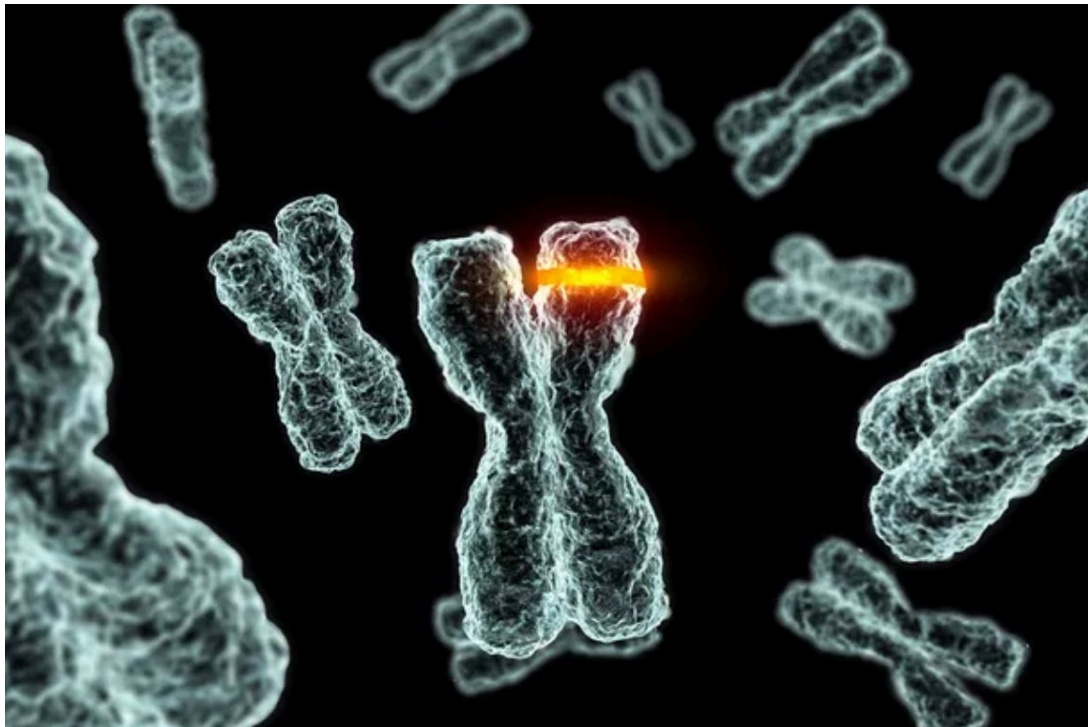


Diagnòstic de malalties genètiques i experimentació animal



GUIÓ DOCENT

CONTINGUTS

1. Alteracions genètiques, malalties hereditàries i consell genètic
 1. Alteracions genètiques i malalties hereditàries
 2. Unitats de consell genètic: funcions i estructura
 - 2.1. La consulta de genètica
 - 2.2. Genètica molecular: la síndrome del cromosoma X fràgil + activitat pràctica
 - 2.3. Citogenètica: diagnòstic d'alteracions cromosòmiques numèriques + activitat pràctica
 3. Debat sobre bioètica i genètica

2. La carrera investigadora en l'àmbit de la biomedicina
 1. Quines opcions tinc si vull cursar estudis relacionats amb biomedicina?
Graus universitaris de l'àmbit biosanitari
 2. I després del grau? Màsters, doctorats i sortides professionals

3. Experimentació animal
 1. Introducció a l'experimentació amb animals
 2. El ratolí com a model de recerca en obesitat
 - 2.1. Activitat pràctica: visualització de mostres de fetge de ratolí
 3. Debat sobre l'ús d'animals en investigació

BLOC 1

ALTERACIONS GENÈTIQUES, MALALTIES HEREDITÀRIES I CONSELL GENÈTIC

1.1 ALTERACIONS GENÈTIQUES I MALALTIES HEREDITÀRIES

Les **alteracions genètiques** són modificacions de la seqüència del DNA que, en major o menor mesura, poden tenir efectes en l'expressió i regulació genètiques i provocar desviacions del que considerat fenotip estàndard o consens respecte a un tret concret o un conjunt d'ells.

Les alteracions genètiques són, per tant, la base de les **malalties hereditàries**, encara que no totes les modificacions provoquen alteracions heretables.

La base de les malalties relacionades amb alteracions genètiques està en la **hipòtesi de dosi gènica**, establerta el 1999 per Pritchard i Kola, que estableix que els fenotips es deuen a un balanç entre les quantitats de producte o regulació de diferents gens. Per tant, quan aquest equilibri es veu alterat, hi ha una descompensació que, en major o menor mesura, generarà un fenotip alterat respecte a l'estàndard.

Segons la quantitat de material genètic que abasten, podem dividir les alteracions genètiques en dos tipus generals: gèniques i cromosòmiques.

1.1.1 Alteracions gèniques

Ens referim a malalties hereditàries associades a alteracions gèniques quan es hi ha un o pocs gens associats a la mateixa.

Segons el tipus de mutació, podem trobar diferents tipus de transmissió hereditària:

- Pèrdua de funció: genera fenotips recessius per diversos mecanismes: (1) manca de síntesi de producte gènic; (2) síntesi de producte gènic reduïda; (3) producte sintetitzat no funcional; (4) el producte d'un sol al·lel salvatge és suficient per evitar el fenotip de malaltia.
- Guany de funció: genera fenotips dominants degut a que (1) el producte gènic no funciona bé; (2) hi ha sobreexpressió del gen; (3) el gen ha perdut la seva regulació. Aquest fenomen es coneix com haploinsuficiència.

Segons la localització de la mutació, podem dividir els tipus d'herència en:

- Autosòmica: localitzada a algun dels autosomes o cromosomes no sexuals.
- Lligada al cromosoma sexual X: localitzada a la regió diferencial del cromosoma X.
- Lligada al cromosoma sexual Y: localitzada a la regió diferencial del cromosoma Y. Les malalties hereditàries que segueixen aquest patró només afecten als homes.
- Pseudoautosòmica: quan està localitzada en la regió comuna dels cromosomes sexuals.

1.1.2 Alteracions cromosòmiques

Variacions en el nombre o estructura normal dels cromosomes. Segons el criteri que utilitzem les podem dividir en:

(1) Morfologia i reestructuració:

- Numèriques: poliploidia (triploidia, tetraploidia); aneuploidia (trisomia, monosomia, nulissomia); mixoploidia (mosaicisme, quimerisme).

Programa **Amgen TransferCiència 2021-2022**

- **Estructurals:** delecions, duplicacions, insercions, translocacions (robertsonianes, recíproques), inversions, isocromosomes, cromosomes en anell, cromosoma marcador.

(2) Origen:

- **Constitucionals:** no es transmetran a la descendència perquè no es donen a la línia germinal
- **Somàtiques:** es passaran a la descendència perquè s'hi donen a la línia germinal

(3) Material genètic i repercussió:

- **Equilibrades:** no es dona augment ni pèrdua de material genètic
- **Desequilibrades:** si es dona augment o pèrdua de material genètic

Alteracions numèriques

Triploidies (47, XY, + CROM o 47, XX, +CROM): son letals en forma constitucional (pot ser sí en mosaic), excepte les següents:

- Trisomia del cromosoma 21 (síndrome de Down): anomalia autosòmica més comuna que presenta certes malformacions congènites
- Trisomia del cromosoma 18 (síndrome d'Edwards)
- Trisomia del cromosoma 13 (síndrome de Patau)
- Trisomia de cromosomes sexuals:
 - Triplo X (antigament superfemelles): 47,XXX: moderat dèficit intel·lectual
 - Doble Y: 47,XYY
 - Síndrome de Klinefelter: 47,XXY: ginecomastia, poca musculatura, poc pèl

Monosomia (45, X): falta d'un cromosoma. Excepte Turner, totes letals en forma constitucional, però algunes viables en mosaic:

- Monosomia del cromosoma X (síndrome de Turner): infantilisme, creixement retardat, genitals infantils, amenorrea primària (falta de pubertat) i escàs desenvolupament mamari. Son dones amb talla baixa i disfunció tiroidea.

Nul·lisomia: pèrdua d'un parell d'homòlegs, que dona error en la implantació i és letal.

Alteracions estructurals

Poden ser equilibrades (no hi ha pèrdua de material genètic i no sol associar-se a anomalies evidents) o desequilibrades (pèrdua o guany de material, que s'associa a patologies greus). Tipus:

Translocacions: un segment cromosòmic es trasllada a un cromosoma no homòleg.

Deleció: pèrdua d'un segment d'un cromosoma. La importància dependrà de la longitud i quantitat de gens que abasta. En homozigosi mai viables, però poden ser viables en heterozigosi.

- Deleció total o parcial del braç curt del cromosoma 5 o 5p (síndrome del miol de gat o de Lejeune): microcefàlia, plor de to alt, retard mental.
- Deleció 15q 11-13 (síndrome de Prader-Willi o síndrome d'Angelman): exemple d'expressió diferencial d'una mutació degut a la imprompta genòmica (metilació), segons si d'hereta del pare o la mare:
 - Síndrome de Prader-Willi: la deleció s'hereta del pare i genera obesitat, estatura baixa i dificultat en l'aprenentatge.
 - Síndrome d'Angelman: la deleció s'hereta de la mare i genera epilèpsia i retard mental i motor.

Insercions i duplicacions: un segment cromosòmic es repeteix.

Inversió: anomalia cromosòmica on el segment d'un cromosoma pateix una rotació de 180°

1.2 LA UNITAT DE GENÈTICA I DIAGNÒSTIC PRENATAL

1.2.1 Objectius i tipus de mostres per l'anàlisi genètica

La **Unitat de Genètica i Diagnòstic** prenatal d'un hospital té com objectiu abastar tot l'estudi de les alteracions genètiques de qualsevol tipus que estiguin directament relacionades amb alteracions a la vida dels pacients. Es tracta per tant d'un departament que treballa de forma transversal amb altres serveis assistencials, com ara ginecologia, pediatria, oncologia, dermatologia, etc.

Depenent de la patologia o síndrome detectat pel facultatiu que remet el cas a la Unitat de Genètica o del qual es té sospita, el tipus de **mostra per l'estudi genètic** podrà ser:

- **Sang perifèrica**: és la mostra més habitual, ja que és la que s'utilitza com a primera elecció per ja nascuts, independentment de l'edat. En el cas de dones embarassades, també es pot utilitzar una mostra de sang materna per aïllar sèrum o cèl·lules fetals en circulació per estudiar alteracions al fetus. Tanmateix, hi ha un alt índex d'error degut a la llunyania d'aquestes mostres respecte al fetus.
- **Sang de taló**: es tracta d'una variant de la primera, doncs la nostra és extreta del taló dels nounats només nàixer. S'utilitza principalment per l'estudi i cribratge de metabolopaties congènites.
- **Líquid amniòtic**: després de la sang, és la segona mostra més comuna. S'utilitza per estudis prenatals de fetus en què el ginecòleg ha observat alguna mena d'anomalia, al fetus o a la mare, ja que aquest líquid conté cèl·lules descamades de l'epiteli fetal. S'extreu mitjançant amniocentesi la setmana 15-16 de gestació i comporta un cert risc per l'embaràs.
- **Vellositat coriònica**: també s'utilitza per estudiar els fetus i s'obté a les 12 setmanes de gestació. Biològicament, el còrion és una capa més allunyada del fetus que el líquid amniòtic, pel que pot haver incongruències entre el fetus i aquesta mostra. També comporta un cert risc d'avortament.
- **Sang fetal**: s'obté mitjançant punció del cordó umbilical o cordocentesi. És la mostra fetal més representativa amb que es pot treballar per embarassos en curs, però degut a l'alt risc d'avortament que comporta, només es duu a terme en casos extrems.
- **Biòspies**: de naturalesa diversa, que poden anar des de fetus avortats espontàniament a mostres de pell d'adults amb alteracions cutànies, com ara el nevus.

1.2.2 Laboratori de genètica molecular: la síndrome del cromosoma X fràgil

La secció de **genètica molecular** s'encarrega de l'anàlisi de malalties genètiques causades, de forma genèrica, per mutacions puntuals o que al menys no abasten grans regions cromosòmiques. Per la qual cosa, i a diferència dels estudis citogenètics, les anàlisis portades a terme utilitzen mostres de DNA, principalment procedents de sang perifèrica o líquid amniòtic.

Donat que la major part de mutacions que s'estudien a la secció són a nivell de càrrega al·lèlica o de mutacions puntuals, una vegada s'ha extret el DNA de la mostra original es realitzarà principalment anàlisi mitjançant reacció en cadena de la polimerasa o **PCR**, amb la qual s'obté gran quantitat del DNA d'interès mitjançant amplificació del gen o fragment que es vol estudiar. Aquest DNA es pot analitzar després per **gel d'agarosa** per saber-ne la seva grandària, o mitjançant seqüenciació.

Com a exemple de malaltia típicament diagnosticada en mitjançant aquestes pràctiques, treballarem amb la **síndrome del cromosoma X fràgil (SXF)** o síndrome de Martin-Bell, que és la forma més comuna de retard mental hereditari i la segona causa genètica de retard mental després de la síndrome de Down. La prevalència (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.

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 a que al genoma humà hi ha llocs que, en certes condicions de cultiu cel·lular, s'estreuen 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 degut a 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 (PM) 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 PMs. Donat 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. Això també provoca que entre el 20 i 40% d'individus amb SXF presentin mosaicisme (alteració genètica per la qual un individu té dos o més línies cel·lulars amb composició genètica diferent), pel que sí expressen certa quantitat de proteïna FMRP, el que 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.

1.2.3 Laboratori de citogenètica

La secció de **citogenètica** és l'encarregada, de forma genèrica, de trobar alguna alteració al cariotip (moltes vegades no descrites prèviament) que expliqui el trastorn o quadre clínic que presenta el pacient, així com l'estudi prenatal de fetus.

Alguns dels fets més habituals que justifiquen l'anàlisi citogenètica són:

- Avortaments de repetició o infertilitat
- Retard en el desenvolupament mental i/o psicomotor, sent els nens amb trastorns de l'espectre autista (TEA) els casos més freqüents
- Trastorns de la identitat sexual (TIS) en adolescents o adults
- Embarassos de risc: edat avançada de la mare, exposició a agents mutàgens durant l'embaràs o alguna etapa del desenvolupament, etc.
- Pertànyer a grups poblacionals o situacions de risc com ara els emparellaments consanguinis

De forma general, podem distingir dos tipus generals d'objectius: estudis en individus ja nascuts i estudis en nonnats o pre-embràs. En qualsevol cas, l'eina principal amb què es treballa a aquesta secció és el **cariotip constitucional**, el qual s'obté en metafase a partir de diferents tipus de mostres.

En el cas dels **nens o adults**, la major part de les mostres consisteixen en sang perifèrica o biòpsies de pell. Si al cariotipat s'observa alguna alteració numèrica i/o estructural, es pot confirmar o descartar mitjançant la tècnica d'hibridació fluorescent in situ (FISH), que consisteix a marcar certes regions dels cromosomes d'interès amb sondes de DNA que porten acoblats fluoròfors, que són molècules capaces d'emetre fluorescència quan són excitades amb llum de determinada longitud d'ona.

A més de realitzar cariotipat en ja nascuts, la citogenètica assistencial també s'encarrega del **diagnòstic prenatal i preimplantacional**. En aquests casos generalment es treballa amb mostres de líquid amniòtic o de vellositats coriòniques per tal d'obtenir el cariotip.

1.2.4 La consulta de genètica

El **consell genètic** es pot definir com "el procés pel qual els membres d'una família amb risc per una malaltia que pot ser hereditària són informats sobre les conseqüències d'aquesta malaltia, de la possibilitat de patir-la i transmetre-la i de la forma de prevenir-la o de reduir els seus efectes" (Peter Harper, professor de genètica a l'Hospital Universitari de Gal·les, 1984).

Una part molt important del consell genètic consisteix no només en l'estudi de l'individu, sinó també de la seva família per tal de arreplegar dades que ajuden a construir l'arbre genealògic, el qual és de gran utilitat a l'hora de esbrinar el mode d'herència de la possible alteració genètica.

Per aquest procés, a més de la recollida de la mostra en les unitats de remissió corresponents, també es cita al/s pacients/s per tal de fer la recollida de dades familiars i antecedents que permeten construir l'arbre genealògic, un procés conegut com anamnesi. Aquesta part és de vital importància degut al llarg temps de generació de l'espècie humana (25 anys i pujant) i al reduït nombre de descendents, pel que sovint s'haurà de buscar l'origen del desordre genètic en els ascendents.

Un aspecte important del consell genètic és que es fonamenta en els principis de l'ètica mèdica, pel que ha de complir una sèrie característiques:

- Ha de ser completament lliure i voluntari
- Les dades són de caràcter privat i només el pacient i els especialistes relacionats hi poden tindre accés a ella
- El pacient ha de rebre tota la informació necessària, comprendre-la i tenir l'oportunitat de fer preguntes
- El pacient ha d'entendre les implicacions i limitacions de l'estudi: potser no es coneixen tots els mecanismes de patogènia genètica, pel que el resultat pot tenir significat incert a la llum dels coneixements de que es disposen en eixe moment

Tots aquests aspectes es recullen en forma de **consentiment informat**, que el pacient o els seus tutors legals (si és menor de edat) hauran de signar. Està regulat a l'article 3 de la Llei 41/2002 d'autonomia del pacient, publicada el 14 de novembre al BOE.

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

Després de l'explicació teòrica dels continguts, ara aplicarem el que hem après per conèixer com es diagnostiquen les malalties gèniques a la secció de genètica molecular.

1.3.1 Presentació 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. Tanmateix, haurem de confirmar el diagnòstic mitjançant tècniques moleculars.

Problema: la llei contempla que les dades relatives als pacients són sensibles, pel que hem de tractar-les amb cura i evitar al màxim la seva 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?: donat que tenim la ferma sospita de que al menys un pacient és candidat a SXF, haurem d'aplicar tècniques de genètica molecular per esbrinar si hi ha alguna de les 3 mostres que es correspon amb aquesta alteració.

En cas que cap de les 3 presenti la mutació corresponent a SXF, podrem descartar aquests diagnòstic. Si al menys una de les 3 és positiva, podrem imaginar que la nostra sospita és certa. Tanmateix, per poder estar-ne segurs, hauríem d'agafar noves mostres dels pacients i, amb la correspondència adequada, confirmar-ho de nou abans de comunicar-ho a les famílies.

1.3.2 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). A l'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 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.

Pla de treball: 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, pel que després podrem comparar els resultats i treballar així el concepte de rèplica experimental.

1.3.3 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).

Mostres: de les 4 mostres que vénen al kit, només n'utilitzarem 3: el DNA digerit amb PstI, que serà la mostra de DNA del pacient #1, sense SXF; el DNA digerit amb EcoRI, que serà la mostra de DNA del pacient #2, amb SXF; i el DNA digerit amb HindIII, que serà la mostra del pacient #3, amb SXF també. Per tant:

- Mostra #1: PstI (Guillem)
- Mostra #2: EcoRI (Nil)
- Mostra #3: HindIII (Vicent)

Ho farem així perquè la mostra de PstI (carril esquerre a la figura del gel) genera una banda principal més baixa que la banda d'EcoRI i HindIII (carrils més a la dreta a la figura del gel). Per tant, les mostres amb major nombre de repeticions del tàndem CGG migraran menys i correspondran a la dels pacients amb SXF (mostres #2 i #3, la del Nil i Vicent, respectivament).

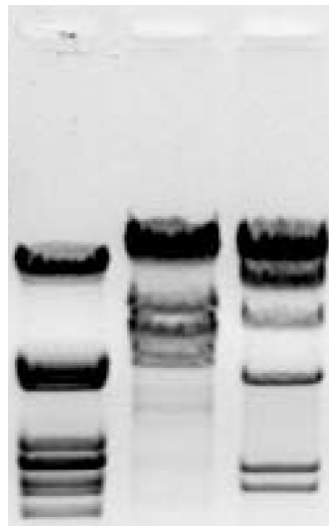


Figura 1: patró esperat de migració de les mostres #1 (PstI; esquerra), mostra #2 (EcoRI; centre) i mostra #3 (HindIII, dreta).

Font: manual instruccions kit BioRad Analysis of Precut Lambda DNA Kit

PROTOCOL

(I) Preparació de reactius

1. Preparació del tampó d'electroforesi TAE (Tris-acetat-EDTA), que s'haurà de diluir a 1x (a partir del 50x). Amb 3L de TAE 1x és suficient per preparar 8 gels i córrer 8 electroforesis.
2. Preparació del gel d'agarosa a l'1% (1 gram d'agarosa en 100 mL de TAE 1x) amb 1 cm d'espessor. Preparar amb tampó d'electroforesi, no amb aigua! Per 8 gels en safates de 7 x 7 cm, caldran uns 320 mL d'agarosa 1%; per safates de 7 x 10 cm, 400 mL.
 - a. Pesar la quantitat necessària d'agarosa
 - b. Dissoldre-la mitjançant ebullició en microones en el volum requerit de TAE 1x
 - c. Deixar refredar fins 60°C
 - d. Preparar les safates amb pintes d'almenys 4 pous i cinta per tancar-les

- e. Vertir agarosa i deixar refredar durant 10-20 minuts
 - f. Retirar la pinta i la cinta de les safates
3. Retolar 8 tubs d'1.5 mL amb "LD" i aliquotar 30 µL de tampó de càrrega per tub.

(II) Preparació de la cambra d'electroforesi

- 4. Col·locar el gel d'agarosa ja solidificat en una cambra d'electroforesi de manera que la part de càrrega de mostres quedi en la part negra (càtode) i la vermella (ànode) en la part baixa de la cambra.
- 5. Emplenar la cambra amb TAE 1x de manera que cobreixi al menys fins 2 mm el gel.

(III) Preparació de les mostres i càrrega del gel

- 6. Transferir 10 µL de DNA #1, #2 o #3 a un tub d'1.5 mL net.
- 7. Afegir 2 µL de tampó de càrrega (LD) al tub amb DNA.
- 8. Tapar el tub i agitar amb cops suaus amb els dits.
- 9. Carregar 10 µL de cada mostra en diferents pous del gel. Cada alumne carregarà 1 mostra, de manera que tindrem 3 mostres/gel.
- 10. Tapar la cambra d'electroforesi i connectar a la font d'alimentació (vigilar amb els pols!)
- 11. Córrer a 100V durant 30 minuts

(IV) Visualització dels fragments de DNA

- 12. Quan hagi acabat l'electroforesi, apagar la font d'alimentació i treure la tapa de la cambra.
- 13. Passar el gel a una safata nova per tenyir (ficarem 2 gels per safata)
- 14. Afegir 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.
- 15. Tenyir durant 2 minuts i després recuperar la solució de tinció en un pot.
- 16. Ficar la safata amb els gels en aigua corrent de l'aixeta durant 10 segons
- 17. Deixar incubar en aigua neta durant 5 minuts. En acabar el temps, canviar l'aigua i deixar altres 5 minuts.

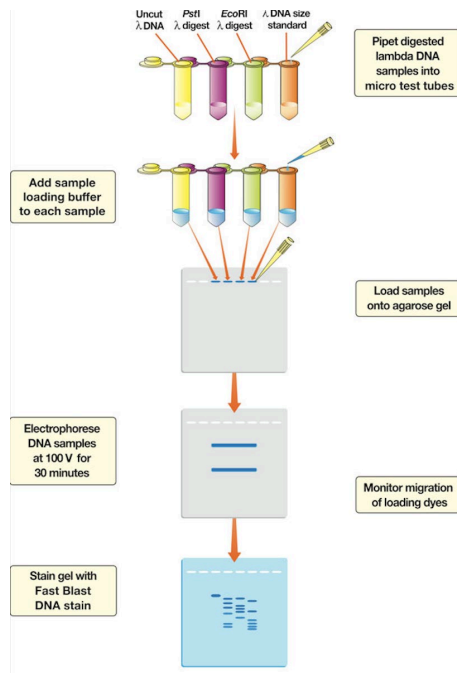


Figura 2: resum esquemàtic del protocol de l'electroforesi en gel d'agarosa.

Font: <https://www.bio-rad.com/es-es/product/analysis-precut-lambda-dna-kit?ID=ddb31e0a-9364-4e7e-aef2-f6eb98a019d8>

1.3.4 Anàlisi de resultats

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?

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 de resultats: Efectivament, hi ha 2 pacients amb la mutació corresponent a la SXF, ja que migren menys lluny al gel que la resta degut al nombre superior d'amplificacions del tàndem CGG. No podem saber si es troba en estat de PM o FM, però sabem que alguna alteració genètica al gen *FMR* hi ha.

Contrastant la hipòtesi inicial: teníem la sospita de que dos dels pacients, Nil i Vicent, podrien presentar la SXF. Tot apunta a que els pacients amb la mutació podrien ser ells, però ho sabem segur?

Comunicació de resultats: ara que ja hem arribat a un acord respecte als resultats, com penseu que ho comunicarem a la família?

Hem de recordar que no teníem clar quina era l'equivalència entre les mostres codificades i els pacients, pel que per procedir correctament hauríem (1) d'agafar una nova mostra del Nil i del Vicent, (2) tornar a convocar els 3 pacients per tornar a prendre mostres i analitzar-les de nou

En cas que cap de les 3 presenti la mutació corresponent a SXF, podrem descartar aquests diagnòstic. Si es repetís el patró de migració, podríem imaginar que la nostra sospita és certa. Tanmateix, per poder estar-ne segurs, hauríem d'agafar noves mostres dels pacients i, amb la correspondència adequada, confirmar-ho de nou abans de comunicar-ho a les famílies.

1.4 ACTIVITAT CITOGÈNÈTICA: 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.

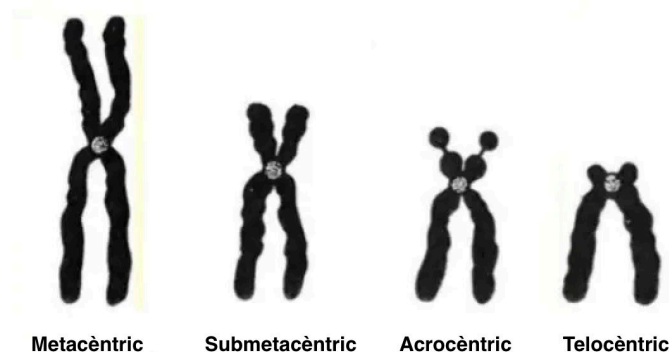


Figura 3: classificació dels cromosomes segons la posició del centròmer.

Font: Adaptat de <https://genotipia.com/cromosomas/clasificacion-cromosomas-centromero/>

Cada alumne (o grups de 2-4) disposarà d'un exemple de cariotip, una plantilla pel cariógrama i els cromosomes retallats corresponents al cariotip de la síndrome de Klinefelter (#1) o síndrome de Down (#2).

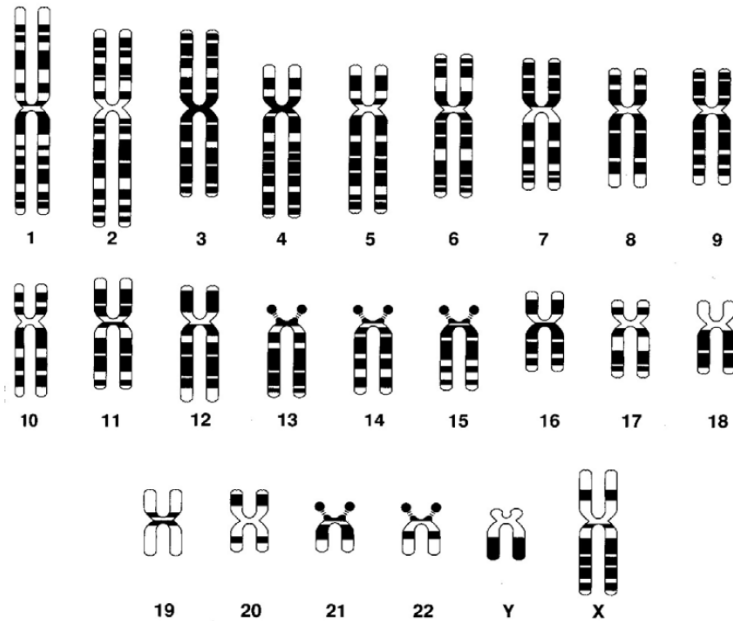


Figura 4: cariotip humà en metafase amb visualització de bandes G (només es mostra 1 cromosoma de cada parell).

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

Utilitzarem mostres de cariotips reals per diagnosticar 2 malalties genètiques provocades per alteracions cromosòmiques numèriques (síndrome de Klinefelter i síndrome de Down).

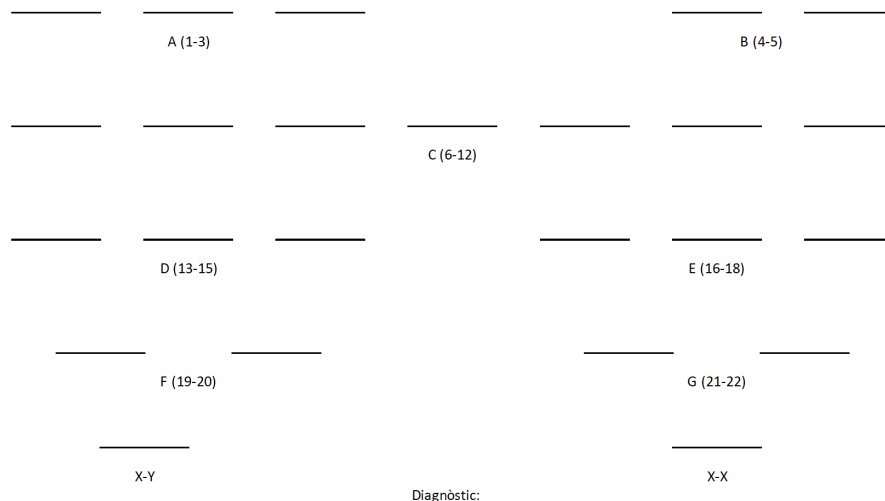
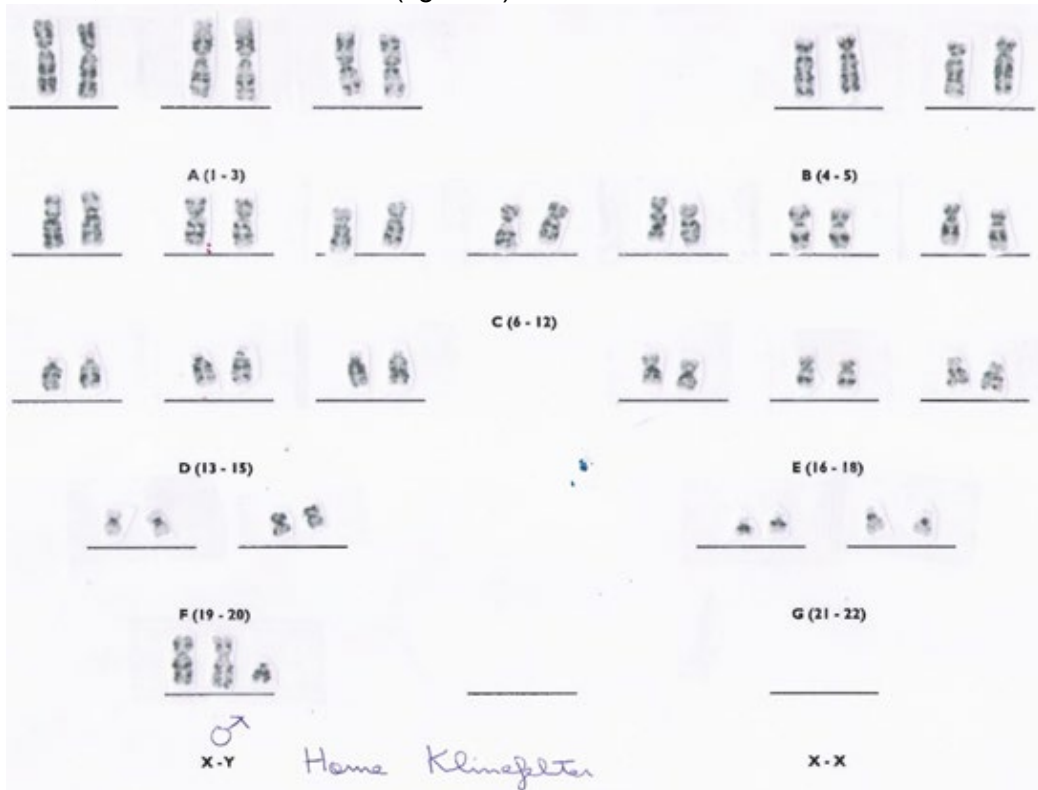


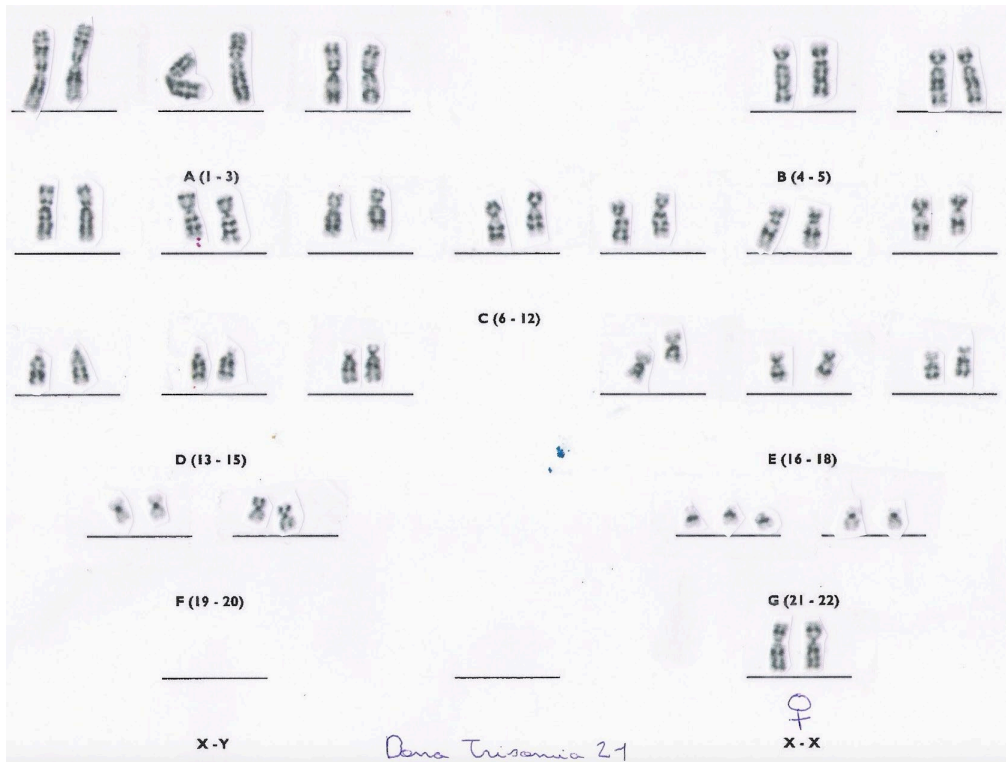
Figura 5: plantilla per obtenir el cariógrama.

Font: elaboració pròpia

Els cariotips reals dels quals partirem es poden observar a les figures 6 i 7. Tindrem el #1, un home amb la síndrome de Klinefelter (figura 6) i una dona amb la trisomia de l'autosoma 21, la síndrome de Down (figura 7).



*Figura 6: Carotip del pacient #1, amb la síndrome de Klinefelter, complet.
Font: dades clíniques anonimitzades*



*Figura 7: Carotip del pacient #2, amb la síndrome de Down, complet.
Font: dades clíniques anonimitzades*

1.5 DEBAT SOBRE BIOÈTICA I GENÈTICA

Després de conèixer diferents aspectes tècnics sobre les malalties hereditàries i la seva aplicació a la terapèutica, passarem a debatre sobre diferents aspectes relacionats amb la part de la bioètica en genètica. Plantejarem diferents qüestions per conèixer l'opinió dels alumnes sobre elles.

Alguns aspectes s'han basat en el set de preguntes de "La suposada modificació genètica d'unes bessones", del repositori de jocs de debat interactius PlayDecide.

SITUACIÓ 1: LA INFORMACIÓ GENÈTICA COM A EINA DE DISCRIMINACIÓ

Avui dia és possible obtenir el genotip (informació genètica continguda a un organisme) d'una persona de forma relativament senzilla i barata. Donat que coneixem certs al·lels (variants d'un gen) predisposen a certes malalties, a partir d'ells es podria saber quina predisposició té aquella persona per desenvolupar certes condicions.

Preguntes:

- Penseu que amb el genotip d'una persona es poden saber totes les malalties o condicions que té o que desenvoluparà en un futur?
- Si tinguéssiu antecedents familiars d'una malaltia hereditària greu, us seqüenciariéu el genoma per saber si teniu predisposició?
- Creieu que seria ètic que les empreses el demanessin abans de contractar algú per estalviar costos? I un llogater per saber si és viable llogar la seva propietat? I una empresa d'assegurances abans de formalitzar una pòlissa? Expliqueu les raons.

Aspectes per motivar el debat:

- El genotip és només una de les parts que influeix en el desenvolupament de caràcters, però en molts d'ells (sobretot els relacionats amb malalties) sol influir l'ambient (interacció gens-ambient)
- Discriminació laboral/social
- Possibilitat de generar un sistema de classes més potent encara on proliferi el negoci de la falsificació de genotips
- Hi ha associacions entre genotip i malaltia que encara no es coneixen

SITUACIÓ 2: APLICACIONS I LÍMITS DE L'EDICIÓ GENÈTICA

Els últims avenços en enginyeria genètica permeten la modificació del genoma de diferents organismes, entre ells el de l'humà. Els científics van establir fa uns anys que els límits de l'edició genètica estaven en la modificació d'organismes humans, principalment embrions o gàmetes degut a que això comportaria uns riscos potencials encara desconeguts: el "Conveni sobre Drets Humans in Biomedicina" o "Conveni d'Oviedo" va ser signat per 35 països el 1999 i limita de forma clara aquest tipus d'activitats.

Tanmateix, un grup de científics xinesos de la Universitat de Ciència i Tecnologia del Sur (Shenzhen) va publicar el 2019 que havia utilitzat la tècnica CRISPR/Cas9 per editar el genoma d'embrions humans, a fi d'evitar la transmissió del virus de l'VIH, del qual el pare era portador. Finalment els embrions van ser implantats a l'úter de la mare i van ser porters a terme, donat llum a dues bessones que, aparentment, estaven sanes al moment del naixement.

Preguntes:

- Penseu que tot val a l'àmbit científic per evitar dolències conegudes, encara que puguem generar d'altres noves?
- Creieu que seria lícit que poguéssim escollir fills "a la carta" mitjançant edició genètica i posterior selecció?
- Avui dia es fa selecció d'embrions lliures d'alteracions genètiques i/o cromosòmiques conegudes a les unitats de genètica, el que es coneix com estudi preimplantacional. No és això una forma de discriminació també?
- De poder implementar-se l'edició genètica lliure, penseu que tothom hauria de poder accedir-hi? En cas de que no, segons quins criteris?
- Tenen drets els progenitors a decidir si els seus fills han de passar per l'edició genètica?
- Qui ha de decidir els límits de la ciència? Els científics? O bé tota la població? És profitós deixar d'aplicar tècniques innovadores per millorar la qualitat de vida dels humans només per qüestions ètiques?

Aspectes per motivar el debat:

- Discriminació per selecció de certs caràcters relativament irrelevants per la supervivència, com ara el color de cabell, ulls o alçada
- Criteris per accedir a edició i selecció genètica: econòmics, socials, de risc (avaluats per científics), geogràfics, etc.
- Si els pares decidissin sobre la possible edició genètica dels seus fills de forma preimplantacional, potser els condemnarien a futurs problemes de salut.

BLOC 2

LA CARRERA INVESTIGADORA EN L'ÀMBIT DE LA BIOMEDICINA

BLOC 3

EXPERIMENTACIÓ ANIMAL

3.1 INTRODUCCIÓ A LA EXPERIMENTACIÓ AMB ANIMALS

Es defineix com **experimentació animal** qualsevol procediment experimental que causi o ataqüi l'estat de benestar d'un animal, el qual tingui com a missió demostrar fenòmens biològics sobre espècies animals, extrapolables o no a l'espècie humana.

La recerca que utilitza animals es sol portar a terme, exceptuant casos puntuals com animals salvatges, en instal·lacions conegudes com estabularis/animalaris/bioteris, a les quals hi ha una sèrie de condicions controlades (temperatura, humitat, soroll, etc.) que garanteixen el benestar animal i una bona reproductibilitat dels experiments.

La realització de procediments experimentals amb animals està supeditat a l'aprovació per part d'un comitè ètic, del qual ha de disposar el centre on es realitza (universitat, centre de recerca, indústria o hospital). S'ha de definir de principi a fi els passos que es seguiran amb els animals, així com les condicions de vida (menjar, beguda, etc.), tractaments i aplicació de l'eutanàsia. Tanmateix, sempre es mira d'aplicar la regla de les 3 R: reduir, refinar i reemplaçar. De forma breu, l'objectiu és utilitzar el nombre mínim d'animals, de la manera més òptima i, a ser possible, de l'espècie menys complexa que l'estudi permeti.

Els models més utilitzats són el ratolí, la rata, els conills, els peixos, els amfibis, les aus i els cobais. De forma molt menys habitual s'utilitzen primats no humans i altres mamífers com gossos i porcs.

3.2 EL RATOLÍ COM A MODEL D'EXPERIMENTACIÓ

El ratolí (*Mus musculus*) és, de lluny (representa més de la meitat dels usos), l'espècie més utilitzada en recerca degut a que:

- Té una mida adequada per ser manipulada i alhora estudiada
- El temps de generació és relativament curt, pel que es pot obtenir un gran nombre d'individus en poc temps
- El seu manteniment ha esdevingut senzill i econòmic
- Elevat grau d'homologia amb l'espècie humana a nivell d'òrgans i fisiològic.
- Presenta bona adaptació per viure estabulat
- Avui dia es treballa amb soques molt estables, pel que hi ha poca variabilitat entre individus
- Es disposa de molta informació a diferents nivells, que han permès el desenvolupament i estandardització de tècniques i procediments, així com de diferents models de malalties humanes

3.2.1 El ratolí en estudis relacionats amb obesitat

D'entre les moltes malalties en què s'utilitza el ratolí com a model experimental, les malalties metabòliques, tals com l'obesitat, diabetis tipus 2 i altres condicions relacionades, són algunes de les més importants.

Respecte a l'obesitat, hi ha 2 models principals de ratolí:

- Genètics: animals portadors de mutacions relacionades amb rutes metabòliques essencials, com ara les quals regulen el control de la gana. La leptina és l'hormona encarregada de regular el pes corporal a través de la gana i la producció de calor al cos. Els ratolins *ob/ob*, que no produeixen leptina, i els *db/db*, que no tenen el receptor de leptina, s'utilitzen en estudis d'obesitat perquè presenten hiperfàgia (ingesta excessiva de menjar, per damunt del que és necessari per cobrir les necessitats fisiològiques) desenvolupen obesitat mòrbida i alteracions associades, com nivells de glucosa desregulats i afectació pancreàtica.

- Induïts per dieta: representen de forma més fidel els processos fisiològics que es donen als humans durant l'obesitat. Els més habituals són la utilització de dietes riques en greix (arriben fins al 60% del seu contingut) i/o la adició de fructosa en aigua de beguda.

L'objectiu de la meua investigació és testar una nova teràpia per pal·liar el procés inflamatori que ocorre a diferents teixits i òrgans en humans obesos, pel que es fa necessari un model de ratolí que ho representi el més fidelment possible.

Al meu model utilitzem ratolins de la soca C57BL/6J, també coneguts com B6, la més utilitzada en recerca, que són alimentats amb dieta de cafeteria i aigua de beguda suplementada amb fructosa, que ve a representar els refrescos. A les mostres de fetge que observarem al microscopi podeu veure com afecten aquests tipus de dietes als ratolins, comparant el fetge d'un ratolí control (sa) amb el d'un que ha sigut alimentat amb la dieta obesogènica.

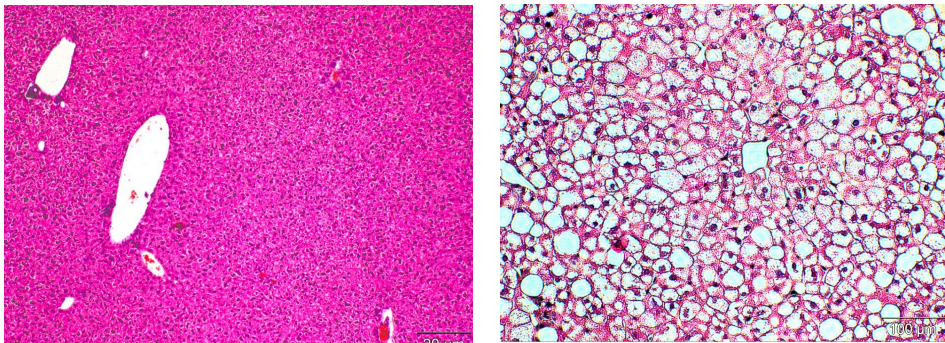


Figura 8: microfotografies (100x d'augment) de fetge de ratolí sa (esquerra) i de fetge afectat per la dieta de cafeteria (dreta) tenyits amb hematoxilina i eosina.
Font: elaboració pròpia

3.3 DEBAT SOBRE L'ÚS D'ANIMALS EN EXPERIMENTACIÓ

Les opinions respecte a l'experimentació animal estan completament polaritzades. Els qui s'oposen es preocupen pels drets dels animals, mentre que els qui li donen suport la veuen com una mitjà per accelerar i millorar la comprensió de la biologia i la terapèutica de les malalties humanes.

SITUACIÓ 1: ELS LÍMITS DE L'EXPERIMENTACIÓ AMB ANIMALS

Degut a que els protocols i procediments que requereixen l'ús d'animals han de passar per un comitè ètic, s'ha de justificar de forma molt adequada les raons per a l'ús, no només d'animals, sinó de l'espècie d'elecció. La idea és que sempre s'han d'utilitzar organismes el més senzill possibles (entenen-ho des d'un punt de vista morfofisiològic i antropocèntric).

Fa unes setmanes va esclatar la polèmica quan es va saber que una empresa que té la seva seu al Parc Científic de Barcelona (PCB), entitat que pertany a la Universitat de Barcelona (UB), havia subcontractat els serveis de l'empresa Vivotecnia Research perquè realitzés un assaig farmacològic amb cadells de gos Beagle.

Segons l'empresa contractant, l'objectiu és "desenvolupar una teràpia per malalties fibròtiques, el que comporta l'estudi histopatològic dels òrgans de 32 cadells de Beagle".

Preguntes:

- Sabent que molts avenços mèdics actuals es deuen a l'ús d'animals en investigació i que altres països europeus com Holanda volen prohibir l'experimentació animal en pocs anys, penseu que s'hauria de limitar el seu ús arreu del món?