

Diagnóstico de enfermedades genéticas y experimentación animal



FICHA DEL ESTUDIANTE

1.1 ACTIVIDAD GENÉTICA MOLECULAR: DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DEL CROMOSOMA X FRÁGIL

1.1.1 ¿En qué consiste el síndrome del cromosoma X frágil?

El síndrome del cromosoma X frágil (SXF) o síndrome de Martin-Bell, es la forma más común de retraso mental hereditario y la segunda causa genética de retraso mental desprendido del síndrome de Down. La prevalencia (número de casos en una población y momento concretos) es de 1/4000 hombres y 1/8000 mujeres, con una frecuencia de portadoras de 1/600 mujeres.

La clínica del síndrome consiste principalmente en un retraso mental de moderado a grave, incluyendo trastornos del comportamiento tales como déficit de atención, hiperactividad, TEA y movimientos repetitivos o estereotipias. Además, también presentan manifestaciones físicas tales como cara alargada con mandíbula prominente, orejas grandes y excesivo desarrollo de los testículos en hombres adolescentes. La clínica es más leve y presenta más variabilidad en mujeres que en hombres.

1.1.2 Genética del SXF

El SXF es una enfermedad genética asociada a mutaciones al gen FMR1 (Fragile Mental Retardation Gene 1), que codifica por la proteína FMRP, por lo que se conoce como una enfermedad monogénica. Se trata de una enfermedad con un número reducido de mutaciones descritas, que carrera, por lo tanto, con poca heterogeneidad alélica. La proteína FMRP se expresa principalmente a las neuronas, pero también a placenta, linfocitos y testículos.

El nombre se debe al hecho que al genoma humano hay lugares que, en ciertas condiciones de cultivo celular, se estrechan o interrumpen. El SXF está asociado a uno de los lugares frágiles más conocidos del genoma, el Xq27.3 (FRAXA).

Las mutaciones se caracterizan por el aumento en el número de repeticiones del tándem CGG (citosina-guanina-guanina) en la región no codificante del gen 5'UTR. En estado normal, el gen presenta entre 5 y 55 repeticiones en tándem, siendo 30 el número de CGGs más típico. Cuando hay entre 55 y 200, se conoce como estado de premutación (PM) y se asocia a ciertos desórdenes psicomotrices, aunque no mentales. Cuando el número de CGGs consecutivas es superior a 200, no se produce la mRNA a causa de cambios epigenéticos al DNA y, por lo tanto, tampoco la proteína FMRP (lo que se conoce como mutación completa o FM), y es cuando aparece el fenotipo asociado a la SXF.

Las premutaciones son inestables durante la meiosis (generación de gametos) y pueden expandirse y originar mutaciones completas. Estas expansiones que pasan de PM a FM siempre se dan a través de la madre y el riesgo asociado a la generación de FM presenta correlación positiva (dos variables que se mueven en la misma dirección) con el tamaño de la repetición. Curiosamente, a la espermatogénesis, se da un mecanismo de selección negativa contra los gametos con alelos FM, predominando las células portadoras de PM. Dado que esto no ocurre en la línea germinal femenina ni en las células somáticas (no sexuales), las expansiones de PM a FM se transmiten a través de la madre. Esto también provoca que entre el 20 y 40% de individuos con SXF presenten mosaicismo (alteración genética por la cual un individuo tiene dos o más líneas celulares

con composición genética diferente), por lo que sí expresan cierta cantidad de proteína FMRP, la cual explica la diversidad fenotípica y clínica.

Este mecanismo molecular genera el que en genética se conoce como fenómeno de anticipación, según el cual la edad de inicio de la enfermedad es menor y/o la severidad de las manifestaciones clínicas a medida que pasan las generaciones de una misma familia.

Ahora aplicaremos el que hemos aprendido para conocer cómo se diagnostican las enfermedades génicas a la sección de genética molecular.

1.1.3 Planteamiento de la actividad

Planteamiento

Nos han llegado 3 muestras de sangre de los pacientes que hemos visitado en la consulta de genética durante esta semana. Se trataba de 3 niños (Nil, Vicente y Guillermo) con retraso mental grave, así como alteraciones psicomotrices.

Junto a los genetistas responsables les hemos realizado la correspondiente anamnesis y observación del fenotipo de los niños, principalmente los rasgos faciales. Hemos anotado toda la información y construido el árbol genealógico de las 3 familias, teniendo en cuenta los antecedentes de enfermedades hereditarias que nos han explicado.

Hipótesis

Tenemos la sospecha de que 1 o 2 de ellos, Nil y Vicente, podrían presentar el síndrome del cromosoma X frágil, puesto que los rasgos físicos podrían corresponder a esta enfermedad. Además, los padres referían otros familiares afectados.

Problema

La ley contempla que los datos relativos a los pacientes son sensibles, por lo que tenemos que tratarlas con cuidado y evitar al máximo la exposición. Por eso, se suele recurrir al uso de códigos para anonimizar las muestras.

Aun así, nuestro supervisor de laboratorio se ha despistado y no ha anotado la correspondencia entre los códigos (#1, #2 o #3) y las fichas de los pacientes.

¿Qué podemos hacer? Intentad pensar de qué manera lo podríamos solucionar

1.1.4 Objetivo de la actividad

Metodología general

Como hemos visto anteriormente, en el laboratorio de genética molecular se utiliza principalmente una muestra humana (en este, caso sangre periférica) por el análisis.

El primer paso sería, por tanto, la extracción del DNA a partir de la muestra de sangre, el cual se realiza de forma automatizada mediante el protocolo que ya habéis trabajado anteriormente, aunque en una versión algo más sofisticada.

Posteriormente, se amplificará esta muestra mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR (de las siglas en inglés de polymerase chain reaction). En esta reacción aumentaremos el número de copias de DNA del fragmento que nos interesa estudiar: la banda 27.3 del brazo largo (o q de queue) del cromosoma X, donde se localiza el gen FMR.

Posteriormente habrá que estudiar el número de repeticiones del tándem CGG con la técnica de la electroforesis en gel de agarosa, que nos permitirá visualizar el tamaño del fragmento de DNA que codifica por el gen FMR.

Antes de realizar la práctica, haremos una breve explicación de los principios de las técnicas de PCR y electroforesis.

PCR: de las siglas en inglés de polymerase chain reaction, la PCR es una técnica básica de biología molecular que permite amplificar (es decir, obtener muchas copias de un fragmento de DNA) a partir de poco material de partida. Por eso se utilizan secuencias complementarias a la que se quiere amplificar (cebadores o primeros).

Electroforesis: significa “movimiento por electricidad” y se trata de una técnica de biología molecular que permite separar los fragmentos de DNA por tamaño gracias a una matriz sólida formada por agarosa (polisacárido formado por repetidas unidades de agarobiosa). Al aplicar una corriente eléctrica sobre el hielo, que se encuentra inmerso en un tampón conductor de electricidad, los fragmentos de DNA (cargados negativamente) se moverán desde el polo negativo o cátodo hacia el polo positivo o ánodo. El gel sirve como matriz por donde el DNA viaja de forma inversamente proporcional a su tamaño: los fragmentos de mayor medida encuentran más dificultades para moverse por los agujeros de la matriz y, por lo tanto, avanzan más hacia el ánodo.

Para entendernos, imaginamos la siguiente situación: cogemos todas las sillas y tablas de la clase y las distribuimos aleatoriamente por el aula, muy prietas. Si un alumno quiere cruzar la clase de punta a punta atravesando el mobiliario, lo tendrá mucho más fácil yendo solo que en grupo con más compañeros cogidos de la mano.

Metodología que aplicaremos

Como en los laboratorios se trabaja mucho en equipo, partiremos de las muestras de DNA ya amplificadas previamente por nuestros compañeros por la secuencia del gen FMR, por lo que seremos los encargados de realizar la electroforesis en gel de agarosa para estudiar si hay un número mayor de repeticiones respecto al estándar.

Los 24 alumnos se dividirán en 8 grupos de 3 y cada uno cargará 1 muestra en el gel. De este modo todos podrán cargar una muestra y cada equipo correrá las 3 muestras.

1.1.5 Desarrollo de la actividad: electroforesis en gel de agarosa para el estudio del tamaño del DNA

Utilizaremos el “**Analysis of Precut Lambda DNA kit**” (BioRad, #1660001EDU).

PROTOCOLO

Previamente se deberá haber hecho una parte de preparación de reactivos y materiales.

(I) Preparación de las muestras y carga de gel

1. Transferir 10 µL de la muestra de DNA #1, #2 o #3 a un tub de 1,5 mL net.
2. Añadir 2 µL de tampón de carga (LD) al tub amb DNA.
3. Tapar el tub y agitar con golpes suaves con los dedos.
4. Cargar 10 µL de cada muestra en diferentes pozos del gel. Cada alumno cargará 1 muestra, de manera que tendremos 3 muestras/gel.
5. Tapar la cámara de electroforesis y conectar a la fuente de alimentación (vigilad con los polvos: los colores entre la cámara y la fuente se deben corresponder).
6. **Correr** a 100V durante 30 minutos.

(II) Visualización de los fragmentos de DNA

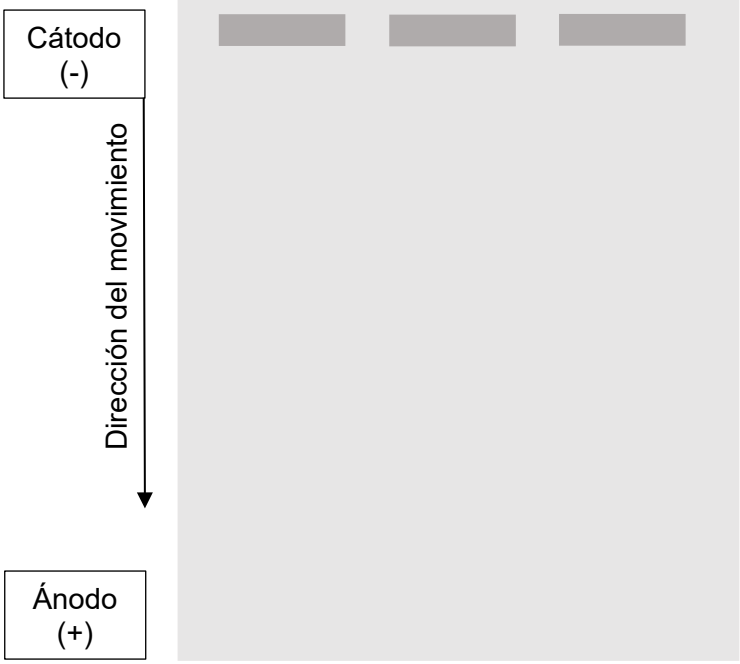
7. Cuando haya acabado la electroforesis, apagar la fuente de alimentación y quitar la tapa de la cámara.
8. Pasar el gel a una bandeja nueva para teñir (meteremos 2 geles por bandeja)
9. Añadir 120 mL de Fast Blast DNA stain 100x por bandeja. Teñiremos con una solución Fast Blast DNA 100x para permitir la visualización inmediata de las bandas de DNA, ya que las moléculas de colorante adheridas al DNA quedarán atrapadas en el gel, marcando así su localización.
10. Teñir durante 2 minutos y después recuperar la solución de tinción en un bote.
11. Meter la bandeja con los geles en agua corriente del grifo durante 10 segundos.
12. Dejar incubar en agua limpia durante 5 minutos. Al acabar el tiempo, cambiar el agua y dejar otros 5 minutos.

Predicción de resultados

Ahora que sabemos cómo funciona la electroforesis y el mecanismo molecular de la SXF, ¿cómo creéis que será la migración de las diferentes muestras de DNA de los pacientes? ¿Llegarán todas igual de lejos?

Predicción de resultados

Dibujad en el esquema del gel cómo pensáis que migrarán las muestras según vuestra predicción. Tened en cuenta que no sabemos a qué paciente corresponde cada código numérico, por lo que debéis anotar la predicción según si la muestra tendrá o no la alteración.



1.1.6 Análisis de resultados

Comparación de resultados

Hemos partido de 3 muestras iniciales de DNA ya amplificado (#1, #2 y #3), de las cuales cada grupo ha cargado una parte en su gel de agarosa. Esto es lo que se conoce como réplicas experimentales.

¿Hemos llegado todos los grupos al mismo diagnóstico? Si no es así, ¿por qué creéis que no? ¿Cómo lo solucionaríais? Mirad de encontrar alguna explicación.

Interpretación de los resultados y contraste de la hipótesis inicial

¿Qué conclusiones podemos sacar a partir de lo que hemos observado en el gel?

¿Los resultados observados se corresponden con vuestra predicción?

Comunicación de los resultados

Teniendo toda la información previa en mente, junto a los resultados obtenidos, ¿cómo pensáis que tendríamos que dar la información a las familias? Anotad si pensáis que se tendría que hacer algo más.

1.2 ACTIVIDAD CITOGENÉTICA: OBTENCIÓN DEL CARIOGRAMA PARA EL DIAGNÓSTICO

El cariotipo es el conjunto de cromosomas que caracteriza una especie. Cuando realizamos una ordenación de estos cromosomas en pares de homólogos siguiendo criterios morfológicos segundos la posición del centrómero, obtenemos el cariógrama, que es de mucha utilidad en la práctica clínica por la detección de alteraciones genéticas.

El cariotipo humano consta de 46 cromosomas, organizados en 22 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales (Macho 46, XY; Hembra 46, XX). Por su obtención se utilizan células de diferentes orígenes (linfocitos de sangre periférica, fibroblastos dérmicos, células de mucosa, células amnióticas u otros tejidos). Brevemente, el protocolo consiste al cultivar las células aisladas durante 72 horas para obtener células en división, a las que se les aplica un tratamiento con colquicina, que rompe el aparato mitótico para acumular células en metafase. Después se realiza un choque hipotónico para hinchar las células y separar los cromosomas, para pasar a fijarlas, extenderlas sobre portaobjetos y teñirlas con la solución correspondiente (Giemsa para obtener bandas G).

Utilizaremos 2 muestras de cromosomas en metafase teñidos con bandas G (zonas ricas en AT, visualizadas por tinción de Giemsa) para generar el cariógrama siguiendo la clasificación de Denver (1960), que agrupa los pares de cromosomas en 7 grupos diferentes, según tamaño (de más grandes a más pequeños) y posición del centrómero:

- Grupo A: pares 1, 2 y 3; grandes y metacéntricos o ligeramente submetacéntricos
- Grupo B: pares 4 y 5; grandes y submetacéntricos
- Grupo C: pares del 6 al 12; de tamaño mediano y submetacéntricos
- Grupo D: pares 13, 14 y 15; de tamaño mediano y acrocéntricos
- Grupo E: pares 16, 17 y 18; metacéntricos o submetacéntricos relativamente cortos
- Grupo F: pares 19 y 20; los más pequeños de los metacéntricos
- Grupo G: pares 21 y 22; los más pequeños de los acrocéntricos
- Cromosomas sexuales: el cromosoma X es submetacéntrico y mediano, con silueta similar a los de los primeros pares del grupo C; mientras que el cromosoma Y es ligeramente más largo que los cromosomas del grupo G, pero con la peculiaridad del paralelismo de los brazos largos.

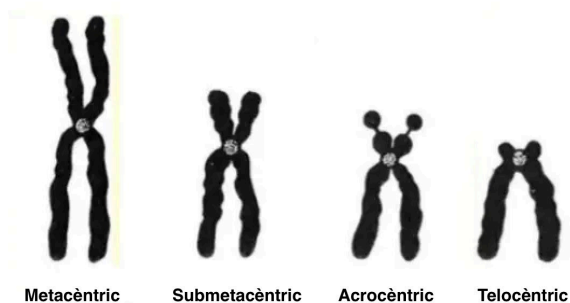


Figura 1: clasificación de los cromosomas según la posición del centrómero
Fuente: Adaptado de <https://genotipia.com/cromosomas/clasificacion-cromosomas-centromero/>

Tarea a realizar

Ahora os repartiremos a cada uno de vosotros 1 cariotipo completo, correspondiente a los pacientes #1 o #2 y una plantilla para realizar su cariotograma.

Utilizando el esquema del cariotipo humano en metafase que encontraréis a continuación, montad el cariotograma del paciente que os ha tocado para averiguar qué tipo de alteración tiene.

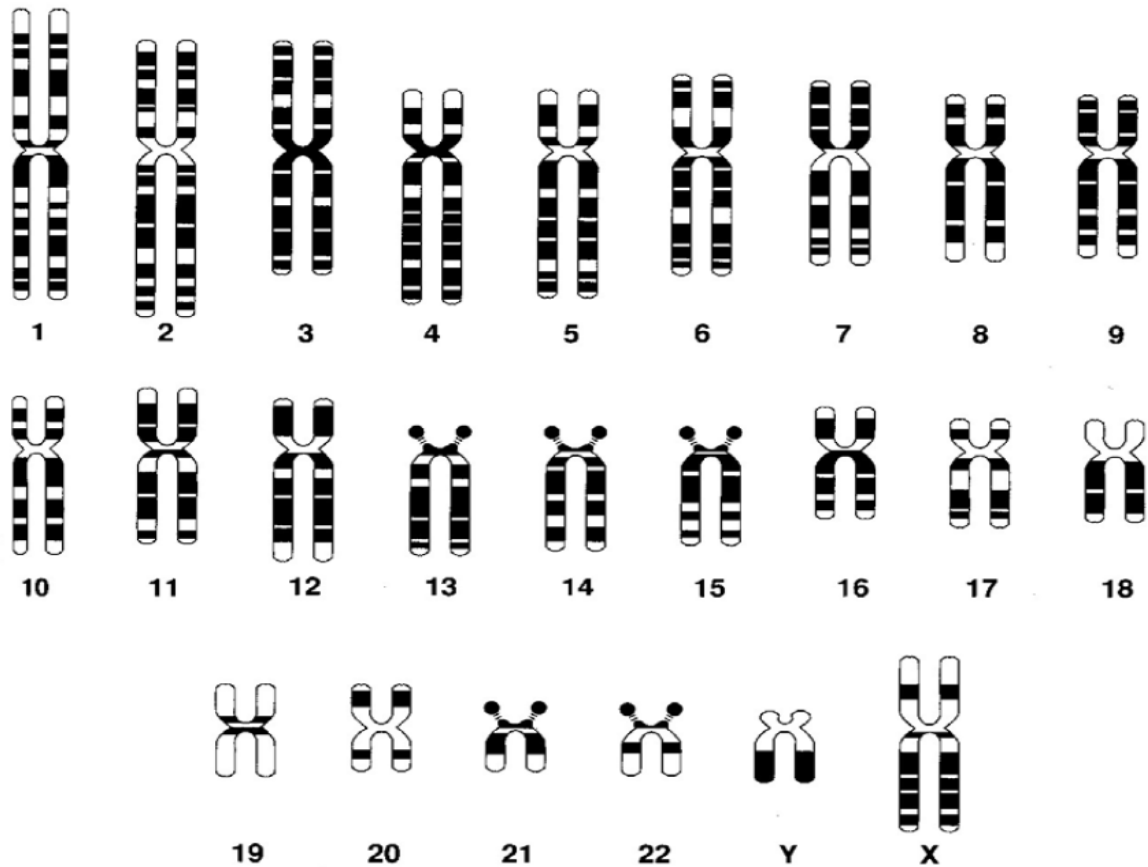


Figura 2: cariotipo humano en metafase con visualización de bandas G (solo se muestra 1 cromosoma de cada par)

Font: https://www.researchgate.net/figure/Diagrammatical-representation-of-the-human-karyotype-of-haploid-chromosome-set-with-X-and-fig2_269643712

1.2.1 Análisis de resultados

Conclusiones

¿Qué alteración tiene el paciente que has cariotipado? ¿Sabes de qué enfermedad se trata?

Compara tu resultado con otro compañero que tenga el mismo paciente que tú. ¿Habéis llegado a la misma conclusión?

Para acabar, compara tu resultado con un compañero que tenga al otro paciente.