tabla 2. Cronograma de actividades previstas para la realización del PAP

Nombre	Recursos	Tiempo (días)	Agosto		Septiembre			Octubre		Noviembre					Diciembre		
			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
Introducción a laboratorio 2 y 3 de la división de Medicina Molecular	0	2															
PCR y digestión biológica de muestras 14-60 DM	TE EP BS ES	6															
Entrega avance 1 de RPAP	CV	1															
Primera presentación con el Dr. Francisco respecto al polimorfismo	AC	1															
PCR y digestión biológica de muestras 61-130 DM	TE EP BS ES	7															
Entrega avance 2 de RPAP	CV	1															
Segunda presentación con el Dr. Francisco respecto al polimorfismo	AC	1															
Realización de PCR en tiempo real	TR	3															
Entrega avance 3 de RPAP	CV	1															
Registro de presentaciones	CI	1															
Presentación y corrección del progreso RPAP al Dr. Francisco	AC	2															
Entrega avance 4 de RPAP	CV	1															

Presentación de RPAP ante alumnos y docentes del ITESO	AU	1																
Entrega final de RPAP con últimas correcciones realizadas	CV	1																

A continuación, en la Tabla 3, se presentan las abreviaturas mostradas en la Tabla 2.

Tabla 3. Abreviaturas de los recursos señalados en el cronograma de actividades

Recursos Utilizados	
Abreviatura	Significado
AC	Area común de la división de Medicina Molecular
AU	Auditorio ITESO a determinar
BS	Baño seco
CI	Correo Institucional
CV	Canvas ITESO
EP	Electroforesis en gel de poliacrilamida
ES	Electroforesis en gel de agarosa
LBII	Laboratorio II del CIBO
LBIII	Laboratorio III del CIBO
RF	Zona de refrigeración
TE	Termociclador
TM	Teams
TR	Termociclador para PCR en tiempo real

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que tiene como propósito ampliar un segmento de ADN. Cuenta con seis componentes esenciales: ADN molde, primers modificados, desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's), ADN polimerasa, iones magnesio y solución amortiguadora. La técnica de PCR utiliza ADN polimerasa termoestable, dos primers y ciclos de calentado y enfriamiento conocidos como termograma,

de la cual se hablará más a continuación [17]. En este PAP, los dNTP's y ADN polimerasa se incluyeron en una mezcla maestra (Máster Mix).

El método de PCR utiliza la habilidad de la ADN polimerasa para sintetizar una nueva hebra de ADN complementaria al fragmento de ADN molde. Para comenzar a agregar los nucleótidos, la ADN polimerasa requiere un grupo hidroxilo preexistente (3'-OH), por ello necesita un primer que pueda comenzar agregando el primer nucleótido a la cadena [18].

Los primers, o también llamados oligonucleótidos, se utilizan como cebador para la síntesis de ADN con el ADN clonado como plantilla. Los primers funcionan como iniciadores para la síntesis química de los segmentos cortos de ADN diseñados a la medida, pueden utilizarse para introducir secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción, útiles para crear diversas moléculas de ADN recombinantes, como las fusiones entre las regiones codificantes de dos genes diferentes o la fusión de un promotor de un gen con la región codificada de otro. Son cruciales en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y, son una característica indispensable de las estrategias de secuenciación del ADN [19]. Es necesario que uno de los primers tenga la misma secuencia complementaria que estará al final del fragmento que se busca amplificar, razón por la cual son llamados primer forward y reverse para que sea complementaria a la cadena que forma el otro [20]. En el laboratorio ambos primers se encontraron en una misma mezcla.

Los termogramas, por su parte, constan de tres fases: desnaturalización, alineamiento y extensión (Figura 1). La primera fase se lleva a cabo cuando la molécula de ADN guía se separa en dos moléculas de una sola hebra y generalmente se realiza a una temperatura de 95°C. La segunda fase ocurre cuando la base del primer modificado se empareja con la secuencia de interés y, se lleva a cabo a una temperatura de 55 - 68°C, aproximadamente. Finalmente, la fase de extensión se da cuando los primers alineados se extienden de acuerdo con las hebras base y por acción de la Taq ADN polimerasa a 72°C [17].

Reacción en cadena de la polimerasa - PCR

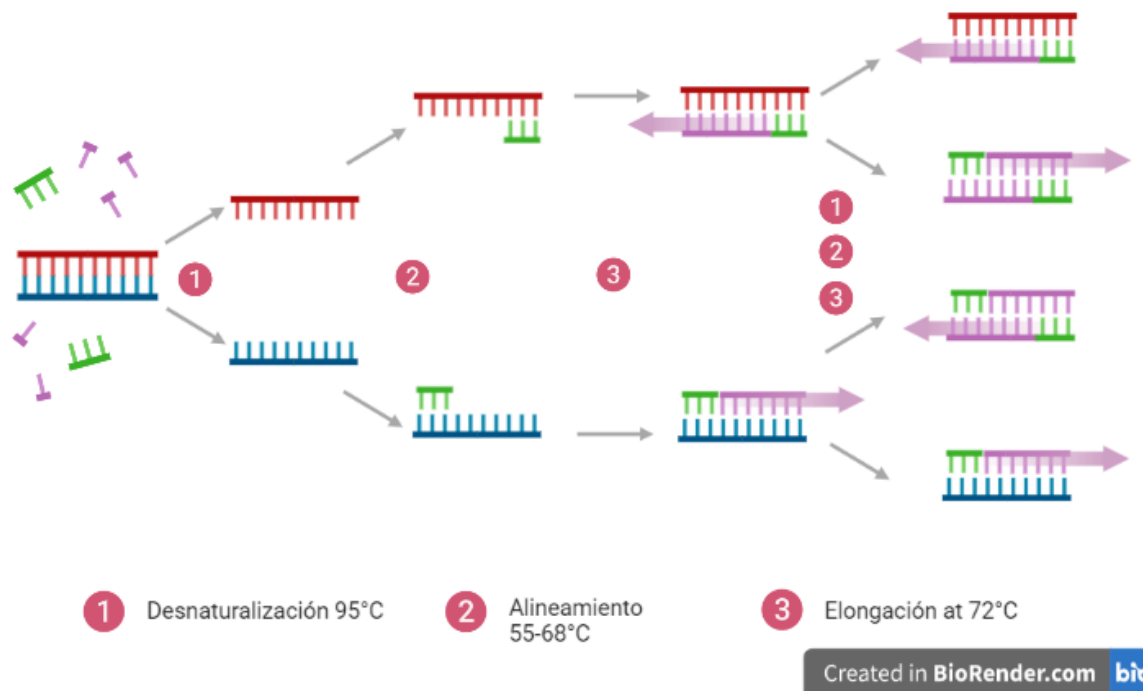


Figura 1. Reacción en cadena de la polimerasa.

Para la separación y análisis de ácidos nucleótidos, se utiliza la técnica de electroforesis. En este proceso se coloca una muestra de ADN sobre un gel de agarosa o poliacrilamida y, gracias a la carga negativa que proporcionan los grupos fosfato de la estructura de los ácidos nucleicos, las moléculas de ADN migrarán a través del gel hasta el extremo positivo de la cámara de electroforesis. Para poder determinar la longitud del fragmento de ADN, se utiliza un marcador conocido como Ruler o Escalera de una cantidad de pares de bases (bp) específica, este correrá de manera simultánea al fragmento de ADN, formando líneas que indiquen la cantidad de bp que se encuentran a cierta distancia del inicio del gel. Si las muestras presentan la longitud esperada, se considera que contienen y han amplificado la secuencia de ADN deseada [21].

Después de la PCR, el siguiente paso será realizar una digestión enzimática del ADN amplificado para identificar los alelos presentes en las muestras. Para ello se pueden utilizar enzimas que cortan los enlaces fosfodiéster en secuencias específicas; estas se conocen como

endonucleasas de restricción [22]. Durante el presente PAP se utilizó la enzima de restricción TaqI.

Alternativamente, la genotipificación se puede realizar por la técnica de PCR en tiempo real. Esta permite detectar y cuantificar la cantidad de copias de ADN que se generan en cada ciclo de la reacción. Además de los primers, se incluyen dos sondas de oligonucleótidos, las cuales son fragmentos cortos de ADN (20-40 nucleótidos) diseñadas para reconocer variaciones específicas en el genoma. Cada sonda está marcada con una molécula fluorescente específica, llamada fluoróforo. En cada ciclo de la reacción, el instrumento o termociclador emite un haz de luz que excita el fluoróforo cuando este se une a la secuencia de ADN el cual, genera fluorescencia que se puede detectar a una longitud de onda específica [16].

Procedimiento

La metodología que se implementó en el presente PAP consta de varias preparaciones y pasos: PCR, gel de poliacrilamida, electroforesis, tinción del gel de poliacrilamida, digestión enzimática y gel de agarosa, las cuales se explican a continuación.

Previamente a la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se contaba con muestras de genomas (ADN) de los pacientes a estudiar, obtenidas de sangre periférica tomadas por el personal del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Las extracciones de ADN fueron realizadas por la estudiante de doctorado Gloria Elizabeth Vázquez a lo largo de su investigación y se almacenaron a 4°C en microtubos Eppendorf de 2.0 mL. Debido a la temperatura de almacenamiento, los tubos presentaban cierta condensación a lo largo de las paredes. Para incorporar la muestra correctamente, los microtubos se agitaron en vórtex y se centrifugaron a 8000 rpm por 10 segundos.

PCR en tiempo real

Para identificar la variante genética rs2231142 se utilizó la técnica de PCR en tiempo real. El proceso comenzó calculando las cantidades necesarias de reactivos para analizar 100 muestras (Tabla 4); las placas de PCR cuentan con 96 pocillos, sin embargo, se consideró un margen de error de 4 pocillos.

Tabla 4. Preparación de PCR

Reactivo	1X	100X
Agua	1.875 µL	187.5 µL
Máster Mix	2.5 µL	250 µL
Sonda	0.125 µL	12.5 µL

Posteriormente se agregó 1 µL de cada muestra a un pocillo correspondiente, además de 3 controles positivos (uno para cada genotipo). Se colocó en el vortex por unos segundos y se centrifugó a 800 rpm por 15 segundos. Finalmente se introdujo en el termociclador en tiempo real y se dejó correr la reacción.

PCR convencional

En cada PCR se analizaron 19 muestras de ADN, más un control negativo. Para saber la cantidad de reactivos necesarios, se realizaron los cálculos presentados en la Tabla 4. Después se rotularon 20 microtubos Eppendorf de 2.0 mL de acuerdo con la muestra de ADN que analizaría cada uno, más el control negativo que contenía únicamente los tres primeros reactivos presentados en la Tabla 5.

Tabla 5. Preparación de PCR

Reactivo	1X	20X
Agua	2.5 µL	50 µL
Master Mix	5.0 µL	100 µL
Primers	0.5 µL	10 µL
Muestra de ADN	2.0 µL	0.0 µL

Por cuestiones de practicidad, se realizó la mezcla total en un microtubo Eppendorf de 2.0 mL, y posteriormente se colocó una cantidad de 8 µL en cada microtubo de la mezcla total, más 2 µL adicionales de la muestra de ADN correspondiente a su microtubo. Al finalizar se colocaron los microtubos en el Vortex y se centrifugaron a 8500 rpm por 15 segundos. Posteriormente se trasladaron al termociclador para comenzar el proceso de PCR. Al terminar, las muestras se almacenaron a 4°C para su uso posterior.

Gel de poliacrilamida

De manera simultánea a la PCR, se preparó un gel de poliacrilamida. Se colocaron dos cristales limpios y dos espaciadores en los extremos. Posteriormente se introdujeron los cristales y los espaciadores en una bolsa de plástico cuidando de mantener el acomodo indicado para después agregar la mezcla del gel.

Para preparar el gel de poliacrilamida se agregó a un frasco de plástico con tapa de 70 mL, 30 mL de poliacrilamida al 30% (29:1, acrilamida - bis acrilamida), 300 μ L de persulfato de amonio (PSA) y 30 μ L TEMED (tetrametiletildiamina). Se agitó la mezcla vigorosamente y se vertió en la bolsa que contenía a ambos cristales; inmediatamente se colocó el peine de 24 espacios.

El gel se dejó polimerizar por 15 minutos, se retiró de la prensa y posteriormente de la bolsa. Después se enjuagó superficialmente con agua destilada, cuidando de limpiar cada pocillo.

Electroforesis

Se colocó el gel en la cámara de electroforesis y se ajustaron correctamente los costados de los cristales en la cámara, posteriormente se agregó Buffer TBE X1 hasta la marca correspondiente. Para introducir las muestras en los pocillos se utilizó una micropipeta de 10 μ L; se agregaron 5 μ L de muestra en cada pocillo incluyendo el control negativo. De la misma manera se agregaron 2 μ L de ruler molecular de 100 bp, como se muestra en la Figura 2.

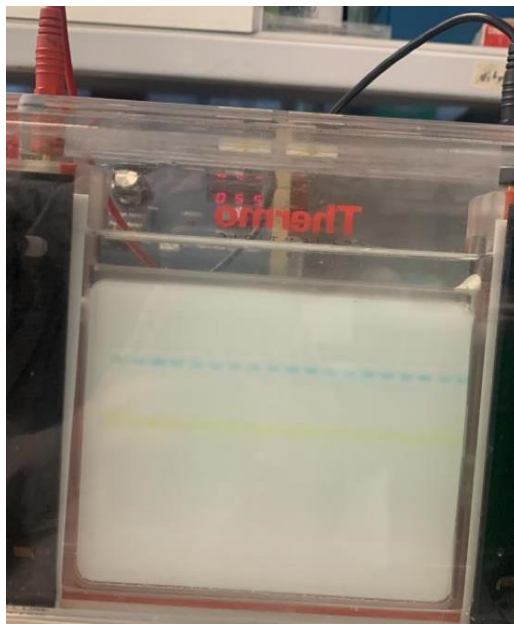


Figura 2. Carga de muestras en el gel de poliacrilamida.

Una vez cargadas las muestras en el gel de electroforesis se conectó a la fuente de poder y se dejó correr por 40 minutos a 100 V. Posteriormente se desmontó la cámara de la fuente de poder y el gel de poliacrilamida de la cámara.

Tinción del gel de poliacrilamida

Se despegó cuidadosamente el gel de los cristales con ayuda de los separadores y se colocó en una bandeja adecuada para tinción. Una vez acomodado completamente el gel en la bandeja, se agregó solución fijadora por 10 minutos y se agitó ocasionalmente, después se decantó la solución y se colocó en el frasco correspondiente para su reutilización. Enseguida se agregó nitrato de plata por 3 minutos agitando ocasionalmente y una vez transcurrido el tiempo se decantó la solución y se vertió en el recipiente correspondiente para su reutilización.

Posteriormente se realizó un lavado del gel con agua destilada durante 3 minutos más, dentro de la misma bandeja, se decantó el agua y se vertió en el correspondiente contenedor de residuos. Después se agregó solución reveladora, junto con 100 μ L de formaldehído al 37% por 2 minutos y al terminar se vertió la solución en el contenedor correspondiente para su

reutilización. Finalmente se colocó el gel en el transiluminador para su análisis, como se muestra en la Figura 3.

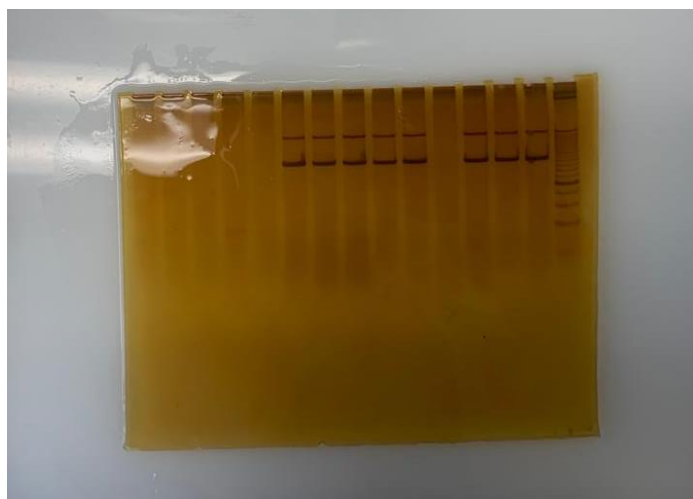


Figura 3. Gel de poliacrilamida después de electroforesis y tinción con AgNO_3

Digestión enzimática

Para saber qué muestras se analizarán en la digestión enzimática, es necesario observar el gel de poliacrilamida teñido e identificar las muestras que se amplificaron en el proceso. Una vez que se determinaron el número de muestras que se incluirán en la digestión, se preparó una mezcla madre con las cantidades correspondientes (nX), como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Preparación de digestión enzimática

Reactivo	1X	nX
Agua	3.7 μL	3.7n μL
Solución Buffer	1.0 μL	1.0n μL
Enzima <i>Taq I</i>	0.3 μL	0.3n μL
Muestra de ADN amplificado	5.0 μL	

La mezcla madre se colocó en el Vortex y se centrifugó por 15 segundos a 8000 rpm. Posteriormente se vertieron 5 μL de la mezcla en cada microtubo Eppendorf que contenía las muestras amplificadas de ADN restantes del proceso de electroforesis. Después se colocaron

los microtubos en el baño seco por 90 minutos a 65°C. Una vez transcurrido el tiempo se retiraron las muestras del baño seco y se trasladaron en una gradilla al gel de agarosa.

Gel de agarosa

Para utilizar la cámara de electroforesis se preparó un gel de agarosa. Para ello se colocó el molde en la posición correspondiente y, se mezclaron en un frasco de cristal resistente a cambios de temperatura, 0.9 g de agarosa y 25 mL de Buffer TBE. Después se colocó el frasco cerrado en el microondas, para evitar que la mezcla se evaporara, por 40 segundos para disolver la agarosa completamente en el Buffer TBE. Se agregaron 7.0 µL de SYBR Safe DNA 10000X. Se dejó enfriar la mezcla durante 5 minutos, aproximadamente, se vertió en la cámara de electroforesis y se colocaron dos peines de 10 pocillos cada uno. Se dejó polimerizar 30 minutos.

Una vez preparado y colocado el gel, se llenó la cámara de electroforesis de Buffer TBE hasta la línea señalada. Después, se depositaron 7 µL de muestra con ayuda de una micropipeta en cada pocillo, de tal manera que cada muestra a analizar se encontrara en un pocillo diferente, como se muestra en las Figuras 4 y 5.

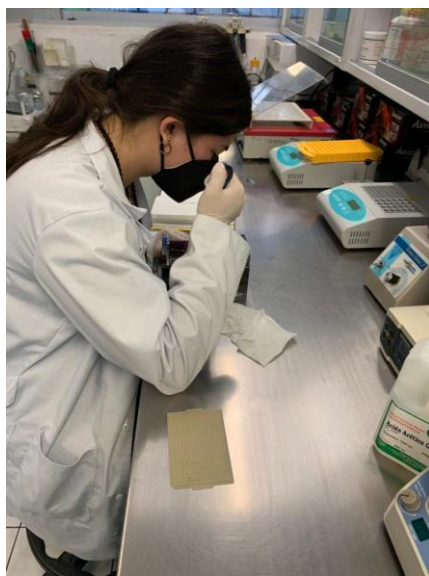


Figura 4. Carga de muestras en gel de agarosa.

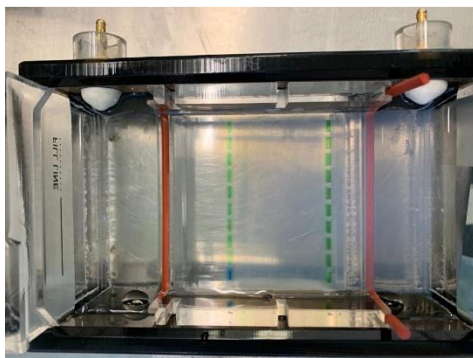


Figura 5. Gel de agarosa cargado con muestras para realizar digestión enzimática.

Posteriormente se conectó la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se dejó correr por 15 minutos a 100 V, como se muestra en la Figura 6. Al terminar el tiempo, se retiró la cámara de la fuente de poder y se trasladó el gel de agarosa al transiluminador UV para su análisis.

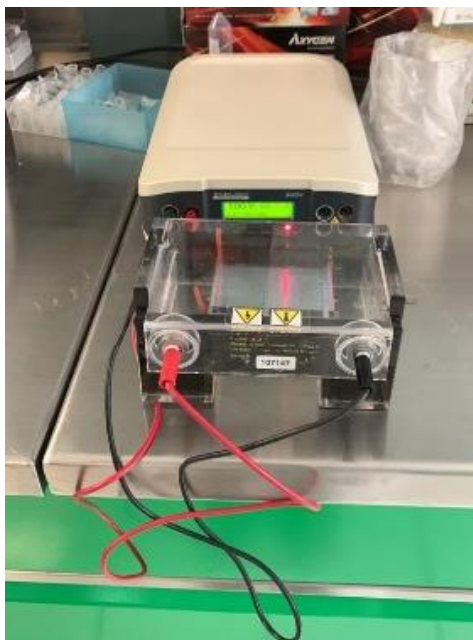


Figura 6. Montaje de electroforesis a la fuente de poder.

Resultados y análisis

PCR convencional

Para analizar las muestras de la variante rs1143634 del gen *IL1B* se observaron los geles de agarosa para determinar los cortes realizados en las enzimas, y con ello los tres genotipos posibles como se muestra en la Figura 7. Cuando se presentaban dos bandas existía la presencia de un heterocigoto C/T, cuando la banda se ubicaba en la parte superior se presentaba un homocigoto T/T, y cuando la banda se colocaba en la parte inferior existía la presencia de un homocigoto C/C.

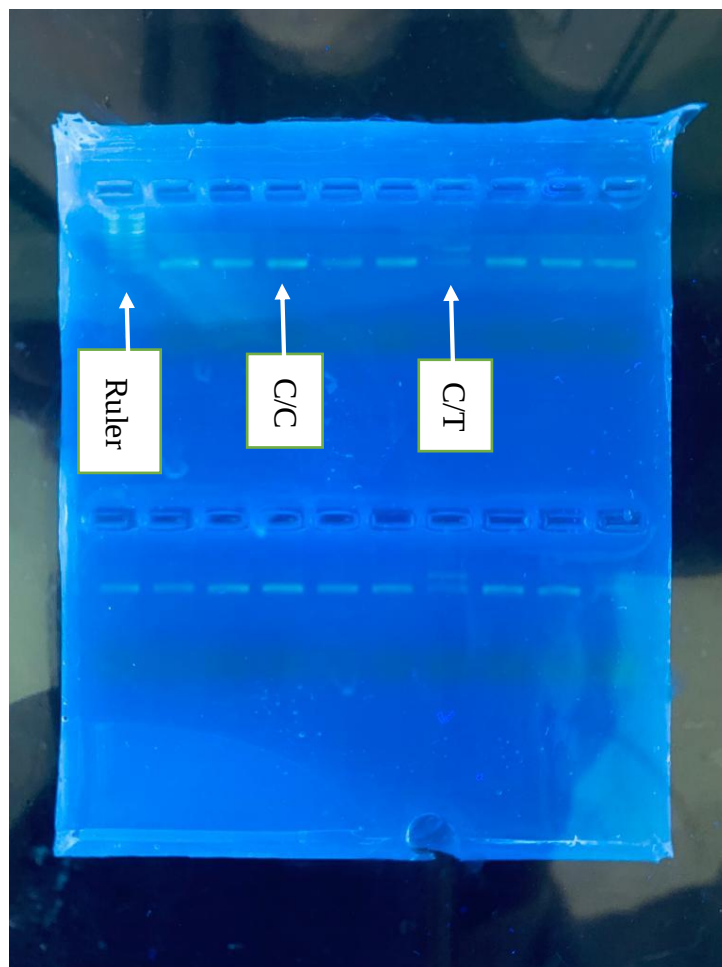


Figura 7. Gel de agarosa irradiado con luz UV en los que se muestran con productos de PCR después de la digestión enzimática.

PCR tiempo real

Los resultados de la PCR en tiempo real fueron obtenidos directamente del termociclador una vez terminada la reacción. Para el análisis de resultados se utilizó el programa LightCycler^{MR} 96 el cual indicó los genotipos correspondientes a cada reacción y se presenta en la Figura 8. Los ejes del gráfico representan la cantidad de fluorescencia del fluoróforo FAM (alelo A, abscisa) o VIC (alelo C, ordenadas), mientras que las dos áreas sombreadas que parten del vértice representan los límites de confianza para cada uno de los tres genotipos posibles. Los puntos azules representan a las muestras con genotipo homocigoto A/A; los triángulos en color naranja en la parte media del gráfico representan muestras con el genotipo heterocigoto C/A y los puntos verdes representan las muestras con el genotipo homocigoto C/C.

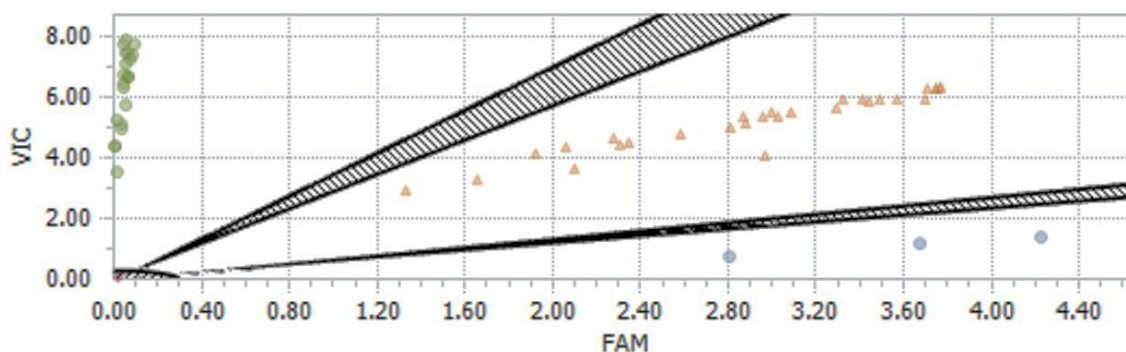


Figura 8. Genotipificación para la variante rs2231142 del gen ABCG2

Análisis de frecuencias

En total, se genotipificaron 283 y 357 muestras para las variantes rs1143634 y rs2231142, respectivamente. Se cuantificaron los alelos T y C, así como A y C en cada muestra, lo cual se conoce como frecuencia alélica (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencias alélicas y genotípicas en pacientes con diabetes tipo 2

Gen	Variante	Genotipo	Frecuencia
<i>IL1B</i>	rs1143634	C/C	215 (76%)
		C/T	63 (22%)
		T/T	5 (2%)
		T	73 (12.9%)
		C	493 (87.1%)
<i>ABCG2</i>	rs2231142	C/C	222 (62%)
		C/A	115 (32%)
		A/A	20 (6%)
		C	559 (78.3%)
		A	155 (21.7%)

Para determinar los genotipos esperados se utilizó la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg (EHW), la cual establece que en una población lo suficientemente grande con reproducción sexual y apareamiento aleatorio no se presenta ningún fenómeno con suficiente impacto para

modificar las frecuencias alélicas, las cuales se mantendrán constantes en las generaciones sucesivas [23]. Los principales supuestos para que se cumpla el EHW son:

- Los organismos diploides con reproducción sexual y generaciones discretas
- El apareamiento entre individuos es aleatorio
- La población es lo suficientemente grande como para despreciar el efecto de la deriva genética y de los eventos migratorios.

Si se cumplen tales supuestos y dados dos alelos A_1 y A_2 presentes en la población con frecuencias $f(A_1) = p$ y $f(A_2) = q$, donde $p + q = 1$, se pueden obtener las frecuencias genotípicas de la siguiente generación utilizando un cuadro de Punnett como se muestra a continuación [23]:

		Hembras	
		$A_1(p)$	$A_2(q)$
Machos	$A_1(p)$	$A_1A_1(p^2)$	$A_1A_2(pq)$
	$A_2(q)$	$A_1A_2(pq)$	$A_2A_2(q^2)$

Figura 9. Cuadro de Punnett para análisis de frecuencias [23].

Entonces, se puede establecer que:

$$p^2 + pq + qp + q^2 = 1$$

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Ecuación 1. Equilibrio Hardy-Weinberg

Sustituyendo las variables p y q de la Ecuación 1 por los valores correspondientes a los alelos T y C para la variante rs1143634 y C y A para la variante rs2231142, respectivamente, se obtuvieron las siguientes frecuencias genotípicas:

$$(0.8710)^2 + 2(0.8710)(0.1290) + (0.1290)^2 = 1$$

$$0.76 + 0.22 + 0.02 = 1$$

$$(0.7829)^2 + 2(0.7829)(0.2171) + (0.2171)^2 = 1$$

$$0.61 + 0.34 + 0.05 = 1$$

Estos valores se multiplican por el total de las muestras (individuos) analizadas ($n = 283$ para rs1143634 y $n = 357$ para rs2231142), con lo que se obtienen las frecuencias genotípicas esperadas:

IL1B rs1143634

$$p^2: (0.76) (283) = \mathbf{215}$$

$$pq : (0.22)(283) = \mathbf{64}$$

$$p^2: (0.02) (283) = \mathbf{5}$$

ABCG2 rs2231142

$$p^2: (0.61) (357) = \mathbf{219}$$

$$pq : (0.34)(357) = \mathbf{121}$$

$$p^2: (0.05) (357) = \mathbf{17}$$

La comparación de los valores observados y esperados se muestra en la Tablas 8 (para la variante rs1143634) y la Tabla 9 (para la variante rs2231142)

Tabla 8. Comparación de genotipos observados contra esperados rs1143634

Genotipo	Observado	Esperado
C/C	215	215
C/T	63	64
T/T	5	5

Tabla 9. Comparación de genotipos observados contra esperados rs2231142

Genotipo	Observado	Esperado
C/C	222	219
C/A	115	121
A/A	20	17

Posteriormente, se compararon los valores observados mediante una prueba de Chi cuadrada y para un grado de libertad utilizando la Ecuación 2:

$$X^2 = \frac{\sum(O - E)^2}{E}$$

Ecuación 2. Prueba de Chi²

Sustituyendo:

IL1B rs1143634

$$X^2 = \frac{(215 - 215)^2}{215} + \frac{(63 - 64)^2}{64} + \frac{(5 - 5)^2}{5} = 0.015$$

ABCG2 rs2231142

$$X^2 = \frac{(222 - 219)^2}{219} + \frac{(115 - 121)^2}{121} + \frac{(20 - 17)^2}{17} = 0.87$$

Para 1 grado de libertad y 95% de confianza, el valor de la X^2 debe ser mayor a 3.86. Por lo tanto, se concluye que la distribución de los genotipos observados en la población analizada cumple con lo esperado según el EHW (Tablas 8 y 9).

El siguiente paso en el análisis de los datos es la descripción de las características de los pacientes analizados, así como su media y rangos intercuartílicos. Los resultados se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Características de los pacientes analizados

Variable	Valor
Sexo (mujeres)	250 (67%)
Edad	62 (54 - 69)
Glucosa	141 (112 - 205)
Ácido Úrico	5.20 (4.3 – 6.5)
Hiperuricemia	37 (24%)
Hemoglobina glicada	7.9 (6.7 – 10.0)
Creatinina	0.75 (0.64 – 0.92)

Análisis de asociación

Se determinó la asociación de las variantes analizadas con la presencia de hiperuricemia, para lo cual se consideró el estado portador del alelo menor de cada variante como factor de riesgo. Los resultados se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Asociación de las variantes rs1143634 y rs2231142 con la presencia de hiperuricemia en pacientes con diabetes tipo 2

Gen	Variante	Genotipo	HU-	HU+	p-value
<i>IL1B</i>	rs1143634	C/C	65 (76%)	17 (59%)	0.06
		T+	21 (24%)	12 (41%)	
<i>ABCG2</i>	rs2231142	C/C	42 (36%)	18 (55%)	0.08
		A+	74 (64%)	15 (45%)	

Se observó que la prevalencia de hiperuricemia fue mayor en los pacientes que portaron el alelo C de la variante rs1143634. De manera contraria, aquellos que portaron el alelo A en la variante rs2231142 mostraron una menor prevalencia de hiperuricemia. Sin embargo, los valores de p mostraron que las diferencias no eran significativas estadísticamente en ambos casos.

Adicionalmente se analizó la influencia de estas mismas variantes sobre los valores de ácido úrico (Tabla 12). Se observó nuevamente que los portadores del alelo A mostraron una mayor concentración de ácido úrico, sin embargo, esta diferencia no fue significativa.

Tabla 12. Relación de las variantes rs1143634 y rs2231142 con las concentraciones de ácido úrico en pacientes con diabetes tipo 2.

Gen	Variante	Genotipo	Media	p-value
<i>IL1B</i>	rs1143634	C/C	5.37 ± 1.42	0.24
		T+	5.74 ± 1.72	
<i>ABCG2</i>	rs2231142	C/C	5.16 ± 1.37	0.08
		A+	5.59 ± 1.56	

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

De acuerdo con el estudio Chen y colaboradores (2021) en donde se analizó una población de 25,245 individuos asiáticos, la variante rs2231142 se asoció con las concentraciones de ácido úrico y con riesgo de hiperuricemia [5]. Sin embargo, en el presente PAP no se encontró asociación significativa en la población mexicana. Esto puede deberse al tamaño de muestra limitado, ya que no todas las muestras lograron ser genotipificadas o no se contaban con los datos de ácido úrico en todos los pacientes. Estas observaciones se pueden confirmar o descartar una vez que se cuente con la totalidad de los datos para todos los pacientes captados lo cual se espera concluya a finales del año 2023.

Si bien no se encontró una relación significativa entre las variantes analizadas con niveles altos de ácido úrico por el momento, el proceso de determinar algunos de los factores genéticos en pacientes con hiperuricemia aporta conocimiento para la mejor comprensión de los factores intervinientes en la regulación de las concentraciones de ácido úrico en la población mexicana. Además, podría significar también un avance en el conocimiento de

factores genéticos relacionados con alteraciones comunes en los pacientes con diabetes, tales como la hiperuricemia, factor de riesgo para enfermedad renal crónica.

1.7. Bibliografía y otros recursos

- [1] National Cancer Institute, «Kidney,» National Cancer Institute, 2022. [En línea]. Available: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/kidney>. [Último acceso: 30 Septiembre 2022].
- [2] N. I. o. D. a. D. a. K. Diseases, «What Is Chronic Kidney Disease?,» National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2022. [En línea]. Available: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/kidney-disease/chronic-kidney-disease-ckd/what-is-chronic-kidney-disease>. [Último acceso: Septiembre 2022].
- [3] N. L. o. Medicine, «Uric acid,» National Library of Medicine, 2022. [En línea]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Uric-acid#section=Information-Sources>. [Último acceso: 30 Septiembre 2022].
- [4] Medline Plus, «ABCG2 gene,» 1 Agosto 2018. [En línea]. Available: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/abcg2/#conditions>.
- [5] Y.-J. Chen y I.-C. Chen, «Association of ABCG2 rs2231142 Allele and BMI With Hyperuricemia in an East Asian Population,» 31 Agosto 2021. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8438144/>. [Último acceso: 22 Noviembre 2022].
- [6] SNPedia, «rs1143634,» SNPedia, 10 Febrero 2021. [En línea]. Available: <https://www.snpedia.com/index.php/Rs1143634>. [Último acceso: 22 Noviembre 2022].

- [7] O. S. Medina Gómez, «Libro Contribuciones del IMSS,» Diciembre 2018. [En línea]. Available: https://www.researchgate.net/publication/329841888_libro_contribuciones_del_IMSS. [Último acceso: 24 Noviembre 2022].
- [8] Z. Dong, J. Zhou, S. Jiang y Y. Li, «Epistatic interaction between PKD2 and ABCG2 influences the pathogenesis of hyperuricemia and gout,» 27 Enero 2020. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6986014/>.
- [9] MedlinePlus, «Enfermedad renal crónica,» 2021. [En línea]. Available: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000471.htm>. [Último acceso: 2 Septiembre 2022].
- [10] Instituto Nacional De Salud Pública, «<https://www.insp.mx/avisos/5296-enfermedad-renal-cronica-mexico.html>,» 26 Agosto 2020. [En línea]. Available: <https://www.insp.mx/avisos/5296-enfermedad-renal-cronica-mexico.html>. [Último acceso: 2 Septiembre 2022].
- [11] INEGI, «ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA DIABETES,» 12 Noviembre 2021. [En línea]. Available: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/EAP_Diabetes2021.pdf. [Último acceso: 2 Septiembre 2022].
- [12] National Library of Medicine, «rs2231142,» National Library of Medicine, 9 Abril 2021. [En línea]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2231142#variant_details. [Último acceso: 22 Noviembre 2022].
- [13] R. D'Achiardi Rey, «FACTORES DE RIESGO DE ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA,» 2011. [En línea]. Available: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-52562011000200009. [Último acceso: 2 Septiembre 2022].
- [14] S. Maddocks y R. Jenkins, «Real-Time Polymerase Chain Reaction,» 2007. [En línea]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological->

sciences/real-time-polymerase-chain-reaction#:~:text=Real-time%20PCR%2C%20also%20called%20quantitative%20real-time%20PCR%2C%20is,normalized%20to%20ADN%20input%20or%20additional%20normalizing. [Último acceso: 30 Septiembre 2022].

- [15] Biosynthesis, «What is PCR amplification,» Biosynthesis, 2015. [En línea]. Available: <https://www.biosyn.com/faq/What-is-PCR-amplification.aspx#:~:text=PCR%20amplification%20is%20the%20selective%20amplification%20of%20ADN,of%20heat%20denaturation%2C%20primer%20annealing%2C%20and%20primer%20extension..> [Último acceso: 30 Septiembre 2022].
- [16] J. D. Watson, *Biología Molecular*, Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2016.
- [17] N. L. o. Medicine, «Polymerase Chain Reaction (PCR),» NIH, 2017. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>. [Último acceso: 22 Noviembre 2022].
- [18] J. Durland y H. Ahmadian-Moghadam, «Gentics, Mutagenesis,» 21 Septiembre 2021. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560519/>.
- [19] J. D. Watson y T. A. Baker, *Biología Molecular del Gen*, CDMX, México: Editorial Médica Panamericana, 2014, pp. 158-338.
- [20] L. Espinosa Asuar, «Guía Práctica Sobre Las Técnica de PCR,» de *Las Herramientas Moleculares*, CDMX, 2022, pp. 517-523.
- [21] C. M. Roth, «Electroploresis,» 2005. [En línea]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123693977001308>. [Último acceso: 28 Octubre 2022].
- [22] J. Gonzales y R. Bueno Topete, «Capítulo 13: Enzimas de restricción,» *Access Medicina*, 2022. [En línea]. Available: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookId=1473§ionId=102743841#1118679708>. [Último acceso: 28 Octubre 2022].

[23] D. J. Orengo Ferriz, Fundamentos de Biología Molecular, Barcelona: Editorial UOC, 2013.

1.8. Anexos generales

Tabla A1. Cantidades para preparar un gel de poliacrilamida

Cantidad	Reactivo
30 mL	Poliacrilamida (29:1 acrilamida, bis acrilamida)
300 μ L	Persulfato de amonio (PSA)
30 μ L	TEMED (tetrametiletilendiamina).

Tabla A2. Cantidades para preparar un gel de agarosa

Cantidad	Reactivo
0.9	Agarosa
25 mL	Buffer TBE 1X
7 μ L	SYBR Green ^{MR}

Tabla A3. Cantidades para preparar el marcador (Ruler)

Cantidad	Reactivo
20 μ L	Concentrado de marcador
20 μ L	Jugo azul
60 μ L	Agua inyectable

Especificaciones	
Concentración	10 U/μl
Sensibilidad a la metilación	Es sensible a la metilación dam, no es sensible a la metilación CpG, no es sensible a la metilación dcm
Enzima	Taq I
Tampón compatible	Tampón único (10X tampones TaqI)
Sensible a la inactivación del calor	No
Temperatura óptima de reacción	65 °C
RE de tipo IIS	No
Cantidad	10 μg
Tipo de producto	Enzima de restricción
Categoría de investigación	Clonación tradicional

Figura A1. Especificaciones de enzima de restricción TaqI ThermoFisher



Figura A2. Secuencia de enzima de restricción TaqI ThermoFisher

2. Productos

Nombre y código del PAP	4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I
Nombre del proyecto	Asociación de Variantes en los Genes ABCG2 y SLC2A9 con Niveles de Ácido Úrico Sérico y Estrés Oxidativo en Pacientes Mexicanos con Enfermedad Renal Diabética en el CIBO, Guadalajara Jalisco.
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Se realizó un libro en Excel para la captura y análisis de frecuencias genotípicas y alélicas. Dentro de él, se capturarán los datos utilizando los códigos existentes de la división, así como los alelos y genotipos a identificar. Siguiendo los pasos de la guía que aparece en la hoja del mismo documento, se obtendrán de manera automática las frecuencias alélicas y genotípicas de las muestras analizadas.
Autores:	Mariana Fonseca Patiño

rs1143634			rs1143627			rs16944		
GENOTIPO	FRECUENCIA GENÓTIPICA		GENOTIPO	FRECUENCIA GENÓTIPICA		GENOTIPO	FRECUENCIA GENÓTIPICA	
T/T	1		C/C	104		T/T	107	
C/T	0		C/T	157		T/C	146	
C/C	27		T/T	40		C/C	76	
TOTAL	28		TOTAL	301		TOTAL	329	
ALELO	FRECUENCIA ALELICA		ALELO	FRECUENCIA ALELICA		ALELO	FRECUENCIA ALELICA	
T	2	3.57%	T	237	39.37%	T	360	54.71%
C	54	96.43%	C	365	60.63%	C	298	45.29%
TOTAL	56	100.00%	TOTAL	602	100.00%	TOTAL	658	100.00%
P	0.0357		P	0.6063		P	0.5471	
Q	0.9643		Q	0.3937		Q	0.4529	
Hardy-Weinberg			Hardy-Weinberg			Hardy-Weinberg		
P ²	0.0013	0	P ²	0.3676	111	P ²	0.2993	98
2PQ	0.0689	2	2PQ	0.4774	144	2PQ	0.4956	163
Q ²	0.9298	26	Q ²	0.1550	47	Q ²	0.2051	67
	Observada	Esperada		Observada	Esperada		Observada	Esperada
T/T	1	0	C/C	104	111	T/T	98	107
C/T	0	2	C/T	157	144	C/T	163	146
C/C	27	26	T/T	40	47	C/C	67	76

El enlace para el libro completo en Excel se presenta a continuación: [Producto Final PAP Otoño 2022.xlsx](#)

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

El Centro de Investigación en el cual desarrolle mi PAP es parte del IMSS, por ende, las muestras que nos proporcionaban eran de pacientes afiliados al Seguro Social. Gracias a ello, convivíamos con personas que padecían enfermedades genéticas, así como sus familiares. Este enfrentamiento con sus realidades despertó en mi gran tristeza y preocupación, ya que veía constantemente a bebés de pocos meses de vida ser diagnosticados con enfermedades genéticas que aún no tienen cura.

Por otra parte, me hizo reflexionar sobre mis propios familiares que reciben atención del Seguro Social, ya que pude ver otra perspectiva y entender el por qué existen tantas limitaciones en cuestión de medicamentos, equipos y recursos.

Adicionalmente pude comprender el potencial de la investigación de enfermedades genéticas, pues cada paso que se da nos lleva a conocer mejor el problema además e incluso una futura cura.

3.2 Aprendizajes logrados

Logré entender mucho mejor el funcionamiento y aplicación de las PCR convencionales, además tuve un ligero acercamiento con otras enfermedades como fibrosis quística, Parkinson y Alzheimer, debido a que en el Centro de Investigación se realizaban exposiciones semanales de parte de los investigadores de otras divisiones.

Considero que mi aprendizaje más grande sin duda fueron las PCR en tiempo real, ya que en el ITESO no contamos con el equipo necesario para realizarlas. Me percaté de que soy capaz de realizar mucho más de lo que consideraba en un inicio, pues con la práctica adecuada pude utilizar herramientas que consideraba sumamente complejas.

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

Competencia	Evidencia	Relevancia/Fortaleza	Competencias nuevas	Competencias potenciales
Conocimientos • Conocimientos del funcionamiento de equipos de laboratorio. • Fundamentos de reacción en cadena polimerasa (PCR) • Conocimientos	He trabajado de manera exitosa dentro del laboratorio manejando equipos como termocicladores, cámara de electroforesis, campana de flujo laminar, entre otros.	Comprenderé con mayor facilidad el funcionamiento de PCR en tiempo real Podré comprender el impacto del proyecto debido a estar adentrada a los padecimientos generales de la enfermedad	Aumenté mis conocimientos respecto a las PCR convencionales Aprendí a realizar PCR en tiempo real Aprendí a manejar nuevas herramientas como pipetas	Comprendí mejor el proceso para escribir un artículo científico. Tuve un ligero acercamiento con extracción de leucocitos en muestras de sangre para

	superficiales respecto a personas con insuficiencia renal	He realizado varias PCR y reportado mis conocimientos e interpretación en reportes de laboratorio. Asistí durante un año a un servicio social en preparatorio a una clínica conocida como Sanefro de insuficiencia renal.		multicanal o placas de 386 pocillos. Aprendí a realizar análisis generales de variantes genéticas y como interpretarlos.	obtención de ADN. Me acerqué un poco al mundo de la investigación, así como su importancia en la actualidad y la posibilidad de desarrollar como carrera profesional.
Habilidades	• Aprendizaje veloz en nuevas técnicas de laboratorio • Buena motricidad fina • Atención a los detalles	Logré aprender a utilizar micropipetas, realizar geles de agarosa e introducir muestras en él, de manera exitosa a las pocas clases. Debido a mi gusto por artes manuales, logré desarrollar un buen manejo de objetos pequeños o delicados, así como su estética y funcionamientos .	Podré adaptarme con facilidad a nuevas técnicas que se me presenten Tener buena precisión es increíblemente útil al introducir las muestras en los pocillos del gel en cámaras de electroforesis		
Actitudes	• Motivación por el aprendizaje y retroalimentación	Escucho constantemente las críticas constructivas de mis profesores y	Podre adaptar nuevas técnicas tomando en cuenta la retroalimentación		

	• Buena organización y responsabilidad • Paciencia para convivir y cuidar de adultos mayores	las recuerdo y aplico. He mantenido distintas actividades durante algunos semestres fuera del ITESO Cuido constantemente de mis abuelos	que se me proporcione Podre ser una buena adición al ambiente laboral Podre interactuar mejor con los pacientes mayores al realizar las entrevistas necesarias para la investigación		
--	---	--	---	--	--