



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA  
**RAFAEL NÚÑEZ**

PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

---

**GUÍA DE GENÉTICA MÉDICA**

**ENIO HERNÁNDEZ AGUIRRE**

*Médico. MSc. En Genética.*

**ANDRÉS SANCHEZ CARABALLO**

*Biólogo. MSc en Inmunología.*

**CATHERINE MEZA TORRES**

*Bacterióloga. MSc en Inmunología.*

---

**Facultad De Ciencias De La Salud**  
**Programa De Medicina**





© **Corporación Universitaria Rafael Núñez**  
Institución Universitaria | Vigilada Mineducación  
2019  
Hecho en Colombia

**Rector**

Miguel Ángel Henríquez López

**Vicerrector General**

Miguel Henríquez Emiliani

**Vicerrectora Académica**

Patricia De Moya Carazo

**Vicerrector Administrativo y Financiero**

Nicolás Arrázola Merlano

**Directora Institucional de la Calidad**

Rosario López Guerrero

**Directora de Investigación**

Judith Herrera Hernández

**Director programa de Medicina**

Heliana Padilla Santos

Mónica Rocha Carrascal

**Director de Biblioteca Miguel Henríquez Castañeda-Cartagena**

Luis Fernando Rodríguez L.

**Revisión técnica disciplinar**

Heliana Padilla Santos

**Revisión y corrección de estilo**

Raúl Padrón Villafañe

**Autor**

Enio Hernández Aguirre

Andrés Sánchez Caraballo

Catherine Meza Torres



## TABLA DE CONTENIDO

	Págs.
NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO	4
INTRODUCCIÓN	5
PRÁCTICA N° 1. REPRODUCCIÓN CELULAR	7
PRÁCTICA N° 2. CARIOTIPO HUMANO	19
PRÁCTICA N° 3. IDENTIFICACIÓN DE LA CROMATINA X	39
PRÁCTICA N° 4. ANALISIS DE LAS LEYES DE LA HERENCIA MONOGENICA CON BASE EN ARBOLES GENEALÓGICOS	48
PRÁCTICA N° 5. PRUEBA DE MICRONÚCLEOS	59
PRÁCTICA N° 6. GENÉTICA DE GRUPOS SANGUÍNEOS	64
PRÁCTICA N° 7. POLIMORFISMO GENÉTICO Y FARMACOGENÓMICA.	82
PRÁCTICA N° 8, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE DNA	94
PRÁCTICA N° 9. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	99
PRÁCTICA N° 10. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	105



## **NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO**

La Bioseguridad en el laboratorio, tiene como objetivo primordial la prevención de condiciones que puedan resultar lesivas tanto para el personal conformante de la comunidad académico-administrativa, llámese a estos docentes, auxiliares de laboratorio, estudiantes, personal de servicios generales y coordinador (a), como para las instalaciones, equipos, simuladores y elementos del laboratorio.

1. Utilizar siempre los elementos de barrera de protección apropiados según las necesidades: bata, gorro, guantes, tapabocas, gafas, zapatos cerrados, etc.
2. No circular con ropa de calle y/o cambiarse de ropa dentro del Laboratorio.
3. Respetar siempre las señalizaciones de Bioseguridad.
4. Lávese las manos vigorosamente antes y después de efectuar un procedimiento, según el protocolo de la práctica.
5. Los materiales utilizados deben desechados de acuerdo con las normas internacionales de bioseguridad para manejo de residuos hospitalarios.
6. Los elementos cortopunzantes como agujas, bisturíes, cuchillas, lancetas y otros, deben ser desechados con precauciones para evitar lesiones (utilice siempre el Guardián).
7. Reportar siempre a su docente los accidentes ocurridos en el Laboratorio, con el objeto de activar el protocolo de atención inmediata e informar al funcionario del laboratorio para realizar la respectiva remisión.
8. Todo material contaminado deberá ser eliminado en bolsa roja.
9. Si padece lesiones exudativas o dermatitis debe evitar el contacto con los pacientes y con los equipos de trabajo, hasta que estas sanen.
10. Absténgase de comer, beber o fumar en el laboratorio.
11. Es responsabilidad de cada estudiante el manejo del equipo, simulador o modelo anatómico al que tenga acceso.
12. Mantener el orden y disposición de equipos, simuladores y cableado que puedan generar lesiones directas o accidentes.
13. Evitar bromas y juegos en el área de laboratorio que puedan generar accidentes o incidentes.
14. Los equipos y simuladores nunca deben colocarse en zonas de paso, particularmente en los pasillos del laboratorio, para evitar los accidentes.



## INTRODUCCIÓN

La genética es una disciplina de la biología, que se encarga de estudiar los genes y sus variaciones entre los organismos. Genética proviene del término génesis que significa generar, iniciar, dar forma. En todos los organismos vivos los genes se ubican en una molécula llamada ácido desoxirribonucleico (ADN) que está formada por una secuencia de nucleótidos, de estos los más conocidos son la adenina, guanina, citosina y timina. Pero sólo aproximadamente el 10% de estas secuencias se organizan estructuralmente en diferentes “cajas” y secuencias “consenso” determinando tres clases de genes. Todos los genes transcriben ARN, pero son los genes clase II los que tienen la información para codificar proteínas, y la organización de estas proteínas establece el fenotipo o expresión morfológica. El paso de los nucleótidos a los aminoácidos de la proteína requiere de un proceso de codificante, y por esta razón se debe expresar “el gen codifica proteína”. La traducción de este código la realiza un ácido ribonucleico (ARN) llamado de transferencia, en dos estructuras ribo proteicas conocidas como ribosomas. La lectura de éste código no es universal, hay diferencias en algunas especies, y en la misma especie humana el código de lectura del ADN mitocondrial es diferente al ADN nuclear. Otro aspecto a considerar es que un gen puede codificar diferentes proteínas y estas se conocen como isoformas, que, aunque estén relacionadas con la misma función, la calidad y nivel de esta función difiere; esto significa que, aunque se herede un gen 100% homólogo al de un progenitor, la función proteica y/o el fenotipo puede variar.

Actualmente la genética está dividida en diferentes campos de aplicación:

- **Genética molecular:** comprende la información estructural, química y funcional del ADN y los genes. También incluye las técnicas del laboratorio para obtenerlo y su aplicación en la investigación y diagnóstico.
- **Genética de poblaciones:** estudia los genes de un grupo de miembros individuales de una misma especie, de una misma raza o etnia, en una determinada población. Este estudio comprende los polimorfismos, y las variaciones génicas a través del tiempo en un espacio determinado, aplicando normas matemáticas de factorización y el equilibrio de Hardy-Weinberg.
- **Fármaco genética y Fármaco genómica:** estudian los genes que codifican las enzimas que metabolizan los medicamentos y otros xenobióticos.



- **Genética Forense:** aplica las técnicas de genética molecular para identificar individuos. Estas mismas técnicas se utilizan en las pruebas de paternidad.
- **Genética Médica y Clínica:** estudia los genes que causan las enfermedades de origen genético, el mecanismo etiológico y la fisiopatología de la sintomatología. Esto incluye enfermedad genética, síndromes, secuencias, deformaciones, malformaciones y disrupciones. También incluye las técnicas para el diagnóstico y las terapias actualmente aceptadas por las normas legales.



## **PRÁCTICA N° 1**

### **REPRODUCCIÓN CELULAR**

#### **I. INTRODUCCIÓN**

**La división celular** es el proceso por el cual una célula se reproduce y origina 2 células hijas. La división celular comprende tres etapas: la mitosis o la meiosis, la cariocinesis y la citocinesis.

La **mitosis** comprende una serie de procesos sucesivos cuyo **objetivo** es repartir equitativamente el material genético o ADN en las células hijas. La **cariocinesis** consiste en la desintegración de la membrana nuclear durante la profase y metafase de la mitosis, y su reconstitución en la parte final de la telofase. La **citocinesis** es separación del citoplasma o citoesqueleto incluyendo membrana celular y orgánulos de la célula progenitora en dos células hijas. De estos procesos, sólo la mitosis tiene un mecanismo de separación equitativa. Los tres procesos poseen mecanismos moleculares independientes que se coordinan durante la división celular, pero que en ciertas circunstancias fisiológicamente normales pueden ser independientes y ocurrir mitosis sin citocinesis o viceversa.

#### **CICLO CELULAR**

Cada célula humana tiene 46 moléculas de ADN organizadas en 23 pares homólogos. Homólogo no significa igual, sino que cada par contiene la información genética para las mismas funciones. Todo el material genético se llama genoma y los genes que se utilizan del genoma se denominan genotipo. Cada célula producto de la división celular debe tener el genoma completo, por lo tanto, la célula progenitora debe duplicarlo para repartir equitativamente el material genético en número y función en las células hijas.

**Esta duplicación es el primer paso de la mitosis.**



Actualmente disponemos de tecnología que nos permite observar el proceso de condensación de los hilos de ADN alrededor de la proteína desde el inicio hasta su máxima condensación ampliando la visión estructural de la mitosis y reorganizando académicamente la mitosis para una mejor comprensión de su función y objetivos.

**Ciclo celular** o **ciclo de división celular** se refiere a la vida de la célula desde que nace hasta que entra en división. Se ha dividido en las fases G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y la separación del material genético propiamente dicho. Esta última fase se nombra como M para referirse a la mitosis o a la meiosis. La letra G es por intervalo en inglés (*gap*). La letra S es por síntesis y se refiere a la duplicación del ADN. La interfase se define como el período donde la célula realiza su función y se prepara para la división celular; comprende las fases G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>.

**Fase G<sub>0</sub>:** la célula que acaba de nacer se encuentra en G<sub>0</sub>, debe poseer todo el genoma con su genotipo funcional, pero, como la citocinesis generalmente no es equitativa, posiblemente sus orgánulos, incluyendo las mitocondrias con el citoesqueleto, no sean suficientemente eficientes para entrar en función. Como todo recién nacido debe crecer y madurar. Al final de la telofase, y durante la evolución del anillo contráctil que caracteriza el inicio de la citocinesis, los cromosomas empiezan a descompensarse, quedando el ADN como cromatina, y se vuelven a formar las membranas nucleares en ambas células hijas. Por lo tanto, la cromatina puede liberarse de las histonas e iniciar la transcripción del genotipo de acuerdo al ambiente donde se encuentre para ejercer su función en G<sub>1</sub>. La célula en G<sub>0</sub> está en reposo sólo con respecto a la interacción con otras células de su sistema o de otros sistemas. El concepto de G<sub>0</sub> como periodo de reprogramación genética se estableció con la clonación por transferencia nuclear iniciada por Ian Wilmut. Las neuronas permanecen en un ciclo de G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-G<sub>0</sub> porque podrían perder la información adquirida si entran en división. Las células recién nacidas pueden permanecer en G<sub>0</sub> si el tejido donde se formen tiene el número normal establecido. Hay un control en el número de células de un tejido y, por esta razón, las dos células hijas en determinados casos no son viables.



**Fase G1:** es el periodo funcional de la célula con respecto a la interacción con otros tejidos. Empieza a transcribir los genes que codifican las proteínas implicadas en su funcionalidad, es decir, un miocito sólo transcribe los genes que codifican proteínas relacionadas con la función muscular. ¿Cómo se escogen estos genes si cada célula posee todos los genes del genoma de la especie humana? La respuesta está en el medio ambiente celular donde moléculas llamadas primeros mensajeros, compatibles con receptores de la membrana celular, activan una cascada de señales moleculares intracelulares que se conoce como transducción de la señal que activan los factores “trans” que llegan a las regiones reguladoras y promotores de genes específicos propios de una determinada función celular. Este mecanismo de regulación génica escoge los genes necesarios para la funcionalidad celular. Durante su función la célula debe permanecer en G1, y esto es regulado por proteínas llamadas oncosupresoras codificadas por genes llamados protooncogenes. Pero por diversas razones, como la programación genética y otros factores génico-ambientales, la célula debe dejar su función y entrar en división, para generar células hijas que cumplan su misma función, o entrar en apoptosis, si ha ocurrido daño genético importante. Si va realizar la división celular se activan los genes de la primera parte del proceso de mitosis y de la división celular. Una célula puede dejar de transcribir en G1, no entrar en división y permanecer en un estado de reposo (G0). Un ejemplo es la ontogenia del linfocito T: nace en médula ósea (G0), pasa a G1 y migra al timo donde se diferencia en CD4 o CD8 y nuevamente pasa a G0, viaja al plasma sanguíneo y si capta un Epítotope presentado por la molécula HLA entra nuevamente a G1.

Para producir células hijas que cumplan la misma función debe tener el genoma de la célula progenitora, por lo tanto, el genoma progenitor debe duplicarse y este periodo se identifica como S: de 23 pares homólogos de ADN se pasan a 46 pares (92 moléculas de ADN). La cantidad de nucleótidos de las moléculas de ADN oscila entre 50 y 250 millones, y la longitud de la molécula de ADN tiene como promedio 8 cm. Ahora imagínense 92 hilos con 23 colores diferentes y traten de organizarlos en tétradas con base en los colores y posteriormente traten de separarlos en diadas con base en los colores. Es un proceso complejo que la evolución celular resolvió formando los cromosomas.



**Para cumplir con el objetivo de la mitosis, primero debe duplicarse el ADN, luego formarse los cromosomas y, posteriormente, separar los cromosomas dobles en 46 y 46 conservando el mismo genoma.**

El cromosoma es una estructura formada por una molécula de ADN superenrollada en unas proteínas llamadas histonas. La formación de los cromosomas es exclusiva de eucariotas y sucede solamente cuando la célula va a dividirse como un mecanismo para repartir equitativamente el material genético. Pero algunas eucariotas, como las levaduras, no forman cromosomas, parece que con un número reducido de moléculas de ADN no es necesario la formación del cromosoma; y para la formación del cromosoma es necesaria la molécula histona 1 (H1). Las bacterias no forman cromosomas, por esto es incorrecto expresar “cromosoma bacteriano”, el concepto correcto es genoma bacteriano.

**La formación del cromosoma** se inicia en la fase S cuando se está terminando la duplicación del ADN. La hebra que termina primero la duplicación es la asociada a la hebra continua o líder, que se enrolla en las histonas viejas que estaban asociadas a la cromatina antes de iniciar la replicación. La hebra que termina después es la asociada a la hebra discontinua o retrasada, que se enrolla en histonas nuevas, que se sintetizan en la fase S. El enrollamiento o condensación del ADN en histonas comprende la formación de los nucleosoma, del solenoide y el enrollamiento del solenoide en un esqueleto que es una especie de andamio para formar el cromosoma metafásico. Este proceso se inicia en la fase G2 y termina en la metafase.

**Formación de Nucleosoma:** la doble hebra de ADN tiene 2 nm de diámetro con base en la difracción de rayos X realizada por Rosalind Franklin. La cromatina de la fase G1 mide en promedio 5 nm, con variaciones en diferentes regiones de la molécula, y puede verse con microscopía electrónica. Inicialmente se organizan 2 moléculas de histonas 2A, 2B, 3 y 4 formando una estructura en forma de “yoyó” llamada octámero de histonas, alrededor de esta el ADN da 2 vueltas y media ocupando aproximadamente 150 nucleótidos. La unión del octámero con ADN se conoce como



nucleosoma y mide 10 nm. Todos los nucleosoma unidos que corresponde a una molécula de ADN parecen un collar de perlas.

**Formación del Solenoide:** seis nucleosoma se organizan alrededor de una molécula de H1; y de 6 en 6 nucleosoma van organizando con un movimiento en espiral al solenoide. Se observa al microscopio electrónico como una cromatina de 30 nm.

**Enrollamiento del Solenoide:** hay una estructura proteica en forma de andamio doble que es el esqueleto para la formación final del cromosoma. En esta estructura doble se enrolla el solenoide de una doble hebra de ADN (molde más hebra líder) y el solenoide de la otra doble hebra de ADN (molde más hebra retrasada). De esta manera, las 2 doble hebras de ADN producto de la duplicación de uno de los pares homólogos quedan unidas en un cromosoma que realmente es doble. Cada par homólogo de ADN de G1 forma 4 moléculas homologas en fase S, que formarán 2 cromosomas dobles en metafase; los 23 pares homólogos de ADN formarán 46 cromosomas dobles. El solenoide empieza a realizar enrollamiento tras enrollamiento alrededor del esqueleto pasando sucesivamente a diámetros de 200, 300, 600, 700 y finalmente 1400 nm. A medida que aumenta el grosor de la cromatina, va disminuyendo su longitud. En promedio, la molécula de ADN mide 8 cm; el ADN que tiene 50 millones de nucleótidos forma un cromosoma de 1,5 micras, y el que tiene 250 millones forma un cromosoma de 8 micras. El proceso se inicia con una cromatina de 10 nm y termina con un cromosoma ya totalmente condensado de 1400 nm de diámetro. Los biólogos que describieron por vez primera la mitosis tenían microscopios que permitían ver la cromatina a partir de 700 nm, esta etapa corresponde a la **profase**, la etapa de 1400 nm corresponde a la **metafase**. El cromosoma termina de formarse en esta etapa y por esto se llama cromosoma metafásico. Así que actualmente la mitosis no puede iniciarse en profase porque puede observarse desde la etapa de nucleosoma y porque se pierde la continuidad lógica de un proceso que actualmente sabemos cómo evoluciona.

**Repartición equitativa del material genético:** tenemos los 46 cromosomas dobles formados en metafase. Deben organizarse en diadas para su separación en 46 y 46



cromosomas en cada célula resultante de la próxima citocinesis. Para facilitar esta separación, debe desaparecer la membrana nuclear que tiene mecanismos moleculares específicos. Al desaparecer la membrana nuclear, se forma una estructura micro tubular con polímeros de tubulina que surgen de un centro organizador que llaman centriolo o MAP (proteína organizadora de microtúbulos) que contactan los centrómeros de los cromosomas dobles. Esta estructura se llama Huso acromático porque se parece al telar artesanal y porque no se tiñe con los colorantes proteicos. El huso acromático o mitótico no se ubica necesariamente en el plano ecuatorial de la célula, pero los cromosomas dobles en diadas sí están en el plano ecuatorial del huso. Por ejemplo, en la ovogénesis humana, el huso acromático se ubica adyacente a la membrana interna del ovocito.

Complejos proteicos asociados al huso comienzan la separación de los 46 cromosomas dobles, y esta etapa se conoce como **Anafase** que significa: partes iguales. En un espacio intermedio entre la anafase y la telofase, complejos proteicos activados por microtúbulos satélites del huso forman un anillo de constricción, alrededor de la célula, a lo largo de un eje equidistante entre los cromosomas en separación, iniciando la citocinesis. Cuando termina la separación de los cromosomas, estos pasan al estado de cromatina y se reconstruyen las membranas nucleares de las futuras células hijas. Esta etapa se conoce como **telofase**, porque el prefijo telo significa "fin". La activación de otros complejos proteicos termina la citocinesis y estas células hijas quedan en G0 para organizarse citoplasmáticamente y programar su genotipo con base en el medio ambiente donde estén ubicadas (transducción de la señal).

### **Aclaración de conceptos:**

No siempre la mitosis se coordina con la citocinesis. En la especie humana, las células gigantes son macrófagos que realizan mitosis continua sin citocinesis. El ovocito humano no realiza citocinesis, solo realiza dos separaciones cromosómicas continuas,



con previa duplicación del ADN, para disminuir (meiosis) los 23 tétradas homólogos a 23. En estas 2 separaciones se forman el primero y segundo cuerpo polar.

El objetivo de la mitosis es separar equitativamente en número y función el material genético en las células hijas, para esto se realizan tres mecanismos: duplicación del ADN, formación de los cromosomas y la formación del huso acromático.

La función básica de los cromosomas es facilitar la separación del material genético. Sólo se forma para la división celular y, después de la formación de las células hijas, desaparece para dejar que el ADN realice su función. Hay eucariotas que no forman cromosomas, por lo tanto, para la mitosis realizan un mecanismo diferente.

## **II. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Identificación y reconocimiento de las distintas fases de la mitosis en ápices radiculares de cebolla.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar cada una de las fases de la mitosis.
- Identificación de la cariocinesis.
- Conocer la importancia de la división celular en los seres vivos.

## **III. FUNDAMENTO**

El proceso de la división celular puede ser estudiado seleccionando un material constituido por células que se encuentren en continua división. Esta condición la reúnen los meristemos terminales o primarios, tales como los que se encuentran en el ápice de las raíces.



#### **IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS**

- 3 Partes Etanol y 1 ácido acético (solución carnoy).
- HCl 1N.
- Orceína acética o de orceína lactopropiónica.
- Agua destilada.
- Cubre Objetos.
- Portaobjetos.
- Microscopios.

#### **V. MUESTRA**

- Raíces de cebolla.

#### **VI. PROCEDIMIENTO**

Dos semanas antes de la práctica, se coloca una cebolla fresca en agua para hacer crecer las raíces.

Se cortan raíces jóvenes de la cebolla, aproximadamente unos 20mm, comprobando que conservan el ápice radicular, que se distinguirá por el cambio de color.

**Fijación.** Se prepara la mezcla fijadora: 3 partes de etanol y 1 parte de ácido acético (Solución Carnoy).

**Conservación.** Se lava el material varias veces con la mezcla fijadora y se conserva a 4°C.

**Preparación.** Las raicillas de cebolla que se hallan en mezcla fijadora se hidrolizan en HCl 1N durante 10 minutos a 60°C.

Transcurridos los 10 minutos de la hidrólisis, se lavan las raicillas en agua destilada y se colocan sobre una gota de orceína acética o de orceína lactopropiónica para su tinción, durante 10 a 15 minutos.



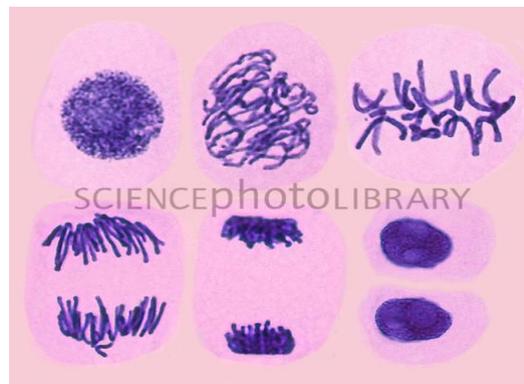
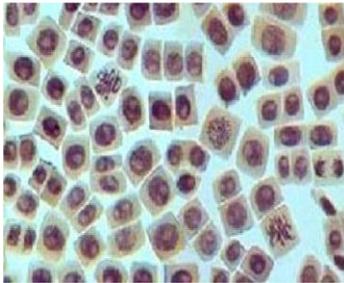
A continuación, se toma una raicilla y se coloca sobre un vidrio portaobjetos y se corta el ápice radicular con un bisturí. Para realizar esta operación se utiliza la lupa. Este ápice radicular se corta a su vez en 4 fragmentos, se hace un corte longitudinal y otro transversal. Se separan los cuatro trozos y a continuación se añade una gota del colorante. Seguidamente se coloca un cubreobjetos sobre el material que deseamos observar. Con la ayuda de un bastoncillo de madera se golpea y extiende el material. A continuación, se presiona con el dedo pulgar y se retira el exceso de colorante con un papel de filtro.

### Observación

Se observa al microscopio empezando con el objetivo de menor aumento. No es necesario utilizar el objetivo de inmersión. Se deben distinguir y dibujar, tal y como se ven, todas las fases de la mitosis.

INTERFASE PROFASE METAFASE

Un ejemplo de la visión en



Credit: [STEVE SCHMEISSNER/SCIENCEPHOTOLIBRARY](#)



**CROMOSOMAS DE LINFOCITOS HUMANOS INICIANDO LA ANAFASE**



. Dr. Enio Hernández A. Unidad de genética .Instituto Nacional de Salud (Bogotá).

## VII. ACTIVIDADES A DESARROLLAR

### 1. Observación de células en interfase y en mitosis.

Observe con mucha atención la preparación y diferencie células en interfase y células en cada una de las etapas de la mitosis.

	<b>INTERFASE</b>	<b>MITOSIS</b>	<b>TOTAL</b>
<b>No CELULAS</b>			
<b>% CELULAS</b>			<b>100%</b>

2. Seleccione un campo, recorra el campo siguiendo un determinado orden, clasifique las células observadas con base en las fases de la mitosis y anote el dato en el cuadro adjunto. Proceda con otros campos, cuidando de no repetir uno observado, hasta tener los datos de un mínimo de 50 células.



FASE	CAMPO 1	CAMPO 2	CAMPO 3	TOTAL	%
Interfase					
Profase					
Metafase					
Anafase					
Telofase					
<b>TOTAL</b>					

Calcular el índice mitótico: %I.M. = No de células en mitosis X 100 / No total de células.

### 3. Responder el siguiente cuestionario.

1. Dibuje cada una de las distintas fases de la mitosis que observe.
2. ¿Por qué el mayor número de células se encuentran en interfase?
3. La cebolla *Allium cepa* es una especie vegetal con  $2n=16$  cromosomas ¿Cuántos cromosomas recibe cada polo en telofase? Explique su respuesta.
4. ¿Cuántas moléculas de ADN tiene uno de los cromosomas de cebolla en metafase? Explique su respuesta.
5. Un individuo diploide y homocigótico AA, ¿Cuántas copias del alelo A tiene en el periodo G1 de la interfase y cuántas en metafase?
6. Un individuo diploide y heterocigótico AA°, ¿Cuántas copias del alelo A° tiene en el periodo G1 de la interfase y cuántas en metafase?
7. ¿Existe alguna diferencia entre endomitosis y endoreduplicación?
8. ¿Por qué se bloquea la continuación de la mitosis en metafase en especies que presentan Haplocromosomas?



## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J. Biología celular molecular. Edición 13. Ed. W.H.Freeman & Co Ltd. 2003
2. Muñoz L, Concha ML. Células troncales en el desarrollo y las perspectivas de reprogramación celular para la regeneración. Int. J. Morphol. Dic 2012; 30(4).
3. Pardo M. Citocinesis en células eucariotas. Investigación y Ciencia (portal online). Julio 2005. <https://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/retinas-artificiales-401/citoquinesis-en-clulas-eucariotas-4456>
4. Rodríguez Fragoso L, Hernández Baltasar E, Reyes Esparza JA. El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer. Biotecnología aplicada. 2004, 21: 60-69.
5. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA. Conceptos de Genética. 8 Edición. Pearson educación S.A.: Madrid. 2006.



## **PRÁCTICA N° 2**

### **CARIOTIPO HUMANO**

#### **I. INTRODUCCIÓN**

Cariotipo significa tipificación del núcleo, pero en la práctica es la organización de los cromosomas de un núcleo. También se denomina estudio cromosómico, y las órdenes médicas generalmente emplean este último término. Cuando se realiza un estudio cromosómico se desea establecer el número de cromosomas y la estructura de los mismos. El número aceptado como normal en la especie humana es 46, pero una variación en este número no representa en forma absoluta que la persona sufra una patología. La estructura normal se basa en los conceptos de metacéntrico, submetacéntrico y acrocéntrico que fue establecido en las convenciones de citogenética y en el patrón de bandeo de los pares homólogos si la técnica para obtenerlos es de bandeo. Se han desarrollado diferentes técnicas para obtener cromosomas, las primeras producían cromosomas homogéneamente teñidos que fueron organizados en grupos (A-G) con base en la longitud pero con el inconveniente que no puede diferenciarse el 1 del 3, el 6, 7, 8 y el X, etc. En general no pueden diferenciarse entre sí los cromosomas de un grupo. El posible diagnóstico se establecía con normas que se explicarán posteriormente en este curso. Las técnicas de bandeo identifican con precisión cada cromosoma, porque cada par homólogo tiene un patrón de bandas específico, por lo tanto, la organización del cariotipo, en este caso, se **basa en las bandas y no en la longitud**, lógicamente hay una relación entre la organización y la longitud de los cromosomas.

Las técnicas de bandeo más utilizadas actualmente son la G (por giemsa) y la R (reverso de G). El comité internacional de citogenética reunido en París en 1995 estableció el *bandeo R con sincronización y alta resolución* como el más indicado para estudios de las enfermedades humanas, recomendando no utilizar más las técnicas de tinción homogénea, que no tienen especificidad para identificar cromosomas. Las técnicas de bandeo identifican las deleciones y amplificaciones de bandas (locus) y



las translocaciones e inversiones cromosómicas. La técnica del bandeo R fue desarrollada por Camargo y Cervenka. Mauricio Camargo Diego es profesor de la Universidad de Antioquia (Colombia).

Como usted ya conoce, el cromosoma es el resultado del enrollamiento supercondensado de una molécula de ADN alrededor de las histonas, y su objetivo es separar equitativamente el material genético (ADN) durante la división celular de eucariotas, posteriormente en las células hijas se descondensa y se libera como cromatina para poder realizar la transcripción de los genes. Así que **los genes no se ubican en los cromosomas, sino en el ADN**. Cuando se realiza un estudio cromosómico no se investigan directamente genes, sino, lo que pudo haber sucedido en una molécula de ADN durante el periodo G1 de funcionalidad o durante la fase S de duplicación o durante la recombinación que ocurre en meiosis. Si se deleta o pierde la banda cromosómica más pequeña, entonces se han perdido por lo menos 4 millones de nucleótidos del ADN. Si la molécula de ADN gana millones de nucleótidos se expresan en el cromosoma como una duplicación de bandas. Si un cromosoma posee un patrón de bandeo que corresponde a otro significa que hubo un cambio de posición de grandes fragmentos de ADN, y para esto se requiere que el ADN se rompa en algún sitio. Las translocaciones y las inversiones requieren de roturas del ADN; por lo tanto, el cromosoma no se rompe porque es una estructura supercondensada, a no ser que los cromosomas sean sometidos a radiaciones iónicas de alta intensidad.

Las ganancias y pérdidas del ADN y sus roturas con translocaciones e inversiones se expresan y pueden verse cuando se convierte en cromosoma. Para el estudio de los genes y de pequeños fragmentos de ADN se requieren las técnicas de biología molecular.

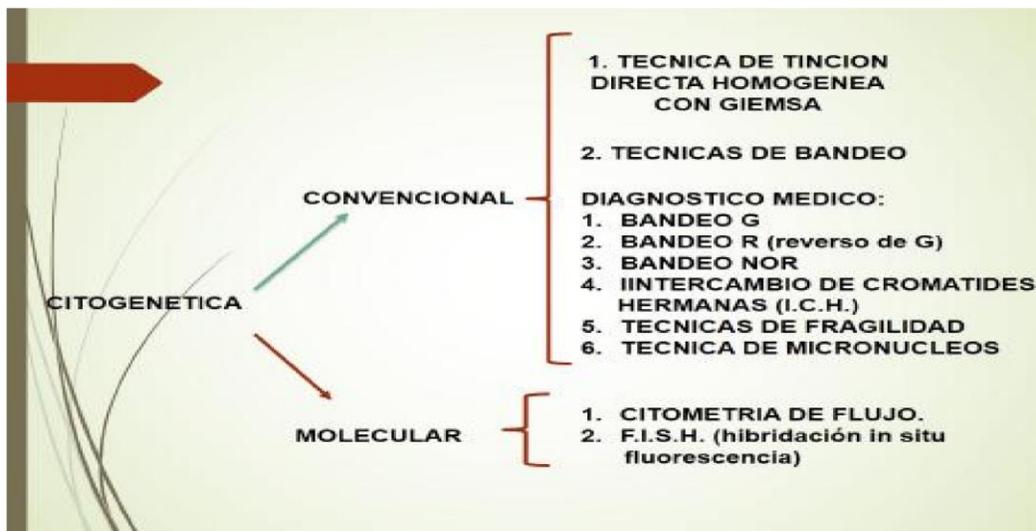
Es frecuente observar en internet y en textos la determinación del sexo o género con base en el cariotipo. ¡Gran error!. Cuando el médico recibe el informe del laboratorio de un cariotipo considerado normal, lo reportan como: “complemento cromosómico 46, XX” o “complemento cromosómico 46, XY”, no agregan el sexo. **El cariotipo 46, XX no es obligadamente femenino, ni el 46, XY es necesariamente masculino**. El género o sexo se determina por la presencia de los genitales externos, y esto se establece con



la observación visual y está respaldado por la ley; no se lleva a una notaría al registrar legalmente un niño el estudio cromosómico ni la cromatina X. Existen un grupo de patologías genéticas llamadas reversión sexual que consisten en varones XX y hembras XY. El cariotipo tampoco define el género cuando hay genitales ambiguos, en estos casos se requiere un estudio general que incluye gónadas, hormonas y otras estructuras sexuales. Por lo tanto, como el género masculino y femenino no requieren de la absoluta presencia del XY y XX, estos cromosomas no deben llamarse cromosomas sexuales, actualmente parece que el concepto de **gonosomas** es el más adecuado.

### **El campo de la ciencia que estudia los cromosomas se llama Citogenética.**

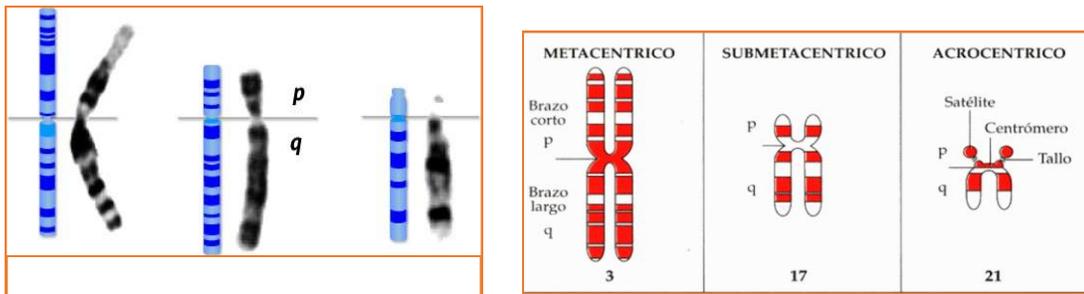
A continuación, verás un cuadro con su organización. Existen diversas técnicas de tinción, pero el cuadro solo menciona las utilizadas en medicina para el diagnóstico genético en humanos (con excepción de la técnica de micronúcleos). La citometría de flujo se utiliza más en el campo inmunológico.



Diversas técnicas de tinción

- Para su estudio, los 46 cromosomas humanos se organizan en parejas. Cada miembro del par proviene de uno de los padres.
- Cada una de estas parejas recibe el nombre de cromosomas homólogos, por lo tanto poseemos 23 parejas de cromosomas homólogos.
- Cada cromosoma contiene una constricción especial llamada centrómero.
- El centrómero divide al cromosoma en los denominados: brazo corto (brazo p) y brazo largo (brazo q).
- De acuerdo con la posición del centrómero, los cromosomas se pueden clasificar en tres grupos:

Metacéntricos, Submetacéntricos y Acrocéntricos.



Identificación y caracterización de los cromosomas, [www.docplayer.es](http://www.docplayer.es).

- Entre los 23 pares de cromosomas presentes en nuestras células somáticas hay un par denominado GONOSOMAS, que son los XX y XY.
- Las 22 parejas restantes se denominan **autosomas** y han sido numerados del par 1 al par 22.
- Para su estudio se organizan en orden de **tamaño decreciente si la técnica es con tinción homogénea**, siendo el par cromosómico número 1 el de mayor tamaño y el par 22 el más pequeño. **Si la técnica es de bandeado se organizan con base en el patrón de las bandas cromosómicas.**
- En los humanos los pares cromosómicos 1, 3, 16, 19 y 20 son metacéntricos.
- Los pares 13, 14, 15, 21, 22 y el cromosoma Y son acrocéntricos.
- Los demás son submetacéntricos.
- En los humanos no existen cromosomas telocéntricos.



## **II. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Conocer las principales anomalías cromosómicas por medio de la evaluación del cariotipo.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Conocer las diferentes técnicas de cariotipo.
- Conocer las principales anomalías cromosómicas.
- Interpretar los resultados obtenidos en el cariotipo con el fin de reconocer las patologías presentadas.

## **III. MÉTODOS**

- Técnica de tinción homogénea con Giemsa.
- Técnicas de bandeo.

## **IV. REACTIVOS, MATERIALES Y REACTIVOS**

- Jeringa previamente heparinizada.
- Fitohemaglutinina.
- Solución fijadora (Carnoy).
- Giemsa.

## **V. MUESTRA**

Sangre Venosa.



## **VI. PROCEDIMIENTO**

Para la obtención de un cariotipo por tinción homogénea con Giemsa se requieren los siguientes pasos:

1. Se toman de 3 a 5 cc de sangre venosa con jeringa previamente heparinizada. Si se toma fuera del laboratorio debe permanecer en la jeringa, fijar la tapa de aguja y el embolo. Se cubre con papel aluminio y refrigerar a 4°C hasta enviar al laboratorio.
2. Se agregan 20 gotas de sangre en frasco de cultivo que contiene el medio de cultivo, antibióticos y se adiciona Fitohemaglutinina. Se incuba a 37°C durante 3 días.
3. Se adiciona colcemid o colchicina y se deja actuar por 2 horas.
4. Se saca de la incubadora y se pasa a un tubo de ensayo.
5. Se centrifuga para concentrar las células en el fondo y se agrega una solución hipotónica y se re suspende. Se deja actuar por 30 minutos.
6. Se centrifuga, se descarta la solución hipotónica, y se agrega una solución fijadora (Carnoy). Se re suspende, se deja actuar por algunos minutos (10) y se repite el proceso dos veces.
7. Por ultimo las células en Carnoy se gotea sobre una lámina portaobjetos a cierta altura y se deja secar durante 3 a 7 días.
8. Posteriormente se aplica tinción Giemsa, se deja secar, se coloca lamina cubre objeto que se fija con pegante.
9. Se procede a buscar los cromosomas con microscopia.

La siguiente imagen nos muestra una fotografía a través del microscopio en la lámina portaobjetos donde se goteó y procesó.

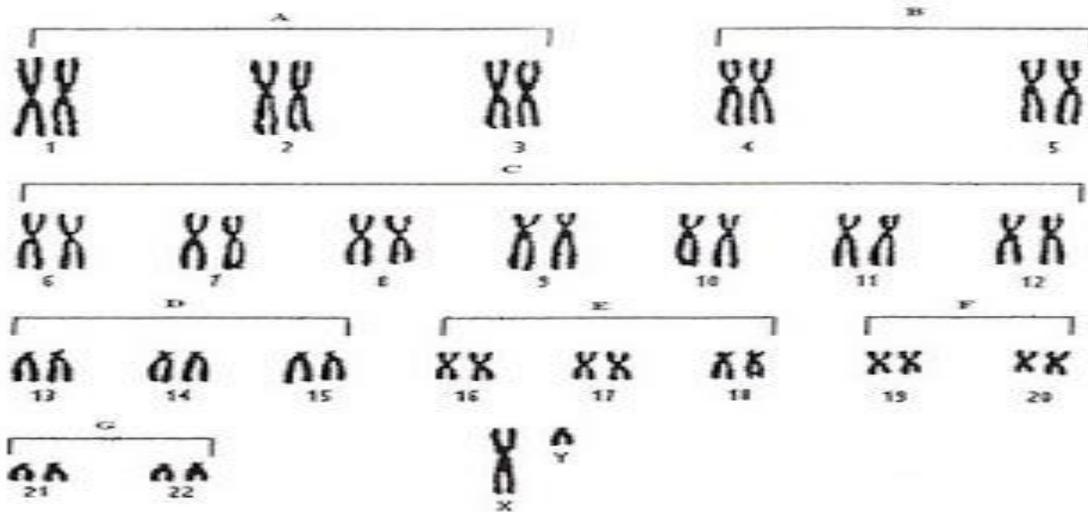


Foto: Cariotipo. Dr. Enio Hernández A. Universidad del Norte. Barranquilla Atlántico.

El siguiente cuadro nos muestra la organización con base en grupos de la A-G

Grupos	Cromosomas	Morfología
Grupo A	1, 2 y 3	Metacéntricos grandes
Grupo B	4 y 5	Submetacéntricos grandes
Grupo C	6 al 12 y X	Submetacéntricos medianos
Grupo D	13, 14 y 15	Acrocéntricos grandes
Grupo E	16, 17 y 18	Submetacéntricos pequeños
Grupo F	19 y 20	Metacéntricos pequeños
Grupo G	21, 22 e Y	Acrocéntricos pequeños

### Imágenes del cariotipo de tinción homogénea organizado



Extraído de: <https://biologiaccadinarte11mogrado.wordpress.com/tercer-bimestre/>

Con esta técnica es muy difícil identificar dentro de cada grupo un determinado cromosoma. Por ejemplo: distinguir los miembros del grupo C. Distinguir entre el 4 y el 5, distinguir entre los acrocéntricos 13, 14 y 15, etc.

Pero, hay ciertas patologías donde puede ser útil. Por ejemplo: si hay una expresión fenotípica de Down y sabemos que el género es femenino, entonces debe haber 16 cromosomas del grupo C y 5 cromosomas del grupo G. Si el género es masculino debe haber 15 cromosomas del grupo C y 6 del G, pero solo en caso de trisomías 21 clásicas o libres, donde hay 47 cromosomas; porque en el Down por translocación o por trisomía parcial hay 46 cromosomas.

### TÉCNICAS DE BANDEO.

Hay diversas técnicas de bandeo, pero las utilizadas en el diagnóstico médico son las siguientes:

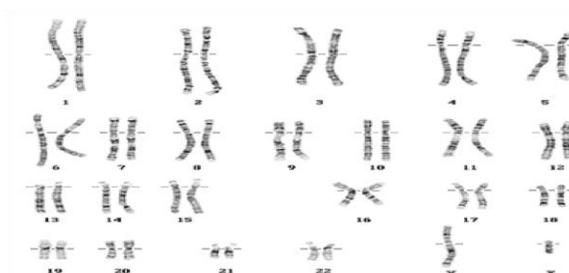


1. Los bandeos G y R solucionan la mayoría de los diagnósticos donde se requiere su uso. Ambas técnicas son aprobadas en el sistema de salud Colombiano.
2. El bandedo NOR (regiones que organizan el nucléolo) investigan las bandas de los brazos p de los acrocéntricos 13, 14, 15, 21 y 22. Se utiliza para determinar el origen parental de las trisomías 13 y 21. Se utiliza generalmente en problemas legales y en investigaciones.
3. Las técnicas de I.C.H. y de fragilidad se utilizan para investigar efectos nocivos sobre el ADN de los factores ambientales. Investigan susceptibilidad a procesos cancerosos e inestabilidad genómica; es de uso general en la medicina laboral u ocupacional.
4. La técnica de micronúcleos no se utiliza en el diagnóstico médico.

En 1995 el comité internacional de citogenética recomendó utilizar el *bandedo R de alta resolución y sincronización* para el diagnóstico médico. Sin embargo, se utiliza más el bandedo G porque es el más ordenado por las entidades de salud por su bajo costo (técnicamente requiere menos procedimientos). El actual bandedo R de alta resolución y sincronización fue desarrollado por Mauricio Camargo Diago (colombiano) en su tesis doctoral.

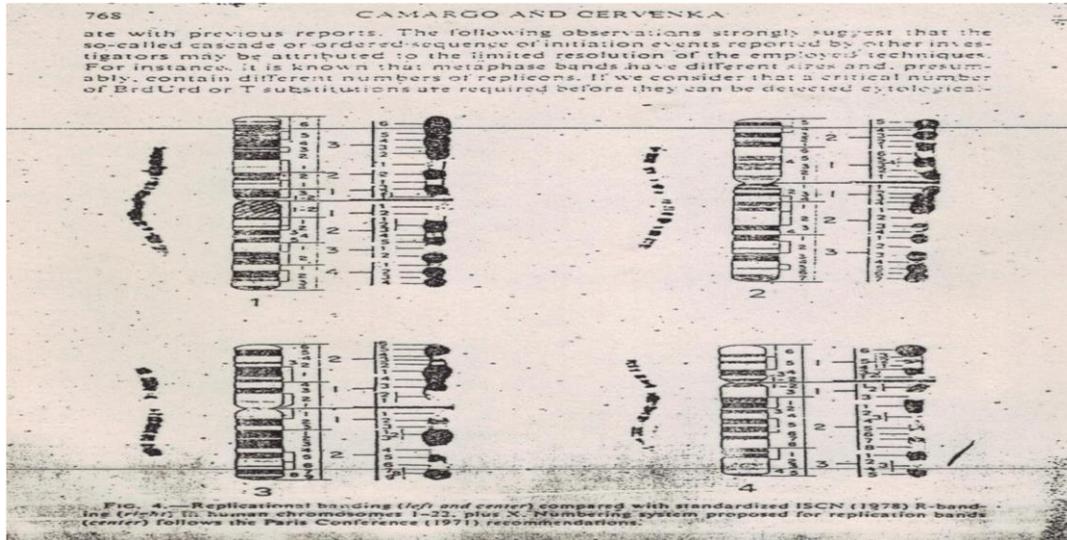
### Ejemplo de un bandedo R de alta resolución.

#### Complemento cromosómico 46, XY



<https://docplayer.es/12701799-Identificacion-y-caracterizacion-de-los-cromosomas.html>

En este caso la organización no es por grupos sino por patrón de bandeado. Cada par cromosómico tiene un patrón determinado por convención. En el patrón de bandeado G los telómeros no se tiñen. El bandeado R (reverso de G) tiñe las bandas claras del G.



Patterns of DNA replication of human chromosomes: replication map and replication model. Camargo & Cervenka. Am J Hum Genet. 1982 sep.; 34(5): 757-780

## UTILIDAD DEL CARIOTIPO EN MEDICINA

Sólo el 10% del genoma tienen genes, por lo tanto, la mayoría de las bandas cromosómicas no tienen genes. Si se pierde una banda (delección) que no tenga genes funcionales no habrá síntomas patológicos. La rotura del ADN en sitios donde no hay genes no produce patología.

El cariotipo se utiliza para investigar **anomalías numéricas** o genómicas, donde hay variación en el número normal de los cromosomas. Y para investigar **anomalías estructurales** del patrón de bandeado y de la forma. La alteración de la forma se presenta especialmente en inversiones pericéntricas.

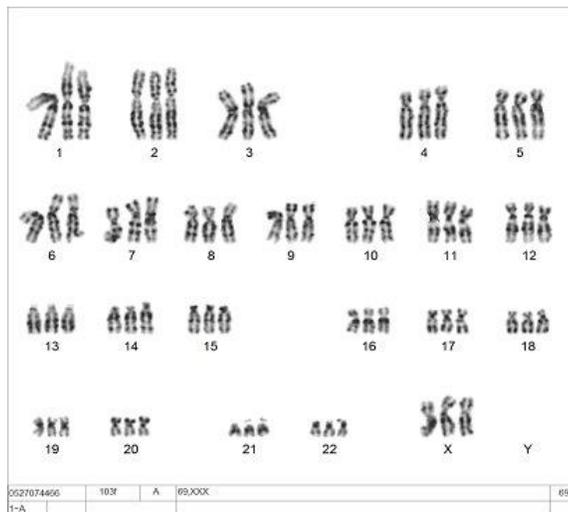
Las anomalías numéricas se dividen en:

1. Poliploidías.



- 1.1. Triploidías (tiene 3 veces el número haploide del gameto:  $3 \times 23 = 69$ ).
- 1.2. Tetraploidías (tiene 4 veces número haploide del gameto. No se ha reportado en humanos).
2. Aneuploidías. Tiene 1 de más o le falta 1 al número diploide.
  - 2.1. Monosomías (tiene 45 cromosomas)
  - 2.2. Trisomías (tiene 47 cromosomas)
  - 2.3. Tetrasomías (tiene 48 cromosomas)
  - 2.4. Pentasomías (tiene 49 cromosomas)
  - 2.5. Lo máximo en humanos son las octasomías, ejemplo: 52, XXXXXYY en varones, y las sexasomías en mujeres: 50, XXXXXX.

Las Triploidías comprenden la Dispermia, la Diginia y la Diandria.

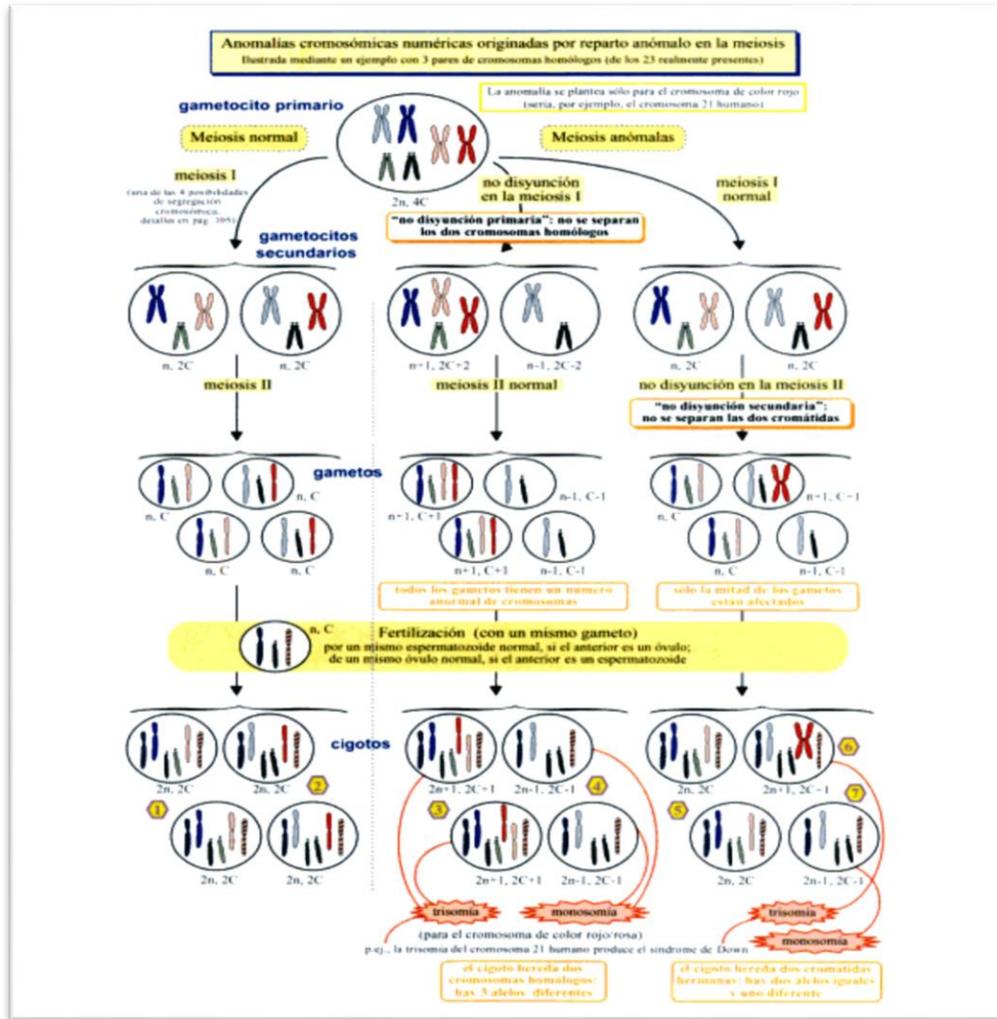


CARIOTIPO  
ORGANIZADO  
A PARTIR DE  
DOS  
NORMALES:

69,XXX

Triploidía 69 XXX. Marta Gonzales Vilanova

Las Aneuploidías más frecuentes en Medicina son: Trisomía 21, Monosomía X, Trisomía 13, Trisomía 18, Trisomía XXY (Síndrome de Klinefelter). El mecanismo de producción de las aneuploidias se debe a no disyunción de los pares cromosómicos durante la meiosis I o II cuando se producen los gametos. **A continuación, un diagrama con el mecanismo de no disyunción.**



Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética.  
 José Luche y Ángel Herráez. Editorial Elsevier. Página 404.

Con respecto a las **anomalías estructurales**, estas se dividen en: deleciones, duplicaciones, translocaciones recíprocas, translocaciones Robertsonianas, inversión paracéntrica, inversión pericéntrica, isocromosomas y cromosomas en anillos

**El cariotipo es el estudio del complemento cromosómico individual.** Puede organizarse con base en un solo núcleo o con base en varios. El número considerado normal en la especie humana es de 46 cromosomas. Como el proceso en el laboratorio se detiene en metafase antes de anafase, en realidad normalmente son 46 cromosomas dobles.



Si a un cromosoma le falta una banda o es más pequeña de lo normalmente aceptado, decimos que está **deletado**, y esto significa que hace falta un fragmento de ADN con genes potencialmente funcionales, pero también ese fragmento perdido puede no tener genes.

Si una banda de un cromosoma es más grande de lo normalmente aceptada, decimos que esta **duplicada**. Significa que los posibles genes del fragmento de ADN que conforma esa banda están duplicados o en doble dosis. Si se suma la banda del otro cromosoma homólogo, estarán triplicados. Decimos entonces, que hay una trisomía parcial. Normalmente funcionamos correctamente con 2 dosis. La triplicación de los genes generalmente produce patologías. Pero también es posible que la banda duplicada no contenga genes.

Si un cromosoma posee 2 patrones de bandeos que corresponden a 2 cromosomas diferentes, decimos que hay una **translocación**. Se conocen translocaciones recíprocas y simples (inserciones). En las recíprocas dos moléculas de ADN diferentes intercambian información; en las simples solo una recibe información y no devuelve. En este caso no se pierde ni se gana material genético. Simplemente el material genético se cambia de posición y los genes se siguen transcribiendo normalmente. El problema se presenta cuando en el sitio de la rotura del ADN que permite la translocación se secciona un gen funcional.

Un cromosoma puede tener una porción con el bandeo en posición inversa a lo normalmente aceptado. Decimos que tiene una **inversión**. Si compromete un solo brazo decimos que es **paracéntrica**, si compromete los dos se llama **pericéntrica**. En este caso tampoco hay alteración de genes. Funcionan perfectamente en G1. Pero habrá patologías si en los sitios de rotura se comprometen genes.

En resumen: la deleciones y las duplicaciones cromosómicas producen alteraciones si en la banda comprometida existen genes funcionales. Las translocaciones y las inversiones producen patologías si en el sitio de la rotura hay genes funcionales. Todas estas alteraciones no ocurren en el estado de cromosomas (estructura



supercondensada e impenetrable compuesta de ADN más proteínas), sino durante la meiosis y cuando son moléculas de ADN en las fases de G1 y S de la duplicación, donde para funcionar debe abrirse.

Como sólo el 10% del genoma contienen genes, la mayoría de las bandas no tienen genes. **Para el normal funcionamiento del humano es absolutamente necesario el genotipo funcional, no los 46 cromosomas.** Así que habrá personas con pérdida y ganancia de bandas, con translocaciones e inversiones cromosómicas que son normales. El concepto de **“alteración cromosómica balanceada”** se aplica en genética clínica para aquellas personas **normales** con alteraciones cromosómicas estructurales y de número.

### **¿Cómo puede expresarse una alteración cromosómica balanceada?**

En la meiosis las cromátides o cromatinas homólogas de origen paterno y materno deben unirse perfectamente para recombinar locus homólogos. Si uno de ellas tiene alterado el orden de sus locus, o le falta uno, ocurre un intercambio genético anormal conocido como “crossing over” desigual. Esto se traduce en gametos anormales y se expresa como infertilidad, como abortos o recién nacidos con malformaciones congénitas.

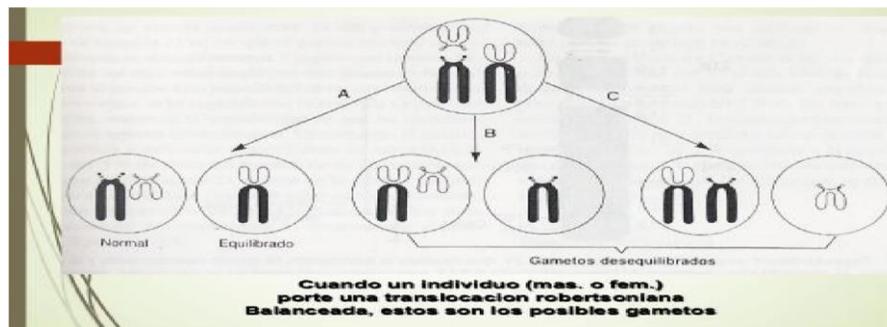
La alteración cromosómica balanceada más frecuente es la translocación Robertsoniana entre los cromosomas acrocéntricos (13,14, 15, 21 y 22), en la cual el individuo puede tener 45 ó 44 cromosomas y es fenotípicamente normal.

El individuo que porte una translocación Robertsoniana entre un acrocéntrico grande (13, 14, 15) y un acrocéntrico pequeño (21, 22) tiene en cada gestación una probabilidad de 3/6 de abortar, 1/6 de tener un hijo con patología y 2/6 de tener hijos normales, pero la mitad de estos portará la translocación que se transmitirá de generación en generación constituyendo una **alteración cromosómica constitucional**. En toda pareja con abortos es importante preguntar por historia de abortos en la familia.

Las inversiones paracéntricas más frecuentes como anomalías constitucionales, afectan a los cromosomas 3, 7 y 14. Algunas inversiones pericéntricas son muy frecuentes, y se llaman cromosomas variantes; por ejemplo, la inv(9)(p11q13)

encontrada en 1/400 individuos con una gran variación geográfica. Los individuos con inversiones pericéntricas tienen todos sus gametos anormales; son infértiles o todas sus fecundaciones se abortan. Los **cromosomas variantes** son alteraciones cromosómicas balanceadas frecuentes en determinadas poblaciones.

A continuación, un diagrama que muestra las posibilidades gaméticas en una persona normal con translocación Robertsoniana balanceada entre un acrocéntrico grande (13 o 14 o 15) y uno pequeño (21 o 22).



Genética médica de Thompson % Thompson. Edición 5.

## CONCEPTOS RELACIONADOS CON LA ELABORACION DEL CARIOTIPO

1. **Tipo de muestra:** cualquier tejido que tenga núcleo puede ser usado para realizar un cariotipo; los más utilizados son: sangre venosa, médula ósea, líquido amniótico y tejidos sólidos.

### 2. ¿Cómo se toma la muestra?

2.1. La muestra de sangre periférica se toma con jeringa normal heparinizada de 3 a 5 ml. La sangre debe permanecer en la jeringa fijando la aguja y el embolo con cinta adhesiva. Se cubre con papel aluminio para evitar que la luz solar (LUV) rompa el ADN y se deja media hora a temperatura de 20°C para estabilizar las mitosis. La muestra se conserva a 4°C hasta ser enviada



- al laboratorio. Se envía en una bolsa de plástico en caja de icopor con hielo normal o geles congelados. No colocar hielo seco.
- 2.2. La muestra de médula ósea es tomada por un hematólogo con las mismas precauciones descritas para sangre venosa, pero debe enviarse inmediatamente al laboratorio.
  - 2.3. El líquido amniótico es tomado por el ginecólogo a través de la punción de las bolsas amnióticas. Requiere la participación de un ecógrafo. Se realiza a las 17 semanas de gestación para poder tomar 20 ml sin repercusiones fetales. Se deja en la jeringa y se toman las mismas medidas descritas anteriormente. El envío al laboratorio debe ser lo más pronto posible.
  - 2.4. Se toman de 0.5 a 1 cc. Y se introduce en solución salina si se procesa en el mismo sitio. Si la entrega al laboratorio dura 24 horas se envía en medio de cultivo (MEM o RPMI). Si la entrega dura más de 24 horas, al medio de cultivo se le agrega suero fetal bovino (SFB). Se conserva a 4°C con geles. No debe congelarse ni utilizar formol.
- 3. Procedimiento para realizar el cariotipo de bandeó.** Se divide en siembra, procesamiento y análisis.
- 3.1. **Siembra:** depende del tejido.
    - 3.1.1. Para la **sangre periférica**, se agrega 25 gotas de sangre a un medio de cultivo enriquecido con SFB, más antibióticos y fitohemaglutinina. Se incuba a 37°C.
    - 3.1.2. La muestra de **médula ósea** se adiciona a un medio de cultivo con SFB. No se utiliza estimuladores de la mitosis y se incuba a 37°C.
    - 3.1.3. El **líquido amniótico** se pasa a un tubo seco estéril y se centrifuga. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado con medio de cultivo. Se siembra en una caja de Petri que contiene láminas portaobjetos y se incuba a 37°C.
    - 3.1.4. El tejido sólido se pasa a una caja de Petri con cultivo. Se fragmenta en pequeñísimos segmentos y se adiciona a un frasco de cultivo especial



con medio de cultivo y SFB. Se incuba a 37°C y se deja quieto por 4 días para garantizar el crecimiento. El medio de cultivo posee una tensión superficial de tal modo que mantiene adherido el tejido a la superficie basal del frasco de cultivo.

3.2. **Procesamiento.** Consiste en procesar las células obtenidas para obtener los cromosomas de las células que estén en metafase. En general la mayoría están en interfase.

3.2.1. **Sangre periférica:** a los tres días de cultivo se le agrega Colchicina y se deja actuar por 1 a 2 horas, posteriormente se pasa el cultivo a un tubo y se centrifuga, se descarta el sobrenadante y se agrega una solución hipotónica (KCl 0,075 M). Se centrifuga y se descarta sobrenadante. Se agrega solución Carnoy, luego se hacen varios lavados con solución Carnoy. Finalmente se gotea sobre láminas.

3.2.2. **Médula ósea:** si la impresión diagnóstica es leucemia linfóide se utilizan las mitosis a las 24, 48 y 72 horas. Si es leucemia mieloide se utilizan las mitosis a las 48 y 96 horas.

3.2.3. **Para líquido amniótico,** a los 3 días de cultivo se observa con el microscopio invertido directamente en la caja de Petri para buscar fibroblastos adheridos a las láminas. Se hacen recambios de medio de cultivo más SFB cada 3 días hasta obtener suficientes fibroblastos.

3.2.4. **Tejido sólido:** a los 4 días deben verse fibroblastos adheridos al piso del frasco de cultivo. Posteriormente se hacen recambios de cultivos cada 3 días hasta obtener suficientes fibroblastos.

3.3. **Análisis:** comprende la coloración, la búsqueda microscópica, la fotografía y la organización del cariotipo. La coloración depende de la técnica.



### **Cariotipo con alta resolución y sincronización:**

En este caso, la sincronización consiste en detener todas las células en cultivo en el intervalo G1/S utilizando metotrexate. Posteriormente todas reinician el proceso a partir de fase S utilizando Bromo deoxiuridina, de esta manera la gran mayoría de las células llegan al mismo tiempo a la metafase y son detenidas en esta etapa con la colchicina. De este modo se obtienen muchos núcleos para poder analizar de 25 a 50 metafases que es lo recomendado.

La alta resolución consiste en obtener cromosomas largos donde puedan distinguirse con mayor facilidad las bandas y poder identificarlos con mayor precisión. Este resultado se logra por la acción de la Bromo deoxiuridina.

En esta técnica también se utiliza el mismo medio MEM o RPMI, la fitohemaglutinina, la colchicina, la solución hipotónica, la solución Carnoy y el colorante Giemsa.

## **VII. ACTIVIDADES A DESARROLLAR POR LOS ESTUDIANTES:**

- I. **Trabajo en grupos:** organizar los siguientes cariotipos (entregado por el docente), con técnica de tinción homogénea y con técnica de bandeo.

## **VIII. TRABAJO EN GRUPOS**

Investigar las respuestas de las siguientes preguntas.

¿Qué es la fitohemaglutinina y cómo funciona en la elaboración del cariotipo?

1. ¿Qué es el colcemid o colchicina y cómo actúa en la elaboración del cariotipo?
2. ¿Cómo funciona la solución hipotónica?
3. ¿Cómo está compuesta la solución Carnoy y cuál es su función?
4. ¿Qué es el metotraxate? ¿Cuál es el mecanismo de acción y cómo funciona en la sincronización?



5. ¿Qué es la bromodeoxiuridina y cómo funciona en la técnica de alta resolución y sincronización?
6. ¿Cuál es la utilidad clínica del cariotipo en las diferentes muestras biológicas y qué tipos de células se obtienen de cada muestra?
7. ¿Por qué lo máximo en aneuploidías son las octasomías (varón XY) y las sexasomías (hembra XX)?
8. ¿Qué es un isocromosoma y cromosomas en anillo?
9. ¿Qué es la dispermia, la diginia y la diandria? ¿Cuál es la expresión clínica de cada una?
10. ¿Por qué en el cultivo de médula ósea varía el tiempo para el análisis de las mitosis? ¿Por qué no se usan mitógenos en la siembra?
11. ¿Qué características tienen los fibroblastos en los medios de cultivo?
12. ¿Qué parte del cromosoma tiñe el colorante Giemsa?
13. ¿Por qué los individuos con translocaciones Robertsonianas entre acrocéntricos (con excepción del Y) tienen 45 cromosomas y son normales?
14. ¿Cuántos cromosomas tiene el individuo que porte el isocromosoma 21q;21q? ¿Qué posibilidad tiene de tener hijos normales? Diga el porqué de la respuesta.
15. ¿Con base en el diagrama de no disyunción podría explicar el origen del cariotipo 49,XXXXY?

## **IX. BIBLIOGRAFÍA**

1. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA. Conceptos de Genética. 8 Edición. Pearson Educación S.A. : Madrid, 2006.
2. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Thompson & Thompson. Genética en Medicina. Edición 7. Elsevier Masson : Ámsterdam. 2008.



3. Camargo M, Cervenka J. Patterns of DNA replication of human chromosomes. ii. Replication map and replication model. *Am j hum genet.* 1982, Sep 34(5): 757–780.
4. Luche J, Herráez A. Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. 2012. Editorial Elsevier. Página 404.
5. Zentella Dehesa A, Grether González P, Lisker Yourkowsky R. Introducción a la genética Humana. Ed. 3. Editorial El manual moderno. 2013.



## PRÁCTICA N° 3

### IDENTIFICACIÓN DE LA CROMATINA X

#### I. INTRODUCCIÓN

La cromatina X es la heterocromatización de una de las moléculas de ADN que corresponde a los cromosomas X. Cuando la molécula se asocia a proteínas no puede funcionar, a esto también se conoce como la inactivación del X.

En 1949 M. Barr y E. Bertram observaron en la membrana interna del núcleo de una célula en interfase un corpúsculo condensado diferente al nucléolo, y notaron que las gatas normales poseían este corpúsculo mientras que los gatos no lo poseían. Estos investigadores lo nombraron como cromatina sexual, pero posteriormente se ha denominado corpúsculo de Barr. Investigaciones recientes con microscopios de alta resolución revelan que los extremos del corpúsculo de Barr están en estrecha proximidad formando un anillo.

Con los avances de la citogenética se fue demostrando que los varones XXY poseen un corpúsculo de Barr, las mujeres Turner (45,X) no tienen corpúsculo, las mujeres XXX tienen 2 corpúsculos, las mujeres 48XXXX tienen 3 corpúsculos y en general las personas con un número anormal de cromosomas X poseían un corpúsculo menos al número de cromosomas X, lo que sugirió la fórmula: **No de cromosomas X = No de corpúsculos Barr + 1.**

En 1966, Mary Lyon (inglesa) sugirió que el corpúsculo de Barr representaba un cromosoma X inactivo. La prueba directa de la hipótesis de Lyon se produjo cuando, en mujeres normales, los citólogos identificaron el corpúsculo de Barr como un cromosoma X inactivo. Pruebas genéticas también apoyaron la hipótesis de Lyon: las hembras heterocigóticas para un determinado locus del X muestran un patrón peculiar de expresión fenotípica. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) es una enzima cuyo gen ubicado en Xq28 presenta dos formas alélicas que codifican dos formas de enzimas (A y B) funcionales en forma independientes (codominancia), que difieren en



un aminoácido y, por lo tanto, se pueden separar por electroforesis. Un varón XY sólo tendría la forma A o B. La mujer XX heterocigota para este alelo tiene ambas formas en el plasma sanguíneo y se observan dos bandas en la electroforesis, pero el análisis realizado en segmentos de tejidos solo muestra la forma A o la B, indicando que un locus permanece inactivo en el tejido. La hipótesis de Lyon se ha demostrado con muchos loci ligados al X. Esto indica que en cada célula sólo se encuentra activo uno de los dos cromosomas X. Actualmente sabemos que en los seres humanos el cromosoma X que se inactiva en cada célula, se inicia alrededor del decimosegundo día de vida fetal, y parece que el azar determina qué cromosoma X debe inactivarse. A partir de este momento, el mismo cromosoma X se sigue inactivando en las células descendientes. Así que la hembra XX, a pesar de ser Heterocigota u homocigota para alelos del X, en realidad es hemicigota para muchos loci del cromosoma X.

### **Importancia Clínica**

Aunque en etapas muy tempranas del desarrollo ambos cromosomas X son activos, la inactivación del X se inicia cuando los blastómeros comienzan a diferenciarse hacia la etapa de blastocito. En cada célula del feto femenino XX se elige para la inactivación uno de los dos cromosomas X parentales: el  $X_m$  o el  $X_p$ , aunque se considera aleatoria, en la placenta humana se inactiva el X paterno. Una vez que una célula progenitora en el embrión temprano se comprometió a inactivar el cromosoma  $X_p$  o el  $X_m$ , todos los descendientes de la célula dentro del linaje celular resultante llevan el mismo patrón de inactivación de X que la célula progenitora. Esto significa que todos los mamíferos hembra son mosaicos por la mezcla de líneas celulares en las que se inactiva el X heredado del padre paterno y líneas celulares en las que se inactiva el X heredado de la madre. Un heterocigoto femenino XX para una enfermedad ligada a X (sea dominante o recesiva) es un mosaico. Cada célula expresará el alelo normal o el anormal, pero no ambos, por lo tanto, la expresión patológica dependerá del X que se inactiva. Cuando el fenotipo patológico depende de un producto circulante, como en la hemofilia, hay un efecto promedio entre las células que expresan el X con el alelo normal y las células que expresan el alelo anormal. Las mujeres portadoras tienen un



fenotipo intermedio y ocasionalmente manifiestan sintomatología clínica leve, pero son anormales desde el punto de vista bioquímico.

Cuando el fenotipo es una propiedad localizada en células individuales, como es el caso de la displasia ectodérmica hipohidróica (carencia de glándulas sudoríparas y presencia de dientes y pelo anormales), las mujeres portadoras muestran placas de tejido normal y anormal. En ocasiones se observan mujeres heterocigotas que manifiestan enfermedades recesivas ligadas al X, pudiendo estar afectadas de un modo grave debido a que casi todas las células de algunos tejidos críticos han inactivado el X normal.

En la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), enfermedad recesiva ligada al X, los varones están gravemente afectados y fallecen alrededor de los 15 años; las mujeres portadoras expresan debilidad muscular con el ejercicio leve, aumento de Creatinina Fosfato Kinasa (CPK) y cardiopatías.

Actualmente para la herencia de los genes asociados al X sólo existen dos reglas, no importa que el fenotipo sea dominante o recesivo:

1. En el varón XY la expresión del fenotipo siempre es dominante por ser hemicigoto obligado.

2. En la hembra XX la expresión del fenotipo depende de la inactivación del cromosoma X.

Es importante mencionar que la inactivación del X se invierte únicamente en la línea germinal, cuando se inicia la ovogénesis. Así que el cromosoma  $X_m$  se hereda activado. El  $X_p$  siempre está activo.

También es importante mencionar que el corpúsculo de Barr se utiliza para determinar el número de cromosomas X que tiene una célula y/o tejido. No determina el complemento cromosómico ni el género (sexo) de la persona, así que su nombre correcto es *cromatina X*.



### **¿Qué es el fenómeno de compensación de dosis?**

El cromosoma X tiene unos 1000 genes y el cromosoma Y tiene 7 regiones que contienen genes que no son esenciales para la vida, pero posee las regiones SRY y AZF que son importantes para el desarrollo del varón. Las hembras tienen el doble de copias de los genes ligados al X y expresarían el doble de los transcritos de estos genes si no existiera un mecanismo que realice un equilibrio con los transcritos del varón. A pesar de la diferencia en el número de genes las células femeninas y masculinas tienen cantidades equivalentes de las proteínas codificadas por genes del cromosoma X. **Esto se conoce como compensación de dosis y es el resultado de la inactivación de un cromosoma X en las hembras XX.**

El fenómeno de compensación de dosis supera las diferencias de género con respecto a la relación esperada de la dosis de genes autosómicos con la dosis de genes del cromosoma X. Esta relación de dosis es muy importante ya que los productos de los genes ligados al X deben interactuar con los productos de los genes autosómicos en las diferentes vías metabólicas y del desarrollo, y la cantidad de las dosis es esencial para la regulación homeostática.

La inactivación del cromosoma X es el mecanismo que utilizan los mamíferos humanos para regular las dosis de los genes que se localizan en el cromosoma X; hay especies que utilizan mecanismos diferentes.

### **¿Cómo se inactiva el cromosoma X?**

A partir de 1990 empezó a descubrirse el mecanismo de inactivación del X. Un gen llamado XIST, que se ubica en el locus Xq13.2, que también se conoce como XIC (centro de inactivación del X) transcribe un RNA Xist (transcrito específico del X inactivo) que no codifica proteínas, pero que inicia la inactivación de la molécula de ADN que lo transcribe.



En el proceso de inactivación y en el mantenimiento del mismo participan mecanismos moleculares precisos. El RNA Xist forma moléculas bicatenarias entre si y desencadena el reclutamiento de un complejo proteico que induce la metilación de los residuos lisina-27 y lisina-9 de la histona H3, generando la condensación del ADN y la formación de la cromatina X. Este proceso requiere además de la desacetilación de la histona H4 y la activación de la H2A. Múltiples copias del RNA Xist bicatenario se expanden a través de la molécula de ADN para unirse a las histonas H3 y H2A. Para que el gen XIST se transcriba es necesaria la presencia de por lo menos dos moléculas de ADN o los 2 locus. En todos los individuos con un número de cromosomas X mayor de 1, como 46 XX, 47 XXX y 47 XXY, etc. todos los cromosomas X con excepción de uno, realizan el proceso de inactivación.

En los individuos triploides (69, XXX) se observan uno o dos cromosomas X activos, mientras que en tetraploides (92, XXXX) permanecen activos dos. Esto significa que un cromosoma X debe estar activo por cada dos grupos de autosomas. El gen XIST es esencial para iniciar la inactivación del cromosoma X, y se observa mayor expresión cuanto mayor es el número de cromosomas X.

### Expresión del gen XIST

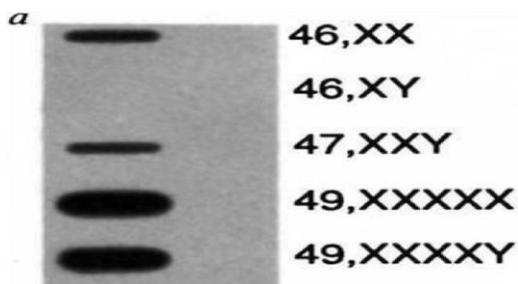


Imagen de Silvia Baquedano y  
Alejandro Usón.  
[www.unizar.es/lagenbio/docencia/apuntesfundamentos/cromosomaX.pdf](http://www.unizar.es/lagenbio/docencia/apuntesfundamentos/cromosomaX.pdf)



La flecha muestra un corpúsculo de Barr.

Foto del laboratorio de la CURN. Dr. Enio Hernández A.

Si en las mujeres XX se inactiva un cromosoma X, entonces funcionalmente tendrían un solo X. El 60% de las mujeres con síndrome de Turner tienen el cariotipo 45, X, o sea, un solo X. ¿Entonces, si debe inactivarse un cromosoma X, por qué se produce esta patología en la mujer 45, X?

Un análisis detallado de la expresión de genes ligados al X inactivo, ha demostrado que al menos el 15% escapan a la inactivación y se expresan tanto en el cromosoma X activo como en el inactivo. Además, hay otro 10% que muestra una inactivación X variable; es decir, escapan a la inactivación en algunos individuos del sexo femenino, pero no en todos. Por lo tanto, las mujeres son mosaicos con respecto a los genes del X, y la mayoría de estos genes funcionan en estado haploide como sucede en el varón.

Los genes que permanecen activos en el X inactivo contribuyen a la expresión fenotípica sexual, a la variabilidad fenotípica entre las mujeres heterocigotas para condiciones ligadas al desarrollo sexual, y a la variedad de expresión clínica en pacientes con alteraciones en genes del cromosoma X. Para el desarrollo de los ovarios y el desarrollo de las características sexuales secundarias se necesitan los dos genes implicados en forma activa en ambos ADN. Ejemplo, para el desarrollo de los ovarios se requieren los dos locus del gen DAX-1 y WNT-4.

El siguiente cuadro muestra genes que deben permanecer activos en ambos ADN del cromosoma X, y lo que producen si están en forma hemicigota.



<b>GEN</b>	<b>LOCUS</b>	<b>FENOTIPO</b>
SHOX	Xp22.33	Talla baja
ZFX	Xp11.2-22.1	Anomalías esqueléticas.
ZFX, USP9X	Xp11.2-22.1	Fallo ovárico
DIAPH2	Xq13-26	
USP9X	Xp11.2-22.1	Paladar ojival Tiroiditis autoinmune
RPS4X	Xcen-q13.2	Pobre viabilidad intrauterina

## **II. DESARROLLO DE LA PRÁCTICA**

(OBTENCIÓN DEL CORPUSCULO DE BARR).

## **III. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Observar la cromatina X en células de la mucosa bucal humanas.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Conocer la importancia de la inactivación de la cromatina X.
- Observar la cromatina X.
- Calcular los corpúsculos de BAAR en los individuos evaluados.

## **IV. MATERIALES**

- Espátula metálica o de madera con extremo redondeado.
- Solución fijadora: 3 partes de etanol al 95% + 1 parte de ácido acético glacial.
- Cubetas de coloración.
- Colorante Aceto-orceína.



- Papel filtro.
- Láminas y laminillas.
- Gasa.
- Guantes y tapaboca.

## **V. PROCEDIMIENTO**

1. Limpie la mucosa de la cavidad oral con un pedazo de gasa. El paciente debe mantener la boca abierta y disponer la lengua en el lado opuesto al que va a ser frotado.
2. Para el frotis de la mucosa se utiliza la espátula. Este debe hacerse con presión moderada, asegurándose de obtener una capa de material blanquecino.
3. El material de la espátula se extiende delgada y suavemente sobre una lámina y ésta se sumerge inmediatamente en la solución fijadora. Pueden obtenerse tres láminas de cada lado de la boca.
4. Las láminas pueden permanecer en el fijador entre un minuto y una semana.
5. Las láminas se colocan en una cubeta de coloración y el colorante acetorceína se aplica por 10 minutos.
6. Se dispone una laminilla sobre la lámina y el colorante en exceso se remueve aplicando papel de filtro y ejerciendo firme presión.
7. Observe inmediatamente con el objetivo de menor aumento, para buscar áreas donde las células estén bien extendidas.
8. Observe con el objetivo de mayor aumento (o inmersión) e identifique las estructuras ligeramente alargadas o plano-convexas adyacentes a la membrana nuclear, de coloración oscura en comparación con el resto del núcleo. Nota: el corpúsculo de Barr solo se forma en G1.



## VI. PREGUNTAS PARA RESOLVER

1. Consulta qué tres técnicas están relacionadas con la cromatina X.
2. Investiga sobre **las aplicaciones actuales** de la cromatina X en medicina.
3. Investiga dónde se localizan las regiones SRY y AZF y qué funciones tienen los genes asociados.
4. ¿Cuál es la verdadera etiología génica del síndrome de Turner 45, X?
5. Hay una pregunta que realizan los pediatras a los estudiantes en clínica. ¿Por qué fallecen más niños que niñas ante un mismo proceso infeccioso, a pesar que reciben el mismo tratamiento y los mismos cuidados? ¿Podría usted explicar la razón?
6. ¿Por qué el corpúsculo de Barr se forma sólo en G1?

## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC, Carroll SB. Introducción a la genética. 9a edición. Mc Graw-Hill: Medellín. 2008
2. Strachan T, Read AP. Genética molecular humana. Edición 7. Editorial: Omega, España. 1999
3. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J. Biología Celular Molecular, Edición 13. Ed. W.H.Freeman & Co Ltd. 2003
4. Cooper GM, Hausman RE. The Cell. 3 Edición. Editorial Prensa ASM. 2004
5. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson. Genética en Medicina. Edición 7. Elsevier Masson: Ámsterdam. 2008
6. Daher N. V, Be R. C, Youlton R. R. Cromatina de Barr: análisis de su valor actual. Rev. Chil. Pediatr.1986, 57(6): 506-509.



## PRÁCTICA N° 4

### ANÁLISIS DE LAS LEYES DE LA HERENCIA MONOGENICA CON BASE EN ARBOLES GENEALÓGICOS

#### I. INTRODUCCIÓN

**Un árbol genealógico** es una representación gráfica que organiza los antepasados y los descendientes de un individuo en forma estructural con orientación vertical, o en forma de árbol. Dependiendo de la finalidad del árbol genealógico, éste puede referirse sólo a la filiación y sucesión masculina, llamada también linaje de sangre, o a la filiación y sucesión femenina, llamada también linaje de ombligo. También se utiliza para mostrar el pedigrí o ascendencia de un animal para investigar la pureza de la raza, representar la evolución de una lengua o idioma, seguir la trayectoria de un partido político o una disciplina artística. **En genética médica se utiliza para analizar la trayectoria de la expresión de determinados fenotipos relacionados con enfermedades.**

**Herencia monogénica** se refiere a la expresión fenotípica que origina un solo gen, que fue heredado del padre o la madre sin modificaciones.

Todas las personas heredamos 23 moléculas de ADN de cada progenitor, pero esto no significa que deben ser idénticas en secuencia. El ADN tiene tres funciones básicas: la duplicación (fase S), la transcripción del gen (especialmente en G1) y la mutación. La mutación es la base de la evolución para la adaptación de los seres vivos a los cambios de la naturaleza, y esto ocurre principalmente en forma espontánea durante la duplicación del ADN. Una adenina puede complementarse con timina o la guanina dependiendo de su forma ceto o enol, y si el organismo con esta mutación se adapta al medio ambiente entonces se establece en la población, constituyendo los polimorfismos de un simple nucleótido (SNP) característicos de muchos genes. **Los cambios en determinados SNP modifican la expresión fenotípica. Podemos**



**heredar un determinado gen de un progenitor, pero esto no quiere decir que funcionará de la misma manera.**

El genoma que heredamos proviene del espermatozoide y del óvulo, y estos de células que conforman la línea germinal. Las primeras células germinales se originan en la entrada del alantoides (saco vitelino; capa endodérmica) en la tercera semana de gestación, posteriormente cuando el saco vitelino se introduce en el embrión (plegamiento) para formar el tubo intestinal, las células germinales llegan a las gónadas indiferenciadas; si estas se transforman en testículos las células germinales se diferencian en gonocitos primordiales, pero si las gónadas inician la formación de ovarios, en la semana 12 las células germinales se diferencian en oogonios. Desde célula germinal hasta espermatozocito primario hay 35 ciclos mitóticos y desde célula germinal hasta ovocito primario hay 25 ciclos de mitosis. Esto significa *que antes de iniciar la espermatogénesis y la ovogénesis muchos genes han mutado y también habrá genes que han revertido la mutación.* **Esto quiere decir que una enfermedad de etiología génica puede empezar en cualquier generación y puede terminar en cualquier generación.** Un individuo puede tener un gen normal en su línea somática sin tener expresión fenotípica anormal y mutarlo durante la gametogénesis generando un hijo con expresión fenotípica anormal. La mutación que origina una expresión anormal también puede ser adquirida durante el desarrollo embriológico y fetal del individuo afectado.

Una manera de saber si un gen dañado fue heredado desde la línea somática o adquirida: amplificar el gen y secuenciarlo en el hijo afectado y en los progenitores. La presencia del gen mutado en uno de los progenitores significa que fue heredado; en caso contrario, la mutación fue adquirida durante la gametogénesis de uno de los progenitores o durante el desarrollo embriológico del hijo afectado. Si fue durante la gametogénesis, la persona afectada tendrá todos los tejidos con la mutación; si fue durante el desarrollo embriológico, se comportará clínicamente como un mosaico. **Las mutaciones adquiridas se conocen como nuevas mutaciones o *de novo*.**



Antes del surgimiento de la biología molecular y de las técnicas para la identificación y tipificación de genes, el árbol genealógico tenía una gran importancia para tratar de entender el comportamiento de los genes en familias. Actualmente no es útil para estos fines, sin embargo, lo empleamos para representar el comportamiento de alelos relacionados con un fenotipo en familias y en poblaciones. Los conceptos de *Dominante* y *Recesivo* fueron utilizados por Gregorio Mendel para el comportamiento de las características y no de los factores; posteriormente las características se homologaron al fenotipo y los factores con los genes. En la década de 1950, se consideró que un gen determinaba un fenotipo y los conceptos de dominante y recesivo se extrapolaron al gen. Actualmente sabemos que un gen puede codificar diferentes proteínas y expresar diferentes fenotipos, por lo tanto, **los conceptos de dominante y recesivo sólo deben aplicarse al fenotipo.**

Un gen está formado por segmentos llamados exones e intrones. La proteína se codifica a partir de los exones. Un exón o varios exones determinan segmentos de la proteína para una equis función, lo que significa que una proteína puede estar implicada en diferentes funciones y contribuir a la expresión de varios fenotipos. Se llama **Dominio** a la parte de una proteína implicada en una función, y se llama **gen pleiotrópico** al implicado en la expresión de varios fenotipos. Lo anterior también nos explica que un fenotipo puede ser el resultado de la interacción de varias proteínas diferentes, lo que se interpreta como la acción de varios genes para un fenotipo; este modelo se conoce como **heterogeneidad**.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVOS GENERAL**

Análisis de las leyes de la herencia monogénica con base en árboles genealógicos.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Reconocer el tipo de herencia que se presentan y su comportamiento en las diferentes patologías.

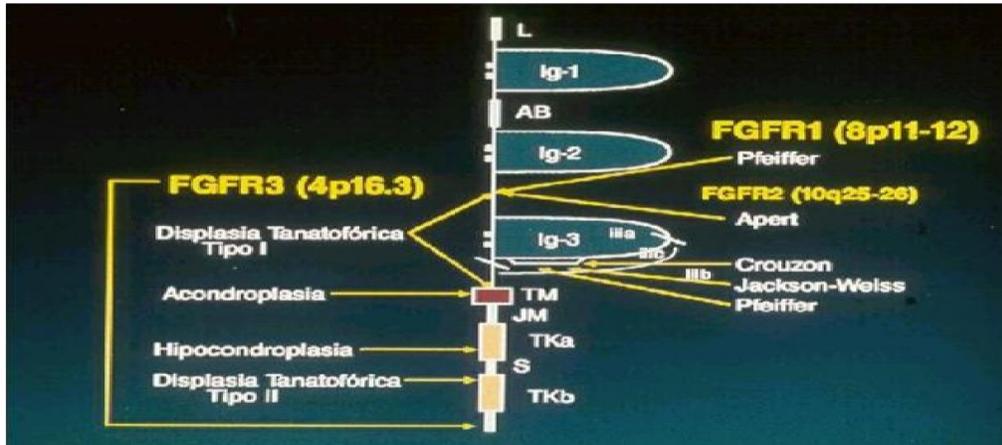


- Reconocer el comportamiento de la herencia de tipo recesivo.
- Identificar cada una de las normas para reconocer los tipos de herencia.

## II. FUNDAMENTO

Cuando se analiza un árbol genealógico como herencia dominante o recesiva nos estamos refiriendo al fenotipo que expresa la enfermedad, y realmente son raros los fenotipos morfológicos de origen monogénica, es diferente el fenotipo bioquímico como, por ejemplo, una enzima. Los trastornos monogénicos se caracterizan por sus patrones de transmisión en familias, pero no existe una diferencia absoluta entre el árbol genealógico considerado como dominante y el árbol genealógico considerado como recesivo, ni la relación entre el fenotipo y la acción del gen es directa. El fenotipo depende más de la interacción entre dominios proteicos. Aunque la Acondroplasia se considera de expresión dominante, el 80% de los árboles genealógicos tienen características de expresión recesiva porque la mayoría de las mutaciones son nuevas y ocurren en la línea germinal.

A continuación, una figura que representa los factores de crecimiento de fibroblastos 1, 2 y 3, que son proteínas codificadas por tres genes diferentes cuyos locus también se muestra en la figura. La Acondroplasia es un enanismo frecuente que aparece en los libros como de herencia autosómica dominante. El gen FGFR-3 se localiza en 4p16.3 y codifica al receptor de su nombre que tiene tres dominios extracelulares, un dominio de transmembrana y dos dominios intracelulares (ver figura). Si la mutación ocurre en el exón del gen que codifica la región de transmembrana se origina el fenotipo Acondroplasia, si la mutación ocurre en el exón que codifica el dominio TKa intracelular origina la Hipocondroplasia, otros fenotipos como la displasia tanafórica I y II surgen por mutaciones en otros exones del mismo gen. Los FGFR 1,2 y 3 interaccionan con aproximadamente 20 factores de crecimiento necesarios para diferentes fenotipos normales del sistema osteomuscular.



Estructura de los receptores de los factores de crecimiento óseo 1, 2 y 3. Se observan las diferentes patologías que surgen por diferentes mutaciones en diferentes exones que comprometen la función en diferentes dominios.

**Conceptos de Homocigoto y Heterocigoto:** cuando los 2 genes de un loci son iguales se considera que son homocigotos. Cuando son diferentes son heterocigotos. Para saber si los genes son iguales hay que secuenciarlos. Un heterocigoto puede tener el gen considerado normal y el otro estar mutado, o los dos genes pueden estar mutados.

**El genotipo** es la constitución genética de un individuo. Se puede aplicar a todos los loci en forma colectiva o a un solo locus. Los genotipos que se tratan en los árboles genealógicos se refieren a un solo locus. **El fenotipo** es la expresión del genotipo que puede ser morfológico (visible) o bioquímico o molecular.

En el árbol genealógico se tratan los fenotipos morfológicos, y lo que es dominante y recesivo es el fenotipo. Por lo tanto, los alelos no deben representarse con letras mayúscula y minúscula, sino con ambas letras en mayúsculas o en minúsculas o con otros símbolos tratando de identificar uno de los alelos mutados, porque cuando se realiza un árbol genealógico en medicina es porque hay una enfermedad y genes mutados. Ejemplo: A y A', a y a', | y |°, etc. Thompson & Thompson en la página 53 de la cuarta edición dicen: "Si se es estricto, debe aclararse que es el fenotipo, y no el



alelo, el que resulta dominante o recesivo. Sin embargo, los genes se clasifican como dominantes o recesivos sobre la base de su expresión fenotípica, y los términos “gen dominante” y “gen recesivo” son utilizados ampliamente, aunque de manera imprecisa. La distinción entre herencia dominante y recesiva no es absoluta; por el contrario, constituye una designación arbitraria que se basa en fenotipos clínicos que pueden no tener significación a nivel de acción génica”.

Para mayor información de los conceptos a entender, leer capítulos: *Patrones de herencia monogénica* de Thompson & Thompson, 4ta edición, y *Patrones de herencia humana* de Solari, 3ª edición.

Otros conceptos a considerar: los varones 46, XY son **hemicigotos** para los alelos sobre el X. Las hembras 46, XX pueden ser homocigotas o heterocigotas, pero para muchos alelos se comportan como hemicigotas por la inactivación del X. **La Penetrancia** se refiere a la intensidad de expresión fenotípica de un gen, que puede ser desde 0% al 100%. Hay diversas causas de una baja o nula penetrancia como la impronta genómica, la necesidad de interacción con otras proteínas para la expresión fenotípica (heterogeneidad). **La expresividad** es el grado de expresión del fenotipo, que puede depender de las interacciones proteicas y del medio ambiente y la genética del individuo. El **concepto de mutación en genética médica**, se utiliza con 2 sentidos: como un nuevo cambio génico no observado previamente en miembros de la familia (de novo) y en otras ocasiones indica un alelo anormal.

Para el análisis de las herencias monogénica con base en el árbol genealógico se tienen en cuenta tres factores:

1. El locus génico que puede estar en un autosoma (**autosómico**) o en un cromosoma X (**ligado al X**).
2. La clase de fenotipo, que puede ser **dominante**, que se expresa cuando solo un alelo del par del loci está mutado. O puede ser **recesivo**, cuando ambos alelos del loci están mutados.
3. Se aplican normas para su análisis con ayuda del cuadro de Punnett.



**Normas a considerar para una herencia autosómica dominante (HAD).**

1. El fenotipo se expresa en igual proporción en ambos géneros.
2. Generalmente en cada generación hay afectados.
3. Solo se necesita un alelo afectado para expresarse.
4. Generalmente los que tienen los dos alelos mutados fallecen de forma temprana.

**Normas a considerar para una herencia autosómica recesiva (HAR).**

1. El fenotipo se expresa en ambos géneros.
2. Se requiere que los dos alelos del loci estén mutados para expresarse.
3. Hay pocas generaciones afectadas.
4. Generalmente surgen de uniones consanguíneas.
5. Generalmente la mutación es frecuente en la población. Un ejemplo clásico son la Fibrosis Quística en blancos y mestizos, y la anemia de células falciformes en negros.

**Normas para las herencias ligadas al X**

En el varón XY por ser hemicigota obligado siempre es dominante.

1. En la mujer XX la expresión fenotípica depende de la inactivación del cromosoma X en los tejidos implicados en la patología.

**Expongamos un ejemplo con base en el cuadro de Punnett:**

♀♂		



Analicemos el anterior cuadro.

La línea vertical azul representa el cromosoma con el alelo normal y la línea roja el cromosoma con el alelo dañado. Esto es convencional y hay que aclararlo en el análisis, porque puede ser a lo inverso. El número del cromosoma depende de la patología, por ejemplo, si el cuadro corresponde a la Acondroplasia, entonces la línea representa al cromosoma 4 y el gen FGFR3 estaría en el locus 4p16.3; si el cuadro corresponde a la Fibrosis Quística la línea representa al cromosoma 7 y el gen CFTR estaría en el locus 7q31.2. En este caso la línea roja representa al cromosoma 4 que tiene la mutación en el FGFR3.

**El cuadro anterior con base en la HAD se explica así:**

1. Ambos progenitores están afectados (expresan el fenotipo patológico).
2. En cada gestación o embarazo existe **la probabilidad** de un 25% de tener hijos normales y un 75% de tener hijos afectados. Dependiendo de la patología el hijo afectado con dos alelos dañados puede fallecer o nacer muerto (mortinato).

**El mismo cuadro anterior con base en la HAR se explica así:** Ambos progenitores están sanos (no expresan el fenotipo). Nota: la única manera de saber si portan un alelo dañado es realizar el estudio del gen o que tengan hijos afectados.

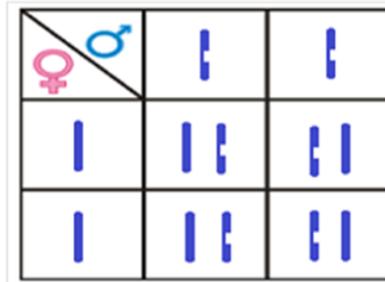
1. En cada gestación existe **la probabilidad** del 25% de tener hijos afectados y un 75% de tener hijos sanos. Los 2/3 de los sanos portaran el alelo dañado.

Lo anterior no significa que la descendencia debe ser siempre así, en la vida real todos los hijos pueden ser sanos o pueden estar afectados.

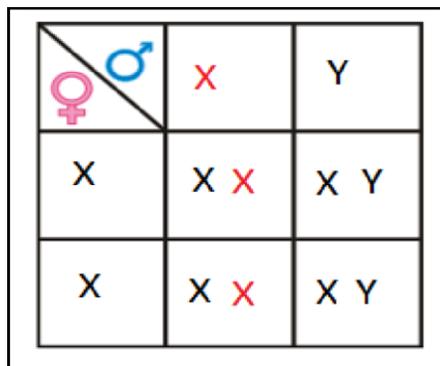
**III. ACTIVIDADES A REALIZAR EN LA PRÁCTICA.**

1. Investigar qué es la impronta genómica y qué es la herencia mitocondrial.

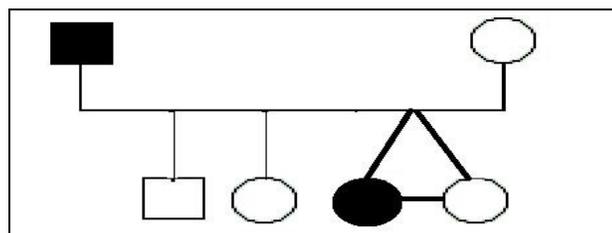
1. En el siguiente cuadro de Punnett, la línea vertical con el defecto indica un cromosoma con un alelo dañado. **Realice el análisis con base en la HAD Y HAR.**



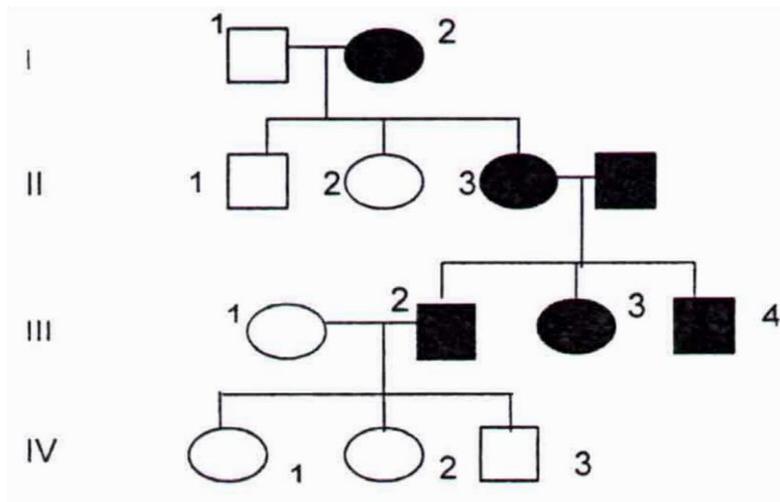
2. El cuadro de Punnett que sigue muestra un modelo de enfermedad cuyo gen se ubica en el cromosoma X. El gen del daltonismo se ubica en Xq28. El cuadro muestra el X con el gen afectado en rojo, por lo tanto, el padre padece la enfermedad, todos los hijos serán normales y las hijas serán portadoras del alelo dañado.



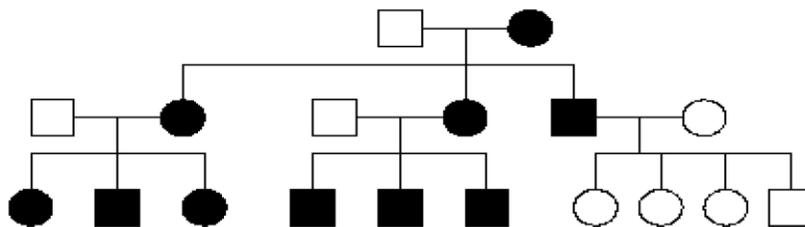
Sin embargo, el árbol genealógico siguiente (tomado de Thompson & Thompson) nos muestra algo diferente. En este árbol genealógico se observa que una de las gemelas monocigotas está afectada de Daltonismo. **¿Qué pudo haber ocurrido?**

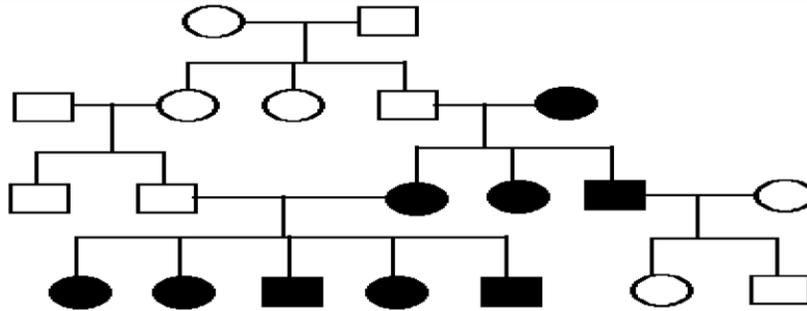


5. Realice el análisis del siguiente árbol genealógico teniendo en cuenta las normas de las herencias estudiadas y los conceptos estudiados como: nuevas mutaciones, reversión de mutación en la gametogénesis, pleiotropía, penetrancia. Para el análisis debe utilizar los cuadros de Punnett para justificar con más claridad los resultados.



Analice el anterior árbol con base en la HAR y HAD y justifique la más probable.





6. ¿Qué tipo de herencia corresponde a los 2 anteriores árboles genealógicos?

### I. BIBLIOGRAFÍA

1. Strachan T, Read AP. Genética molecular humana. Edición 7. Editorial Omega: España. 1999
2. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J. Biología celular molecular. Edición 13. W.H.Freeman & Co Ltd. 2003
3. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson. Genética en Medicina. Edición 7. Elsevier Masson: Ámsterdam. 2008



## **PRÁCTICA N° 5 PRUEBA DE MICRONÚCLEOS**

### **I. INTRODUCCIÓN**

Las células están constituidas por biomoléculas con propiedades físicas, químicas y/o biológicas que cumplen acciones específicas en cualquier ser vivo. Sin embargo, las exposiciones a diferentes sustancias presentes en el medio pueden modificar estas propiedades y la naturaleza de las biomoléculas, incluso conllevando a una muerte celular. Tal exposición puede ser inadvertida, accidental e incluso inevitable. La mayoría de estas sustancias tienen la capacidad de generar toxicidad al provocar reacciones biológicas que alteran el metabolismo activo celular, generando modificaciones morfológicas y funcionales. Una de estas modificaciones son variaciones no específicas dentro del ADN que pueden producir carcinogenicidad o teratogenicidad; dichos eventos se traducen en enfermedades y como consecuencia se puede presentar la muerte del organismo.

Una de las principales causas para el aumento de estas sustancias tóxicas es la contaminación, proceso consecuente al desarrollo tecnológico y social de la población, principalmente en zonas urbanas. Sustancias como nitratos, benceno, SDS, entre otros, pueden provocar cambios drásticos en el ADN, resultando en la pérdida parcial o completa de material genético, con lo cual se forman los micronúcleos (MN).

#### **Micronúcleo**

Los MN son fragmentos o cromosomas completos que quedan fuera del núcleo después de la división celular. Esta alteración se da en la anafase, cuando cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse al núcleo, pues carece de la orientación del huso acromático hacia los polos. Estos elementos rezagados quedan integrados en el citoplasma de las células hijas y son más pequeños que el núcleo principal y de ahí el nombre de MN (Fig. 1).

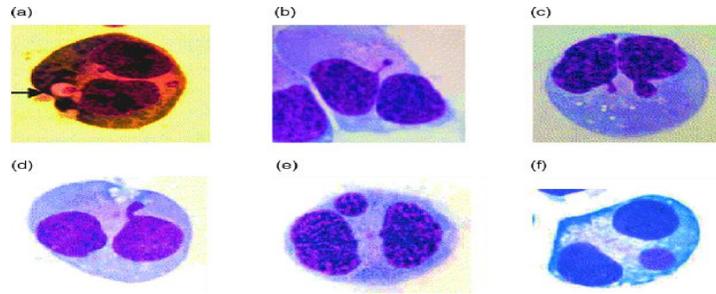


Figura 1. Formación de micronúcleos en linfocitos. Cerqueira. E., et al. Genotoxic effects of X-rays on keratinized mucosa cells during panoramic dental radiography. Dentomaxillofac Rad.2018

## II. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Detectar de forma sencilla, económica y contundente, la presencia de micronúcleos en muestra de células bucales humanas y en sangre de ratón.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conocer la importancia y la ventaja de aplicar la prueba de micronúcleos, para detectar contaminantes en el medio ambiente por medio de bioindicadores in vivo.
- Aprender a manejar adecuadamente los reactivos biológicos y así como obtener las muestras o tejidos de interés.

## III. FUNDAMENTO DE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS

Los micronúcleos sirven para detectar el efecto de agentes clastógenos (que induce interrupción o ruptura en los cromosomas) o aneuploidógenos (que dañan el huso mitótico imposibilitando la migración a los polos). Ambos efectos se pueden diferenciar por el tamaño de los MN o por la presencia o ausencia de centrómero. Esta prueba se realiza en tejidos de proliferación



celular continua, tales como: médula ósea, hepatocitos, mucosa oral, queratinocitos, eritrocitos y leucocitos de sangre periférica, células germinales y de vagina. Estas modificaciones pueden transmitirse de generación a otra a través de las células germinales, por lo que es tan importante su detección a tiempo.

#### **IV. MATERIAL Y REACTIVOS**

- 1 ratón adulto.
- Mucosa bucal.
- Dos cajas de vidrio con tapa para tinción con canastilla para 50 laminillas.
- Portaobjetos.
- Unas tijeras de relojero.
- Guantes desechables
- Alcohol absoluto.
- Colorante Giemsa.
- Colorante de Wright.
- Aceite de inmersión.

#### **V. PROCEDIMIENTO**

**Paso 1:** marcaje e identificación de los portaobjetos.

Los portaobjetos serán marcados por estudiante, la cual será proporcionada por el profesor titular de la práctica para cada alumno.

**Paso 2:** se limpiará el portaobjeto con un desengrasante y se evitará colocar el dedo en la superficie.

**Paso 3:** toma de sangre periférica

La muestra de sangre se obtendrá a partir de la vena caudal del ratón, específicamente de la punta de la cola para evitar traumatismo. Se utilizará una gota de sangre por dos extendidos.

**Pasó 4:** preparación de las muestras de sangre periférica y tinción:



Una vez corridas las muestras de sangre sobre los portaobjetos, se dejan secar al aire libre y se fijan en alcohol absoluto por 10 minutos, se retiran del alcohol y se ponen nuevamente a secar. Una vez secas se realiza la tinción con Giemsa durante aprox. 15 minutos, posteriormente se lava y se coloca en una caja con la tinción de Wright entre 10 a 15 minutos. Se retira el exceso de colorante y se lava en agua destilada. Se deja secar al aire libre. Las muestras se observarán en microscopio óptico a 100X.

**Paso 5:** lectura de la muestra

Para evaluar el daño genotóxico se analizarán los eritrocitos micronucleados en un total de 500 eritrocitos observados (preferiblemente eritrocitos jóvenes).

Para evaluar daño citotóxico se evalúa la presencia de eritrocitos micronucleados en un total de 100 eritrocitos observados.

## **VI. BIBLIOGRAFÍA.**

1. Antonio EL, do Nascimento AJ, Soares de Lima AA, Soares Leonart MS, Fernandes A. Genotoxicidade e citotoxicidade dos raios x em crianças submetidas à radiografia panorâmica. Rev. paul. pediatr. [Internet]. 2017 Sept; 35(3): 296-301. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-05822017000300296&lng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-05822017000300296&lng=pt).
2. Garcia Rodriguez MC, García Cardenas GP, Montaña Rodriguez AR, Altamirano Rosano MA. Efecto genotóxico y citotóxico de la exposición a metales pesados (cromo [VI] y talio [I]) en ratones de la cepa CD-1: micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular. Acta Universitaria. 2014; 24 (Extra 2), 91-96. Disponible en: <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/1863>.
3. Mahmoodi M, Soleyman-Jahi S, Zendejdel K, Mozdarani H, Azimi C, Farzanfar F, Safari Z, Mohagheghi MA, Khaleghian M, Divsalar K, Asgari E, Rezaei N. Chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges, and micronuclei in lymphocytes of oncology department personnel handling anti-neoplastic drugs.



Drug Chem Toxicol. 2017 Apr; 40(2):235-240. doi:  
10.1080/01480545.2016.1209678. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27461518.

4. Atlı Şekeroğlu Z, Güneş B, Konaş Yedier S, Şekeroğlu V, Aydın B. Effects of tartrazine on proliferation and genetic damage in human lymphocytes. Toxicol Mech Methods. 2017 Jun;27(5):370-375. doi: 10.1080/15376516.2017.1296051. Epub 2017 Mar 7. PMID: 28264634.



## **PRÁCTICA N° 6**

### **GENÉTICA DE GRUPOS SANGUINEOS**

#### **I. INTRODUCCIÓN**

Los grupos sanguíneos son receptores de membrana en los glóbulos rojos cuya función básica es de transporte, por ejemplo, transportar oxígeno y dióxido de carbono. Como los eritrocitos no tienen núcleo ni ADN, estos receptores no funcionan como transductores de la señal.

La mayoría de estos receptores son péptidos y algunos son carbohidratos. Cuando se utilizan como xenoantígenos y aloantígenos pueden inducir la producción de anticuerpos, por esto también se les llama antígenos de glóbulos rojos, pero no todos son inmunógenos.

Determinados grupos de estos receptores proteicos están codificados por varios alelos, y por eso también se llaman sistema de grupos sanguíneos. Un sistema genético se define como un grupo de genes que codifican proteínas relacionadas en una función.

#### **BREVE HISTORIA**

En 1875, Landois reportó la aglutinación y hemólisis entre eritrocitos de diferentes especies. En 1900 Erlich y Morgenroth reportó la aglutinación y hemólisis entre glóbulos rojos de animales de la misma especie. En el mismo 1900 Karl Landsteiner describió los fenotipos A, B y O. Decastello en 1902 describió el fenotipo AB. En 1927 K. Landsteiner y Wiener descubrieron los sistemas MN y P, que tienen mayor importancia en genética de población y en estudios antropológicos. En 1940 Landsteiner, Weiner,



Levin y Stetson descubrieron los antígenos del sistema Rhesus (Rh), cuya importancia radica en las reacciones de choque pos transfusión y en la enfermedad hemolítica del recién nacido (RN). Membrana del glóbulo rojo agrupados en más de 24 sistemas diferentes.

Tabla que muestra los grupos sanguíneos más conocidos, que se han utilizado en clínica.

SISTEMA	LOCUS	ALELOS	ANTIGENOS Receptor en G.R.	No DE Ag.
ABO	9q34	A, B, H	A1, A2, B, H	4
Rhesus	1p34-36	RHD, RHCE	D, C, E, c, e, etc.	45
MNSs	4q28-31	M, N, S, s	M, N, S, s, U, etc.	18
Lewis	19q13.3	FUT3	Le <sup>a</sup> , Le <sup>b</sup> , Le <sup>c</sup> , Le <sup>d</sup> .	4
Kell	7q33	KEL	K, k, etc	18
Duffy	1q22-23	Fy	Fy <sup>a</sup> , Fy <sup>b</sup> ,...	6
Kidd	18q11-12	JK	JK <sup>a</sup> , JK <sup>b</sup>	2
Lutheran	19q12-13	LU	Lu <sup>a</sup> , Lu <sup>b</sup> , etc.	17
Diego	17q12-21	AE1	Di <sup>a</sup> , Di <sup>b</sup>	2
P	22q11-qter	P1	Pi, P, etc.	4
Xg	Xp22-23	XG	Xg, Xg <sup>a</sup>	2

En inmunohematología un sistema de grupo sanguíneo se refiere a los antígenos producidos por los alelos de un solo locus. Los genes de cada locus de los sistemas se heredan en forma independiente. Los diferentes antígenos de cada sistema se producen por mutaciones en los genes, y en algunos loci como el Rh hay recombinación meiótica.



Los grupos sanguíneos se dividen en “públicos” o de alta incidencia que están presentes en casi toda la población, y en “privados” o de baja incidencia que son raros.

**La Inmunogenicidad** es la capacidad de inducir anticuerpos (Ac). Los antígenos (Ags) de grupos sanguíneos difieren en su capacidad inmunógena. El antígeno D del sistema Rh es el que tiene mayor capacidad antigénica, pero solo el 70% de los individuos RhD- que reciben el antígeno D producen anticuerpos; el 30% no lo produce a pesar de transfusiones repetidas. Los antígenos RhC y RhE tienen mediano poder Inmunógeno. El antígeno Tj<sup>a</sup> del sistema P es el más potente de los inmunógenos, pero solo 1/1.000.000 de personas es Tj<sup>a</sup>-. El antígeno del sistema Kell también tiene alto poder inmunógeno, es 2,5 veces más inmunógeno que el RHe, es 3 veces más que el RhE y 20 veces más inmunógeno que otros antígenos de los grupos sanguíneos mayores, con excepción del RhD. Hay Ags de baja incidencia con alta Inmunogenicidad, pero como son raros hay pocos reportes de reacciones postrasnfusión.

### **Importancia clínica**

Tiene importancia en las reacciones hemolíticas pos transfusión y en la enfermedad hemolítica del recién nacido (RN). Para la interpretación clínica hay que tener en cuenta las condiciones de las reacciones y la especificidad de los anticuerpos.

Los Ac tipo G tienen especial importancia en la enfermedad hemolítica del RN porque la IgG es la que atraviesa la membrana placentaria. La IgM es el anticuerpo que activa más el complemento y tiene mayor importancia en las reacciones pos transfusión, porque se mantiene en el plasma por su gran tamaño. Las reacciones hemolíticas en los sistemas Rhesus, Kell, Duffy, Kidd y Ss son consideradas peligrosas, por producir hemolisis, fallo renal, choque y muerte.

Si el receptor o antígeno del grupo sanguíneo es un péptido requiere de previa sensibilización para producir una reacción postrasnfusión. Es decir, un individuo Rh- o Kell- o Kidd-, puede recibir sangre Rh+ o Kell+ o Kidd+ la primera vez en caso de emergencia, pero hay una gran probabilidad que el individuo negativo desarrolle



anticuerpos de tipo IgM que produzca una reacción hemolítica en caso de una segunda transfusión con sangre Rh+ o Kell+ o Kidd+. Para comprobar si un individuo ha desarrollado Ac después de una transfusión se realiza una prueba donde se contacta el suero del transfundido con los glóbulos rojos del donante. La prueba para conocer que tipos de Ac se han generado, es llamada de Antiglobulina. La prueba de Coombs sólo determina anticuerpos de tipo IgG y un individuo puede desarrollar otros tipos de Ac en reacciones de pos transfusión.

## II. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Conocer la importancia de la identificación del sistema ABO en los individuos e identificar las posibles complicaciones de la incompatibilidad sanguínea.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los diferentes grupos sanguíneos que se presentan en los seres humanos.
- Conocer los diferentes genotipos que presentan los grupos sanguíneos.
- Reconocer la importancia del sistema ABO en los seres humanos.

## III. FUNDAMENTO.

### SISTEMA ABO o ABH

Ubicado en el locus 9q34 contiene un alelo que puede ser A, B u O, que codifican los Ags A y B y los fenotipos A1, A2, B, AB y O. Los alelos constituyen los genotipos que se ubican en el loci.

<b>GENOTIPOS DEL SISTEMA ABO</b>	<b>FENOTIPOS</b>
A/A	A1 o A2
A/O	A1 o A2



B/B	B
B/O	B
A/B	A1/B o A2/B
O/O	O

Tabla de genotipos y fenotipos del sistema ABO.

El fenotipo A se divide en A1 y A2. El alelo O codifica una proteína que no funciona, por lo tanto, no produce antígeno. La letra O proviene de la palabra alemana Ohne que significa “sin”, o sea, sin antígeno.

## **ESTRUCTURA MOLECULAR**

La membrana del glóbulo rojo de todos los individuos posee una molécula llamada H que también se encuentra en otras especies como cabras, ternera, anguilas y vegetales. Esta sustancia H es vital para la integridad del eritrocito y su ausencia produce anemia. La sustancia H es el precursor molecular donde se fijan los determinantes antigénicos de las sustancias A y B.

### **¿Cómo se forma la sustancia H?**

En la membrana del glóbulo rojo hay una cadena de azúcares asociadas a esfingolípidos; estos azúcares son N-acetil galactosamina, D-galactosa y N-acetil glucosamina. Una enzima Fucosil transferasa codificada por un gen “H” localizado en el cromosoma 19 coloca el azúcar L-fucosa sobre esta cadena de azúcares originando la cadena H. Hay un alelo “h” que no codifica enzima. La sustancia H se origina por los genotipos H/H y H/h. El genotipo h/h no produce sustancia H. Aunque hay artículos que mencionan que la sustancia H no es inmunógena, existe el Ac contra la sustancia H, pero casi no se utiliza porque es común a varias especies. El Ac anti H y las lectinas para la sustancia H son útiles en el diagnóstico del fenotipo Bombay.

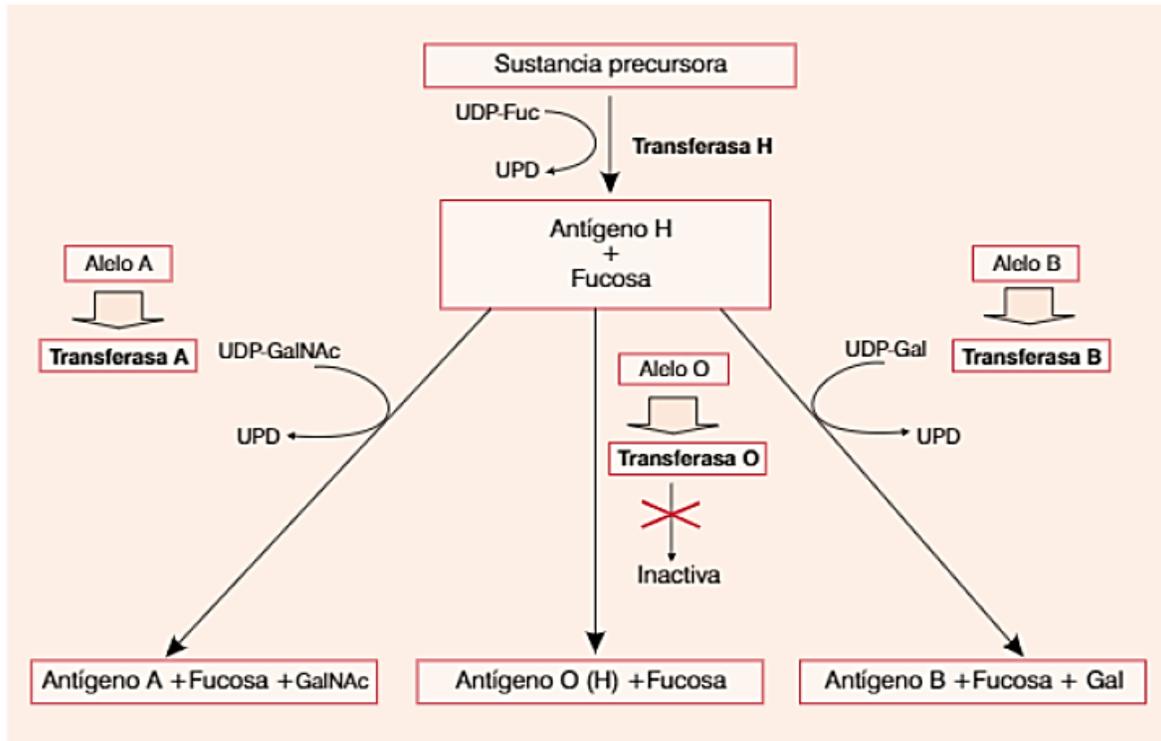


### **¿Cómo se forman los fenotipos A, B y O?**

En un locus 9q34 puede estar el gen A o el gen B o el gen O. El gen A codifica una enzima Glicosil transferasa que coloca el azúcar N-acetil Galactosamina sobre la sustancia H. El gen B también codifica una enzima Glicosil transferasa que coloca el azúcar D-Galactosa sobre la sustancia H. El gen O codifica una enzima que no es funcional, por lo tanto, no se asocia azúcar sobre la sustancia H. Las personas del fenotipo O solo tienen sustancia H sobre los eritrocitos, y por esta razón al sistema ABO también se le conoce como ABH.

La diferencia entre los genes A y B son mutaciones puntuales en 4 nucleótidos. El gen O tiene una deleción puntual que origina un codón stop y codifica una proteína muy corta. Los azúcares terminales N-acetil Galactosamina y D-Galactosa son los responsables de la especificidad antigénica y generan los Ac anti A y anti B. Los fenotipos A y B son codominantes y el fenotipo O en realidad no existe.

A continuación la estructura del sistema ABO o ABH.



Carlos Alberto Arbeláez García. Sistema de grupo sanguíneo ABO. <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2009/myl097-8c.pdf>

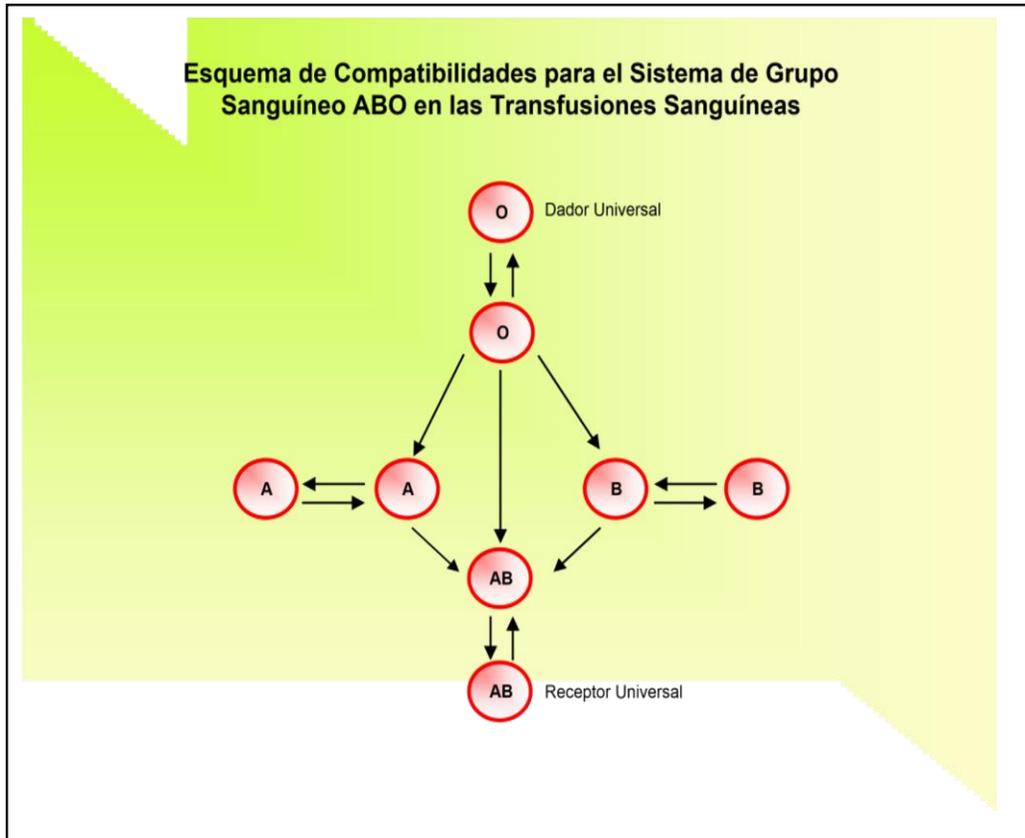
Normalmente una persona desarrolla Ac contra un antígeno extraño, pero no lo desarrolla contra uno propio. Así que las personas que sólo tienen el antígeno A desarrollan Ac contra el B, las personas con Ag B lo desarrollan contra el A y las personas del grupo O desarrollan Ac contra el A y el B.

**Los Ac anti A y B no son naturales**, se producen durante el primer año de vida y se ha demostrado su inducción por los azúcares contenidos en Neumococos tipo XIV y en la cepa E. Coli 086, por lo tanto, las bacterias ricas en polisacáridos son las responsables de la producción de estos anticuerpos. **Un R.N. puede ser transfundido sin tener en cuenta el fenotipo ABO porque no tiene Ac anti A ni Ac anti B.**

Los Ac anti A y B de las personas A y B, generalmente son de tipo IgM producto de un linfocito B especial que no interacciona con el linfocito T, porque los antígenos A y B son azúcares. **Los Ac anti A y B de las personas O generalmente son de tipo IgG, lo que puede producir enfermedad hemolítica en el R.N. desde la primera**

gestación. En la Ictericia Fisiológica del R.N. es importante verificar una madre del grupo O con un hijo A o B o AB.

El siguiente esquema muestra cómo se puede realizar transfusiones con el sistema



ABO.

Esquema de Elena Llop R. Universidad del Norte.

Si se centrifuga sangre en un tubo de ensayo, los glóbulos rojos que contienen los antígenos quedan en el fondo, los leucocitos en la parte media y el suero que contiene los anticuerpos en la parte superior.

El grupo O es dador universal, pero sólo de glóbulos rojos empacados en una solución diferente al suero, no de sangre total. Igualmente, el grupo AB solo puede recibir del A o del B glóbulos rojos empacados. En clínica hay que saber si el individuo A es A1 o A2, porque el A2 puede producir Ac contra el A1.



El grupo A se subdivide en A1 y A2 de acuerdo al número de sitios antigénicos A sobre el eritrocito. Los glóbulos rojos de la personas A1 tienen una alta densidad de antígenos A y la interacción de 2 oligosacáridos estrechamente ligados produce una especificidad antigénica diferente. La reacción Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac) con el Ac-A que se usa de rutina es débil o negativa cuando el individuo es A1, así que un individuo O o B puede ser en realidad A1 o A1B. Para diferenciar los subgrupos A1 y A2 se usan lectinas que son proteínas que reconocen residuos específicos de carbohidratos, glicolípidos y glicoproteínas. Hay lectinas que identifican al subgrupo A1 y a la sustancia H; el Ac-A de uso rutinario identifica al subgrupo A2.

### **FENOTIPO BOMBAY**

El individuo con genotipo h/h no tiene sustancia H, por lo tanto, aunque posea los genes A y B no tiene donde colocar el antígeno A y el B. En la hemoclasificación de rutina resultará de fenotipo O teniendo los genes A o B; a este grupo se le conoce como fenotipo Bombay u Oh.

Los progenitores de la primera generación tienen el genotipo H/h, por lo tanto, tienen sustancia H y sus fenotipos debe ser realmente O y B con genotipos O/O y B/B como muestra el árbol. Si se realiza el cuadro de Punnet, todos sus hijos deben ser de fenotipo B con genotipos BO, y tienen la probabilidad del 25% en cada gestación de tener hijos h/h sin sustancia H. El tercer hijo (hembra) tiene el genotipo h/h y el fenotipo O por la ausencia de la sustancia H. Si realizamos el cuadro de Punnet de la unión conyugal de la segunda generación con base en los fenotipos que expresan y con base en los posibles genotipos, no hay posibilidad que surjan hijos AB. Este caso puede ser considerado como infidelidad si no se tiene en cuenta el fenotipo Oh. Aunque el fenotipo Oh es raro, a todo individuo O se le debe investigar el fenotipo Bombay.

En la hemoclasificación del fenotipo Oh, el Ac-A es negativo, el Ac-B es negativo y la lectina anti también es negativa. El fenotipo O normal tiene A negativo, B negativo y anti-H positivo.

**En definitiva, para investigar el sistema ABO o ABH se deben utilizar los siguientes anticuerpos: Ac-A, Ac-B, lectina anti A1, lectina anti H o Ac-H.**



**Con base en lo aprendido podemos enunciar que la hemoclasificación del ID no sirve para la aplicación en clínica.**

**En las transfusiones de emergencia y por primera vez de un paciente hospitalizado siempre debe tenerse en cuenta el sistema ABO por que las personas desarrollan los Ac anti A y anti B durante el primer año de vida sin necesidad de transfusión, con la exposición a bacterias ricas en polisacáridos, ya que los Ag A y Ag B son azúcares.**

#### **IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS**

Láminas.

Palillos.

Papel Absorbente.

Algodón.

Alcohol.

Anticuerpos anti-A.

Anticuerpos anti-B.

Lectinas A1 y H.

Anticuerpos anti-D.

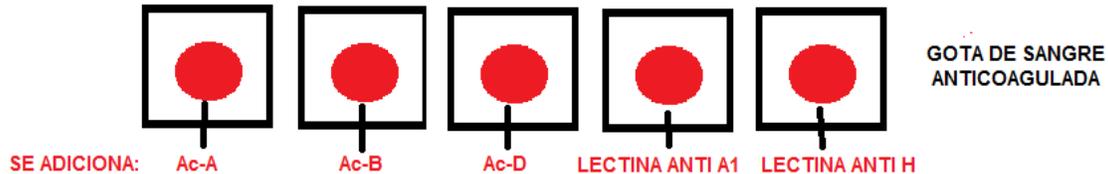
#### **V. MUESTRA**

Sangre.

#### **VI. PROCEDIMIENTO DEL LABORATORIO**

Sencillamente en una lámina dividida en 4 cuadros, preferente blanca, se coloca una gota de sangre anticoagulada en cada cuadro y se le agrega una gota de los Anticuerpos anti-A y anti-B, y de las lectinas A1 y H de acuerdo a la identificación de los cuadros. En este proceso también se determina el antígeno D del sistema Rhesus, por lo tanto, se utiliza el anticuerpo contra el D.

A continuación, imágenes y figuras que orientan el proceso.



### **SISTEMA RHESUS (Rh)**

Descubierto por Karl Landsteiner y Wiener en 1940 cuando inmunizaron conejos y cobayos con los glóbulos rojos del mono *Macacus Rhesus*, y obtuvieron un suero que contenía Ac que aglutinó los eritrocitos del mono M.R. Cuando se probó este antisuero en una población blanca de Nueva York aglutinó el 85% de los glóbulos y se les llamó Rh positivo y los que no aglutinaron se les llamó Rh negativo. Posteriormente se comprobó que el M.R. solo tenía un solo antígeno y en los humanos el sistema Rh está formado por un complejo de varias proteínas. El locus Rh en humanos se ubica en 1p34-46.

El Loci Rh está ocupado principalmente por seis genes alelos: el gen D, el gen d, genes C y c, genes E y e. **El gen d no es funcional y no codifica Ag.** Los Ag y fenotipos son D, C, c, E y e principalmente.

**Se conocen más de 40 Ag diferentes en el sistema Rh.** El Ag D puede estar codificado por diferentes genes; los genes C y c puede estar reemplazado por los genes alternos  $C^w$ ,  $C^r$  y R26; los genes E y e pueden ser reemplazados por los genes  $E^w$ ,  $E^r$ ,  $hr^s$ ,  $hr^B$ .



**Aunque la literatura clásica dice que se heredan en bloque cumpliendo las leyes mendelianas, se han demostrado mutaciones y entrecruzamiento en meiosis, que han producido los diferentes antígenos, y que aún se siguen reportando.**

Existen otras nomenclaturas: C=rh', c=hr', E=rh'', e=hr'', D=R, d=r

Los genotipos por locus más frecuentes en la población son: Dce, DCe, DcE, dce, dCe, dcE y dCE.

Una persona en un locus puede tener Dce y en el otro DCe. Su genotipo sería Dce/DCe y su fenotipo Rh+ C+ c+ e+ E-. Un individuo con genotipo DcE/dce, tendría como fenotipo Rh+ E+ c+ e+ C-. Un individuo con genotipo dcE/dCE tendría como fenotipo Rh- C+ c+ E+ e-. **El individuo Rh+ puede tener los genotipos DD y Dd. El Rh- tiene el genotipo dd.**

Un individuo con fenotipo Rh+ C+ c+ E- e+ no debe recibir sangre de un individuo Rh+ C+ c+ E+ e+, porque puede desarrollar Ac contra el Ag E y desarrollar una hemólisis en una transfusión posterior con sangre E+. **Así que la hemoclasificación que aparece en el documento de identificación no es útil en clínica.**

Hay anticuerpos contra todos los antígenos del sistema Rh, menos para el Ag d porque no existe. Los Ags del sistema Rh son péptidos, por lo tanto, requieren ser presentados por una molécula HLA al linfocito T y una interacción posterior con el linfocito B, lo que significa que se requiere contactar primero al Ag para que un individuo produzca anticuerpos, que inicialmente la mayoría son del tipo IgM. El anticuerpo o inmunoglobulina M tiene 10 sitios para activar el complemento, y si un individuo desarrolla IgM contra un antígeno sanguíneo y lo recibe nuevamente durante una transfusión hemolisa la sangre que recibe.

**Una persona en urgencias que requiera transfusión inmediata y nunca ha sido transfundido sólo debe considerarse el sistema ABO.** Si una persona con IgM contra un determinado antígeno sanguíneo lo vuelve a contactar, generalmente cambia el Ac hacia el tipo IgG, y este conocimiento es importante para comprender la isoinmunización del R.N. por sistema de grupos sanguíneos, anteriormente llamada



Eritroblastosis fetal. Por esta razón la isoimmunización del R.N. por los sistemas sanguíneos peptídicos ocurren después de la segunda gestación si en las primeras dos gestaciones los bebés han presentado el mismo antígeno productor del anticuerpo.

Comercialmente para clasificar el sistema Rhesus hay 5 reactivos: anti-D, anti-C, anti-c, anti-E y anti-e. En clínica se han reportado reacciones postransfusión y hemólisis en R.N. con los otros antígenos del sistema Rh.

Tradicionalmente se han dicho que una pareja normal Rh- no puede tener hijos Rh+, pero hay muchos reportes de padres Rh- con hijos Rh+, y se ha comprobado con la huella genética. Expliquemos el por qué.

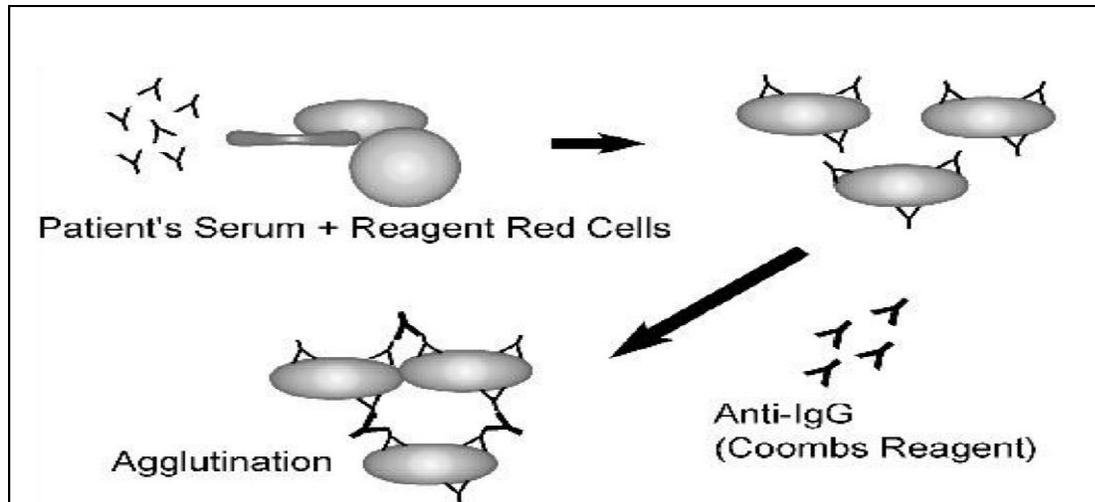
### **SUBUNIDADES DEL Ag D.**

El Ag D es una molécula de gran tamaño integrada por varios determinantes antigénicos (epítope) o subunidades codificadas por diversos exones del gen D. En algunas personas se pueden perder subunidades por deleciones de exones o re arreglos cromosómicos, formándose un Ag D incompleto que se comporta como Rh+. Si una persona Rh+ con D incompleto recibe sangre de un Rh+ con un D completo produce Ac contra las subunidades que le faltan. El Ag D tiene 12 dominios y 6 se expresan en la región externa de la membrana del eritrocito.

Donde dice “D epítope” es el blanco del Ac utilizado comercialmente. Si una persona no tiene esa subunidad es hemoclasificado como Rh-, pero tiene el resto de unidades y funciona como Rh+. Varias subunidades se han estudiado con mayor detenimiento y se han nombrado Rh<sup>A</sup>, Rh<sup>B</sup>, Rh<sup>C</sup>, Rh<sup>D</sup>. Entre los caucásicos hay Rh- por la ausencia del epítope D; hay negros africanos y Japoneses Rh- que tienen el Ag D normal. ¿Por qué son Rh-?

En algunos casos los Ags D son escasos sobre la membrana del glóbulo rojo, y si el Ac anti D que usa el laboratorio es de tipo IgG no se produce aglutinación y es reportado como Rh-. En este caso se requiere puentes de inmunoglobulinas para unir las IgG, utilizando un anticuerpo anti-G (reactivo de Coombs) para que se forme la aglutinación.

**Se recomienda realizar la prueba de Coombs a toda persona que resulte Rh- con anticuerpos anti-D de tipo IgG. Todo Rh+ que resulte Rh- se le llama RhD<sup>U</sup> (+).**



Esquema de la reacción de Coombs.  
Donde dice suero de paciente se reemplaza por Ac anti-D de tipo IgG

### Tipos de RhD<sup>U</sup>.

1. RhD<sup>U</sup> hereditario: también conocido de bajo grado. En la raza negra es la expresión del complejo genético Dce, y en la raza blanca se presenta como la expresión de los complejos genéticos DCE y DcE, por lo tanto, se ha transmitido de generación a generación.
2. RhD<sup>U</sup> de interacción genética: es la supresión de un gen D normal por el otro alelo del loci. Por ejemplo, el genotipo DCE/dCe puede producir el fenotipo RhD<sup>U</sup>Ce.
3. RhD<sup>U</sup> por ausencia de subunidades del Ag D: ya se mencionó y se produce por delección de exones del gen, posiblemente como resultado de un “crossing over” desigual durante la meiosis.

**Una persona RhD<sup>U</sup> sólo debe recibir sangre Rh- pero no a lo contrario.**



## **EL Rh NULO.**

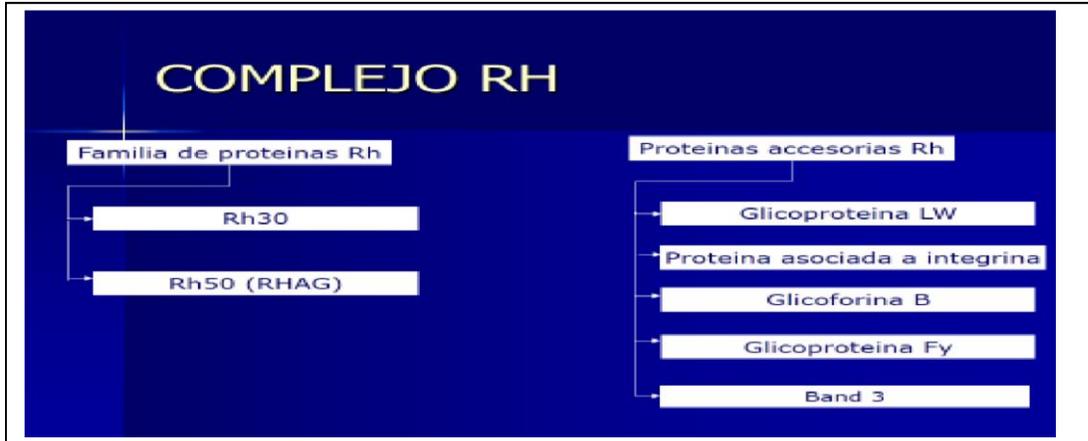
Así como los antígenos A y B del sistema ABH tienen una molécula precursora llamada sustancia H, los Ags del sistema Rh también tienen una sustancia precursora llamada L, cuyo gen se llama  $X^1r$ . Este gen tiene un alelo no funcional nombrado  $X^{\circ}r$ . Los genotipos  $X^1r/X^1r$  y  $X^1r/X^{\circ}r$  codifican la sustancia L y los individuos con el genotipo  $X^{\circ}r/X^{\circ}r$  no producen la sustancia L. **Por lo tanto, estas personas, aunque tengan los genes del sistema Rh, no expresan los antígenos y todos los fenotipos son negativos (Rh-, C-, c-, E-, e-, etc).**

**En las personas con Rh nulo la vida media de los glóbulos rojos está disminuida y sufren de anemia, estomatocitosis y alteraciones de los antígenos del sistema sanguíneo MNSs.**

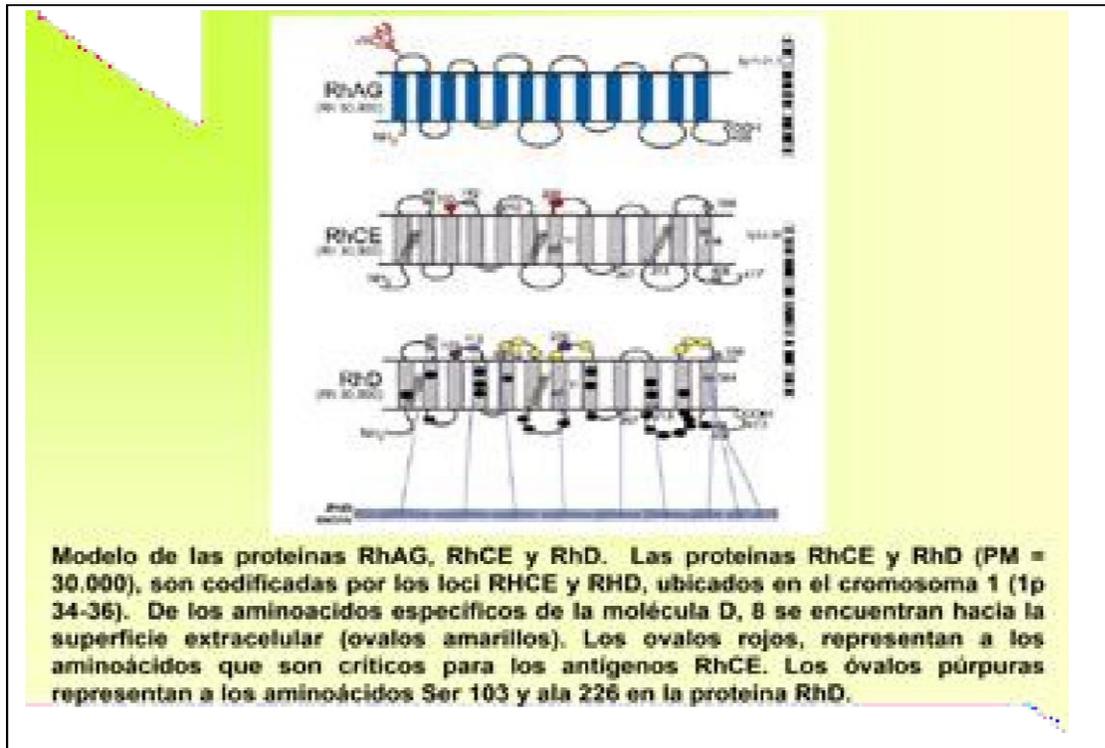
## **LA FAMILIA DE PROTEINAS RH**

El sistema Rh no es solamente los alelos D,d, C, c, E, e y los otros alelos reportados. Está conformado por otras proteínas que en conjunto reciben el nombre de familia de proteínas Rh. Algunas de estas tienen funciones específicas y de origen genético diferente.

Los genes de las proteínas RhD, Cc, Ee se ubican en el locus 1p36.13-p34.3, el gen de la proteína RhAG en el locus 6p21.1-p11, los genes de las proteínas LW, IAP, GPB y Band3 se ubican respectivamente en los locus 19p13.3, 3q13, 4q28-q21 y 17q12-21.



Proteínas que hacen parte del sistema o complejo Rh.



Organización molecular de la proteína RhAG, RhD, RhC, RhE. Se observan los dominios externos, de transmembrana e intracelulares.  
**Avent, N. D. (2001). *Molecular Biology of the Rh Blood Group System*.**



## VII. RESOLVER LOS SIGUIENTES INTERROGANTES

1. Teniendo en cuenta su hemoclasificación del ID y el de sus hermanos, determine los posibles genotipos de sus progenitores.
2. Investigue la frecuencia de los fenotipos del sistema ABO en diferentes poblaciones.
3. ¿Cuál sería la hemoclasificación de Drácula para poder aceptar los diferentes grupos sanguíneos? Tenga en cuenta todos los grupos sanguíneos.
4. Investigue en qué consiste la prueba de Antiglobulina y cuál es su utilidad en medicina.
5. ¿Qué es la estomatocitosis?
6. Explique el mecanismo etiológico de la isoimmunización del R.N., por el sistema ABO y los otros sistemas: Rh, Kell, Kidd, etc. ¿En qué gestación puede darse y por qué?
7. ¿Puede una persona Rh nulo con un conyugue Rh- tener hijos Rh+? Explique su respuesta.
8. ¿Puede una pareja Rh- tener hijos Rh+? ¿Explique el por qué?
9. Una mujer con el fenotipo Rh+ C- c+ E+ e+ tiene un bebé Rh+ C+ c+ E+ e+. ¿En las próximas gestaciones con el mismo conyugue puede tener un hijo con anemia hemolítica por grupos sanguíneos? Explique su respuesta.
10. Cuál es la función de las siguientes proteínas asociadas al sistema Rh: glicoproteína LW, proteína asociada a integrina, Glicoforina B y glicoproteína Fy

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Linares J. Inmunohematología y transfusión: principios y procedimientos. Cromotip: Caracas. 1986.

Arbeláez García CA. Sistema de grupo sanguíneo ABO. Revista Medicina & Laboratorio. 2009; 15(7-8), 329-346.



F.F. Wagner F, Muller TH, Gessner C. Rh phenotype prediction by DNA typing and its application to practice. *W.A Transfusion Medicine*. 1998; 8, 281-302.

D. Avent N. Molecular Biology of the Rh Blood Group System. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 2001; 23(6), 394-400.

Olson ML, Chester MA. Polymorphism and recombination events at the ABO locus: a major challenge for genomic ABO blood grouping strategies. *Transfusion Medicine*. 2001; 11, 295-313. Sweden.

Watkins WM. The ABO blood system: historical background. *Transfusion Medicina*. 2001; 11, 243-265

Yamamoto F. Cloning and regulation of the ABO genes. *Transfusión Medicine*. 2001; 11, 281-294.

Daniels G, Poole J, de Silva M, Callaghan T, Maclennan S, Smith N. The Clinical significance of blood group antibodies. *Transfusion Medicine*. 2002; 12, 287-295.



## PRÁCTICA N° 7

### POLIMORFISMO GENÉTICO Y FARMACOGENÓMICA

#### INTRODUCCIÓN

El concepto de Polimorfismo se aplica a la existencia normal de proteínas con formas relativamente comunes y diferentes genéticamente. Muchas proteínas diferentes se sintetizan en cada célula del cuerpo, incluyendo enzimas implicadas en el metabolismo. La relación fundamental entre proteínas y genes se halla en una secuencia específica de un fragmento del ADN llamado gen, por lo tanto, un cambio en esta secuencia puede producir una proteína variante con un mal funcionamiento por el cambio de su estructura. Esta variación del gen se llama **mutación**, y este cambio no necesariamente altera la función.

No todos los cambios en el gen son deletéreos o dañinos. Thompson afirma: “Uno de los conceptos importantes de la genética humana y médica es que la enfermedad genética constituye la manifestación más obvia y a menudo más extrema del cambio genético que destaca sobre un trasfondo de variabilidad genética enteramente normal”.

Según Vogel F (Berlín 1986), la frecuencia de mutación es de  $10^{-10}$ /par de bases/por duplicación del ADN y de  $10^{-5}$ /locus /generación. Las mutaciones pueden ocurrir en cualquier célula tanto germinal como somática, pero solo las mutaciones de la línea germinal pueden transmitirse de generación en generación y originar las enfermedades hereditarias. Pero la mayor de las mutaciones ocurre en la línea somática (con  $10^{13}$  células) originando patologías tipo mosaicos y una proporción significativa de cánceres, pero no enfermedades hereditarias.

“Con respecto a la magnitud total de la carga de las mutaciones humanas...los errores de replicación provocan miles de nuevas mutaciones virtualmente en cada posición del nucleótido en el genoma y en cualquier parte del organismo. La mayoría de las mutaciones ocurren en células somáticas. Según la naturaleza de la mutación, su localización en el genoma del tejido involucrado, una determinada mutación puede



generar o no cáncer o variación fenotípica. Un pequeño número de las mutaciones nuevas sucede en la línea germinal durante cualquiera de las divisiones mitóticas que ocurre a lo largo de la espermatogénesis u ovogénesis, o bien durante la propia meiosis... el número y el momento de estas divisiones difieren entre los sexos”.

Las células de la línea germinal que produce el ovocito sufren 25 procesos de mitosis y la primera parte de la meiosis en la vida fetal. Las células de la línea germinal de la espermatogénesis sufren 35 ciclos de mitosis desde la etapa de embrión hasta la pubertad y posteriormente sufre 25 divisiones mitóticas desde el gonocito primordial hasta espermatozoides durante toda la vida, así que cada espermatozoide haploide es el producto de centenares de divisiones mitóticas dependiendo de la edad. “Por lo tanto, cabe esperar que la frecuencia de mutaciones nuevas paternas dependa de la edad y cierto tipo de mutaciones nuevas en enfermedades genéticas sean con mayor frecuencia de origen paterno y no materno... como la Neurofibromatosis (NF1), Acondroplasia y Hemofilia A”.

“Cada espermatozoide producido por un varón de 25 a 30 años de edad contiene alrededor de 100 nuevas combinaciones de pares de bases como resultado en los errores en la replicación del DNA. Así, en una eyaculación normal, que contiene aproximadamente 100 millones de espermatozoides, hay alrededor de ¡10.000 millones de nuevas mutaciones! Cada par de bases del genoma está mutando al menos una vez en cada eyaculación. De acuerdo con tasas calculadas de mutaciones deletéreas en loci individuales... *aproximadamente 1 de cada 10 espermatozoides porta una nueva mutación deletérea*”. Pero la mayor parte producen fenotipos letales o recesivos o producen cambios de comportamiento proteico (alelos).

## **I. OBJETIVOS.**

### **OBJETIVO GENERAL**

Conocer la importancia de los polimorfismos en una población.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Conocer la importancia de variabilidad genética en una población.



- Identificar los factores que influyen en la aparición de nuevas variantes polimórficas en una población.
- Aprender a calcular la frecuencia genotípica y fenotípica en una población.

## II. FUNDAMENTO

**Polimorfismo genético:** es la presencia de múltiples alelos en un locus, teniendo en cuenta que dos de ellos aparezcan en más del 1% de la población. **El loci polimórfico** es aquel que es heterocigoto en el 2% de la población. También se ha expresado que se refiere a los loci que tienen cierto número de alelos comunes que permiten clasificar a los miembros de una población natural en fenotipos diferentes.

**Fármaco genómica y Fármaco genética:** algunos autores establecen una diferencia teniendo en cuenta el concepto de genoma y de genotipo. Pero en común estudian el polimorfismo genético de los genes que codifican las enzimas que metabolizan los medicamentos de uso médico y xenobióticos implicados en patologías.

Recomendación: leer capítulo de *Variación genética, polimorfismo y mutación*, de Genética en Medicina de Thompson & Thompson.

## VARIABILIDAD GENETICA

Una característica de la vida es la variabilidad, es la base de la evolución de las poblaciones. El componente de la varianza fenotípica se debe a las diferencias genéticas entre los individuos que constituyen una población. La magnitud de la variación fenotípica condujo a Charles Darwin a la idea de evolución, por medio de la selección natural. La magnitud de la variabilidad genética dentro de una población, afecta su potencial para adaptarse al cambio ambiental. Todos los organismos exhiben variación o variabilidad genética, y entre más corto sea el periodo generacional más variaciones se establecen en la población; en la especie humana variaciones importantes pueden ocurrir cada 4 o 5 generaciones.



### La variabilidad se origina por:

1. **Mixovariación:** reproducción de individuos con genotipos distintos. El proyecto genoma humano demostró que las mezclas raciales mejoran la especie.
2. **Paravariación:** acción selectiva del medio ambiente. En este caso sustancias tipo xenobióticos pueden mutar el ADN (mutaciones inducidas).
3. **Idiovariación:** originada por las mutaciones génicas. En este caso son mutaciones espontaneas que ocurren en la mayoría de los casos durante la replicación del ADN antes de la división celular; las mutaciones que ocurren en la recombinación meiótica (meiosis); y las mutaciones por transposición o cambios en la posición de los genes en el genoma, cuya etiología en gran parte se debe a infecciones por retrovirus. Hay información científica que respalda la teoría de la evolución del cromosoma Y a partir del X por acción de transposones. Parece que la transposición provoca cambios evolutivos importantes.

## GENÉTICA DE POBLACIONES

La genética de poblaciones describe en forma algebraica la constitución genética de una población y la forma en que las frecuencias cambian en las poblaciones a lo largo del tiempo.

**Genotipo:** conjunto de genes del genoma. El genotipo difiere entre los sistemas del ser humano por la diferencia de funciones. El genotipo del sistema respiratorio es diferente al del sistema muscular.

**Fenotipo:** es la manifestación que se detecta del genotipo. Se divide en fenotipo morfológico que se observa ocularmente; fenotipo bioquímico que se detecta a través del laboratorio y molecular que se refiere a la estructura de la proteína.

**Frecuencia Genotípica:** es la proporción relativa de los diferentes genotipos en una población.



Una frecuencia es una proporción o un porcentaje, expresado habitualmente como una fracción decimal. Ejemplo, si el 20% de los alelos en un locus particular en una población es A, decimos que la frecuencia del alelo A en la población es 0,20.

En el caso de poblaciones grandes, en las que no es práctico determinar los genes de todos los individuos, suele tomarse una muestra de individuos provenientes de la población, se calculan las frecuencias genotípicas y alélicas para esta muestra. Luego, estas se utilizan para representar el conjunto génico de la población.

Para determinar la estructura genética o el conjunto génico de una población, se determinan los tipos y las frecuencias de genotipos y alelos.

**El cálculo de las frecuencias Genotípicas** se obtiene sumando la cantidad de individuos que poseen el genotipo y se divide por el número total de individuos en la muestra. Para un locus con tres genotipos AA, AA° y A°A° la frecuencia de cada genotipo es:

$$F(AA) = \# \text{ de individuos } AA / N$$

$$F(AA^\circ) = \# \text{ de individuos } AA^\circ / N$$

$$F(A^\circ A^\circ) = \# \text{ de individuos } A^\circ A^\circ / N$$

N = # de individuos de la muestra en estudio. La suma de todas las frecuencias genotípicas siempre es igual a 1.

**Cálculo de las frecuencias alélicas:** la combinación de los alelos determina los genotipos, de modo que el conjunto génico de una población puede describirse en términos menores cuando se utilizan las frecuencias alélicas. En una población con reproducción sexual los genotipos son combinaciones transitorias de alelos. Los genotipos se desintegran en cada generación cuando los alelos individuales se transfieren a la generación siguiente a través de los gametos. De tal manera que son los tipos y números de alelos, no los genotipos, los que tienen continuidad real de una generación a la siguiente y componen el conjunto génico de una población. Las frecuencias alélicas pueden calcularse a partir de: 1) Los números de los genotipos y 2) Las frecuencias de los genotipos. Ambos métodos deben dar igual resultado.



Cálculo de las frecuencias alélicas a partir **del número de genotipos**: En caso de un locus con sólo 2 alelos A y A°, las frecuencias se representan con los símbolos p y q.

$$P = f(A) = 2(n_{AA}) + (n_{AA^\circ}) / 2N \quad q = f(A^\circ) = 2(n_{A^\circ A^\circ}) + (n_{AA^\circ}) / 2N$$

N es igual al número de personas de la muestra. n<sub>AA</sub> y n<sub>AA°</sub> es el número de personas homocigotas AA y A°A°. Se divide entre 2N porque cada individuo diploide tiene dos alelos. La suma de las frecuencias alélicas siempre es igual a 1 (p + q = 1), de modo que obtenido p se obtiene q con una resta (q = 1 – p).

**Cálculo de las frecuencias alélicas a partir de las frecuencias de los genotipos**: se suma la frecuencia del homocigoto para cada alelo más la mitad de la frecuencia del heterocigoto (porque la mitad de los alelos del heterocigoto es de cada tipo).

$$P = f(AA) + f(AA^\circ) / 2 \quad q = f(A^\circ A^\circ) + f(AA^\circ) / 2$$

**Cálculo de las frecuencias alélicas para un loci con tres o más alelos**: para calcular las frecuencias alélicas a partir de los números de genotipos contamos el número de copias de un alelo sumando el doble del número de homocigotos al número de heterocigotos que posee el alelo y esta suma se divide por el doble del número de individuos en la muestra.

Para un locus con tres alelos (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y A<sub>3</sub>) y seis genotipos (A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>, A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>, A<sub>1</sub>A<sub>3</sub>, A<sub>2</sub>A<sub>3</sub>, A<sub>3</sub>A<sub>3</sub>) las frecuencias (p, q y r) de los alelos son:  $P = f(A_1) = 2(n_{A_1A_1}) + n_{A_1A_2} + n_{A_1A_3} / 2N$   $q = f(A_2) = 2(n_{A_2A_2}) + n_{A_2A_1} + n_{A_2A_3} / 2N$   $r = f(A_3) = 2(n_{A_3A_3}) + n_{A_3A_1} + n_{A_3A_2} / 2N$

A medida que aumentan los alelos del loci se aumenta en la suma el número de homocigotos y el número de heterocigotos, y se colocan símbolos para los otros alelos.

## **FACTORES QUE MODIFICAN LAS FRECUENCIAS ALELICAS**

1. Unión no aleatoria: que comprende: la estratificación, la unión dirigida y la endogamia.



2. Selección natural.
3. Mutaciones.
4. Deriva génica.
5. Efecto fundador.
6. Flujo génico.

La *estratificación* se observa en subgrupos que se han mantenido genéticamente separados.

La **unión dirigida** es la elección de conyugues con rasgos particulares (color de ojos o del cabello) o con características patológicas, como la unión entre ciegos, sordos, acondroplásicos.

La **endogamia** es la unión entre parientes y se mide con el coeficiente de endogamia (CE), que es la proporción de loci homocigotos que tiene una persona por ascendencia. En Europa el CE es de 1/500-1000 personas, en la India es de 1/50. Una de las consecuencias de la endogamia es el aumento de homocigotos y la aparición de enfermedades, ejemplo: la anemia de células falciformes entre los negros, la enfermedad de Huntington entre los blancos, la enfermedad de Tay Sachs entre los judíos.

La **selección natural** o ventaja selectiva, es el factor que determina si una nueva mutación se pierda inmediatamente o se mantenga unas cuantas generaciones y/o permanezca como un nuevo alelo. Este nuevo alelo puede mejorar la función, puede producir daño o simplemente ser neutral.

La **mutación**: toda evolución depende de los procesos que genera la variación genética. Las mutaciones recurrentes causan cambios en las frecuencias alélicas. Así que el de las frecuencias alélicas es determinado por las tasas de mutación. Por lo tanto, la frecuencia de un alelo es el resultado del equilibrio entre la tasa de mutación y el efecto de la selección natural. La mutación depende de la homeostasis celular durante la replicación del ADN y de los contaminantes ambientales y en la selección natural intervienen medicamentos, dietas, condiciones de *higiene ambiental y nutrición*. La ventaja selectiva para un nuevo alelo va de 0 a 1. La probabilidad de estar presente en la próxima generación



como alelo normal otorga una ventaja selectiva de 1, si provoca muerte o esterilidad la ventaja selectiva es cero. **Las mutaciones que generalmente se mantienen son los cambios puntuales de un solo nucleótido tipo transición que se producen en la línea germinal, y se conocen como SNP (polimorfismo de un solo nucleótido). Si un individuo con un nuevo SNP con ventaja funcional y fértil, transmitirá el nuevo alelo en una población selectivamente adaptable.**

**La deriva genética** es el efecto que ejerce el azar en la transmisión de alelos en un grupo pequeño de población. Esto produce sobrevivencia de frecuencias alélicas.

**El efecto fundador** es el fiel reflejo de frecuencias alélicas en una población total derivada del poblamiento de una pequeña población ancestral, en un determinado sitio.

**El flujo genético** es la difusión lenta de genes a través de una barrera racial por migración.

**A continuación, una tabla que muestra los principales SNP del gen NAT2 en poblaciones indígenas del Caribe Colombiano.**

SNPs	Chimila	Wiwa	Wayuu	Población total
<b>C481T</b>				
C	83.0	64.5	74.0	73.5
T	17.0	35.5	26.0	26.5
CC	72.3	41.8	54.0	54.9
CT	21.3	45.5	40.0	37.1
TT	6.4	12.7	6.0	7.9
<b>G590A</b>				
G	90.4	94.5	93.5	93.1
A	9.6	5.5	6.5	6.9
GG	80.9	89.1	87.0	86.1
GA	19.1	10.9	13.0	13.9
AA	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>G857A</b>				
G	73.4	80.0	87.0	81.9
A	26.6	20.0	13.0	18.1
GG	55.3	67.3	75.0	68.3
GA	36.2	25.5	23.0	26.7
AA	8.5	7.3	2.0	5.0

Datos mostrados como %.  
N-acetyltransferase 2 (NAT2)

ARIAS, I et al. NAT2 gene polymorphisms in three indigenous groups in the Colombian Caribbean Coast region. *Colomb. Med.* [online]. 2014, vol.45, n.4, pp.148-153. ISSN 1657-9534.



El gen NAT2 codifica la enzima N-acetil transferasa que metaboliza antibióticos, como la isoniazida y la rifampicina. La combinación de los alelos de este gen determina los fenotipos de acetilador rápido, intermedio y lento. El acetilador rápido elimina rápidamente el medicamento y el tratamiento no tiene éxito. El acetilador lento no elimina el medicamento y se producen reacciones secundarias. El individuo con acetilación intermedia es lo ideal para permitir la acción del medicamento sin las reacciones secundarias. Este campo de estudio se conoce como Farmacogenética.

**Tabla que muestra el fenotipo acetilador de los indígenas de la tabla anterior.**

Genotipo	Estado acetilador							
	Rapido	Intermedio			Lento			
	NAT2*4/4	NAT2*4/5	NAT2*4/6	NAT2*4/7	NAT2*5/5	NAT2*5/6	NAT2*5/7	NAT2*7/7
Chimila	13 (29.5)	4 (9.1)	4 (9.1)	10 (22.7)	3 (6.8)	2 (4.5)	4 (9.1)	4 (9.1)
Wiwa	7 (12.79)	18 (32.7)	2 (3.6)	10 (18.2)	6 (10.9)	4 (7.3)	4 (7.3)	4 (7.3)
Wayuu	31 (31.3)	27 (27.3)	8 (8.1)	12 (12.1)	5 (5.1)	4 (4.0)	10 (10.1)	2 (2.0)
Total (%)	25.2	24.3	6.9	15.8	6.9	5.0	8.9	5.0

frecuencia= n (%)

ARIAS, I et al. NAT2 gene polymorphisms in three indigenous groups in the Colombian Caribbean Coast region. *Colomb. Med.*. 2014, vol.45, n.4, pp.148-153. ISSN 1657-9534.

### **PRINCIPIO O LEY O EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG.**

Las relaciones entre las frecuencias alélicas y genotípicas en una población, bajo una serie de supuestos ideales, constituye el principio de Hardy-Weinberg. Propuesto independientemente en 1908 por Geoffrey Hardy y Wilhem Weinberg.

La ley tiene 3 aspectos:

- 1) Las frecuencias alélicas en un locus autosómico no cambian de una generación a la siguiente (equilibrio de las frecuencias alélicas).



2) Las frecuencias genotípicas están determinadas de una manera predecible por las frecuencias génicas (equilibrio de las frecuencias genotípicas).

3) El equilibrio es neutro, si se perturba en la población, el equilibrio se reestablecerá en una sola generación con apareamiento al azar.

Para que se mantenga el equilibrio genético en un locus con dos alelos A y A°, con frecuencias alélicas de p y q respectivamente, el PHW predice que la frecuencia genotípica para el homocigoto AA es p<sup>2</sup>, la del heterocigoto AA° es 2pq y la del otro homocigoto, A°A° es q<sup>2</sup>. Esta fórmula es fácil de deducir con base en el cuadro de Punnett.

El siguiente cuadro representa los alelos de un loci, cuya suma en equilibrio debe ser igual a 1. En matemáticas AA es = A<sup>2</sup>, AA° es = A x A°. Simplemente se hace el reemplazo de A por p y de A° por q. La fórmula queda p<sup>2</sup> + 2(pq) + q<sup>2</sup> = 1. Para cada loci investigado en una población se aplica la formula teniendo en cuenta homocigotos y heterocigotos.

El aumento de homocigotos está indicando aumento de endogamia en la población. Para que la formula sea igual a 1, p y q deben valer cada uno 0.5 cuando hay un equilibrio perfecto. Cuando un alelo se acerca a 0 se está perdiendo en la población y cuando se acerca a 1 permanecerá en la población.

La sumatoria del cuadro de Punnet es 100% = 1

Por lo tanto, p<sup>2</sup> + pq + pq + q<sup>2</sup> = 1. Así que el equilibrio depende de una relación entre los homocigotos y los heterocigotos.



## Ejemplos de polimorfismo SNP en enfermedades humanas

**Tabla 1. Ejemplo de algunos rSNP, haplotipos y srSNP con efecto funcional asociados a diversas enfermedades complejas**

Gen	Localización	Sitio polimórfico	Alelo o haplotipo	Efecto funcional del rSNP o srSNP	Patología asociada
<i>FCRL3</i>	Promotor	-169T/C	C	Crea una mayor afinidad de unión al factor de transcripción NF- $\kappa$ B, conlleva una sobreexpresión del gen	AR, LEG, AITD <sup>28</sup>
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	Promotor	-376G/A	A	Crea un sitio de unión para el factor de transcripción Oct1, conlleva una sobreexpresión del gen	MC <sup>29</sup>
		-308G/A	A	Sin función conocida, pero está relacionado con mayores niveles de expresión génica y de proteína en suero y respuesta a tratamiento	AR, ARJ, LEG, asma, enfermedades infecciosas, etc. <sup>31-41</sup>
<i>MIF</i>	Promotor	-173G/C	C	Sin función conocida, pero está relacionado con mayores niveles de expresión génica y de proteína en suero	ARJ, cáncer <sup>42</sup>
<i>CRTH2</i>	3'UTR	1544G/C 1651G/A	GG	Aumenta la vida media del ARNm del gen <i>CRTH2</i>	Asma <sup>51</sup>
<i>TNFR2</i>	3'UTR	593A/G 598T/G 620 T/C	ATC	Aumenta la degradación del ARNm de <i>TNFR2</i>	Obesidad <sup>52-53</sup>
<i>HMGCR</i>	Intrón 13	*rs3846662A/G	G	Afecta a la eficiencia del corte y empalme y genera un transcrito que carece del exón 13	Dislipemia <sup>51</sup>
<i>CR2</i>	5'UTR	+21A/G	A	Aumenta la actividad transcripcional de <i>CR2</i>	LEG <sup>52</sup>
	Exón10 Exón11	L592L G/A S639N G/A S663P A/G	GGA	Disminuye la eficiencia del corte y empalme y genera un transcrito que incluye al exón 11 de <i>CR2</i>	

\*rs = referencia del SNP.

AITD: enfermedad tiroidea autoinmune; MC: malaria cerebral.

J Ramírez Bello, et al. rSNP y srSNP y enfermedades complejas Gaceta Médica de México. 2013; 149.

### III. ACTIVIDADES A REALIZAR

1. Investigar la variación genética en el locus de la Galactosemia y su aplicación en medicina.
2. Investigar la variación genética de la Alfa-anti tripsina y su aplicación en medicina.
3. Investigar la variación genética o polimorfismo del gen APOE y su aplicación en medicina.



4. Investigar el polimorfismo del gen NAT2 y su aplicación en medicina y en Farmacogenética.
5. Investigar el polimorfismo del gen CYP2C19 y su aplicación en medicina y en Farmacogenética.
6. ¿Qué son la Hemofilia A, la Acondroplasia y la Anemia de células Falciformes? ¿Dónde se encuentran las mutaciones?

#### **IV. BIBLIOGRAFÍA**

1. Arias I, Lecompte N, Visbal L, Curiel I, Hernández E, Garavito P, Silvera-Redondo C. NAT2 gene polymorphisms in three indigenous groups in the Colombian Caribbean Coast region. *Colombia Médica*. 2014; 45(4).
2. Strachan T, Read AP. *Genética molecular humana*. Edición 7. Editorial Omega, España. 1999
3. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J. *Biología Celular Molecular*, Edición 13. Ed. W.H.Freeman & Co Ltd. 2003
4. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Thompson & Thompson. *Genética en Médica*. Edición 7. Elsevier Masson: Ámsterdam. 2008
5. Solari A. *Genética Humana*. Editorial Panamericana, 3 edición. Ed. Médica Panamericana, 2004.
6. Martínez-Barnetche J, Valverde-Garduño V. Polimorfismos reguladores y su participación en la patogenia de enfermedades complejas en la era pos genómica. *Revista Salud Pública Mex*. 2014; 51(149): 220-8.



## **PRÁCTICA N° 8**

### **AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE DNA**

#### **I. INTRODUCCIÓN**

El DNA no existe como molécula libre en las células, por el contrario, se encuentra asociado con proteínas que constituye la cromatina. Hay además RNA en el núcleo y en el citoplasma. Es por esto, que los procesos de extracción y aislamiento de DNA de una célula y de otras moléculas es el primer paso para muchos procedimientos de laboratorio en biotecnología, biología molecular, genética e inmunología entre otras ciencias.

Estos procesos involucran, generalmente, rompimiento de las células, desnaturalización de proteínas, la digestión del ARN y la precipitación del DNA.

En todo proceso de investigación de genética se requiere la extracción del ADN puro sin proteínas y sin el ARN. Aunque el ARN también se utiliza para el estudio de la transcripción de los genes.

Una vez obtenido el DNA, este puede ser sometido a diferentes procedimientos técnicos como: el estudio de genes, estudios de paternidad, trabajos forenses para identificación de individuos, diagnóstico de enfermedades, diagnóstico e identificación de patógenos. Los pasos que se darán en esta práctica son similares a los utilizados en los equipos sofisticados de las industrias biotecnológicas; razón por la cual el estudiante debe comprender la importancia de cada uno de estos, y visitar la galería de imágenes para que observe los niveles de empaquetamiento del DNA.

#### **II. OBJETIVOS**

##### **OBJETIVO GENERAL**

Aislar e identificar DNA de muestras de cebolla.



## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comprender la importancia de cada uno de los reactivos empleados para la obtención de DNA.
- Diferenciar el DNA de otros componentes celulares, mediante una reacción de coloración.

## **III. MATERIALES Y REACTIVOS**

- Solución de Sal/Detergente: agregue a 10 mL de detergente y 10 gramos de NaCl(sin YODO) a 90 mL de agua destilada.
- Ablandador de Carne: Agregue 5 gramos del ablandador a 95 mL de agua destilada.
- Solución al 5% p/v de NaCl. ,
- Etanol de 95% o isopropanol de 95% helado.
- Cebolla blanca fresca.
- Cuchillo.
- Agua destilada.
- Vaso de precipitado de 100 mL.
- Tubos de ensayo.
- Varillas agitadoras de vidrio.
- Papel filtro.
- Hielo.
- Nevera de icopor.
- Tabla para picar.

## **IV. PROCEDIMIENTO**

### **Método A:**

- ◆ Pique la cebolla en trocitos de máximo un centímetro cuadrado de tamaño.
- ◆ Agregue alrededor de 2 gramos de cebolla picada en un vaso de precipitado.



- ◆ Adicione la solución de sal/ detergente en cantidad suficiente para cubrir la muestra (alrededor de 10 mL). Si es necesario, con ayuda de la varilla, mantenga los trocitos de cebolla por debajo del nivel de la solución mencionada durante 5 minutos.
- ◆ Decante el líquido en un tubo de ensayo limpio y adicione 5mL de solución ablandadora. Remueva suavemente para mezclar.
- ◆ Introduzca la varilla agitadora de vidrio en el tubo y vierta cuidadosamente 10mL de etanol helado por las paredes del mismo. Deje que se forme una capa por encima del extracto de cebolla. Deje reposar por 5 a 10 minutos.
- ◆ Mueva ligeramente la varilla agitadora a través de la interfase de los dos líquidos, recolectando la sustancia de aspecto mucoso y colóquela en un tubo de ensayo limpio con 10 mL de NaCl al 5% p/v .
  - ◆ La mezcla de aspecto mucoso corresponde al DNA, compruebe mediante coloración con difenilamina.

### **Método B:**

(Tomado de Genetic Science Learning Center at the Eccles Institute of Human Genetics University of Utah)

- ◆ Coloca en una licuadora 100 mL o ½ taza de arvejas verdes con aproximadamente 1/8 de cucharadita de sal.
- ◆ Adiciona 200 mL o una taza de agua fría.
- ◆ Licua a alta velocidad durante 15 segundos.
- ◆ Filtra el licuado con ayuda de un colador y recoge en un beaker de 500 mL.
- ◆ Mide el volumen del filtrado y añade como 1/6 de esa cantidad de detergente líquido; mézclalo con un agitador de vidrio y deja reposar durante 5 a 10 minutos.
- ◆ Vierte la mezcla en tubos de ensayo, llenando solo la tercera parte de estos.
- ◆ Añade un pellizquito de enzima a cada tubo de ensayo y agítalo suavemente. ¡Se cuidadoso! Si lo agitas demasiado fuerte romperás en ADN haciéndolo más difícil de ver.



- ◆ Ladea tu tubo de ensayo y lentamente vierte el alcohol (isopropílico al 95% o alcohol etílico) sobre la pared del tubo de manera que forme una capa sobre la mezcla de arvejas. Sigue vertiendo hasta que tengas en el tubo aproximadamente la misma cantidad de alcohol que de mezcla de arvejas.
- ◆ Observa como el ADN se elevará desde la mezcla de arvejas hasta la capa de alcohol. Puedes usar un palito de madera u otro tipo de gancho para arrastrar el ADN que está en el alcohol.

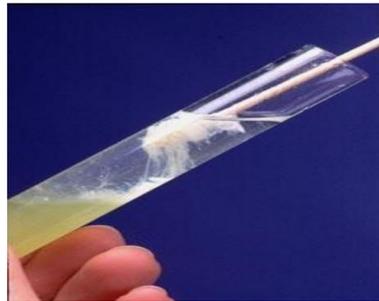


Figura 1. ADN aislado. Genetic Science Learning Center at the Eccles Institute of Human Genetics University of Utah

## V. ACTIVIDADES A RESOLVER

1. ¿Qué acción realiza el detergente sobre la membrana celular de la cebolla?
2. ¿Por qué es necesaria la utilización de detergente en esta práctica?
3. ¿Para qué se utiliza el ablandador de carnes?
4. Consulta de qué manera se utiliza el DNA para estudios de identificación de personas, esto incluye estudios forenses y pruebas de paternidad.
5. Investigue un protocolo de extracción del ADN de un Kit comercial y explique la función de cada reactivo.
6. Consulta acerca de los fundamentos de las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Corte de ácidos nucleicos con enzimas de restricción, Electroforesis de ADN y ARN y secuenciación del ADN.



## **VI. BIBLIOGRAFÍA**

1. Cuéllar Gómez R et al. Curso de formación real time PCR. Field Applications Specialist Bio-Rad Laboratorie. Nov 2014.
2. Genetic Science Learning Center at the Eccles Institute of Human Genetics University of Utah.



## **PRÁCTICA N° 9**

### **REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

#### **I. INTRODUCCIÓN**

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Polymerase Chain Reaction), creada y desarrollada por Millis y col. de la Cetus Corporation, ha desarrollado una poderosa herramienta que cumple con los requisitos de especificidad y sensibilidad que exigen la caracterización de los ácidos nucleicos, pudiendo detectar con ella de forma fácil la presencia de estas biomoléculas en una muestra, aun cuando sus cantidades se enmarcan en el orden de los picogramos. La PCR es un método enzimático in vitro que permite la amplificación de una secuencia específica del ADN.

#### **ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE LA PCR**

La PCR es altamente específica. Solo las secuencias de ADN que se amplifican son aquellas que se encuentran entre los dos fragmentos iniciadores que han hibridado. Un gen presente en una muestra donde el mismo constituya una parte de millón del total del material genético que se analiza, es accesible por PCR. La PCR es exquisitamente sensitiva. Una única molécula de ADN en una muestra puede ser detectada y amplificada.

#### **APLICACIONES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

La secuenciación y clonaje del ADN han sido grandemente simplificados con la introducción de esta técnica, lo que a su vez ha favorecido la tecnología del ADN recombinante.

En medicina su valor diagnóstico es amplio. La detección de bacterias y virus es posible si se utilizan los segmentos iniciadores necesarios. Mediante PCR se puede



revelar la presencia del HIV1 en individuos que no muestran una respuesta inmunológica eficiente ante este agente y que pueden pasar como no infectados cuando se utilizan las técnicas de inmunodiagnóstico rutinarias. La búsqueda del *Mycobacterium tuberculosis* en tejidos es lenta y laboriosa, con la PCR la presencia de tan solo 10 bacilos por millón de células humanas, puede ser detectada.

El PCR constituye un método promisorio en el diagnóstico precoz de determinados tipos de cáncer. Esta técnica permite determinar la mutación de determinado gen controlador del crecimiento celular, por ejemplo los RAS, genes involucrados en la transformación cancerosa. Monitorear la quimioterapia del cáncer es otra posibilidad que nos da la técnica, resultando ideal detener el tratamiento cuando las células cancerosas han desaparecido o reiniciarlo cuando aparecen las recidivas.

En el diagnóstico prenatal, la aparición de nuevos métodos diagnósticos que utilizan la PCR permite identificar individuos enfermos. El trasplante de órganos se facilita cuando por la PCR se hace un estudio del HLA (Human Leucocit Antigen) del donante y del receptor.

En medicina legal, su aplicación es amplia. El repertorio genético de un individuo es altamente distintivo. La amplificación de múltiples genes puede esclarecer el grado de parentesco entre dos individuos o su procedencia racial.

El análisis de la sangre o semen de un individuo por PCR puede ser valioso en caso de asaltos y violaciones. Los restos celulares presentes en una colilla o un cabello presente en la escena del crimen, pueden donar suficiente material genético como para llegar al autor.

## **II. FUNDAMENTO**

Esta técnica se basa en el uso de dos oligonucleótidos que luego de reconocer la secuencia complementaria en la molécula de ADN, son alargados cíclicamente mediados por la acción de la ADN Polimerasa. Cada ciclo de la técnica generalmente



20 o 30 en total, implica la desnaturalización del ADN, el apareamiento de los oligonucleótidos y la síntesis del nuevo fragmento de ADN a partir del oligonucleótido, lo que resulta en un crecimiento exponencial de millones de copias del fragmento seleccionado. La reacción de síntesis es catalizada por una ADN Polimerasa termoestable, obtenida del *Thermus aquaticus*.

### **LA Taq POLIMERASA**

Esta enzima fue aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*, que habita en aguas termales y que tienen una temperatura óptima alrededor de los 90°C. Esta enzima al igual que la ADN polimerasa de *E. coli*, tiene tres centros activos en su cadena polipeptídica única, cada uno claramente separado del otro. Existe un centro con actividad ADN Polimerasa 5' a 3', otro con actividad exonucleasa (correctora de prueba) 3' a 5' y que desempeña una importante función en la polimerización al eliminar bases no complementarias.

Por último muestra actividad exonucleasa 5' a 3' que completa la actividad 3' a 5' exonucleasa, pero que es totalmente diferente a ésta y se produce por ruptura de un enlace fosfodiéster terminal o en un enlace alejado del extremo 5' que se encuentre o no en una zona de doble hélices. Su índice de error de incorporación es de 1 en 4 x 10 bases y amplifica segmentos de hasta 3000 pb.

### **Cebadores para PCR**

Al igual que otras ADN polimerasas, la *Taq* polimerasa solo puede hacer ADN si hay un **cebador**, una corta secuencia de nucleótidos que proporciona un punto de partida para la síntesis de ADN. En una reacción de PCR, la región de ADN que será copiada, o amplificada, se determina por los cebadores que él o la investigadora elija.

Los cebadores para PCR son pedazos cortos de ADN de cadena sencilla, generalmente de unos 20 nucleótidos de longitud. En cada reacción de PCR se utilizan dos cebadores que están diseñados para flanquear la región blanco (la región que debe ser copiada). Es decir, les agregan secuencias que harán que se unan a cadenas



puestas del molde de ADN solo en los extremos de la región a copiar. Los cebadores se unen al molde mediante complementariedad de bases.

### **III. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

Conocer la importancia de la aplicación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar los reactivos utilizados en la realización de la PCR.
- Conocer la importancia de la amplificación del ADN in vitro.

### **IV. MATERIALES Y REACTIVOS.**

- DNA en una dilución de 10mg/ul.
- Placas de PCR 96 pozos.
- Agua destilada estéril libre de DNasa.
- Gen de referencia.
- Fluorocromo (Eva Green, SyBR Green, Taqman).
- Pipetas de 1 ul y de 100 ul.
- Guantes de nitrilo.

### **V. PROTOCOLO DE REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA.**

No podemos referir un protocolo único que permita el montaje de esta técnica en el laboratorio, ya que diferentes compañías anuncian en sus revistas especializadas estuches comerciales de aplicación en el diagnóstico o la investigación, donde se describe la técnica con especificaciones de tiempo, temperatura y número de ciclos.

Los parámetros cambian según el fabricante, pero, de forma general, todos los protocolos descritos cumplen con un procedimiento de tres pasos en cada ciclo, estos son: Desnaturalización, Alineamiento y extensión.



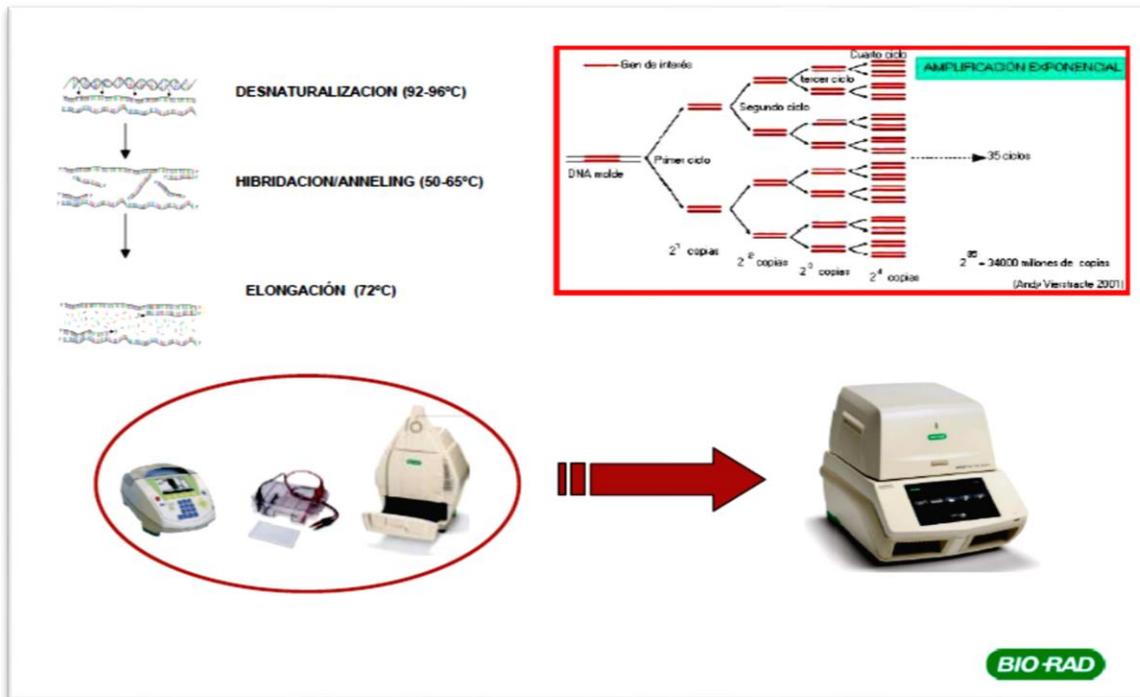
A continuación, se describe en qué consiste cada uno de ellos.

**Desnaturalización:** aquí se separan o desnaturalizan las dos cadenas complementarias del ADN blanco, esto se logra aumentando la temperatura de la reacción 92-98°C durante un tiempo que va de 30 a 90 segundos.

**Alineamiento:** consiste en el apareamiento específico entre los fragmentos iniciadores (oligonucleótidos) y las cadenas simples del ADN desnaturalizado, para ello se disminuye la temperatura de la reacción hasta 50 o 60°C. Este paso tiene una duración de 30 a 60 segundos.

**Extensión:** En este paso la ADN polimerasa extiende la longitud de los fragmentos iniciadores que se encuentran unidos al ADN blanco, originando nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas del ADN desnaturalizado presente al inicio de la reacción debe aumentarse hasta 70 ó 74°C. Esta etapa tiene una duración promedio de 30 a 90 segundos.

El próximo ciclo se inicia en el mismo tubo, con los mismos componentes de la mezcla de reacción que se han puesto en cantidad suficiente desde el primer ciclo, solo que ahora existe el doble de cadenas sencillas de ADN blanco a copiar.



**Raquel Cuéllar Gómez, Field Applications Specialist, Bio-Rad Laboratories.** Curso Avanzado de PCR en tiempo real de BIO- RAD.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

Cuéllar Gómez R. Field Applications Specialist, Curso Formación Real Time PCR Bio-Rad Laboratories. España. Nov 2014.



## **PRÁCTICA N° 10**

### **ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.**

#### **I. INTRODUCCIÓN**

La electroforesis en gel de agarosa se utiliza comúnmente para separar moléculas en función de su carga, tamaño y forma. Se trata de un medio de separación especialmente eficaz para las biomoléculas cargadas como el ADN, el ARN y las proteínas.

A pesar de que la electroforesis en gel de agarosa sea una técnica simple y fácil, posee dotes de separación eficaces. El gel se fabrica disolviendo polvo de agarosa en una solución tampón hirviendo. A continuación, se deja enfriar la solución a 55°C y se vierte en un soporte, donde se solidifica. Se sumerge después el soporte en un equipo de electroforesis de electrodos que contiene solución tampón.

Para preparar las muestras para la electroforesis, éstas se mezclan con componentes que les agregan densidad, como el glicerol o la sacarosa. Estos proporcionan a las muestras más densidad que la del tampón de electroforesis.

Las muestras pueden entonces colocarse por medio de una micropipeta, o pipeta de transferencia, en las rendijas visibles en el gel con la ayuda de una plantilla. Por su densidad, las muestras se sumergen en la solución tampón y permanecen en los pocillos.

El equipo de electroforesis se conecta a una fuente de corriente continua directa y se somete a tensión. Las moléculas cargadas contenidas en las muestras penetran en los capilares del gel. Las moléculas de carga neta negativa migran hacia el electrodo positivo del aparato de electroforesis (ánodo), mientras que las moléculas de carga neta positiva migran hacia el electrodo negativo (cátodo). Dentro de ciertos márgenes, cuanto más fuerte sea el campo eléctrico, más rápido migran las moléculas. El tampón



sirve a la vez para conducir la electricidad y para controlar el pH. Efectivamente, el pH tiene una influencia sobre la carga y la estabilidad de las moléculas biológicas.

La agarosa es un polisacárido derivado del agar. En este experimento utilizamos Ultra-Spec Agarose™. Este componente se constituye de una mezcla de agarosa y de hidrocoloides que hacen que el gel sea transparente y resistente. El gel contiene capilares microscópicos que actúan como "tamices" moleculares. Las propiedades del gel determinan la velocidad de migración de las moléculas: las pequeñas moléculas migran más rápidamente que las grandes. Además, las moléculas de misma masa y carga pueden tener formas distintas: las de forma más compacta (las formas redondeadas son más compactas que las formas alargadas) migran más rápidamente.

Factores como la carga, el tamaño y la forma de las moléculas, así como las características del tampón de electroforesis, la concentración del gel y la potencia eléctrica, tienen un impacto sobre la movilidad de las moléculas en el gel. Entre las moléculas de masa y forma molecular semejante, las más cargadas migrarán con mayor rapidez. Por otra parte, distintas moléculas interactúan en medida distinta con la agarosa. Cuanto menos simple sea la interacción, más lenta es la migración de las moléculas.

En este experimento, someteremos diversas muestras a la electroforesis mediante gel de agarosa y observaremos la velocidad y la dirección de su migración.

## **II. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo de este experimento consiste en desarrollar una comprensión básica de la teoría de la electroforesis y en adquirir práctica con los procesos de separación de diversas moléculas a través de la electroforesis horizontal sobre gel.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Conocer la aplicabilidad de las técnicas de biología celular y molecular en el diagnóstico médico.
- Comprender la importancia de la determinación de marcadores genéticos en el diagnóstico médico.



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### MUESTRAS DE ELECTROFORESIS READY-TO-LOAD™

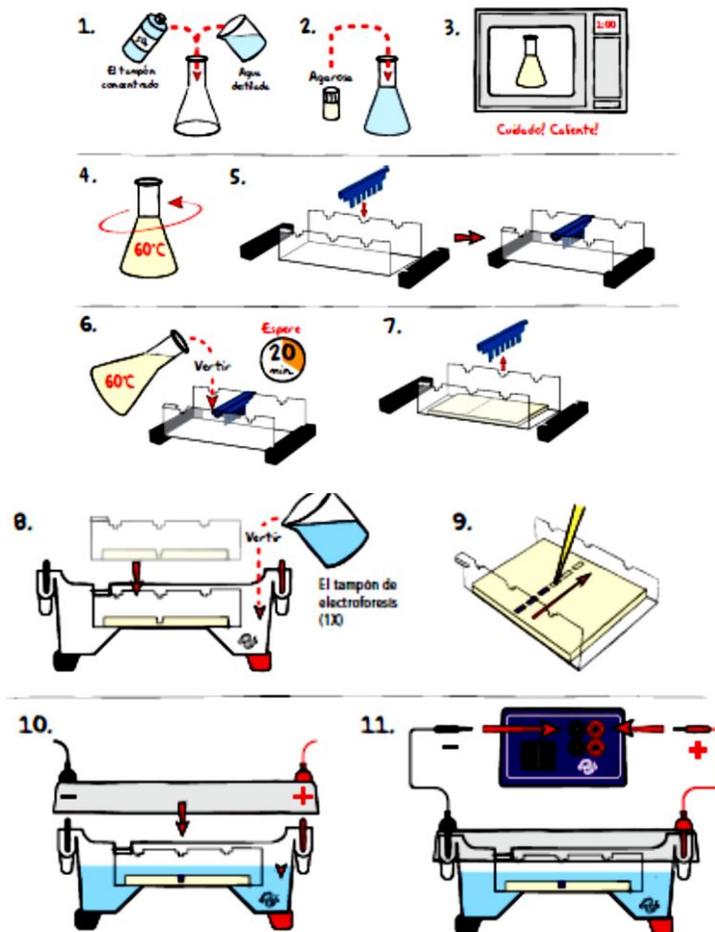
### IV. PROCEDIMIENTO

#### Preparación del gel de agarosa.

- a. DILUIR el tampón concentrado (50x) en agua destilada para obtener tampón 1x (ver Tabla A).
  - b. MEZCLAR el polvo de agarosa con el tampón 1x en un matraz de 250 mL (ver Tabla A).
  - c. DISOLVER el polvo de agarosa, poniendo la solución a hervir. CALENTAR la solución en el microondas durante 1 minuto a alta temperatura. RETIRAR con cuidado el matraz del microondas y MEZCLAR la solución agitando con cuidado el matraz. Continuar CALENTANDO la solución por periodos de 15 minutos hasta que la agarosa esté completamente disuelta (la solución debe tener un color claro como el agua).
  - d. Dejar ENFRIAR la agarosa hasta 60°C agitando con cuidado el matraz para permitir una disipación homogénea del calor.
  - e. Mientras la agarosa se enfría, CERRAR el soporte por medio de los tornillos de caucho de los sujetadores. SITUAR el molde (peine) en la ranura central.
2. VERTIR la solución de agarosa enfriada en el soporte. El gel debería solidificarse al cabo de veinte minutos máximo. El gel se reafirma y se vuelve menos transparente al solidificarse.
  3. RETIRAR los tornillos de los sujetadores y el peine. Al quitar el peine, tenga cuidado de no estropear los pocillos.
  4. METER el gel (soporte) en la cuba de electroforesis. CUBRIR el gel con el tampón de electroforesis 1x (ver volúmenes recomendados en la Tabla B). El gel debe estar completamente sumergido.



5. AGUJEREAR el envoltorio del QuickStrip™ con la punta de una pipeta. DEPOSITAR las muestras (35 - 38  $\mu$ L) en los pocillos en el orden especificado en la Tabla 1.
6. CERRAR la tapa de seguridad. VERIFICAR que el gel esté situado en la dirección correcta.
7. CONECTAR los enchufes con la fuente de corriente y REALIZAR la electroforesis (ver duraciones y voltajes en la Tabla C).
8. Una vez que haya completado la electroforesis, RETIRE el gel y el soporte de la cuba de electroforesis y VISUALICE el gel de agarosa.



Edvotec. Edvo-kit 101: principios y práctica de la electroforesis en gel de agarosa. The Biotechnology Education. Biotechnology education Company, USA. 2019



Tabla A Gel Individual UltraSpec-Agarose de 0,8%				
Talla del molde de gel	50x Tampón concentrado	+ Agua destilada	+ Cantidad de agarosa	= Volumen total
7 x 7 cm	0,6 ml	29,4 ml	0,23 g	30 ml
7 x 10 cm	1,0 ml	49,0 ml	0,39 g	50 ml
7 x 14 cm	1,2 ml	58,8 ml	0,46 g	60 ml

Tabla B Tampón de electroforesis 1x (tampón de cubeta)			
Talla del soporte de gel	Volumen total necesario	Dilución	
		50x Tampón concentrado	+ Agua destilada
M6+	300 ml	6 ml	294 ml
M12	400 ml	8 ml	392 ml
M36	1000 ml	20 ml	980 ml

Tabla C Duración y voltaje (gel de agarosa de 0,8%)		
Voltios	Tipo de electroforesis	
	M6+	M12 et M36
	Min / Max	Min / Max
150	15/20 min	25 / 35 min
125	20/30 min	35 / 45 min
75	35 / 45 min	60 / 90 min

Tabla 1 : Carga del gel		
1	Tubo A	Naranja
2	Tubo B	Morado
3	Tubo C	Rojo
4	Tubo D	Azul 1
5	Tubo E	Mezcla de colorante
6	Tubo F	Mezcla de colorante azul (Azul 1 + Azul 2)

Edvotec. Edvo-kit 101: principios y práctica de la electroforesis en gel de agarosa. The Biotechnology Education. Biotechnology education Company, USA. 2019

## V. BIBLIOGRAFÍA

Edvotec. Edvo-kit 101: principios y práctica de la electroforesis en gel de agarosa. The Biotechnology Education. Biotechnology education Company, USA. 2019



# CORPORACIÓN UNIVERSITARIA RAFAEL NÚÑEZ

## Campus Cartagena

Centro Comercial Pasaje de la Moneda

Cra. 8B #8-56

Tel. 6517088 Ext 1202

## Campus Barranquilla

Cra 54 #66-54

Tel. (5) 3602197 Ext 110

[www.curn.edu.co](http://www.curn.edu.co)

Institución Universitaria | Vigilada Mineducación

Reconocimiento personería jurídica: Resolución 6644 del 5 de junio de 1985 Mineducación.

