

# DIAGNÓSTICO GENÉTICO DEL CÁNCER HEREDITARIO

Ref. PCRCAN (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 aquellos cánceres con un componente hereditario.**

**Los estudiantes adquirirán conocimientos básicos sobre la biología molecular del cáncer estudiando el caso de un gen supresor de tumores como el p53.**

## 2. INTRODUCCION

### **2.1 Genes supresores de tumores.p53**

Se han identificado muchos factores que contribuyen a la aparición del cáncer, incluyendo la exposición a ciertos carcinógenos en nuestra dieta y medio ambiente. Además, se han encontrado algunas formas de cáncer que tienen una tendencia familiar. **Este grupo de cánceres aparecen unidos a la herencia de genes supresores mutados, como el p53.**

Aunque los cánceres familiares colectivamente constituyen una pequeña fracción del total del cáncer conocido, se presentan como un modelo de herencia dominante. Las mutaciones que son directamente heredadas se corresponden con **mutaciones en la línea germinal**, estas mutaciones pueden ser detectadas en los pedigrís familiares. Un segundo tipo de mutaciones, conocidas como **mutaciones somáticas**, no tienen una causa genética directa y son adquiridas durante la vida del individuo.

Con el avance de las aplicaciones de la biología molecular a la medicina, los mapas de genes y su localización en los cromosomas se ha utilizado **como herramienta para la identificación de la predisposición a varias enfermedades**. El procedimiento para obtener tal información incluye la extracción del ADN y el análisis de la mutación en áreas calientes para genes relacionados con el cáncer, **como el p53**.

El estudio de cánceres heredados ha contribuido a que los biólogos moleculares que estudian el cáncer tengan la oportunidad para buscar genes que son críticos en el desarrollo normal de las células y la carcinogénesis. A nivel molecular, la formación de un cáncer se caracteriza por la alteración tanto en **oncogenes** dominantes y **genes supresores de tumores** como el p53. Estos genes supresores de tumores dan lugar a proteínas que limitan el crecimiento celular. Por el contrario, los oncogenes están implicados en promover el crecimiento celular.

Actualmente, la proteína supresora de tumores p53 se ha convertido en el centro de varios estudios biológicos del cáncer, hay mucho interés en comprender como funciona este gen en las células normales comparadas con las células cancerígenas. Este gen se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 y codifica para una fosfoproteína nuclear. En una célula normal funciona como un regulador celular.

Actualmente hay evidencias que el p53 normal es una proteína que se une al ADN en una secuencia específica que actúa como regulador de la transcripción. Si presenta una mutación, perderá esta función de unirse al ADN y promoverá el crecimiento celular incontrolado y por tanto funcionará como un oncogén.

Para que un gen supresor de tumores como el p53 juegue un papel en la transformación en cáncer, es necesario que ambos alelos estén mutados.

La proteína p53 presenta 3 dominios. El primero contiene la región amino la cual contiene la región activadora de la transcripción. La segunda es la región central donde se encuentran la mayoría de las "**zonas calientes**" de mutaciones, estas zonas se llaman así porque son las zonas donde las mutaciones se detectan con una elevada frecuencia, dentro de esta región existen 5 subregiones donde se detectan las mutaciones puntuales en cánceres humanos. El tercer dominio es la sección carboxílica que contiene las secuencias de oligomerización.

Ejemplos de zonas calientes incluyen los codones 165 y 175 en el exón 5; 196 y 213 en el exón 6; 245 y 248 en el exón 7; 273 y 282 en el exón 8; todas ellas dentro de la proteína p53. Varias de estas mutaciones dan lugar a proteínas p53 con una conformación alterada, esto puede llevar a cambios que resultarán en un incremento de la estabilidad de las proteínas mutantes y su capacidad para unirse a proteínas p53 normales de forma que las inactivarán.

Es de especial interés comentar que existe una correlación entre el lugar de la mutación y el tumor que produce. Un ejemplo es la mutación en el aminoácido 175 lo cual es común del carcinoma de colon pero raramente observado en el carcinoma de pulmón.

## 2.2 La enfermedad: El síndrome de Li-Fraumeni

**El síndrome de Li-Fraumeni (LFS)** es una enfermedad rara autosómica dominante que afecta a pacientes jóvenes y que consiste en una predisposición a desarrollar un amplio rango de tumores.

La definición histórica y clásica se basa en criterios familiares, por ejemplo en la observación de un sarcoma en un paciente por debajo de los 45 años, que tiene o bien un pariente de primer grado que ha desarrollado cualquier tipo de cáncer antes de la edad de 45 años, o algún pariente de segundo grado que haya tenido un cáncer o sarcoma antes de la edad de 45 años. Es difícil de estimar la incidencia de esta enfermedad rara ya que su definición suscita un problema de clasificación nosológica. Los tumores más característicos son los osteosarcomas, sarcomas de tejido blando, cáncer de mama en sujetos jóvenes, leucemias/linfomas, tumores cerebrales y adenocarcinoma; sin embargo, se puede observar cualquier tipo de tumor. **Se halla una mutación germinal del gen p53 en el 70% de las familias con LFS**, así como en algunas familias o pacientes con patrones de la enfermedad sugestivos del síndrome, sin cumplir estrictamente los criterios. El riesgo de desarrollar cáncer para un paciente portador de una mutación deletérea en el gen p53 es del 15% a los 15 años, del 80% para las mujeres de 50 años de edad, y del 40% para los hombres de la misma edad; la diferencia significativa entre sexos se explica casi enteramente por los cánceres de mama. El riesgo de desarrollar un segundo cáncer, especialmente un cáncer inducido por radiaciones, es alto. El consejo genético es difícil, debido al amplio espectro de tumores y su aparición a cualquier edad, especialmente durante la infancia.

Ninguna medida de vigilancia puede considerarse efectiva a excepción de aquellas encaminadas a los cánceres de mama en mujeres con edades superiores a 20 años.

El síndrome de Li-Fraumeni está causado por alteraciones genéticas germinales en el gen supresor de tumores *p53*, localizado en la sección 13.1 del brazo corto del cromosoma 17 (17p13.1). Este gen consta de 11 exones y codifica un mRNA de 2,8 kb que da lugar a una proteína de unos 20 minutos de vida media que se localiza principalmente en el núcleo, aunque también puede detectarse en el plasma en fase G1 y durante la síntesis de DNA, ya que la función de *p53* es de control del ciclo celular durante la fase G1 mediante la transactivación de genes que codifican proteínas con actividad supresora de crecimiento. Sin embargo, *p53* no resulta necesaria para el crecimiento y funcionamiento normal de la célula, **sino para suprimir el desarrollo de tumores**. En situaciones de hipoxia o de daño al DNA las concentraciones de *p53* se incrementan rápidamente, paralizando el ciclo celular en la fase G1, lo que permite a la célula tener tiempo para reparar el DNA y, en caso de no ser posible, inducir la apoptosis.

Entre el 73-88% de las mutaciones germinales que tienen lugar en el gen *p53* se agrupan entre los exones 5, 6, 7 y 8 que corresponden con la región central de *p53*. Se trata de una región muy hidrofóbica y altamente conservada que presenta actividad de unión al DNA e interactúa con las secuencias diana de los genes que sufrirán transactivación transcripcional.

Así pues, las alteraciones genéticas en el gen supresor de tumores *p53* contribuyen al desarrollo de diferentes cánceres. En primer lugar, las mutaciones germinales generan predisposición a la aparición temprana de diversos tumores en el síndrome de Li-Fraumeni, tal y como se ha descrito anteriormente. Pero, en ocasiones, también se presentan mutaciones somáticas que pueden generar la aparición de tumores. En estos casos, la prevalencia de las zonas donde se desarrollan los tumores varía respecto al síndrome de Li-Fraumeni. Los cánceres más frecuentemente causados por mutaciones somáticas en el gen *p53* –en proporción– son, entre otros, el cáncer de ovario, colorrectal, esófago, cabeza y cuello, laringe, pulmón, páncreas, etc. En general estas mutaciones son más frecuentes en los subtipos más agresivos.

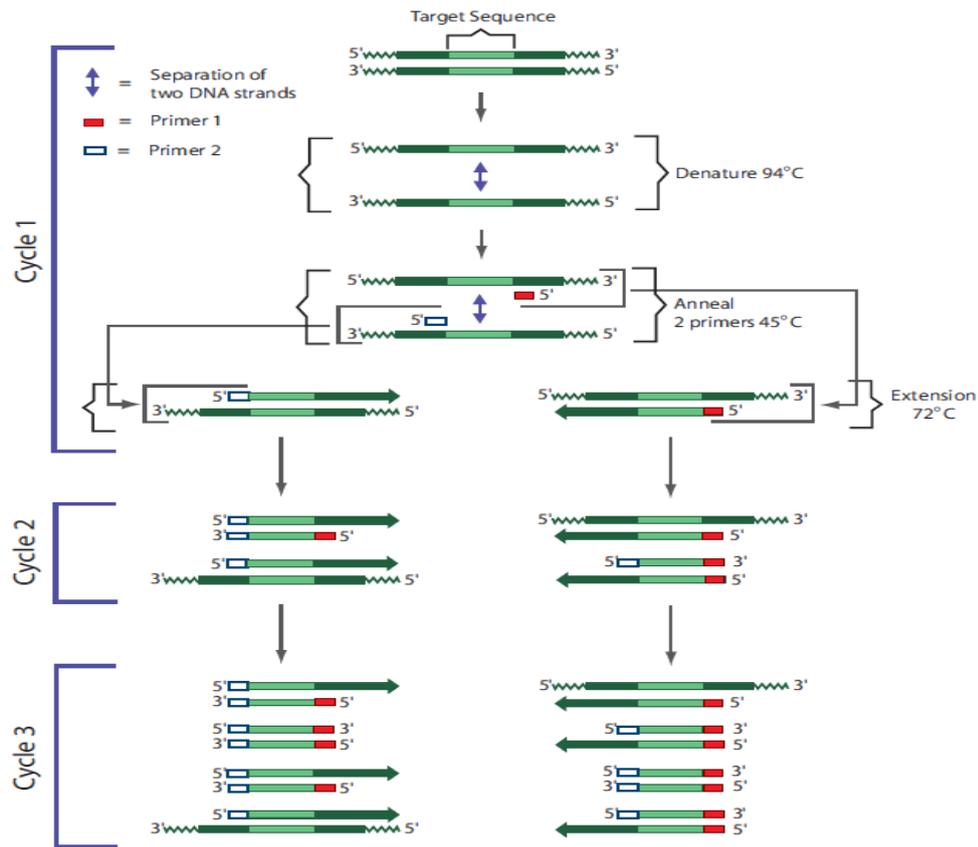
La heterogeneidad de los síntomas y tumores asociados al síndrome de Li-Fraumeni es la causa que induce a pensar a los especialistas que este síndrome se encuentra infradiagnosticado, así como de que su diagnóstico sea más tardío de lo que sería deseable. Las técnicas de biología molecular, especialmente las basadas en secuenciación, permiten en la actualidad un diagnóstico más eficaz y seguro, precoz y más temprano y, en ocasiones, permite su asociación con determinados pronósticos.

### 2.3 El análisis por PCR

La detección de cualquier mutación asociada al síndrome de Li-Fraumeni o de cualquier mutación somática localizada en el gen *p53* mediante **amplificación por PCR seguida de secuenciación directa**. Para la detección de mutaciones germinales asociadas al síndrome de Li-Fraumeni se recomienda iniciar el estudio por los exones 5, 6, 7 y 8 donde se localizan la mayoría de alteraciones, con la posible reducción de tiempo y coste que conlleva en la mayoría de los casos.

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  $\mu$ l. 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-emparejamiento-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.

**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.**

### 3. EXPOSICIÓN DE LOS HECHOS

Nelia Hurtado de 36 años, se encontró una pequeña masa irregular después de su palpación mamaria rutinaria ya que su madre había sufrido una mastectomía. El diagnóstico fue cáncer de mama. Parte del trabajo del oncólogo consiste en preguntar sobre el cáncer en la historia familiar.

Después de consultar con su madre, observamos que la familia paterna está libre de cáncer mientras que en la familia materna se observa que ha habido varios casos de cáncer. Esto lleva a pensar al oncólogo una posible presencia del síndrome de Li-Fraumeni. En este caso, se suele realizar un test diagnóstico secundario. **Nelia proporciona una muestra de sangre y biopsia del tumor para realizar un análisis del ADN para el gen p53.**

Normalmente el procedimiento consiste en amplificar el gen utilizando la PCR seguido de alguno de los diferentes métodos para detectar la presencia de una mutación puntual en las "zonas calientes" conocidas.

En este experimento de simulación, el ADN amplificado del gen p53 obtenido de Nelia será digerido con un enzima de restricción que reconoce la secuencia mutada y dará lugar a un patrón de bandas en una electroforesis en gel de agarosa. En paralelo, se realizará lo mismo con un control normal de ADN amplificado que nos proporcionará un patrón de bandas diferente.

Nelia tiene 3 niños menores de 15 años, si se detecta la presencia del síndrome de Li-Fraumeni, será conveniente hacer un estudio en los hijos para ver si lo padecen y en su caso establecer medidas de control.

### 4. 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	4

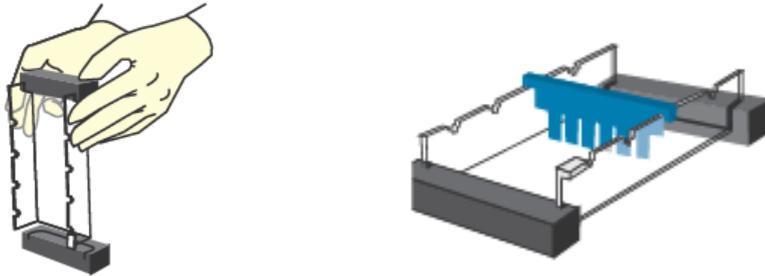
**Añadir 450 ml de agua destilada a cada envase de Tampón de electroforesis 10 X para elaborar 2 x 500 ml de Tampón de electroforesis 1 X que es el Tampón de trabajo.**

## 5. PRACTICA

### 5.1 PREPARACION GEL DE AGAROSA

#### A) Preparación del molde

Coger el molde para hacer los geles 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 geles 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.

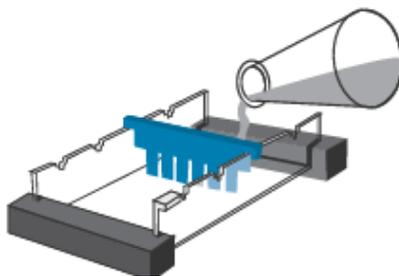
**Para geles de 7 x 10 cm:** Añadir **42 ml de Tampón de electroforesis 1 X** más **0.40 gr de agarosa**, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa

**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.

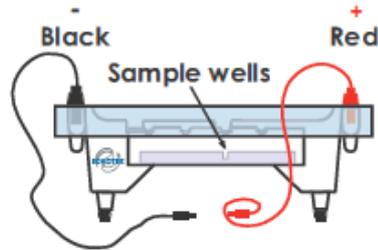


6.b) Permitir que el gel solidifique. Para acelerar el proceso se puede sembrar el gel en una nevera (si la electroforesis se realizará al día siguiente, conservar el gel a 4°C).

#### 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.

## 5.2 SIEMBRA DEL GEL Y ELECTROFORESIS

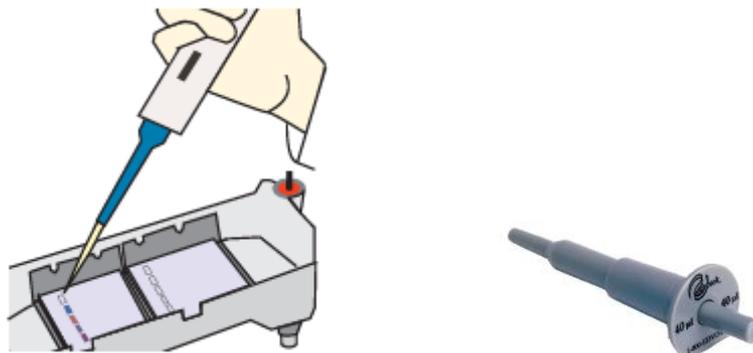
**Nota:** Si usted no está familiarizado con la siembra de geles de agarosa, es recomendable que practique la siembra antes de llevar a cabo el experimento, o llevar a cabo el experimento completo antes de realizarlo con los alumnos.

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 4 muestras diferentes presentadas en 4 tubitos cada uno de un color, sembrar o cargar las muestras en el siguiente orden:

Pocillo	Muestra	Descripción
1	<b>Verde</b>	Marcador peso molecular
2	<b>Negro</b>	ADN normal
3	<b>Rojo</b>	ADN sangre (tejido normal) de Nelia
4	<b>Lila</b>	ADN tumor de la biopsia de Nelia
5	<b>Azul</b>	ADN tejido mamario normal de la biopsia

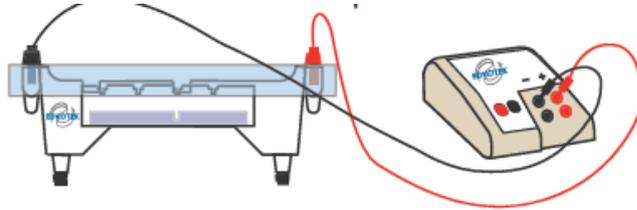
2.b) Sembrar 20 microlitros de cada muestra, utilizar para ello la micropipeta de volumen fijo que se suministra con una punta de pipeta.



## 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).



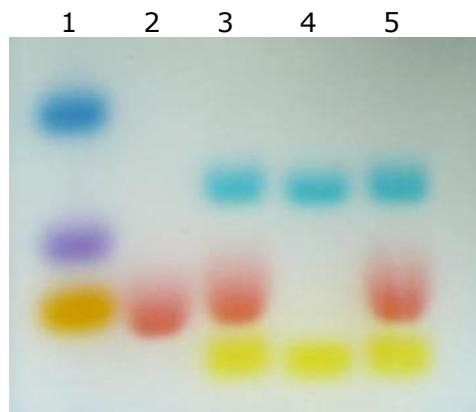
3.b) Configurar la fuente de corriente a **75 voltios (30 minutos) o a 150 voltios (20 minutos)**. **Vigilar que los colorantes no salen fuera del gel.**

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).

## 6. RESULTADOS



1: Marcador de peso molecular.

2: ADN normal para el gen p53, el alelo no contiene lugares de restricción para el enzima.

3: ADN sangre (tejido normal) de Nelia. Se observa que presenta un alelo normal y otro mutado para el gen p53.

4: ADN tumor de la biopsia de Nelia que muestra el patrón de banda para el gen p53 mutado.

5: ADN tejido mamario normal de la biopsia. Se observa que presenta un alelo normal y otro mutado para el gen p53.

## **7. PREGUNTAS Y RESPUESTAS SOBRE LA PRACTICA**

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

1. **¿Cuál es la diferencia entre gen supresor de tumores y oncogén?** Los genes supresores de tumores como el p53 dan lugar a proteínas normales que limitan el crecimiento celular. Por el contrario los oncogenes promueven el crecimiento celular. Si existen mutaciones en alguno de ellos puede dar lugar al crecimiento celular incontrolado (cáncer).
2. **¿Por qué la muestra del tumor de Nelia presenta un patrón con menos bandas que de la muestra de sangre?** La muestra de sangre de Nelia contiene bandas que representan un alelo normal y un segundo que está mutado para el gen p53, por tanto, el patrón de bandas es la suma de ambos. El tumor representa que ambos alelos están mutados resultando un patrón de bandas que es un subconjunto del de sangre.
3. **¿Qué propósito tiene el control normal?** En todos los experimentos, especialmente en los análisis biomédicos, los controles son necesarios para obtener resultados que no sean artefactos o lleven a error.
4. **¿Cuál es la función de los 4 nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en una reacción de PCR?** Los 4 dNTPs son los componentes del ADN. Para la síntesis de ADN se requiere un ADN molde y 2 cebadores, la cadena opuesta del molde es sintetizada siguiendo la regla de emparejamiento de bases de Watson-Crick.
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. **¿Te harías un análisis genético de este tipo para saber si tienes predisposición a padecer cáncer?**

Entre el 5 y 10 % de los tumores viene dado por la herencia de una mutación genética, pero investigar este tipo de cáncer supone avanzar en el conocimiento de todos los demás. Los más frecuentes son los de mama y colon.

Los estudios sobre cáncer hereditario se enfrentan a varias preguntas: ¿cómo interpretar las mutaciones de los genes clave de cáncer? ¿qué otras causas genéticas o no influyen en la aparición de esos tumores? ¿qué relación existe entre el cáncer de colon que desarrolla el padre y el cáncer de mama que sufre su hija? ¿por qué ha aparecido antes el cáncer en el hijo de 30 años que en el padre de 60? ¿cómo se producen los cambios genéticos y qué papel juegan aquellos más sutiles en la proliferación de células cancerígenas? Y, ¿cómo aplicar las nuevas tecnologías a la secuenciación de estas mutaciones, y sobre todo, para saber interpretarlas? Dar respuestas a estas incógnitas y otras, significará poder desarrollar tratamientos más eficaces y seguros que poder ofrecer al enfermo, y dar a la familia alternativas de prevención.

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