

**Técnico Superior**  
Módulo Transversal

# Biología molecular y citogenética

**Coordinador**  
*Julián Sanz Ortega*

ARÁN





# Autores

## Director y coordinador

### **Julián Sanz Ortega**

Profesor Titular de Anatomía Patológica y Facultativo Especialista de Área del Hospital Universitario San Carlos y de la Universidad Complutense de Madrid, desde 1996. Desde el año 2000 es Director Científico del Biobanco del Hospital Clínico San Carlos y del Biobanco de la RTICC de ISCIII. Responsable de Patología Molecular y Dianas Terapéuticas. Nombrado Presidente Territorial de Madrid de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) en el año 2012. Autor de 66 artículos científicos: publicaciones internacionales en revistas indexadas y nacionales.

Premio Extraordinario de la Universidad Complutense de Madrid y Premio de la Fundación San Nicolás de la Real Academia Nacional de Medicina en 1994.

## Autores

### **Carmen Cotarelo Pérez**

Facultativo especialista de Área. Sección de Genética Clínica. Servicio de Análisis Clínicos. Responsable de Citogenética constitucional. Hospital Clínico Universitario San Carlos. Madrid

**María Fenollar Cortés**

Facultativo especialista de Bioquímica Clínica. Responsable de Genética Molecular. Facultativo especialista de Área. Sección de Genética Clínica. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Clínico Universitario San Carlos. Madrid

**Elena Molina Roldán**

Licenciada en Biología. Laboratorio de Anatomía Patológica. Hospital Clínico Universitario San Carlos. Madrid

**Raluca Oancea Ionescu**

Facultativo especialista de Área. Sección de Genética Clínica. Servicio de Análisis Clínicos. Responsable de Oncohematología. Hospital Clínico Universitario San Carlos. Madrid

**Julián Sanz Ortega**

Profesor Titular de Anatomía Patológica y Facultativo especialista de Área. Hospital Clínico Universitario San Carlos y Universidad Complutense de Madrid. Madrid

# Índice

## Capítulo 1

<b>Caracterización de los procesos que se realizan en los laboratorios de citogenética y biología molecular</b> .....	13
1. Organización y funciones del laboratorio de citogenética y cultivo celular. Materiales y equipo básico .....	14
2. Organización y funciones del laboratorio de biología molecular .....	21
3. Normas de manipulación del material estéril. Técnica aséptica .....	26
4. Seguridad en los laboratorios de citogenética y biología molecular .....	28
5. Uso eficiente de los recursos .....	30

## Capítulo 2

<b>Realización de cultivos celulares</b> .....	37
1. Tipos de cultivo celular en citogenética: líquido amniótico, vellosidad corial y sangre periférica. Tipos de células y medios de cultivo .....	38
2. Técnicas de obtención, mantenimiento y propagación de cultivos .....	41
3. Determinación de número y viabilidad celular .....	49
4. Contaminación de cultivos celulares .....	49

## Capítulo 3

<b>Aplicación de técnicas de análisis cromosómico</b> .....	59
1. Técnica de obtención de extensiones cromosómicas. Cultivo y sacrificio celular .	60
2. Métodos de tinción y bandeado cromosómico: patrones de identificación..	64

3. Nomenclatura citogenética .....	68
4. Automatización del análisis citogenético .....	71
5. Alteraciones cromosómicas: numéricas y estructurales .....	71
6. Diagnóstico prenatal: métodos y aplicaciones .....	82
7. Citogenética y cáncer .....	92

## Capítulo 4

<b>Aplicación de técnicas de extracción de ácidos nucleicos</b> .....	105
1. Características estructurales y funcionales de los ácidos nucleicos .....	106
2. Propiedades físicas relacionadas con las técnicas de biología molecular .....	109
3. Endonucleasas de restricción y otras enzimas asociadas a los ácidos nucleicos .....	110
4. Mutaciones y polimorfismos .....	111
5. Técnicas de extracción de adn en sangre periférica, biopsias y tejidos .....	114
6. Extracción de ARN .....	119
7. Sistemas automáticos de extracción de ácidos nucleicos .....	122

## Capítulo 5

<b>Aplicación de técnicas de PCR y electroforesis al estudio de los ácidos nucleicos</b> .....	131
1. Técnicas de PCR y variantes .....	132
2. Técnicas de electroforesis en gel .....	138
3. Técnicas de visualización de fragmentos e interpretación de resultados .....	140
4. Aplicaciones diagnósticas y forenses de las técnicas de PCR .....	141

## Capítulo 6

<b>Aplicación de técnicas de hibridación con sonda</b> .....	151
1. Tipos de sonda y tipos de marcaje .....	152
2. Procedimiento de hibridación .....	163
3. Técnicas de transferencia e hibridación de ácidos nucleicos en soporte sólido .....	171
4. Técnicas de hibridación en cromosomas y tejidos. Hibridación <i>in situ</i> .....	178

## Capítulo 7

<b>Determinación de métodos de clonación y secuenciación del ADN</b> .....	195
1. Clonación: componentes y fases del procedimiento de clonación .....	196
2. Bioinformática: análisis de bases de datos de ADN y proteínas .....	197
3. Métodos de secuenciación de ADN .....	198
4. Otros análisis realizados en el secuenciador .....	200
5. Aplicación de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico clínico .....	201
6. Aplicaciones de las técnicas de biología molecular en medicina legal y forense .....	202
<b>Soluciones “Evalúate tú mismo”</b> .....	207

capítulo

# 3

## APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE ANÁLISIS CROMOSÓMICO

*Carmen Cotarelo Pérez,  
Raluca Oancea Ionescu,  
María Fenollar Cortés*

### Sumario

1. Técnica de obtención de extensiones cromosómicas. Cultivo y sacrificio celular
2. Métodos de tinción y bandeado cromosómico: patrones de identificación
3. Nomenclatura citogenética
4. Automatización del análisis citogenético
5. Alteraciones cromosómicas: numéricas y estructurales
6. Diagnóstico prenatal: métodos y aplicaciones
7. Citogenética y cáncer

El descubrimiento en 1956 por Tjio y Levan del **número de cromosomas humanos** y la descripción de Lejeune y cols. de los **47 cromosomas** (trisomía 21) en los pacientes con síndrome de Down supuso una revolución en la genética médica. A partir de ese momento, se describieron muchas anomalías constitucionales y somáticas cromosómicas responsables de enfermedad, como el cromosoma Philadelphia en la **leucemia mieloide crónica (LMC)**, descrito por Nowel y Hungerford en 1960. Hoy en día sabemos que las alteraciones cromosómicas son una causa importante de síndromes y enfermedades genéticas que afectan aproximadamente al 0,7 % de los recién nacidos vivos, y este porcentaje es mayor si incluimos en esta categoría no solo los síndromes diagnosticados con citogenética clásica, sino también los diagnosticados gracias a las **técnicas de citogenética molecular** (FISH, array-CGH).

A pesar del avance tecnológico, el **cariotipo** tiene aún un papel fundamental en el diagnóstico genético. Sabemos que sus alteraciones son causantes del 7 % de los **defectos congénitos**, de más del 50 % de los **abortos** del primer trimestre, se dan en el 2 % de las gestantes mayores de 35 años, en el 25 % de las **discapacidades intelectuales**, son causa de infertilidad/esterilidad y sus alteraciones están descritas en tumores.

## I. TÉCNICA DE OBTENCIÓN DE EXTENSIONES CROMOSÓMICAS. CULTIVO Y SACRIFICIO CELULAR

Los **cromosomas** de una célula se estudian en el estado de metafase o prometafase de la división celular. Para conseguir este estadio celular de la división ya se han explicado las **técnicas de cultivo celular** en el capítulo anterior. Una vez que se ha conseguido cultivar las células, hay que proceder al "sacrificio de los cultivos" que consiste en inhibir la división celular en la fase de metafase para poder realizar las extensiones cromosómicas.

### I.1. Sacrificio y extensión de los cultivos

El **sacrificio** tiene diferentes metodologías y tiempos que dependen del tipo de cultivo celular, pero todos tienen unos principios generales:

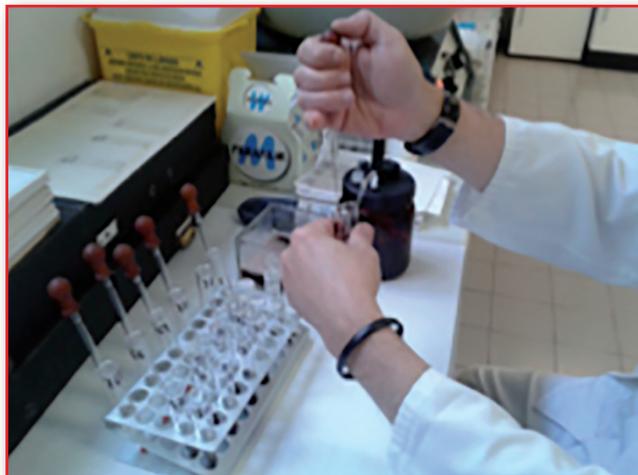
- 】 Tras el tiempo de incubación hay que añadir en el frasco del cultivo un **antimitótico**, la **colchicina**, que inhibe la formación del huso mitótico y retrasa la separación de los centrómeros actuando sobre

**Ejemplo de sacrificio y extensión de un cultivo de sangre** (Figura 1)

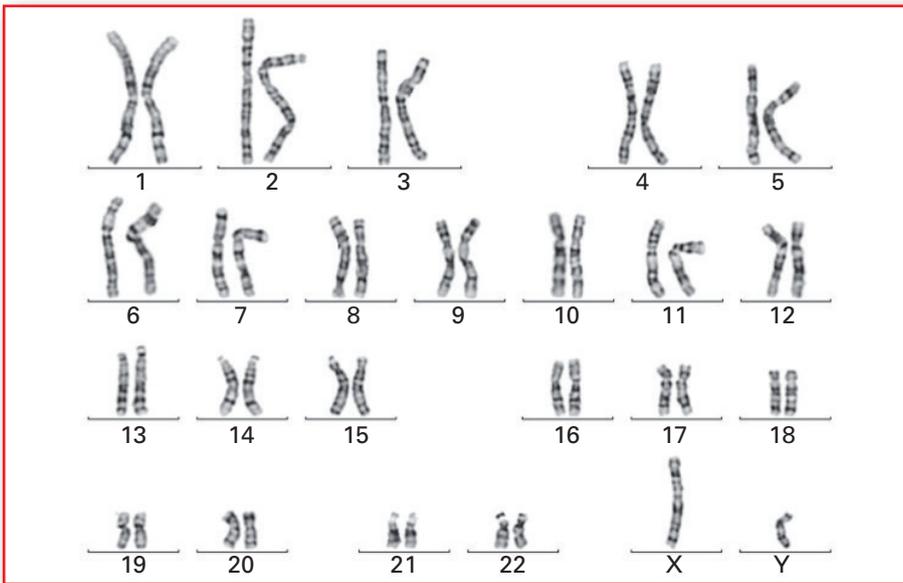
Tras el tiempo de incubación de 72 horas:

**Sacrificio**

- 】 Antimitótico: añadir 250 ml de colchicina a temperatura ambiente e incubar 1 hora en estufa a 37 °C.
- 】 Pasar el contenido de los frascos a tubos de centrifuga de 10 ml y centrifugar 5 minutos a 1.500 rpm. Con una pipeta Pasteur, que se utilizará para cada paciente en todo el proceso, retirar el sobrenadante, dejando aproximadamente 0,25 ml.
- 】 Choque hipotónico: dispensar aproximadamente 1 ml de CIK (precalentado para evitar un choque importante de temperatura).
  - ▶ Siempre dispensar sobre la pared del tubo, nunca sobre las células directamente, e inclinando el tubo.
  - ▶ Resuspender el sedimento con suavidad, sin sacar la pipeta del líquido, y sin hacer burbujas. Puede sacarse con cuidado y dispensar sobre la pared del tubo. Continuar hasta eliminar los grumos (si hay algún coágulo, puede retirarse).
  - ▶ Una vez resuspendido, añadir otros 4 ml de CIK (recordar hacerlo siempre sobre la pared del tubo, nunca sobre las células) y resuspender con la pipeta.
  - ▶ Incubar en el baño a 37 °C, durante 20 minutos.

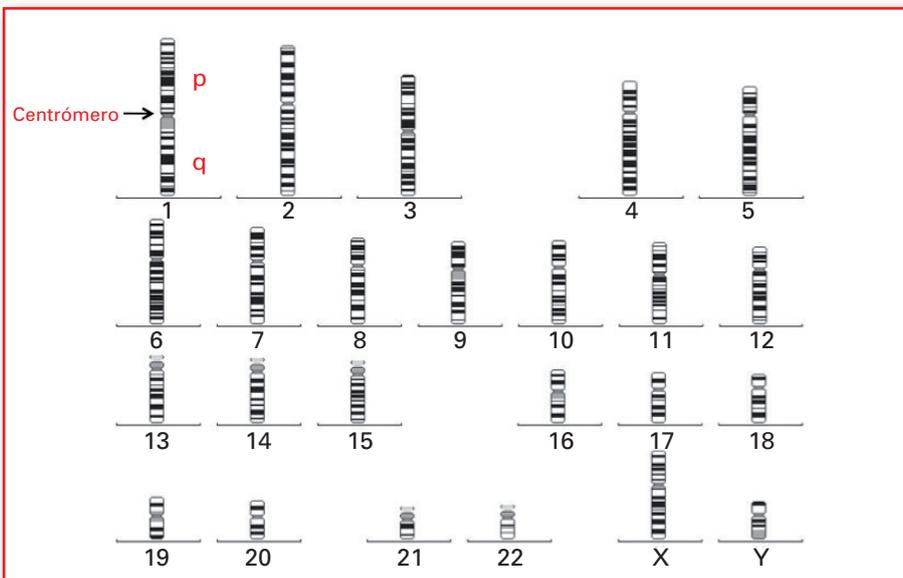


**Figura 1.** Sacrificio de cultivo de sangre.

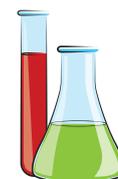


**Figura 2.** Cariotipo masculino normal.

La **organización funcional del genoma** se correlaciona perfectamente con su organización estructural, y los cromosomas no son un grupo de genes y secuencias al azar. Todo ello queda reflejado en el bandeo de los cromosomas en metafase. Las bandas G y Q contienen regiones más ricas en A-T y replican su ADN en un periodo más tardío de la fase S del ciclo celular, mientras que las R (que son inversas a las anteriores) contienen regiones ricas en G-C. En las regiones ricas en GC se han localizado la mayoría de los genes humanos y su importancia clínica en las alteraciones cromosómicas es mayor.



**Figura 3.** Patrón de bandas G. Ideograma.



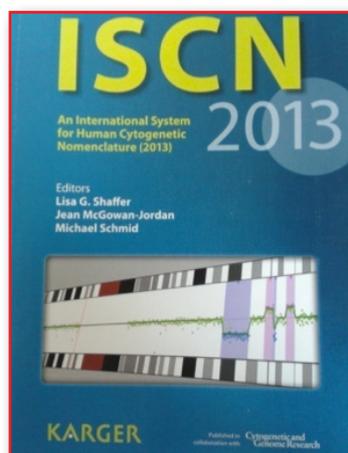
*El patrón estándar de bandas G de los cromosomas se representa en ideogramas.*



**Figura 4.** Microscopio óptico con analizador de imagen.

cortos y largos de los cromosomas se dividen a su vez en regiones que se numeran, en función del número de bandas de cada cromosoma, desde el centrómero a la parte terminal de cada brazo (telómero). Esto nos permite utilizar una **nomenclatura común e internacional**, tanto a la hora de hablar de localización de los genes en determinadas regiones cromosómicas (mapeo cromosómico), como de describir las variantes normales y las alteraciones en el cariotipo. De esta manera, todos los genetistas son capaces de interpretar un resultado, incluso sin necesidad de visualizar el cariotipo.

La **nomenclatura**, internacionalmente aceptada y sujeta a revisiones cada cierto tiempo, es realizada por un comité de citogenética humana y publicada en un libro, el **ISCN**, *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (Figura 5). No solo existe para la citogenética convencional o clásica sino también para la citogenética molecular (hibridación *in situ* fluorescente y array-CGH que se estudian en el capítulo 6).



**Figura 5.** ISCN. Nomenclatura internacional.

TABLA 2

## Ejemplos de síndromes cromosómicos

<b>Aneuploidías de los autosomas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>› Síndrome de Down: trisomía del par 21</li> <li>› Síndrome de Edwards: trisomía del par 18</li> <li>› Síndrome de Patau: trisomía del par 13</li> </ul>
<b>Aneuploidías de los cromosomas sexuales. Mayor frecuencia de mosaicismos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>› Síndrome de Turner: monosomía del X, 45,X. Fenotipo femenino</li> <li>› Síndrome de Klinefelter: 47,XXY. Fenotipo masculino</li> <li>› Síndrome del triplo X: 47,XXX. Fenotipo femenino</li> <li>› Síndrome doble Y: 47,XYY. Fenotipo masculino</li> <li>› 45,X/46,XY fenotipo turneriano masculin</li> </ul>
<b>Alteraciones estructurales de los cromosomas sexuales. Mayor frecuencia de mosaicismos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>› Variantes del síndrome de Turner: fenotipo femenino               <ul style="list-style-type: none"> <li>› 46,X,i(Xq) (isocromosoma del Xq)</li> <li>› 46,X,del(Xq) o 46,X,del(Xp) (deleciones)</li> <li>› 45,X/46,X,i(Xq) , 45,X/46,X,del(Xq) o 46,X,del(Xp) (mosaicismos)</li> </ul> </li> <li>› 46,X,idic(Y) (cromosoma Y dicéntrico) fenotipo masculino</li> <li>› 45,X/46,X,idic(Y) fenotipo variable desde el femenino al masculino</li> </ul>
<b>Síndromes de microdelección microduplicación autosómicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>› Síndrome Wolf- Hirschhorn: del(4)(p16.3)</li> <li>› Síndrome maullillo del gato: del(5)(p15.2)</li> <li>› Síndrome Williams: del(7)(q1.23)</li> <li>› Síndrome Prader-Willi/Angelman: del(15)(q11.2q13) (locus sujeto a imprintig)</li> <li>› Síndrome Miller Dieker: del(17)(p13.3)</li> <li>› Síndrome Smith-Magenis: del(17)(p11.2)</li> <li>› Síndrome Phelan-McDermid: del(22)(q13)</li> <li>› Síndrome DiGeorge/velocardiofacial: del(22)(q11.2)</li> <li>› Síndrome microduplicación dup(22)(q13.3)</li> <li>› Síndrome microduplicación dup(22)(q11.2)</li> <li>› Deleciones de regiones subtelo méricas</li> </ul>

## 6. DIAGNÓSTICO PRENATAL: MÉTODOS Y APLICACIONES

El diagnóstico prenatal es el área de la genética que se ocupa de la **detección de síndromes y anomalías congénitas fetales** en gestantes en riesgo. Comenzó en 1966 cuando Steele y Breg demostraron que podía conocerse el cariotipo fetal cultivando células procedentes de líquido amniótico. Ello, unido al conocimiento del riesgo de las mujeres con edad materna avanzada de tener hijos con síndromes cromosómicos (fundamentalmente síndrome de Down), potenció su desarrollo.

ser realizado en **vellosidad corial** de la que se extrae ADN. Cuando la enfermedad tiene un patrón de herencia ligado al cromosoma X y solo repercute clínicamente en los varones se determina antes el sexo fetal por métodos no invasivos, y se realiza el estudio si el feto es varón. En algunas enfermedades metabólicas el diagnóstico se hace por métodos bioquímicos en líquido amniótico mediante la determinación de metabolitos.

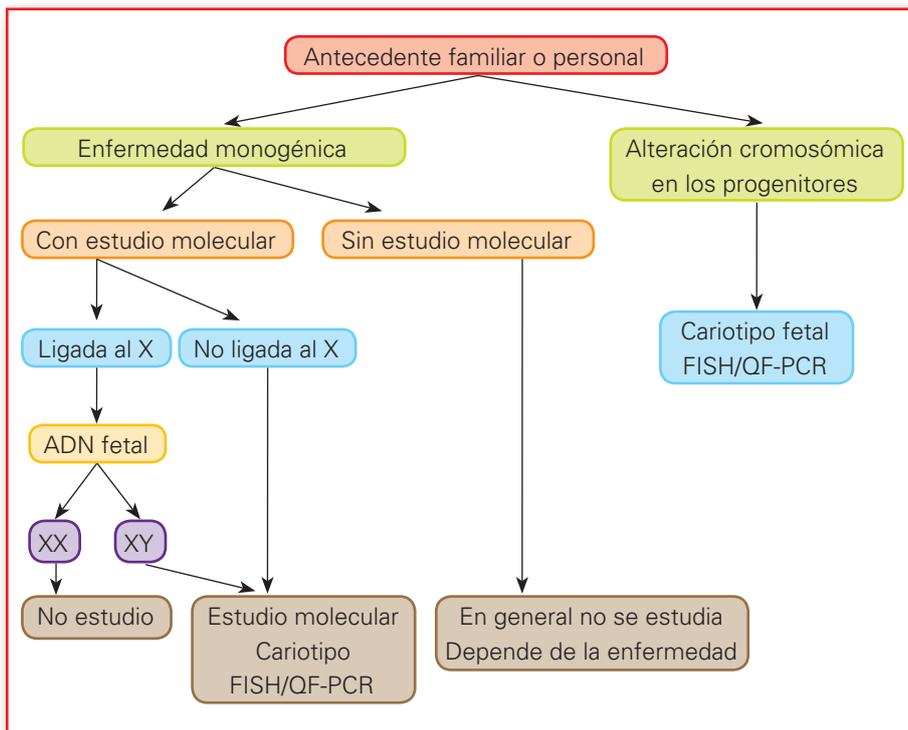


Figura 13. Indicaciones al diagnóstico prenatal invasivo.

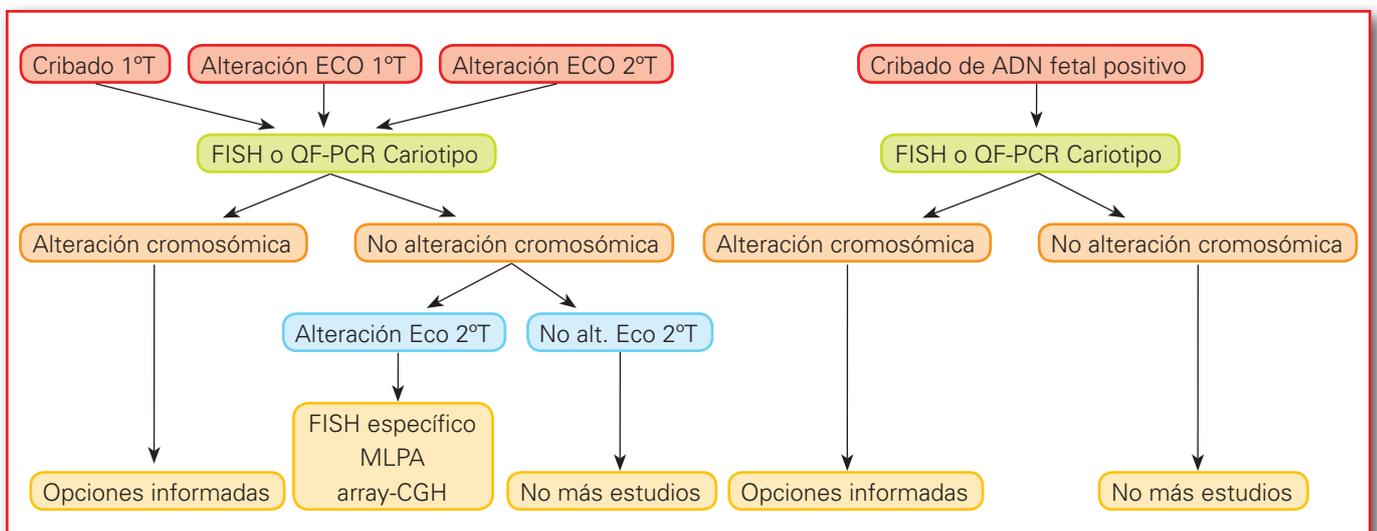


Figura 14. Indicaciones al diagnóstico prenatal invasivo.

- 】 En aquellas gestantes en las que existen antecedentes familiares y/o personales de algún tipo de enfermedad monogénica en las que es necesario algún tratamiento en la gestante para evitar alteraciones fetales, como, por ejemplo, en las hiperplasias suprarrenales congénitas.
- 】 En aquellos casos en los que la citogenética no diagnostica la anomalía fetal o el feto presenta signos compatibles con enfermedad monogénica.



## AMPLÍA TUS CONOCIMIENTOS

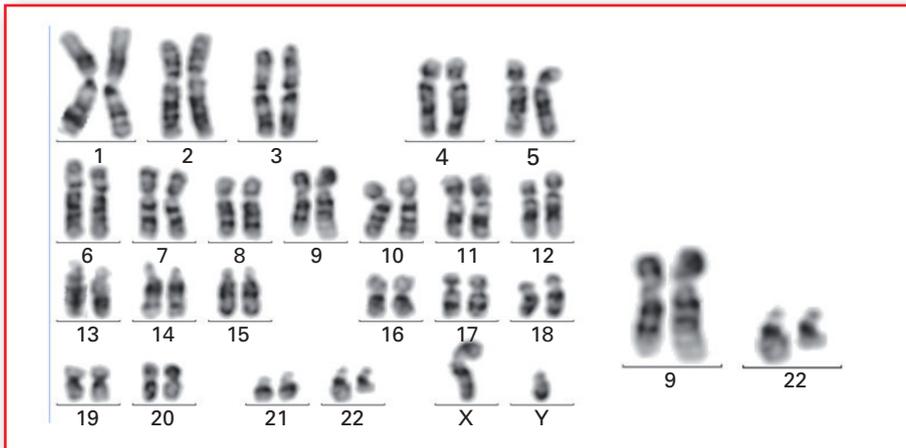
Dadas las características especiales que tiene este tipo de diagnóstico no se debe olvidar que hay que realizar un **asesoramiento pre-test** donde se explique con claridad:

- 】 El **riesgo de aborto** de los diferentes métodos de obtención de la muestra y sus ventajas e inconvenientes.
- 】 Las **limitaciones técnicas** y la posibilidad de tener que repetir la toma o añadir estudios (fallo en toma de muestra, fallo cultivo, contaminación con células maternas, mosaicismos confinados a placenta, pseudomosaicismo, en estudios moleculares).
- 】 Las **dificultades interpretativas** (polimorfismos, alteraciones cromosomas sexuales, extramicros y alteraciones estructurales de "novo", mosaicismo, sensibilidad de los estudios moleculares, etc.).
- 】 El **tiempo requerido para el diagnóstico**; las posibilidades de afectación fetal, su naturaleza, las consecuencias de la misma y las opciones informadas (interrupción legal del embarazo, tratamientos).
- 】 La **posibilidad de no encontrar la alteración genética** y por tanto disponer solo de seguimiento ecográfico para ver la evolución. Debe obtenerse el **consentimiento informado**.

El **asesoramiento pos-test** debe incluir la descripción de la alteración encontrada y debe permitir la consulta con otros especialistas.

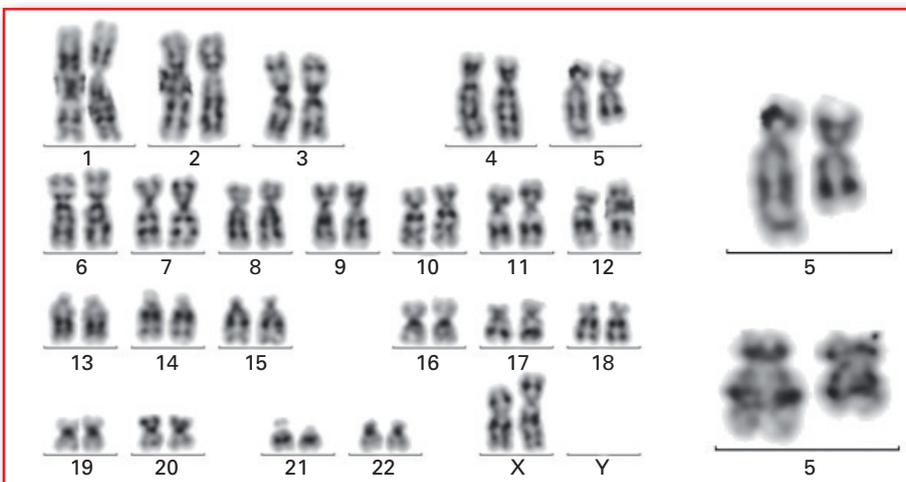
Es imprescindible proporcionar opciones informadas y riesgos de recurrencia para futuras gestaciones.

nes que pueden ser estudiados mediante técnica de FISH. Este reordenamiento está presente en el 95 % de los pacientes. Es una enfermedad de adultos, rara en niños, que puede mantenerse en una fase crónica durante décadas (cuando avanza a fase blástica se transforma en leucemia mieloide o linfocítica aguda de mal pronóstico) gracias a fármacos inhibidores de la tirosinquinasa (imatinib, dasatinib y nilotinib).



**Figura 16.** Translocación  $t(9;22)$ .

Otro ejemplo lo constituyen los **síndromes mielodisplásicos (SMD)**, donde las alteraciones citogenéticas determinan el pronóstico de la enfermedad, y en uno de ellos, el **síndrome 5q-**, determina el tratamiento (Figura 17). Los SMD son un grupo de hematopatías malignas donde las células que se producen en médula ósea no maduran, provocando una citopenia con alto riesgo de infección y hemorragias. Los pacientes que presentan la alteración citogenética deleción 5q se benefician del tratamiento con lenalidomida.



**Figura 17.** Síndrome 5q-.

## RESUMEN

- ✓ Tras conocer los **métodos de análisis cromosómico y bandedo**, hemos visto distintas enfermedades en las que hay **alteraciones cromosómicas o mosaicismo**.
- ✓ Los métodos de diagnóstico prenatal pueden ser **invasivos** (biopsia corial, amniocentesis, funiculocentesis) o **no invasivos**. El diagnóstico genético preimplantacional garantiza que la gestación y el feto sean normales antes de comenzar el embarazo.
- ✓ Hemos visto las principales aplicaciones de técnicas FISH en tumores sólidos, de los cultivos y técnicas de citogenética en oncohematología.

## G L O S A R I O

**Aneuploidía:** alteración del número de cromosomas que no es múltiplo del número haploide.

**Bandeo:** digestión y tinción de los cromosomas para su identificación.

**Cariotipo:** dotación cromosómica de una célula.

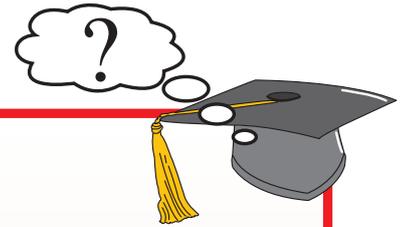
**Centrómero:** constricción del cromosoma que se une al huso mitótico. Divide al cromosoma en dos brazos (p y q), y las posiciones en el cromosoma se designan con relación a él.

**Cigoto:** célula diploide que viene de la fusión de un gameto masculino y uno femenino.

**Clon:** conjunto de células o material genético idénticos.

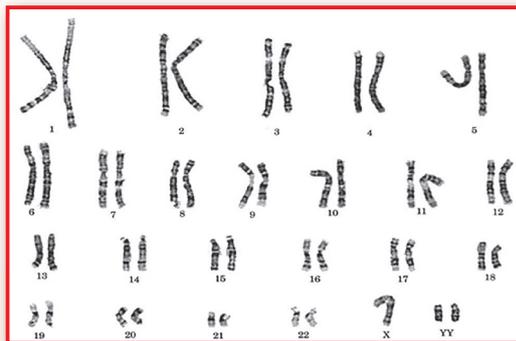
**Constitucional:** genotipo heredado presente en todos los tejidos.

**Cromatina:** complejo ADN más proteínas cromosómicas



## EJERCICIOS

- » **E1. Observa el siguiente cariotipo y describe la alteración cromosómica encontrada según la nomenclatura internacional:**



Fórmula cromosómica

.....

- » **E2. Escribe las siguientes fórmulas cromosómicas según la nomenclatura internacional:**

- Síndrome de Klinefelter.....
- Varón con síndrome de Down.....
- Mujer con síndrome de Edwards.....

- » **E3. Agrupa las siguientes alteraciones cromosómicas en numéricas y estructurales: inversión, duplicación, tetraploidías, triploidía, delección, monosomía, translocación recíproca, trisomía:**

Numéricas .....

Estructurales.....

- » **E4. Tacha las fórmulas cromosómicas erróneas:**

- 46,XXY
- 48,XXXXY
- 47,+21,XX
- 47,+18,XX
- 47,XY,+13
- 47,XY,+18

- » **E5. Completa los siguientes enunciados:**

- El estudio de los cromosomas pertenece al área de .....
- El número haploide de cromosomas es de .....
- La inversión pericéntrica del cromosoma 9 es una alteración cromosómica .....
- La translocación recíproca constitucional más frecuentemente encontrada es .....



## EVALÚATE TÚ MISMO

### 1. Hoy en día el bandeo cromosómico más utilizado de rutina en España es el:

- a) Bando Q.
- b) Bando R.
- c) Bando NOR.
- d) Bando G.

### 2. Los cromosomas humanos no se clasifican por posición del centrómero en:

- a) Acrocéntricos.
- b) Metacéntricos.
- c) Submetacéntricos.
- d) Extrametacéntricos.

### 3. Elige el enunciado verdadero sobre los cultivos primarios:

- a) En general los seres humanos tienen dos autosomas.
- b) En mujeres el par sexual es el XY.
- c) Los cromosomas poseen una constricción primaria que se llama centrómero.
- d) Todas las respuestas anteriores son falsas.

### 4. Los cromosomas:

- a) Van numerados del 1 al 22.
- b) Se clasifican por grupos desde la A al G.
- c) Las respuestas a y b son verdaderas.
- d) Las respuestas a y b son incorrectas.

### 5. Un cariotipo normal tiene:

- a) 23 cromosomas.
- b) 46 cromosomas.
- c) 48 cromosomas.
- d) Todas las respuestas anteriores son incorrectas.

### 6. Según la nomenclatura internacional, la fórmula cromosómica de un varón con síndrome de Down es:

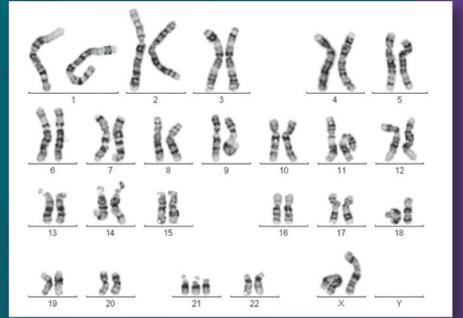
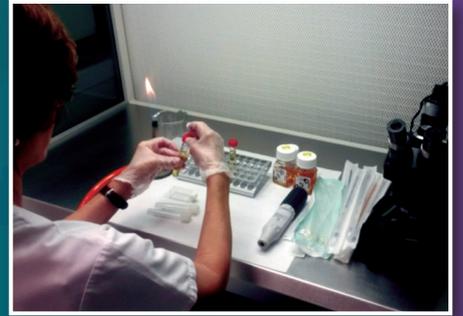
- a) 46,+21,XX.
- b) 47,XX,+21.
- c) 47,XY,+21.
- d) 47,XY,21+.



**SOLUCIONES**  
**EVALÚATE TÚ MISMO**



[http://www.aranformacion.es/images/Archivos/IMG\\_I\\_69\\_C\\_1.PDF](http://www.aranformacion.es/images/Archivos/IMG_I_69_C_1.PDF)



Avalado por:

**SeAP-IAP**

[Sociedad Española de Anatomía Patológica]  
[International Academy of Pathology]

Avalado por:



Sociedad Española de  
Hematología y Hemoterapia

ISBN 978-84-16293-91-9



9 788416 293919