

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



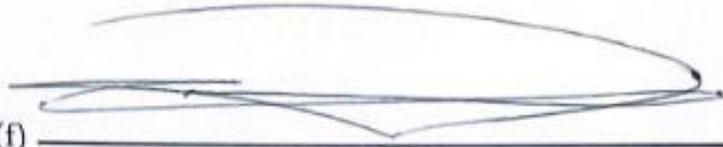
Evaluación de la relación genética entre la dislexia y las enfermedades neurodegenerativas, y propuesta de terapia génica *in silico* para el tratamiento de la dislexia

Trabajo de graduación presentado por Diego Andrés Medina Mencos para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Biomédica

Guatemala,

2024

Vo.Bo.:


(f) _____
Ph. D. Diego Archila

Tribunal Examinador:


(f) _____
Ph. D. Diego Archila


(f) _____
Ph. D. Mónica Echeverry


(f) _____
Ph. D. Andrea del Valle

Fecha de aprobación: Guatemala, 13 de enero de 2024.

El funcionamiento del cuerpo humano y el tratamiento de enfermedades son áreas que me han llamado la atención desde muy pequeño. Al poder aplicar los conocimientos de ingeniería para contribuir a la salud de las personas, me interesa poder encontrar soluciones desde el área genética y celular. Esto, combinado con experiencias personales relacionadas a dificultades específicas del aprendizaje (DEA), permitieron que surgiera el presente estudio. El objetivo principal siempre fue y ha sido aumentar el conocimiento acerca de dislexia en Guatemala.

Antes que nada, quiero agradecer a mi familia. A mi mamá y a mi papá, por apoyarme incondicionalmente y por todo el amor y cariño que siempre me han dado. Sobre todo, porque gracias a ellos soy la persona que soy el día de hoy, porque gracias a todo lo que me han enseñado he llegado a donde estoy. Agradezco a mis hermanos, Rodrigo y Emilio, por todas las experiencias vividas que me han ayudado a buscar ser una mejor persona. A mis abuelos y el resto de mi familia, por todo el amor que me dan y por marcar mi vida de la manera más linda. Este trabajo es para todos ustedes.

Quiero agradecerle especialmente a mi novia, María, porque sin ella este trabajo no sería posible. Gracias por siempre apoyarme, motivarme e inspirarme. En especial, gracias por revisar el trabajo y por corregirlo para que fuera lo mejor posible. No lo hubiera logrado sin ti. También, a mis mejores amigos, porque su amistad ha marcado significativamente mis años en la universidad y porque son personas espectaculares; ha sido todo un placer compartir tantas experiencias con ustedes.

Agradezco a la Universidad del Valle por todo el apoyo brindado. Al Ph. D. Diego Archila por ser mi asesor y por compartir conmigo todo su conocimiento, pero más que nada, por siempre inspirarme. Al Ing. Esquit y a todo el departamento de Ingeniería Electrónica, Mecatrónica y Biomédica por su contribución en todo el proceso del estudio. Al departamento de Bioquímica, por su apoyo para utilizar los laboratorios y por los reactivos brindados, sin ustedes no hubiera sido posible. Una mención especial a José Leal por siempre estar al pendiente del estudio.

Prefacio	III
Lista de figuras	VII
Lista de cuadros	VIII
Resumen	IX
<i>Abstract</i>	X
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
3. Justificación	4
4. Objetivos	7
5. Alcance	9
6. Marco teórico	10
6.1. Dificultades específicas del aprendizaje	10
6.2. Dislexia	10
7. Metodología	11
7.1. Estudio genético piloto para la optimización de la amplificación gen <i>SNCA</i> , para ser aplicado en los genes <i>APP</i> y <i>HTT</i>	11
7.1.1. Diseño de <i>primers</i> de los genes <i>APP</i> , <i>SNCA</i> y <i>HTT</i>	11
7.1.2. Validación de <i>primers in silico</i>	12
7.1.3. Obtención de las muestras de saliva	12
7.1.4. Optimización de extracción de ADN	13
7.1.5. Medición de la concentración de ADN extraído	14
7.1.6. Gel de integridad de extracciones de ADN	15
7.1.7. Optimización de ensayos PCR	15

7.2. Administración de datos	18
7.2.1. Recolección de datos	18
7.2.2. Manejo de la información	18
7.3. Consideraciones éticas: reclutamiento y consentimiento informado	18
7.4. Propuesta de ensayos preclínicos <i>in silico</i> para edición génica del gen de	
susceptibilidad de dislexia <i>KIAA0319</i>	19
7.4.1. Generación de guías de ARN	19
7.4.2. Construcción de plásmido recombinante LentiCRISPRAAVS1 v2	20
7.4.3. Construcción de plásmido recombinante pAAVS1-DNR-KIAA0319	21
8. Resultados	22
8.1. Estudio genético piloto para la optimización de la amplificación gen <i>SNCA</i> ,	
para ser aplicado en los genes <i>APP</i> y <i>HTT</i>	22
8.1.1. Diseño de <i>primers</i> para amplificación de los genes <i>SNCA</i> , <i>APP</i> y <i>HTT</i>	22
8.1.2. Optimización de extracción de ADN	23
8.1.3. Optimización de amplificación del gen <i>SNCA</i>	25
8.1.4. Recomendación de pasos siguientes para la continuación del estudio	
genético	30
8.2. Propuesta de ensayos preclínicos <i>in silico</i> para edición génica del gen de	
susceptibilidad de dislexia <i>KIAA0319</i>	31
8.2.1. Guías de ARN	31
8.2.2. Plásmido LentiCRISPRAAVS1 v2	32
8.2.3. Plásmido pAAVS1-DNR-KIAA0319	33
9. Discusión	35
9.1. Estudio genético piloto para la optimización de la amplificación gen <i>SNCA</i> ,	
para ser aplicado en los genes <i>APP</i> y <i>HTT</i>	35
9.2. Propuesta de terapia génica <i>in silico</i> para tratamiento de dislexia	38
10. Procedimiento detallado de pasos futuros para aprobación de terapia gé-	
 nica para tratamiento de dislexia	40
10.1. Experimentación <i>in vitro</i>	40
10.2. Resultados esperados de experimentación <i>in vitro</i>	42
10.3. Estrategias para futuras investigaciones	43
10.3.1. Estudios preclínicos	43
10.3.2. Ensayos clínicos	44
11. Conclusiones	45
12. Recomendaciones	47
13. Referencias	48
14. Anexos	53
14.1. Figuras complementarias de estudio genético piloto para la optimización de	
la amplificación gen <i>SNCA</i> , para ser aplicado en los genes <i>APP</i> y <i>HTT</i>	53
14.2. Figuras complementarias de propuesta de terapia génica <i>in silico</i> para trata-	
miento de dislexia	59
14.3. Documentos de bioética	68

Lista de figuras

1. <i>Gel de integridad de extracción de ADN a partir de muestras de saliva de pacientes con dislexia.</i>	24
2. <i>Amplificación de los genes APP, SNCA y HTT.</i>	25
3. <i>Modificación en la amplificación de los genes APP, SNCA y HTT.</i>	26
4. <i>Amplificación del gen SNCA.</i>	27
5. <i>Modificación de la amplificación del gen SNCA.</i>	28
6. <i>Gel de integridad y amplificación del gen SNCA, a partir de muestras de saliva y sangre del estudiante Diego Medina.</i>	29
7. <i>Cuantificación de segmentos en ensayos PCR.</i>	30
8. <i>Plásmido base LentiCRISPR v2.</i>	32
9. <i>Plásmido recombinante LentiCRISPRAVVS1 v2.</i>	33
10. <i>Plásmido base pAAVS1-P-MCS</i>	34
11. <i>Plásmido recombinante pAAVS1-DNR-KIAA0319</i>	34
12. <i>Plásmidos recombinantes en la plataforma Addgene.</i>	41
13. <i>Imagen de referencia de los resultados esperados de un ensayo Western Blot (Jujo et al., 2014).</i>	43
14. <i>Configuración de la herramienta UCSC In-Silico PCR</i>	53
15. <i>PCR in silico del gen APP</i>	54
16. <i>PCR in silico del gen SNCA</i>	54
17. <i>PCR in silico del gen HTT</i>	55
18. <i>Curva estándar de peso molecular a partir de gel de electroforesis como resultado del primer ensayo PCR</i>	56
19. <i>Curva estándar de peso molecular a partir de gel de electroforesis como resultado del segundo ensayo PCR.</i>	57
20. <i>Curva estándar de peso molecular a partir de gel de electroforesis como resultado del tercer ensayo PCR.</i>	58
21. <i>Curva estándar de peso molecular a partir de gel de electroforesis como resultado del quinto ensayo PCR</i>	59
22. <i>Parámetros de guías de ARN en la herramienta CRISPick.</i>	60
23. <i>Ingreso de la secuencia de ADN del sitio AAVS1 en la herramienta CRISPick.</i>	60
24. <i>Validación de la secuencia introducida en la herramienta CRISPick.</i>	60

25. <i>Obtención de resultados obtenidos en la herramienta CRISPick.</i>	61
26. <i>Datos importantes de resultados obtenidos en la herramienta CRISPick.</i> . .	61
27. <i>Selección de opción para generar guías de ARN en la herramienta Benchling.</i>	61
28. <i>Introducción de secuencia de ADN del sitio AAVS1 en la herramienta Ben-</i> <i>chling.</i>	62
29. <i>Parámetros de guías de ADN en la herramienta Benchling.</i>	62
30. <i>Región objetivo de guías de ADN en la herramienta Benchling.</i>	62
31. <i>Búsqueda de la secuencia del plásmido LentiCRISPR v2.</i>	63
32. <i>Análisis de la secuencia del plásmido LentiCRISPR v2.</i>	63
33. <i>Definición de sitios de restricción en la secuencia del plásmido LentiCRISPR</i> <i>v2.</i>	64
34. <i>Análisis de la secuencia completa del plásmido LentiCRISPR v2.</i>	64
35. <i>Obtención de la secuencia del plásmido LentiCRISPR v2.</i>	64
36. <i>Obtención de secuencias de segmentos importantes en el plásmido Lenti-</i> <i>CRISPR v2.</i>	65
37. <i>Búsqueda de secuencias de segmentos importantes en el plásmido LentiCRISPR</i> <i>v2 en ApE.</i>	65
38. <i>Creación de nuevo segmento en la secuencia del plásmido LentiCRISPR v2</i> <i>en ApE.</i>	66
39. <i>Identificación de segmentos importantes en el plásmido LentiCRISPR v2 en</i> <i>ApE.</i>	66
40. <i>Inserción del ARN guía en el plásmido LentiCRISPR v2.</i>	66
41. <i>Ubicación del sitio Safe Harbor AAVS1.</i>	66
42. <i>Secuencia con etiqueta TSL:1 en el software Ensembl.</i>	67
43. <i>Enzimas de restricción definidas del plásmido pAAVS1-P-MCS.</i>	67
44. <i>Comprobación de ausencia de sitios de corte en la secuencia del gen KIAA0319.</i>	67
45. <i>Identificación de segmentos importantes del plásmido pAAVS1-P-MCS.</i> . . .	68
46. <i>Inserción del gen KIAA0319 en el plásmido pAAVS1-P-MCS.</i>	68

Lista de cuadros

1. <i>Matriz para la recolección de datos de las guías de ARN generadas.</i>	19
2. <i>Primers diseñados para amplificación de genes APP, SNCA y HTT.</i>	23
3. <i>Concentración y pureza del ADN extraído a partir de las muestras de saliva de pacientes con dislexia.</i>	23
4. <i>Concentración y pureza del ADN extraído a partir de las muestras de saliva y sangre del estudiante Diego Medina.</i>	24
5. <i>Volúmenes de reactivos utilizados en la amplificación de los genes APP, HTT y SNCA.</i>	26
6. <i>Volúmenes modificados de reactivos utilizados en la amplificación de los genes APP, HTT y SNCA.</i>	27
7. <i>Volúmenes modificados de reactivos utilizados en la amplificación del gen SNCA.</i>	28
8. <i>Secuencias guía de ARN resultantes del software CRISPick.</i>	31
9. <i>Secuencias guía de ARN resultantes del software Benchling.</i>	32
10. <i>Construcción de curva estándar y cuantificación de pesos moleculares del primer ensayo PCR.</i>	56
11. <i>Construcción de curva estándar y cuantificación de pesos moleculares del segundo ensayo PCR.</i>	57
12. <i>Construcción de curva estándar y cuantificación de pesos moleculares del tercer ensayo PCR.</i>	58
13. <i>Construcción de curva estándar y cuantificación de pesos moleculares del quinto ensayo PCR.</i>	59

La dislexia es un trastorno neuronal caracterizado por la deficiencia en el desarrollo de la lectura, escritura y habla. Actualmente, es el desorden de aprendizaje más estudiado alrededor del mundo, ya que afecta aproximadamente a 1 de cada 10 personas. Por otro lado, las enfermedades neurodegenerativas son cada vez más comunes a nivel mundial, siendo el Alzheimer y el Parkinson las más recurrentes. Se ha establecido que pacientes que desarrollan algún tipo de demencia tienen alta probabilidad de desarrollar dislexia. Dicha relación se establece debido a que en ambos casos se ven afectadas las células neuronales del sistema nervioso central. Al inicio del estudio, se hipotetizaba que era factible plantear una relación entre el desarrollo a temprana edad de la dislexia y la manifestación futura de enfermedades neurodegenerativas. Para comprobar lo anterior, se llevó a cabo un estudio genético en el que se buscaba amplificar los genes *APP* (Alzheimer), *HTT* (Huntington) y *SNCA* (Parkinson) del genoma de pacientes con dislexia. Se diseñaron los *primers* Forward y Reverse para estos tres genes. Sin embargo, debido a inconvenientes con las muestras de ADN y con los protocolos utilizados, en el presente estudio, solamente se realizó la optimización de los protocolos para la amplificación del gen *SNCA* (Parkinson), para que en futuras investigaciones puedan concretarse los objetivos planteados.

La terapia génica consiste en el reemplazo de genes que provocan cierta enfermedad. Se ha utilizado en múltiples aplicaciones debido a sus efectos a largo plazo, incluso llegando a curar a los pacientes. Dado lo anterior y a que actualmente no existe un tratamiento concreto para dislexia, en el presente estudio se diseñó una propuesta de terapia génica *in silico* para tratar este trastorno. Para esto, se utilizaron las bases de ingeniería genética para la inserción del gen *KIAA0319*, el cual es asociado a susceptibilidad para desarrollar dislexia, mediante la tecnología CRISPR/Cas9. Se detalló todo el procedimiento necesario para la implementación de la estrategia planteada, los resultados esperados y los pasos posteriores para futuras investigaciones. Es importante notar que antes de llevar dicha propuesta de terapia a la fase experimental, es necesario determinar que existe una relación genética entre la dislexia y las enfermedades neurodegenerativas mencionadas. La terapia génica propuesta no es un producto terminado, sino el inicio de un campo no estudiado en Guatemala y el mundo. Por lo tanto, en el presente trabajo, solamente se establecen los posibles pasos a seguir; sin embargo, su aplicación sería un tema de investigación y requeriría un análisis más profundo.

Dyslexia is a neural disorder characterized by a deficiency in reading, writing and speaking development. Currently, it is the learning disorder most widely studied worldwide, affecting approximately 1 in 10 people. On the other hand, neurodegenerative diseases are becoming more and more common around the world, being Alzheimer and Parkinson's Disease the most recurring. It has been established that patients who develop any type of dementia have high probability of developing dyslexia. That relation could be explained because in both cases neuronal cells from the central nervous system are affected. At the beginning of this study, it was hypothesized that it is feasible to suggest a relation between the development of dyslexia at an early age and the future manifestation of neurodegenerative diseases. In order to verify this, a genetic study was carried out, in which the genes *APP* (Alzheimer's), *HTT* (Huntington's Disease's), and *SNCA* (Parkinson's Disease's) were aimed to be amplified and sequenced from the genome of patients with dyslexia. Primers Forward and Reverse were designed for these three genes. However, due to problems with the DNA samples and the protocols used, in the present study, it was only feasible to optimize the protocols for the amplification of the *SNCA* (Parkinson's) gene, so that in future research the proposed objectives can be achieved.

Genetic therapy consists in the replacement of genes that cause a certain disease and has been utilized in multiple applications due to its long term effects, even curing patients completely. Given the above, and given that currently there is no concrete treatment for dyslexia, the present study seeks to design a proposal of genetic therapy *in silico* for the treatment of this disorder. For this purpose, the genetic engineering concepts will be used to do the insertion of the gene *KIAA0319*, that has been associated to susceptibility to development of dyslexia, by means of CRISPR/Cas9 technology. All the necessary procedure for the implementation of the strategy proposed, the possible results and the posterior steps for future investigation will be detailed in this work. It is important to note that before taking this therapy proposal to the experimental phase, it is necessary to determine that there is, in fact, a genetic relationship between dyslexia and the aforementioned neurodegenerative diseases. The proposed gene therapy is not a finished product, but rather the beginning of a field not studied in Guatemala and in the world. Therefore, this work only establishes the possible steps to follow; however, its application would be a topic of research and would require a more in-depth analysis.

Dislexia es una dificultad del aprendizaje que afecta el desarrollo del lenguaje hablado, escrito y fonológico. Diversos estudios han identificado genes, que se han relacionado con susceptibilidad para la aparición de este trastorno. Por otro lado, las enfermedades neurodegenerativas son condiciones en las que los pacientes presentan muerte en las células cerebrales, lo que provoca que manifiesten dificultades cognitivas, de movimiento y lenguaje. Se ha determinado que pacientes diagnosticados con algunas enfermedades neurodegenerativas, también pueden desarrollar dislexia. Sin embargo, no existe, en la literatura, una manifestación de enfermedades neurodegenerativas posterior a la aparición de dislexia.

Dado lo anterior, en el presente estudio se identificó que tanto dislexia, como enfermedades neurodegenerativas, han sido vinculadas con causas genéticas. De la misma manera, en ambos casos las células afectadas son las neuronas en el sistema nervioso central. Por tal razón, se hipotetiza que podría existir una relación genética entre dislexia y las enfermedades neurodegenerativas mencionadas. Para esto, se diseñaron los primers *in silico* para la amplificación de los genes *APP*, *SNCA* y *HTT*. El presente trabajo se enfocó en la optimización de la amplificación del gen *SNCA* (Parkinson). Cabe recalcar que el estudio no es concluyente y que, si alguien quisiera continuar con el estudio, es necesario afinar la concentración de reactivos y protocolos de amplificación.

Además, se busca proponer una estrategia innovadora para el tratamiento de dislexia desde la perspectiva genética. Para esto, se plantea una idea de terapia génica *in silico* para realizar la inserción del gen *KIAA0319* en el genoma de estos pacientes. Sin embargo, en esta sección, solamente se menciona una propuesta, no una terapia completamente formulada. Adicionalmente, se detalla todo el proceso recomendado para escalar la terapia propuesta, incluyendo los experimentos que se deberían realizar, los resultados que se podrían esperar y las consideraciones bioéticas a tomar en cuenta. Dichos pasos son circunstanciales y recomendaciones, pero es necesario un análisis más profundo si se desea llevar la propuesta a una fase experimental.

Dislexia es un trastorno neuronal, que se presenta tanto en niños como en adultos, caracterizado por la deficiencia en el desarrollo del lenguaje, es decir, dificultades en la lectura, escritura y habla (Haywitz, 1998). Alrededor del mundo, aproximadamente 1 de cada 10 personas sufren de este trastorno. De la misma manera, se estima que entre 1 de cada 5 de los estudiantes tienen una dificultad de aprendizaje relacionada al lenguaje, siendo dislexia la más común (Wagner et al., 2020). Además de esto, diversos estudios han comprobado que esta enfermedad es hereditaria, por lo que los hijos de padres que sufren de este trastorno tienen alta posibilidad de presentarla también (Haywitz, 1998). Diversos estudios han relacionado la susceptibilidad de presentar dislexia con mutaciones en los genes *KIAA0319* y *DCDC2* (Schumacher et al., 2007; Newbury et al., 2011). Así mismo, también se han reportado los genes *DYX1C1* y *ROBO1* (Nopola-Hemmi et al., 2000).

En Guatemala, lastimosamente, no existen estadísticas de la cantidad de personas con dislexia y los centros educativos no están capacitados para la enseñanza a niños que presentan dislexia o alguna dificultad de aprendizaje (Escobar, 2019). Por tal razón, existen diversas instituciones privadas cuyos esfuerzos se centran en resolver las deficiencias en la educación especializada que necesitan estos estudiantes. Es importante tomar en cuenta que en Guatemala los niños se ven afectados por diversos factores como la salud, nutrición, escolaridad y nivel de vida, tanto económico como social, los cuales han sido relacionados al deterioro de funciones cognitivas (Yount et al., 2009).

Globalmente, las enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson y Demencia Frontotemporal, entre otras, son cada vez más recurrentes. Según las estadísticas se estima que para 2050, 1 de cada 6 personas en el mundo será mayor a los 65 años, lo que implica que la población mundial está envejeciendo a una tasa rápida (Zheng y Chen, 2022). Esto se traduce en un incremento proporcional en el riesgo a sufrir una enfermedad neurodegenerativa. De igual manera, se estima que para 2050, aproximadamente 36.7 millones de personas alrededor del planeta desarrollarán demencia, convirtiendo a esta enfermedad en un tema de alta preocupación.

Desafortunadamente, en Guatemala tampoco existen estadísticas acerca de la recurrencia de desórdenes neurodegenerativos en la población, por lo que es difícil conocer la situación actual en el país.

Se ha establecido previamente que los pacientes con demencia frontotemporal, que poseen genes de susceptibilidad a la dislexia, presentan un déficit de lenguaje conforme su enfermedad progresa (Paternicó et al., 2015). Sin embargo, no existen estudios que relacionen directamente este trastorno de aprendizaje, en edades tempranas, con el desarrollo de algún desorden neurodegenerativo en etapas posteriores.

En los últimos años, la ingeniería genética ha sido un pilar importante para el desarrollo de nuevas terapias que buscan tratar diversas enfermedades. Enfermedades cardiovasculares (Ylä-Herttuala y Martin, 2000), ceguera (Sahel y Roska, 2013), cáncer (Culver y Blaese, 1994) y desórdenes neurológicos (Simonato et al., 2013) son algunas de las enfermedades en las que se han realizado estudios utilizando este método. No obstante, ningún estudio ha buscado generar una terapia génica para el tratamiento de pacientes con dislexia. El desarrollo *in silico* de una terapia génica sería el primer paso para demostrar que ésta es factible y confiable, de acuerdo a las normas bioéticas, para posteriormente realizar experimentaciones en líneas celulares, animales y humanos (Roy et al., 2017). Por tal razón, en este trabajo se plantea la propuesta para un estudio exploratorio de fase preclínica para el tratamiento de dislexia. Sin embargo, no es una terapia establecida y si desea llevarse a fases experimentales, es necesario realizar un análisis más profundo.

Las enfermedades neurodegenerativas son cada vez más comunes a nivel mundial. Aproximadamente, 10 millones de personas se ven afectadas por Parkinson (Delamarre y Meissner, [2017](#)) y 697 de cada 10,000 personas sufren algún tipo de demencia (Cao et al., [2020](#)). Lastimosamente, no existe una cura para estos trastornos, por lo que los pacientes inevitablemente desarrollan y manifiestan degeneración cognitiva, e incluso física, de forma progresiva. Por lo tanto, estas enfermedades provocan la muerte de millones de personas cada año, teniendo un impacto significativo en el bienestar de los pacientes y familiares, así como en el sistema de salud y la sociedad. (Peplow et al., [2022](#)). Aunque estas enfermedades son ampliamente conocidas y estudiadas, aún no se han determinado con exactitud sus causas.

El diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas usualmente se realiza hasta que los síntomas aparecen, es decir, hasta 20 años después de que se presenten los primeros cambios patológicos en el cerebro (Zheng y Chen, [2022](#)). Cuando los pacientes son diagnosticados, usualmente es demasiado tarde para proporcionar tratamiento y prevenir la progresión de la enfermedad, ya que pueden encontrarse en una etapa avanzada de la degeneración. En Guatemala, adicionalmente a esto, se debe tomar en consideración que las personas, especialmente los niños, se ven expuestos a factores que pueden afectar sus funciones cognitivas. Enfermedades resultantes de una mala nutrición (Cicconetti et al., [2004](#)), pobreza infantil y baja escolaridad pueden aumentar el riesgo de desarrollo de enfermedades neurodegenerativas a edades avanzadas (Yount et al., [2009](#)).

Actualmente, algunas de las técnicas de diagnóstico de estas enfermedades neuronales se basan en criterios clínicos, distintas modalidades de imágenes médicas (Hayden et al., [1986](#); Poewe et al., [2017](#); Petrella et al., [2003](#)) y biomarcadores (Irwin et al., [2020](#)). Sin embargo, dependen de cambios fisiológicos o patológicos para poder ser utilizados. Diversos estudios han establecido que la identificación e intervención temprana, contribuye a que los pacientes tengan una progresión más lenta, mejor esperanza de vida, menor impacto en la familia y un menor costo económico (Leifer, [2003](#); Senturk, [2020](#)). Por ello, es de suma importancia crear métodos que permitan la detección temprana de estas enfermedades para iniciar su

tratamiento anticipadamente y así controlar y ralentizar su progresión.

Algunos estudios muestran que pacientes con Alzheimer desarrollan dislexia fonológica (Vliet et al., 2004) y dislexia superficial como consecuencia a la enfermedad (Coslett y Turkeltaub, 2016). Así mismo, estudios han relacionado el desarrollo de un déficit de lenguaje, resultado de dislexia, en pacientes que tienen Demencia Frontotemporal (Paternicó et al., 2015). Sin embargo, no existen estudios que establezcan que personas que presentan dislexia a temprana edad sean propensos a desarrollar trastornos cognitivos a largo plazo. Sin embargo, la dislexia y las enfermedades neurodegenerativas cuentan con dos similitudes. En primer lugar, ambas se presentan como alteraciones en los circuitos neuronales y en segundo lugar, ambas poseen factores genéticos que incrementan la propensidad de las personas a padecerlas. Por ello, la hipótesis de una relación entre el desarrollo a temprana edad de dislexia y la manifestación futura de otras enfermedades neurodegenerativas es factible, pero necesita estudiarse para generar una conclusión.

Los niños, en el rango de edad entre 6 y 12 años, poseen la capacidad para razonar lógicamente y muestran pensamiento operacional concreto (Duque et al., 2008). Por lo que, no deberían presentar dificultades de aprendizaje relacionados a lectura, escritura o cálculo. Por lo tanto, en esta edad se presentan las fases tempranas de la identificación de dislexia. Esto significa que el cerebro de los niños con dislexia ya presenta alteraciones medibles, las cuales, de tener alguna relación con enfermedades neurodegenerativas, podrían abrir la puerta al diagnóstico temprano en estas personas. Esto representa una nueva perspectiva en la prevención, manejo y detección de estas enfermedades.

Antes de realizar una relación concluyente entre dislexia y las enfermedades neurodegenerativas mencionadas, es necesario llevar a cabo un estudio profundo. En el presente estudio, se llevó a cabo un piloto para la optimización de la amplificación del gen *SNCA*. Aún es necesario afinar los protocolos utilizados para asegurar la correcta amplificación de este gen y de los otros genes que se deseaban estudiar. Una vez se logre lo anterior, se puede proceder a realizar la amplificación y secuenciación de los genes *APP*, *HTT* y *SNCA* en pacientes sanos para determinar la eficiencia del protocolo. Esto permitiría llevar a cabo los procedimientos en muestras de pacientes con dislexia. De esta manera, se podría ir avanzando el estudio para comprobar la hipótesis planteada, pero es importante completar cada paso.

Diversos estudios han buscado identificar genes que estén directamente vinculados al desarrollo de dislexia (Pennington et al., 1991; Fagerheim et al., 1999; Mueller et al., 2014; Centanni et al., 2016). No se ha logrado establecer un gen específico que provoque este trastorno, pero sí se han identificado genes de susceptibilidad. Por tal razón, al crear una terapia génica que busque modificar los genes de susceptibilidad mutados, podría representar una manera de estudiar a mayor profundidad la genética de la enfermedad e, incluso, ser un tratamiento para estos pacientes.

La terapia génica consiste en el reemplazo o inactivación de genes que provocan cierta enfermedad, lo que permite curarla desde su origen genético. Estas terapias resultan ser beneficiosas debido a que sus efectos son a largo plazo, incluso llegando a curar a los pacientes. El avance de la ingeniería genética ha permitido la mejora de vectores y de los métodos utilizados, dando como resultado que esta técnica sea cada vez más precisa (Naldini, 2015). Sin embargo, el éxito también depende del conocimiento de la bioquímica y fisiología que se

tenga de las células que se buscan tratar. Aplicaciones en células hematopoyéticas (Naldini, 2011), hígado (Mingozzi y High, 2011) y cáncer (Rosenberg y Restifo, 2015), entre otras, han tenido resultados prometedores. Consecuentemente, la creación de una terapia génica que busque modificar los genes que han sido asociados a dislexia sería una opción viable para el tratamiento de este trastorno. Para esto, se debe tener en cuenta que existen limitaciones debido a las consideraciones bioéticas, por lo que, es necesario cumplir con cada etapa del proceso asegurando que sea seguro y confiable.

La propuesta *in silico* de este método sería solamente el primer paso. No obstante, el hecho de que no se haya realizado con anterioridad representa una oportunidad innovadora para el tratamiento de dislexia. En Guatemala, la ingeniería biomédica, especialmente en la rama de ingeniería genética y de tejidos, aún se encuentra en fases iniciales. Debido a esto, la propuesta de un modelo *in silico* para tratamiento génico de enfermedades es novedoso y permite sentar las bases para futuros proyectos. Sin embargo, si se desea llevar la propuesta generada a fases experimentales, es necesario realizar un mejor análisis e investigación de los pasos y procedimientos que se deberían llevar a cabo. El proceso detallado en el primer estudio representa solamente una guía general con recomendaciones, no un listado definitivo de lo que se debe realizar.

Primer objetivo general

Generar una estrategia inicial que permita evaluar la existencia de una relación a nivel genético en genes que han sido relacionados con enfermedades neurológicas, en el genoma de pacientes con dislexia, basada en secuenciación de los mismos por medio de ensayos PCR.

Objetivos específicos

- Reclutar sujetos de prueba, obtener y manejar muestras de saliva para la extracción de ADN, siguiendo las normas bioéticas correspondientes en cada etapa de la investigación.
- Diseñar *primers* que permitan llevar a cabo la amplificación de los genes *APP*, *HTT* y *SNCA*.
- Ejecutar un estudio piloto para la optimización de la amplificación del gen *SNCA*, afinando la concentración de reactivos y protocolos de los ensayos PCR.

Segundo objetivo general

Diseñar una propuesta de fase preclínica de terapia génica *in silico* para el tratamiento teórico del trastorno de dislexia desarrollada, mediante el método CRISPR/Cas9.

Objetivos específicos

- Generar y validar una secuencia guía de ARN, para realizar la inserción del gen *KIAA0319*, empleando las herramientas de Broad Institute GPP y Benchling.

- Proponer el proceso de inserción de la secuencia guía de ARN en el plásmido Lenti-CRISPR v2.
- Construir *in silico* un plásmido que contenga el gen *KIAA0319*.
- Proponer la metodología detallada del procedimiento a realizar para la inserción hipotética del gen *KIAA0319*, así como los resultados esperados y las estrategias siguientes para futuras investigaciones.

El presente trabajo consiste en un piloto para poder desarrollar un estudio genético que evalúe si existe una relación entre el trastorno de dislexia y una manifestación futura de enfermedades neurodegenerativas. Este diseño de un estudio piloto permite establecer las bases para futuras investigaciones genéticas más profundas para aumentar el conocimiento de dislexia en Guatemala y en el mundo. Es de suma importancia recalcar que los resultados obtenidos servirán solamente como referencia, no son resultados concluyentes. Es decir, es necesario optimizar primero la amplificación del gen *SNCA*, para luego optimizar los genes de interés *APP* y *HTT*, que es lo que se buscaba en el presente estudio. Una vez realizado lo anterior, se puede proceder a la secuenciación de dichos genes en pacientes sanos y, luego, en pacientes con dislexia para la evaluación de la relación a nivel genético.

Así mismo, en el presente trabajo se plantea una propuesta de fase preclínica de una terapia génica *in silico* para el tratamiento de dislexia. Para esto, se utiliza el método CRISPR/Cas9 (siglas en inglés de Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas Regularmente Espaciadas) como base para proponer la inserción hipotética del gen *KIAA0319* en el genoma de pacientes diagnosticados con este trastorno. Aunque la propuesta es puramente teórica, representa una buena base para generar un tratamiento innovador para dislexia. Además, se facilita el escalamiento del proyecto, ya que se detalla el procedimiento que se recomienda seguir para los futuros experimentos necesarios. Sin embargo, es importante recalcar que ésta es solamente una propuesta y que la metodología planteada es una guía general, basada en recomendaciones. Si se desea llevar a cabo las fases experimentales de dicha propuesta, es necesario realizar una investigación y análisis profundo.

6.1. Dificultades específicas del aprendizaje

Las Dificultades específicas del aprendizaje (DEA), son un conjunto de alteraciones que se manifiestan como problemas en las habilidades de habla, lectura, escucha, escritura, razonamiento o matemáticas (Jiménez et al., 2009). Éstas se deben a una disfunción cerebral y pueden presentarse a lo largo del ciclo vital del individuo. Entre las DEA se pueden encontrar la dislexia, afasia, disfunciones cerebrales mínimas, dificultades perceptuales y lesiones cerebrales (Páez et al., 2013).

6.2. Dislexia

La dislexia es la Dificultad específica del aprendizaje (DEA) más ampliamente estudiada y la que presentan la mayoría de los pacientes con problemas de aprendizaje. Se estima que la dislexia afecta a aproximadamente entre 5 y 17.5% de los niños que tienen un trastorno neuroconductual (Haywitz, 1998). Actualmente, hay un consenso entre investigadores, que establece que la dificultad central en dislexia es producto de una deficiencia del módulo fonológico, relacionado en el procesamiento de sonidos (Haywitz, 1998; Siegel, 2006). Sin embargo, hay diferentes clasificaciones de este trastorno dependiendo de su origen y de los rasgos característicos que presentan los pacientes.

Algunas de las dificultades cognitivas resultantes de dislexia están relacionadas a la memoria del lenguaje, reconocimiento de sonidos del lenguaje y aprendizaje de la fonología de las letras y palabras. Consecuentemente, se ve reflejado en problemas de lectura (rasgo más conocido), escritura y déficit fonológico (Siegel, 2006). Lo anterior es producto de una disfunción de la red del lenguaje, en el hemisferio izquierdo del cerebro, lo que implica un desarrollo anormal de materia blanca, así como, una disminución del lóbulo anterior del cerebelo derecho (Figura ?? 

7.1. Estudio genético piloto para la optimización de la amplificación gen *SNCA*, para ser aplicado en los genes *APP* y *HTT*

7.1.1. Diseño de *primers* de los genes *APP*, *SNCA* y *HTT*

El diseño de los oligonucleótidos “Forward” y “Reverse” para los genes *APP* (Alzheimer), *HTT* (Huntington) y *SNCA* (Parkinson), fue realizado utilizando la metodología aprendida en múltiples cursos de la Universidad del Valle de Guatemala. Se buscaron las secuencias de los genes utilizados para el estudio en las plataformas Ensembl (Instituto Europeo de Bioinformática) y NIH (National Center for Biotechnology Information). Para cada gen se identificó la región codificante de la proteína asociada. Se determinaron secuencias de una longitud entre 18 a 28 pb que representaran oligonucleótidos potenciales cercanos a la región codificante, tanto anteriores (Forward) como posteriores (Reverse). Se calcularon los parámetros % GC utilizando la siguiente fórmula:

$$\%GC = \frac{C + G}{Lt} \quad (1)$$

C es igual a la cantidad de citocinas en la secuencia; G , a la cantidad de guaninas en la secuencia; y Lt , a la longitud total de la secuencia.

La temperatura de desnaturalización (T_m) se calculó mediante la fórmula descrita a continuación:

$$Tm = 64.9 + \frac{41 * (G + C - 16.4)}{Lt} \quad (2)$$

Se calculó la temperatura de anillamiento por medio de la fórmula siguiente:

$$Ta = Tm + / - 5 \quad (3)$$

Las secuencias óptimas fueron trasladadas a la plataforma ThermoFisher Scientific [\[1\]](#), buscando “multiple primer analysis” en la barra de búsqueda. Se validaron los parámetros calculados anteriormente y se determinó que no existían estructuras secundarias que pudieran afectar. Las secuencias óptimas también fueron validadas en la herramienta OligoAnalyzer Tool (Integrated DNA Technologies: [\[2\]](#)). Se escogieron los oligos con las mejores propiedades para el estudio y se mandaron a pedir a la empresa MacroGen (Humanizing Genomics [\[3\]](#)).

7.1.2. Validación de *primers in silico*

Se realizó un ensayo PCR *in silico* para validar los primers diseñados. Para esto, se utilizó el *software* UCSC In-Silico PCR (University of California Santa Cruz, USA). En la parte superior de la herramienta, se seleccionó la opción de genoma humano (Figura [\[14\]](#)). Luego, se escogió la opción “Dec. 2013 GRCh38/hg38” en la sección “Assembly”. En el apartado del objetivo a amplificar, se seleccionó la opción “GENCODE Genes”. Por último, se introdujeron las secuencias de los *primers* Forward y Reverse diseñados para cada gen (Figura [\[14\]](#)).

7.1.3. Obtención de las muestras de saliva

La recolección de muestras de saliva se realizó siguiendo el procedimiento planteado por (Küchler et al., [\[2012\]](#)), con algunas modificaciones. Es importante recordar que la obtención de muestras se llevó a cabo siempre y cuando los participantes hubieran firmado el consentimiento informado. Primeramente, se pidió a los candidatos tener ayuno de por lo menos una hora antes de realizar la recolección de la muestra. Para cada paciente, se preparó un tubo cónico con 15 mL de solución salina y se rotuló con un código numérico aleatorio. Se le solicitó a cada paciente que se enjuagara la boca con la solución salina, de su tubo respectivo, durante 1 minuto. Luego de ese tiempo se les invitó a que escupieran la solución salina al tubo y se cerró adecuadamente. Las muestras fueron almacenadas en una hielera y trasladadas al laboratorio de la Universidad del Valle de Guatemala, donde se almacenaron a -20 °C.

¹<https://www.thermofisher.com/gt/en/home.html>

²<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer?returnurl=%2Fcalc%2Falyzer>

³<https://dna.macrogen.com>

7.1.4. Optimización de extracción de ADN

Protocolo inicial de extracción de ADN en pacientes con dislexia

Se utilizó la estrategia planteada por (Aidar y Line, 2007) para llevar a cabo la extracción de ADN a partir de las muestras de saliva obtenidas. Los tubos con las muestras se descongelaron y centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente en una centrifuga 5430 R (Eppendorf, Alemania). Se descartó el sobrenadante en un beaker con cloro dentro de la campana de extracción Class II (Labconco, Kansas, USA). Se resuspendió el precipitado en 1 mL de buffer de lisis [10mM Tris (pH 8.0), 0.5 % SDS, 5mM EDTA]. Se incubaron las muestras durante la noche en una incubadora Imperial III (Lab-line, Illinois, USA).

Luego de la incubación, se agregaron 400 mv de acetato de amonio 10M y se mezclaron por inversión aproximadamente 20 veces. Se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se trasladaron 750 mv de cada muestra a un tubo de 1.5 mL y se agregaron 750 mv de etanol absoluto frío. Se incubaron las muestras durante 20 minutos en un congelador a -20 °C (Frigidaire, Carolina del Norte, USA). Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 20 minutos a -4 °C. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 1 mL de etanol al 70%. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 minutos a -4 °C y se descartó el sobrenadante cuidadosamente. Se dejaron secar los tubos en una servilleta de papel durante 25 minutos. El pellet de cada muestra fue resuspendido en 100 mv de buffer TE [10mM Tris(pH 7.8) y 1mM EDTA]. Se almacenaron las muestras a -20 °C.

Extracción de ADN de muestras de saliva con kit PureLink Genomic DNA

Primero, se diluyeron el Buffer de Lavado 1 y el Buffer de Lavado 2 con etanol al 100 % según las especificaciones del kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen, USA). Se preparó la incubadora Imperial III (Lab-line, Illinois, USA) a 55 °C. Se realizó un enjuague bucal con 15 mL de solución salina durante 60 segundos. En un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL, se agregaron 20 mv de Proteinasa K y se trasladaron 200 mv de la muestra de saliva. Se mezcló por medio de pipeteo. Se añadieron 200 mv de Buffer de Lisis/Ligación del kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen, USA) y se mezcló por medio de un vortex. Se incubó la muestra a 55 °C durante 10 minutos en la incubadora Imperial III (Lab-line, Illinois, USA).

Luego, se añadieron 200 mv de etanol al 100 % al tubo y se mezcló por medio de un vortex. Se prepararon un Tubo de Colección con una Columna Spin del kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen, USA) y se agregaron 640 mv del lisado. Se centrifugó la muestra a 12,000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente (25 C) en una centrifuga 5430 R (Eppendorf, Alemania). Se descartó el Tubo de Colección y se traslado la Columna Spin a un nuevo Tubo de Colección. Se agregaron 500 mv de Buffer de Lavado 1 del kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen, USA). La muestra se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente en una centrifuga 5430 R (Eppendorf, Alemania). Se descartó el Tubo de Colección y se traslado la Columna Spin a un nuevo Tubo de Colección. Se agregaron 500 mv de Buffer de Lavado 2 del kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen, USA).

La muestra se centrifugó a máxima velocidad durante 3 minutos a temperatura ambiente en una centrifuga 5430 R (Eppendorf, Alemania). Se descartó el Tubo de Colección y se trasladó la Columna Spin a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL. Se agregaron 50 μ L de Buffer de Elución del kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen, USA) y se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se centrifugó la muestra a máxima velocidad durante 1 minuto a temperatura ambiente en una centrifuga 5430 R (Eppendorf, Alemania). Se almacenaron las muestras a -20 °C.

Extracción de ADN de muestras de sangre con kit PureLink Genomic DNA

Primero, se diluyeron el Buffer de Lavado 1 y el Buffer de Lavado 2 con etanol al 100 % según las especificaciones del kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen, USA). Se preparó la incubadora Imperial III (Lab-line, Illinois, USA) a 55 °C. Un profesional capacitado realizó la extracción de sangre en tubos con anticoagulante EDTA. En un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL, se agregaron 200 μ L de la muestra de sangre. Se añadieron 20 μ L de Proteinasa K del kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen, USA). Se agregaron 20 μ L de RNasa A del kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen, USA) y se mezcló por medio de un vortex. Se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se añadieron 200 μ L de Buffer de Lisis/Ligación del kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen, USA) y se mezcló por medio de un vortex. Se incubó la muestra a 55 °C durante 10 minutos en la incubadora Imperial III (Lab-line, Illinois, USA).

Luego, se añadieron 200 μ L de etanol al 100 % al tubo y se mezcló por medio de un vortex. Se prepararon un Tubo de Colección con una Columna Spin del kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen, USA) y se agregaron 640 μ L del lisado. Se centrifugó la muestra a 12,000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente (25 °C) en una centrifuga 5430 R (Eppendorf, Alemania). Se descartó el Tubo de Colección y se trasladó la Columna Spin a un nuevo Tubo de Colección. Se agregaron 500 μ L de Buffer de Lavado 1 del kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen, USA). La muestra se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente en una centrifuga 5430 R (Eppendorf, Alemania). Se descartó el Tubo de Colección y se trasladó la Columna Spin a un nuevo Tubo de Colección. Se agregaron 500 μ L de Buffer de Lavado 2 del kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen, USA).

La muestra se centrifugó a máxima velocidad durante 3 minutos a temperatura ambiente en una centrifuga 5430 R (Eppendorf, Alemania). Se descartó el Tubo de Colección y se trasladó la Columna Spin a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL. Se agregaron 50 μ L de Buffer de Elución del kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen, USA) y se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se centrifugó la muestra a máxima velocidad durante 1 minuto a temperatura ambiente en una centrifuga 5430 R (Eppendorf, Alemania). Se almacenaron las muestras a -20 °C.

7.1.5. Medición de la concentración de ADN extraído

Se midió la concentración de ADN extraído utilizando el espectrofotómetro NanoDrop One (ThermoFisher Scientific, Massachusetts). Primero, se colocaron 2 μ L de Buffer de Elución en el lente de lectura y se realizó la medición de referencia (blanco). Se colocaron 2

mv de cada muestra extraída en el lente para llevar a cabo la medición de las concentraciones. Todos los datos se registraron en los cuadros respectivos de cada medición (protocolo inicial y extracción con kit).

7.1.6. Gel de integridad de extracciones de ADN

Se comprobó la integridad de la extracción de ADN, tanto del protocolo inicial como utilizando el kit, mediante un gel de electroforesis. Se prepararon 50 mL de gel 1 %. En un Erlenmeyer se agregaron 5 mL de buffer TBE 10X y 45 mL de agua ultrapura. Se agregaron 0.5 g de agarosa en polvo y se mezcló. Se disolvió a solución en el microondas y se dejó reposar durante 5 minutos aproximadamente o hasta que estuviera frío. Se añadieron 2 mv de SYBR Green y se mezcló. Se volcó la solución en una bandeja de geles y se le colocó el peine de pozillos. Se dejó gelificar la solución por 20 minutos. Se transfirió el gel a la cámara electroforética y se cubrió con Buffer TBE 1X (buffer de corrida). Se cargaron las muestras de PCR en cada pozillo y escaleras de referencia, registrando los datos en una tabla. Se corrió el gel durante 20 minutos aproximadamente y se procedió a observar el resultado exponiendo el gel a luz UV.

7.1.7. Optimización de ensayos PCR

Estudio de la amplificación de los genes *APP*, *HTT* y *SNCA*

El siguiente procedimiento se realizó para cada muestra de saliva, los cálculos fueron realizados con base en la concentración final deseada de cada reactivo. En un minitubo de 0.5 mL se agregaron 5 mv de Buffer Gotaq 5X. Se agregaron 0.5 mv de Taq polimerasa 5 unidades/mv, 0.5 mv de dNTP mix 10mM (nucleótidos) y 2.5 mv de MgCl₂ 25 mM. Se agregaron 0.5 mv de cada uno de los primers Forward (3 en total) y cada uno de los primers Reverse (3 en total), respectivamente. Se añadieron 6.93 mv de ADN y 8.57 mv de agua ultrapura para el caso de la muestra 4291. Dada la concentración de las otras dos muestras, se agregaron 8 mv de ADN y 7.5 mv de agua ultrapura para éstas.

Todas las muestras resultantes se colocaron en el termociclador para realizar el ensayo PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Se programó el termociclador para que realizara inicialización a 95 °C por 10 minutos, desnaturalización a 95 °C por 10 s, annealing a 62 °C por 50 s y extensión a 72 °C por 2 minutos. Esta programación se repetió por 45 ciclos y, finalmente, se programó una elongación a 72 °C por 10 minutos.

Luego, se procedió a visualizar la amplificación de los genes. Para esto, se realizó un gel de electroforesis. Se prepararon 50 mL de gel 0.8 por ciento. En un Erlenmeyer se agregaron 5 mL de buffer TBE 10X y 45 mL de agua ultrapura. Se agregaron 0.4 g de agarosa en polvo y se mezcló. Se disolvió a solución en el microondas y se dejó reposar durante 5 minutos aproximadamente o hasta que estuviera frío. Se añadieron 2 mv de SYBR Green y se mezcló. Se volcó la solución en una bandeja de geles y se le colocó el peine de pozillos. Se dejó gelificar la solución por 20 minutos. Se transfirió el gel a la cámara electroforética y se cubrió con Buffer TBE 1X (buffer de corrida). Se cargaron las muestras de PCR en cada pozillo y escaleras de referencia, registrando los datos en una tabla. Se corrió el gel durante

20 minutos aproximadamente y se procedió a observar el resultado exponiendo el gel a luz UV.

Optimización de concentraciones de reactivos para la amplificación de los genes *APP*, *HTT* y *SNCA*

En la realización del segundo ensayo PCR se realizaron modificaciones en las concentraciones de finales de los primers Forward y Reverse utilizados en la amplificación. En un minitubo de 0.5 mL se agregaron 5 μ l de Buffer GoTaq 5X. Se agregaron 0.5 μ l de Taq polimerasa 5 unidades/ μ l, 0.5 μ l de dNTP mix 10mM (nucleótidos) y 2.5 μ l de MgCl₂ 25 mM. Se agregaron 2.5 μ l de cada uno de los primers Forward (3 en total) y cada uno de los primers Reverse (3 en total), respectivamente. Se añadieron 6.93 μ l de ADN y 4.57 μ l de agua ultrapura para el caso de la muestra 4291. Dada la concentración de las otras dos muestras, se agregaron 8 μ l de ADN y 3.5 μ l de agua ultrapura para éstas. El resto del procedimiento, es decir, el programa en el termociclador y el gel de electroforesis, se realizó exactamente igual que en el primer ensayo PCR.

Estudio de la modificación de temperatura de anillamiento para la amplificación del gen *SNCA*

En el tercer ensayo PCR se añadieron exactamente los mismos volúmenes de reactivos, ADN y agua utilizados en el segundo ensayo PCR. Sin embargo, solamente se realizó el procedimiento para amplificar el gen *SNCA*. Además, se modificó el programa de amplificación. Se programó el termociclador para que realizara inicialización a 95 °C por 10 minutos, desnaturalización a 95 °C por 10 s, annealing a 52 °C por 50 s (modificación) y extensión a 72 °C por 2 minutos. Esta programación se repitió por 45 ciclos y, finalmente, se programó una elongación a 72 °C por 10 minutos.

Luego, se procedió a visualizar la amplificación de los genes con un gel de electroforesis con una modificación. Se prepararon 50 mL de gel 1.5%. En un Erlenmeyer se agregaron 5 mL de buffer TBE 10X y 45 mL de agua ultrapura. Se agregaron 0.75 g de agarosa en polvo y se mezcló. Se disolvió a solución en el microondas y se dejó reposar durante 5 minutos aproximadamente o hasta que estuviera frío. Se añadieron 2 μ l de SYBR Green y se mezcló. Se volcó la solución en una bandeja de geles y se le colocó el peine de pozillos. Se dejó gelificar la solución por 20 minutos. Se transfirió el gel a la cámara electroforética y se cubrió con Buffer TBE 1X (buffer de corrida). Se cargaron las muestras de PCR en cada pozillo y escaleras de referencia, registrando los datos en una tabla. Se corrió el gel durante 20 minutos aproximadamente y se procedió a observar el resultado exponiendo el gel a luz UV.

Optimización de concentraciones de reactivos y protocolo en termociclador para la amplificación del gen *SNCA*

Para el cuarto ensayo PCR, nuevamente se realizó solamente la amplificación del gen *SNCA*. Para este se modificaron las concentraciones de los primers Forward y Reverse. Por

lo tanto, en un minitubo de 0.5 mL se agregaron 5 mv de Buffer Gotaq 5X. Se agregaron 0.5 mv de Taq polimerasa 5 unidades/mv, 0.5 mv de dNTP mix 10mM (nucleótidos) y 2.5 mv de MgCl₂ 25 mM. Se agregaron 0.25 mv los primers Forward y de los primers Reverse, respectivamente. Se añadieron 6.93 mv de ADN y 8.07 mv de agua ultrapura para el caso de la muestra 4291. Dada la concentración de las otras dos muestras, se agregaron 8 mv de ADN y 7.5 mv de agua ultrapura para éstas.

Además, se modificó el programa de amplificación. Se programó el termociclador para que realizara inicialización a 95 °C por 10 minutos, desnaturalización a 96 °C por 15 s, annealing a 53 °C por 50 s (modificación) y extensión a 72 °C por 2 minutos. Esta programación se repitió por 45 ciclos y, finalmente, se programó una elongación a 72 °C por 10 minutos. El procedimiento del gel de electroforesis fue exactamente igual que en el tercer ensayo PCR.

Estudio de la amplificación del gen *SNCA* a partir de muestras de saliva y sangre obtenidas con el kit PureLink Genomic DNA

Para el quinto ensayo PCR, nuevamente se realizó solamente la amplificación del gen *SNCA*. Sin embargo, en este caso se utilizaron las muestras de ADN resultantes de la extracción de saliva y sangre, obtenidas del segundo procedimiento de extracción de ADN. Para este ensayo, se utilizaron las mismas concentraciones de reactivos que al realizar el cuarto ensayo PCR. El resto del procedimiento fue exactamente igual al llevado a cabo en el cuarto ensayo PCR.

Cuantificación de los pesos moleculares de segmentos amplificados en ensayos PCR

Se utilizó el software ImageJ (NIH, USA) para realizar la cuantificación de los pesos moleculares. Se abrió la imagen de cada gen en la herramienta y se recortó de tal forma que solo se observara el gel. Se giró la imagen de manera que los pozillos quedaran en la parte izquierda de la imagen. Se seleccionó el carril de referencia (escaleras moleculares) utilizando la opción Gel Analyzer Options. Luego, se fueron seleccionando cada uno de los carriles del gel utilizando la misma opción. una vez marcados todos los carriles, se utilizó la opción Plot Lanes para graficar las densidades de color. Se marcaron los picos conocidos de la grafica de las escaleras moleculares. Así mismo, se marcaron los picos máximos de cada uno de los carriles. Utilizando la opción Measure, se obtuvieron los datos de las coordenadas en el eje x de los picos marcados. Con los datos obtenidos, se generaron tablas para cada gel (Cuadros [10](#), [11](#), [12](#), [13](#), ver página 75). Se construyeron curvas estándar de pesos moleculares utilizando las tablas generadas y con las ecuaciones obtenidas de las curvas, se calcularon los pesos moleculares aproximados de cada segmento amplificado (Figuras [18](#), [19](#), [20](#), [21](#), ver página 75).

7.2. Administración de datos

7.2.1. Recolección de datos

Este es un estudio médico que ayudará a entender de una mejor manera la relación genética entre el trastorno de dislexia y las enfermedades neurodegenerativas. Se realizó este estudio porque no existe una relación directa en la literatura entre estas condiciones.

En el estudio, se utilizó una computadora en la que se registró la información de contacto de los pacientes, así como los resultados obtenidos. Además, se contó con un repositorio de muestras de saliva que fueron mantenidas en un congelador a lo largo del estudio. La información y las muestras de los pacientes fueron utilizadas exclusivamente para este estudio. Todas las muestras de saliva se descartaron de acuerdo a las normativas de la Universidad del Valle de Guatemala al finalizar el estudio o si los pacientes decidieran ya no participar.

7.2.2. Manejo de la información

Toda la información y muestras se mantuvieron en un ambiente con acceso limitado y fueron manejadas únicamente por el estudiante Diego Medina, para el uso exclusivo en este estudio. No se guardaron ni manejaron los nombres de los participantes para la identificación de las muestras, sino que se les asignó un código numérico aleatorio. De esta manera, el estudio se llevó a cabo sin conocer la identidad personal de cada paciente y ésta no se reveló en la publicación de los resultados.

7.3. Consideraciones éticas: reclutamiento y consentimiento informado

Se contactaron pacientes dentro de la comunidad de la Universidad del Valle de Guatemala por medio de un poster de reclutamiento de voluntarios. Se citó a los pacientes en el laboratorio de Ingeniería Biomédica y se les explicó verbalmente la importancia del estudio, así como el procedimiento a llevar a cabo. Se les proporcionó un consentimiento informado para que pudieran leerlo tranquilamente. En el consentimiento informado se estableció que los pacientes podrían dejar de participar en el estudio en cualquier momento y sus muestras no serían utilizadas si este es el caso. Aquellos pacientes que aceptaron participar debieron firmar dicho documento dando su consentimiento.

7.4. Propuesta de ensayos preclínicos *in silico* para edición génica del gen de susceptibilidad de dislexia *KIAA0319*

7.4.1. Generación de guías de ARN

Se realizó la búsqueda de la secuencia de ADN del cromosoma 19, GRCh38.p14 en la Librería Nacional de Medicina NIH (National Center for Biotechnology Information ⁴), que se puede encontrar utilizando el código de acceso NC_000019 o escribiendo el nombre en la barra de búsqueda. La secuencia fue introducida en el software Broad Institute CRISPick (MA, USA ⁵) siguiendo los siguientes pasos.

- Dentro de los parámetros, se escogió la opción de genoma de referencia “GRCh38” y se seleccionó el mecanismo “CRISPRo”. Asimismo, se eligió la enzima “SpyoCas9” correspondiente a “Chen (2013)” (Figura ²²).
- En la sección de secuencia objetivo, se seleccionó la opción “Bulk/Advanced targets” y se introdujeron las primeras 2,000 pb (pares de bases) de la secuencia de ADN del cromosoma 19 (Figura ²³).
- Se presionó el botón “Validate” en la parte inferior de la pantalla. Al cargar la nueva página, se aseguró que la secuencia introducida fuera válida y se presionó el botón “Submit” (Figura ²⁴).
- Al cargar la página de resultados, se presionó la opción “Picking results” para descargar las guías de ARN (Figura ²⁵).
- Los resultados se abrieron utilizando Excel y se buscaron los datos correspondientes a las columnas “sgARN Cut Position”, “sgARN Sequence”, “PAM Sequence”, “Target Cut” y “On-Target Efficacy Score” (Figura ²⁶) y se organizaron como se puede observar a continuación:

Cuadro 1: *Matriz para la recolección de datos de las guías de ARN generadas.*

Posición de corte sgRNA	Secuencia sgRNA	Secuencia PAM	Puntaje de eficacia	% de especificidad
P1	Guía 1	PAM 1	ES 1	TC 1
P2	Guía 2	PAM 2	ES 2	TC 2
P3	Guía 3	PAM 3	ES 3	TC 3
P4	Guía 4	PAM 4	ES 4	TC 4
P5	Guía 5	PAM 5	ES 5	TC 5

Asimismo, se utilizó la herramienta Benchling ⁶ para validar las secuencias de ARN guía obtenidas.

⁴<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

⁵<https://portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/public>

⁶<https://www.benchling.com>

- Se seleccionó la opción “+” de la barra principal, luego la opción “CRISPR” y, por último, la opción “CRISPR guides” (Figura 27).
- Al aparecer la ventana emergente, se seleccionó la opción “Raw Bases”, se le colocó el nombre “AAVS1” y se introdujeron las primeras 2,000 pb (pares de bases) de la secuencia de ADN del cromosoma 19 (Figura 28). Se presionó el botón “Next”.
- En la siguiente ventana, se seleccionó la opción “Single guide” y una longitud de guía de “20”. Se escogió el genoma “GRCm38 EnsemblRelease 102 (Mus musculus)” y el PAM “NGG (SpCas9, 3 side)” (Figura 29). Se presionó el botón “Finish”.
- Se introdujo una región objetivo de 1 a 2,000 pb y se presionó el botón “+” (Figura 30).
- Dentro de todas las secuencias generadas, se buscaron las guías de ARN correspondientes a las obtenidas en Broad Institute CRISPick y se organizaron utilizando la matriz descrita en el Cuadro 1.

Las secuencias obtenidas de ambas herramientas fueron analizadas y comparadas para realizar la validación. Utilizando la información de eficacia y especificidad, se escogió la guía de ARN óptima para ser utilizada en la terapia génica.

7.4.2. Construcción de plásmido recombinante LentiCRISPRAAVS1 v2

Se buscó la secuencia del plásmido LentiCRISPR v2 por Feng Zhang (código de Addgene #52961) utilizando el software Addgene 7 y se trasladó a la herramienta ApE para su construcción siguiendo los siguientes pasos.

- Se escribió el nombre del plásmido en la barra de búsqueda y se seleccionó el primer plásmido resultante dando click en su nombre. En la nueva ventana, se presionó en la opción “View all sequences” (Figura 31).
- En la siguiente página, se seleccionó el botón “Analyze sequence” de la primera secuencia parcial mostrada (Figura 32). Se analizó el mapa de la secuencia y se definieron los sitios de corte utilizando la enzima de restricción BsmBI en las posiciones 24 bp y 406 bp (Figura 33).
- Se seleccionó el botón “Analyze sequence” para la secuencia completa del plásmido (Figura 34) y se seleccionó la opción de secuencia en la barra superior (Figura 35). Se copió la secuencia completa y se trasladó a la aplicación de edición de plásmidos ApE (M. Wayne Davis 8) descargada con anterioridad.
- Utilizando el software Addgene, se copiaron las secuencias de los componentes principales del plásmido (marcados con colores), una por una (Figura 36). En la aplicación ApE se seleccionó el botón con una lupa “Find”, de la barra superior y se introdujo la secuencia copiada; se presionó el botón “Find Next” (Figura 37). Con la secuencia

⁷<https://www.addgene.org/search/catalog/plasmids/?q=>

⁸<https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>

seleccionada, se seleccionó la opción “Features” en la barra superior y se presionó la opción “New Feature” (Figura 38). En la ventana emergente, se colocó el nombre del segmento y se cambió el color para su identificación (Figura 39).

- Al tener todos los segmentos importantes, se identificaron también los sitios de corte de la enzima BsmBI. Se eliminó el segmento que se encontraba entre estos sitios de corte y se insertó la guía de ARN escogida para la terapia génica, cambiándole el color para su identificación (Figura 40).

7.4.3. Construcción de plásmido recombinante pAAVS1-DNR-KIAA0319

Se escogió la secuencia del plásmido pAAVS1-P-MCS por Knut Woltjen (código de Addgene #80488) como base para la construcción del plásmido donante y se trasladó a la plataforma ApE (M. Wayne Davis) para su modificación siguiendo los siguientes pasos.

- Se buscó la secuencia del gen *KIAA0319* en la base de datos del software Ensembl (Instituto Europeo de Bioinformática⁹). Se escogió la primera opción del resultado de la búsqueda y en la nueva página, se seleccionó la primera secuencia “RefSeq Match” dentro de la tabla de transcritos disponible, que tiene una etiqueta TSL:1 (Figura 41). Se copió la secuencia completa del gen *KIAA0319* en la aplicación ApE.
- En el catálogo de plásmidos del software Addgene, se buscó un plásmido donante para el sitio AAVS1 escribiendo “AAVS1 donor” en la barra de búsqueda. Se obtuvieron múltiples opciones que fueron analizadas con detenimiento. Se estableció el plásmido pAAVS1-P-MCS como el óptimo para utilizar en la terapia génica (Figura 42).
- Se comprobó que los sitios de corte escogidos no provocaran cortes en el gen *KIAA0319*. Para esto, se obtuvieron las secuencias de corte de las enzimas de restricción SpeI y PacI (Figura 43). En la aplicación ApE, se buscó la secuencia de ambas enzimas de restricción en la secuencia del gen *KIAA0319* copiada con anterioridad. Se presionó la opción “Find” de la barra superior, se introdujo la secuencia de las enzimas y se observó que no se encontraban dentro del gen (Figura 44).
- Se copió la secuencia completa del plásmido pAAVS1-P-MCS y se trasladó a la aplicación ApE. Se realizó el procedimiento utilizado en la construcción del plásmido LentiCRISPRAAVS1, para la identificación de todos los segmentos importantes de la secuencia (Figura 45).
- Al tener identificados los sitios de corte, se eliminó el segmento que se encontraba en el medio y se insertó la secuencia completa del gen *KIAA0319* (Figura 46).

⁹https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index

8.1. Estudio genético piloto para la optimización de la amplificación gen *SNCA*, para ser aplicado en los genes *APP* y *HTT*

8.1.1. Diseño de *primers* para amplificación de los genes *SNCA*, *APP* y *HTT*

Se diseñaron seis *primers* en total, un *primer* Forward y un primer Reverse para cada uno de los genes analizados en el estudio. Cabe recordar que el gen *APP* está relacionado a Alzheimer; *SNCA*, a Parkinson; y *HTT*, a enfermedad de Huntington. La longitud de los *primers* generados es de 20 pb y, solamente los *primers* APP Forward y HTT Forward, tienen una longitud de 21 pb (Cuadro 2). La temperatura (T_m) del primer SNCA Reverse es la menor (58.7 °C) (Cuadro 2), por lo que el rango de temperatura (T_a) se encuentra °C. Por otro lado, las temperaturas (T_m) del resto de *primers* se encontraron por arriba de 60 °C (Cuadro 2). Por último, se puede notar que el ratio de guanina-citosina (%GC) de los *primers* se encuentra entre 50 y 57 (Cuadro 2).

Cuadro 2: *Primers diseñados para amplificación de genes APP, SNCA y HTT.*

Primer	Secuencia	Longitud (pb)	Tm (°C)	%GC
APP Forward	TCAGTTTCCTCGGCAGCGGTA	21	65.7	57
APP Reverse	GCACAGCTGTCAAAAGGCGA	20	62.4	55
SNCA Forward	CAAGCCTTCTGCCTTTCCAC	20	61.8	55
SNCA Reverse	GAAATGTCATGACTGGGCAC	20	58.7	50
HTT Forward	ATTCATTGCCCGGTGCTGAG	21	65.4	57
HTT Reverse	ACAAGGGCGCAGACTTCCAA	20	64.3	55

Para validar los *primers* diseñados, se realizaron ensayos PCR *in silico* de cada uno de los genes. En el caso del gen *APP*, se observó una correcta amplificación, presentando un segmento de 2,372 bp (Figura 15). La amplificación del gen *SNCA* en la plataforma, mostró un segmento de 658 bp (Figura 16). Por último, se obtuvo la amplificación de un segmento de 9,575 bp para el gen *HTT* (Figura 17).

8.1.2. Optimización de extracción de ADN

Protocolo inicial de extracción de ADN en pacientes con dislexia

A partir de la medición en el espectrofotómetro NanoDrop One (ThermoFisher Scientific, Massachusetts), se recolectaron los datos de concentración y los valores de pureza A260/A280 y A260/A230 de cada una de las muestras. Para la muestra 4291, se obtuvo la mejor concentración de ADN, con un valor de 36.1 ng/mv, y una pureza de 1.52 y 0.54 respectivamente (Cuadro 3). La muestra 2685 fue la que presentó la menor concentración de ADN (7.3 ng/mv), sin embargo, la pureza A260/A280 fue la mayor junto con la muestra 9125 (Cuadro 3). Aunque la muestra 9125 presentó una concentración baja (10.8 ng/mv), fue la muestra con la mayor pureza A260/A230, con un valor de 0.87 (Cuadro 3).

Cuadro 3: *Concentración y pureza del ADN extraído a partir de las muestras de saliva de pacientes con dislexia.*

Muestra	Concentración (ng/mv)	A260/A280	A260/A230
4291	36.1	1.52	0.54
9125	10.8	1.61	0.87
2685	7.3	1.61	0.51
Promedio	18.06	1.58	0.64
Desv. Est.	15.71	0.05	0.20

Para comprobar que el ADN extraído se encontraba en buenas condiciones, se realizó una prueba de integridad por medio de un gel de electroforesis. Se observaron bandas claras de material genético, en las muestras 9125 y 2685, mientras que, las bandas obtenidas a partir de la muestra 4291, son opacas (Figura 1). A pesar de lo anterior, las bandas de todas las muestras se apreciaron en la parte superior del gel realizado (Figura 1). Es decir, en la

posición correspondiente a los segmentos de mayor longitud, de acuerdo a las escaleras de referencia utilizadas (1 Kb), ubicadas en ambos extremos del gel (Figura 1¹).

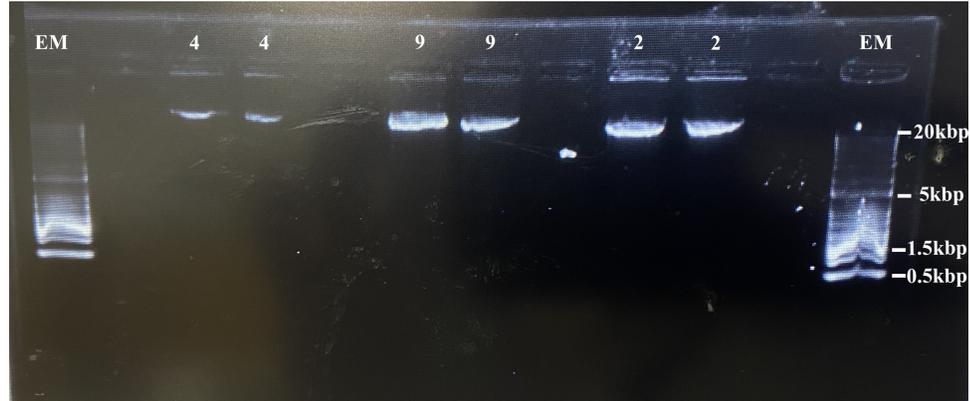


Figura 1: Gel de integridad de extracción de ADN a partir de muestras de saliva de pacientes con dislexia.

Extracción de ADN de muestras de sangre y saliva con kit PureLink Genomic DNA

Se midieron, tanto la concentración, como la pureza de las muestras de ADN extraídas a partir de las muestras de saliva y sangre del estudiante Diego Medina. Las muestras de sangre fueron las que presentaron los valores más altos de concentración de ADN, 37.5 y 60.5 ng/mv respectivamente (Cuadro 4). La primera muestra de sangre, mostró la mayor pureza de todas las muestras, especialmente el valor A260/A230 de 2.62. En contraste, la segunda muestra de saliva presentó la menor pureza, con un valor A260/A230 de 1.38 (Cuadro 4).

Cuadro 4: Concentración y pureza del ADN extraído a partir de las muestras de saliva y sangre del estudiante Diego Medina

Muestra	Concentración (ng/mv)	A260/A280	A260/A230
Saliva 1	17.4	1.63	2.17
Saliva 2	31.0	1.65	1.38
Sangre 1	37.5	1.74	2.62
Sangre 2	60.5	1.74	2.14
Promedio	36.6	1.69	2.08
Desv. Est.	18.0	0.051	0.51

Al comparar las concentraciones de ADN extraído en el protocolo inicial de pacientes con dislexia y las muestras extraídas con kit, se puede notar un aumento generalizado. Solamente la muestra de saliva 1 presentó concentración relativamente baja en la extracción con kit (Cuadro 4). Las concentraciones, especialmente las de sangre, fueron mayores a las

¹EM se refiere a la escalera molecular de 1 kbp utilizada como referencia. Las muestras 4291 se representan con un 4; las muestras 9125, con un 9; y las muestras 2685, con un 2.

observadas en el protocolo inicial (Cuadro 3). Esto puede comprobarse con el promedio de la concentración calculado. De la misma forma, los valores de pureza A260/A280 fueron mayores en todas las muestras extraídas con kit (Cuadro 4), en comparación con las extraídas en el protocolo inicial (Cuadro 3). El mismo caso fue observado en los valores de pureza A260/A230. Lo anterior se confirma al analizar los promedios de los valores de purzas, que fueron mayores en los dos casos en comparación con los del protocolo inicial.

8.1.3. Optimización de amplificación del gen *SNCA*

Estudio de la amplificación de los genes *APP*, *HTT* y *SNCA*

Se realizó un ensayo PCR para amplificar los genes *APP* (Alzheimer), *HTT* (Huntington) y *SNCA* (Parkinson) y, a continuación, se llevó a cabo un gel de electroforesis para observar los resultados. Los volúmenes de reactivos utilizados para realizar el ensayo PCR se registraron en el Cuadro 5. Se observa que las bandas de todas las muestras, se encontraron en la misma ubicación, en la posición inferior del gel (Fig. 2). Sin embargo, la ubicación de los segmentos sobrepasa la referencia brindada por la escalera utilizada (100 Kbp). Adicionalmente, las bandas se notan opacas y borrosas, lo que no permite distinguirlas correctamente (Figura 2²).

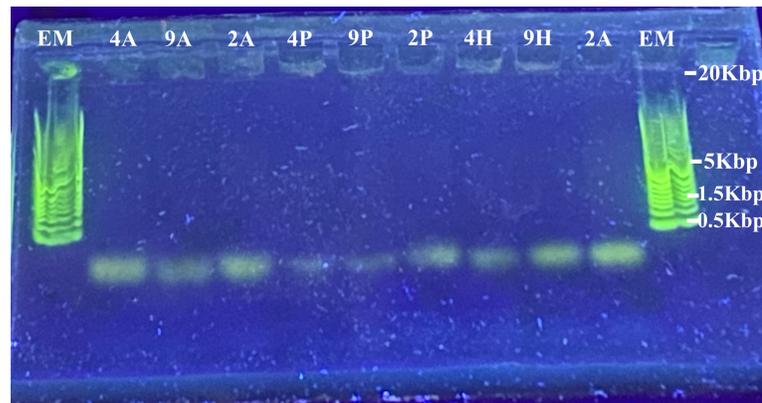


Figura 2: Amplificación de los genes *APP*, *SNCA* y *HTT*.

²EM se refiere a la escalera molecular de 1 kbp utilizada como referencia. Las muestras 4291 se representan con un 4; las muestras 9125, con un 9; y las muestras 2685, con un 2. Las muestras con el gen *APP* amplificado se representan con una letra A; las muestras con el gen *SNCA*, con una letra P; y las muestras con el gen *HTT*, con una letra H.

Cuadro 5: Volúmenes de reactivos utilizados en la amplificación de los genes *APP*, *HTT* y *SNCA*

Reactivos	Concentración Stock	Concentración Final	Factor de Dilución	Volumen Final
dNTP Mix	10 mM	0.2 mM	50	0.5 mv
Buffer GoTaq	5 X	1 X	5	5 mv
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	10	2.5 mv
Taq Polimerasa	5 u/mv	2.5 u/mv	-	0.5 mv
Primer Forward	10 uM	0.2 uM	50	0.5 mv
Primer Reverse	10 uM	0.2 uM	50	0.5 mv

Optimización de concentraciones de reactivos para la amplificación de los genes *APP*, *HTT* y *SNCA*

Debido a los resultados obtenidos del *primer* ensayo PCR, se repitió el procedimiento con distintas cantidades de reactivos. Se aumentaron los volúmenes de ambos primers a 2.5 mv y de MgCL₂ a 5 mv (Cuadro 6). Al realizar el gel de electroforesis, se observó que las bandas se encontraron en la misma ubicación, en la parte inferior, que en el ensayo realizado (Figura 3). Nuevamente, dicha ubicación sobrepasó el límite de la escalera molecular de referencia utilizada (100 Kb). Sin embargo, en este ensayo PCR, se apreciaron bandas claras y bien marcadas que permiten distinguirlas fácilmente (Figura 3³).

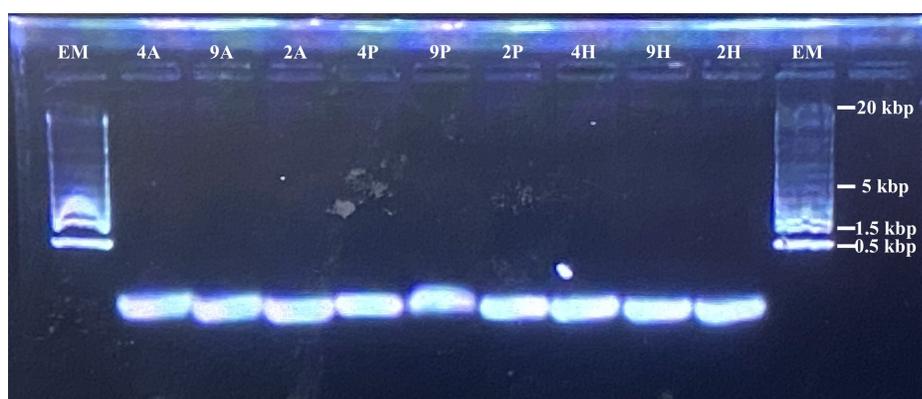


Figura 3: Modificación en la amplificación de los genes *APP*, *SNCA* y *HTT*.

³EM se refiere a la escalera molecular de 1 kbp utilizada como referencia. Las muestras 4291 se representan con un 4; las muestras 9125, con un 9; y las muestras 2685, con un 2. Las muestras con el gen *APP* amplificado se representan con una letra A; las muestras con el gen *SNCA*, con una letra P; y las muestras con el gen *HTT*, con una letra H.

Cuadro 6: Volúmenes modificados de reactivos utilizados en la amplificación de los genes *APP*, *HTT* y *SNCA*

Reactivos	Concentración stock	Concentración final	Factor de dilución	Volumen final
dNTP Mix	10 mM	0.2 mM	50	0.5 mv
Buffer GoTaq	5 X	1 X	5	5 mv
MgCl ₂	25 mM	5 mM	5	5 mv
Taq Polimerasa	5 u/mv	2.5 u/mv	-	0.5 mv
Primer Forward	10 uM	1 uM	10	2.5 mv
Primer Reverse	10 uM	1 uM	10	2.5 mv

Estudio de la modificación de temperatura de anillamiento para la amplificación del gen *SNCA*

Se evaluó la amplificación del gen *SNCA* de las tres muestras, con modificaciones en la temperatura de “annealing” del programa de amplificación, por medio de un gel de electroforesis (Figura 4⁴). Se colocaron escaleras de 1 Kb en ambos extremos del gel para tener una referencia del tamaño de los fragmentos. Se observó que todos los fragmentos presentaron la misma longitud, ya que estaban ubicados en la misma posición vertical (Figura 4). Dichos resultados son consistentes con los ensayos PCR realizados. Se puede notar que los segmentos de ADN se encontraron en la parte inferior del gel, nuevamente sobrepasando la referencia de la escalera.

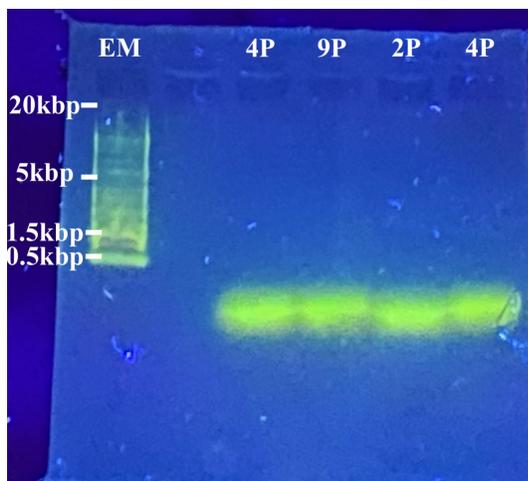


Figura 4: Amplificación del gen *SNCA*.

⁴EM se refiere a la escalera molecular de 1 kbp utilizada como referencia. Las muestras 4291 se representan con un 4; las muestras 9125, con un 9; y las muestras 2685, con un 2. Las muestras con el gen *SNCA* amplificado se representan con una letra P.

Optimización de concentraciones de reactivos y protocolo en termociclador para la amplificación del gen *SNCA*

Se repitió la amplificación del gen *SNCA*, modificando tanto la temperatura y el tiempo de inicialización, como la concentración de los *primers* utilizados, disminuyendo su volumen a 0.25 mv (Cuadro 7). Se evaluó la amplificación del gen utilizando un gel de electroforesis (Figura 5⁵). A pesar de las modificaciones, no se observaron segmentos amplificados en el gel, solamente la escalera de referencia (Figura 5).

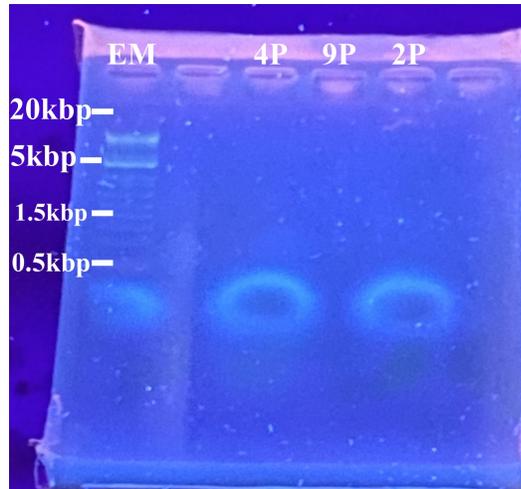


Figura 5: Modificación de la amplificación del gen *SNCA*.

Cuadro 7: Volúmenes modificados de reactivos utilizados en la amplificación del gen *SNCA*

Reactivos	Concentración stock	Concentración final	Factor de dilución	Volumen final
dNTP Mix	10 mM	0.2 mM	50	0.5 mv
Buffer GoTaq	5 X	1 X	5	5 mv
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	10	2.5 mv
Taq Polimerasa	5 u/mv	2.5 u/mv	-	0.5 mv
Primer Forward	10 uM	0.1 uM	100	0.25 mv
Primer Reverse	10 uM	0.1 uM	100	0.25 mv

Estudio de la amplificación del gen *SNCA* a partir de muestras de saliva y sangre obtenidas con el kit PureLink Genomic DNA

Se realizó la extracción de ADN a partir de muestras de sangre y de saliva del estudiante Diego Medina. Esto, se hizo para comprobar si el problema de los ensayos PCR realizados, eran las muestras utilizadas en el estudio. Se observó que las muestras con el ADN (pozos 1

⁵EM se refiere a la escalera molecular de 1 kbp utilizada como referencia. Las muestras 4291 se representan con un 4; las muestras 9125, con un 9; y las muestras 2685, con un 2. Las muestras con el gen *SNCA* amplificado se representan con una letra P.

al 4), se mantuvieron en la parte superior del gel (Figura 6⁶). Sin embargo, se puede notar que el ADN de las muestras de sangre (pozos 3 y 4) mostraron bandas más notorias en comparación con las muestras de saliva (pozos 1 y 2). Por otro lado, los segmentos amplificados (pozos 1A a 4A) se encuentran ubicados en la parte inferior del gel, aproximadamente en 0.5 kbp. Estas, muestran múltiples bandas que no permiten distinguir cuál es el tamaño exacto del fragmento (Figura 6). Para llevar a cabo este ensayo PCR, se utilizaron los volúmenes de reactivos del ensayo realizado con anterioridad (Cuadro 7).

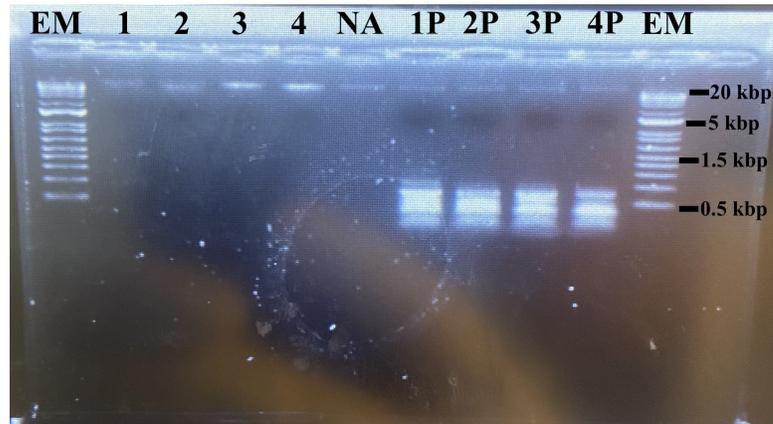


Figura 6: Gel de integridad y amplificación del gen *SNCA*, a partir de muestras de saliva y sangre del estudiante Diego Medina.

El progreso de la optimización de la amplificación del gen *SNCA*, se registro en una gráfica para su mejor entendimiento (Figura 7⁷). Se puede observar que los pesos moleculares de las bandas del primer ensayo PCR realizado, se encuentran entre 0.5 y 0.7 kpb (Figura 7). Por otro lado, los pesos moleculares de la optimización de los genes *APP*, *HTT* y *SNCA*, se encuentran entre 0.2 y 0.3 kbp aproximadamente (Figura 7). Con el tercer ensayo PCR, donde se buscaba optimizar la amplificación del gen *SNCA*, cambiando la temperatura de anillamiento, los pesos moleculares de las bandas se encontraron entre 0.1 y 0.2 kpb (Figura 7). Por último, en el último ensayo PCR realizado, los segmentos amplificados muestran pesos moleculares entre 0.35 y 0.5 kpb aproximadamente (Figura 7).

⁶EM se refiere a la escalera molecular de 1 kbp utilizada como referencia. Las muestras 1 y 2 son procedentes de saliva; las muestras 3 y 4, de sangre. Las muestras con el gen *SNCA* amplificado se representan con una letra P.

⁷Se muestran los pesos moleculares aproximados de las bandas obtenidas en cada ensayo PCR realizado.

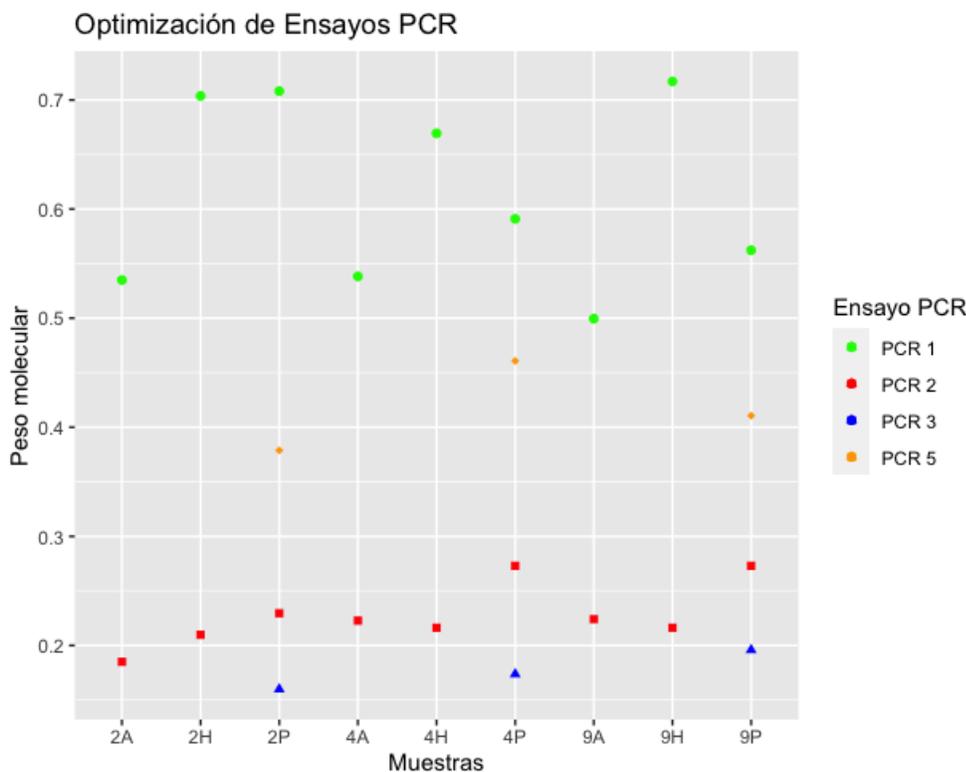


Figura 7: Cuantificación de segmentos en ensayos PCR.

8.1.4. Recomendación de pasos siguientes para la continuación del estudio genético

A pesar de los avances logrados en la optimización de la amplificación del gen *SNCA*, aún no se lograron resultados exitosos. Por tal razón, el primer paso para continuar con el presente estudio es optimizar la amplificación del gen mencionado. Se propone modificar las concentraciones de primers Forward y Reverse, aumentando hasta 0.5 μM . Así mismo, se sugiere aumentar la concentración de MgCl_2 a 5 mM, debido a que esto funcionó en la optimización de la amplificación de los genes *APP*, *HTT* y *SNCA* (Cuadro 6, ver página 42). Las concentraciones de reactivos y el protocolo de amplificación en el termociclador deben modificarse hasta que la amplificación del gen *SNCA* sea completamente exitosa. Esto, permitirá llevar a cabo los protocolos establecidos con los otros dos genes de interés.

Una vez se hayan amplificado los genes *APP*, *HTT* y *SNCA* satisfactoriamente, el siguiente paso es la secuenciación de las muestras. Se debe realizar nuevamente el reclutamiento de pacientes con dislexia, llevar a cabo la extracción de ADN de las muestras y amplificar los genes con el protocolo optimizado. Luego, los segmentos obtenidos en el gen de electroforesis pueden mandarse a secuenciar a cualquier empresa que ofrezca dicho servicio. Se propone realizar la secuenciación con la empresa MacroGen Humanizing Genomics (Seúl, Corea del Sur) debido al bajo precio, buena calidad y rapidez de envío de sus productos. Los primers utilizados en el presente estudio se adquirieron por medio de esta empresa.

Por último, al adquirir los resultados de la secuenciación de las muestras, se deberán utilizar herramientas bioinformáticas para el análisis de las mismas. Se recomienda utilizar el método de alineación de secuencias, utilizando el genoma de referencia hg38. Se debe analizar si existen polimorfismos (SNP) o mutaciones en el segmento secuenciado, es decir, diferencias entre los genes de los pacientes con dislexia y el genoma de referencia. Para realizar un estudio más concreto, se propone reclutar pacientes con las enfermedades neurodegenerativas de interés (Alzheimer, Parkinson y Huntington) y realizar extracción de ADN y amplificación de los genes *APP*, *SNCA* y *HTT*. Secuenciar los segmentos obtenidos del procedimiento y realizar nuevamente la alineación de secuencias, utilizando los genes de pacientes con dislexia y los de pacientes con enfermedades neurodegenerativas. De esta manera, se puede analizar si las mutaciones encontradas en dislexia, en caso de que hubieran, son las mismas que se manifiestan en estas enfermedades. Es importante recalcar que el estudio no es concluyente y que es necesario una investigación suficientemente amplia y profunda para determinar cualquier relación genética que pudiera existir. Esto, podría tomar años y múltiples experimentos para poder tener una conclusión definitiva.

8.2. Propuesta de ensayos preclínicos *in silico* para edición génica del gen de susceptibilidad de dislexia *KIAA0319*

8.2.1. Guías de ARN

Las secuencias de ARN guías generadas en el software CRISPick, fueron analizadas de acuerdo a su puntaje de eficacia y porcentaje de especificidad, para determinar la guía óptima para realizar la terapia. La secuencia 5-AGATAGACCAGACTGAGCTA-3, ubicada en la posición 873 pb, presentó el mejor puntaje de eficacia (100 %) (Cuadro 8). Así mismo, mostró un porcentaje de especificidad bajo (43%). Por otro lado, la secuencia con una posición de corte en 604 pb, fue la que presentó el menor porcentaje de especificidad (30.2%), así como, un puntaje de eficacia de 75 % (Cuadro 8).

Cuadro 8: *Secuencias guía de ARN resultantes del software CRISPick.*

Posición de corte	Secuencia sgRNA	Secuencia PAM	Puntaje de eficacia	% de especificidad
604	CAGTTGAAGCGGCTCCAATT	CGG	0.7515	30.2
873	AGATAGACCAGACTGAGCTA	TGG	1.042	43.6
702	CAGTTAAAGCGACTCCAATG	CGG	0.572	35.1
1237	GCTCCGGAAAGAGCATCCTT	GGG	0.7455	61.8
996	GCTCAAAGTGGTCCGGACTC	AGG	0.5565	49.8

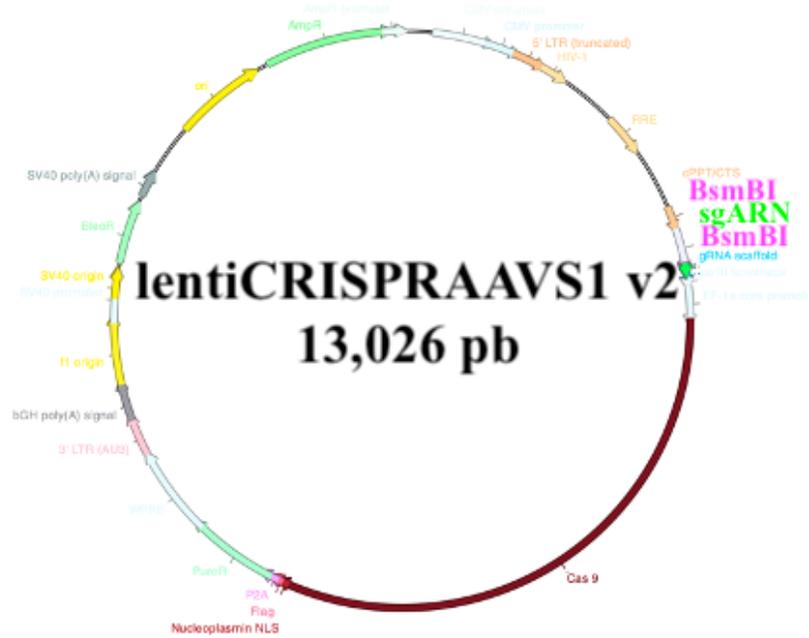


Figura 9: *Plásmido recombinante LentiCRISPRAAVS1 v2.*

8.2.3. Plásmido pAAVS1-DNR-KIAA0319

En el plásmido construido PAAVS1-DNR-KIAA0319, se observa un aumento en la cantidad de pares de bases que lo conforman (12,340 pb) (Figura 11), en comparación con el plásmido base utilizado (5,504 pb) (Figura 10). De la misma manera, dicho plásmido presenta, dentro de su secuencia, el gen *KIAA0319* que fue insertado, cuya longitud es de 6,838 pb (Figuras 11 y 46). Se puede notar que la secuencia del gen se encuentra dentro de los sitios de restricción SpeI y PacI, utilizados para realizar los cortes.

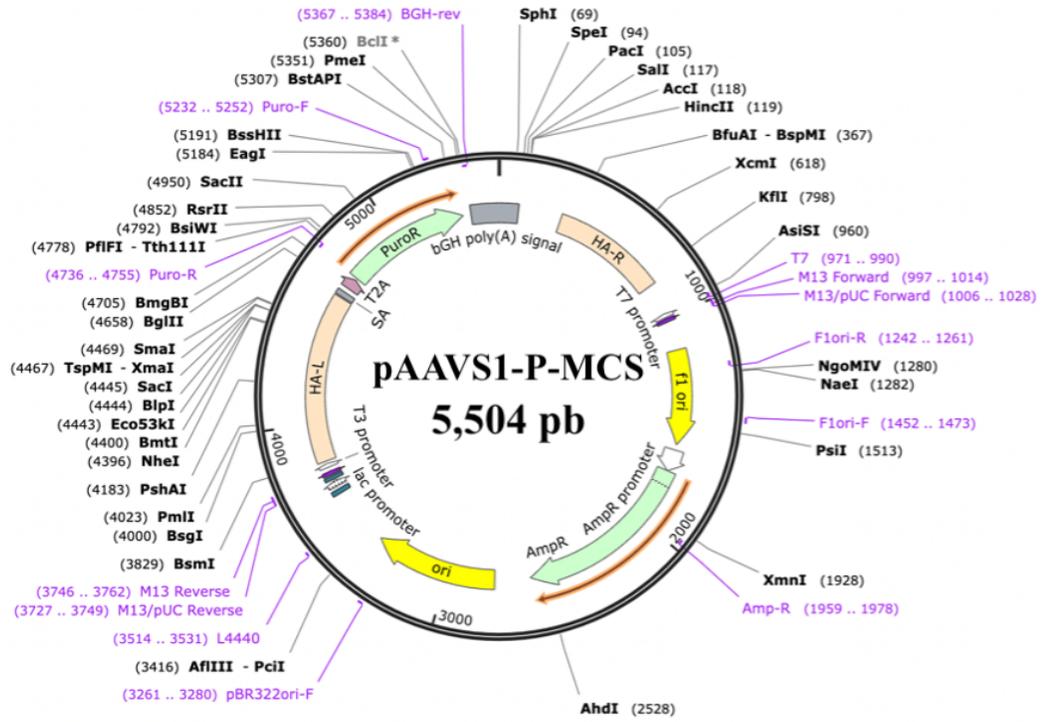


Figura 10: *Plásmido base pAAVS1-P-MCS*

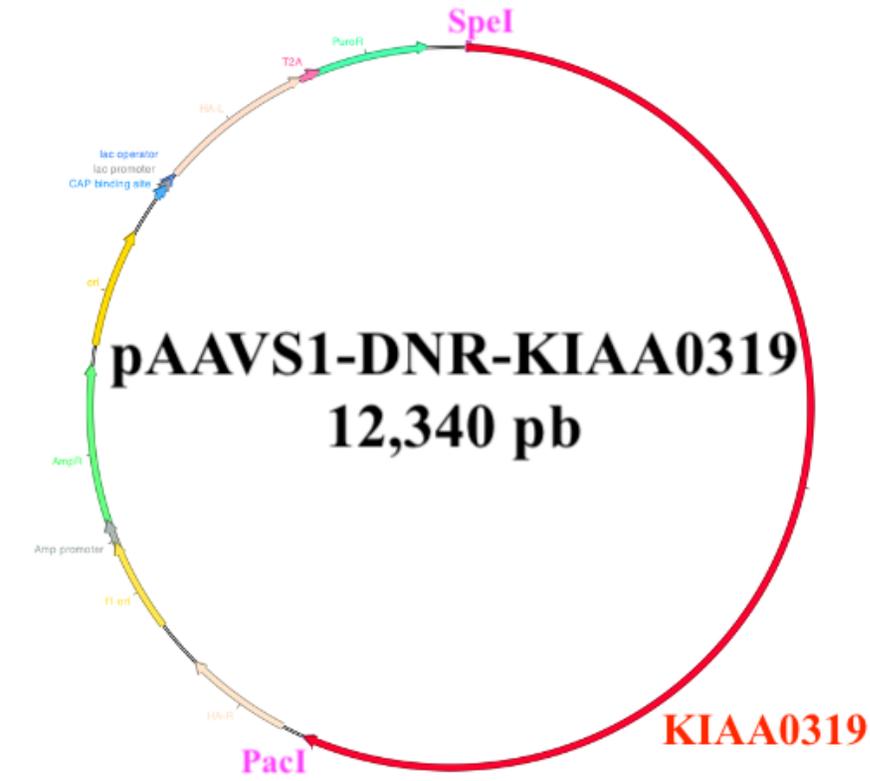


Figura 11: *Plásmido recombinante pAAVS1-DNR-KIAA0319*

9.1. Estudio genético piloto para la optimización de la amplificación gen *SNCA*, para ser aplicado en los genes *APP* y *HTT*

Durante el proceso de reclutación de sujetos de prueba, se presentaron inconvenientes para que los padres de familia aceptaran que sus hijos formaran parte del estudio. Por lo que, a pesar del esfuerzo por contactar múltiples centros especializados en intervención de dificultades específicas en el aprendizaje (DEA) fue necesario modificar el rango de edad establecido en un inicio. Al tomar en cuenta a jóvenes adultos y adultos, se obtuvieron muestras de 3 participantes. Estas se manejaron siguiendo las normas bioéticas correspondientes en cada etapa de la investigación.

El primer paso en el estudio consistió en el diseño de los primers correspondientes para la amplificación de los genes *SNCA*, *APP* y *HTT*. Las secuencias con una longitud entre 18 y 24 pares de bases (bp) suelen ser óptimos al momento de llevar a cabo ensayos PCR (Dieffenbach et al., 1993). Así también, los oligonucleótidos con un porcentaje GC entre 50 % y 60 % y una temperatura (T_m) entre 56 °C y 70 °C presentan un anillamiento eficiente en el procedimiento (Dieffenbach et al., 1993). Los *primers* diseñados se encuentran dentro de los rangos aceptables de los distintos parámetros (Figura 8). Además, de acuerdo a los ensayos PCR *in silico* realizados se validó el diseño de los *primers* y se estableció el tamaño esperado de las bandas en la amplificación de los genes.

Luego, se procedió a optimizar la extracción de ADN a partir de las muestras de saliva recolectadas. Las mediciones de la concentración de ADN y su pureza, llevadas a cabo utilizando el espectrofotómetro NanoDrop One, comprobaron que el material genético de las tres muestras fue extraído exitosamente, sin embargo, con una concentración baja. La

muestra 4291 fue la que presentó la mayor concentración (36.1 ng/mv), mientras que, se obtuvieron concentraciones bajas en las otras dos muestras (9125 y 2685), 10.8 ng/mv y 7.3 ng/mv respectivamente (Cuadro 3). Un valor de aproximadamente 1.8 de la tasa A260/A280 representa que el ADN es aceptablemente puro. Si el valor de dicha tasa es menor a 1.6 puede que se encuentren proteínas y otras moléculas contaminantes dentro de la muestra (Lucena-Aguilar et al., 2016). Los valores A260/A280 de las muestras 9125 y 2685 se encuentran dentro del rango aceptable. Por otro lado, la muestra 4291 presentó un valor ligeramente por debajo del límite aceptable en este indicador. Debido a que dicho valor se encuentra cercano al límite se determinó que es suficientemente puro para ser utilizado en los procedimientos posteriores.

La tasa A260/A230 se utiliza como un indicador secundario de pureza. El rango normal o aceptable para este valor se encuentra entre 2.0 y 2.2 (Lucena-Aguilar et al., 2016). Para todas las muestras, el valor A260/A230 se encontraron por debajo del límite, por lo que se puede decir que la calidad del ADN es significativamente mala (Cuadro 3). A pesar de lo anterior, este indicador puede ser erróneo por su inestabilidad cuando se utiliza un buffer de elución para disolver el ADN (Lucena-Aguilar et al., 2016). Dado que en el procedimiento se utilizó un buffer TE para resuspender las muestras es coherente que los valores obtenidos de dicha tasa no sean confiables. Por tal razón, se estableció que las muestras son lo suficientemente puras para ser utilizadas. Esto, además, puede comprobarse con los resultados de la prueba de integridad. Los segmentos de ADN de todas las muestras se ubicaron en la parte superior del gel, es decir que no migraron a través de este (Figura 1). Esto se explica debido a que la cadena principal del ADN está cargada negativamente, gracias a su grupo fosfato, lo que lo ayuda a migrar por el gel. A medida que el segmento es más grande, también es más pesado, es decir, que se traslada una menor distancia (Lee et al., 2012). Las muestras contienen el ADN completo de los sujetos, por lo tanto se esperaba observar que éstos no migraran y se mantuvieran en la parte superior del gel.

Dado que las muestras de ADN eran suficientemente aptas para el procedimiento se procedió a realizar un ensayo PCR que buscaba la amplificación de los genes *APP* (Alzheimer), *HTT* (Huntington) y *SNCA* (Parkinson). Al correr el gel de electroforesis se observó que todos los segmentos amplificados se encontraban en la misma posición, pero las bandas eran borrosas y opacas (Figura 2). Debido a esto se determinó que el ensayo PCR no se había realizado correctamente. Es importante recalcar que las concentraciones de reactivos utilizadas son condiciones que funcionan para una gran variedad de ensayos PCR, pero no funcionan en todos los casos. Consecuentemente, el proceso puede optimizarse cambiando dichas concentraciones para obtener los resultados deseados (Saiki, 1989). En este caso, se determinó que debía modificarse la concentración de los primers y de cloruro de magnesio. Al realizar la segunda amplificación, se observaron las bandas claras y brillantes en el gel (Figura 3), lo que afirma que las concentraciones fueron modificadas correctamente. Sin embargo, los genes amplificados tienen diferentes longitudes: *APP* (2.5 kbp), *HTT* (9.6 kbp) y *SNCA* (700 bp). Por lo tanto, se esperaba que las bandas de los distintos genes se ubicaran en posiciones diferentes dentro del gel (Lee et al., 2012). Al cuantificar los segmentos amplificados en este ensayo PCR se obtuvieron pesos moleculares entre 0.15 y 0.3 kpb, lo que representa una disminución en comparación con los obtenidos en el primer ensayo PCR (Figura 7). Dichos valores están sumamente alejados de las longitudes de los genes estudiados. De acuerdo al resultado obtenido, se estableció que la amplificación de los genes no se llevó a cabo de forma correcta. El resultado fallido pudo deberse a que la temperatura

de anillamiento era más alta que el requerimiento del *primer* Reverse para el gen *SNCA*. Cuando esta temperatura no se encuentra cercana al requerimiento de los primers se pueden formar productos no específicos (Rychlik et al., 1990). Por tal razón, se repitió el ensayo PCR modificando la temperatura de anillamiento en el termociclador.

En el tercer ensayo PCR se obtuvieron resultados similares a los observados anteriormente, con respecto a la ubicación de los segmentos amplificados (Figura 4). Esto se puede comprobar en la cuantificación de los pesos moleculares, donde se observó que los segmentos presentaron una longitud cercana a la obtenida en el ensayo PCR realizado anteriormente (Figura 7). Los pesos moleculares aún se encontraron lejanos al peso molecular del gen *SNCA*. Dado el resultado se estableció que la temperatura de anillamiento no era la razón de la incorrecta amplificación de los genes. Se hipotetizó que la temperatura de desnaturalización y las concentraciones de los *primers* podían estar afectando en el proceso. Si la temperatura de desnaturalización no es la adecuada, el ADN no se deshibridiza y no permite que los primers se adhieran para llevar a cabo la amplificación (Rychlik et al., 1990). Por lo tanto, se realizaron las modificaciones correspondientes y se repitió el ensayo PCR. No se observaron segmentos en el gel de electroforesis al llevar a cabo el cuarto ensayo PCR, es decir, que no hubo amplificación en absoluto (Figura 5). Se estableció que la temperatura de desnaturalización y la concentración de los *primers* no fueron la causa de la incorrecta amplificación en los ensayos anteriores.

Es común que los ensayos PCR estén expuestos a sustancias inhibitoras que resulten en datos falsos positivos (Schrader et al., 2012). Es por esto que se hipotetizó que el ADN extraído de las muestras de los pacientes con dislexia contenía sustancias contaminantes que provocaban la inhibición de la amplificación. Para comprobar dicha hipótesis se realizó extracción de ADN a partir de muestras de saliva y sangre del estudiante Diego Medina, por medio del kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen, USA). En general, la concentración y pureza del ADN resultante fue mayor en comparación con las muestras de pacientes con dislexia (Cuadro 3 y 4). Cabe notar que las muestras de sangre presentaron mejores resultados que las muestras de saliva (Cuadro 4). De la misma forma, al realizar la prueba de integridad se observaron segmentos más distintivos en las muestras de sangre (Figura 6). Dichos resultados permiten establecer que la extracción de ADN a partir de las muestras de saliva, proporcionadas por pacientes con dislexia, no fue exitosa como se pensaba y que debe optimizarse utilizando un kit específico para este propósito. Además, aunque es más invasivo para los pacientes, el procedimiento puede mejorarse al utilizar muestras de sangre.

Al realizar la amplificación del gen *SNCA*, utilizando las muestras de ADN extraídas del estudiante Diego Medina, se observaron bandas brillantes ubicados aproximadamente en 0.5 kbp (Figura 6). Al cuantificar los pesos moleculares de los segmentos amplificados se comprobó que éstos se encontraron cercanos a 0.5 kbp (Figura 7). Por lo tanto, se puede afirmar que se optimizó ligeramente la amplificación del gen *SNCA*, aunque aún no se obtuvo el resultado esperado. Sin embargo, las muestras presentan múltiples bandas que no permiten distinguir cuál es el tamaño verdadero del segmento. Esto, probablemente, se debe a la formación de dímeros al momento que los primers se adhieren al ADN. Se ha demostrado que los dímeros inhiben la reacción PCR provocando la aparición de bandas falsas en adición a la banda original del segmento que se desea amplificar (Bacich et al., 2011). Es necesario comprobar que los productos inespecíficos son ocasionados por la formación de dímeros. Para evitar la aparición de este fenómeno es necesario realizar la amplificación del gen con

modificaciones en la concentración de los reactivos utilizados y en las temperaturas del protocolo en el termociclador. De esta manera se podría amplificar exitosamente el gen, finalmente. Dada la mejora en los resultados se comprobó que la extracción de ADN, a partir de las muestras de saliva de pacientes con dislexia, no fue realizada óptimamente y, por lo tanto, es la causa principal de la incorrecta amplificación de los genes estudiados.

9.2. Propuesta de terapia génica *in silico* para tratamiento de dislexia

Se logró diseñar una propuesta de terapia génica *in silico* para el tratamiento de dislexia utilizando el método CRISPR/Cas9. Es importante recordar que se buscaba realizar knock-in del gen KIAA0319, relacionado con susceptibilidad para desarrollar dislexia. Para lograr esto, los pasos que se siguieron fueron: generar secuencias de ARN guía y construcción de dos plásmidos recombinantes LentiCRISPRAAVS1 v2 y pAAVS1-DNR-KIAA0319.

En cuanto al primer paso, se determinó la secuencia 5-AGATAGACCAGACTGAGCTA-3, ubicada en la posición 873 pb, presentó los mejores porcentajes de eficacia (100 %) y especificidad (43.6 %) (Cuadro 8). De la misma manera, el porcentaje de especificidad encontrado en la plataforma Benchling es el mejor entre las secuencias (51.8 %), sin embargo, el puntaje de eficacia no corresponde al encontrado en la plataforma CRISPick (Cuadro 9). A pesar de lo anterior, los parámetros obtenidos utilizando la plataforma Benchling son similares a los de guías de ARN utilizadas para realizar ingeniería genética en el sitio AAVS1 Mali et al., 2013 Natsume et al., 2016 Udy y Bradley, 2022. Por esta razón, se estableció la guía de ARN mencionada para llevar a cabo la propuesta de terapia génica *in silico* para el tratamiento de dislexia.

La guía de ARN seleccionada se utilizó para construir el plásmido recombinante encargado de realizar el corte en el sitio AAVS1. La región anterior fue seleccionada debido a que es un puerto seguro para la inserción de genes, por lo que, ha sido utilizado exitosamente para la implementación de expresión génica en líneas celulares Hong et al., 2017. La introducción de la secuencia se realizó satisfactoriamente al utilizar los sitios de corte de la enzima BsmBI (Fig. Suplementaria 33) Udy y Bradley, 2022, que se puede notar al comparar los tamaños del plásmido base LentiCRISPR v2 y el plásmido recombinante LentiCRISPRAAVS1 v2 (Fig. ??). Los sitios de restricción no solo se encuentran en un segmento donde no hay secuencias importantes, sino que son contrarias y complementarias. Consecuentemente, la guía de ARN puede insertarse en la dirección deseada, evitando problemas de lectura al momento de llevar a cabo el proceso de CRISPR/Cas9 Janscak et al., 1999. Adicionalmente, se puede notar que el plásmido recombinante contiene todos los componentes esenciales: origen de replicación (ori); marcadores de selección, en este caso genes de resistencia a ampicilina, puromicina y bleomicina; expresión de la endonucleasa Cas9, necesaria para realizar el corte en la región deseada utilizando el método CRISPR/Cas9 Zhan et al., 2019. Por lo tanto, la construcción del plásmido recombinante LentiCRISPRAAVS1 v2 fue efectuada según lo esperado.

Además de lo anterior, se construyó un plásmido recombinante encargado de la inserción del gen *KIAA0319*. Debido a que la modificación genética utilizaría como base la repara-

ción homóloga del ADN, la selección del plásmido base fue de suma importancia, ya que debía contener los brazos homólogos al sitio AAVS1. Estos, son necesarios para asegurar una mejor especificidad en la ubicación de la inserción del gen, evitando una traslocación aleatoria. La misma estrategia se ha empleado en estudios de expresión transgénica en células pluripotentes inducidas (iPSC) Ocegüera-Yanez et al., [2016](#) Por esta razón, el plásmido pAAVS1-P-MCS por Knut Woltjen (Addgene #80488) es el adecuado para la recombinación. Se identificaron sitios de corte utilizando las enzimas SpeI y PacI, que así como en el plásmido anterior, permiten que el gen pueda introducirse en la dirección deseada. Se puede apreciar, que el gen KIAA0319, relacionado con susceptibilidad para dislexia, se insertó adecuadamente en la posición entre los dos brazos homólogos (Figura [43](#)). Dado lo anterior, se demostró que la propuesta de una terapia génica *in silico* para el tratamiento de dislexia fue realizada eficazmente y que, por lo tanto, es una opción viable para generar un nuevo método para ayudar a las personas que la presentan.

Como resultado de la construcción de plásmidos recombinantes, se cuenta con los componentes básicos necesarios para el diseño de una nueva terapia génica Food and Administration, [2022](#). Por lo tanto, lo propuesto en el presente estudio es válido bajo el marco regulatorio establecido por la FDA. Esto, indica que el método de tratamiento de dislexia creado es un producto listo para escalar a estudios preclínicos.

Sin embargo, es importante analizar la seguridad de utilizar esta tecnología para crear una terapia para el tratamiento de dislexia. Actualmente, alrededor del mundo, se están realizando múltiples terapias para tratar una diversidad de enfermedades. El único problema es que solamente una ha sido aprobada por entes reguladores para ser utilizada en el mercado Wilkinson, [2023](#). Esto se debe a que se trata de un procedimiento complejo y delicado, que presenta algunas desventajas. Entre éstas se puede encontrar la probabilidad de introducir el gen en un segmento no deseado, respuestas inmunológicas o la dificultad de distribución del sistema Cas 9 en ambientes *in vivo* Ghorui y Baksi, [2023](#), en el que se deben realizar estudios que aseguren el bienestar de los pacientes, es decir, es de suma importancia cumplir con las normas bioéticas. Debido a esto, el proceso de aprobación para que una terapia génica pueda llegar al mercado puede llevar décadas. Dado lo mencionado anteriormente, vale la pena evaluar la factibilidad de realizar la terapia utilizando la tecnología CRISPR/Cas9.

Procedimiento detallado de pasos futuros para aprobación de terapia génica para tratamiento de dislexia

10.1. Experimentación *in vitro*

En el presente estudio se planteó una terapia génica para el tratamiento de dislexia completamente *in silico*. Es decir, que lo propuesto es puramente la teoría de cómo funcionaría dicha estrategia, lo que en otras palabras se conoce como el diseño del producto. Como se mencionó anteriormente, todo lo realizado se encuentra bajo el marco regulatorio de la FDA. A continuación, se detallará el procedimiento propuesto para que el proyecto pueda escalar a etapas más avanzadas.

El primer paso que debe realizarse es la transformación bacteriana con el objetivo de crecer una gran cantidad de plásmidos. La razón por la que esta fase se lleva a cabo en bacterias es porque su ciclo de división celular tiene una duración de aproximadamente 20 minutos, lo que es significativamente menor que el de una célula eucariota que dura hasta 24 horas (Alberts, 2017). Debido a la gran cantidad de estudios realizados en la bacteria *E. Coli*, respecto a su genética (Lederberg y Lederberg, 1953), bioquímica (Wang, 2002) y transformación (Miller y Nickoloff, 1995), se propone utilizar dicha bacteria.

Los plásmidos recombinantes fueron agregados y pueden encontrarse en la plataforma Addgene bajo los números de identificación #206877 (pAAVS1-DNR-KIAA0319) y #206876 (LentiCRISPRAAVS1 v2) (Figura 12). Esto facilita el proceso, ya que solamente tienen que ordenarse los plásmidos en la página y no construirlos en el laboratorio, lo que conlleva una serie de pasos que podrían influir tanto en la duración como en los resultados del estudio. Toda vez ya se cuente con los plásmidos es necesario volver competentes a las bacterias para que éstos puedan introducirse. Para esto se propone emplear el método “heat shock”, que consiste en un cambio rápido de temperatura, lo que se sugiere que genera una

disminución de potencial en la membrana facilitando la entrada de ADN (Panja et al., 2006). Las bacterias con los plásmidos deben cultivarse en placas de agar LB que contengan los antibióticos ampicilina o puromicina, que son marcadores de selección que permiten identificar que las bacterias fueron transformadas; así también, se le debe agregar medio SOC que contiene glucosa y se ha demostrado que aumenta la eficiencia de transformación (Sun et al., 2009).

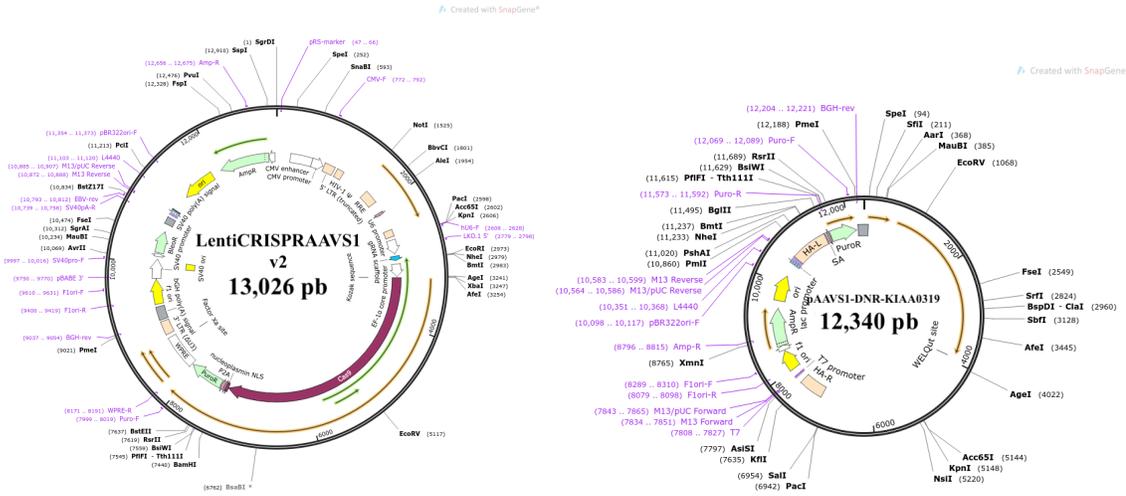


Figura 12: Plásmidos recombinantes en la plataforma Addgene.

El paso siguiente sería aislar los plásmidos recombinantes para utilizarse en líneas celulares humanas. El procedimiento es similar al utilizado para extracción de ADN descrito anteriormente en el presente estudio. Existen kits que incluyen todas las soluciones necesarias y que describen la metodología que debe seguirse. Sin embargo, también se puede utilizar el protocolo descrito por Ehrt & Schnappinger (2003) (Ehrt y Schnappinger, 2003).

Las células para realizar la transfección pueden ser compradas de cualquier distribuidor autorizado de líneas celulares. Cabe recalcar que por la naturaleza del estudio es necesario utilizar líneas celulares neuronales. Por ejemplo, se podría utilizar una línea de neuroblastoma SH-SY5Y, que ha sido utilizada ampliamente en estudios neuronales (Gordon y Amini, 2021). Así mismo, es de suma importancia resaltar que el estudio no puede llevarse a cabo en líneas celulares embrionarias, únicamente en células somáticas para evitar que el resultado de la inserción del gen *KIAA0319*, sea beneficioso o perjudicial, pueda ser heredado (Martello y Smith, 2014). El proceso de transfección celular puede realizarse por medio de múltiples métodos, sin embargo, en el presente estudio se sugiere emplear uno de los más simples: electroporación, que ha sido utilizado exitosamente en diversos estudios con células mamíferas (Furuya et al., 2003; Lukas et al., 1994; Bian et al., 2017). Esta metodología consiste en aplicar pulsos eléctricos cortos de alto voltaje provocando cambios en la permeabilidad de la membrana que pueden ser regulados por la amplitud o duración de los pulsos (Fus-Kujawa et al., 2021). Las células deben cultivarse junto con los plásmidos recombinantes, aislados previamente, en medio que contenga sulfoxido dimetilo (DMSO), para aumentar la eficiencia de la transfección (Melkonyan et al., 1996) y puromicina (antibiótico), que es el marcador de selección.

Por último, se puede realizar un ensayo Southern Blot, utilizando líneas no trasfectadas de los mismos pacientes como control. Este tipo de ensayo permite analizar el número de

copias del transgen (Ballester et al., 2004). Sin embargo, es necesario realizar PCR como complemento para determinar que el gen *KIAA0319* fue insertado satisfactoriamente en las células humanas. Se recomienda secuenciar el gen obtenido de la PCR para comprobar que se encuentra intacto y no presenta mutaciones. Por otro lado, es valioso realizar un estudio Western Blot que permite separar proteínas por medio de electroforesis y anticuerpos (Hnasko y Hnasko, 2015). Esto permitiría establecer si se está sintetizando correctamente o no la proteína que se ve afectada debido a las mutaciones que presentan personas con dislexia.

10.2. Resultados esperados de experimentación *in vitro*

Si la transformación bacteriana, utilizando los plásmidos recombinantes, es ejecutada de manera correcta, se deberían observar colonias de bacterias creciendo en las placas de cultivo. Debido a que los plásmidos contienen el gen de resistencia a ampicilina (marcador de selección), solamente las bacterias que integraron los plásmidos deberían ser capaces de crecer en esas condiciones. Al momento de aislar los plásmidos se debe realizar una medición de concentración utilizando un espectrofotómetro. Los valores de pureza obtenidos de la medición deberían encontrarse entre el rango aceptable: A260/A280 entre 1.8 a 2.0 y A260/A230 entre 2.0 a 2.2 (Lucena-Aguilar et al., 2016). Por otro lado, un procedimiento realizado incorrectamente resultaría en placas de cultivo que no presentan crecimiento bacteriano o en valores de pureza fuera del rango aceptable, lo que indica que la muestra está contaminada.

Los mismos resultados deben obtenerse al momento de efectuar la transfección celular; solamente las placas que presentan crecimiento celular integrarán satisfactoriamente el gen *KIAA0319*. Esto se debe a que los plásmidos contienen el gen de resistencia a puomicina (marcador de selección), por lo tanto son las únicas que pueden sobrevivir en el cultivo con este antibiótico. Una inserción exitosa del gen debería mostrar bandas de un tamaño de aproximadamente 7 kb en el gel de electroforesis, tanto para el ensayo Southern Blot como para la PCR, debido a que el gen *KIAA0319* tiene una longitud de 6,838 pb. Complementariamente, la secuenciación del gen insertado debe contener exactamente la misma secuencia que puede encontrarse en el *software* Ensembl. Al realizar el alineamiento de ambas secuencias, no se deberían observar diferencias en absoluto.

Por último, los resultados al realizar un Western Blot deberían mostrar bandas de la proteína deseada si se lleva a cabo correctamente. Las bandas mostrarán mayor o menor intensidad dependiendo de la cantidad de proteína que está siendo sintetizada. Sin embargo, el simple hecho de observar una banda clara indicaría que la proteína correcta está siendo sintetizada gracias a la inserción del gen *KIAA0319* en el genoma de las líneas celulares. Se puede apreciar en la imagen de referencia un ejemplo de los resultados que se pueden obtener en un ensayo Western Blot (Figura 13). En el “eje y” de la gráfica, se muestran distintas proteínas incluyendo el control y en el “eje x”, las líneas celulares de las que fue extraída la proteína.

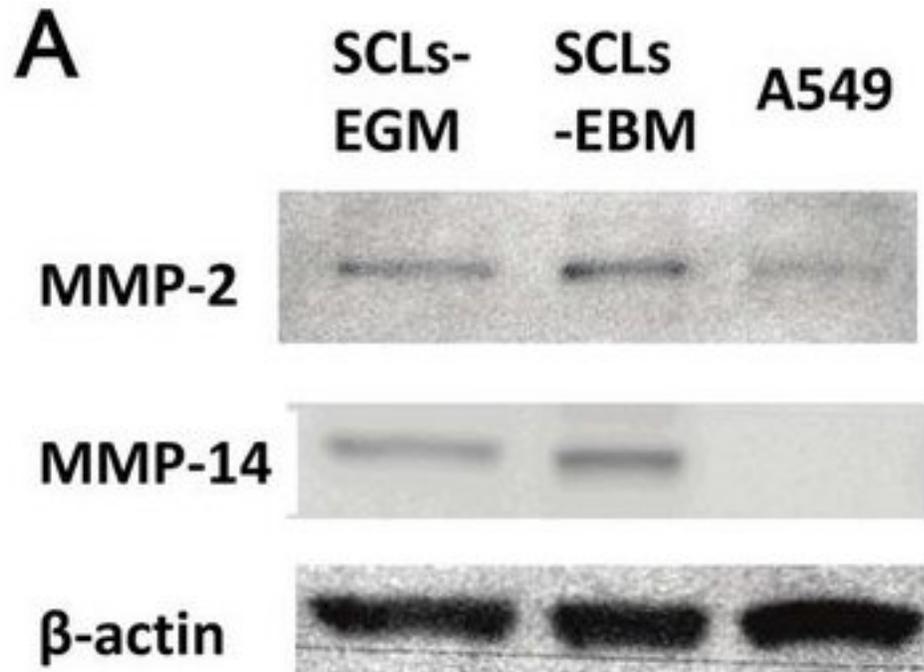


Figura 13: Imagen de referencia de los resultados esperados de un ensayo Western Blot (Jujo et al., 2014).

10.3. Estrategias para futuras investigaciones

10.3.1. Estudios preclínicos

Según la normativa de la FDA, luego de realizar la experimentación *in vitro* y que el producto haya sido aprobado, se debe continuar con los estudios preclínicos. Con estos estudios se busca determinar la dosis óptima de terapia a suministrar a los pacientes, en este caso, a las células; identificar si existen dosis tóxicas de la terapia y establecer una ruta de administración segura (Food y Administration, 2022). Por tal razón, en esta sección se describirán una serie de experimentos que se consideran necesarios para la aprobación del estudio en etapas más avanzadas.

Anteriormente, se plantearon los experimentos correspondientes para determinar que la terapia funcionaría. Sin embargo, es de suma importancia repetir la transfección celular utilizando distintas concentraciones de plásmidos recombinantes. El objetivo de este experimento es determinar cuál es la dosis óptima de plásmidos a agregar en un cultivo celular de un paciente, así como, establecer si existen dosis que pueden resultar tóxicas o dañinas. Será necesario evaluar la cantidad de células que hayan crecido en el cultivo luego de la transfección, el estado en el que se encuentran, el tiempo de vida una vez hayan incorporado los plásmidos y la capacidad de síntesis de la proteína deseada.

Una vez establecida la dosis óptima y las dosis dañinas, se puede trasladar el estudio a experimentación con animales. Es de vital importancia escoger un modelo animal que

se asemeje a la fisiología de la condición que se busca tratar con la terapia génica (Food and Administration, 2022). Es decir, que el sistema nervioso del modelo animal debe ser lo más cercano al del humano y debe presentar las características de la dislexia, que en este caso es una mutación en el gen KIAA0319. El gen objetivo ya se ha estudiado en ratas y se ha descubierto que está relacionado con la migración de neuronas durante el desarrollo cerebro-cortical (Peschansky et al., 2010; Adler et al., 2013). Además, se ha descrito la creación de ratas transgénicas, mediante el knockdown del gen *KIAA0319*, que presentan una expresión disminuida de la proteína (Galaburda, 2022). Dado lo anterior, se recomienda utilizar ratas como modelo animal para realizar la continuación de los estudios preclínicos de la terapia génica. Se debe evaluar la factibilidad de crear el modelo animal necesario para la experimentación o la compra de éste. Así mismo, se deben tomar en cuenta todas las normas bioéticas pertinentes para llevar a cabo esta fase del estudio.

10.3.2. Ensayos clínicos

El último paso necesario antes que la terapia génica pueda salir al mercado, es la aprobación de los estudios clínicos. Se debe diseñar todo este proceso de tal forma que se tomen en cuenta las medidas de seguridad de la administración del producto a los pacientes, monitoreo de la eficiencia y seguridad del tratamiento y darle el seguimiento adecuado a largo plazo (Food and Administration, 2022). Esta fase del estudio es la más complicada e importante, por lo tanto, debe efectuarse de la manera más controlada posible.

La selección adecuada de la población objetivo para esta fase, contribuye a minimizar los riesgos potenciales y asegura los mayores beneficios para los pacientes. Por tal razón, se recomienda establecer que los estudios sean llevados a cabo primero en adultos, especialmente aquellos cuya dislexia es grave. Es decir, los que presentan Dislexia de Doble Déficit y a los que se les dificulta grandemente desempeñarse correctamente, tanto profesionalmente como académicamente. Es importante mencionar que se debe comprobar que los beneficios de la terapia sobrepasan los riesgos asociados (Food and Administration, 2022).

En fases anteriores del estudio, se mencionó que debe establecerse la dosis óptima de plásmidos recombinantes. Sin embargo, se debe reevaluar si ésta es la óptima para los pacientes. Por lo tanto, basados en la dosis establecida, se debe crear un plan de cantidad y recurrencia del tratamiento. Así mismo, es importante generar el plan de gestión de riesgos. Este, debe tomar en consideración todos los posibles eventos que podrían dañar la salud de los pacientes durante todo el proceso de los estudios clínicos.

Una vez se haya aprobado la fase uno de los estudios clínicos, se puede aumentar la cantidad de pacientes a los que se les administrará la terapia génica. Por lo tanto, podrán agregarse adolescentes como parte de la población estudiada, antes de incluir niños. Cuando el estudio esté más avanzado, se podrá estudiar la terapia en sujetos pediátricos. La aprobación de la terapia en la fase 4 de los estudios clínicos, significará que el producto está listo para salir al mercado para ayudar a miles de personas alrededor del mundo. Aunque suena irreal, ese es el objetivo final de la terapia génica *in silico* para tratamiento de dislexia que fue desarrollada en este trabajo.

- Se implementó un protocolo estándar de obtención de muestras para el análisis de datos humanos en Guatemala. Se formularon cuatro documentos que contienen información relacionada a la seguridad del paciente, protección de datos personales, criterios de reclutamiento-inclusión o exclusión y un consentimiento informado. Utilizando este protocolo, se realizó el reclutamiento de pacientes jóvenes adultos y adultos. Además, se obtuvieron y manejaron correctamente las muestras de saliva proporcionadas de acuerdo a las normas bioéticas correspondientes.
- Se llevó a cabo un estudio piloto para la optimización de extracción de ADN y amplificación del gen *SNCA*. Una posible causa de los ensayos PCR fallidos fue la baja concentración y pureza de las muestras de ADN de los pacientes de dislexia, así como la existencia de agentes inhibidores. La presencia de sustancias inhibidoras es común al realizar ensayos PCR y un factor importante que se debe tomar en cuenta al llevarlos a cabo. Estas generan productos inespecíficos que provocan una mala interpretación de los resultados. Por esta razón, es necesario optimizar tanto la extracción de ADN como la amplificación de los genes. Se determinó que al realizar la extracción de ADN utilizando un kit, específico para este propósito, permite obtener una mayor concentración y pureza del mismo, especialmente, si el procedimiento es realizado a partir de muestras de sangre. Por último, se estableció que la modificación en la concentración de los distintos reactivos empleados y las temperaturas del proceso en el termociclador, mejora significativamente los resultados de la amplificación de genes. Esto, se debe a que al haber una mayor concentración de *primers* y MgCl₂ (cofactor de la polimerasa), se induce una mayor probabilidad de que éstos sean sintetizados por la enzima. Sin embargo, aún es necesario optimizar el protocolo de amplificación para obtener resultados exitosos que permitan la secuenciación de las muestras.
- Se diseñó una terapia génica *in silico* para el tratamiento teórico de dislexia mediante el método CRISPR/Cas9. A lo largo del presente trabajo, se detalló el proceso completo para desarrollar el producto, utilizando múltiples *softwares* disponibles. Se generaron y validaron, en las herramientas Broad Institute GPP y Benchling, cinco secuencias guía de ARN para realizar *knock-in* del gen KIAA0319. Al analizar la especificidad

y la eficacia de las secuencias resultantes, se determinó la secuencia óptima para llevar a cabo la terapia génica. Esto permitió construir exitosamente dos plásmidos recombinantes, uno para realizar el corte en el ADN y otro que funciona como donante para insertar el gen *KIAA0319* en el genoma. Los plásmidos cumplen con todos los requerimientos establecidos por la FDA, por lo que, bajo el marco regulatorio, el producto diseñado puede ser escalado a estudios preclínicos.

- Utilizando el producto diseñado en el estudio, se propuso la metodología detallada para realizar el *knock-in* del gen *KIAA0319* en estudios *in vitro*. Se recomendaron los pasos que se deben llevar a cabo para generar una gran cantidad de plásmidos recombinantes por medio de transformación bacteriana, como efectuar la trasfección celular utilizando líneas neuronales y ensayos que podrían contribuir a determinar la efectividad y seguridad del tratamiento. También, se describieron los resultados que podrían esperarse de realizar los experimentos propuestos. Por último, se sugirieron las estrategias para fases más avanzadas del estudio, estudios preclínicos y clínicos. Utilizando los marcos regulatorios de la FDA, se determinaron los pasos a seguir y las consideraciones que deben tomarse en cuenta en estas fases.

Recomendaciones

Para futuros estudios, se recomienda realizar la extracción de ADN utilizando un kit, ya que estos incluyen los reactivos necesarios y un protocolo estandarizado. Aunque el procedimiento es más invasivo, es preferible utilizar muestras de sangre para obtener una mayor concentración y pureza del ADN extraído. Asimismo, se recomienda optimizar el proceso de amplificación de los genes estudiados al modificar la concentración de los *primers* y de cloruro de magnesio para evitar la formación de dímeros. En caso de que no funcione, se recomienda modificar las temperaturas del protocolo del termociclador, especialmente la de anillamiento. Por último, no se recomienda realizar la secuenciación de las muestras hasta que la amplificación sea totalmente exitosa para evitar resultados erróneos.

Tomando en consideración que la propuesta *in silico* es solamente el planteamiento teórico de una posible terapia génica que tiene el potencial de tratar dislexia, se proponen algunas sugerencias para continuar con este estudio. Primeramente, se recomienda investigar a profundidad las regulaciones y requerimientos específicos para terapias génicas establecidos por la FDA. Se considera que esto ayudará a tener un mejor entendimiento de los pasos que se deben llevar a cabo, así como de experimentos adicionales que podrían ser necesarios para validar la terapia. Es importante recordar que, aunque se sugirieron experimentos que se consideran esenciales y sus posibles resultados, al realizar la investigación, se pueden encontrar obstáculos y variables inesperadas que podrían influenciar en el proceso. Por lo tanto, se recomienda utilizar la metodología planteada en el presente trabajo como guía, pero realizar cambios de ser necesario.

- Adler, W. T., Platt, M. P., Mehlhorn, A. J., Haight, J. L., Currier, T. A., Etchegaray, M. A., Galaburda, A. M., & Rosen, G. D. (2013). Position of neocortical neurons transfected at different gestational ages with shRNA targeted against candidate dyslexia susceptibility genes. *PloS one*, *8*(5), e65179.
- Aidar, M., & Line, S. R. P. (2007). A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Brazilian dental journal*, *18*, 148-152.
- Alberts, B. (2017). *Molecular biology of the cell*. Garland science.
- Bacich, D. J., Sobek, K. M., Cummings, J. L., Atwood, A. A., & O'Keefe, D. S. (2011). False negative results from using common PCR reagents. *BMC Research Notes*, *4*(1), 1-7.
- Ballester, M., Castelló, A., Ibáñez, E., Sánchez, A., & Folch, J. M. (2004). Real-time quantitative PCR-based system for determining transgene copy number in transgenic animals. *Biotechniques*, *37*(4), 610-613.
- Bian, S., Zhou, Y., Hu, Y., Cheng, J., Chen, X., Xu, Y., & Liu, P. (2017). High-throughput in situ cell electroporation microsystem for parallel delivery of single guide RNAs into mammalian cells. *Scientific reports*, *7*(1), 42512.
- Cao, Q., Tan, C.-C., Xu, W., Hu, H., Cao, X.-P., Dong, Q., Tan, L., & Yu, J.-T. (2020). The prevalence of dementia: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Alzheimer's Disease*, *73*(3), 1157-1166.
- Centanni, T. M., Booker, A. B., Chen, F., Sloan, A. M., Carraway, R. S., Rennaker, R. L., LoTurco, J. J., & Kilgard, M. P. (2016). Knockdown of dyslexia-gene *Dcdc2* interferes with speech sound discrimination in continuous streams. *Journal of Neuroscience*, *36*(17), 4895-4906.
- Cicconetti, P., Riolo, N., Priami, C., Tafaro, L., & Ettore, E. (2004). [Risk factors for cognitive impairment]. *Recenti progressi in medicina*, *95*, 535-545.
- Coslett, H. B., & Turkeltaub, P. (2016). Acquired dyslexia. *Neurobiology of language*, 791-803.
- Culver, K. W., & Blaese, R. M. (1994). Gene therapy for cancer. *Trends in Genetics*, *10*(5), 174-178.
- Delamarre, A., & Meissner, W. G. (2017). Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. *La Presse Médicale*, *46*(2), 175-181.

- Dieffenbach, C., Lowe, T., Dveksler, G., et al. (1993). General concepts for PCR primer design. *PCR methods appl*, 3(3), S30-S37.
- Duque, P., Juan, S., & Duque, P. (2008). *Síndromes neuropsicológicos del desarrollo: una introducción y una aproximación desde la Atención Primaria*.
- Ehrt, S., & Schnappinger, D. (2003). Isolation of plasmids from E. coli by alkaline lysis. *E. coli Plasmid Vectors: Methods and Applications*, 75-78.
- Escobar, M. A. S. (2019). *Material educativo dirigido a las maestras de la escuela oficial urbana mixta no. 35 "José Francisco de Córdova" jornada matutina, que les ayuda a conocer, identificar y apoyar a los estudiantes con Dislexia*.
- Fagerheim, T., Raeymaekers, P., Tønnessen, F. E., Pedersen, M., Tranebjærg, L., & Lubs, H. A. (1999). A new gene (DYX3) for dyslexia is located on chromosome 2. *Journal of medical genetics*, 36(9), 664-669.
- Food & Administration, D. (2022). Human Gene Therapy Products Incorporating Human Genome Editing. *U.S. Department of Health and Human Services*.
- Furuya, M., Yasuchika, K., Mizutani, K.-i., Yoshimura, Y., Nakatsuji, N., & Suemori, H. (2003). Electroporation of cynomolgus monkey embryonic stem cells. *genesis*, 37(4), 180-187.
- Fus-Kujawa, A., Prus, P., Bajdak-Rusinek, K., Teper, P., Gawron, K., Kowalczyk, A., & Sieron, A. L. (2021). An overview of methods and tools for transfection of eukaryotic cells in vitro. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 701031.
- Galaburda, A. M. (2022). Animal models of developmental dyslexia. *Frontiers in Neuroscience*, 16, 981801.
- Ghorui, A., & Bakshi, S. (2023). CRISPR/Cas9 Technology: Challenges and drawbacks. *Journal of Advanced Zoology*, 44.
- Gordon, J., & Amini, S. (2021). General overview of neuronal cell culture. *Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols*, 1-8.
- Hayden, M. R., Martin, W. R. W., Stoessl, A. J., Clark, C., Hollenberg, S., Adam, M. J., Ammann, W., Harrop, R., Rogers, J., Ruth, T., Sayre, C., & Pate, B. D. (1986). Positron emission tomography in the early diagnosis of Huntington039;s disease. *Neurology*, 36, 888.
- Haywitz, A. E. S. (1998). *Current Concepts CURRENT CONCEPTS D YSLEXIA*.
- Hnasko, T. S., & Hnasko, R. M. (2015). The western blot. *ELISA: Methods and Protocols*, 87-96.
- Hong, S. G., Yada, R. C., Choi, K., Carpentier, A., Liang, T. J., Merling, R. K., Sweeney, C. L., Malech, H. L., Jung, M., Corat, M. A., et al. (2017). Rhesus iPSC safe harbor gene-editing platform for stable expression of transgenes in differentiated cells of all germ layers. *Molecular therapy*, 25(1), 44-53.
- Irwin, D. J., Fedler, J., Coffey, C. S., Caspell-Garcia, C., Kang, J. H., Simuni, T., Foroud, T., Toga, A. W., Tanner, C. M., Kiebertz, K., Chahine, L. M., Reimer, A., Hutten, S., Weintraub, D., Mollenhauer, B., Galasko, D. R., Siderowf, A., Marek, K., Trojanowski, J. Q., & Shaw, L. M. (2020). Evolution of Alzheimer's Disease Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Early Parkinson's Disease. *Annals of Neurology*, 88, 574-587.
- Janscak, P., MacWilliams, M. P., Sandmeier, U., Nagaraja, V., & Bickle, T. A. (1999). DNA translocation blockage, a general mechanism of cleavage site selection by type I restriction enzymes. *The EMBO Journal*, 18(9), 2638-2647.
- Jiménez, J. E., Guzmán, R., Rodríguez, C., & Artiles, C. (2009). Prevalencia de las dificultades específicas de aprendizaje: la dislexia en español. *Anales de Psicología/Annals of Psychology*, 25(1), 78-85.

- Jujo, T., Sakao, S., Tsukahara, M., Kantake, S., Maruoka, M., Tanabe, N., Masuda, M., & Tatsumi, K. (2014). The role of matrix metalloproteinase in the intimal sarcoma-like cells derived from endarterectomized tissues from a chronic thromboembolic pulmonary hypertension patient. *PLoS One*, *9*(1), e87489.
- Küchler, E. C., Tannure, P. N., Falagan-Lotsch, P., Lopes, T. S., Granjeiro, J. M., & Amorim, L. M. F. (2012). Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. *Journal of Applied Oral Science*, *20*, 467-471.
- Lederberg, E. M., & Lederberg, J. (1953). Genetic studies of lysogenicity in *Escherichia coli*. *Genetics*, *38*(1), 51.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (62), e3923.
- Leifer, B. P. (2003). Early diagnosis of Alzheimer's disease: clinical and economic benefits. *Journal of the American Geriatrics Society*, *51*(5s2), S281-S288.
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Avila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. *Biopreservation and biobanking*, *14*(4), 264-270.
- Lukas, J., Bartek, J., & Strauss, M. (1994). Efficient transfer of antibodies into mammalian cells by electroporation. *Journal of immunological Methods*, *170*(2), 255-259.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., & Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, *339*(6121), 823-826.
- Martello, G., & Smith, A. (2014). The nature of embryonic stem cells. *Annual review of cell and developmental biology*, *30*, 647-675.
- Melkonyan, H., Sorg, C., & Klempt, M. (1996). Electroporation efficiency in mammalian cells is increased by dimethyl sulfoxide (DMSO). *Nucleic acids research*, *24*(21), 4356-4357.
- Miller, E. M., & Nickoloff, J. A. (1995). *Escherichia coli* electrotransformation. *Electroporation protocols for microorganisms*, 105-113.
- Mingozzi, F., & High, K. A. (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nature reviews genetics*, *12*(5), 341-355.
- Mueller, B., Ahnert, P., Burkhardt, J., Brauer, J., Czepezauer, I., Quente, E., Boltze, J., Wilcke, A., & Kirsten, H. (2014). Genetic risk variants for dyslexia on chromosome 18 in a German cohort. *Genes, Brain and Behavior*, *13*(3), 350-356.
- Naldini, L. (2011). Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nature Reviews Genetics*, *12*(5), 301-315.
- Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage. *Nature*, *526*(7573), 351-360.
- Natsume, T., Kiyomitsu, T., Saga, Y., & Kanemaki, M. T. (2016). Rapid protein depletion in human cells by auxin-inducible degron tagging with short homology donors. *Cell reports*, *15*(1), 210-218.
- Newbury, D. F., Paracchini, S., Scerri, T. S., Winchester, L., Addis, L., Richardson, A. J., Walter, J., Stein, J. F., Talcott, J. B., & Monaco, A. P. (2011). Investigation of dyslexia and SLI risk variants in reading- and language-impaired subjects. *Behavior Genetics*, *41*, 90-104.

- Nopola-Hemmi, J., Taipale, M., Haltia, T., Lehesjoki, A.-E., Voutilainen, A., & Kere, J. (2000). Two translocations of chromosome 15q associated with dyslexia. *Journal of Medical Genetics*, *37*, 771.
- Oceguera-Yanez, F., Kim, S.-I., Matsumoto, T., Tan, G. W., Xiang, L., Hatani, T., Kondo, T., Ikeya, M., Yoshida, Y., Inoue, H., et al. (2016). Engineering the AAVS1 locus for consistent and scalable transgene expression in human iPSCs and their differentiated derivatives. *Methods*, *101*, 43-55.
- Páez, J., et al. (2013). Dificultades de aprendizaje. *Cuadernos de Educación y Desarrollo*, *32*.
- Panja, S., Saha, S., Jana, B., & Basu, T. (2006). Role of membrane potential on artificial transformation of *E. coli* with plasmid DNA. *Journal of biotechnology*, *127*(1), 14-20.
- Paternicó, D., Premi, E., Alberici, A., Archetti, S., Bonomi, E., Gualeni, V., Gasparotti, R., Padovani, A., & Borroni, B. (2015). Dyslexia susceptibility genes influence brain atrophy in frontotemporal dementia. *Neurology: Genetics*, *1*.
- Pennington, B. F., Gilger, J. W., Pauls, D., Smith, S. A., Smith, S. D., & DeFries, J. C. (1991). Evidence for major gene transmission of developmental dyslexia. *Jama*, *266*(11), 1527-1534.
- Peplow, P. V., Martinez, B., & Gennarelli, T. A. (2022). Prevalence, needs, strategies, and risk factors for neurodegenerative diseases. *Neurodegenerative Diseases Biomarkers: Towards Translating Research to Clinical Practice*, 3-8.
- Peschansky, V. J., Burbridge, T. J., Volz, A. J., Fiondella, C., Wissner-Gross, Z., Galaburda, A. M., Turco, J. J. L., & Rosen, G. D. (2010). The effect of variation in expression of the candidate dyslexia susceptibility gene homolog Kiaa0319 on neuronal migration and dendritic morphology in the rat. *Cerebral Cortex*, *20*(4), 884-897.
- Petrella, J. R., Coleman, R. E., & Doraiswamy, P. M. (2003). Neuroimaging and Early Diagnosis of Alzheimer Disease: A Look to the Future. *Radiology*, *226*, 315-336.
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A.-E., & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*, 17013.
- Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*, *348*(6230), 62-68.
- Roy, A., Nair, S., Sen, N., Soni, N., & Madhusudhan, M. (2017). In silico methods for design of biological therapeutics. *Methods*, *131*, 33-65.
- Rychlik, W., Spencer, W., & Rhoads, R. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic acids research*, *18*(21), 6409-6412.
- Sahel, J.-A., & Roska, B. (2013). Gene therapy for blindness. *Annual review of neuroscience*, *36*, 467-488.
- Saiki, R. K. (1989). The Design and Optimization of the PCR (H. A. Erlich, Ed.). *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, 7-16.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *Journal of applied microbiology*, *113*(5), 1014-1026.
- Schumacher, J., Hoffmann, P., Schmäl, C., Schulte-Körne, G., & Nöthen, M. M. (2007). Genetics of dyslexia: The evolving landscape. *Journal of Medical Genetics*, *44*, 289-297.
- Senturk, Z. K. (2020). Early diagnosis of Parkinsons disease using machine learning algorithms. *Medical hypotheses*, *138*, 109603.
- Siegel, L. S. (2006). *Perspectives on dyslexia* (9).

- Simonato, M., Bennett, J., Boulis, N. M., Castro, M. G., Fink, D. J., Goins, W. F., Gray, S. J., Lowenstein, P. R., Vandenberghe, L. H., Wilson, T. J., et al. (2013). Progress in gene therapy for neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*, *9*(5), 277-291.
- Sun, Q.-Y., Ding, L.-W., He, L.-L., Sun, Y.-B., Shao, J.-L., Luo, M., & Xu, Z.-F. (2009). Culture of *Escherichia coli* in SOC medium improves the cloning efficiency of toxic protein genes. *Analytical biochemistry*, *394*(1), 144-146.
- Udy, D. B., & Bradley, R. K. (2022). Nonsense-mediated mRNA decay uses complementary mechanisms to suppress mRNA and protein accumulation. *Life Science Alliance*, *5*(3).
- Vliet, E. C.-v., Miozzo, M., & Stern, Y. (2004). Phonological Dyslexia: A Test Case for Reading Models. *Psychological Science*, *15*, 583-590.
- Wagner, R. K., Zirps, F. A., Edwards, A. A., Wood, S. G., Joyner, R. E., Becker, B. J., Liu, G., & Beal, B. (2020). The prevalence of dyslexia: A new approach to its estimation. *Journal of learning disabilities*, *53*(5), 354-365.
- Wang, Y. (2002). The function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*, *292*(2), 396-401.
- Wilkinson, E. (2023). UK regulator approves groundbreaking gene treatment for sickle cell and β thalassaemia.
- Ylä-Herttuala, S., & Martin, J. F. (2000). Cardiovascular gene therapy. *The Lancet*, *355*(9199), 213-222.
- Yount, K. M., Hoddinott, J., Stein, A. D., & DiGirolamo, A. M. (2009). Individual capital and cognitive ageing in Guatemala. *Population Studies*, *63*, 295-306.
- Zhan, T., Rindtorff, N., Betge, J., Ebert, M. P., & Boutros, M. (2019). CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. *55*, 106-119.
- Zheng, J. C., & Chen, S. (2022). Translational Neurodegeneration in the era of fast growing international brain research. *Translational Neurodegeneration*, *11*.

14.1. Figuras complementarias de estudio genético piloto para la optimización de la amplificación gen *SNCA*, para ser aplicado en los genes *APP* y *HTT*

Las siguientes imágenes permiten observar el procedimiento realizado para la validación de los *primers* generados para la amplificación de los genes estudiados.

The image shows the configuration interface for the UCSC In-Silico PCR tool. The interface is titled "UCSC In-Silico PCR" and contains several input fields and a submit button. The fields are arranged in two rows. The first row contains: "Genome:" with a dropdown menu set to "Human"; "Assembly:" with a dropdown menu set to "Dec. 2013 (GRCh38/hg38)"; "Target:" with a dropdown menu set to "GENCODE Genes"; "Forward Primer:" with a text input field containing "ATTTCATTGCCCGGTGC"; and "Reverse Primer:" with a text input field containing "ACAAGGGCGCAGACTT". To the right of the Reverse Primer field is a "submit" button. The second row contains: "Max Product Size:" with a text input field set to "10000"; "Min Perfect Match:" with a text input field set to "15"; "Min Good Match:" with a text input field set to "15"; "Flip Reverse Primer:" with an unchecked checkbox; and "Append to existing PCR result:" with a checked checkbox.

Figura 14: Configuración de la herramienta UCSC In-Silico PCR

```

>ENST00000348990.9 APP:1+2372 2372bp AGTTTCCTCGGCAGCGGTA GCACAGCTGTCAAAGCGCA
AGTTTCCTCGGCAGCGGTAaggcagagcacgaggagcgtgcccgggg
gccccgggagacggcggcggctggcggcggcggcagagcaaggacggcggc
gatcccactcgccacagcagcactcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
ctgcccggttggcactgctcctgctggcggcggcggcggcggcggcggcggc
ggaggtaccactgatggtaatgctggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
catgttctgtggcagactgaacatgcacatgaatgtccagaatgggaag
tgggattcagatccatcaggaccacaaacctgcattgataccaaggaag
catcctgcagtatgccaagaagtctaccctgaactgcagatcaccaatg
tggtagaagccaaccaaccagtgaccatccagaactggcgaagcggggc
cgcaagcagtgcaagaccatcccactttgtgatccctaccgctgctt
agtgggtgagttgtaagtgtgaccttctgctcctgacaagtgcaaat
tcttacaccaggagaggatggatgttgcgaacctcacttccactggcac
accgtcgccaagagacatgcagtgagaaggtaccaactgcatgacta
cggcatgttctgctccctgcccgaatgcaaatccgaggggtagagtttg
tgtgtgcccactggcgaagaagtgaacatgtggattctgctgatgctg
gaggaggatgactcggatgtctggtggggcggagcagacacagactatg
agatgggagtgaaagcaaaagtagtagaagtagcagagggaggaagaagtg
ctgaggtggaagaagaagaagcggatgatgacgaggacgatgaggatgg
gatgaggtagaggaagaggctgaggaccctacgaagaagccacagagag
aacccaccagattgccaccaccaccaccaccacagagctctgtggaag
agggtgctcgagttcctacaacagcagccagtagccctgatgcccgtgac
aagtatctcgagacacctggggatgagaatgaacatgccattccagaa
agccaagagaggcttgaggccaagcaccgagagagaatgtcccaggtca
tgagagaatgggaagaggcagaacgtcaagcaagaactgcctaaagct
gataagaaggcagttatccagcattccaggagaaggtggaatccttggga
acaggaagcagccaacgagagacagcagctggggagacacacatggcca
gagtggaagccatgctcaatgaccgcccggcctggcctggagaactac
atcaccgctctgcaggctgttctcctcggcctcgtcagctgttcaatat
gctaagaagtagtccgagcagaacagaaggacagacagcacaccctaa
agcatttccagcagctgctgagcagctggggatcccaagaagccgctcagatc
cggctccagggtatgacacacctcggctgatttatgagcagatgaatca
gtctctcctcctgctctacaacgtgctgagtgccgaggagattcagg
atgaagttgatgagctgctcagaaagagcaaaactattcagatgacgctc
ttggccaacatgatagtgaaaccaaggatcagttacggaacgatgctct
catgccatcttgaccgaaacgaaaaccacgctggagctcctcccgtga
atggagagttcagcctggcagatctccagcctggcattctttggggcct
gactctgcccagccaacacagaaaaaggaagtgagcctgttgatgccc
cctgctgcccagcaggagctgaccactcgaccaggttctgggtgacaa
atatcaagacggaggagatctgaaagtgaagatggatgcagaatccga
catgactcaggatagaaattcatcaaaaaatgggtgtctttgacaga
agatgtgggttcaaaaggaagtgcaatcattggactcaggtggcgggtg
ttgtcatagcagcagtgatcgtcatcaccttgggtgagctgaaagaagaaa
cagtacacatccattcatcaggtgtggtggaggtgacgcccgtgtcac
cccagagagcgccacctgtccaagatgcagcagaacggctacgaaaaatc
caacctacaagttctttgagcagatgcagaactagacccccccacagca
gcctctgaagttggacagcaaaacattgcttactaccatcgggtgtcc
atztatagaataatgtgggaagaaacaaaccggttttatgattactcat
taTCGCCTTTTGACAGCTGTGC

```

Figura 15: *PCR in silico* del gen *APP*

```

>ENST00000674129.1 SNCA:290+947 658bp CAAGCCTTCTGCCTTTCCAC GAAATGTCATGACTGGGCAC
CAAGCCTTCTGCCTTTCCACcctcgtgagcggagaactgggagtgccat
tcgacgacagtggtgtaaaaggaattcattagccatggatgattcatg
aaaggacttcaaaagccaaggaggagttgtggctgctgagaaaaac
caaacagggtgtggcagaagcagcaggaaagcaaaagagggttctct
atgtaggctccaaaaccaaggaggaggtggtgcatggtgtggcaacagtg
gctgagaagaccaaaagagcaagtgacaaaatgtggaggagcagtggtgac
gggtgtgacagcagtagccagaagacagtgaggaggcaggagcattg
cagcagccactggcttctcaaaaggaccagttggcagaagctctctt
aggaaatgaaatgctctccagaacctgcagcagcacagaccaaagtcagaa
tgaagaaggagccccacaggaaggaattctggaagatagcctgtggatc
ctgacaatgaggcttatgaaatgcttctgaggaaggtatcaagactac
gaacctgaagcctaagaaatcttctgctccagtttcttgagatctgct
gacagatgttccatcctgtacaagtgctcagttccaatGTGCCAGTCAT
GACATTTT

```

Figura 16: *PCR in silico* del gen *SNCA*

```

>ENST00000355072.11_HTT:67+9641|9575bp|ATTCATTGCCCGGTGCTGAG ACAAGGGCGCAGACTTCCAA
ATTGATTGCCCGGTGCTGAGcggcgccgagtcggccgaggcctccg
gggactgcccgtgcccggggagaccgccaaggcgaccctggaaaagctg
atgaaggccttcgagtcctcaagtcctccagcagcagcagcagcagca
gcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
cgccgcccggcgccgcccctcagcttcctcagcggcgccgagcag
gcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
gccaccggcccggctgtggctgaggagcggctgcaccgaccaaaagaag
aaccttcagctaccaagaagaccgtgtaacattgtctgacaatgt
gaaaacatagtgacagctgtcagaaattctcagaatttcagaaact
tctgggcatcgctatggaacttttctgctgtgagtgatgacgagagc
cagatgtcaggatggctgacgaatgcctcaacaaagtatcaaaagct
ttgatggattctaacttccaaggttacagctcgagctctataaggaat
taaaagaatggcgccctcggagtttgctgtgcccctgtggagtttg
ctgagctggctcacctggctcggcctcagaaatgcaggccttacctggg
aaccttctgcccgtgctgactcgaacaagcaagagaccgaaagaatcag
ccaggagaccttgctgagctgttcccaaaatattggctcttttgga
atcttgcaaatgacaatgaaatgaagttttgtaaaaggccttcagagc
aacctgaagtcaagctccccacattcggcggacagcggctggatcagc
agtgagcatctgcccagcactcaagaaggacacaaatattctatagttgg
tactaaatgtgctcttaggcttactcgttctctgctgaggatgaaactcc
actctgctgattcttgccgtgctgctcaccctgaggtatttggtgccctt
gctcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
caaggaaagaatggaagtctctccttctcagagcagctgtccaggtt
tatgaactgacgttacatcacacagcaccagagcacaatgttgtgac
cggagcctggagctgtgagcagccttcagaacgcctccaccgagc
tcttgcaaacctgaccgagcagtcgggggcatgggagcctcaccgctgct
aaggaggagctcgtggcgaagcctgagtgaggatattgtggaacttat
agctggagggggttctcagcagcctgtccttcaagaaaacaaaag
gcaagtgtcttaggagaagaagccttgaggatgactcgaatcg
agatcggatgtcagcagctctgcctaacagcctcagtgaggatgagat
cagtgaggagctggctgcttctcaggggttccactccagggtcagcag
gtcatgacatcatcacagaacagccagcagcagcagcagcagcagcagc
gactcagtgagctggcagcgtgacttgacaagctctgcccactgagtg
ggatgaggaggatatttgagccacagctccagccaggtcagcgcctcc
catctgaccctgcccagcctgaaatgatgggaccagcctcgtcgcctc
atcagcagcagctcccagaccacacgaaaggcctgattcagctgttac
ccctcagacagctctgaaattgtgttagacggctaccgacaaccagatt
tggccctgcagatggagagcccaggatgaagatgaggaaagccacaggt
attcttctgatgaagcctcggaggcctcaggaactcttccatggccct
tcaacaggcacttattgaaaaacatgagctactcagggcagcctctc
acagcagtggtgataaattgtgtgagagatgaagctactgaaccgggt
gatcaagaaaaaagccttgccgcatcaagggtgacattggacagctccac
tgatgatgactctgacactctgtccattgtgctccgcttttatctgctt
cgttttgctaaacagggggaaaaaatgtgctggttccggacagggatgtg
agggtcagcgtgaaggcctggccctcagctgtgtgggagcagctgtggc
ctccaccggaaacttcttctcagcaactctataaagtctctcttgaca
ccaggaataccctgaggaaacagttatgtctcagacatctgaaactacac
gatcagggagaccacaggttcgaggagcactgccattctctgtgggac
ctcatctgctccatcctcagcaggtcccgttccacgtgggagattgga
tgggcaccattagaacctcaggaatacatttcttggcggattgc

```

Figura 17: PCR *in silico* del gen *HTT*

Utilizando los datos extraídos de los geles de electroforesis, se contruyeron las curvas estándar y se cuantificaron los pesos moleculares de los ensayos PCR (Cuadros 10, 11, 12 y 13¹). De la misma forma, se generaron gráficas de las curvas estándar (Figuras 18, 19, 20 y 21).

¹EM se refiere a la escalera molecular utilizada como referencia, cuyos pesos moleculares ya se conocen. PM se refiere a Peso Molecular. Utilizando los datos de longitud total del gel y las coordenadas en X obtenidas de la herramienta ImageJ, se calcularon los factores de retención (Rf) de cada muestra. A partir de dichos valores se construyó la curva estándar de pesos moleculares.

Cuadro 10: Construcción de curva estándar y cuantificación de pesos moleculares del primer ensayo PCR.

No.	Muestra	Coordenada X	PM estándar (Kbp)	Rf	log PM	PM muestras (Kbp)
1	EM	47	20	0.05	1.30	
2	EM	424.5	5	0.42	0.70	
3	EM	511.5	1.5	0.50	0.18	
4	EM	580.5	0.5	0.57	-0.30	
5	4A	663.5		0.65	-0.27	0.54
6	9A	675.5		0.66	-0.30	0.50
7	2A	664.5		0.65	-0.27	0.53
8	4P	648.5		0.64	-0.23	0.59
9	9P	656.5		0.64	-0.25	0.56
10	2P	619.5		0.61	-0.15	0.71
11	4H	628.5		0.62	-0.17	0.67
12	9H	617.5		0.61	-0.14	0.72
13	2H	620.5		0.61	-0.15	0.70
14	Fin gel	1020				

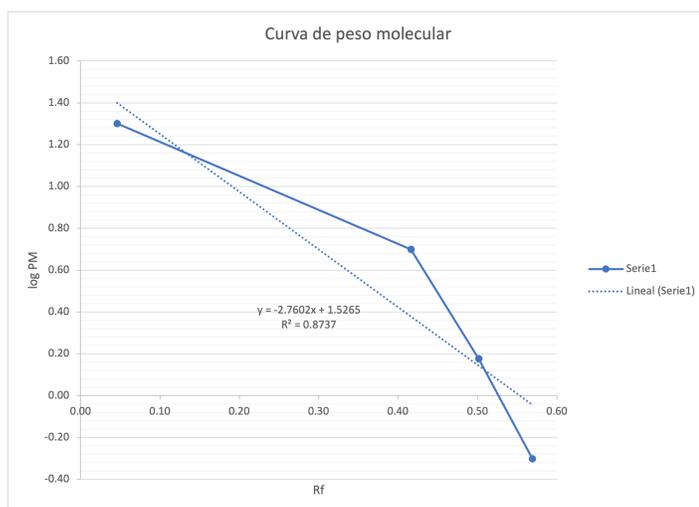


Figura 18: Curva estándar de peso molecular a partir de gel de electroforesis como resultado del primer ensayo PCR

Cuadro 11: *Construcción de curva estándar y cuantificación de pesos moleculares del segundo ensayo PCR.*

No.	Muestra	Coordenada X	PM estándar (Kbp)	Rf	log PM	PM muestras (Kbp)
1	EM	27	20	0.03	1.30	
2	EM	406.5	5	0.38	0.70	
3	EM	518.5	1.5	0.49	0.18	
4	EM	589.5	0.5	0.56	-0.30	
5	4A	816.5		0.77	-0.65	0.22
6	9A	815.5		0.77	-0.65	0.22
7	2A	847.5		0.80	-0.73	0.19
8	4P	782.5		0.74	-0.56	0.27
9	9P	782.5		0.74	-0.56	0.27
10	2P	811.5		0.77	-0.64	0.23
11	4H	821.5		0.78	-0.67	0.22
12	9H	821.5		0.78	-0.67	0.22
13	2H	826.5		0.78	-0.68	0.21
14	Fin gel	1060				

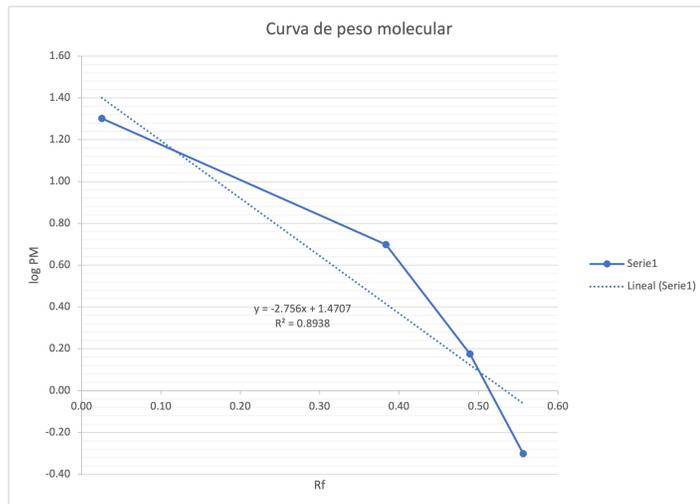


Figura 19: *Curva estándar de peso molecular a partir de gel de electroforesis como resultado del segundo ensayo PCR.*

Cuadro 12: *Construcción de curva estándar y cuantificación de pesos moleculares del tercer ensayo PCR.*

No.	Muestra	Coordenada X	PM Estándar (Kbp)	Rf	log PM	PM muestras (Kbp)
1	EM	101	20	0.10	1.30	
2	EM	262.5	5	0.25	0.70	
3	EM	417.5	1.5	0.40	0.18	
4	EM	482.5	0.5	0.46	-0.30	
5	4P	622.5		0.60	-0.76	0.17
6	9P	609.5		0.58	-0.71	0.20
7	2P	631.5		0.60	-0.80	0.16
8	4P	604.5		0.58	-0.69	0.21
9	Fin gel	1044				

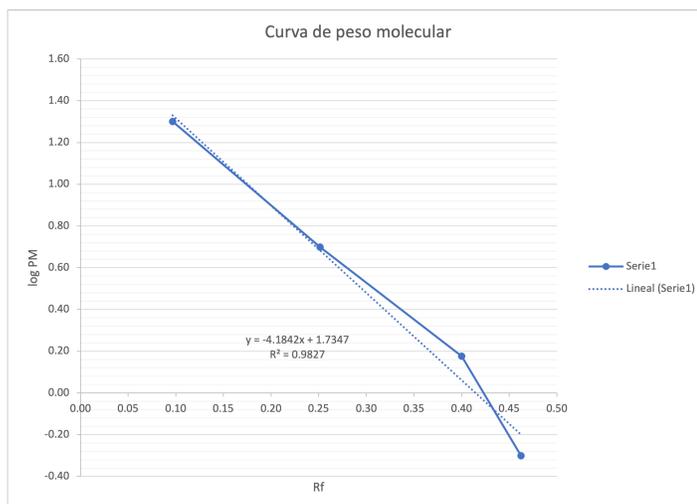


Figura 20: *Curva estándar de peso molecular a partir de gel de electroforesis como resultado del tercer ensayo PCR.*

Cuadro 13: Construcción de curva estándar y cuantificación de pesos moleculares del quinto ensayo PCR.

No.	Muestra	Coordenada X	PM Estándar (Kbp)	Rf	log PM	PM muestras (Kbp)
1	EM	151	20	0.14	1.30	
2	EM	219.5	5	0.21	0.70	
3	EM	327.5	1.5	0.31	0.18	
4	EM	460.5	0.5	0.43	-0.30	
5	4P	450.5		0.43	-0.34	0.46
6	9P	460.5		0.43	-0.39	0.41
7	2P	467.5		0.44	-0.42	0.38
8	4P	477.5		0.45	-0.47	0.34
9	Fin gel	1059				

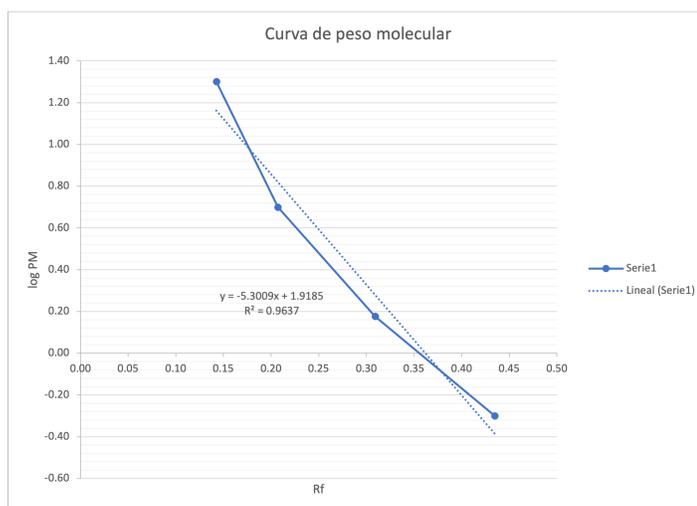
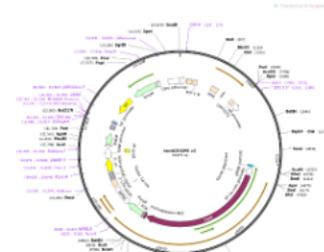


Figura 21: Curva estándar de peso molecular a partir de gel de electroforesis como resultado del quinto ensayo PCR

14.2. Figuras complementarias de propuesta de terapia génica *in silico* para tratamiento de dislexia

En las siguientes figuras se muestra el procedimiento realizado para la generación de ARN guías, utilizadas para la terapia génica propuesta. También, se muestra el procedimiento para validar las secuencias y la construcción de los plásmidos “LentiCRISPRAAVS1 v2” y “pAAVS1-DNR-KIAA0319”.

lentiCRISPR v2
(Plasmid #52961) Print



[Enlarge](#) | [View all sequences](#)

PURPOSE
Replaces original lentiCRISPRv1 (Addgene Plasmid 49535) and produces ~10-fold higher titer virus. 3rd generation lentiviral backbone.

DEPOSITING LAB
Feng Zhang

PUBLICATION
Sanjana et al Nat Methods. 2014 Aug;11(8):783-4. doi: 10.1038/nmeth.3047. (How to cite ↓)

SEQUENCE INFORMATION
Sequences (10)

ORDERING

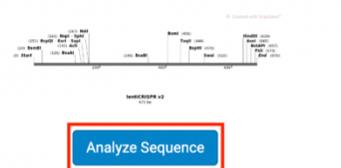
Item	Catalog #	Description	Quantity	Price (USD)	
Plasmid	52961	Standard format: Plasmid sent in bacteria as agar stab	1	\$85	Add to Cart
Cloning Grade DNA	52961-DNA.cg	2 µg of cloning grade DNA in Tris buffer More Information ↓	1	\$105	Add to Cart

This material is available to academics and nonprofits only.

Figura 31: *Búsqueda de la secuencia del plásmido LentiCRISPR v2.*

Partial Sequences from Addgene (9)

Addgene has sequenced portions of this plasmid for verification. The results are shown below. Leading primers are indicated on the first line of each sequence.



[GenBank](#) | [SnapGene](#) | [File Help](#)

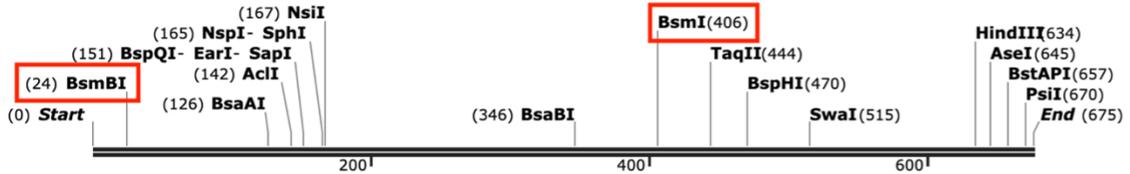
```
> StrepPyoCas9-5UTR-F 5'-CGGTGCCACTTTTCAAGTTG-3'
ttaaactgctatttctagctctaaacagagacgtacaaaaAGAGCAAGAAGCTAAAAAGatTTaa
AATTATTTTAGCGCAGTTAATGGAACAGGAACATAAATTTACCCAAAAATATTACGTGAATCAGGATAT
AACGTTATTGAGGTTGAAGAGCATGCATTGAAGATGAACATTTAAAAATGTTGTAATCCAAATCCAG
AATTGATCCTGCATGA AAAATACCGCTTGAATATGGTATTAACATGATGCAGATATTATTATTGAA
TGACCAGATGCTGACAGATTTGGAATGGCAATAAACATGATGGTCATTTGTAAGATTAGATGGAAT
CAACAGGACCAATTTAATTGATTGAAAATTATCAAAATCTaAAAACGCTTAAATAGCATTCCAAAAATC
CGGCTATATCAAGTTTGTAAACAGTATTGGGTGATAGAAATCGCTCATGAAAAATATGGAGTTAA
TATTGTA AAAACTTAACTGGATTTAAATGAATGGGTAGAGAAATGCTAaAGAAAGATAACGGATTA
AATTTGTTTTTCCTTATGAAGAAAGTTATGGATATGTAATTGATGACTCagCTAGAGATAaAGATGGAA
TACAAGCTTCTATATTATAGCAGAGGCTGCTGATTTTaaAA
```

Figura 32: *Análisis de la secuencia del plásmido LentiCRISPR v2.*

Map View

Instructions

Created with SnapGene®



lentiCRISPR v2
675 bp

Figura 33: Definición de sitios de restricción en la secuencia del plásmido LentiCRISPR v2.

Full Sequences from Addgene (1)

Based on next-generation sequencing (NGS) results where indicated (Addgene NGS Result), or assembled from reference sequences and/or Sanger results (Addgene Assembled Sequence).



Figura 34: Análisis de la secuencia completa del plásmido LentiCRISPR v2.



Figura 35: Obtención de la secuencia del plásmido LentiCRISPR v2.



Figura 36: Obtención de secuencias de segmentos importantes en el plásmido LentiCRISPR v2.

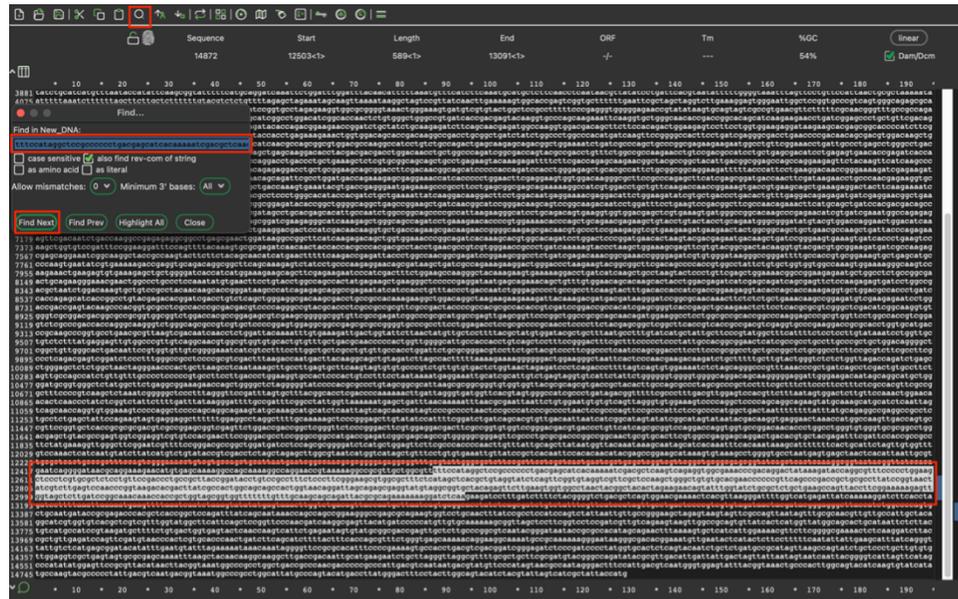


Figura 37: Búsqueda de secuencias de segmentos importantes en el plásmido LentiCRISPR v2 en ApE.

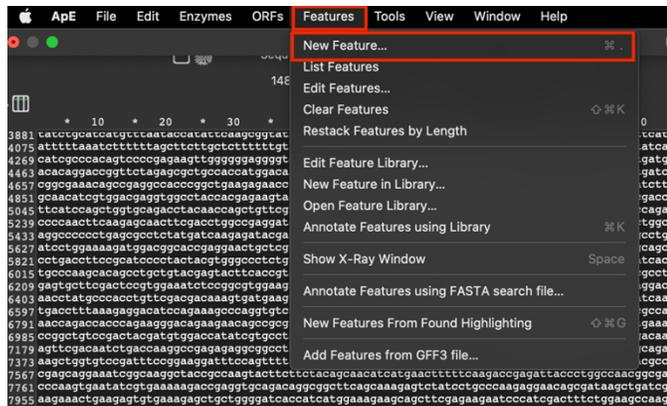


Figura 38: Creación de nuevo segmento en la secuencia del plásmido LentiCRISPR v2 en ApE.

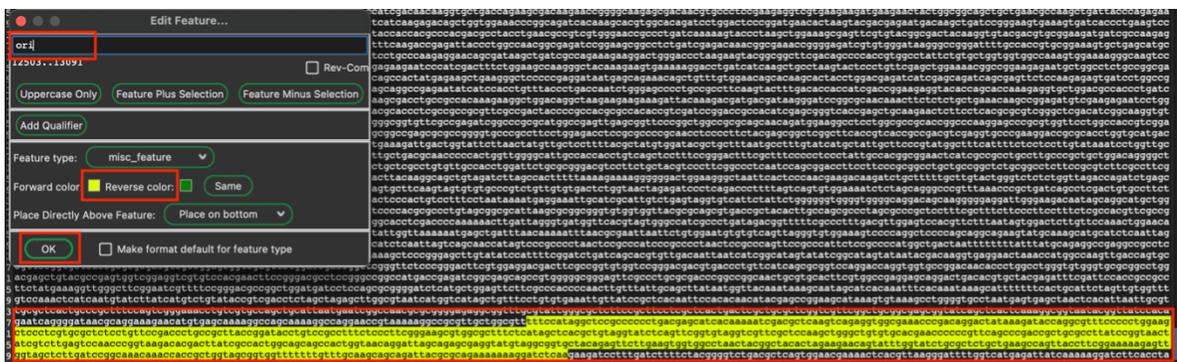


Figura 39: Identificación de segmentos importantes en el plásmido LentiCRISPR v2 en ApE.

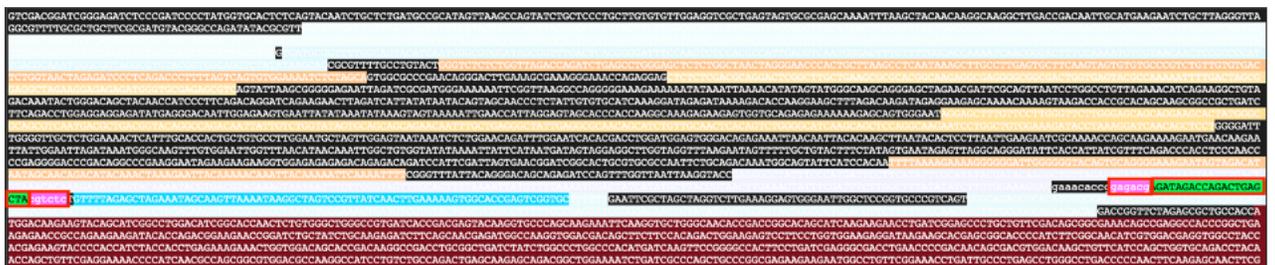


Figura 40: Inserción del ARN guía en el plásmido LentiCRISPR v2.



Figura 41: Ubicación del sitio Safe Harbor AAVS1.

Transcript ID	Name	bp	Protein	Biotype	CCDS	UniProt Match	RefSeq Match	Flags				
ENST00000378214.8	KIAA0319-201	6838	1072aa	Protein coding	CCDS34348.6	Q5V43-1	NM_014809.4	MANE Select	Ensembl Canonical	GENCODE basic	APPRIS P2	TSL:1
ENST00000535378.5	KIAA0319-203	6896	1063aa	Protein coding	CCDS54970.2	Q5V43-2	-		GENCODE basic	APPRIS ALT2	TSL:2	
ENST00000537886.5	KIAA0319-204	6622	1011aa	Protein coding	CCDS54971.1	Q5V43-4	-		GENCODE basic	TSL:1		
ENST00000430948.6	KIAA0319-202	6620	1027aa	Protein coding	CCDS54969.6	Q5V43-3	-		GENCODE basic	APPRIS ALT2	TSL:2	
ENST00000616673.4	KIAA0319-205	5315	483aa	Protein coding	CCDS75409.9	AOA087X0U9.9	-		GENCODE basic	TSL:1		

Figura 42: Secuencia con etiqueta TSL:1 en el software Ensembl.

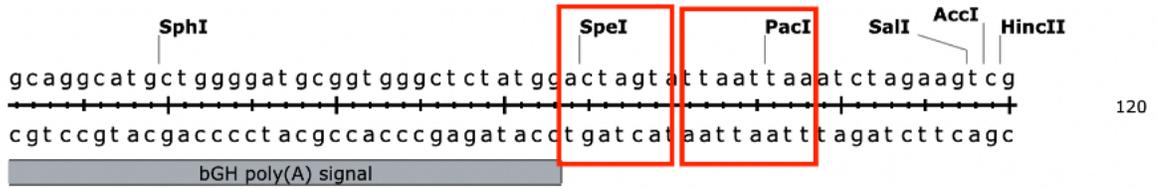


Figura 43: Enzimas de restricción definidas del plásmido pAAVS1-P-MCS.

Figura 44: Comprobación de ausencia de sitios de corte en la secuencia del gen KIAA0319.

Consentimiento Informado

PROYECTO: Evaluación de la relación genética entre dislexia y enfermedades neurodegenerativas y propuesta de terapia génica *in silico* para tratamiento de dislexia.

Investigador: Diego Andrés Medina Mencos - 19697

Supervisor: José Andrés Leal - jaleal@uvg.edu.gt

1. Introducción

Gracias por considerar participar en nuestro estudio. Este formulario de consentimiento informado tiene como objetivo proporcionarle información importante sobre el propósito, los procedimientos y los posibles riesgos y beneficios de participar en este estudio. Por favor, lea cuidadosamente este documento antes de aceptar participar. Si tiene alguna pregunta, no dude en preguntar al investigador.

2. Propósito del Estudio

El propósito de este estudio es recopilar información sobre mutaciones en genes relacionados a Alzheimer, Parkinson y Enfermedad de Huntington, a partir de muestras de niños, adolescentes y adultos con dislexia.

La información obtenida en este estudio será utilizada exclusivamente por Diego Medina para realizar el trabajo de graduación de la licenciatura en Ingeniería Biomédica.

3. Procedimientos del Estudio

Si decide participar en este estudio, se le pedirá que brinde una muestra de saliva por medio de enjuague bucal.

El procedimiento tomará aproximadamente 10 minutos para completarse y se harán preguntas sobre antecedentes familiares de Alzheimer, Parkinson y Enfermedad de Huntington.

La toma de muestra implicará que enjuague su boca con solución salina, que no representa ningún peligro, durante aproximadamente 30 a 60 segundos.

4. Posibles Riesgos y Beneficios

No se conocen riesgos asociados con la participación en este estudio. Sin embargo, puede experimentar cierta incomodidad o molestia al responder preguntas sobre temas sensibles o personales.

5. Confidencialidad y Protección de Datos

Toda la información recopilada durante este estudio se mantendrá confidencial y anónima. Los datos se almacenarán de forma segura y solo el investigador y el equipo de investigación tendrán acceso a ellos. No se utilizará información identificable en ninguna publicación o presentación que resulte del estudio.

6. Participación Voluntaria

La participación en este estudio es voluntaria. Tiene el derecho de negarse a participar o de retirarse del estudio en cualquier momento sin penalización o pérdida de beneficios a los que tiene derecho de otra manera.

7. Compensación

Su participación en este estudio no recibirá ningún tipo de compensación.

8. Información de Contacto

Si tiene alguna pregunta o inquietud sobre este estudio, comuníquese con el supervisor del proyecto en jaleal@uvg.edu.gt. Si tiene alguna inquietud acerca de sus derechos como participante de investigación, comuníquese con el Ing. Carlos Equit caesquit@uvg.edu.gt.

9. Reconocimiento

He leído y entiendo la información anterior sobre el estudio. He tenido la oportunidad de hacer preguntas y he recibido respuestas satisfactorias. Al aceptar participar en este estudio, doy libremente mi consentimiento informado para participar en el estudio.

Nombre del participante: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Criterios de Reclutamiento-Inclusión-Exclusión

PROYECTO: Evaluación de la relación genética entre dislexia y enfermedades neurodegenerativas y propuesta de terapia génica *in silico* para tratamiento de dislexia.

Investigador: Diego Andrés Medina Mencos - 19697

Supervisor: José Andrés Leal - jaleal@uvg.edu.gt

1. Criterios de reclutamiento:

Para poder participar en este ensayo clínico, los participantes deben cumplir con los siguientes criterios de reclutamiento:

- **Edad:** 6 a 12 años.
 - **Sexo:** ambos sexos.
 - **Diagnóstico:** dislexia.
-

2. Criterios de inclusión:

Los criterios de inclusión para este estudio son los siguientes:

- Cumplir con los criterios de reclutamiento establecidos anteriormente
 - Capacidad para dar consentimiento informado
-

3. Criterios de exclusión:

Los criterios de exclusión para este estudio son los siguientes:

- No cumplir con los criterios de inclusión establecidos anteriormente

Protección de Datos Personales

PROYECTO: Evaluación de la relación genética entre dislexia y enfermedades neurodegenerativas y propuesta de terapia génica *in silico* para tratamiento de dislexia.

Investigador: Diego Andrés Medina Mencos - 19697

Supervisor: José Andrés Leal - jaleal@uvg.edu.gt

En este documento se detallan las medidas técnicas y organizativas que se implementarán para salvaguardar los datos, derechos y libertades de los participantes en este estudio. Esta información será compartida con los participantes del estudio.

Medidas técnicas:

1. **Almacenamiento seguro de datos:** Se ha utilizado un sistema de almacenamiento seguro para garantizar la protección de los datos personales de los participantes, y se ha restringido el acceso solo al personal autorizado.
2. **Anonimización de datos:** Se aplican las siguientes metodologías de anonimización:
 - Se evitará la recolección de datos personales, incluyendo nombres, direcciones, números de teléfono, correos electrónicos, números de identificación, entre otros.
 - La identificación de cada muestra se realizará mediante la creación de un código numérico aleatorio al momento de la recolección de la muestra de saliva.
 - A cada individuo se le preguntará acerca de antecedentes de Alzheimer, Parkinson y Enfermedad de Huntington en la familia. Sin embargo, no se preguntará el parentesco específico con la persona que presente alguna de las anteriores.

Medidas organizativas:

1. **Formación del personal:** Se ha proporcionado una formación adecuada al personal que trabaja con los datos personales de los participantes para garantizar que comprendan sus responsabilidades y obligaciones en relación con la protección de dichos datos.
2. **Políticas y procedimientos:** Se han establecido políticas y procedimientos claros en relación con la protección de los datos personales de los participantes, que se han comunicado a todo el personal involucrado en el estudio.

Además, se ha obtenido el consentimiento informado de los participantes en el estudio, y se ha asegurado que los datos personales recopilados solo se utilizarán para fines específicos relacionados con el estudio.

Por este medio me comprometo a seguir los procedimientos establecidos y a proceder éticamente durante toda la realización del proyecto.

Diego Andrés Medina Mencos - 19697

Seguridad del Participante

PROYECTO: Evaluación de la relación genética entre dislexia y enfermedades neurodegenerativas y propuesta de terapia génica *in silico* para tratamiento de dislexia.

Investigador: Diego Andrés Medina Mencos - 19697

Supervisor: José Andrés Leal - jaleal@uvg.edu.gt

A continuación, presento los procedimientos tomados para garantizar que los participantes del estudio no estén sujetos a ningún tipo de coerción o incentivo indebido.

1. **Consentimiento informado:** Antes de participar en el estudio, se obtendrá el consentimiento informado de los participantes. El consentimiento se proporcionará en un lenguaje claro y sencillo, e incluye información sobre los objetivos del estudio, los procedimientos involucrados, los riesgos y beneficios asociados y la posibilidad de retirarse del estudio en cualquier momento.
2. **Anonimato y confidencialidad:** Se garantiza que la identidad de los participantes se mantendrá confidencial. Se tomarán medidas para proteger la privacidad de los participantes, como el uso de números de identificación en lugar de nombres reales, el uso de rangos de edad, y el . Además, es importante asegurarse de que los datos recopilados no sean compartidos con terceros sin el consentimiento explícito del participante.
3. **Ausencia de incentivos indebidos:** Es importante evitar ofrecer incentivos que puedan influir indebidamente en la participación de los participantes. Los incentivos deben ser proporcionales al esfuerzo requerido para participar en el estudio y no deben ser tan altos que los participantes se sientan presionados para participar.
4. **Declaración de conflictos de intereses:** Si hay algún conflicto de intereses en el estudio, este debe ser divulgado a los participantes. Esto puede incluir cualquier relación financiera o personal que los investigadores tengan con el patrocinador del estudio o con cualquier otro grupo de interés.
5. **Revisión ética:** Antes de iniciar el estudio, se someterá a revisión ética por parte de un comité de ética independiente. Esto ayudará a garantizar que el estudio se lleve a cabo de acuerdo con los estándares éticos y que se proteja la seguridad y el bienestar de los participantes.

Por este medio me comprometo a seguir los procedimientos establecidos y a proceder éticamente durante toda la realización del proyecto.

Diego Andrés Medina Mencos - 19697