ISBN 970-27-1045-6

IDENTIFICACIÓN DEL GENOTIPO ALU TPA-25 EN ESTUDIANTES DEL CUCBA: UNA EXPERIENCIA TEÓRICO-PRÁCTICA PARA LOS CURSOS DE GENÉTICA MOLECULAR

Ricardo Romero Guevara, Jesús Aguirre Gutíerrez, Mariana Chávez Lozano, Juan Jesús Ruelas Medina, Alma Rosa Villalobos Arámbula.

Laboratorio de Genética, Departamento de Biología Celular y Molecular

Introducción

La familia Alu, llamada así por tener secuencias de restricción para la endonucleasa *Alu*I, son regiones de DNA cortas, dispersas y moderadamente repetitivas, (SINE por sus siglas en Inglés) que se encuentran a lo largo del genoma de primates y humanos, y que se han insertado por un proceso de retrotransposición, es decir, tomando como base un molde de RNA, para sintetizar un DNA que luego se inserta de manera azarosa en el genoma. Muchas de estas inserciones han ocurrido en el último millón de años por lo que su presencia no es universal, este es el caso del locus Alu TPA-25, que se encuentra en el intrón del gen activador del plasminógeno tisular en el cromosoma 8, y cuyo dimorfismo (presencia o ausencia) puede detectarse mediante una PCR. Este locus ha sido ampliamente utilizado en estudios de genética de poblaciones en humanos y debido a ello se escogió para este trabajo.

Las prácticas de laboratorio son un elemento indispensable para el buen aprovechamiento de los alumnos, además de ser un nicho para poner en práctica los conocimientos aprendidos durante el curso así como las aplicaciones y técnicas más utilizadas. A pesar de esto, las prácticas suelen presentarse a los alumnos como técnicas aisladas que se emplean en los laboratorios de genética molecular de todo el mundo, pero les resulta complicado relacionar estas con un objetivo de investigación.

Este trabajo incorpora tres de las técnicas más ampliamente utilizadas en el laboratorio; extracción de DNA, PCR que es una reacción que permite amplificar una secuencia específica de DNA y por último, la electroforesis en geles de agarosa que permite visualizar las secuencias amplificadas, todo esto dentro de un mismo protocolo de prácticas dirigido a los estudiantes. Además de lo anterior el trabajo emplea el modelo del equilibrio de Hardy-Weinberg como uno de los análisis matemáticos de mayor impacto en la Genética de poblaciones para el cálculo y comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas del locus Alu TPA 25.

Justificación

Los alumnos de los cursos de Biología Molecular y de Genética no cuentan con una experiencia en la que cada práctica ocupe un punto determinante dentro de una secuencia lógica de pasos (extracción de DNA, PCR, electroforesis, determinación de los genotipos y

análisis y discusión de los datos obtenidos) a seguir en un proceso experimental típico para alcanzar un objetivo de investigación como es el análisis de las frecuencias alélicas del locus TPA-25.
Así, en este trabajo se pretende practicar las tres técnicas más utilizadas en Biología molecular y Genética Evolutiva. En particular llevar a cabo una experiencia teórico-práctica para los estudiantes de Biología Molecular, Genética Avanzada y Genética Evolutiva que siga una secuencia lógica y que incorpore las tres técnicas más empleadas de Biología molecular, y Genética poblacional. Además de estandarizar las técnicas de extracción de DNA, las condiciones de PCR y electroforesis; elaborar una base de datos con los resultados de la práctica, disponible a los alumnos, y finalmente calcular las frecuencias alélicas y genotípicas del locus Alu TPA-25 y compararlos con lo predicho por el modelo de Hardy-Weinberg.

Material y Métodos

El estudio se llevo a cabo en el CUCBA con los alumnos de los cursos de Genética Avanzada, Genética Evolutiva y Biología molecular de Octubre de 2004 a Junio de 2006. Su experiencia en el laboratorio se dividió en cuatro etapas, previamente se enseño a los alumnos los fundamentos teóricos de cada una de las etapas, así como las aplicaciones del análisis de *loci* polimórficos, dentro de los cuales se encuentra la familia Alu.
1ª etapa.-**Extracción DNA.** Se obtuvo un extracto celular de mucosa bucal empleando una solución salina de NaCl 0.9% para producir la lisis osmótica y después se transfirió un baño María hirviendo para producir la lisis por efecto de la temperatura, previamente se adicionó la resina Chelex 10% al tubo con las células y la sal, pues tiene el efecto de fijar los iones positivos como el hierro que son cofactores para las endonuecleasas.
También se ensayo otro protocolo para la extracción de DNA de folículo de cabello que se basa en la digestión con Proteinasa K. Finalmente, se comparó la eficiencia de los dos protocolos ensayados.
2ª etapa.- **PCR.** Las condiciones de PCR se modificaron en los primeros experimentos con el fin de optimizar los resultados empleándose finalmente concentraciones de 2.5 □ de los iniciadores Alu 1 (5´-GTA GTT CCG TAA CAG GAC AGCT-3´), Alu2 2.5□M (5´-CCC CAC CCT AGG AGA ACT TCT CTTT-3´). El programa de amplificación incluye: desnaturalización prolongada a 94ºC por 4min, 30 ciclos (94ºC 1min, 58ºC 2min, 72ºC 2min), extensión prolongada 72ºC 10min.
3ª etapa.- **Electroforesis**. La concentración de agarosa optima fue de 3.5%, ya que la de 2% que se utilizo en los primeros experimentos no permitía una correcta separación de la banda de 100pb con la banda del dímero-iniciador lo que dificultaba la visualización y determinación de los genotipos.
4ª etapa.- **Análisis estadístico.** Los alumnos determinaron el genotipo de su propia muestra al analizar las bandas amplificadas en la fotografía del gel. Con estos datos se elaboró una base de datos para determinar frecuencias genotípicas y alélicas , posteriormente se ensayó el modelo Hardy-Weinberg. Finalmente se calculó el estadístico $\square^2$ con grados de libertad n-1.

Resultados y Discusión

1. Amplificación de la Inserción Alu TPA-25

La inserción Alu TPA-25 de 311pb que se encuentra en el intrón 8 del gen activador del plasminógeno tisular en el cromosoma 8, puede ser detectada mediante una PCR con primers específicos dirigidos a diferentes secuencias que se encuentran a uno y otro lado del locus, amplificándose para nuestro caso un fragmento de 100 pb en caso de ausencia (-) y otro de 400 pb en presencia de la inserción (+), al respecto cabe señalar que la concentración que marca el protocolo (agarosa al 2%), no permitió la correcta separación de las bandas, en particular el fragmento de 100pb con respecto al dímero cebador (que se forma al final de la reacción de PCR por la asociación entre cebadores). Por lo tanto, al modificar la concentración del gel de agarosa a 3.5% estas aparecen mas compactadas y separadas, lo que permite distinguir el fragmento de 100pb del dímero cebador (Figura 1).

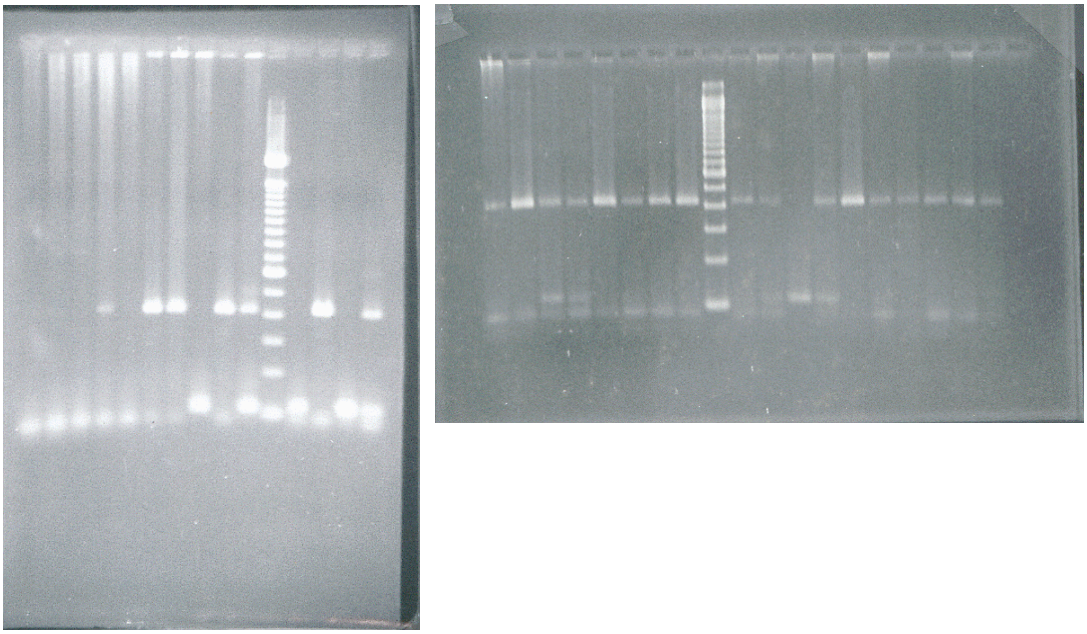

Fig. *1* A la izquierda un gel de agarosa 2%, compare el genotipo de un individuo heterocigoto (+/-) del ultimo carril., con el tercer carril en el gel de la derecha preparado con agarosa al 3.5%.

2. Protocolos de Extracción de Material Genético

La extracción de material genético a partir de mucosa bucal y folículo de cabello, representa una manera de obtener DNA mediante un método no invasivo, seguro y atractivo para los alumnos, ya que son metódos que se aplican en la realidad, por ejemplo, en los estudios forenses se obtiene DNA de muestras pequeñas de estos tejidos, ya que con frecuencia pueden estar presentes en la escena del crimen. Así, en este trabajo se probó la eficiencia en la amplificación cuando se extrajo el material de folículo de cabello y de

mucosa bucal. En la tabla 1 aparecen el número de muestras procesadas con cada método y el porcentaje de amplificación. Se puede apreciar que el método de extracción a partir de Mucosa bucal es mucho más eficiente con 93% de las muestras amplificadas en comparación con el 55% del otro método (folículo de cabello); a pesar de lo anterior, se continuará trabajando en la optimización del método de extracción de material genético a partir de folículo de cabello, ya que a los alumnos les resulta más fácil pues el número de pasos a seguir es mucho menor en comparación con el protocolo alternativo, este punto puede ser determinante si se toma en consideración que los grupos son numerosos (45 alumnos por grupo) y que las dudas que puedan tener aunado a la probabilidad de cometer un error se multiplican cuando los protocolos son más largos y laboriosos. Además, el protocolo de extracción de folículo de cabello tiene una utilidad potencial mayor para los biólogos, ya que al momento de trabajar con mamíferos de poblaciones silvestres, es uno de las maneras mas factibles de obtener material genético del animal sin poner en riesgo su salud ni la del colector.

Tabla 1 *Eficiencia de los protocolos de extracción de material genético.*

		% de amplificación	
Tipo de Tejido	**n**	**Amplificados**	**Sin amplificación.**
Mucosa Bucal	193	**93%** (180)	**7%**(13)
Folículo de cabello	121	**55%** (67)	**45%**(54)

3. Análisis del Equilibrio Hardy Weinberg

Después de determinar los genotipos de los 109 alumnos del CUCBA a través de los geles de agarosa al 3.5 % e incorporarlos a una base de datos, fue posible determinar la siguiente distribución genotípica:

Homocigotos +/+ =41 H
Heterocigotos +/- =30 Hh
Homocigotos -/- =38 h

n = 109

Con estos datos, la frecuencia alélica puede calcularse como sigue si denominamos al alelo que cuenta con la inserción (+) **p** y al que carece de ella (-) **q**:

$$p = (41)\ 2 + 30/2\ (109)$$

$$p = 0.51$$

$$q = (38)\ 2 + 30/2\ (109)$$

$$q = 0.49$$

Posteriormente con las frecuencias alélicas y de acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg (**$p^2+2pq+q^2$**) para una población bastante grande y que se reproduce al azar, en ausencia migración, selección y mutación, la distribución genotípica seria la siguiente:

$$\mathbf{p^2(109) = 28.77}$$

$$\mathbf{2pq(109) = 54.46}$$

$$\mathbf{q^2(109) = 25.77}$$

$$\square^2=\sum (o-e)^2/e$$

$$\square^2 =21.98638$$
$$gl =3-1=2$$

Valor Crítico=5.991 *p=0*.05
H0 se rechaza.

Al comparar las frecuencias genotípicas observadas con las esperadas, el estadístico $\square^2$, superior al valor crítico con grados de libertad 2 nos dice que la ***ho*** se rechaza pues contiene la condición de igualdad entre los datos, para aceptar la hipótesis sería necesario que los datos esperados se aproximaran más a los observados, cosa que no sucede. En otras palabras, lo que el estadístico nos quiere decir es que una desviación cómo la que tenemos con respecto a lo predicho por el modelo es demasiado grande como para atribuirla al azar y por lo tanto es más factible decir que los datos son diferentes.

La razón de esta desviación no esta clara, en la literatura se ha mencionado que el locus Alu TPA-25 es útil por que se localiza en una región intrónica y que por ello no es una característica sujeta a selección natural, esto es así para muchos miembros de la familia Alu. Además, se menciona que cada evento de inserción de uno de estos elementos puede considerarse único; por lo tanto, las diferencias en heterocigocidad o en las proporciones genotípicas se deben ante todo al efecto fundador de la población en esa región, desgraciadamente no existen muchas publicaciones de las frecuencias genotípicas de Alu TPA-25 en México, aún menos en la región, por lo que no es posible comparar nuestros datos, para conocer que tanto se ajustan a los de toda la población. Cabe resaltar que aunque la ***ho*** se haya rechazado esto no implica que los cálculos o los datos puedan considerarse erróneos o insuficientes, ya que bases de datos de Estados Unidos muestran también que las frecuencias genotípicas de este *locus* presentan una gran variación de población a población lo que soporta el argumento del efecto fundador.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Patricia Castro Félix por la asistencia técnica en la determinación de algunos genotipos y al Ocean. Salvador Velazquez Magaña por su apoyo en el análisis estadístico. Este trabajo fue financiado por la Universidad de Guadalajara con el Programa de Incorporación Temprana a la Investigación 2006 para ARVA.

Bibliografía

Bloom M. v., Freyer G. A., Micklos D.A., Laboratory DNA Science: An Introduction to Recombinant DNA Techniques and Methods of Genome Analysis. The Benjamins/Cummings Publishing Company, Inc. 1996.

Frost, DeLong Laura, Peart T. Sharifa. 2003 "DNA Isolation from Dried Blood Sample, PCR Amplification and Population Analysis". Biochemistry and Molecular Biology Education. Vol.31 (6). Pp 418-421.

Harold M.A. Joel, A.T. Horwitz B. 2004. "Enhancing Active Learning in The Student Laboratory". Adv. Physiol Educ. Vol 28 pp 107-111.

Hartl L. Daniel, Clark G. Andrew. 1997. "Principles of Population Genetics" pp503.

Nasidze Ivan, Risch Gregory, Robichaux Myles, Stoneking Mark, Bartzer Mark, Sherry Stephen. 2001. "Alu Insertion Polymorphisms and the Genetic Structure of Human Population from The Caucasus." European Journal of Human Genetics. Vol. 9 pp 267-272.

Ravindranath V. M., Lakshmi N., Ramesh M., Veerraju P. 2005 "Alu Insertion/Deletion Polymorphisms in Yadava Population of Anddhra Pradesh, South India". Int J Hum Genet, Vol. 5 (3). Pp 223-224

Tamarin, Robert H. 1996. "Principios de Genética". EDITORIAL REVERTÉ. Barcelona. España.

William S. Klug., Cummings R. Michael. 1999. "Conceptos de Genética". PRENTICE HALL. Madrid. España.

The ALele FREcuency Database (ALFRED)
http://alfred.med.yale.edu/alfred/recordinfo.asp?condition=sites.site_uid