

Diagnòstic de malalties genètiques i experimentació animal



FITXA DE L'ESTUDIANT

1.1 ACTIVITAT GENÈTICA MOLECULAR: DIAGNÒSTIC DE LA SÍNDROME DEL CROMOSOMA X FRÀGIL

1.1.1 En què consisteix la síndrome del cromosoma X fràgil?

La **síndrome del cromosoma X fràgil (SXF)** o síndrome de Martin-Bell, és la forma més comuna de retard mental hereditari i la segona causa genètica de retard mental després de la síndrome de Down. La prevalença (nombre de casos en una població i moment concrets) és de 1/4000 homes i 1/8000 dones, amb una freqüència de portadores de 1/600 dones.

La clínica de la síndrome consisteix principalment en un retard mental de moderat a greu, incloent trastorns del comportament tals com dèficit d'atenció, hiperactivitat, TEA i moviments repetitius o estereotípies. A més també presenten manifestacions físiques tals com cara allargada amb mandíbula prominent, orelles grans i excessiu desenvolupament dels testicles en homes adolescents. La clínica és més lleu i presenta més variabilitat en dones que en homes.

1.1.2 Genètica de la SXF

La SXF és una malaltia genètica associada a mutacions al **gen *FMR1*** (*Fragile Mental Retardation Gene 1*), que codifica per la proteïna FMRP, pel que es coneix com una malaltia monogènica. Es tracta d'una malaltia amb un nombre reduït de mutacions descrites, que cursa, per tant, amb poca heterogeneïtat al·lèlica. La proteïna FMRP s'expressa principalment a les neurones, però també a placenta, limfòcits i testicles.

El nom es deu al fet que al genoma humà hi ha llocs que, en certes condicions de cultiu cel·lular, s'estrenyen o interrompen. LA SXF està associada a un dels llocs fràgils més coneguts del genoma, l'Xq27.3 (FRAXA).

Les mutacions es caracteritzen per l'augment en el nombre de repeticions del tàndem CGG (citosina-guanina-guanina) en la regió no codificant del gen 5'UTR. En estat normal, el gen presenta entre 5 i 55 repeticions en tàndem, sent 30 el nombre de CGGs més típic. Quan hi ha entre 55 i 200, es coneix com a estat de premutació (PM) i s'associa a certs desordres psicomotrius, encara que no mentals. Quan el nombre de CGGs consecutives és superior a 200, no es produeix l'mRNA a causa de canvis epigenètics al DNA i, per tant, tampoc la proteïna FMRP (el que es coneix com mutació completa o FM), i és quan apareix el fenotip associat a la SXF.

Les premutacions són inestables durant la meiosi (generació de gàmetes) i poden expandir-se i originar mutacions completes. Aquestes expansions que passen de PM a FM sempre es donen a través de la mare i el risc associat a la generació de FM presenta correlació positiva (dues variables que es mouen en la mateixa direcció) amb la grandària de la repetició. Curiosament, a l'espermatogènesi, es dona un mecanisme de selecció negativa contra les gàmetes amb al·lèls FM, predominant les cèl·lules portadores de PM. Atès que això no ocorre en la línia germinal femenina ni a les cèl·lules somàtiques (no sexuals), les expansions de PM a FM es transmeten a través de la mare. Açò també provoca que entre el 20 i 40% d'individus amb SXF presentin mosaïcisme (alteració genètica per la qual un individu té dos o més línies cel·lulars amb composició genètica diferent), per la qual cosa sí expressen certa quantitat de proteïna FMRP, la qual explica la diversitat fenotípica i clínica.

Aquest mecanisme molecular genera el que en genètica es coneix com fenomen d'anticipació, segons el qual l'edat d'inici de la malaltia és menor i/o la severitat de les manifestacions clíniques a mesura que passen les generacions d'una mateixa família.

Ara aplicarem el que hem après per conèixer com es diagnostiquen les malalties gèniques a la secció de genètica molecular.

1.1.3 Plantejament de l'activitat

Plantejament

Ens han arribat 3 mostres de sang dels pacients que hem visitat a la consulta de genètica durant aquesta setmana. Es tractava de 3 nens (Nil, Vicent i Guillem) amb retard mental greu, així com alteracions psicomotrius.

Junt als genetistes responsables els hem realitzat la corresponent anamnesi i observació del fenotip dels nens, principalment els trets facials. Hem anotat tota la informació i construït l'arbre genealògic de les 3 famílies, tenint en compte els antecedents de malalties hereditàries que ens han explicat.

Hipòtesi

Tenim la sospita de que 1 o 2 d'ells, el Nil i el Vicent, podrien presentar la síndrome del cromosoma X fràgil, ja que els trets físics podrien correspondre a aquesta malaltia. A més a més, els pares referien altres familiars afectats.

Problema

La llei contempla que les dades relatives als pacients són sensibles, per la qual cosa hem de tractar-les amb cura i evitar-ne al màxim l'exposició. Per això, es sol recórrer a l'ús de codis per anonimitzar les mostres.

Tanmateix, el nostre supervisor de laboratori s'ha descuidat i no ha anotat la correspondència entre els codis (#1, #2 o #3) i les fitxes dels pacients.

Què podem fer? Intenteu pensar de quina manera ho podríem solucionar

1.1.4 Objectiu de l'activitat

Metodologia general

Com hem vist anteriorment, al laboratori de genètica molecular s'utilitza principalment una mostra humana (en aquest, cas sang perifèrica) per l'anàlisi.

El primer pas seria, per tant, l'**extracció del DNA** a partir de la mostra de sang, el qual es realitza de forma automatitzada mitjançant el protocol que ja heu treballat anteriorment, encara que en una versió una mica més sofisticada.

Posteriorment, s'amplificarà aquesta mostra mitjançant la tècnica de reacció en cadena de la polimerasa o **PCR** (de les sigles en anglès de *polymerase chain reaction*). En aquesta reacció augmentarem el nombre de còpies de DNA del fragment que ens interessa estudiar: la banda 27.3 del braç llarg (o *q* de *queue*) del cromosoma X, on es localitza el gen *FMR*.

Posteriorment caldrà estudiar el nombre de repeticions del tàndem CGG amb la tècnica de l'**electroforesi en gel d'agarosa**, que ens permetrà visualitzar la grandària del fragment de DNA que codifica pel gen *FMR*.

Abans de realitzar la pràctica, farem una breu explicació dels principis de les tècniques de PCR i electroforesi.

PCR: de les sigles en anglès de *polymerase chain reaction*, la PCR és una tècnica bàsica de biologia molecular que permet amplificar (és a dir, obtenir moltes còpies d'un fragment de DNA) a partir de poc material de partida. Per això s'utilitzen seqüències complementàries a la que es vol amplificar (encebadors o *primers*).

Electroforesi: significa "moviment per electricitat" i es tracta d'una tècnica de biologia molecular que permet separar els fragments de DNA per grandària gràcies a una matriu sòlida formada per agarosa (polisacàrid format per repetides unitats d'agarobiosa). En aplicar un corrent elèctric sobre el gel, que es troba immers en un tampó conductor d'electricitat, els fragments de DNA (carregats negativament) es mouran des del pol negatiu o càtode cap al pol positiu o ànode. El gel serveix com a matriu per on el DNA viatja de forma inversament proporcional a la seva grandària: els fragments de major mida troben més dificultats per moure's pels forats de la matriu i, per tant, avancen més cap a l'ànode.

Per entendre'ns, imaginem la següent situació: agafem totes les cadires i taules de la classe i les distribuïm aleatòriament per l'aula, ben atapeïdes. Si un alumne vol creuar la classe de punta a punta travessant el mobiliari, ho tindrà molt més fàcil anant sol que en grup amb més companys agafats de la mà.

Metodologia que aplicarem

Com als laboratoris es treballa molt en equip, partirem de les mostres de DNA ja amplificades prèviament pels nostres companys per la seqüència del gen *FMR*, pel que serem els encarregats de realitzar l'electroforesi en gel d'agarosa per estudiar si hi ha un nombre major de repeticions respecte a l'estàndard.

Els 24 alumnes es dividiran en 8 grups de 3 i cadascun carregarà 1 mostra al gel. D'aquesta manera tots podran carregar una mostra i cada equip correrà totes 3 mostres.

1.1.5 Desenvolupament de l'activitat: electroforesi en gel d'agarosa per l'estudi de la grandària del DNA

Utilitzarem l'"**Analysis of Precut Lambda DNA kit**" (BioRad, #1660001EDU).

PROTOCOL

Prèviament s'haurà fet una part de preparació de reactius i materials.

(I) Preparació de les mostres i càrrega del gel

1. Transferiu 10 µL de la mostra de DNA #1, #2 o #3 a un tub d'1,5 mL net.
2. Afegiu 2 µL de tampó de càrrega (LD) al tub amb DNA.
3. Tapeu el tub i agiteu amb cops suaus amb els dits.
4. Carregueu 10 µL de cada mostra en diferents pous del gel. Cada alumne carregarà 1 mostra, de manera que tindrem 3 mostres/gel.
5. Tapeu la cambra d'electroforesi i connectar a la font d'alimentació (vigilar amb les pólvores: els colors entre la cambra i la font s'han de correspondre).
6. **Correu** a 100V durant 30 minuts.

(II) Visualització dels fragments de DNA

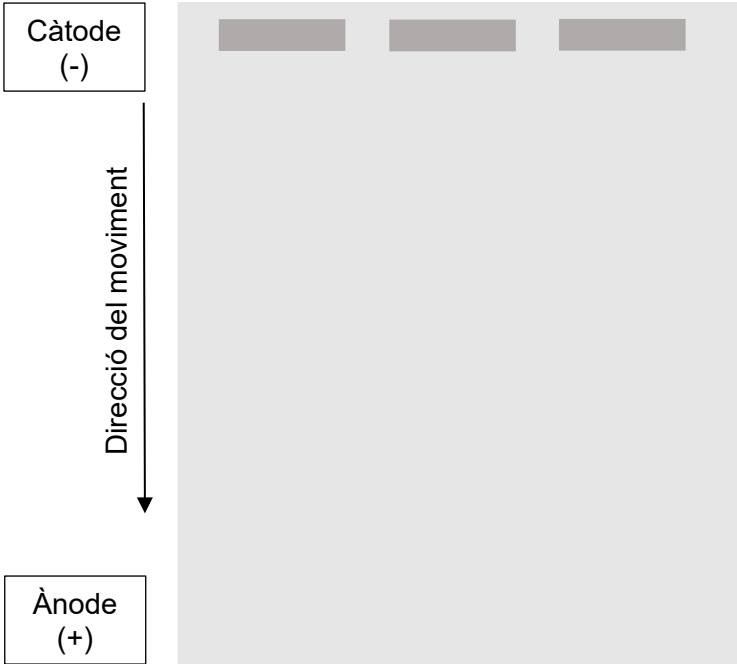
7. Quan hagi acabat l'electroforesi, tanqueu la font d'alimentació i traieu la tapa de la cambra.
8. Passeu el gel a una safata nova per tenyir (ficarem 2 gels per safata)
9. Afegiu 120 mL de Fast Blast DNA stain 100x per safata. Tenyirem amb solució Fast Blast DNA 100x per permetre la visualització immediata de les bandes de DNA, ja que les molècules de colorant adherides al DNA quedaran atrapades al gel, marcant així la seva localització.
10. Tenyiu durant 2 minuts i després recuperar la solució de tinció en un pot.
11. Fiqueu la safata amb els gels en aigua corrent de l'aixeta durant 10 segons.
12. Deixeu incubar en aigua neta durant 5 minuts. En acabar el temps, canvieu l'aigua i deixeu altres 5 minuts.

Predicció de resultats

Ara que sabem com funciona l'electroforesi i el mecanisme molecular de la SXF, com creieu que serà la migració de les diferents mostres de DNA dels pacients? Arribaran totes igual de lluny?

Predicció de resultats

Dibuixeu a l'esquema del gel com penseu que migraran les mostres segons la vostra predicció. Tingueu en compte que no sabem a quin pacient correspon cada codi numèric, pel que anoteu la predicció segons si la mostra tindrà o no l'alteració.



1.1.6 Anàlisi de resultats

Comparació de resultats

Hem partit de 3 mostres inicials de DNA ja amplificat (#1, #2 i #3), de les quals cada grup ha carregat una part al seu gel d'agarosa. Això és el que es coneix com rèpliques experimentals.

Hem arribat tots els grups al mateix diagnòstic? Si no és així, per què creieu que no? Com ho solucionaríeu? Mireu de trobar alguna explicació.

Interpretació dels resultats i contrast de la hipòtesi inicial

Quines conclusions podem treure a partir del que hem observat al gel?

Els resultats observats es corresponen amb la vostra predicció?

Comunicació dels resultats

Tenint tots la informació prèvia en ment, junt als resultats obtinguts, com penseu que hauríem de donar la informació a les famílies? Anoteu si penseu que s'hauria de fer alguna cosa més.

1.2 **ACTIVITAT CITOGENÈTICA:** OBTENCIÓ DEL CARIOGRAMA PEL DIAGNÒSTIC

El **cariotip** és el conjunt de cromosomes que caracteritza una espècie. Quan realitzem una ordenació d'aquests cromosomes en parells d'homòlegs seguint criteris morfològics segons la posició del centròmer, obtenim el **cariograma**, que és de molta utilitat en la pràctica clínica per la detecció d'alteracions genètiques.

El cariotip humà consta de 46 cromosomes, organitzats en 22 parells d'autosomes i un parell de cromosomes sexuals (Mascle 46, XY; Femella 46, XX). Per la seva obtenció s'utilitzen cèl·lules de diferents orígens (limfòcits de sang perifèrica, fibroblasts dèrmics, cèl·lules de mucosa, cèl·lules amniòtiques o d'altres teixits). Breument, el protocol consisteix en cultivar les cèl·lules aïllades durant 72 hores per obtenir cèl·lules en divisió, a les quals se'ls aplica un tractament amb colquicina, que trenca l'aparell mitòtic per acumular cèl·lules en metafase. Després es realitza un xoc hipotònic per inflar les cèl·lules i separar els cromosomes, per passar a fixar-les, estendre-les sobre portaobjectes i tenyir-les amb la solució corresponent (Giemsa per obtenir bandes G).

Utilitzarem 2 mostres de cromosomes en metafase tenyits amb bandes G (zones riques en AT, visualitzades per tinció de Giemsa) per generar el cariograma seguint la classificació de Denver (1960), la qual agrupa els parells de cromosomes en 7 grups diferents, segons grandària (de més grans a més petits) i posició del centròmer:

- **Grup A:** parells 1, 2 i 3; grans i metacèntrics o lleugerament submetacèntrics
- **Grup B:** parells 4 i 5; grans i submetacèntrics
- **Grup C:** parells del 6 al 12; de grandària mitjana i submetacèntrics
- **Grup D:** parells 13, 14 i 15; de grandària mitjana i acrocèntrics
- **Grup E:** parells 16, 17 i 18; metacèntrics o submetacèntrics relativament curts
- **Grup F:** parells 19 i 20; els més petits dels metacèntrics
- **Grup G:** parells 21 i 22; els més petits dels acrocèntrics
- **Cromosomes sexuals:** el cromosoma X és submetacèntric i mitjà, amb silueta similar als dels primers parells del grup C; mentre que el cromosoma Y és lleugerament més llarg que els cromosomes del grup G, però amb la peculiaritat del paral·lelisme dels braços llargs.

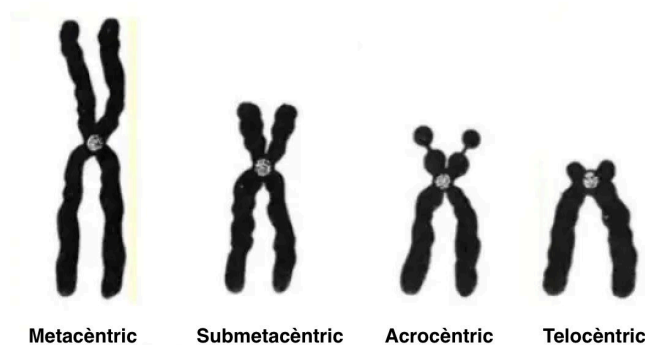


Figura 1: classificació dels cromosomes segons la posició del centròmer
Font: Adaptat de <https://genotipia.com/cromosomas/clasificacion-cromosomas-centromero/>

Tasca a realitzar

Ara us repartirem a cadascun de vosaltres **1 cariotip complet**, corresponent als pacients #1 ò #2 i una **plantilla** per realitzar el seu **cariograma**.

Utilitzant l'esquema del cariotip humà en metafase que trobareu a continuació, munteu el cariograma del pacient que us ha tocat per esbrinar quina mena d'alteració té.

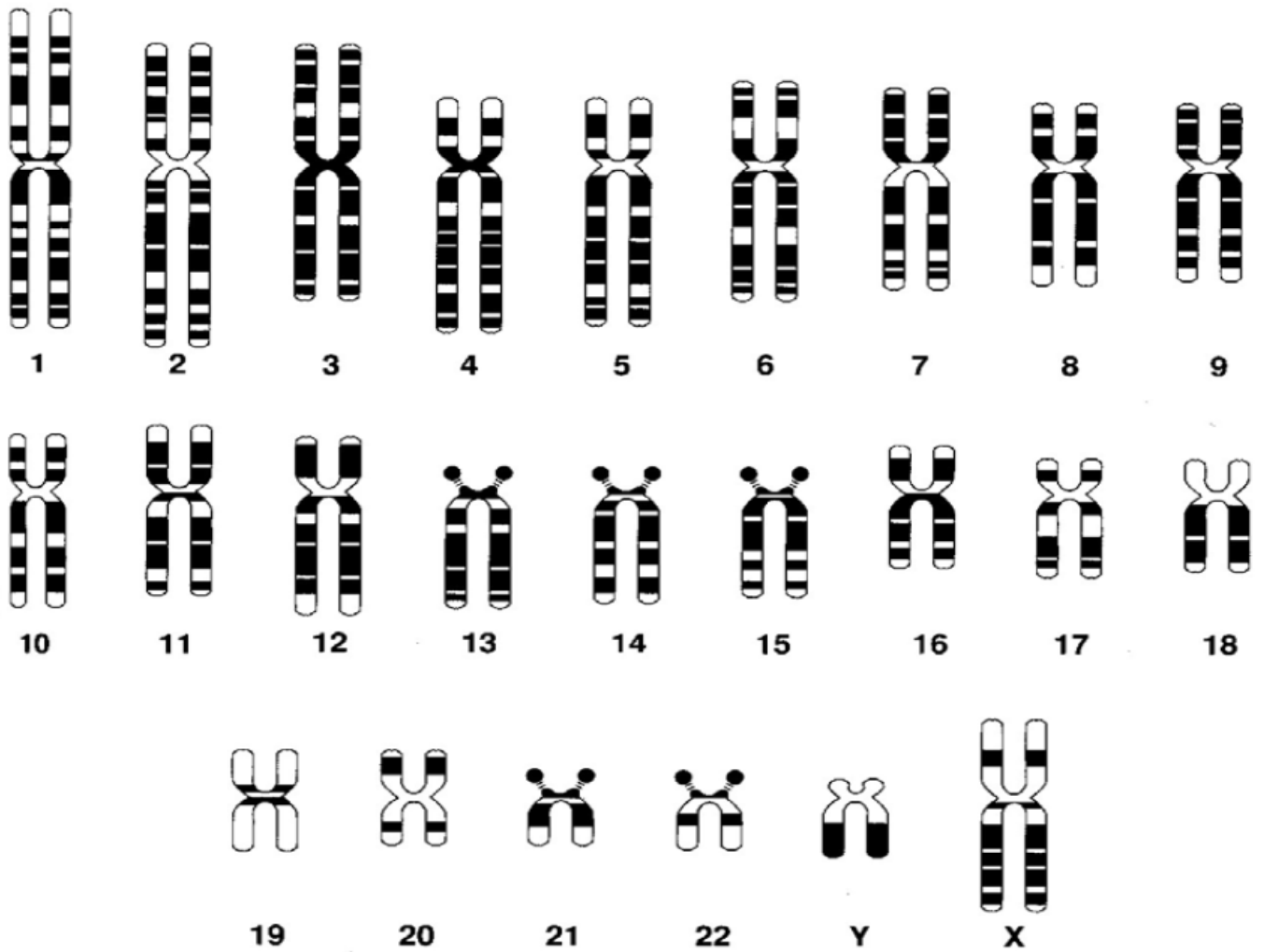


Figura 2: cariotip humà en metafase amb visualització de bandes G (només es mostra 1 cromosoma de cada parell)

Font: https://www.researchgate.net/figure/Diagrammatical-representation-of-the-human-karyotype-of-haploid-chromosome-set-with-X-and_fig2_269643712

1.2.1 Anàlisi de resultats

Conclusions

Quina alteració té el pacient que has cariotipat? Saps de quina malaltia es tracta?

Compara el teu resultat amb altre company que tingui el mateix pacient que tu. Heu arribat a la mateixa conclusió?

Per acabar, compara el teu resultat amb un company que tingui l'altre pacient.