

Diagnóstico de enfermedades genéticas y experimentación animal



GUION DOCENTE

CONTENIDOS

1. Alteraciones genéticas, enfermedades hereditarias y consejo genético

1. Alteraciones genéticas y enfermedades hereditarias
2. Unidades de consejo genético: funciones y estructura
 - 2.1. La consulta de genética
 - 2.2. Genética molecular: el síndrome del cromosoma X frágil + actividad práctica
 - 2.3. Citogenética: diagnóstico de alteraciones cromosómicas numéricas + actividad práctica
3. Debate sobre bioética y genética

2. La carrera investigadora en el ámbito de la biomedicina

1. ¿Qué opciones tengo si quiero cursar estudios relacionados con biomedicina? Grados universitarios del ámbito biosanitario
2. ¿Y tras el grado? Máster, doctorados y salidas profesionales

3. Experimentación animal

1. Introducción a la experimentación con animales
2. El ratón como modelo de investigación en obesidad
 - 2.1. Actividad práctica: visualización de muestras de hígado de ratón
3. Debate sobre el uso de animales en investigación

BLOQUE 1

ALTERACIONES GENÉTICAS, ENFERMEDADES HEREDITARIAS Y CONSEJO GENÉTICO

1.1 ALTERACIONES GENÉTICAS Y ENFERMEDADES HEREDITARIAS

Las alteraciones genéticas son modificaciones de la secuencia del DNA que, en mayor o menor medida, pueden tener efectos en la expresión y regulación genéticas y provocar desviaciones del que se considera fenotipo estándar o consenso respecto a un rasgo concreto o un conjunto de ellos.

Las alteraciones genéticas son, por tanto, la base de las enfermedades hereditarias, aunque no todas las modificaciones provocan alteraciones heredables.

La base de las enfermedades relacionadas con alteraciones genéticas está en la hipótesis de dosis génica, establecida el 1999 por Pritchard y Kola, que establece que los fenotipos se deben a un balance entre las cantidades de producto o regulación de diferentes genes. Por tanto, cuando este equilibrio se ve alterado, hay una descompensación que, en mayor o menor medida, generará un fenotipo alterado respecto al estándar.

Según la cantidad de material genético que alcanzan, podemos dividir las alteraciones genéticas en dos tipos generales: génicas y cromosómicas.

1.1.1 Alteraciones génicas

Nos referimos a enfermedades hereditarias asociadas a alteraciones génicas cuando se hay uno o pocos genes asociados a la misma.

Según el tipo de mutación, podemos encontrar diferentes tipos de transmisión hereditaria:

- Pérdida de función: genera fenotipos recesivos por varios mecanismos: (1) carencia de síntesis de producto génico; (2) síntesis de producto génico reducida; (3) producto sintetizado no funcional; (4) el producto de un solo alelo salvaje es suficiente para evitar el fenotipo de enfermedad.
- Ganancia de función: genera fenotipos dominantes debido a que (1) el producto génico no funciona bien; (2) hay sobreexpresión del gen; (3) el gen ha perdido su regulación. Este fenómeno se conoce como haploinsuficiencia.

Según la localización de la mutación, podemos dividir los tipos de herencia en:

- Autosómica: localizada a alguno de los autosomas o cromosomas no sexuales.
- Unida al cromosoma sexual X: localizada en la región diferencial del cromosoma X.
- Unida al cromosoma sexual Y: localizada en la región diferencial del cromosoma Y. Las enfermedades hereditarias que siguen este patrón solo afectan a los hombres.
- Pseudoautosómica: cuando está localizada en la región común de los cromosomas sexuales.

1.1.2 Alteraciones cromosómicas

Variaciones en el número o estructura normal de los cromosomas. Según el criterio que utilicemos las podemos dividir en:

(1) Morfología y reestructuración:

- Numéricas: poliploidía (triploidía, tetraploidía); aneuploidía (trisomía, monosomía, nulisomía); mixoploidía (mosaicismo, quimerismo).
- Estructurales: deleciones, duplicaciones, inserciones, translocaciones (robertsonianas, recíprocas), inversiones, isocromosomas, cromosomas en anillo, cromosoma marcador.

(2) Origen:

- Constitucionales: no se transmitirán a la descendencia porque no se dan en la línea germinal
- Somáticas: se pasarán a la descendencia porque se dan en la línea germinal.

(3) Material genético y repercusión:

- Equilibradas: no se produce aumento ni pérdida de material genético
- Desequilibradas: sí se produce aumento o pérdida de material genético

Alteraciones numéricas

Triploidías (47, XY, + CROM o 47, XX, +CROM): son letales en forma constitucional quizás sí en mosaico), excepto las siguientes:

- Trisomía del cromosoma 21 (síndrome de Down): anomalía autosómica más común que presenta ciertas malformaciones congénitas
- Trisomía del cromosoma 18 (síndrome de Edwards)
- Trisomía del cromosoma 13 (síndrome de Patau)
- Trisomía de cromosomas sexuales:
 - Triplo X (antiguamente superhembras): 47,XXX: moderado déficit intelectual
 - Doble Y: 47,XYY
 - Síndrome de Klinefelter: 47,XXY: ginecomastia, poca musculatura, poca piel

Monosomía (45, X): falta de un cromosoma. Excepto Turner, todas letales en forma constitucional, pero algunas viables en mosaico:

- Monosomía del cromosoma X (síndrome de Turner): infantilismo crecimiento ree, crecimiento retardado, genitales infantiles, amenorrea primaria (falta de pubertad) y escaso desarrollo mamario. Son mujeres con talla baja y disfunción tiroidea.

Nulisomía: pérdida de un par de homólogos, que da error en la implantación y es letal.

Alteraciones estructurales

Pueden ser equilibradas (no hay pérdida de material genético y no suele asociarse a anomalías evidentes) o desequilibradas (pérdida o ganancia de material, que se asocia a patologías graves). Tipo:

Translocaciones: un segmento cromosómico se traslada a un cromosoma no homólogo.

Delección: pérdida de un segmento de un cromosoma. La importancia dependerá de la longitud y la cantidad de genes que alcanza. En homocigosis nunca viables, pero pueden ser viables en heterocigosis.

- Deleción total o parcial del brazo corto del cromosoma 5 o 5p (síndrome del maullido de gato o de Lejeune): microcefalia, lloro de to alto, retraso mental.
- Deleción 15q 11-13 (síndrome de Prader-Willi o síndrome d'Angelman): ejemplo de expresión diferencial de una mutació debido a la impronta genómica (metilación), según si se hereda del padre o la madre:
 - Síndrome de Prader-Willi: la deleción se hereda del padre y genera obesidad, estatura baja y dificultad en el aprendizaje.
 - Síndrome de Angelman: la deleción se hereda de la madre y genera epilepsia y retraso mental i motor.

Inserciones y duplicaciones: un segmento cromosómico se repite.

Inversión: anomalía cromosómica donde el segmento de un cromosoma padece una rotación de 180°

1.2 LA UNIDAD DE GENÉTICA Y DIAGNÓSTICO PRENATAL

1.2.1 Objetivos y tipos de muestras para el análisis genético

La Unidad de Genética y Diagnóstico prenatal de un hospital tiene como objetivo alcanzar todo el estudio de las alteraciones genéticas de cualquier tipo que estén directamente relacionadas con alteraciones en la vida de los pacientes. Se trata por tanto de un departamento que trabaja de forma transversal con otros servicios asistenciales, como por ejemplo ginecología, pediatría, oncología, dermatología, etc.

Dependiente de la patología o síndrome detectado por el facultativo que remite el caso a la Unidad de Genética o del cual se tiene sospecha, el tipo de muestra por el estudio genético podrá ser:

- Sangre periférica: es la muestra más habitual, puesto que es la que se utiliza como primera elección para ya nacidos, independientemente de la edad. En el caso de mujeres embarazadas, también se puede utilizar una muestra de sangre materna para aislar suero o células fetales en circulación para estudiar alteraciones en el feto. Aun así, hay un alto índice de error debido a la lejanía de estas muestras respecto al feto.
- Sangre de talón: se trata de una variante de la primera, pues la muestra se extrae del talón de los neonatos solo nacer. Se utiliza principalmente por el estudio y criba de metabolopatías congénitas.
- Líquido amniótico: tras el de la sangre, es la segunda muestra más común. Se utiliza por estudios prenatales de fetos en el que el ginecólogo ha observado algún tipo de anomalía, en el feto en la madre, puesto que este líquido contiene células descamadas del epitelio fetal. Se extrae mediante amniocentesis la semana 15-16 de gestación e implica cierto riesgo para el embarazo.
- Velloidad coriónica: también se utiliza para estudiar los fetos y se obtiene en las 12 semanas de gestación. Biológicamente, el corion es una capa más alejada del feto que el líquido amniótico, por lo que puede haber incongruencias entre el feto y esta muestra. También comporta cierto riesgo de aborto.
- Sangre fetal: se obtiene mediante punción del cordón umbilical o cordocentesis. Es la muestra fetal más representativa con la que se puede trabajar para embarazos en curso, pero debido al alto riesgo de aborto que implica, solo se lleva a cabo en casos extremos.
- Biopsias: de naturaleza diversa, que pueden ir desde fetos abortados espontáneamente a muestras de piel de adultos con alteraciones cutáneas, como por ejemplo el nevus.

1.2.2 Laboratorio de genética molecular: el síndrome del cromosoma X frágil

La sección de genética molecular se encarga del análisis de enfermedades genéticas causadas, de forma genérica, por mutaciones puntuales o que al menos no alcanzan grandes regiones cromosómicas. Por lo cual, y a diferencia de los estudios citogenéticos, los análisis llevados a cabo utilizan muestras de DNA, principalmente procedentes de sangre periférica o líquido amniótico.

Dado que la mayor parte de mutaciones que se estudian a la sección son a nivel de carga alélica o de mutaciones puntuales, una vez se ha extraído el DNA de la muestra original se realizará principalmente análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa o PCR, con la cual se obtiene gran cantidad del DNA de interés mediante amplificación del gen o fragmento que se quiere estudiar. Este DNA se puede analizar después por gel de agarosa para saber su tamaño, o mediante secuenciación.

Como ejemplo de enfermedad típicamente diagnosticada en mediante estas prácticas, trabajaremos con el síndrome del cromosoma X frágil (SXF) o síndrome de Martin-Bell, que es la forma más común de retraso mental hereditario y la segunda causa genética de retraso mental después 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.

La SXF es una enfermedad genética asociada a mutaciones al gen FMR1 (Fragile Mental Retardation Gene 1), que codifica por la proteína FMRP, por lo 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 a que al genoma humano hay lugares que, en ciertas condiciones de cultivo celular, se *estreyen o interrumpen. LA *SXF está asociada 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, siente 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 debido a cambios epigenéticos al DNA y, por lo tanto, tampoco la proteína *FMRP (el que se conoce como mutación completa o FM), y es cuando aparece el fenotipo asociado a la *SXF.

Las premutaciones (PM) 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 PMs. Dado que esto no ocurre en la línea germinal femenina ni a 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 el que sí expresan cierta cantidad de proteína FMRP, lo que explica la diversidad fenotípica y clínica.

Este mecanismo molecular genera lo 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.

1.2.3 Laboratorio de citogenética

La sección de citogenética es la encargada, de forma genérica, de encontrar alguna alteración en el cariotipo (muchas veces no descritas previamente) que explique el trastorno o cuadro clínico que presenta el paciente, así como el estudio prenatal de feto.

Algunos de los hechos más habituales que justifican el análisis citogenético son:

- Abortos de repetición o infertilidad
- Retraso en el desarrollo mental y/o psicomotor, sienten los niños con trastornos del espectro autista (TEA) los casos más frecuentes
- Trastornos de la identidad sexual (TIS) en adolescentes o adultos
- Embarazos de riesgo: edad avanzada de la madre, exposición a agentes mutágenos durante el embarazo o alguna etapa del desarrollo, etc.
- Pertenecer a grupos poblacionales o situaciones de riesgo como por ejemplo los emparejamientos consanguíneos.

De forma general, podemos distinguir dos tipos generales de objetivos: estudios en individuos ya nacidos y estudios en nonatos o preembarazo. En cualquier caso, la herramienta principal con que se trabaja a esta sección es el cariotipo constitucional, que se obtiene en metafase a partir de diferentes tipos de muestras.

En el caso de los niños o adultos, la mayor parte de las muestras consisten en sangre periférica o biopsias de piel. Si en el cariotipado se observa alguna alteración numérica y/o estructural, se puede confirmar o descartar mediante la técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH), que consiste a marcar ciertas regiones de los cromosomas de interés con sondas de DNA que llevan acoplados fluoróforos, que son moléculas capaces de emitir fluorescencia cuando son excitadas con luz de determinada longitud de onda.

Además de realizar cariotipado en ya nacidos, la citogenética asistencial también se encarga del diagnóstico prenatal y preimplantacional. En estos casos generalmente se trabaja con muestras de líquido amniótico o de vellosidades coriónicas para obtener el cariotipo.

1.2.4 La consulta de genética

El consejo genético se puede definir como “el proceso por el cual los miembros de una familia con riesgo por una enfermedad que puede ser hereditaria son informados sobre las consecuencias de esta enfermedad, de la posibilidad de sufrirla y transmitirla y de la

forma de prevenirla o de reducir sus efectos” (Peter Harper, profesor de genética en el Hospital Universitario de Gales, 1984).

Una parte muy importante del consejo genético consiste no solo en el estudio del individuo, sino también de su familia para recoger datos que ayudan a construir el árbol genealógico, que es de gran utilidad en la hora de averiguar el modo de herencia de la posible alteración genética.

Por este proceso, además de la recolección de la muestra en las unidades de remisión correspondientes, también se cita a los pacientes para realizar la recogida de datos familiares y antecedentes que permiten construir el árbol genealógico, un proceso conocido como anamnesis. Esta parte es de vital importancia debido al largo tiempo de generación de la especie humana (25 años y subiendo) y al reducido número de descendientes, por lo que a menudo se tendrá que buscar el origen del desorden genético en los ascendientes.

Un aspecto importante del consejo genético es que se fundamenta en los principios de la ética médica, por lo que tiene que cumplir una serie características:

- Tiene que ser completamente libre y voluntario.
- Los datos son de carácter privado y solo el paciente y los especialistas relacionados pueden tener acceso a ella.
- El paciente tiene que recibir toda la información necesaria, comprenderla y tener la oportunidad de hacer preguntas.
- El paciente tiene que entender las implicaciones y limitaciones del estudio: quizás no se conocen todos los mecanismos de patogenia genética, por lo que el resultado puede tener significado incierto a la luz de los conocimientos de que se disponen en ese momento.

Todos estos aspectos se recogen en forma de consentimiento informado, que el paciente o sus tutores legales (si es menor de edad) tendrán que firmar. Está regulado en el artículo 3 de la Ley 41/2002 de autonomía del paciente, publicada el 14 de noviembre en el BOE.

1.3 ACTIVIDAD GENÉTICA MOLECULAR: DIAGNÒSTIC DE LA SÍNDROME DEL CROMOSOMA X FRÀGIL

Después de la explicación teórica de los contenidos, ahora aplicaremos lo que hemos aprendido para conocer cómo se diagnostican las enfermedades génicas en la sección de genética molecular.

1.3.1 Presentación 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. Aun así, tendremos que confirmar el diagnóstico mediante técnicas moleculares.

Problema: la ley contempla que los datos relativos a los pacientes son sensibles, por lo que tenemos que tratarlos con cuidado y evitar al máximo su 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? Dado que tenemos la firme sospecha de que al menos un paciente es candidato a SXF, tendremos que aplicar técnicas de genética molecular para averiguar si hay alguna de las 3 muestras que se corresponde con esta alteración.

En caso de que ninguno de las 3 presente la mutación correspondiente a SXF, podremos descartar este diagnóstico. Si al menos una de las 3 es positiva, podremos imaginar que nuestra sospecha es cierta. Aun así, para poder estar seguros, tendríamos que coger nuevas muestras de los pacientes y, con la correspondencia adecuada, confirmarlo de nuevo antes de comunicarlo a las familias.

1.3.1 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 lo 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 gel, que se encuentra inmerso en un tampón conductor de electricidad, los fragmentos de DNA (cargados negativamente) se moverán 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 tamaño

encuentran más dificultades para moverse por los agujeros de la matriz y por tanto, avanzan más hacia el ánodo.

Para entendernos, imaginamos la siguiente situación: cogemos todas las sillas y mesas de la clase y las distribuimos aleatoriamente por el aula, muy juntas. 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.

Plan de trabajo: 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, por lo que después podremos comparar los resultados y trabajar así el concepto de réplica experimental.

1.3.2 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).

Muestras: de las 4 muestras que vienen al kit, solo utilizaremos 3: el DNA digerido con PstI, que será la muestra de DNA del paciente #1, sin SXF; el DNA digerido con EcoRI, que será la muestra de DNA del paciente #2, con SXF; y el DNA digerido con HindIII, que será la muestra del paciente #3, con SXF también. Por lo tanto:

- Muestra #1: PstI (Guillermo)
- Muestra #2: EcoRI (Nil)
- Muestra #3: HindIII (Vicente)

Lo haremos así porque la muestra de PstI (carril izquierdo en la figura del gel) genera una banda principal más baja que la banda de EcoRI y HindIII (carriles más a la derecha en la figura del gel). Por lo tanto, las muestras con mayor número de repeticiones del tándem CGG migrarán menos y corresponderán a la de los pacientes con SXF (muestras #2 y #3, la de Nil y Vicente, respectivamente).

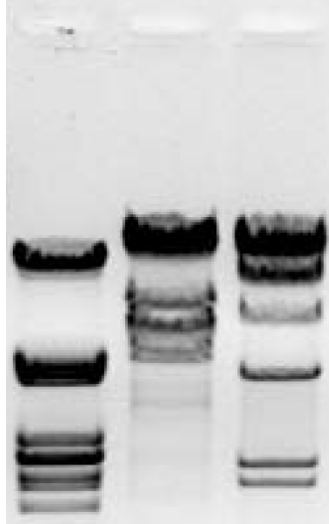


Figura 1: patrón esperado de migración de las muestras #1 (PstI; izquierda), muestra #2 (EcoRI; centro) y muestra #3 (HindIII, derecha).

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

PROTOCOLO

(I) Preparación de reactivos

- (1) Preparación del tampón de electroforesis TAE (Tris-acetato-EDTA), que se tendrá que diluir en 1x (a partir del 50x). Con 3L de TAE 1x es suficiente para preparar 8 geles y correr 8 electroforesis.
- (2) Preparación del gel de agarosa al 1% (1 gramo de agarosa en 100 ml de TAE 1x) con 1 cm de espesura. ¡Preparad con tampón de electroforesis, no con agua! Por 8 geles en bandejas de 7 x 7 cm, harán falta unos 320 ml de agarosa 1%; por bandejas de 7 x 10 cm, 400 ml.
 - a. Pesar la cantidad necesaria de agarosa
 - b. Disolverla mediante ebullición en microondas en el volumen requerido de TAE 1x
 - c. Dejar enfriar hasta 60 °C
 - d. Preparar las bandejas con peines de al menos 4 pocillos y cinta para cerrarlas
 - e. Verter agarosa y dejar enfriar durante 10-20 minutos
 - f. Retirar el peine y la cinta de las bandejas
 - g.
- (3) Rotular 8 tubos de 1.5 ml con "LD" y alicuotar 30 µL de tampón de carga por tubo.

(I) Preparación de la cámara de electroforesis

- (1) Colocar el gel de agarosa ya solidificado en una cámara de electroforesis de forma que la parte de carga de muestras quede en la parte negra (cátodo) y la roja (ánodo) en la parte baja de la cámara.
- (2) Rellenar la cámara con TAE 1x de forma que cubra al menos hasta 2 mm el gel.

(II) Preparación de las muestras y carga del gel

- Transferir 10 μ L de DNA #1, #2 o #3 a un tubo de 1.5 ml limpio.
- Añadir 2 μ L de tampón de carga (LD) al tubo con DNA.
- Tapar el tubo y agitar con golpes suaves con los dedos.
- Cargar 10 μ L de cada muestra en diferentes pocillos del gel. Cada alumno cargará 1 muestra, de forma que tendremos 3 muestras/gel.
- Tapar la cámara de electroforesis y conectar a la fuente de alimentación (¡vigilad con los polos!)
- Correr a 100V durante 30 minutos

(III) Visualización de los fragmentos de DNA

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

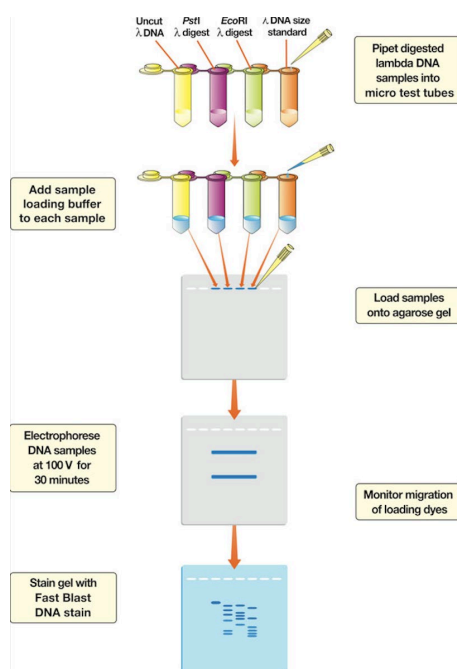


Figura 2: resumen esquemático del protocolo de electroforesis en gel de agarosa.

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

1.3.3 Análisis de resultados

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?

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 a su gel de agarosa. Esto es el 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 resultados: Efectivamente, hay 2 pacientes con la mutación correspondiente a la SXF, puesto que migran menos lejos en el gel que el resto debido al número superior de amplificaciones del tándem CGG. No podremos saber si se encuentra en estado de PM o FM, pero sabemos que alguna alteración genética en el gen FMR hay.

Contrastando la hipótesis inicial: teníamos la sospecha de que dos de los pacientes, Nil y Vicente, podrían presentar la SXF. Todo apunta a que los pacientes con la mutación podrían ser ellos, ¿pero lo sabemos seguro?

Comunicación de resultados: ahora que ya hemos llegado a un acuerdo respecto a los resultados, ¿cómo pensáis que lo comunicaremos a la familia?

Tenemos que recordar que no teníamos claro cuál era la equivalencia entre las muestras codificadas y los pacientes, por lo que para proceder correctamente tendríamos (1) que coger una nueva muestra de Nil y de Vicente, (2) volver a convocar los 3 pacientes para volver a tomar muestras y analizarlas de nuevo.

En caso de que ninguno de las 3 presente la mutación correspondiente a SXF, podremos descartar este diagnóstico. Si se repitiera el patrón de migración, podríamos imaginar que nuestra sospecha es cierta. Aun así, para poder estar seguros, tendríamos que coger nuevas muestras de los pacientes y, con la correspondencia adecuada, confirmarlo de nuevo antes de comunicarlo a las familias.

1.4 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 en cultivar las células aisladas durante 72 horas para obtener células en división, a las cuales 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 teñidas con bandas G (zonas ricas en AT, visualizadas por tinción de Giemsa) para generar el cariograma siguiendo la clasificación de Denver (1960), la cual 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.

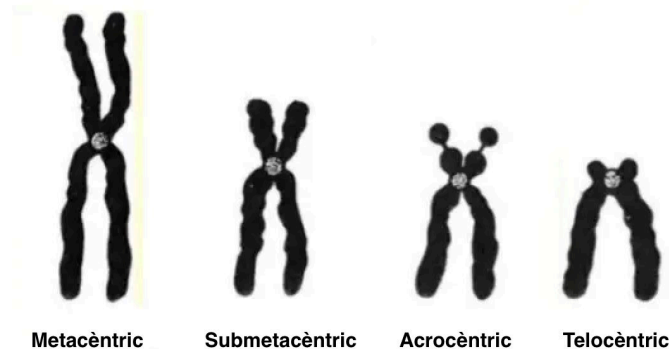


Figura 3: clasificación de los cromosomas según la posición del centrómero.

Fuente: Adaptado de <https://genotipia.com/cromosomas/clasificacion-cromosomas-centromero/>

Cada alumno (o grupos de 2-4) dispondrá de un ejemplo de cariotipo, una plantilla para el cariograma y los cromosomas recortados correspondientes al cariotipo del síndrome de Klinefelter (#1) o síndrome de Down (#2).

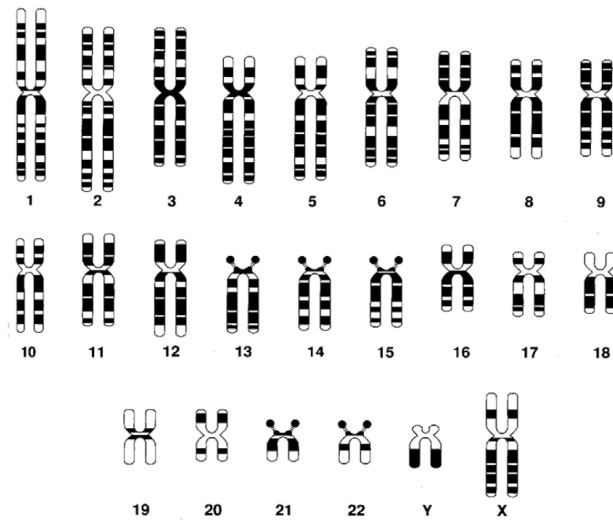


Figura 4: cariotipo humano en metafase con visualización de bandas G (solo se muestra 1 cromosoma de cada par).

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

Utilizaremos muestras de cariotipos reales para diagnosticar 2 enfermedades genéticas provocadas por alteraciones cromosómicas numéricas (síndrome de Klinefelter y síndrome de Down).

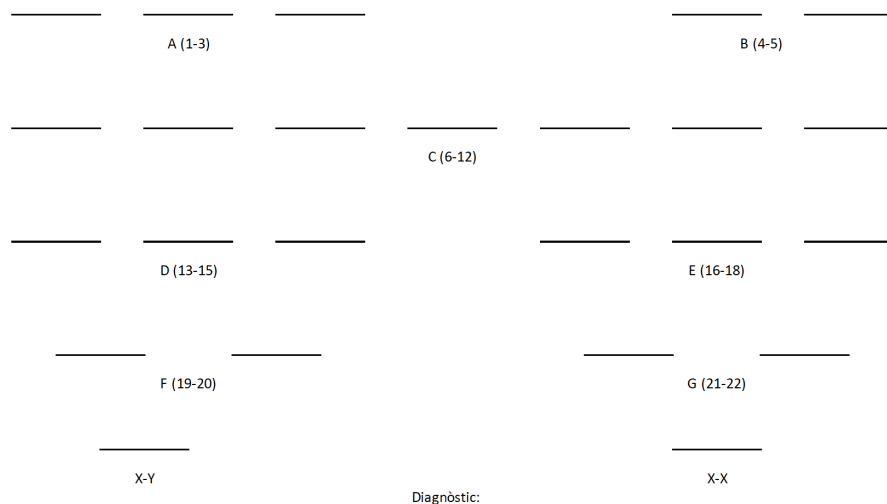


Figura 5: plantilla para obtener el cariograma.

Fuente: elaboración propia

Los cariotipos reales de los cuales partiremos se pueden observar en las figuras 6 y 7. Tendremos el #1, un hombre con el síndrome de Klinefelter (figura 6) y una mujer con la trisomía del autossoma 21, el síndrome de Down (figura 7).

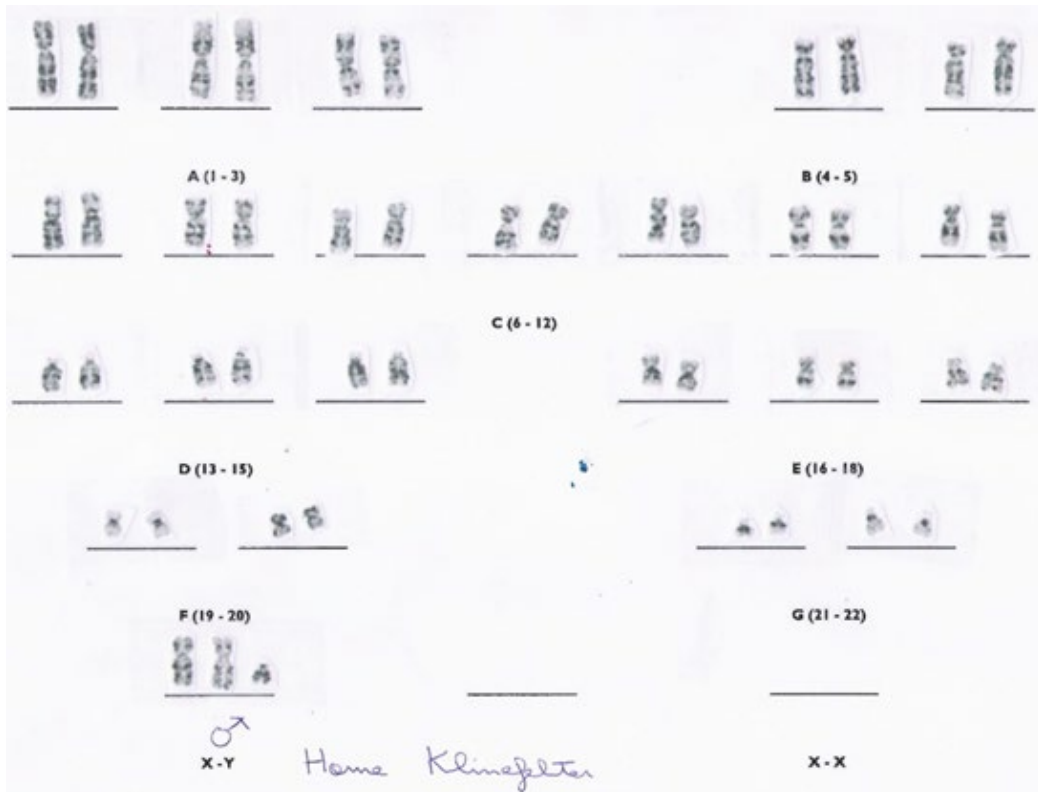


Figura 6: Cariotipo del paciente #1, con el síndrome de Klinefelter, completo.
Fuente: datos clínicos anonimizados

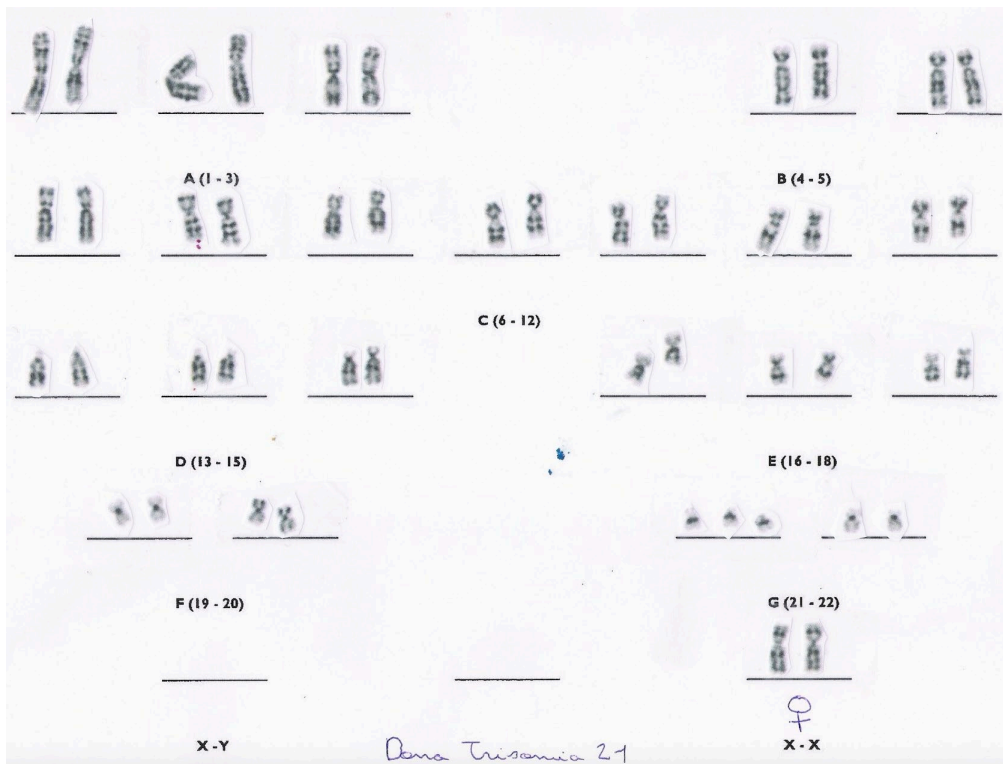


Figura 7: Cariotipo del paciente #2, con el síndrome de Down, completo.
Fuente: datos clínicos anonimizados

1.4 DEBATE SOBRE BIOÉTICA Y GENÉTICA

Después de conocer diferentes aspectos técnicos sobre las enfermedades hereditarias y su aplicación a la terapéutica, pasaremos a debatir sobre diferentes aspectos relacionados con la parte de la bioética en genética. Plantearemos diferentes cuestiones para conocer la opinión de los alumnos sobre ellas.

Algunos aspectos se han basado en el set de preguntas de “La supuesta modificación genética de unas gemelas”, del repositorio de juegos de debate interactivos PlayDecide.

SITUACIÓN 1: LA INFORMACIÓN GENÉTICA COMO HERRAMIENTA DE DISCRIMINACIÓN

Hoy en día es posible obtener el genotipo (información genética contenida a un organismo) de una persona de forma relativamente sencilla y barata. Dado que conocemos ciertos alelos (variantes de un gen) predisponen a ciertas enfermedades, a partir de ellos se podría saber qué predisposición tiene aquella persona para desarrollar ciertas condiciones.

Preguntas:

- ¿Pensáis que con el genotipo de una persona se pueden saber todas las enfermedades o condiciones que tiene o que desarrollará en un futuro?
- Si tuvierais antecedentes familiares de una enfermedad hereditaria grave, ¿os secuenciaríais el genoma por saber si tenéis predisposición?
- ¿Creéis que sería ético que las empresas lo pidieran antes de contratar alguien para ahorrar costes? ¿Y un arrendatario para saber si es viable alquilar su propiedad? ¿Y una empresa de seguros antes de formalizar una póliza? Explicad las razones.

Aspectos para motivar el debate:

- El genotipo es solo una de las partes que influye en el desarrollo de caracteres, pero en muchos de ellos (sobre todo los relacionados con enfermedades) suele influir el ambiente (interacción genes-ambiente)
- Discriminación laboral/social
- Posibilidad de generar un sistema de clases más potente todavía donde prolifere el negocio de la falsificación de genotipos
- Hay asociaciones entre genotipo y enfermedad que todavía no se conocen

SITUACIÓN 2: APLICACIONES Y LÍMITE DE LA EDICIÓN GENÉTICA

Los últimos avances en ingeniería genética permiten la modificación del genoma de diferentes organismos, entre ellos lo del humano. Los científicos establecieron hace unos años que los límites de la edición genética estaban en la modificación de organismos humanos, principalmente embriones o gametos debido a que esto comportaría unos riesgos potenciales todavía desconocidos: el “Convenio sobre Derechos Humanos en Biomedicina” o “Convenio de Oviedo” fue firmado por 35 países el 1999 y limita de forma clara este tipo de actividades.

Aun así, un grupo de científicos chinos de la Universidad de Ciencia y Tecnología del Sur (Shenzhen) publicó el 2019 que había utilizado la técnica CRISPR/Cas9 para editar el genoma de embriones humanos, a fin de evitar la transmisión del virus del VIH, del cual el padre era portador. Finalmente, los embriones fueron implantados en el útero de

la madre y llevados a término, dando a luz a dos gemelas que, aparentemente, estaban sanas en el momento del nacimiento.

Preguntas:

- ¿Pensáis que todo vale al ámbito científico para evitar dolencias conocidas, aunque podamos generar otras nuevas?
- ¿Creéis que sería lícito que pudiéramos escoger hijos “a la carta” mediante edición genética y posterior selección?
- Hoy en día se hace selección de embriones libres de alteraciones genéticas y/o cromosómicas conocidas a las unidades de genética, lo que se conoce como estudio preimplantacional. ¿No es esto una forma de discriminación también?
- De poder implementarse la edición genética libre, ¿pensáis que todo el mundo tendría que poder acceder? En caso de que no, ¿según qué criterios?
- ¿Tienen derechos los progenitores a decidir si sus hijos tienen que pasar por la edición genética?
- ¿Quién tiene que decidir los límites de la ciencia? ¿Los científicos? ¿O bien toda la población? ¿Es beneficioso dejar de aplicar técnicas innovadoras para mejorar la calidad de vida de los humanos solo por cuestiones éticas?

Aspectos para motiva el debate:

- Discriminación por selección de ciertos caracteres relativamente irrelevantes por la supervivencia, como por ejemplo el color de cabello, ojos o altura.
- Criterios para acceder a edición y selección genética: económicos, sociales, de riesgo (evaluados por científicos), geográficos, etc.
- Si los padres decidieran sobre la posible edición genética de sus hijos de forma preimplantacional, quizás los condenarían a futuros problemas de salud.

BLOQUE 2

LA CARRERA INVESTIGADORA EN EL ÁMBITO DE LA BIOMEDICINA

BLOQUE 3

EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

3.1 INTRODUCCIÓN A LA EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES

Se define como experimentación animal cualquier procedimiento experimental que cause o ataque el estado de bienestar de un animal, el cual tenga como misión demostrar fenómenos biológicos sobre especies animales, extrapolables o no a la especie humana.

La investigación que utiliza animales se suele llevar a cabo, exceptuando casos puntuales como animales salvajes, en instalaciones conocidas como estabularios/animalarios/bioterios, en las que hay una serie de condiciones controladas (temperatura, humedad, ruido, etc.) que garantizan el bienestar animal y una buena reproductibilidad de los experimentos.

La realización de procedimientos experimentales con animales está supeditado a la aprobación por parte de un comité ético, del cual tiene que disponer el centro donde se realiza (universidad, centro de investigación, industria u hospital). Se tiene que definir de principio a fin los pasos que se seguirán con los animales, así como las condiciones de vida (comida, bebida, etc.), tratamientos y aplicación de la eutanasia. Aun así, siempre se mira de aplicar la regla de las 3 R: reducir, refinar y reemplazar. De forma breve, el objetivo es utilizar el número mínimo de animales, de la manera más óptima y, a ser posible, de la especie menos compleja que el estudio permita.

Los modelos más utilizados son el ratón, la rata, los conejos, los peces, los anfibios, las aves y las cobayas. De forma mucho menos habitual se utilizan primates no humanos y otros mamíferos como perros y cerdos.

3.2 EL RATÓN COMO MODELO DE EXPERIMENTACIÓN

El ratón (*Mus musculus*) es, de lejos (representa más de la mitad de los usos), la especie más usada en investigación debido a que:

- Tiene una medida adecuada para ser manipulado y a la vez estudiado
- El tiempo de generación es relativamente corto, por el que se puede obtener un gran número de individuos en poco tiempo
- Su mantenimiento ha acontecido sencillo y económico
- Elevado grado de homología con la especie humana a nivel de órganos y fisiológico.
- Presenta buena adaptación para vivir estabulado
- Hoy en día se trabaja con troncos muy estables, por lo que hay poca variabilidad entre individuos
- Se dispone de mucha información a diferentes niveles, que han permitido el desarrollo y estandarización de técnicas y procedimientos, así como de diferentes modelos de enfermedades humanas

3.2.1 El ratón en estudios relacionados con obesidad

De entre las muchas enfermedades en que se utiliza el ratón como modelo experimental, las enfermedades metabólicas, tales como la obesidad, diabetes tipo 2 y otras condiciones relacionadas, son algunas de las más importantes.

Respecto a la obesidad, hay 2 modelos principales de ratón:

- Genéticos: animales portadores de mutaciones relacionadas con rutas metabólicas esenciales, como por ejemplo las cuales regulan control del hambre. La *leptina es la hormona encargada de regular el peso corporal a través del hambre y la producción de calor en el cuerpo. Los ratones ob/ob, que no producen leptina, y los db/db, que no tienen el receptor de leptina, se utilizan en estudios de obesidad porque presentan hiperfagia (ingesta excesiva de comida, por encima del que es necesario para cubrir las necesidades fisiológicas) desarrollan obesidad mórbida y alteraciones asociadas, como niveles de glucosa desregulados y afectación pancreática.
- Inducidos por dieta: representan de forma más fiel los procesos fisiológicos que se dan a los humanos durante la obesidad. Los más habituales son la utilización de dietas ricas en grasa (llegan hasta el 60% de su contenido) y/o la adición de fructosa en agua de bebida.

El objetivo de mi investigación es testar una nueva terapia para paliar el proceso inflamatorio que ocurre a diferentes tejidos y órganos en humanos obesos, por el que se hace necesario un modelo de ratón que lo represente el más fielmente posible.

A mi modelo utilizamos ratones del tronco C57BL/6J, también conocidos como B6, la más utilizada en investigación, que son alimentados con dieta de cafetería y agua de bebida suplementada con fructosa, que viene a representar los refrescos. A las muestras de hígado que observaremos al microscopio podéis ver cómo afectan a estos tipos de dietas a los ratones, comparando el hígado de un ratón control (sano) con el de uno que ha sido alimentado con la dieta obesogénica.

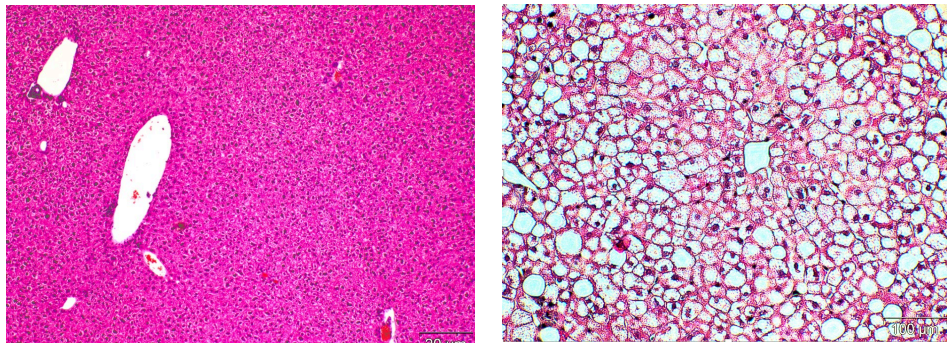


Figura 8: microfotografies (100x d'augment) de fetge de ratolí sa (esquerra) i de fetge afectat per la dieta de cafeteria (dreta) tenyits amb hematoxilina i eosina.
Font: elaboració pròpia

3.3 DEBATE SOBRE EL USO DE ANIMALES EN EXPERIMENTACIÓN

Las opiniones respecto a la experimentación animal están completamente polarizadas. Quienes se oponen se preocupan por los derechos de los animales, mientras que quienes le apoyan la ven como un medio para acelerar y mejorar la comprensión de la biología y la terapéutica de las enfermedades humanas.

SITUACIÓN 1: LOS LÍMITES DE LA EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES

Debido a que los protocolos y procedimientos que requieren el uso de animales tienen que pasar por un comité ético, se tiene que justificar de forma muy adecuada las razones para el uso, no solo de animales, sino de la especie de elección. La idea es que siempre se tienen que utilizar organismos lo más sencillos posibles (entendiéndolo desde un punto de vista morfofisiológico y antropocéntrico).

Hace unas semanas estalló la polémica cuando se supo que una empresa que tiene su sede en el Parque Científico de Barcelona (PCB), entidad que pertenece en la Universidad de

Programa **Amgen TransferCiencia 2021-2022**

Barcelona (UB), había subcontratado los servicios de la empresa Vivotecnia Research para que realizara un ensayo farmacológico con cachorros de perro Beagle.

Según la empresa contratante, el objetivo es “desarrollar una terapia por enfermedades fibróticas, el que comporta el estudio *histopatològic de los órganos de 32 cachorros de *Beagle”.

Preguntas:

- Sabiendo que muchos avances médicos actuales se deben al uso de animales en investigación y que otros países europeos como Holanda quieren prohibir la experimentación animal en pocos años, ¿pensáis que se tendría que limitar su uso en todo el mundo?