



Universidad del Sureste

Licenciatura en Medicina Humana

Docente:

Q.F.B. Alberto Alejandro Maldonado López

Alumno:

Russell Manuel Alejandro Villarreal

Semestre y grupo:

8 "B"

Materia:

Biología Molecular en la Clínica

Proyecto:

Ensayo

Comitán de Domínguez, Chiapas a; 26 de mayo de 2023.

POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO

El polimorfismo, en lo que se refiere a la genómica, es la presencia de dos o más formas variantes de una secuencia específica de ADN que puede producirse entre diferentes personas o poblaciones. El tipo más frecuente de polimorfismo implica la variación en un nucleótido único (también denominado polimorfismos de nucleótido único, o SNP). Otros polimorfismos pueden ser mucho más grandes y abarcar segmentos más largos de ADN. La definición estricta de polimorfismo, a la que casi nadie presta ya atención, es un lugar en la secuencia de ADN donde existe una variación, y la variante menos común está presente en al menos el uno por ciento de la población analizada. Así se distingue un polimorfismo de una variante poco común que puede ocurrir en sólo una de cada 1.000 personas. Un polimorfismo tiene que ocurrir en al menos una de cada 100 personas. Los polimorfismos pueden ser cambios de una sola letra, como una C en vez de T. Pero también podrían ser algo más complejo, como un tramo entero del ADN, el cual está presente o ausente. Éstas también pueden llamarse alteraciones en el número de copia; pero todos son polimorfismos. Básicamente, es un término general para hablar de la diversidad en los genomas de una especie.

1.-MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA

La regulación de la expresión genética se refiere a los mecanismos celulares que controlan el perfil espaciotemporal del producto funcional de un gen. La regulación puede actuar a nivel de la transcripción o de manera postranscripcional. La intensidad de la transcripción de un gen que codifica a una proteína depende, al menos, de la unión de factores de transcripción activados a regiones reguladoras en la molécula de ADN y del reclutamiento del complejo activo de la polimerasa II de ARN, que en conjunto determinan la frecuencia de síntesis del ARNm correspondiente. Los factores de transcripción son proteínas que, al unirse a sitios específicos del ADN, los denominados elementos de respuesta, pueden interactuar con otros factores transcripcionales o con cofactores para formar un complejo de proteínas y DNA que permite la iniciación de la transcripción del gen. Los ER son secuencias de ADN de aproximadamente cuatro a 15 pares de bases de longitud cuya secuencia casi siempre presenta algunas variaciones. Diferentes familias de factores transcripcionales reconocen distintos ER. Los cambios sutiles en la secuencia de un ER pueden inducir cambios en la afinidad con la que se une el factor transcripcional

correspondiente y modificar así los niveles de transcripción. En los vertebrados, los ER pueden encontrarse en tres tipos de regiones reguladoras conocidas. Los que componen al promotor suelen localizarse dentro de las primeras 1 000 pb en la región 5' del inicio de la transcripción; otros pueden situarse a grandes distancias de dicho sitio en estructuras conocidas como enhancers, que pueden incrementar la frecuencia de inicio desde el promotor con el que se relacionan, así como en los silencers, que pueden reducir o suprimir la transcripción. Las mutaciones en los ER de cualquiera de estos tres tipos de regiones reguladoras en el genoma pueden modificar la transcripción e influir en el fenotipo del individuo.

2.-ANÁLISIS DE LOS DETERMINANTES GENÉTICOS DE LA VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA

La identificación de variantes genéticas relacionadas con la variación de la expresión genética supone retos muy particulares inherentes a la complejidad de los mecanismos de regulación transcripcional.

Cuantificación de ARNm específico de alelo

En este caso se analiza el nivel de transcripción de cada alelo. La cuantificación de ARNm específico de alelo requiere el conocimiento previo de la presencia de al menos un SNP en el transcrito que permita identificar el ARNm producido a partir de cada cromosoma. El ARNm purificado del tejido se utiliza como molde para una amplificación de ADN con oligonucleótidos específicos para cada marcador. Un cociente de expresión entre ambos alelos diferente a 1 sugiere la presencia de un rSNP en desequilibrio de ligamiento con el SNP del transcrito, pero no excluye la posibilidad de que las diferencias sean de origen epigenético.

Enfoques bioinformáticos para la identificación de rSNP. La explosión del número de bases de datos públicas del genoma humano, así como de sus variaciones, representa una fuente abundante de información disponible para la búsqueda in silico de candidatos a determinantes genéticos de enfermedades.

Análisis genético de la variación de la expresión genética a escala genómica

El nivel de expresión de genes puede considerarse en sí mismo un fenotipo cuantificable que en muchos casos es heredable y, por lo tanto, es susceptible de análisis por estudio genético de segregación o relación en organismos como levadura, ratón, rata y seres humanos. Con la finalidad de identificar candidatos a determinantes genotípicos de perfiles de expresión, Morley y colaboradores analizaron por microarreglos los perfiles de expresión

de 8 500 genes de líneas linfoblastoides derivadas de 195 individuos pertenecientes a 14 familias.

Validación por genes reporteros

Una vez que los estudios de asociación u otros métodos reconocen la presencia de uno o más rSNP en regiones reguladoras vinculadas con susceptibilidad a enfermedades comunes, es necesario validar su función reguladora. En este caso se construye una molécula de ADN con la región codificadora de un gen reportero fácil de detectar bajo el control transcripcional del promotor que contiene el polimorfismo; como control se utiliza la secuencia del promotor con la variante de individuos no susceptibles. Cada una de estas construcciones se introduce en células relevantes en cultivo y se analiza el nivel de expresión del reportero en cada una de las variantes alélicas del promotor.

3.-POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SENCILLO (SNP)

Los polimorfismos se distinguen terminológicamente de las mutaciones por su frecuencia. Las diferentes formas de los polimorfismos son más frecuentes que las mutaciones, esto es, en una frecuencia mayor al 1%. La gran mayoría de los SNP's tienen dos alelos los cuales están representados por una sustitución de base por otra. En las poblaciones, este tipo de alelos se clasifican en alelo principal o "silvestre" y alelo raro o mutante, clasificación basada en la frecuencia observada en las poblaciones. Actualmente, en el "dbSNP" se han catalogado más de 9 millones de variantes en la secuencia de ADN. Asimismo, existen variaciones funcionales que pueden producir alguna enfermedad o susceptibilidad a ésta, pueden estar localizados en la región promotora del gen, influenciando la actividad transcripcional del gen, en intrones, en sitios de "splicing" o en regiones intragénicas. Otro tipo de SNP's son los llamados "sinónimos" los cuales no alteran la conformación del gen; sin embargo, se ha descrito que algunos de estos polimorfismos pueden tener consecuencias funcionales por algún tipo de mecanismo aún desconocido.

4.-POLIMORFISMOS DE SECUENCIAS REPETIDAS

Otro tipo de polimorfismos son los de secuencias repetidas, con una mayor aplicación en el diagnóstico genético y son conocidos como VNTRminisatélites y VNTR-microsatélites o STR. En ambos casos presentan un número variable de repeticiones en tándem. Los minisatélites son loci que corresponden a secuencias de ADN de unas pocas decenas de nucleótidos repetidas en tándem. El número de dichas repeticiones varía de cromosoma a cromosoma, de forma que en un cromosoma el número de repeticiones en tándem puede ser de 10, en otro de 15, en otro de 22, etc. La singularidad más especial de este tipo de polimorfismos está en que cada loci puede presentar muchos alelos distintos, sin embargo,

presentan el inconveniente de que no están distribuidos por todo el genoma y sólo pueden ser utilizados en el diagnóstico de un número muy reducido de enfermedades. Los VNTR-minisatélites han encontrado su máxima aplicación en la determinación de la paternidad y en los protocolos de identificación genética en el ámbito judicial. Cuando se habla de huellas dactilares del ADN se está hablando de este tipo de polimorfismo. Los VNTR-microsatélites son por excelencia los polimorfismos anónimos utilizados en el diagnóstico genético.

5.-APLICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS

El estudio de los polimorfismos tiene muchas aplicaciones en medicina, investigaciones biológicas y procesos jurídicos. En algunos casos las enfermedades genéticas pueden ser causadas por polimorfismos. De esta forma, los investigadores pueden usar los polimorfismos como marcadores de ciertas enfermedades, por ejemplo, si el presentar ciertos polimorfismos puede ser causal de riesgo para el desarrollo o progresión de alguna enfermedad. Los polimorfismos localizados cerca de un “gen candidato” pueden ser usados para hallar el gen por sí mismo a través de un mapeo genético. En este proceso el investigador está en búsqueda de polimorfismos que son heredados junto con la enfermedad, tratando de delimitar estos polimorfismos en regiones más y más pequeñas del cromosoma. Los polimorfismos genéticos pueden ser usados como marcadores para ayudar a esclarecer ciertos patrones y/o procesos biológicos; además, pueden establecer parentescos. También se puede determinar la cantidad de entrecruzamiento entre diferentes grupos de la misma especie, y la información ser usada para identificar poblaciones únicas, potencialmente importante para la sobrevivencia de la especie.

6.-SNP Y ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN A ENFERMEDADES

Los estudios de asociación permiten identificar genes relacionados con distintas enfermedades; a partir de esto han surgido pruebas directas e indirectas para el estudio de genes candidatos. En un estudio de prueba directa, el supuesto SNP responsable de una enfermedad es genotipificado directamente. El reto de este tipo de estudios es predecir o determinar a priori cuáles SNP's son los responsables del fenotipo de interés. Muchas de las veces se sospechan de un SNP, si éste es uno no sinónimo (nsSNP); es decir, si el cSNP cambia el aminoácido en la proteína del gen de interés. Los estudios indirectos de asociación genética difieren de las pruebas directas porque el estudio de los SNP's no es probado directamente, pues este tipo de estudios se basa en un análisis de ligamiento genético el cual utiliza “marcadores neutrales”, y no hace predicciones sobre la localización del gen responsable de la enfermedad en estudio. Los estudios de asociación indirecta son más frecuentes en estudios de casos-control.

7.-ANÁLISIS DE LIGAMIENTO

El análisis de ligamiento o escaneo genómico es un método en el cual se hace una búsqueda aleatoria en el genoma para tratar de encontrar los genes asociados a una enfermedad. Posteriormente cada miembro de la familia es genotipificado para marcadores de ADN que están esparcidos a lo largo del genoma; a partir de esto se determina cuáles marcadores son heredados más frecuentemente con la enfermedad. Los genes son identificados por separado y se determina su posición en el genoma; al aproximarse a la región del genoma identificado, el reto es encontrar las mutaciones responsables del fenotipo. Una ventaja de este método es que se pueden encontrar nuevos genes implicados en la patogénesis de la enfermedad y no se limita a la búsqueda de polimorfismos en genes que se sabe son causantes de ella. A la fecha, el desarrollo de estos estudios es vasto; entre ellos, encontramos los realizados en artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria, sistémica y crónica con un componente genético complejo, donde se cree que la enfermedad tiene una patogénesis autoinmune, aunque la etiología precisa se desconoce aún.

8.-ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA

En éstos se buscan polimorfismos individuales de genes implicados en la patogénesis de la enfermedad y, así, determinar si existe algún tipo de relación con ella, para lo que primero se deben identificar genes candidatos que se crea o se sepa son importantes en la patogénesis de una condición. Este tipo de genes pueden ser candidatos debido a un extenso estudio de la enfermedad y/o comparando los niveles de expresión génica en tejidos normales y enfermos; el siguiente paso es identificar los diferentes polimorfismos sobre el gen que pudieran estar afectando su función, y finalmente examinar si los polimorfismos elegidos ocurren más frecuentemente en individuos que tienen la enfermedad con respecto a una población control, o si este tipo de variación predice el desarrollo de la enfermedad en un estudio de cohorte.

9.-IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS

Para identificar factores genéticos asociados con determinado fenotipo, se busca perfeccionar las herramientas de estudio. A continuación, se mencionan algunos métodos: La secuenciación del ADN es la prueba de oro para la detección de nuevos polimorfismos, pero resulta muy costosa, por lo que se han desarrollado diferentes métodos para realizar este tipo de escaneo.

D/TGGE: Analiza el polimorfismo a través de la estabilidad, a distintas condiciones desnaturalizantes o a diferentes temperaturas del DNA amplificado. Su principal problema reside en las dificultades técnicas para mantener estables las condiciones experimentales.

SSCP: Técnica basada en el análisis del polimorfismo a través de las diferencias conformacionales de fragmentos de DNA de cadena sencilla. Las distintas conformaciones son detectables como un cambio de movilidad en geles de poliacrilamida no desnaturalizante.

DHPLC: La técnica es una variante del análisis heteroduplex. En lugar de usar un gel y separar los fragmentos de ADN por electroforesis, se utilizan una resina modificada y el HPLC. Cuando se separan los fragmentos de ADN a altas temperaturas, se realinean los fragmentos y se pueden distinguir las cadenas heteroduplex de las homoduplex.

Secuenciación por hibridación: Cuando se conoce la secuencia de un fragmento de ADN, es posible colocar un juego de oligonucleótidos cortos representando el fragmento completo de ADN o "chip" de ADN. Debido a que se conoce la secuencia de los oligonucleótidos en cada posición, se puede inferir la secuencia de ADN de una prueba de ADN marcada con fluorescencia, analizando el patrón de hibridación

Hibridación: En ésta se diseñan dos pruebas alelo-específicas para hibridar a una secuencia blanco, solamente cuando éstas sean totalmente complementarias. Cuando las sondas alelo-específicas son inmovilizadas sobre un soporte, se capturan las muestras de ADN y se visualizan los eventos de hibridación detectando una marca fluorescente.

Extensión de oligonucleótidos: Prueba muy sólida y flexible de discriminación alélica. Hay tres categorías de variaciones del método, basadas en que la ADN polimerasa puede incorporar nucleósidos específicos complementarios a la secuencia del templado: a) secuenciación, b) prueba de PCR alelo-específica y c) prueba de "primer extensión" alelo-específica.

PCR en tiempo real: Método basado en la aplicación de la técnica de PCR y en la creación de dos sondas alelo-específicas, las cuales emiten una señal fluorescente al unirse al templado.

10.- CONCLUSIONES

El estudio de la participación de la variación genética en la predisposición a las enfermedades complejas ha cobrado nuevas dimensiones en la era genómica. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son el tipo de variación más común entre individuos y su vinculación con enfermedades es motivo de investigación intensa. En fecha reciente, el estudio de los SNP que afectan la expresión genética (rSNP) ha suscitado

mayor interés, ya que las diferencias de la expresión genética entre un sujeto y otro pueden modificar el fenotipo. El descubrimiento y caracterización funcional de los rSNP y el estudio de su frecuencia alélica representan un nuevo campo en la búsqueda de determinantes genéticos de enfermedades multifactoriales.

11.-BIBLIOGRAFÍA

-Marco Antonio Checa Caratachea, Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. Revista del instituto nacional de enfermedades respiratorias Ismael Cosío Villegas. Julio-septiembre 2007, Segunda Época, Vol. 20 No 3

-Julián Ramírez-Bello y Mayra Jiménez-Morales. Implicaciones funcionales de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes codificantes de proteínas y no codificantes en enfermedades multifactoriales. Unidad de Investigación en Enfermedades y Metabólicas, Hospital Juárez de México, Ciudad de México, México. Gac Med Mex. 2017;153:238-50

-Jesús Hernández-Romano, PhD. Jesús Martínez-Barnetche, MD, PhD. Verónica Valverde-Garduño, PhD. Polimorfismos reguladores y su participación en la patogenia de enfermedades complejas en la era posgenómica. salud pública de méxico / vol. 51, suplemento 3 de 2009