

# DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR POR RFLP

Ref. PCRCOLEST (4 prácticas)

## 1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

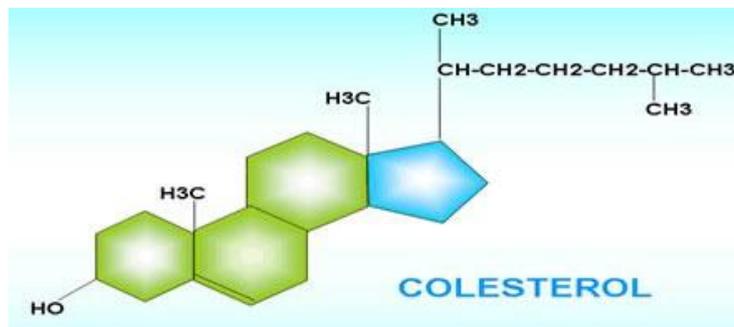
**El objetivo de este experimento es introducir a los estudiantes en los principios y práctica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como herramienta para el diagnóstico genético de enfermedades relacionadas con el colesterol.**

**Los estudiantes adquirirán conocimientos básicos sobre la molécula del colesterol y las posibles enfermedades cardiovasculares asociadas.**

## 2. INTRODUCCION

### 2.1 Colesterol

El colesterol es un componente fundamental de las membranas celulares. Regula la fluidez de la membrana y es precursor de hormonas esteroideas y de la vitamina D. Se transporta en sangre en forma de lipoproteínas. Los distintos tipos de lipoproteínas y sus niveles en sangre son factores determinantes en la aparición de enfermedades cardiovasculares.



El colesterol es un esteroide componente fundamental de las membranas celulares. También se encuentra almacenado dentro de las células en forma de ésteres de colesterol. Sus funciones principales derivan de su papel como componente de las membranas y de su naturaleza esteroidea ya que es precursor de hormonas esteroideas como la testosterona y la aldosterona y de la vitamina D. El colesterol proviene de la dieta o, en su mayor parte, de la síntesis endógena en el hígado. La enzima HMG-CoA reductasa cataliza el primer paso de la síntesis de colesterol.

El colesterol es transportado en sangre unido a proteínas (apolipoproteínas), en forma de ésteres de colesterol, constituyendo los quilomicrones, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL). La LDL transporta el colesterol del hígado a los tejidos mientras que la HDL lo transporta de los tejidos al hígado para su excreción con la bilis, por eso a veces se le denomina "colesterol bueno". El colesterol de la bilis puede ser de nuevo reabsorbido. Además, el colesterol es precursor de las sales biliares.

## 2.2 La enfermedad: Hipercolesterolemia familiar

El colesterol es esencial para la vida pero un exceso en el suero puede tener consecuencias negativas. Se ha establecido que cantidades elevadas de colesterol en sangre, especialmente el LDL, a veces denominado "colesterol malo" está relacionado con enfermedades cardiovasculares.

Niveles elevados de colesterol indican la necesidad de una reducción del colesterol mediante la dieta y otros cambios en el estilo de vida, y a menudo la utilización de medicación. Las estatinas, que son inhibidores competitivos de la HMG-CoA reductasa, se están usando con muy buenos resultados en el tratamiento de la hipercolesterolemia.

En la mayoría de las células existen receptores de LDL que endocitan la LDL para liberar posteriormente el colesterol dentro de las células. El colesterol de la LDL es el que se acumula en las placas ateroscleróticas. Por el contrario niveles bajos de HDL aumentan el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. El colesterol de la dieta disminuye la biosíntesis de colesterol en el hígado, induce la formación de esteres de colesterol intracelularmente y disminuye la síntesis del receptor de LDL. Al disminuir el receptor de LDL aumenta el colesterol extracelular lo que implica riesgo cardiovascular. Hay tipos de hipercolesterolemia debidos a factores genéticos. **En la hipercolesterolemia familiar (HF) una mutación en el gen del receptor de LDL provoca la acumulación extracelular de LDL** ya que no pueden eliminar eficientemente el LDL de la circulación. El resultado de esta deficiencia resulta en que el LDL permanece en la circulación y se acumula en las paredes arteriales. **Los pacientes que son heterocigotos** para esta mutación, por tanto, poseen un gen funcional y disponen del 50% de receptores que los individuos sanos. **Los pacientes que son homocigotos** para esta mutación, por tanto, no disponen de receptores para LDL y poseen niveles extremadamente elevados de colesterol en sangre, a veces, mayores de 600 mg/ml suero (150-200 mg es considerado normal). Si estos pacientes no son tratados, normalmente mueren muy jóvenes de enfermedad arterial coronaria.

También hay causas secundarias que provocan hipercolesterolemia, como la diabetes o alteraciones hepáticas.

## 2.3 El análisis por RFLP y la PCR

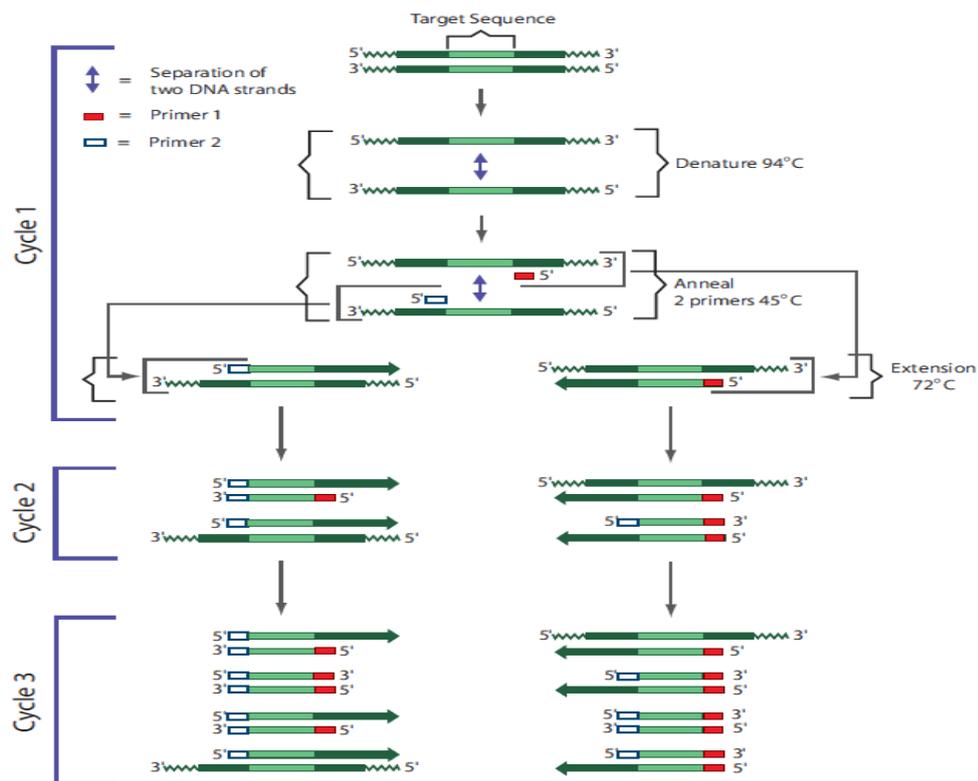
La mutación puede ser detectada mediante diagnósticos genéticos basados en análisis de **RFLP (restriction fragment length polymorphism) o polimorfismo en la longitud los fragmentos de restricción**, es decir, existen variaciones en el lugar de restricción en regiones del ADN de individuos sanos frente a individuos enfermos.

En los análisis de RFLP, una región específica del ADN dentro o cerca del gen causante de la enfermedad, **es primero amplificada utilizando la PCR**,

A) En una reacción de PCR, el primer paso es la preparación de la muestra de ADN que es extraída de varias fuentes biológicas o tejidos. En la PCR, el ADN o gen a amplificar se define como "target" (diana) y los oligonucleótidos sintéticos utilizados se definen como "primers" (cebadores). Un set de 2 cebadores de entre 20-45 nucleótidos que son sintetizados químicamente para que se correspondan con los extremos del gen a amplificar. Cada cebador se une a uno de los extremos de cada cadena de ADN y es el punto de inicio de la amplificación.

Una reacción típica de PCR contiene ADN molde, Taq polimerasa y los 4 dNTPS en un tampón de reacción apropiado. El volumen total de reacción es de 25-50 µl. En el primer paso de la reacción de PCR, las cadenas complementarias de ADN se separan (desnaturalizadas) la una de la otra a 94°C, mientras que la Taq polimerasa permanece estable. En el segundo paso, conocido como emparejamiento, la muestra es enfriada a una temperatura entre 40-65°C que permita la hibridación de los 2 cebadores, cada uno a una hebra del ADN molde. En el tercer paso, conocido como extensión, la temperatura es

elevada a 72°C y la Taq polimerasa añade nucleótidos a los cebadores para completar la síntesis de una nueva cadena complementaria.



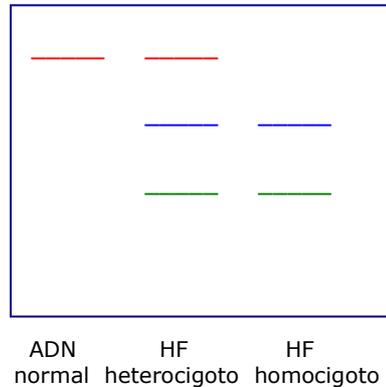
Estos tres pasos, desnaturalización-empareamiento-extensión, constituye un ciclo de PCR. Este proceso se repite durante 20-40 ciclos amplificando la secuencia objeto exponencialmente. La PCR se lleva a cabo en un termociclador, un instrumento que es programado para un rápido calentamiento, enfriamiento y mantenimiento de las muestras durante varias veces. El producto amplificado es luego detectado por separación de la mezcla de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa.

B) En este caso, seguido a la reacción de la PCR, la región amplificada es digerida con enzimas de restricción específicos. **Si el paciente posee una mutación el gen del receptor del LDL, el patrón de digestión que se puede observar en un gel de agarosa es diferente al observado en pacientes sanos.**

**En esta práctica se realizará una PCR simulada ya que el instrumento para llevar a cabo la PCR tiene un coste muy elevado, para ello se utilizarán colorantes NO TOXICOS que migrarán en el gel de agarosa como si se tratasen de los fragmentos de ADN resultantes de la digestión del fragmento amplificado con enzimas de restricción.**

#### 4. EXPOSICIÓN DE LOS HECHOS

Tenemos la familia Gracia donde el padre y la madre son heterocigotos para la mutación de la HF, tienen 2 niños y se les va a realizar un diagnóstico genético mediante RFLP de la mutación HF para establecer en qué grado pueden padecer la enfermedad.



A partir del resultado observado en el gel de agarosa, se podrá establecer si los pacientes son normales, heterocigotos o homocigotos para la mutación HF. El ADN de los pacientes que son heterocigotos para la mutación tendrá un alelo normal y otro mutado. Los individuos homocigotos tendrán los 2 alelos mutados.

#### 5. COMPONENTES

Tampón de electroforesis concentrado 10 X (2 envases 500ml)	2 x 50 ml
Agarosa	1.75 gr
Micropipeta 20 microlitros	1
Rack de puntas	1
Microtubos de muestras	6

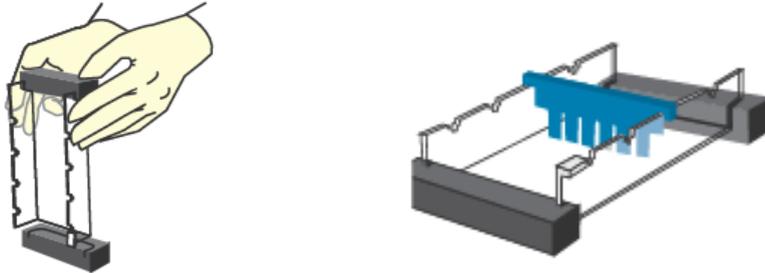
**Añadir 450 ml de agua destilada a cada envase de Tampón de electroforesis 10 X para elaborar 2 x 500 ml de Tampón de electroforesis 1 X que es el Tampón de trabajo.**

## 6. PRACTICA

### 6.1 PREPARACION GEL DE AGAROSA

#### A) Preparación del molde

Coger el molde para hacer los gels y cerrar los extremos con los topes para que no se salga la agarosa. Después colocar el peine para formar los pocillos.



#### B) Preparación del gel de agarosa

1.b) Utilizar un vaso o erlenmeyer de 100 ml para preparar la solución del gel:

2.b) **Para gels de 7 x 7 cm:** Añadir **32 ml de Tampón de electroforesis 1 X** más **0.30 gr de agarosa**, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa.

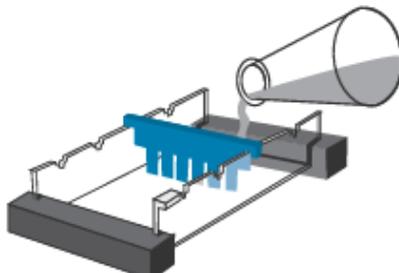
**Para gels de 7 x 10 cm:** Añadir **42 ml de Tampón de electroforesis 1 X** más **0.40 gr de agarosa**, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa

**Asegurarse que se ha añadido los 450 ml de agua destilada al Tampón de electroforesis 10 X**

3.b) Calentar la mezcla para disolver la agarosa, el método más rápido es la utilización de un microondas, también puede utilizarse un placa calefactora, en ambos casos, para que la agarosa se disuelva se ha de llevar **la solución a punto de ebullición**. La solución final debe aparecer clara sin partículas aparentes.

4.b) **Enfriar** la solución de agarosa más o menos a 55°C (para acelerar el proceso se puede enfriar colocando el envase debajo de un grifo de agua y agitar). Si se produce mucha evaporación del líquido, añadir tampón de electroforesis.

5.b) Añadir la solución de agarosa al molde.

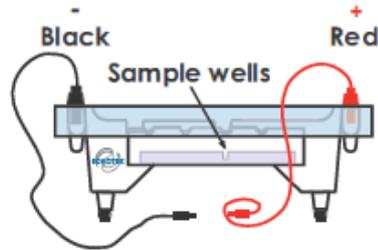


6.b) Permitir que el gel solidifique. Para acelerar el proceso se puede sembrar el gel en una nevera. (si la electroforesis se realizará al día siguiente, conservar el gel a 4°C).

#### C) Preparación del gel para la electroforesis

1.c) Después que el gel se ha solidificado con mucho cuidado sacar los topes.

2.c) Colocar el gel en la cámara de electroforesis correctamente orientada con los pocillos más cerca del polo negativo (color negro).



3.c) Llenar la cámara de electroforesis con **300 ml de Tampón de electroforesis**. **El tampón de electroforesis se puede utilizar para 2 experimentos de electroforesis, una vez terminada la electroforesis guardar este tampón utilizado en un envase diferente al suministrado para utilizarlo en una nueva electroforesis.**

4.c) Asegurarse que el gel está completamente cubierto de tampón.

5.c) Sacar el peine que ha formado los pocillos con mucho cuidado de no romper ningún pocillo.

6.c) Proceder a la siembra del gel y llevar a cabo la electroforesis.

## 6.2 SIEMBRA DEL GEL Y ELECTROFORESIS

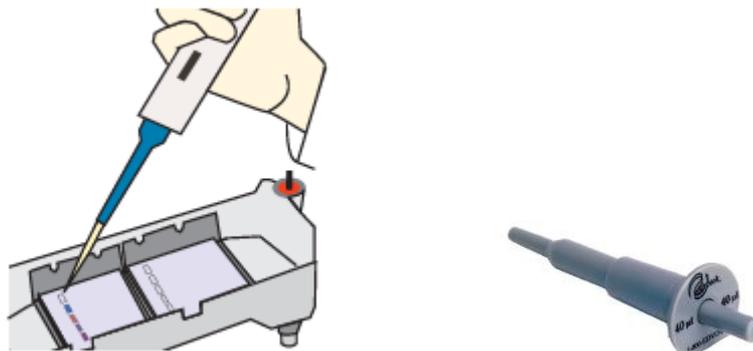
**Nota:** Si usted no está familiarizado con la siembra de geles de agarosa, es recomendable que practique la siembra antes de llevar a cabo el experimento, o llevar a cabo el experimento completo antes de realizarlo con los alumnos.

A) **Muestras de electroforesis:** Chequear el volumen de las muestras. Algunas veces pequeñas gotas de la muestra puede estar en las paredes de los microtubos. Asegurarse de que toda la cantidad de muestra se encuentra uniforme antes de sembrar el gel. Centrifugar brevemente los microtubos de muestra, o golpear los microtubos contra una mesa para obtener toda la muestra en la parte inferior del microtubo.

1.a) Se suministran 6 muestras diferentes presentadas en 6 tubitos cada uno de un color, sembrar o cargar las muestras en el siguiente orden:

Pocillo	Muestra	Descripción
1	<b>Negro</b>	ADN normal
2	<b>Rojo</b>	CONTROL POSITIVO HF
3	<b>Lila</b>	PADRE
4	<b>Azul</b>	MADRE
5	<b>Amarillo</b>	HIJO 1
6	<b>Blanco</b>	HIJO 2

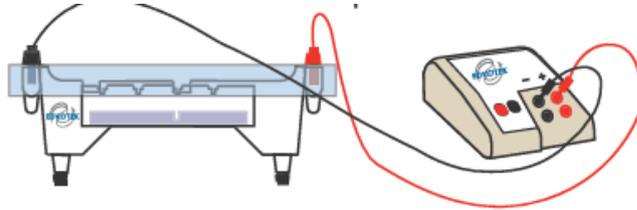
2.b) Sembrar 20 microlitros de cada muestra, utilizar para ello la micropipeta de volumen fijo que se suministra con una punta de pipeta.



## B) Llevar a cabo la electroforesis

1.b) Después que se han sembrado las muestras, cuidadosamente colocar la cubierta del aparato de electroforesis en los terminales de los electrodos.

2.b) Insertar la clavija del cable negro en la entrada de color negro de la fuente de corriente (entrada negativa). Insertar la clavija del cable rojo en la entrada de color rojo de la fuente de corriente (entrada positiva).



3.b) Configurar la fuente de corriente a **75 voltios (30 minutos) o a 150 voltios (20 minutos)** . **Vigilar que los colorantes no salen fuera del gel.**

4.b) Después de 10 minutos empezará a observarse la separación de los colorantes.

5.b) Después de que la electroforesis ha terminado, **apagar la fuente de corriente**, desconectar los cables y sacar la cubierta.

6.b) Colocar el gel en un transiluminador de luz blanca (si no se dispone, una hoja de papel blanco también puede utilizarse).

## 7. RESULTADOS

ADN    HF    Padre Madre Hijo 1    Hijo 2  
Normal Control



Podemos observar claramente del patrón de bandas después de la amplificación por PCR + la digestión con enzimas de restricción que los padres son heterocigotos, mientras que en la descendencia uno de los hijos es homocigoto para el alelo mutado y el otro homocigoto para el alelo normal.

## **8. PREGUNTAS Y RESPUESTAS SOBRE LA PRÁCTICA**

**Una serie de preguntas se pueden realizar a los alumnos sobre la práctica:**

1. **¿Qué es la Hipercolesterolemia familiar?** Es una enfermedad genética dominante en la cual una o más mutaciones existen el gen del receptor para la LDL.
2. **Como ambos padres son heterocigotos, ¿cuál es la probabilidad de que los hijos estén o no afectados por la enfermedad?** Como la mutación es dominante existe un 50 % de probabilidad de que los hijos sean heterocigotos y un 25 % de que estén totalmente afectados por la enfermedad (homocigotos).
3. **¿En qué grado están afectados los hijos 1 y 2?** El hijo 1 no está afectado por la enfermedad al tener las 2 copias del gen buenas, mientras que el hijo 2 es homocigoto y por tanto está afectado totalmente por la enfermedad.
4. **¿Qué es un análisis de RFLP y cómo puede ser utilizada par buscar enfermedades genéticas?** Esta técnica permite establecer una correlación entre la diferencia en el número de lugares de restricción y una cierta enfermedad. Esto producirá diferencias en la longitud de los fragmentos amplificados por PCR situados cerca del gen que produce una enfermedad al ser digeridos con enzimas de restricción específicos.
5. **¿Por qué hay 2 diferentes cebadores o "primers" en la PCR?** Presentan una secuencia diferente que coincide con el inicio y final del gen o secuencia a amplificar (ADN molde).
6. **¿Por qué es tan importante evitar tener niveles elevados de colesterol en sangre?** El exceso de colesterol tiende a acumularse en el interior y exterior de las arterias formando placas que puede llevar a bloquear las arterias resultando en sufrir ataques cardiacos o ictus al verse bloqueado el flujo sanguíneo.
7. **¿Qué son las estatinas?** Se ha descubierto recientemente que las estatinas inhiben la síntesis de colesterol en el hígado y de este modo se reducen los niveles de colesterol en sangre.

**Para cualquier duda o consulta adicional, por favor, contacte con nosotros [bioted@arrakis.es](mailto:bioted@arrakis.es)**