

PEARLS OF LABORATORY MEDICINE

www.traineecouncil.org

TÍTULO: Cápsula de Medicina de Laboratorio: Análisis de dosis génica

PRESENTADORA: Ibi Aseyori

Diapositiva 1:

Hola. Soy la Dra. Ibi Aseyori, Subdirectora de Laboratorio en Immufood, Instructora en la Universidad del Pueblo, y consultora de tiempo parcial para Trinity Lab Services. Bienvenidos a esta Cápsula de Medicina de Laboratorio sobre el “Análisis de Dosis Génica”.

Diapositiva 2:

Espero que al final de esta presentación:

- Hayan aprendido acerca de los efectos de dosis génica
- Comprendan las pruebas disponibles para el análisis de dosis génica
- Hayan adquirido un conocimiento funcional de las tendencias actuales en la investigación, tratamiento y práctica de dosis génica.

En seguida el esquema de esta presentación:

- Empezaremos con una introducción general y revisaremos algunos términos como base para entender lo que es la dosis génica.

- Luego hablaremos de cómo hacemos pruebas para detectar los efectos de dosis génica y cómo realizamos el análisis de dosis génica utilizando enfoques que abarcan todo el genoma, como la secuenciación de nueva generación y la secuenciación del exoma completo.
- En seguida revisaremos las tendencias actuales de la investigación; por ejemplo, la mayor parte de la literatura sobre la dosis génica parece enfocarse en investigación sobre el cáncer y la farmacoterapia.

Diapositiva 3:

¿Cuáles son los efectos de dosis génica?

Un efecto de dosis génica ocurre cuando el gen estructural produce una cantidad de producto proporcional a su número de copias.

Existe una “dosis” adecuada para cada gen, por lo que un exceso o una falta de expresión de un determinado gen o conjunto de genes puede ocasionar una disfunción celular y por ende, una enfermedad.

Entre más copias haya de un gen, más producto génico se expresará y viceversa (entre menos copias haya de un gen, menos se expresará el producto de dicho gen; cabe incluso la posibilidad de que no se exprese nada del producto génico).

Por ejemplo, en el síndrome de Down, la expresión génica en el cromosoma 21 se aumenta en un 50%. ¿Por qué? Porque el número de copias del cromosoma 21 ha aumentado de 2 a 3, lo que se conoce como trisomía 21.

Diapositiva 4:

Pero ¿realmente es así de fácil siempre? ¿Podemos siempre seguir la regla general? Sí y no.

Depende. Es complicado porque...

- el número de genes puede o no surtir efectos de dosis;
- el número de un determinado gen puede surtir un efecto de dosis sobre un conjunto distinto de genes y sus productos génicos;
- el número de repeticiones varía de un individuo a otro (lo que llamamos polimorfismos);
- diferentes alteraciones génicas ocasionan diferentes efectos de dosis génica, por ejemplo:
- variante de nucleótido único (SNV por sus siglas en inglés), como su nombre implica, significa que se sustituye un solo nucleótido por otro. En la imagen se ve la sustitución de un solo nucleótido de adenina por timina.

o Las SNV pueden ser raras en una población pero frecuentes en otra.

o Cuando una SNV está presente en por lo menos el 1% de la población, se conoce como polimorfismo de nucleótido único (SNP, por sus siglas en inglés).

Como se podrán imaginar, resultarán diferentes tipos de mutaciones cuando se sustituye un nucleótido por otro. Existen tres tipos de mutaciones SNV, o mutaciones puntuales:

o Una mutación sinónima/mutación silenciosa – es cuando una sustitución de nucleótido no provoca un cambio de aminoácido.

o Una mutación no sinónima/mutación con cambio de sentido – es cuando una sustitución de nucleótido provoca una sustitución de aminoácido. Esto puede o no ocasionar una variante patogénica dependiendo del efecto de la sustitución de aminoácido sobre la función y estructura de la proteína.

Si la mutación con cambio de sentido no da por resultado una variante patogénica, entonces se considera mutación conservativa donde la función de la proteína solo se cambia de

forma leve y las propiedades del aminoácido permanecen iguales (por ej., hidrofobia, hidrofilia, etc.).

Tratándose de una mutación con cambio de sentido no conservativa, se produce un aminoácido de un tipo totalmente diferente, lo que da por resultado una proteína totalmente diferente. Por ejemplo, en la anemia de células falciformes, el gen de la β -globina ubicado en el cromosoma 11 sufre una mutación con cambio de sentido no conservativa donde la adenina se cambia por timina, como se ve en la imagen, y el codón GAG para el ácido glutámico se cambia por un codón GTG para valina.

De ahí que la anemia de células falciformes sea un ejemplo de un efecto de dosis génica que se debe a 2 copias anormales del gen de la β -globina. ¿Por qué? Porque al recibir por herencia 2 copias anormales, la persona tiene menos copias del gen normal de la β -globina, o inclusive no tiene ninguno.

o deja de ganar/ o empieza a perder/ o es mutación sin sentido– es cuando la sustitución de nucleótido da por resultado un codón de terminación que a su vez provoca ya sea el truncamiento prematuro de la proteína, sea una proteína no funcional, sea una reducción en la producción proteica, o en el peor de los casos, la eliminación de la producción proteica. Por ejemplo, la fibrosis quística, similar a la anemia de células falciformes, es un ejemplo de efectos de dosis génica que se debe al recibir por herencia 2 copias mutadas del gen regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR, por sus siglas en inglés) en 7q31.2. Hay veces que las mutaciones sin sentido se deben a una delección de uno o más nucleótidos; otras veces se podrían deber a un polimorfismo de nucleótido único.

Diapositiva 5:

Inserciones/deleciones – las indels suelen abarcar menos de 50 pares base de ADN que se han insertado al genoma o se han eliminado de él.

- Las indels siempre dan por resultado mutaciones por desplazamiento del marco de lectura
- En la imagen se ve un ejemplo de una mutación por desplazamiento del marco de lectura que se dio cuando se insertó una adenina en medio de dos codones CAT, desplazando el marco de lectura de CAT CAT a CAT – ACA – TCA y así sucesivamente

Donde las indels son de < 50 pares base, ocurren mutaciones estructurales cuando el reacomodo genómico abarca más de 50 pares base.

- Las variaciones estructurales pueden deberse a indels, inversiones, translocaciones, duplicaciones o a una combinación de todas ellas.
- Variación de número de copias (CNV, por sus siglas en inglés) es un tipo de variación estructural en la que cambia el número de copias de regiones específicas del ADN; estas regiones pueden quedar eliminadas o bien duplicadas.
 - o El número de copias de un gen en particular varía de un individuo a otro.
 - o Aproximadamente las dos terceras partes del genoma humano consta de repeticiones, de las que entre el 4.8 y 9.5% se clasifican como CNV.
 - o Las CNV se definen como segmentos de ADN de 1 kb o más, y están presentes en un número variable de copias con respecto a un genoma de referencia.
 - o Las CNV pueden surgir debido a una recombinación homóloga entre secuencias repetidas o a mecanismos de recombinación no homóloga que ocurren por todo el genoma.

Diapositiva 6:

- La CNV puede ser rara (es decir, se da en menos del 1% de la población) o común (se observan variantes en más del 5% de la población).
- Cuando las CNV no son heredadas, se conocen como *de novo*, lo que significa que surgen espontáneamente en la población y pueden o no contribuir a la transmisión entre familiares (por ejemplo, el trastorno del espectro autista y el envejecimiento se asocian con mayores riesgos de mutaciones CNV que surgen *de novo*).
- Las ganancias estructurales por CNV pueden ser
 - o duplicaciones o transposiciones insercionales.
- Las pérdidas o deleciones estructurales por CNV pueden ser
 - o heterocigotas (falta solo una copia),
 - o homocigotas (faltan ambas copias),
 - o hemicigotas, donde solo una copia está presente.
- Resulta interesante que la CNV puede observarse en individuos de fenotipo normal.
- Quiere decir que, en su esencia, la CNV es la causa y la dosis génica es el efecto. A veces esas variaciones en el número de copias incluyen varios genes normales o genes sensibles a la dosis.

En resumen:

La CNV y la dosis influyen en una amplia gama de rasgos, se asocian con riesgo de enfermedad (bajo y alto), y explican algunos trastornos que se deben a mutaciones *de novo*.

Diapositiva 7:

En la investigación se está demostrando que el riesgo de enfermedades se asocia a menudo con la CNV y los genes sensibles a la dosis. Por ejemplo, las CNV y los efectos de dosis génica mal adaptados se asocian con:

- trastornos psiquiátricos (por ejemplo, trastorno del espectro autista, trastorno de déficit de atención/hiperactividad (TDAH), discapacidad intelectual y esquizofrenia);
- cardiomiopatías;
- esclerosis lateral amiotrófica (ELA) – Además de los polimorfismos de nucleótido único (SNP), que provocan solo un número limitado de casos de ELA, un número consistente de CNV raras y comunes se han asociado con ELA.
- La enfermedad de Huntington, o EH, es un trastorno neurodegenerativo predominantemente hereditario.

- o CAG se repite más de 36 veces en el gen responsable de la enfermedad.

- o Quiere decir que la longitud mínima de repetición de CAG que se asocia con el fenotipo de Huntington es de 36, pero se han encontrado longitudes de repetición de 36-39 CAG en individuos mayores asintomáticos.

- o Los individuos con 27-35 repeticiones de CAG no se ven afectados por la enfermedad.

- o Dichos individuos no afectados (con 27-35 repeticiones) tienen tramos de CAG más largos en comparación con la población general.

Diapositiva 8:

La dosis normal de un gen es de 2 porque la mayoría de los genes presentes en el genoma humano se encuentran en dos copias.

Por lo tanto, si existen dos copias funcionales de un gen, se tiene una dosis normal del gen y una expresión normal del producto génico.

Si hay más de dos copias funcionales de un gen, entonces este se amplifica y el producto génico se sobreexpresa, dando por resultado anormalidades celulares y posiblemente una enfermedad progresiva, por ejemplo, cáncer.

La dosis génica también se puede ver afectada por la pérdida de una copia funcional del gen, de manera que el producto génico se subexpresa o de plano deje de expresarse, por ejemplo, en trastornos como la discapacidad intelectual y el retraso en el desarrollo.

La compensación de dosis es una manera de equilibrar la expresión de los genes.

Por ejemplo, se ve la compensación de dosis en los cromosomas sexuales:

Las células femeninas tienen el doble de cromosomas X que las células masculinas. Por consiguiente, las células femeninas tendrían que expresar el doble de genes del cromosoma X que las células masculinas, SIN EMBARGO, resulta que NO lo hacen. Las células masculinas y femeninas expresan los genes del cromosoma X al mismo nivel.

¿Cómo? Debido a la compensación de dosis, que puede darse de tres maneras:

A) Inactivación azarosa del X, donde las hembras suprimen la expresión de uno de los dos X, igualándose a la expresión del único X del macho, O BIEN

B) transcripción doble de un X, donde los machos aumentan la expresión de algunos genes de su único cromosoma X, O BIEN

C) transcripción disminuida de ambos X ya sea por machos o hembras, por ejemplo, se selecciona uno de los dos cromosomas X para suprimirse en una etapa temprana del desarrollo en un proceso conocido como inactivación de cromosoma X.

Diapositiva 9:

Tipos de dosis y compensación:

(A) El número de copias del gen estructural es proporcional a la cantidad de producto producido.

(B) Existen también los efectos de transacción directa, donde la expresión de un gen queda modulada en correlación directa con una dosis cromosómica diferente.

(C) La dosis y compensación pueden ser indirectas.

(D) La compensación de dosis también puede darse cuando la expresión de un gen se correlaciona de manera inversa con la dosis de otra región cromosómica. En este caso, la compensación de dosis no cambiaría ni afectaría la expresión porque

- en un efecto de dosis inversa de una región aneuploide se incluyen genes que también se encuentran en el cromosoma alterado, y
- la dosis combinada del gen estructural y la inversa puede producir una expresión casi igual en todas las dosis cromosómicas,
- así que los dos efectos, el del gen estructurado en el cromosoma alterado y el de la dosis inversa, al combinarse se cancelan para producir una expresión casi igual en todas las dosis cromosómicas.

Diapositiva 10:

En resumen, los efectos de dosis génica no se pueden concebir de forma simple, por ejemplo, en términos de tener más o menos de una copia de un gen, o de que múltiples copias de un gen den por resultado una disfunción fenotípica.

Se complica nuestra comprensión de los efectos de dosis por el hecho de que ciertos individuos con pocas mutaciones dañinas sufran de enfermedades graves, mientras que otros con múltiples mutaciones potencialmente nocivas parezcan fenotípicamente normales.

Por ejemplo, la enfermedad de Parkinson. La evidencia ha demostrado que las causas genéticas pueden variar según los antecedentes geográficos y étnicos de las poblaciones estudiadas.

Varía la expresión del producto génico – puede ser más o menos dependiendo de la enfermedad provocada por la variación – y varía la expresión del fenotipo de la enfermedad.

Varían también los mecanismos de la dosis génica.

Por ejemplo, podrían producirse efectos de dosis génica debido a

1. aberraciones genéticas estructurales, como deleciones, duplicaciones, indels, etc.;
2. o variaciones de longitud:
 - uno puede tener repeticiones cortas de dos nucleótidos, como A-C-A-C-A-C- o repeticiones cortas de tres nucleótidos, como C-A-G- en la enfermedad de Huntington,
 - o repeticiones largas en las que se repiten genes enteros.

3. Los efectos de dosis génica también pueden deberse a las mutaciones con pérdida de función.

Varían además los mecanismos de compensación de dosis (como el efecto trans directo, indirecto, etc.), lo que agrega otra capa más de complejidad.

Diapositiva 11:

¿Cómo hacemos pruebas para detectar los efectos de dosis génica? ¿Cómo realizamos el análisis de dosis génica? ¿Cuáles son los enfoques que consideran todo el genoma a la hora de hacer pruebas?

- Entre las pruebas citogenéticas y moleculares tenemos:

- o los cariotipos – que son imágenes de los cromosomas que se examinan a fin de identificar números o estructuras cromosómicos anormales,

- o hibridación fluorescente *in situ* (conocida por sus siglas en inglés FISH) – que es el primer método molecular capaz de detectar CNV genómicas submicroscópicas, pero se trata de un método engorroso en el que se requiere conocimiento previo de las regiones a explorar, por lo que no se emplea FISH para los análisis que abarcan todo el genoma.

- o Microarray, en cambio, es un enfoque de genoma completo que permite rastrear todo el genoma en busca de anomalías, especialmente las CNV:

- o CGH - hibridación genómica comparativa,

- o SNP - polimorfismos de nucleótido único;

- ambas son tecnologías Microarray que se utilizan actualmente para identificar las CNV pero no son capaces de detectar CNV cortas.

- La secuenciación, en cambio, puede detectar variantes de baja frecuencia. Dos métodos de secuenciación son:

- o NGS –secuenciación de nueva generación,

- o WES –secuenciación del exoma completo.

- PCR –reacción en cadena de la polimerasa:
 - o PCR cuantitativa en tiempo real es un método eficiente para examinar regiones genómicas en busca de CNV. Sin embargo, esta técnica no permite la amplificación y cuantificación simultánea de un número alto de objetivos en una sola reacción.
 - o mPCR-RETINA - prueba múltiple de invasores en tiempo real, basada en PCR.
- MLPA - amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples es un enfoque alternativo puntual basado en PCR que permite el análisis simultáneo de múltiples objetivos (hasta 40) con un par de primers, lo que reduce la probabilidad de que se arrojen resultados confusos de qPCR debido a diferentes condiciones de las reacciones.

Diapositiva 12:

Cabe mencionar estos otros enfoques:

prueba de relación de parálogos (PRT);

conteo molecular de número de copias (MCC);

los enfoques múltiples basados en PCR, como

hibridación de sonda amplificable múltiple (MAPH),

PCR múltiple cuantitativa de fragmentos fluorescentes cortos (QMPSF),

y cuantificación de amplicones múltiples (MAQ).

Diapositiva 13 & 14:

- En las tendencias actuales de la investigación se pone la mira en la variación de la dosis génica y cómo los cambios asociados en la expresión génica inciden en una amplia gama de rasgos en humanos, plantas, enfermedades, etc.

- Las CNV pueden afectar el fenotipo a través de la dosis génica, o bien interfiriendo con los genes funcionales. Por lo tanto, las CNV pueden quedar expuestas a la presión selectiva durante la evolución.

- Además de los SNP, un número consistente de CNV comunes y raras se asocia con enfermedades.

o La CNV se ha reconocido como una fuente predominante de variación genética entre los individuos humanos.

Gran parte de la investigación sobre la dosis génica parece enfocarse en el cáncer y la farmacoterapia.

Diapositiva 15:

Farmacoterapia

- Conforme se amplíen los estudios que relacionan la CNV con las enfermedades, crecerá a la par nuestra comprensión de la diversidad humana, las causas y desarrollo de enfermedades complejas, y la resistencia a las enfermedades, lo que permitirá el desarrollo de estrategias mejoradas para diagnóstico y tratamiento, y de medicina personalizada en forma de farmacogenética.
- Con la farmacogenética se pretende estudiar las variantes génicas asociadas con las enzimas responsables del metabolismo de los fármacos, con los transportadores, con los receptores de fármacos, para así aliviar la carga de enfermedad causada por las diferencias interindividuales de respuesta a fármacos o por las vulnerabilidades a las toxicidades de los fármacos, por ejemplo,

o CYP2D6, (cromosoma 22), un gen clave para la metabolización de los fármacos, que no solo hospeda múltiples variantes genéticas que afectan la función enzimática, sino que también muestra una amplia gama de alelos híbridos y con números de copias diferentes en varias poblaciones de pacientes.

Edición genómica

- La edición genómica ofrece una manera de hacer cambios a partes específicas de un genoma, agregando, quitando o alterando en lugares particulares del genoma.
- Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente inter-espaciadas (conocido por sus siglas en inglés, CRISPR) y Cas9 (proteína 9 asociada a CRISPR).

o Actualmente, la mayor parte de la investigación sobre la edición genómica se realiza para comprender las enfermedades utilizando las células y los modelos de animales. Los científicos todavía están trabajando para determinar si este enfoque es seguro y eficaz para usarse en las personas. Se está explorando en investigaciones sobre una amplia variedad de enfermedades, incluyendo trastornos monogénicos como la fibrosis quística, la hemofilia, y la enfermedad de células falciformes.

Terapia Génica

- Se trata de un tipo de tratamiento que utiliza el material genético con la esperanza de cambiar la trayectoria de una enfermedad.
- Un vector/paquete popular es el virus adenoasociado, conocido por sus siglas en inglés, AAV.

- Aunque muchas terapias génicas se encuentran en la fase de investigación temprana o de pruebas clínicas, algunas ya han sido aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos.

Diapositiva 16:

La terapia génica inició hace más de 40 años. Nuestros conocimientos combinados con los adelantos tecnológicos han producido grandes avances en el campo.

En 2017, tras extensas investigaciones en laboratorios y en pruebas clínicas con humanos en todo el mundo, las primeras terapias génicas fueron aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para uso en los Estados Unidos.

Ya para enero de 2020, la FDA había aprobado 2 productos de terapia génica.

Además, la FDA aprobó dos inmunoterapias celulares basadas en genes para que se usen a partir de enero 2020.

Hasta la fecha, la FDA ha recibido más de 900 solicitudes para investigar terapias génicas en pruebas clínicas.

Se trata de una nueva época de la medicina fundamentada en los efectos de dosis génica.