

Aislamiento de células mononucleares, extracción de ADN y amplificación de genes.

Autores: Andrea Cuellar Nenclares
Fernando Alekos Ocampo González
María de Lourdes Lozano Velázquez

Asesores: Daniel López Hernández
Beatriz Silva Suárez

Escuela: Colegio Carol Baur

Área: Categoría Científica: Ciencias Biológicas, Biomédicas y Químicas.

Proyecto con apoyo externo

Antecedentes

El ser humano siempre ha estado interesado en la genética, desde los primeros hombres que caminaron sobre la faz de la tierra hasta llegar al estudio del genoma humano y de otras especies; así como, del análisis de sus aplicaciones, se han logrado avances en el terreno de la ingeniería genética, la genética, la biología y la salud, descubriendo relaciones filogenéticas entre las especies, avanzando en el conocimiento de la prevención y el diagnóstico de las enfermedades como el cáncer, la diabetes, la obesidad y otras enfermedades hereditarias, analizando la evolución, estableciendo las leyes de la herencia, entre muchas otras aplicaciones. El conocimiento en la genética promete un futuro excelente, respecto a los avances en el conocimiento de la interacción del ser humano con su entorno y el tratamiento de las enfermedades. Por eso, nuestro interés recae en técnicas que permiten ampliar el conocimiento científico de las ciencias genómicas en células sanguíneas humanas (monocitos) que están relacionadas con el sistema inmune innato que tienen los seres vivos y que se han asociado con el desarrollo de enfermedades en el ser humano.

Objetivo

Adquirir y aplicar los fundamentos de las técnicas utilizadas para el aislamiento de células mononucleares, la extracción del ADN y de la reacción en cadena de la polimerasa como herramientas para responder a diferentes preguntas de las distintas áreas de la ciencia.

Marco Teórico

Las células mononucleares son células de sangre periférica, incluyen a los linfocitos y los monocitos y se pueden aislar por centrifugación en un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque. Los monocitos son una de las células que componen al sistema de defensa y son las células precursoras de los macrófagos, las cuales proporcionan una primera línea de defensa contra la infección y se activan por procesos inflamatorios. Para poder llevar a cabo su función de defensa los monocitos expresan en la superficie de su membrana una proteína glicosilfosfatidilinositol denominada CD14. El CD14 es un receptor que se encarga del reconocimiento de los componentes de las bacterias Gram. negativas como son los lipopolisacáridos y de los péptidoglicanos que contienen las bacterias Gram positivas. CD14 es una proteína que no presenta una región intracelular (citoplasmática) que le permita mandar señales al interior de la célula, para

favorecer la respuesta de los monocitos ante un estímulo (por Ej., una infección) por lo que se ayuda de otra proteína que tenga una región citoplasmática para poder mandar el mensaje al interior de la célula, este receptor se denomina TLR4, lo que forma el complejo CD14-TLR4-MD2 que es de gran valor para el sistema inmunológico innato en el reconocimiento de agentes infecciosos y por lo tanto en la respuesta de defensa de un organismo.

Metodología y Desarrollo

El Diseño Experimental se llevo a cabo en el Laboratorio de Biomedicina Molecular del CINVESTAV-IPN (Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional)

Aislamiento de monocitos

Procedimiento: Las células se aíslan mediante centrifugación en un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque, de la siguiente manera.

- Obtener 15 ml. de sangre periférica con una jeringa.
- Se vierte la sangre en un tubo Falcon que contenga 150 microlitros de EDTA.
- Se agrega PBS 1X por las paredes del tubo (para nivelar el pH)
- En un tubo Falcon de 15 ml. con Ficoll-Paque se vierte la mezcla previa (sangre total + PBS 1X) con cuidado por las paredes del tubo.
- Se centrifuga a 2000rpm, 20 minutos, a 17°C
- Se observa un anillo de células mononucleares (color grisáceo) y se toman con cuidado con una pipeta Pasteur y se colocan en un tubo Falcon de 15ml.
- Posteriormente se agrega PBS 1X EN ABUNDANCIA
- Centrifugar a 2000rpm por 5 min a 17°C SIN BRAKE (Primer lavado). Se observa una pastilla de células en el fondo del tubo y el PBS en fase acuosa.
- Se decanta el líquido de un solo golpe y se pone 5ml de PBS 1X y se resuspende la pastilla (SEGUNDO LAVADO)
- Se centrifuga bajo las mismas condiciones.
- Se vuelve a decantar y se resuspenden las células en 1 ml de PBS 1X.
- Se pasa a un tubo Eppendorf por las paredes del tubo (SI NO, LAS CÉLULAS SE PUEDEN ROMPER)
- Finalmente, se cuentan las células en una cámara de Neubauer. (→ 2 microlitros de Azul Triptano x 8 de muestra.) a través de un microscopio óptico.

Extracción del ADN:

Con las células resuspendidas y colocadas en un tubo de eppendorf se adicionan los reactivos para extraer el ADN a través de un kit denominado DNA kit (invitrogene)

Amplificación de una región de 360pb del gen cd14

Con el ADN que se extra, este se utiliza para realizar una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) que nos permita hacer varias copias de una región específica de un gene (amplificar). La mezcla de reacción para la PCR se realiza en frío con los siguientes materiales y cantidades: 1) Regulador 10x (2.50 microlitros), 2) Dos iniciadores: uno en sentido y otro en anti-sentido (primers) ambos en dirección 5'a 3' (1.25 microlitros), 3)dNTP5 (materia prima que necesita la enzima) (2.00 microlitros), 4) MgCl₂ (1.00 microlitro), 5) DNA (2.00 microlitros), 6) Taq-Polimerasa (0.10 microlitros) y 7) H₂O MiliQ (16.15 microlitros) para obtener un volumen final de 25 microlitros. La reacción de la PCR se lleva a cabo en un equipo denominado Termociclador.

Obteniendo Secuenciación del ADN (Región promotora del gen *cd14*)

Ya obtenido el producto de la PCR, el laboratorio nos dono una secuencia del fragmento que amplificamos.

Análisis de una Región en el promotor del gen *cd14*

La secuencia amplificada esta reportada en la bibliografía como una región donde ocurre la mutación de una base nitrogenada a -159pb del sitio +1 de la transcripción y que en varias poblaciones del mundo como en Alemania, Japón, EE. UU., entre otros países se ha asociado con el desarrollo de Infarto Agudo del Miocardio, gingivitis y con mayor susceptibilidad a desarrollar otras infecciones. Al analizar la región del gen *cd14* en el programa BLAST pudimos observar que esta secuencia sólo se ha reportado para otros mamíferos como son los monos, lo que indica que CD14 al parecer no se a analizado en otras especies. Ya que es una molécula del sistema de defensa será interesante saber si se expresa en otras especies.

Conclusiones

Estás técnicas permiten dar respuestas a varias interrogantes en las diferentes áreas de la ciencia y en cuanto a las perspectivas conocer otras técnicas actuales sobre el estudio del ADN que permitan entender la llamada revolución de la biología molecular que afecta a todas las ciencias de la vida, desde la paleontología hasta la medicina: Los estudios en genética y la secuenciación del ADN pueden ayudarnos a entender la evolución de las especies, seguir a nuestros ancestros a través de los fósiles. Aumentar nuestra capacidad para producir alimentos transgénicos. Ayudar a diseñar pruebas de diagnóstico, nuevas terapias contra el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, crónicodegenerativas e infectocontagiosas; desarrollar fármacos más eficaces. Manipular bacterias, plantas y animales con fines médicos e industriales. Avanzar en el desarrollo de códigos en bioética, en la investigación con embriones humanos y la clonación de nuestra especie. Avanzar en el conocimiento de las enfermedades, asociar mutaciones en los genes con enfermedades como la diabetes mellitus tipo 2, la obesidad, el infarto agudo del miocardio, entre otras, permitir implementar medidas de prevención para las personas que son más susceptibles de enfermarse. Para nosotros, el lenguaje del ADN por medio del cual Dios dictó vida al ser, ciertamente es un texto biológico que apenas estamos entendiendo, pero que hemos cruzado para buscarnos un futuro prometedor como lo menciona el Dr. Francis Collins, 2007.

Bibliografía

- Audesirk Teresa, et. al., 2003. Biología La vida en la tierra. Editorial Pearson/Prentice Hall pag.:
- Collins Francis. 2007. El lenguaje de Dios. Editorial Planeta Mexicana pag.:
- Revista MUY Interesante, Documento:Historia de la Biología. Especial.No.27 pag.:
- Janeway, Jr et al., Inmunobiología, el sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad, 2ª edición, Editorial Masson, pag.: 2-5, 296, 635.
- <http://www.uah.es/otrosweb/biomodel>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://workbench.sdsc.edu/>