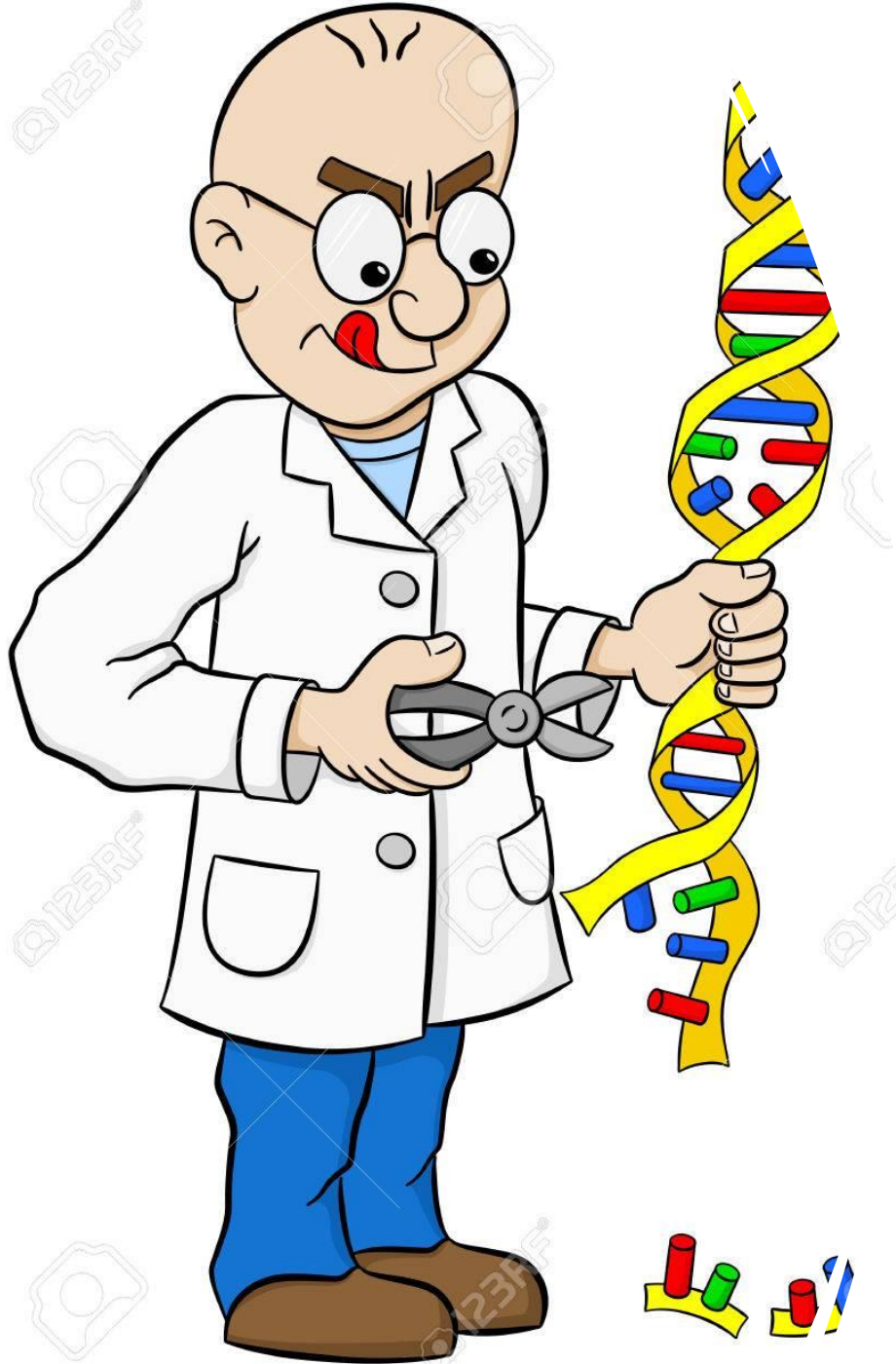




Actualización de las técnicas realizadas en el laboratorio de genética

Sara Martín Junco

R2 Análisis Clínicos

Hospital de Mérida

Índice

- Extracción ADN
- Trombofilias
- Hemocromatosis
- α -Talasemia
- Papilomavirus
- ¿Algo más?



Importancia de la extracción de ADN

- La extracción de DNA es la técnica mediante el cual se obtiene una muestra de DNA genómico de células nucleadas, preservando su integridad, a partir de una muestra de un paciente
- Sirve para el estudio molecular de las enfermedades genéticas mediante otro tipo de técnicas

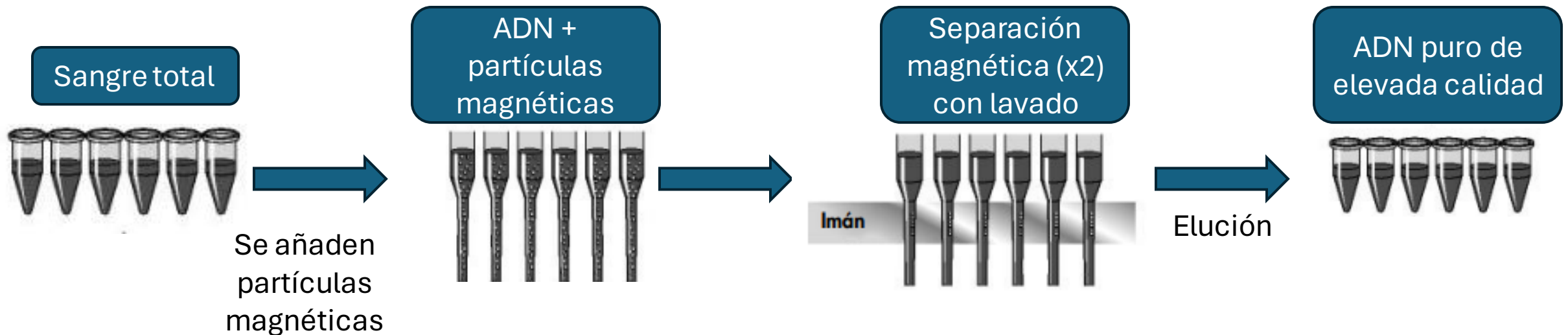


Extracción de ADN no automatizada

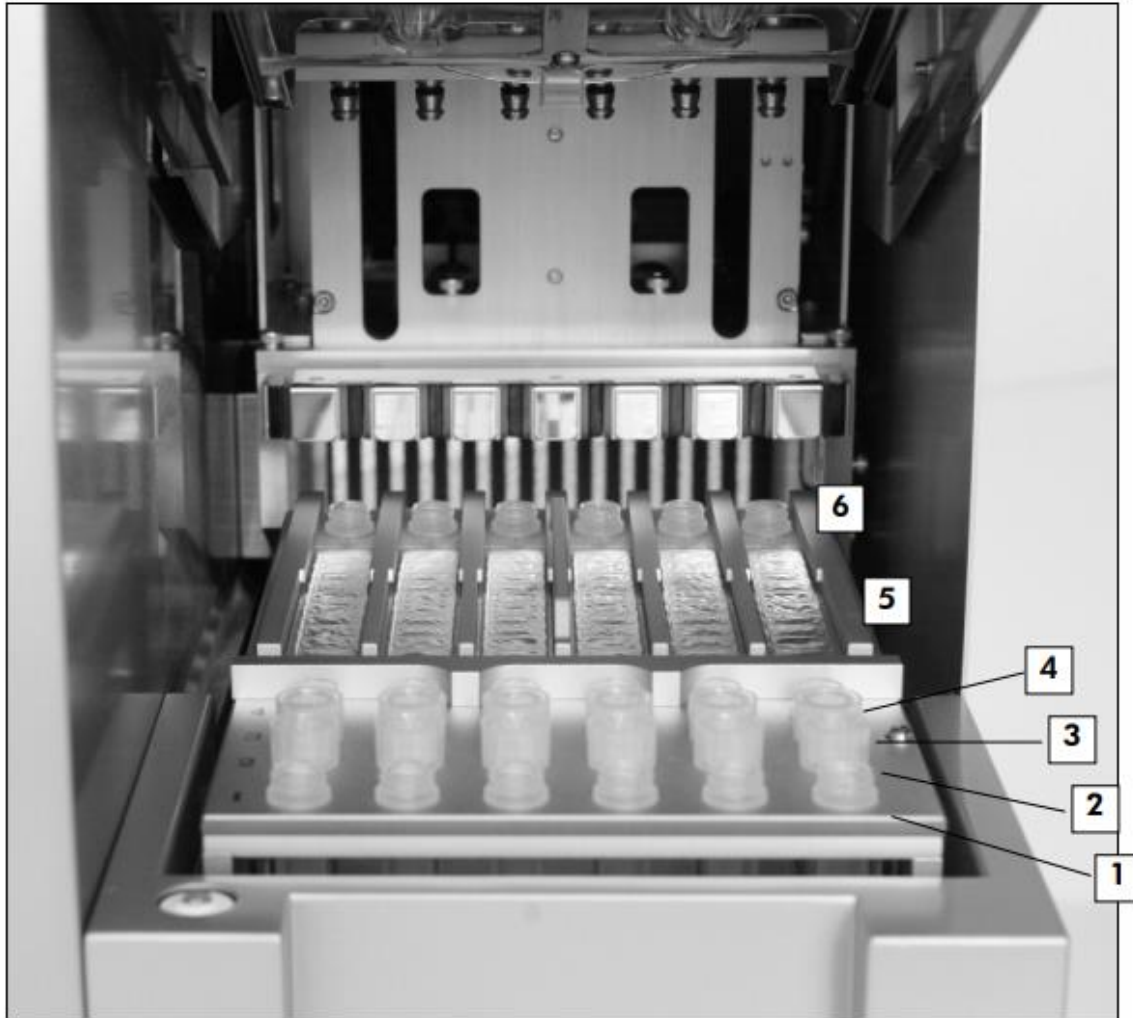
- 1) Lisis celular: mediante una solución salina que contiene detergentes que desnaturalizan proteínas, lípidos y proteasas.
- 2) Purificación:
 - mediante isopropanolo o etanol: alto rendimiento, pero restos orgánicos
 - solventes orgánicos: pueden contaminar la muestra
 - columnas de sílice
 - separación magnética.

- Purificación de ADN genómico a partir de muestras de sangre total.
- Es una tecnología de partículas magnéticas que proporciona ADN de alta calidad idóneo para su uso directo en aplicaciones posteriores como la amplificación.

- Procedimiento:



Extracción de ADN



1) Tubo de elución, donde se recogerá el ADN

2) Soporte de puntas desechables con puntas desechables

3) Etanol 80%

4) Muestras

5) Cartuchos de reactivos

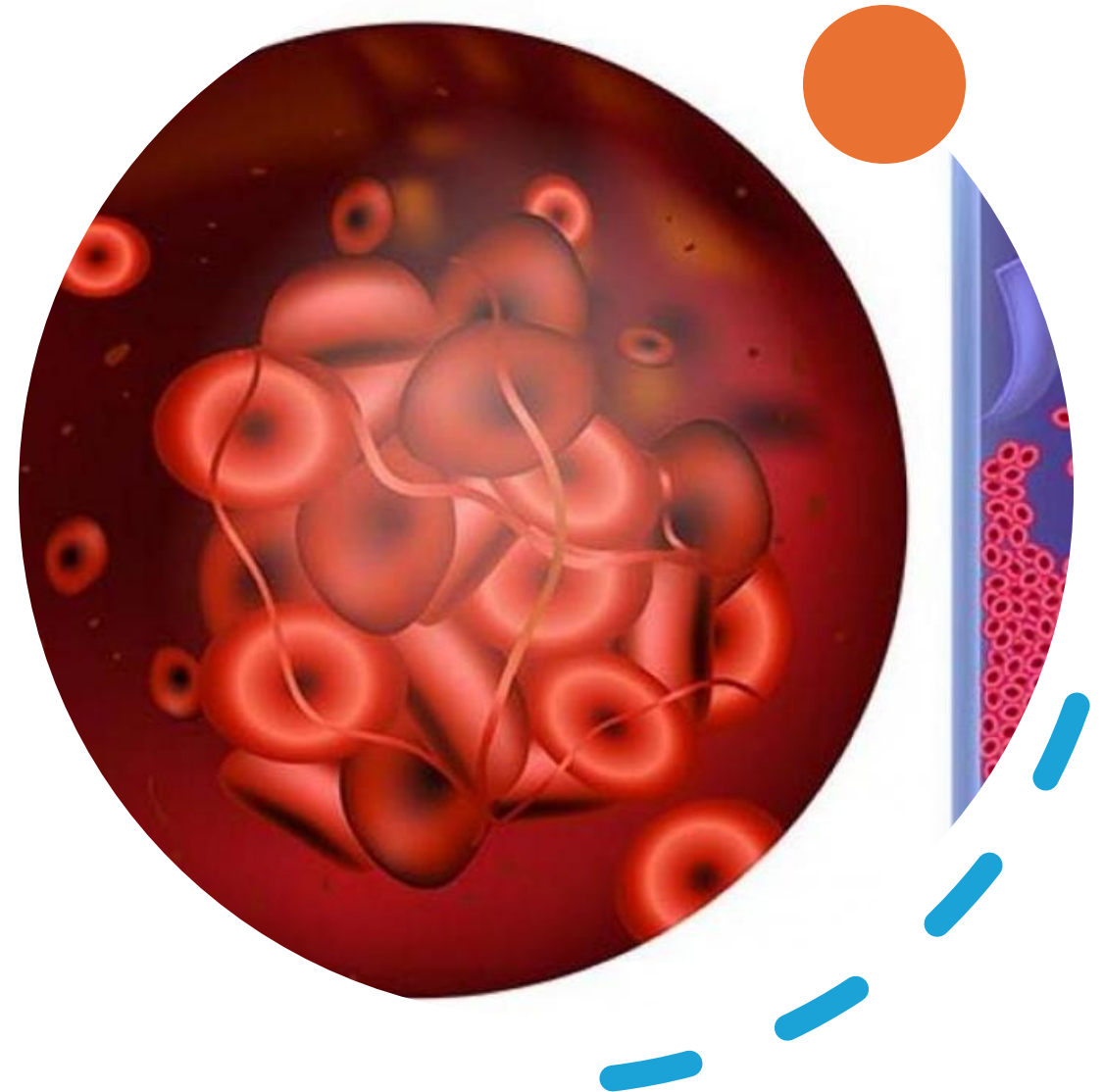




Técnicas realizadas en
el servicio de análisis
clínicos del Hospital
de Mérida

Trombofilia hereditaria

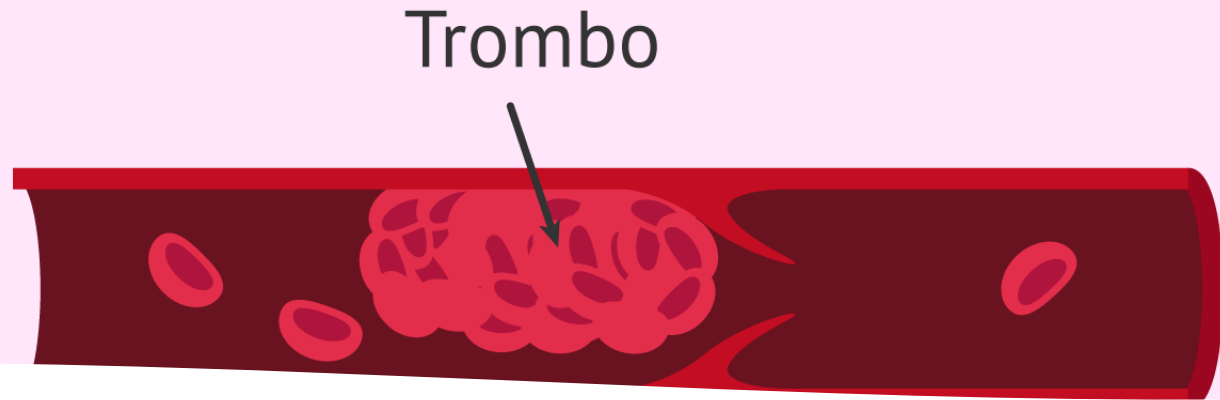
- Enfermedad que supone la tendencia a desarrollar trombosis venosa en base a un estado de hipercoagulabilidad, debido a trastornos hereditarios de la coagulación o fibrinolisis.
- Trastorno multifactorial que afecta a todas las etnias y cuya incidencia aumenta con la edad y varía en los distintos grupos étnicos
- Los tres factores fundamentales en la patogénesis de la trombosis intravascular: daño de la pared vascular, éstasis del flujo sanguíneo y cambios en la coagulabilidad de la sangre.



**Vaso sanguíneo
normal**

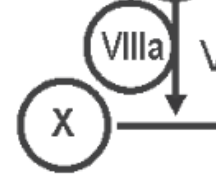
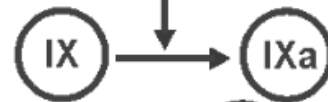
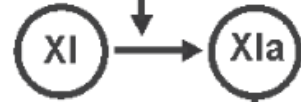


**Vaso sanguíneo
con trombo**



- La trombosis venosa se produce cuando hay daño en la pared de las venas, flujo de la sangre lento y un incremento en la coagulabilidad, que ocasiona la obstrucción de alguna vena del organismo e impide el flujo sanguíneo.

VIA INTRINSECA



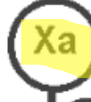
VIA EXTRINSECA



FT



VIA COMUN



Protrombina

Trombina

Fibrinógeno

Fibrina

Polimeración
de la fibrina

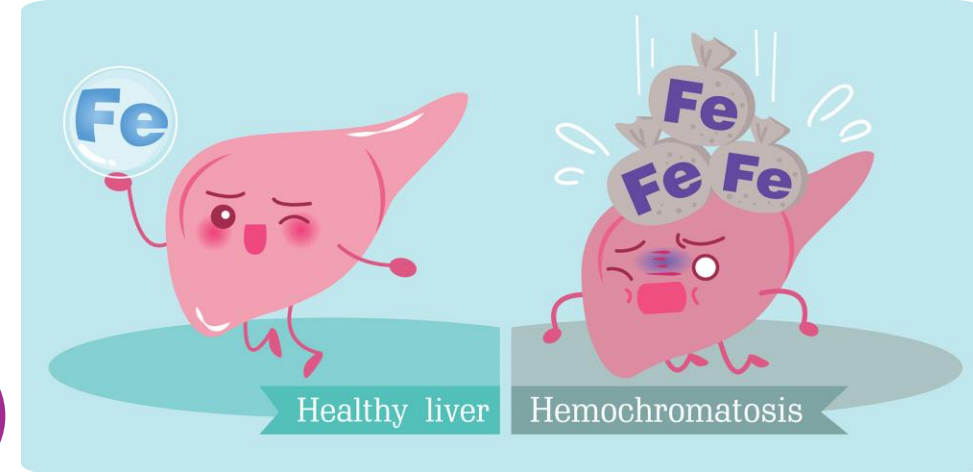
Proteína C



- Mutaciones causales más frecuentes:

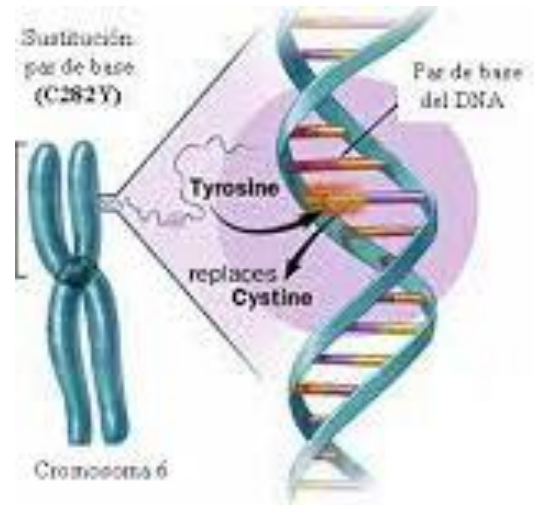
Hemocromatosis

- Enfermedad de sobrecarga de hierro, que ocurre en algunos individuos con mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas en el **gen *HFE***.
- Los depósitos de hierro están determinados en gran parte por la absorción de hierro en la dieta por los enterocitos del ID y la liberación de hierro endógeno por los macrófagos que fagocitan eritrocitos.
- Se identificaron dos mutaciones en el gen de la proteína HFE que juegan un papel decisivo en el paso del hierro desde la sangre al interior de las células.

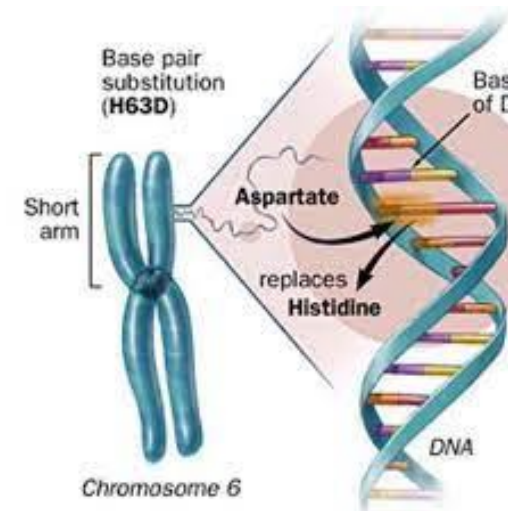


Variantes más frecuentes:

Mutación en Cys282Tyr:
90-95% homocigotos para
esta mutación



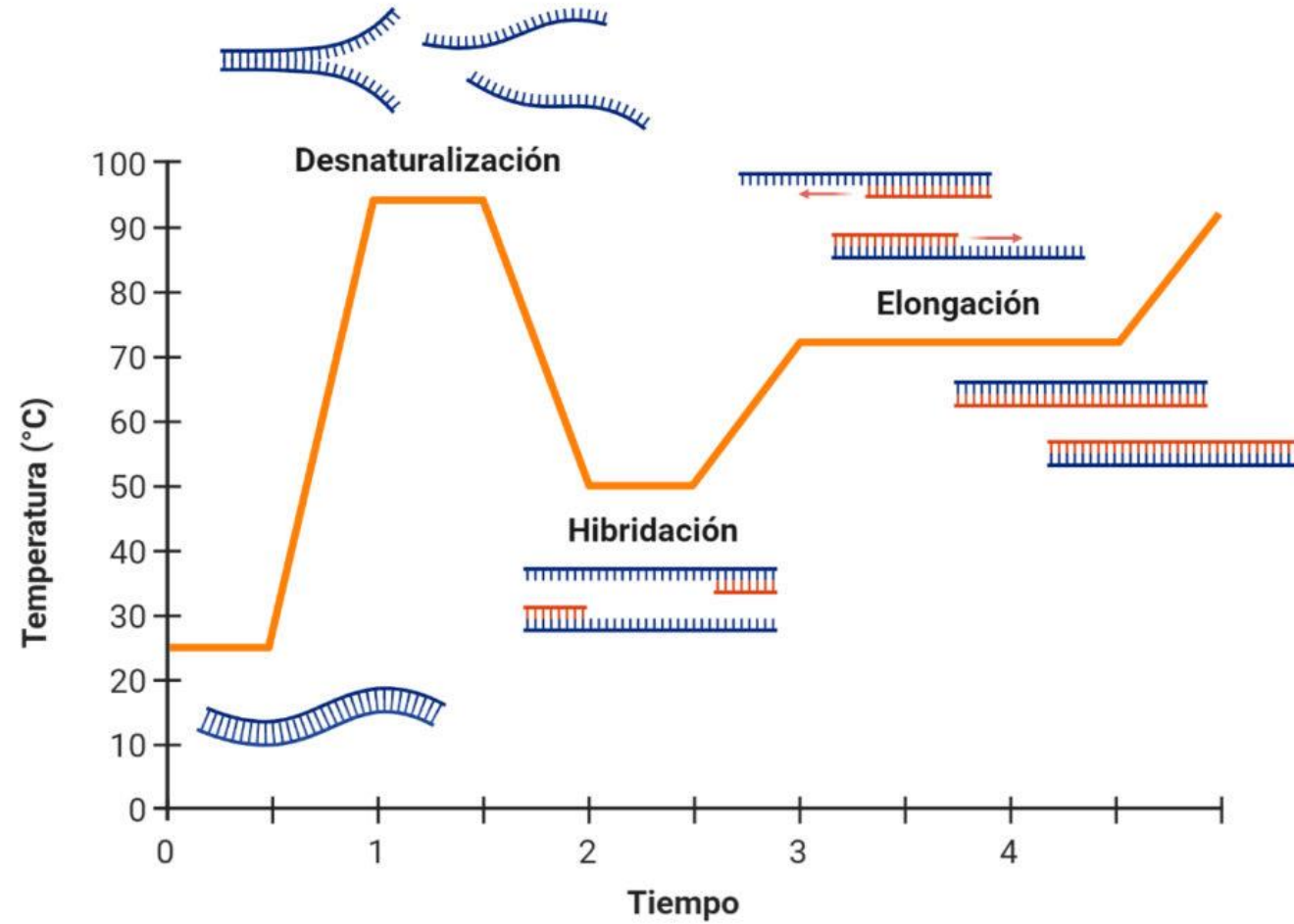
Mutación His63Asp: no
produce hemocromatosis
clínica en homocigosis
salvo que existan causas
adicionales.

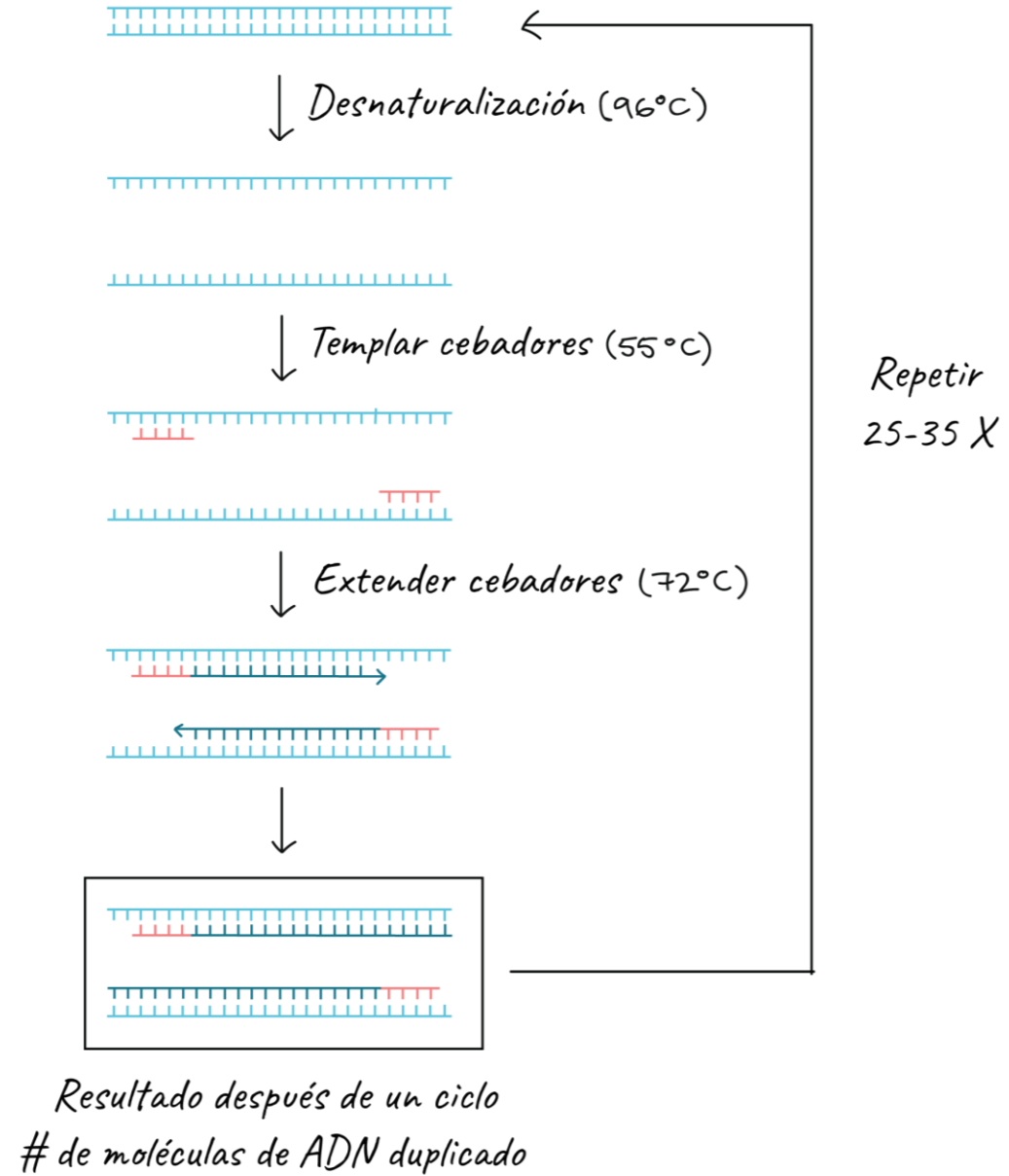
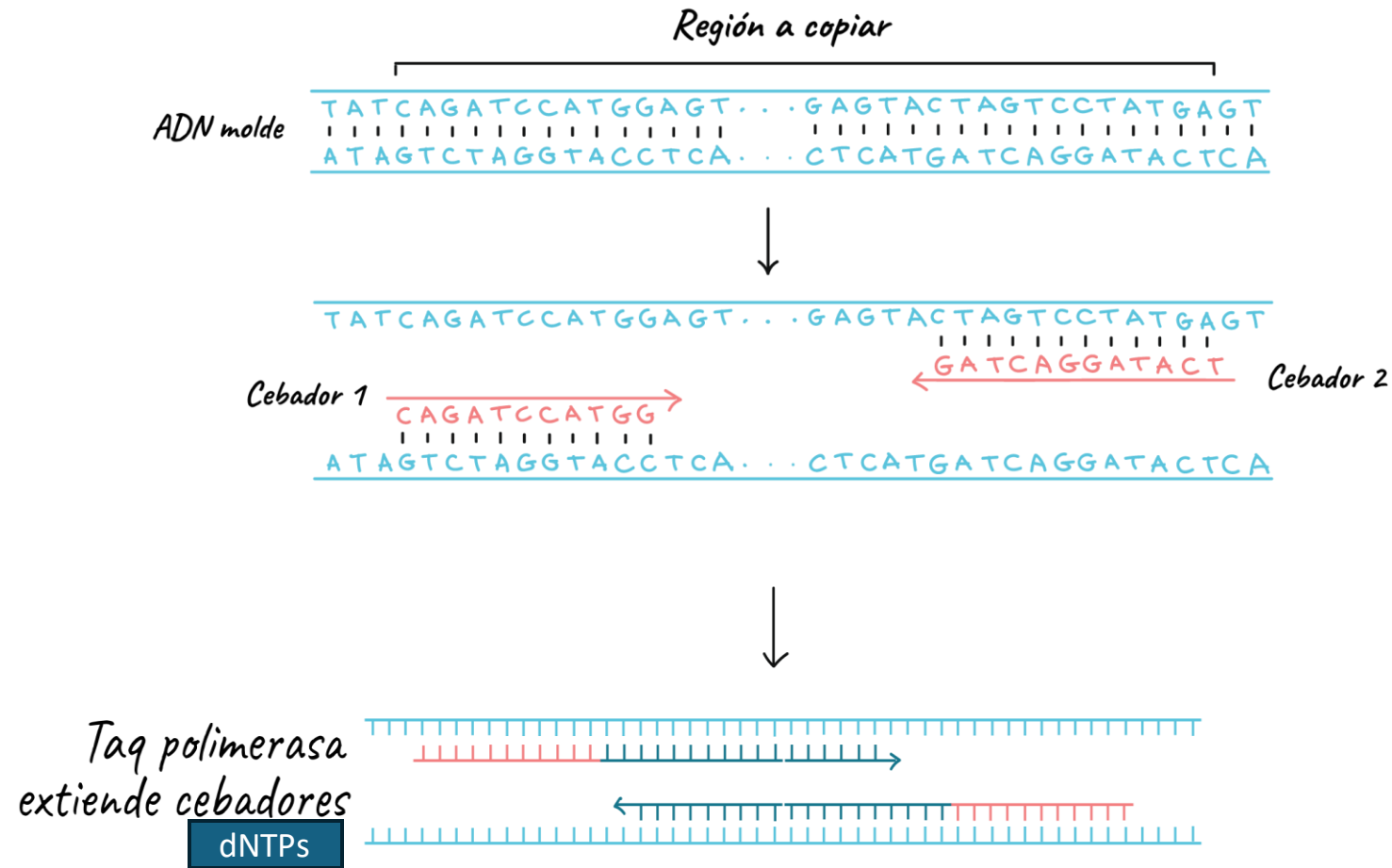


¿Qué es la PCR?

- Técnica reproducible, altamente sensible, que permite la amplificación de un fragmento específico de ADN a partir de cantidades mínimas.
- Copia la doble cadena de ADN en un proceso que se repite varias veces consiguiendo una amplificación exponencial.
- ¿Qué necesita?
 - Cebadores
 - ADN molde
 - ADN polimerasa termoestable
 - dNTPs
 - Condiciones especiales

Proceso PCR

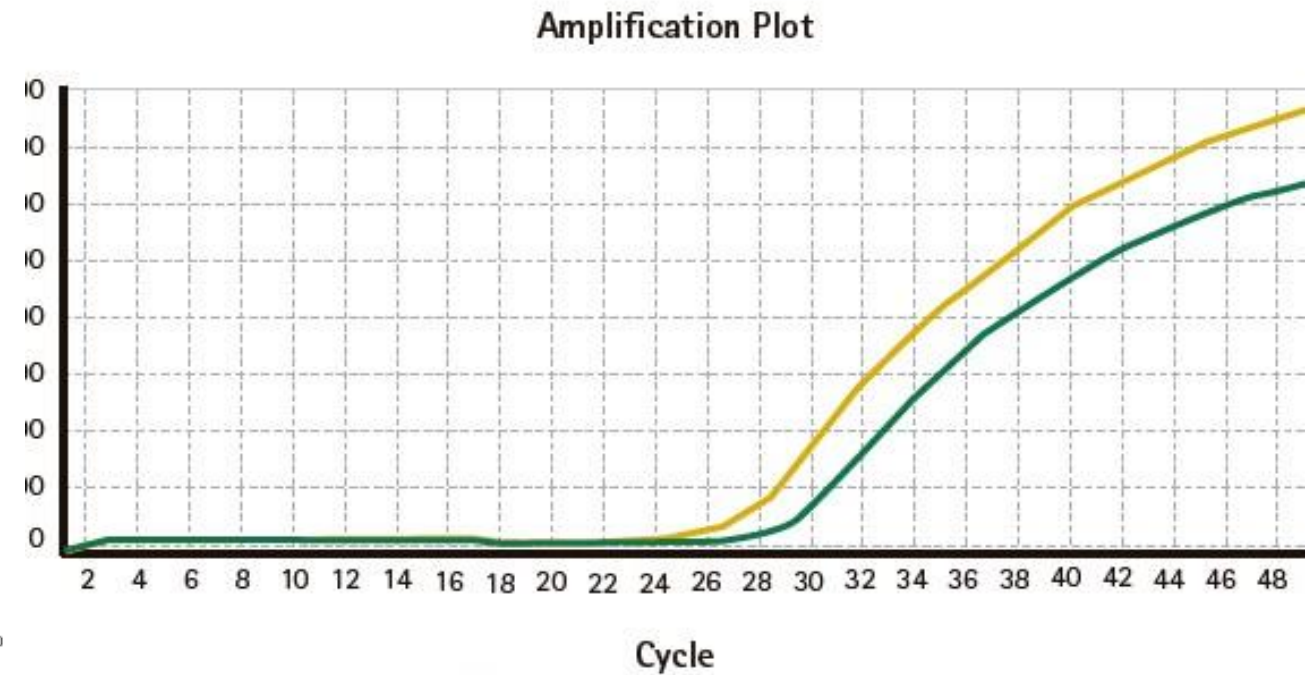
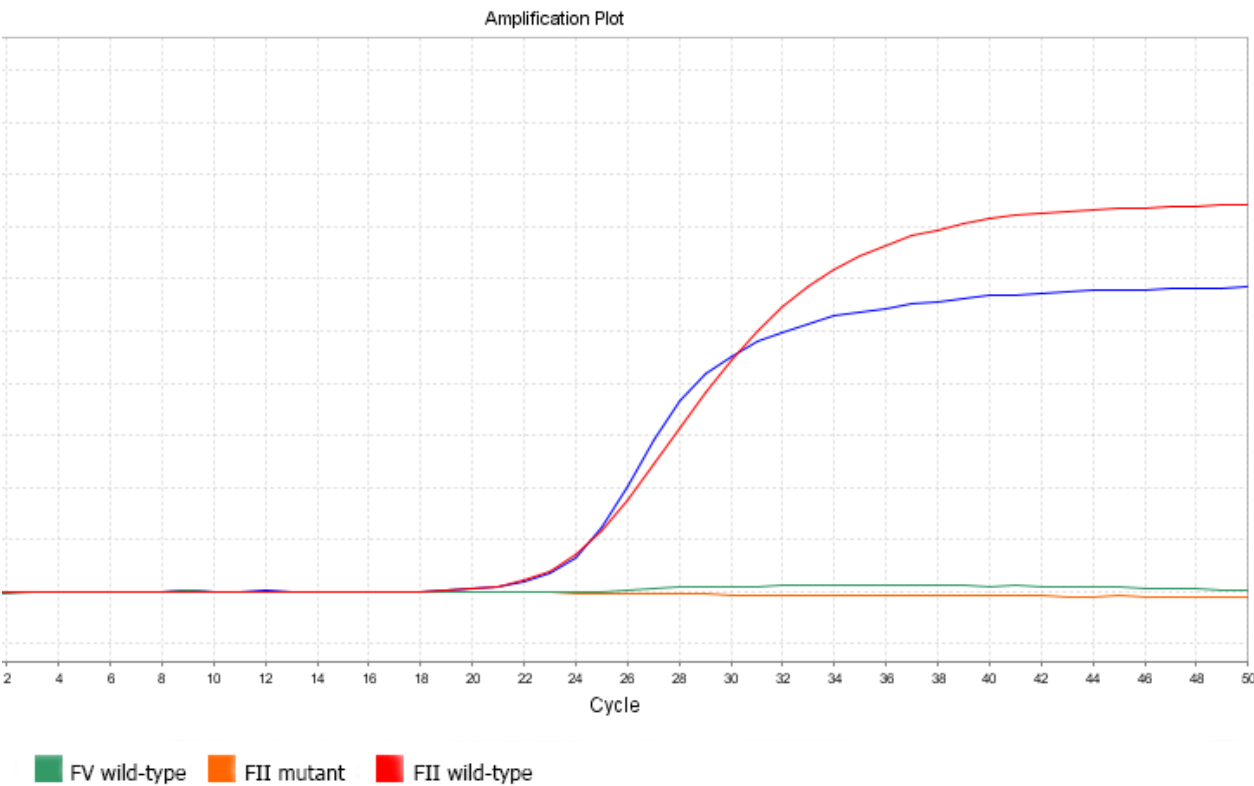






Prueba laboratorio para trombofilias y hemocromatosis

- Sangre en tubo de EDTA - extracción de ADN
- RT-PCR (PCR en tiempo real): modalidad del PCR de punto final, donde la acumulación de ADN amplificado es detectado y cuantificado a medida que la reacción avanza

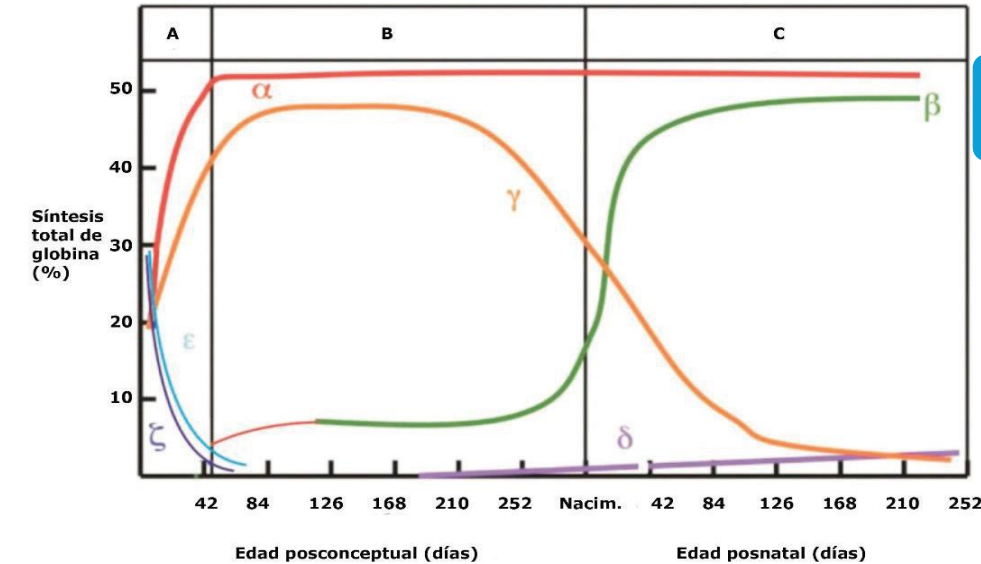


Cys282Tyr Heterocigoto

Se asocia una molécula fluorescente que se une al ADN amplificado, donde el incremento de esta fluorescencia es la proporcional al incremento de la cantidad de moléculas de ADN amplificadas en la reacción.

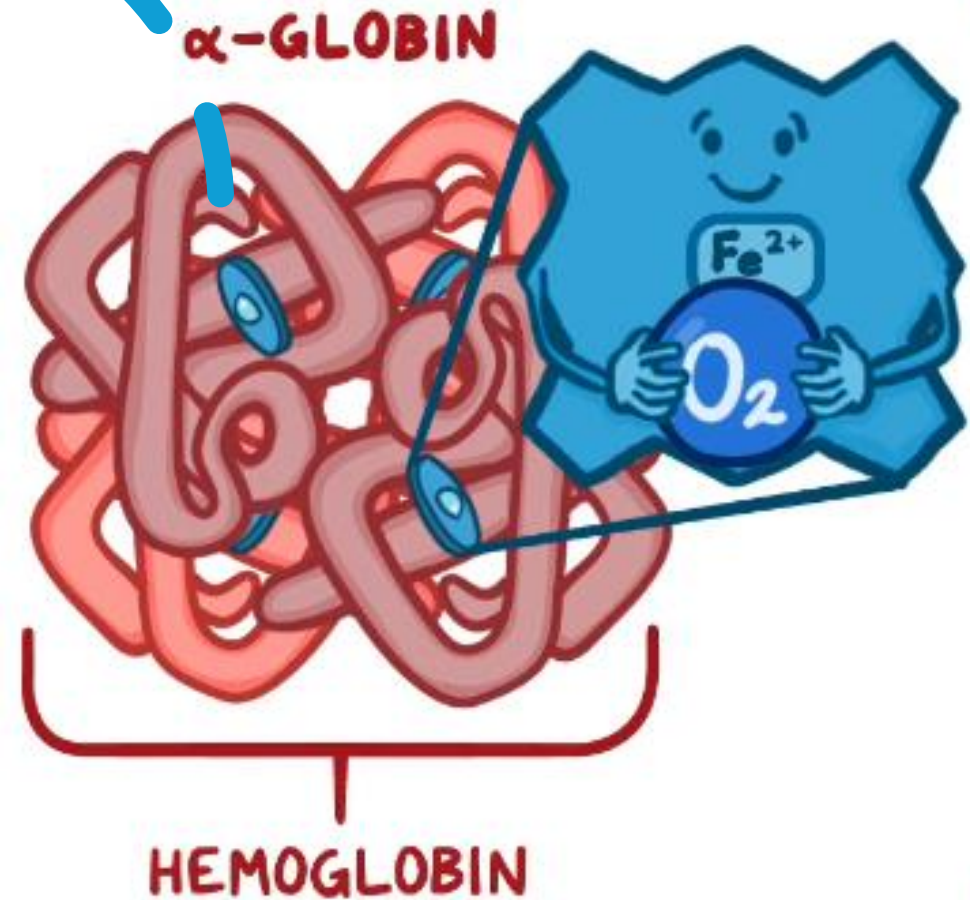
α -Talasemias

- La molécula de Hb es un tetrámero formado por dos pares de cadena de globina junto a un grupo hemo unido a cada cadena.
- HbA ($\alpha_2\beta_2$): 95% en adultos y >1año
- HbF ($\alpha_2\gamma_2$): mayoritaria recién nacido



α -Talasemias

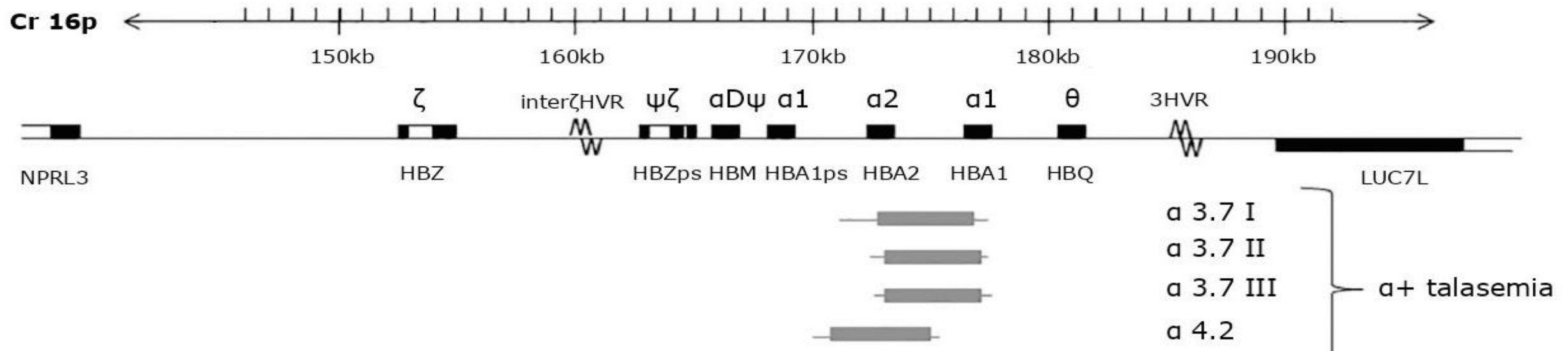
- Deficiencias congénitas de la síntesis de cadenas alfa de la globina, con diferentes formas clínicas dependiendo del genotipo.
- El mecanismo molecular más frecuente son deleciones en el gen de la alfa globina, que varían desde deleciones pequeñas que afectan a un solo gen a deleciones más amplias que implican a ambos genes alfa.
- Las formas más frecuentes son la deleción de **3,7 Kb**, muy frecuente en el área mediterránea y la de **4,2 Kb** (más propia del sudeste asiático).



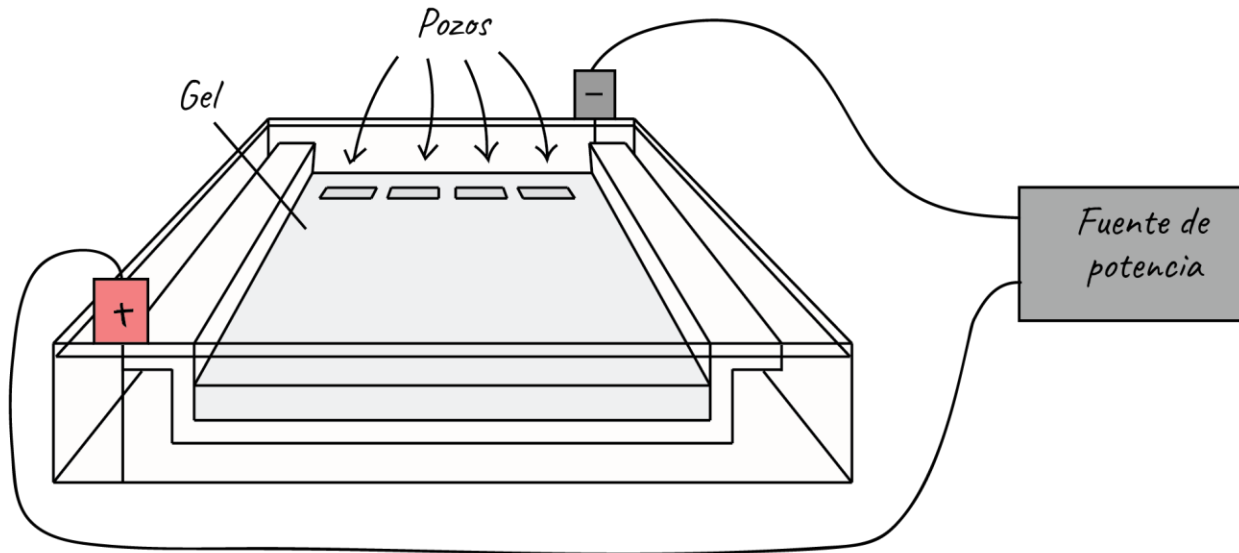
Estado clínico	Número de genes funcionales	Genotipos respecto al gen de la α -globina
Normal	4	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Portador asintomático	3	$\alpha\alpha/\alpha-$
Rasgo α -talasemia (anemia leve y microcitosis)	2	$\alpha\alpha/--$ o $\alpha-/ \alpha-$
Enfermedad Hb H (β_4) (anemia hemolítica moderadamente grave)	1	$\alpha\alpha/--$
Hb Bart, hidropesía fetal	0	$--/--$

Prueba laboratorio para α -talasemia

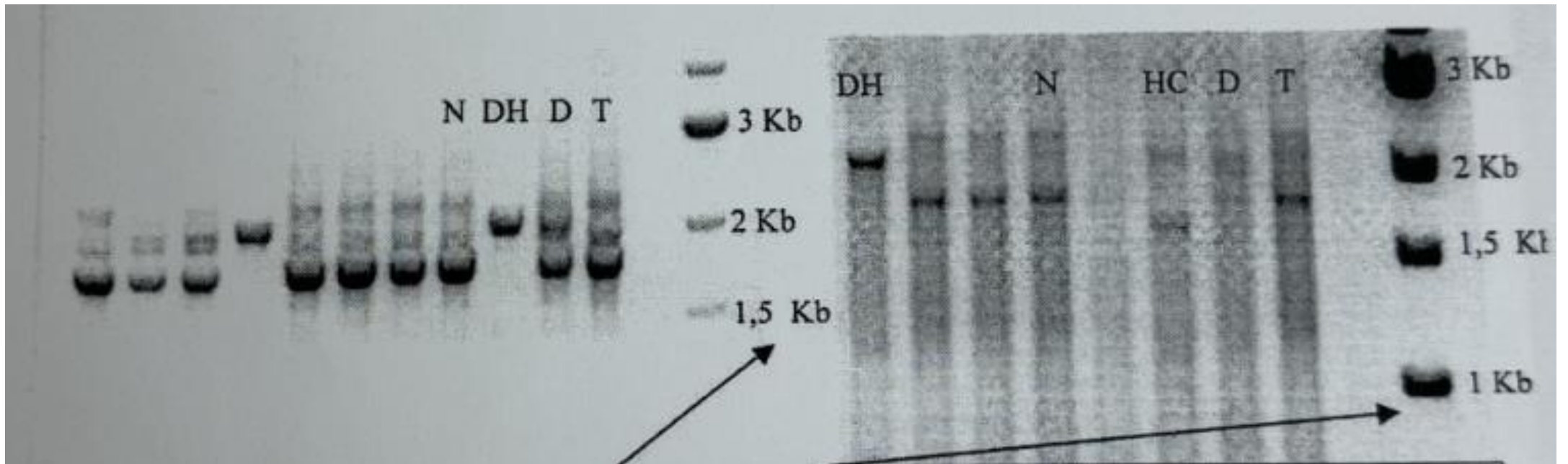
- Sangre en tubo de EDTA - extracción de ADN
- Amplificación por PCR y posterior análisis por electroforesis de las mutaciones: deleciones 3,7, 4,2, 20,5, y triplicaciones 3,7 y 4,2.



- 1) Preparación de la PCR de delecciones + triplicaciones
- 2) Preparar gel de agarosa
- 3) Cargar el producto de la PCR en el gel de agarosa con un marcador de 1 Kb de peso molecular
- 4) Realizar la electroforesis con bromuro de etidio en un transiluminador



Técnica que se basa en la movilidad de las partículas cuando se ven sometidas a un campo eléctrico en función de su tamaño.



Marcador 1 Kb peso
molecular

N: Normal

DH: Delección 3,7 Kb homocigota

T: Triplicación

D: Delección 3,7 Kb heterocigota

HC: Heterocigoto compuesto de delección 3,7 Kb y 4,2 Kb

Virus del papiloma

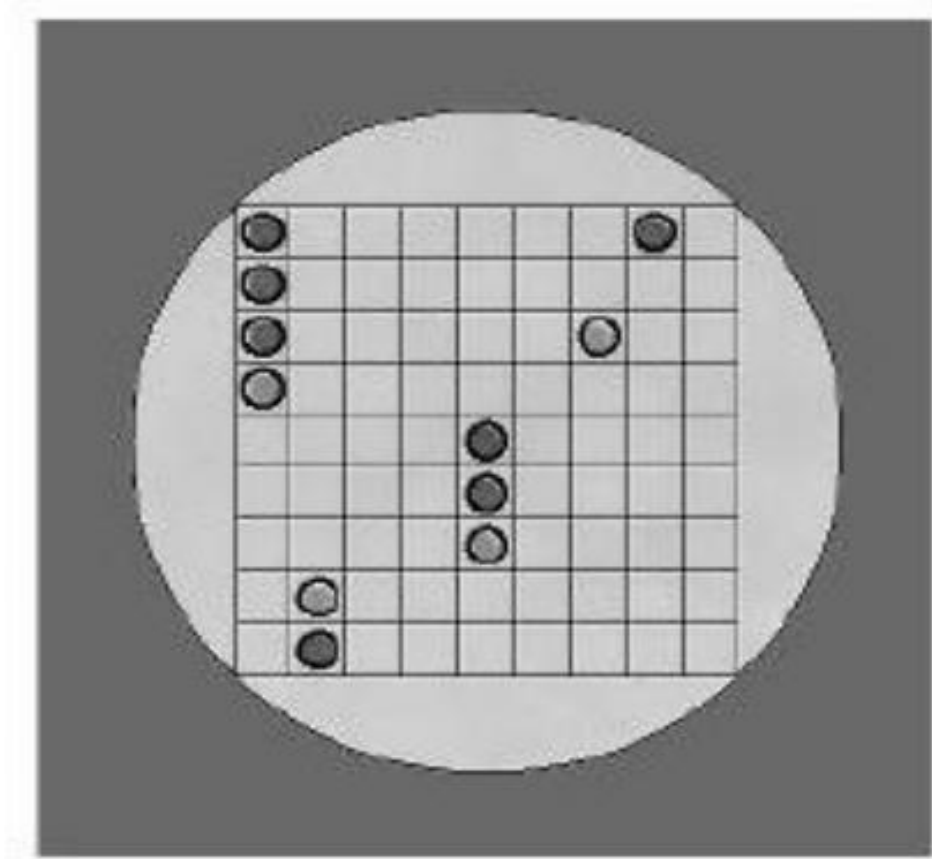
- ETS. No suele presentar síntomas y el 80% es transitorio.
- En ocasiones el VPH produce una infección persistente que puede originar la aparición de verrugas genitales, cáncer de cuello uterino o cáncer anogenital.
- Es un virus pequeño con doble cadena de ADN que pertenece a la familia *Papovaviridae*.
- Los VPH, con capacidad para infectar las mucosas del aparato genital, se han clasificado en dos grupos, según el riesgo de producir cáncer de cérvix.



Prueba laboratorio para VPH

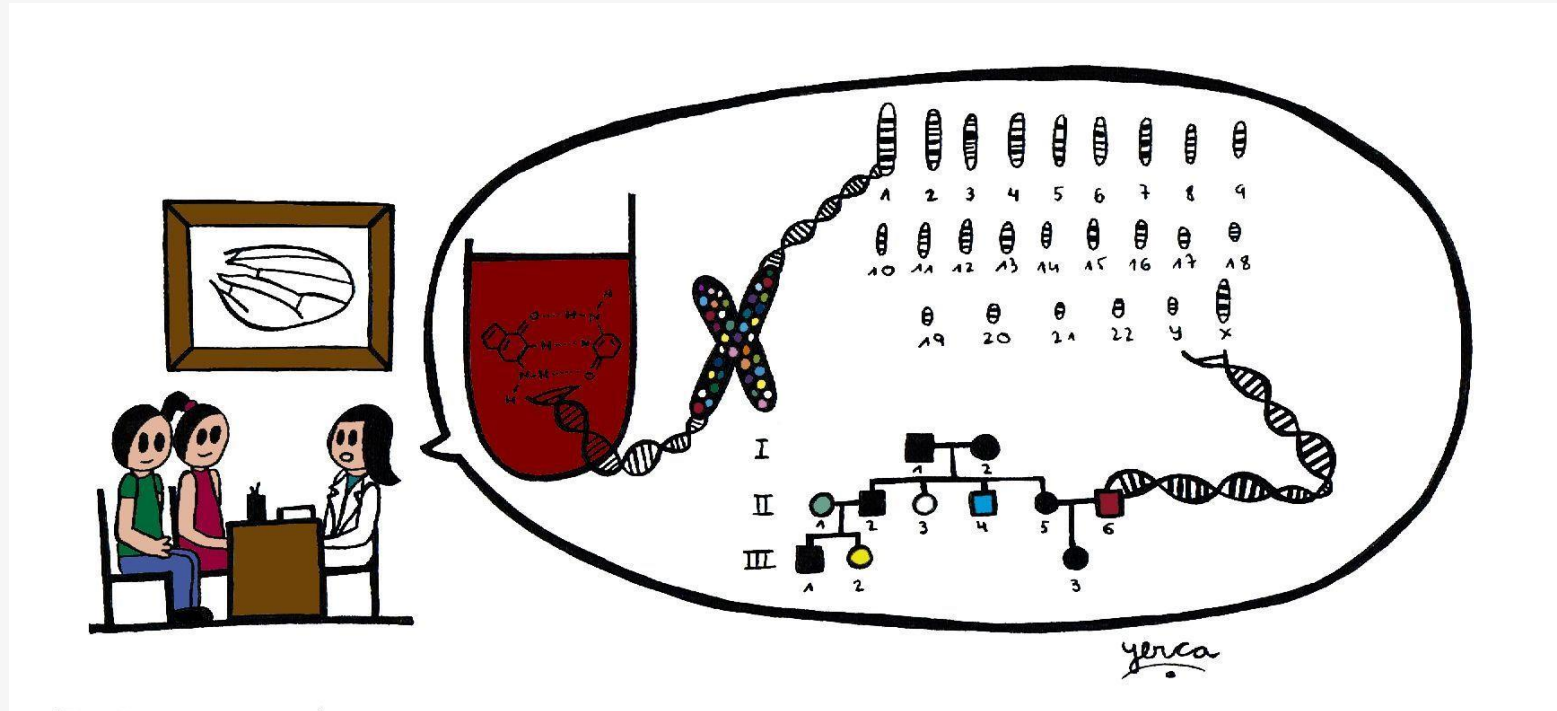
- Sistema de diagnóstico para el análisis rápido y simultáneo de múltiples biomarcadores (ADN, proteínas) mediante dot blot reverso sobre macroarrays.
- Pasos:
 - Amplificación mediante PCR
 - Desnaturalización
 - Hibridación en membrana con sondas ADN específicas por dot blot reverso
 - La señal se visualiza mediante una reacción inmunoenzimática colorimétrica y un cromógeno que genera precipitados insolubles en la membrana en aquellas posiciones en las que ha habido hibridación

Resultados VPH



B	33	58	42	71	16	52	B	
B	35	59	43	72	18	53	6	69
C	39	66	44/55		26	56	11	70
U	45	68	54	84	31	58	40	71
16	51	73	61	B	33	59	44/55	72
18	52	82	62/81	C	35	66	54	
26	53	6	67	U	39	68	61	84
31	56	11	69	42	45	73	62/81	
	B	40	70	43	51	82	67	

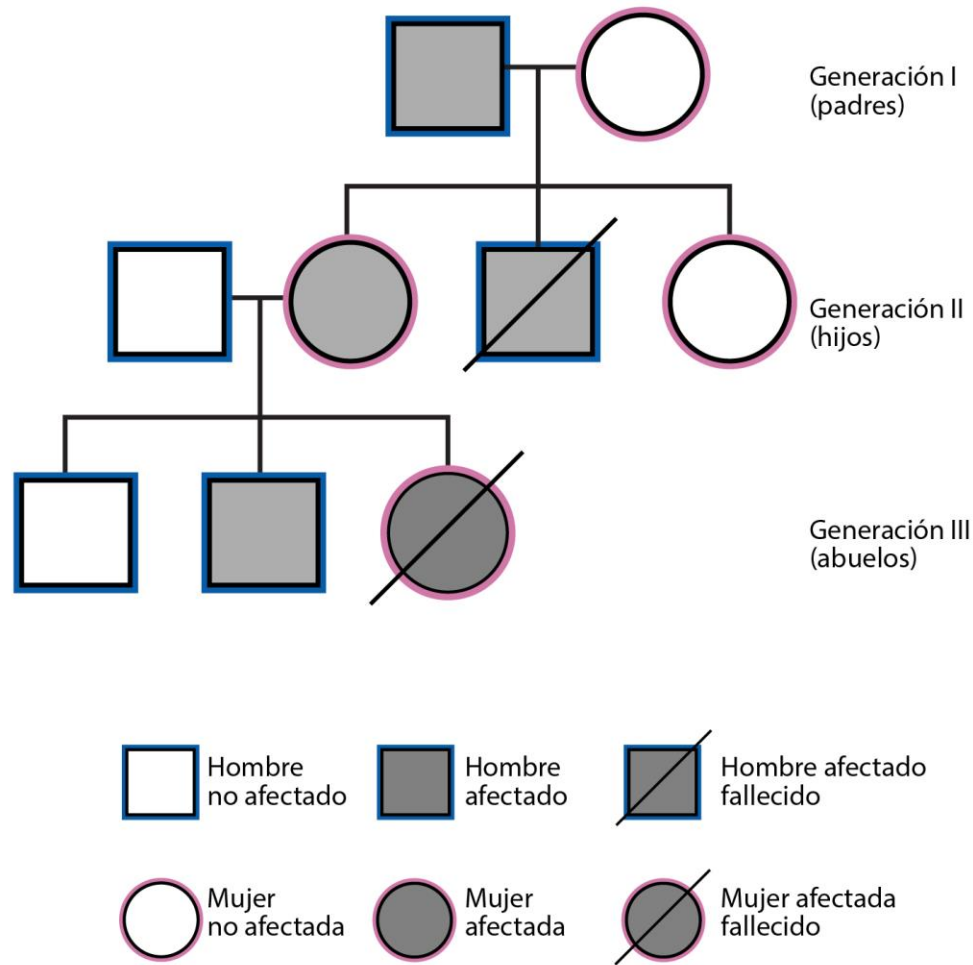
- Sondas específicas para el genotipado de VPH
- Sonda genérica universal para screening de VPH
- Sondas de control de amplificación e hibridación



¿Algo más?

- Martes, miércoles y jueves a primera hora: consulta de consejo genético

Asesoramiento pre-test



- Informar al paciente de lo que se sospecha, la historia natural de la enfermedad e informar cómo se va a determinar la alteración molecular
- Árbol familiar para buscar otros posibles casos y tipo de herencia
- Se solicita una analítica con el panel de genes
- Se pide el CI
- Extracción de sangre



- Con la sangre ya en laboratorio, se extrae ADN a todas las muestras para archivarlo
- Se envía la muestra de sangre donde corresponda
- A los 2-3-4 meses se obtienen los resultados y se vuelve a citar a los pacientes
- En caso de que sea portador de enfermedad genética se estudia a familiares
- Realización de un informe

Asesoramiento post-test

Algunas de las patologías que he visto

- Retinosis pigmentaria
- Trastorno del neurodesarrollo
- Estudio de posible Parkinson
- Poliquistosis renal
- Sordera mitocondrial
- Miocardiopatías
- Corea de Huntington
- QT-largo
- Neurofibromatosis...

¡Gracias por la atención!

