

## PROCEDIMIENTO UDP

*[Dirigido a los médicos responsables del paciente]*

El procedimiento se inicia con la propuesta del equipo médico de un paciente para su inclusión de acuerdo con los siguientes criterios:

1. Hallazgos genéticos sin evidencia suficiente de patogenicidad (**variantes de significado incierto, VUS**) en genes que tienen un fenotipo MIM (*Mendelian Inheritance in Man*, <https://omim.org/> ) asociado.
2. **Incongruencia entre el fenotipo MIM y el genotipo del paciente:** nuevos fenotipos que podrían estar asociados al gen.
3. **Fenotipo clínico complejo del paciente**, con discrepancias o congruencias parciales respecto del genotipo candidato identificado.
4. Sospecha de la presencia de una **segunda enfermedad en el paciente (comorbilidad)**.
5. Dificultades en la interpretación del patrón hereditario de una variante del paciente.
6. Genes sin fenotipo MIM: el paciente presenta una **variante patogénica en un gen no asociado a enfermedad** (nuevo gen – *gene discovery?*).
7. **Sospecha** clínica de enfermedad recesiva en un paciente con una única variante genética identificada, lo que sugiere la presencia de una **segunda variante**.
8. La **necesidad de la búsqueda de diagnóstico mediante análisis multiómicos**.

A continuación, si el paciente cumple con los criterios de inclusión, se realizan las pruebas de genómica funcional bien *in silico*, bien *in vitro* o aplicando ambas aproximaciones para determinar el impacto biológico y patológico de las variantes genéticas.

Los métodos incluyen análisis genéticos, moleculares y celulares, como son técnicas de PCR cuantitativa, clonación y expresión génica, secuenciación de DNA o cDNA, localización subcelular de proteínas, interacción entre proteínas, análisis de imagen celular mediante microscopía confocal, etc.

Se han definido **cuatro tipos de petición** asociadas a las diferentes pruebas funcionales:

- **SILICO:** estudio *in-silico* de la variación genética:
  - Predecir el impacto de la variante candidata en el DNA, RNA y/o proteína.
  - Identificar la variante causal mediante el análisis de datos ómicos.

- **DTDNA:** validación experimental de las predicciones *in silico* utilizando DNA del paciente (sangre periférica u otros tejidos).
- **DTRNA:** validación experimental de las predicciones *in silico* utilizando RNA del paciente (sangre periférica u otros tejidos).
- **DTFIBR:** validación experimental de las predicciones *in silico* en fibroblastos del paciente.

Petición	Indicación clínico-biológica	Prueba funcional	Técnicas	Reactivos
<b>SILICO</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Análisis <i>in-silico</i> exhaustivo del impacto de la variante.</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Estudio del impacto de la variante genética sobre: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Los transcritos del gen donde localiza.</li> <li>• La estructura primaria, secundaria y terciaria de la proteína codificada.</li> </ul> </li> <li>2. Análisis de la variante con predictores de patogenicidad.</li> <li>3. Data mining en diferentes bancos de datos del gen y de la variante; de mecanismos fisiopatológico, de posibles pacientes con variantes en el mismo gen.</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Búsqueda en bases de datos del genoma (como Ensembl), de frecuencias alélicas (como Gnomad y CSVS), de dominios proteicos (como Uniprot), de asociaciones clínicas (como Franklin genoox, Clinvar).</li> <li>• Programas de algoritmos específicos: como Pymol, iTasser, SphIA AI, etc</li> <li>• Revisión exhaustiva de la literatura (como PubMed).</li> </ul>	
<b>DTDNA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Análisis genético con búsqueda de variantes y su segregación parental.</li> </ul>	<p>Se realiza un DTDNA en tres supuestos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Identificación de variantes "Deep intronic" tras hallazgo de pseudoexón en RNAseq.</li> <li>• Identificación de la fase de variantes, en <i>cis</i> o <i>trans</i>.</li> <li>• Expresión de variantes genéticas en regiones reguladoras de la actividad del gen.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PCR.</li> <li>• Clonación de fragmentos genómicos o de cDNA.</li> <li>• Secuenciación de DNA o cDNA.</li> <li>• Estudio de la actividad del gen: ensayo de luciferasa.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DNA polimerasas, nucleótidos.</li> <li>• Oligocebadores específicos.</li> <li>• Vectores de clonación y enzimas ligasas.</li> <li>• Kit de actividad luciferasa.</li> </ul>
<b>DTRNA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Variante que afecte el splicing (sitio consensus, sitio criptico o variante sinónima).</li> <li>• Variante genómica (ej., microdelección).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estudio cualitativo y/o cuantitativo de la expresión génica.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Extracción RNA.</li> <li>• RT-PCR cualitativa.</li> <li>• RT-qPCR (Quant Studio 6 Flexi) (puede incluir cuantificación específica de alelo).</li> <li>• PCR Digital.</li> <li>• Secuenciación de cDNA.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubos Tempus.</li> <li>• Kit de extracción de RNA.</li> <li>• Retrotranscriptasas.</li> <li>• Polimerasas y nucleótidos.</li> <li>• Oligocebadores específicos.</li> <li>• Agentes intercalantes.</li> </ul>
<b>DTFIBR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Variante missense que cambian el aminoácido en la proteína.</li> <li>• Variante que genere proteínas de menor tamaño.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Determinar el impacto de la variante sobre el producto génico (RNA, proteínas)</li> <li>• Definir el fenotipo celular.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cultivo de fibroblastos: basal y tras tratamientos.</li> <li>• Extracción RNA, RT-PCR, RT-qPCR.</li> <li>• Secuenciación de cDNA.</li> <li>• Extracción proteínas: Western blot, Inmunotinción (microscopio confocal).</li> <li>• Estudio de interacciones: PLA/co-IP.</li> <li>• Técnicas fisiológicas específicas (ej., respiración mitocondrial – Seahorse).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticuerpos específicos.</li> <li>• Reactivos generales de biología celular (ej., medios de cultivo).</li> <li>• Material plástico de cultivo.</li> <li>• Reactivos biología molecular (véase arriba: DTDNA y DTRNA).</li> </ul>

Al final se emite un informe biológico y la toma de decisiones conjunta con el equipo médico.