

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

Caracterización de los procesos que se realizan en los laboratorios de citogenética y biología molecular	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

Realización de cultivos celulares	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

Aplicación de técnicas de análisis cromosómico	59
1. Técnica de obtención de extensiones cromosómicas. Cultivo y sacrificio celular .	60
2. Métodos de tinción y bandeo 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

Aplicación de técnicas de extracción de ácidos nucleicos	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

Aplicación de técnicas de PCR y electroforesis al estudio de los ácidos nucleicos	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

Aplicación de técnicas de hibridación con sonda	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

Determinación de métodos de clonación y secuenciación del ADN	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
Soluciones “Evalúate tú mismo”	207

capítulo

4

APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Julián Sanz Ortega

Sumario

1. Características estructurales y funcionales de los ácidos nucleicos
2. Propiedades físicas relacionadas con las técnicas de biología molecular
3. Endonucleasas de restricción y otras enzimas asociadas a los ácidos nucleicos
4. Mutaciones y polimorfismos
5. Técnicas de extracción de adn en sangre periférica, biopsias y tejidos
6. Extracción de ARN
7. Sistemas automáticos de extracción de ácidos nucleicos

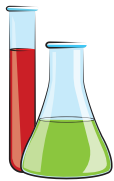
El principal objetivo de este capítulo es entender los **fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**. Veremos sus **etapas** (desnaturalización, anillamiento y extensión del cebador), sus **variantes** y sus **aplicaciones**, entre otras, en patología forense.

Finalmente, conoceremos los principios de la **electroforesis**, sus tipos y cómo se aplica en estudios de PCR. Las técnicas de PCR han sido la principal revolución en biología molecular en los últimos años.

I. TÉCNICAS DE PCR Y VARIANTES

La **reacción en cadena de la polimerasa** (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) es un método para hacer un gran número de copias de un segmento de ADN específico. La PCR multiplica («amplifica») exponencialmente una secuencia específica de ADN. Representa uno de los avances más importantes de la historia de la biotecnología. En 1986, el Dr. Kary Banks Mullis (Figura 1) describió la PCR al realizar *in vitro* el procedimiento que la célula emplea *in vivo* para replicar su ADN.

Con la PCR, pequeñas cantidades de **material genético** pueden ser amplificadas millones de veces en pocas horas permitiendo la detección rápida y fiable de los **marcadores genéticos** de enfermedades infecciosas, cáncer y alteraciones genéticas.



El

descubrimiento de la técnica de PCR supuso uno de los mayores avances de la historia en biología.



RECUERDA QUE

El descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa le valió al Dr. Kary Banks Mullis el Premio Nobel de Química en 1993.



Figura 1. Dr. Kary Banks Mullis.

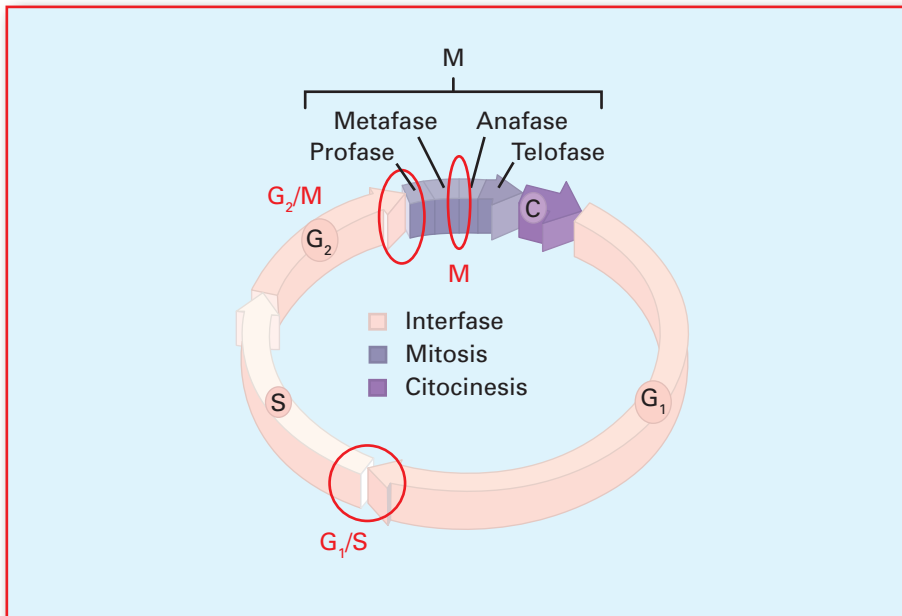


Figura 1. Ciclo celular.

► **Fase M.** Tiene lugar la mitosis y la citocinesis. La mitosis es el proceso de división celular por el cual una célula somática se divide en dos células idénticas con misma dotación de cromosomas, de tal forma que el número de cromosomas por núcleo permanece inalterable. Es un proceso continuo que suele durar 1 o 2 horas. Se separa en cinco fases: profase, prometáfase, metafases, anafase y telofase.

- Durante la **profase** los cromosomas se condensan y se empiezan a formar los microtúbulos del huso mitótico.
- En la **prometáfase** la membrana nuclear se desintegra y los cromosomas se dispersan en el interior de la célula.
- Durante la **metafase** los cromosomas están anclados al huso mitótico y alcanzan su mayor grado de condensación, siendo por ello más fáciles de observar al microscopio óptico. Cada cromosoma tiene dos cromátidas que todavía no se han separado.
- En la **anafase** las dos cromátidas hijas de cada cromosoma se separan hacia los polos opuestos de la célula.
- Durante la **telofase** las cromátidas son ahora cromosomas sencillos y están separadas totalmente. Se separa también el citoplasma, proceso llamado citocinesis. Ya se han formado las dos células hijas idénticas.



RECUERDA QUE

Huso mitótico es una estructura formada por microtúbulos que se une a los centrómeros de los cromosomas durante la división celular.

La **mitosis** (Figura 2) es el proceso de división celular por el cual una célula somática se divide en dos células idénticas con la misma dotación de cromosomas, de tal forma que el número de cromosomas por núcleo permanece inalterable.

AMPLÍA TUS CONOCIMIENTOS

Inhibidores de PCR

Hay que conocer los potenciales inhibidores de PCR que se emplean a veces en etapas previas, para eliminarlos y evitar su presencia en la reacción de PCR.

Inhibidores de PCR

TABLA 1

Inhibidor	Concentración de inhibición
Dodecilsulfato sódico	> 0,005 %
Fenol	> 0,2 %
Etanol	> 1 %
Isopropanol	> 1 %
Acetato de sodio	> 5 mM
Cloruro de sodio	> 25 mM
EDTA	> 0,5 mM
Hemoglobina	> 1 GM/ml
Heparina	> 0,15 UI/ml
Urea	> 20 mM
Etanol	Wolf
Isopropanol	Wolf

6. EXTRACCIÓN DE ARN

6.1. PRECAUCIONES GENERALES

Es preciso recordar la abundancia en el ambiente de las RNAsas (enzimas que rompen ARN) pueden ser introducidas accidentalmente durante cualquier paso del proceso, por lo cual deben tenerse en cuenta los siguientes aspectos cuando se trabaja con ARN:



RECUERDA QUE

La ADN polimerasa Taq fue aislada del *Thermus aquaticus*, microorganismo que era capaz de crecer a temperaturas elevadas (79-85 °C) en el agua de un géiser.

Cada uno de los ciclos consta de las **tres etapas** siguientes (Figura 2):

- 1) Desnaturalización del ADN bicatenario:** se calienta la muestra a 93-95 °C, durante unos 30 segundos; de esta manera se separa la doble hélice en dos cadenas sencillas.
- 2) Anillamiento (*annealing*):** unión específica de los cebadores a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases. A una temperatura que varía entre 50 y 70 °C, cada uno de los *primers* se une a una cadena diferente delimitando la secuencia diana que se pretende amplificar. Para cada pareja de cebadores hay que elegir la temperatura de anillamiento óptima dependiendo de su composición de nucleótidos.
- 3) Elongación o síntesis de ADN:** incorporar nucleótidos a los *primers* haciendo una copia completa y exacta de la cadena molde. La síntesis *in vitro* de ADN está habitualmente catalizada por la enzima llamada «Taq polimerasa» aunque se ha descrito una gran variedad de polimerasas termorresistentes como ya se comentó con anterioridad. Se realiza subiendo la temperatura a 70-75 °C.

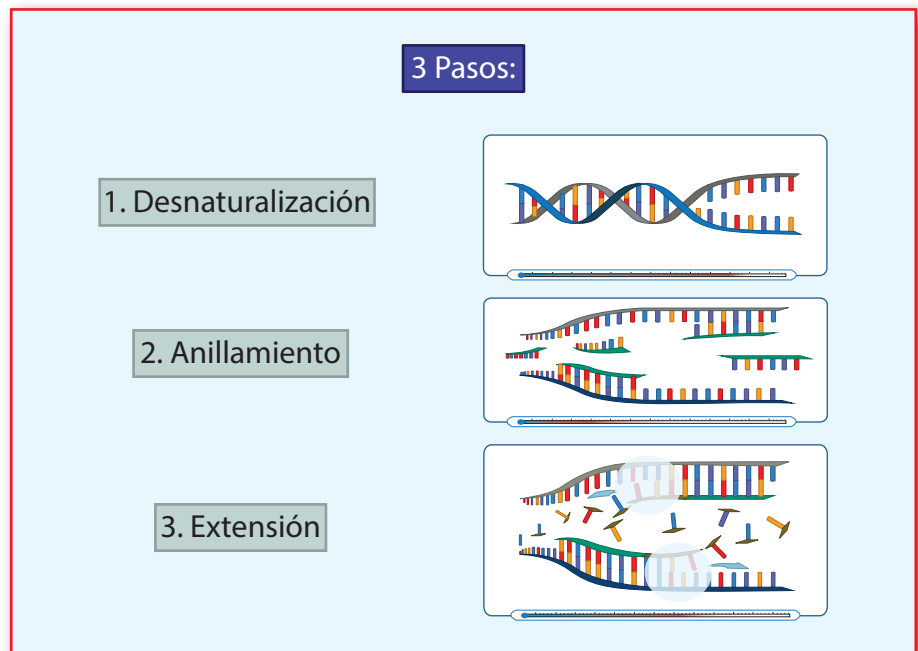
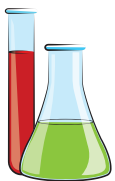


Figura 2. Etapas de la PCR.

El **termociclador** es un equipo de laboratorio que permite llevar a cabo, de forma automática y reproducible, la sucesión de ciclos de temperatura (en cada ciclo, se repiten sucesivamente las tres fases) necesarios para realizar una PCR (Figura 3).



Las tres fases de la PCR son desnaturalización, anillamiento y extensión.

- › Mutaciones de K-RAS y N-RAS en cáncer de colon.
- › GIST muestran mutaciones de c-kit.

BIOMARCADOR	CÁNCER	FÁRMACO (ejemplos)
HER2 (FISH/IHQ)	Mama Estómago	Trastuzumab Lapatinib Trastuzumab
KIT y PDGFRA (mutación)	GIST	Imatinib
KRAS y NRAS (mutación)	Colo-rectal	Panitumumab Cetuximab
EGFR (mutación)	Pulmón (adenocarcinoma)	Gefitinib Erlotinib
ALK (FISH/IHQ)	Pulmón (adenocarcinoma)	Crizotinib
BRAF (mutación/IHQ)	Melanoma	Vemurafenib



<https://faculty.sharepoint.illinoisstate.edu/jfriese/CHE-344/SiteAssets/pages/default/DNA%20Forensics%20ORNL.pdf>



http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10/adn-forense-investigacion-criminal-y-busqueda-de-desaparecidos_604



http://institutodetoxicologia.justicia.es/wps/portal/intcf_internet/portada/utilidades

4.3. Aplicaciones forenses basadas en PCR

Los **genetistas forenses** pueden estudiar vestigios biológicos de interés en la investigación criminal de muy diversos delitos (parecido a series de televisión como CSI), identificar restos humanos y personas desaparecidas, pruebas de paternidad y otras relaciones de parentesco. Habitualmente se usan muestras de sangre, semen, saliva, orina, pelos, tejidos, restos celulares en objetos usados o tocados y las muestras de referencia (normalmente una toma bucal o una muestra de sangre).

Los procedimientos serían sobre todo PCR de regiones repetitivas o ADN mitocondrial (mtDNA) y RFLP:

- › **Amplificación y marcaje fluorescente** de las regiones variables de ADN de interés (microsatélites, mtDNA) utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

INFORMACIÓN IMPORTANTE

La identificación con ADN o "huella genética" se basa en estudiar una serie de fragmentos de ADN presentes en todos los individuos altamente variables o polimórficos de unos individuos a otros. Permite identificar a un individuo con una probabilidad muy cercana al 100 %.



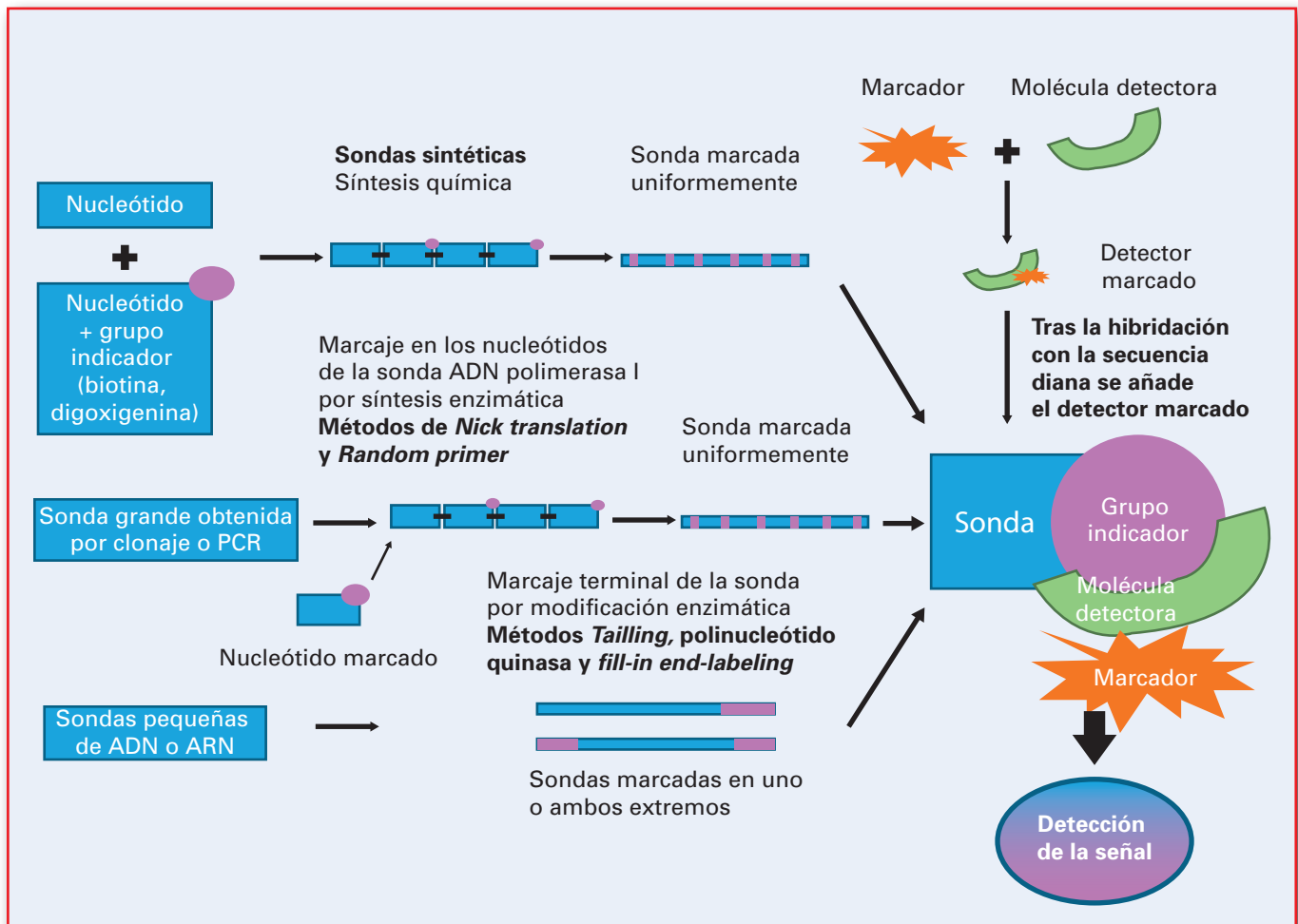


Figura 2. Marcaje indirecto de sondas.

AMPLÍA TUS CONOCIMIENTOS

El **marcaje** de la sonda puede ser:

- › **Directo:** la sonda lleva unido un marcador que se puede detectar.
- › **Indirecto:** la sonda lleva unida una molécula no detectable o grupo indicador que es reconocido en una reacción posterior por un anticuerpo que es el que está marcado.

La sonda puede marcarse a la vez que es sintetizada (sondas sintéticas) incluyendo nucleótidos marcados (dNTPs) en la reacción de síntesis, o después de haber sido sintetizada completamente (sondas clonadas).

Un alelo es una versión específica de un gen. Cada gen autosómico tiene dos alelos, uno paterno y otro materno que pueden variar en su secuencia nucleotídica. Las mujeres XX también tienen dos alelos en los genes localizados en los cromosomas X pero los varones solo tienen un alelo (XY).

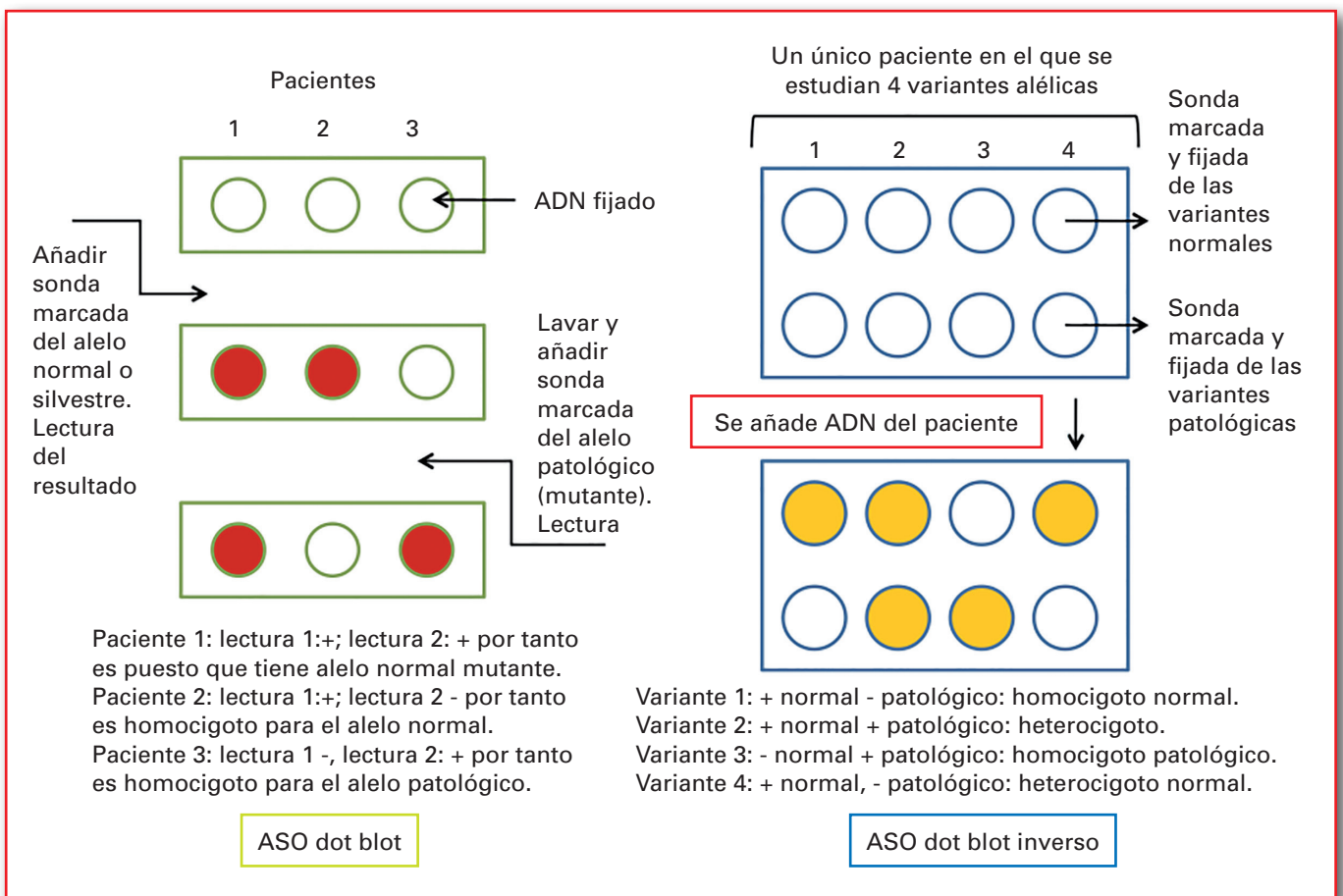


Figura 8. Ensayo de dot-blot.

3.1.2. Southern blot (Figura 9)

Este método recibe el nombre de su inventor Edwin Southern, y se utiliza para la detección de genes o fragmentos de ADN separados por tamaño a partir de un ADN genómico. Se realiza a partir de ADN extraído de todo tipo de muestras y las sondas suelen estar marcadas con radioisótopos. Es utilizada para el diagnóstico molecular de enfermedades genéticas. Este ensayo consta de siete etapas:

➤ Extracción del ADN genómico.

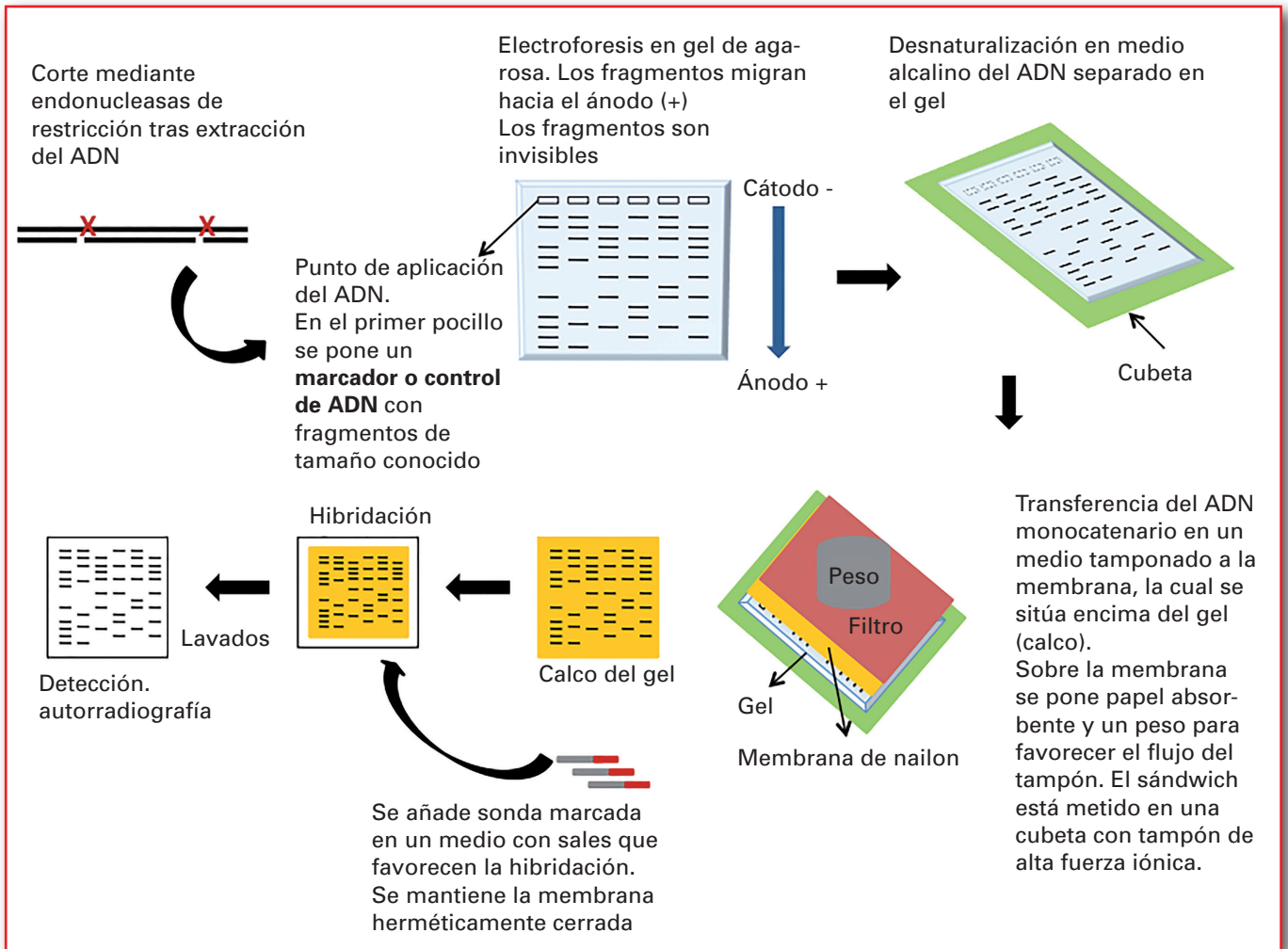


Figura 9. Ensayo de Southern.

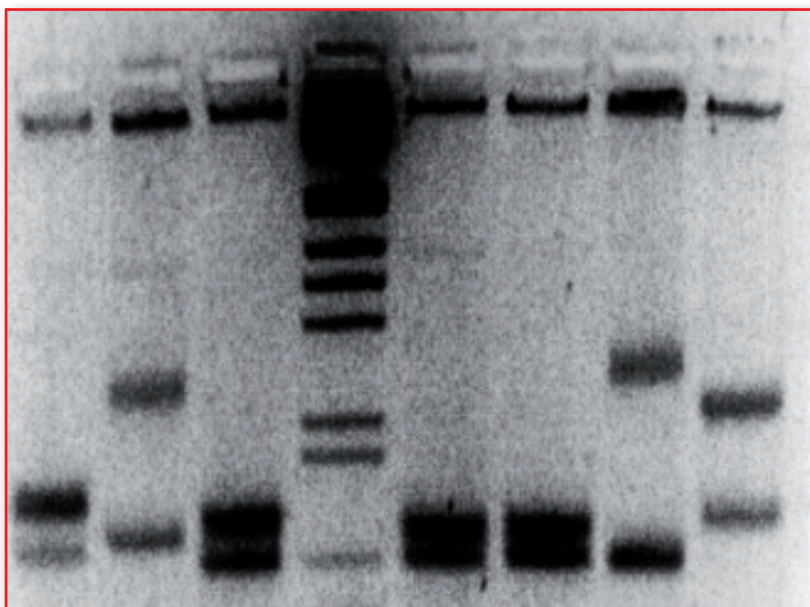


Figura 10. Radiografía resultado de un Southern blot.

TABLA 2

Aplicaciones clínicas del FISH

Aplicaciones clínicas del FISH	Muestras	Estudios
<p>Tisular para estudio de expresión de oncogenes / oncosupresores. Para diagnóstico, pronóstico y tratamiento de tumores sólidos</p>	<p>Cortes histológicos parafinados de tumor sólido Oncogenética</p>	<ul style="list-style-type: none"> – Estudio de amplificación her2/neu (cerbb2) en cáncer de mama – Deleciones de 1p/19p en oligodendrogliomas – Translocación SYT en sarcoma sinovial – Translocación EWG en sarcoma de Ewing – Técnica de hibridación <i>in situ</i> para detección de Epstein Barr virus
<p>Citogenético para el diagnóstico constitucional directo o tras cultivo celular</p> <p>Citogenético en oncohematología para diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las hemopatías malignas</p>	<p>Prenatal: vellosidad corial, líquido amniótico, sangre de cordón, placenta, restos abortivos</p> <p>Posnatal: sangre periférica, saliva, piel, otros</p> <p>Oncohematología: médula ósea</p>	<ul style="list-style-type: none"> – Detección rápida de aneuploidías – Determinación del sexo en enfermedades ligadas al cromosoma X – Estudio de alteraciones cromosómicas en mosaico – Estudio de alteraciones cromosómicas numéricas – Identificación de cromosomas marcadores – Estudio de reordenamientos equilibrados o desequilibrados – Síndromes de microdelección y regiones subteloméricas – Confirmación de cualquier tipo de alteración cromosómica detectada en cariotipo fetal convencional <ul style="list-style-type: none"> – Síndromes mielodisplásicos: del 5q31, del 7q31, del 20q, trisomía 8, etc. – Leucemia mieloide aguda: t(9;22) BCR/ABL, t(8;21) AML/ETO, 11q23 MLL inv(16) CBPB/MYH11, t(15;17) PML/RARA – Leucemia mieloide crónica: t(9;22) BCR/ABL – Leucemia linfoide aguda: t(9;22) BCR/ABL, t(12;21) TEL/AML, 11q23 MLL, MYC/IgH – Leucemia linfoide crónica: CEP 12, 11q23 (ATM), del(17) (p13) (p53), del(13) (q14), del(6) (q23) – Linfomas: t(11;14) BCL-1/IgH, t(14;18) BCL-2/IgH, t(8;14) IgH/c-MYC, 2p23 ALK, t(14;18) MALT/IgH, 3q27 BCL-6 – Mieloma múltiple: del(13) (q14), del(17) (p13) (p53), Aneuploidías (CEP 5, CEP 9 y CEP 15), Reordenamiento IgH, t(4;14) FGRF3/IgH, t(14;16) IgH/MAF, t(11;14) CCND1 Tx/IGH, t(14;20) IgH/MAFB, t(6;14) CCND3/IgH – Otras alteraciones

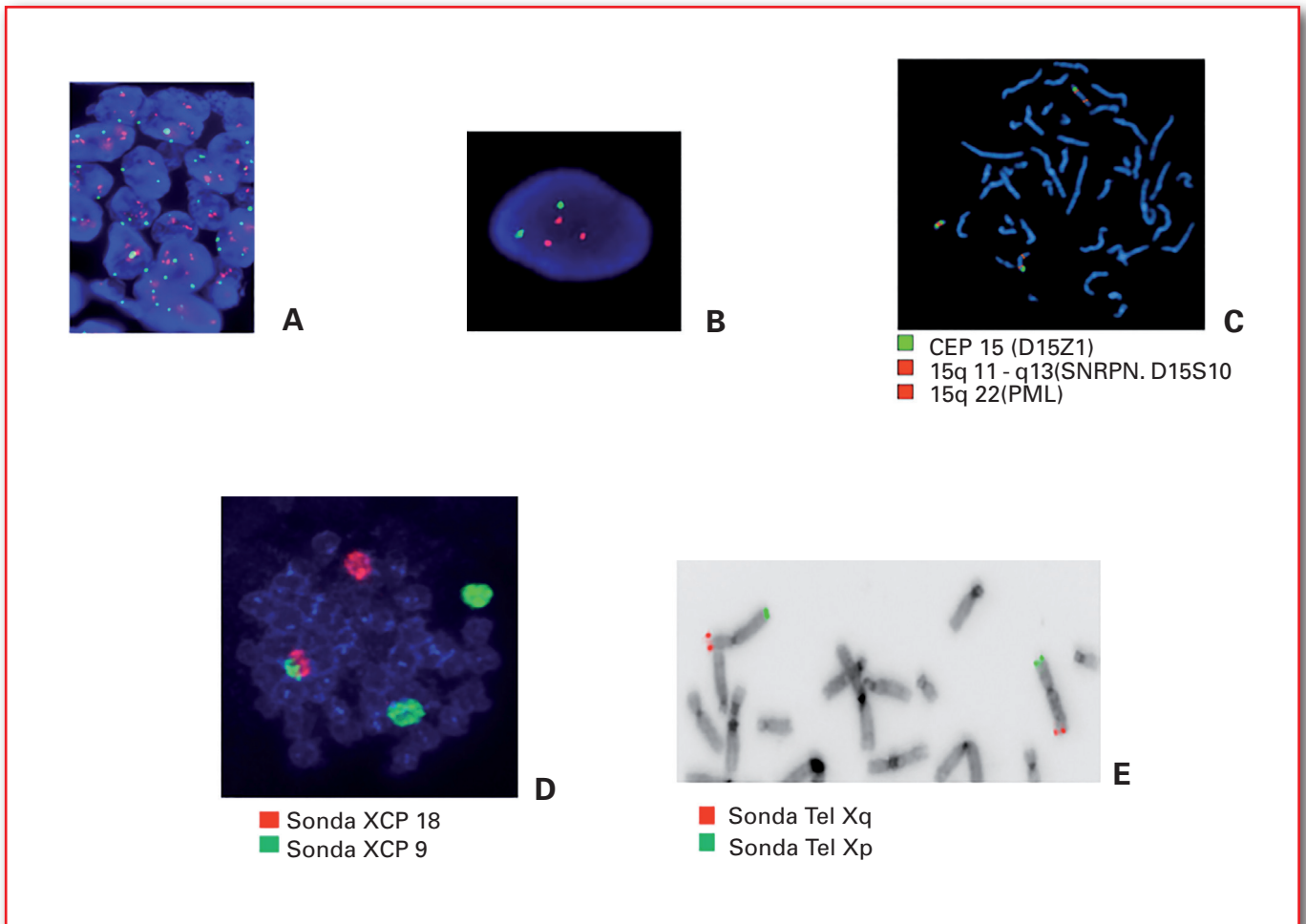


Figura 12. Casos prácticos de aplicación del FISH. A. Estudio de amplificación *her2/neu* (*cerbb2*) en cáncer de mama; B. Aneuploidías en líquido amniótico o vellosidad. LS113: verde. LS121: rojo Trisomía 21; C. Identificación de cromosoma marcador. Síndrome de invdup(15); D. Painting. Reordenamiento en leucemia; E. Subtelómeros en inversión pericéntrica del X.

4.2. CGH-array. CARIOTIPO MOLECULAR

Esta técnica es una variante del FISH que amplía la resolución y capacidad de detección de la variante CGH antes mencionada y realizada en portas con cromosomas metafásicos normales. En la CGH-array, dos ADN genómicos (diana y control) marcados con grupos fluorescentes de diferente color se hibridan a la vez sobre portas donde se han fijado miles de sondas que cubren todo el genoma o las regiones que queremos estudiar. El análisis del estudio se realiza en una plataforma bioinformática que realiza un análisis cuantitativo comparando la proporción de ADN de cada color, de manera que según la relación de la fluorescencia se miden las variaciones en el número de copias de ADN en los diferentes *loci* (CNVs, *copy number variation*).

RESUMEN

- ✓ En este capítulo hemos conocido los **dos tipos** de sondas existentes:
 - Las **convencionales** o **clonadas**: fueron las primeras utilizadas, pueden ser de ADN o ARN pero tienen un marcaje e hibridación difícil y están en desuso.
 - Las **sintéticas**: pueden ser de ARN pero principalmente son de ADN, son fáciles de hacer, económicas y con un manejo más sencillo.
- ✓ La **forma de marcar** estas sondas para poder ser detectadas mediante procesos directos (moléculas detectables sobre la propia sonda) o indirectos (requieren de una reacción aparte para su detección).
- ✓ A continuación hemos visto con detalle el **proceso de hibridación** con los factores que influyen en ella: composición de bases, tiempo, concentración, tamaño... junto a las **técnicas de hibridación** existentes.
- ✓ Por último se explica en detalle la **técnica de hibridación *in situ* fluorescente** dada su gran aplicación en el diagnóstico clínico asistencial, detallándose los pasos de su procedimiento y los tipos y aplicaciones de las sondas existentes.

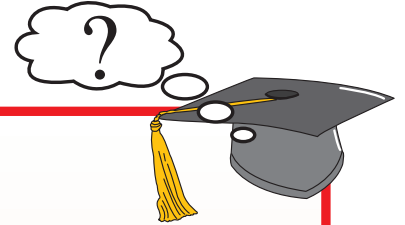
G L O S A R I O

Ácido nucleico: polímero de nucleótidos unidos covalentemente mediante enlaces fosfodiéster entre el grupo OH en posición 3' del azúcar de un nucleótido y el grupo fosfato 5' del siguiente nucleótido.

Adenina: base nitrogenada derivada de purina (púrica).

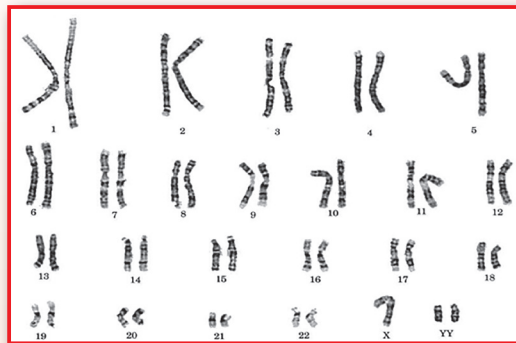
Amplificación de ADN: proceso en que se generan copias de un fragmento de ADN.

Apareamiento de bases: formación de puentes de hidrógeno entre las bases de dos cadenas de ácido nucleico complementarias.



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. ¿Cuál de las siguientes afirmaciones es falsa?:

- a) Una sonda genética es una molécula bioquímica de ADN o ARN.
- b) Una sonda sirve para estudiar un gen o fragmento de ADN diana.
- c) Una sonda hibrida por complementariedad de bases.
- d) Una sonda debe tener regiones complementarias a muchas regiones del genoma.

2. La sensibilidad de una sonda depende de:

- a) Del tipo marcaje.
- b) De la intensidad de señal.
- c) De su tamaño.
- d) Todas las respuestas anteriores son correctas.

3. Los oligonucleótidos sintéticos:

- a) Son de gran tamaño.
- b) Son carísimos.
- c) Se obtienen por clonación celular.
- d) Necesitan un tiempo de hibridación menor.

4. ¿Qué es falso de los tipos de marcaje de las sondas?:

- a) Pueden ser directos o indirectos.
- b) No existe el marcaje enzimático.
- c) Pueden marcarse con fluorescencia.
- d) Los marcadores no radiactivos se usan con más frecuencia.

5. La hibridación molecular:

- a) Se basa en la capacidad que tienen las hebras de un ADN desnaturalizado de volver a unirse por complementariedad de bases.
- b) El ADN se desnaturaliza principalmente con productos químicos.
- c) La renaturalización se produce al bajar rápidamente la temperatura.
- d) La rotura de los puentes de H no es necesaria durante la desnaturalización.

6. En la hibridación molecular influye (señala la falsa):

- a) El tamaño de la sonda.
- b) La concentración de ADN diana.
- c) La concentración de sonda.
- d) Vale cualquier tipo de *buffer* de reacción.



SOLUCIONES
EVALÚATE TÚ MISMO



http://www.aranformacion.es/images/Archivos/IMG_I_69_C_1.PDF