

Biología Molecular aplicada al Diagnóstico Médico

Módulo I: Clase 2

Herramientas y tecnologías de la biología molecular, aplicadas al diagnóstico y al tratamiento en medicina.

Lic. Ezequiel Zubillaga
ezubillaga@cibic.com.ar
16.04.2018



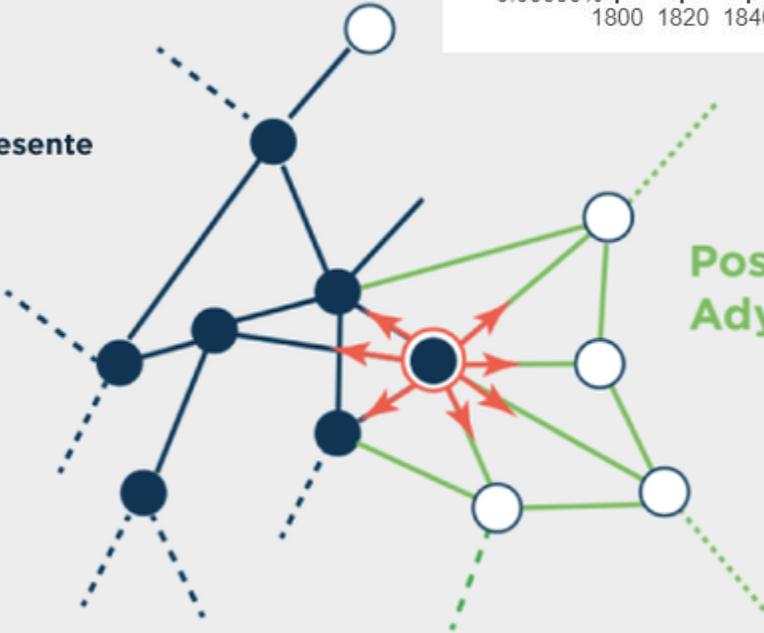
Innovación



Pasado inmediato

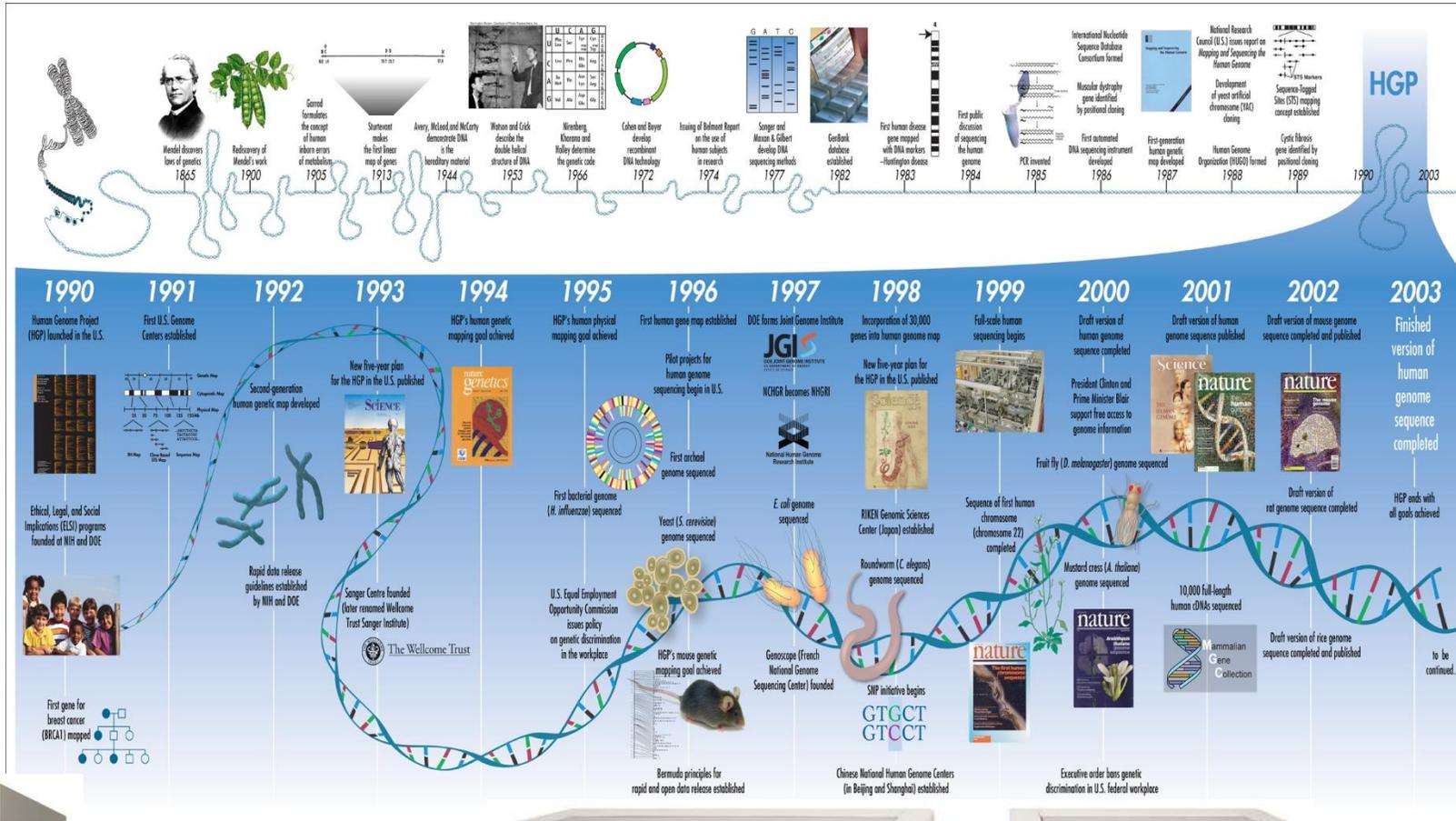


Presente



Posible Adyacente

Herramientas y tecnologías



Eficacia + Eficiencia = Efectividad

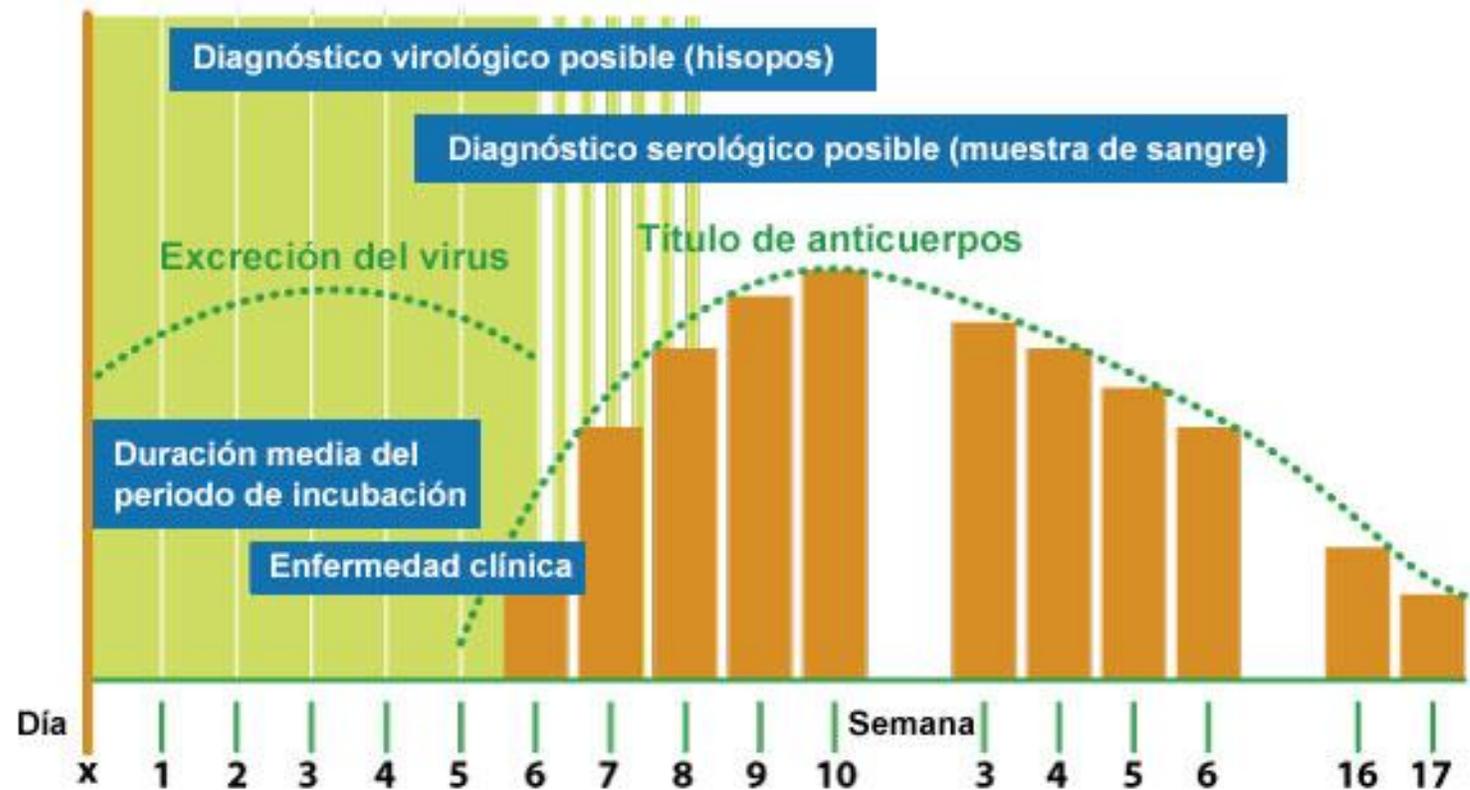
- **Eficacia:** Todo aquello que nos sirve para cumplir el objetivo que se ha planificado.
- **Eficiencia:** Consiste en utilizar los recursos adecuadamente.
- **Efectividad:** **Cumplir con los objetivos planteados utilizando la menor cantidad de recursos posibles.**

¿ Por qué se han desarrollado tantas **herramientas** para realizar diagnósticos utilizando la **biología molecular**?

Porque introducen un
cambio **positivo** en la vida de
los **pacientes**.....

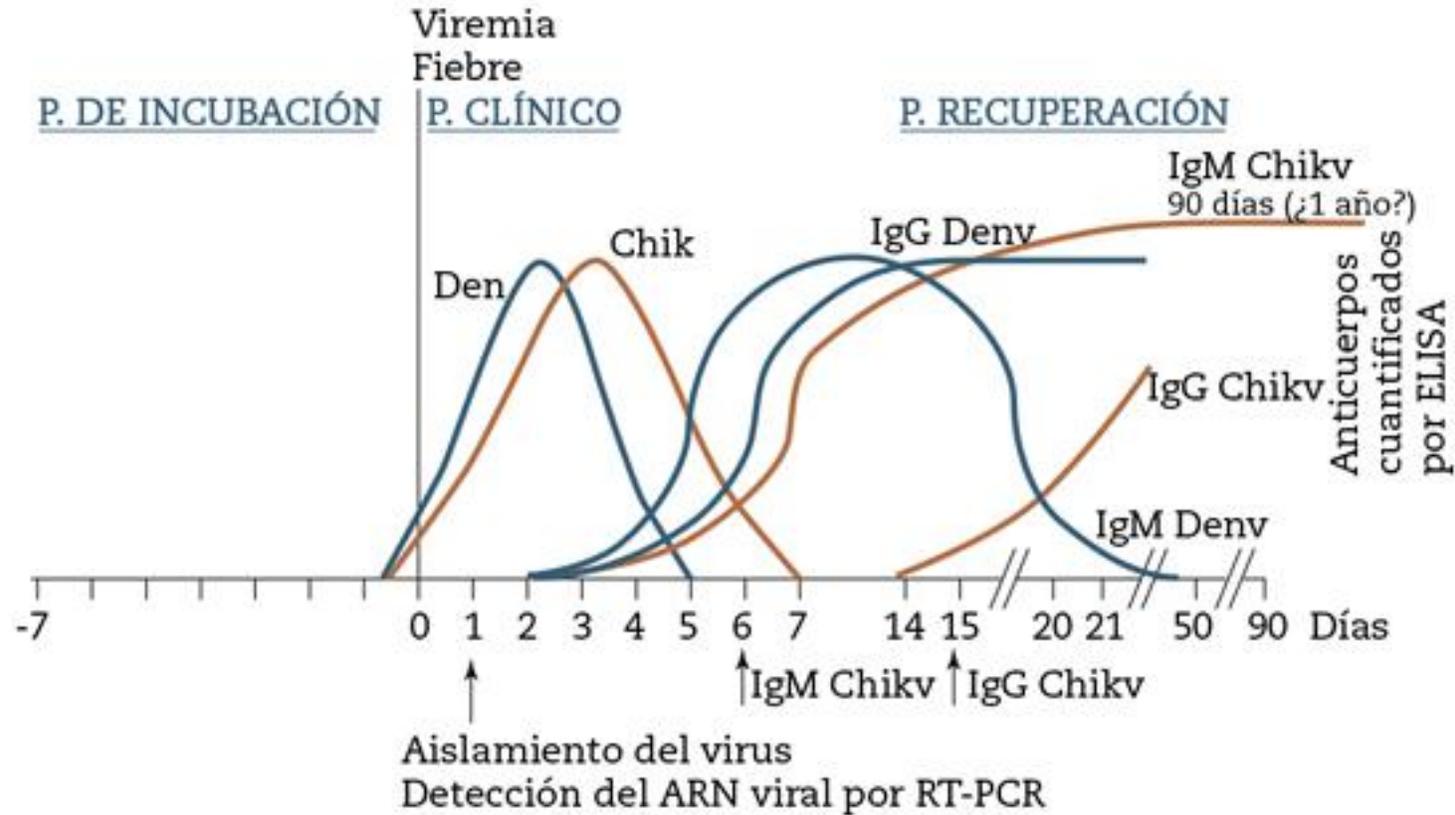
¿Cómo?

H1N1



¿Cómo?

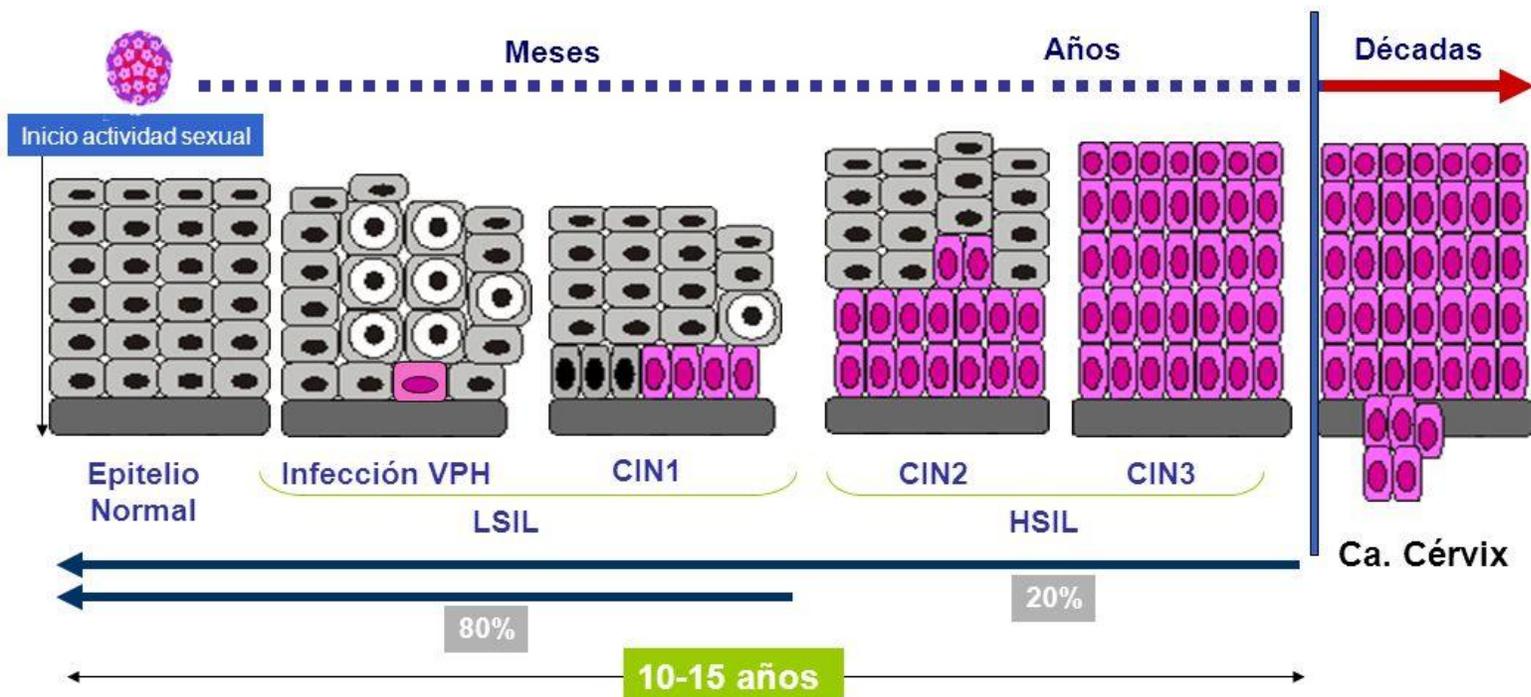
Dengue - Chik



¿Cómo?

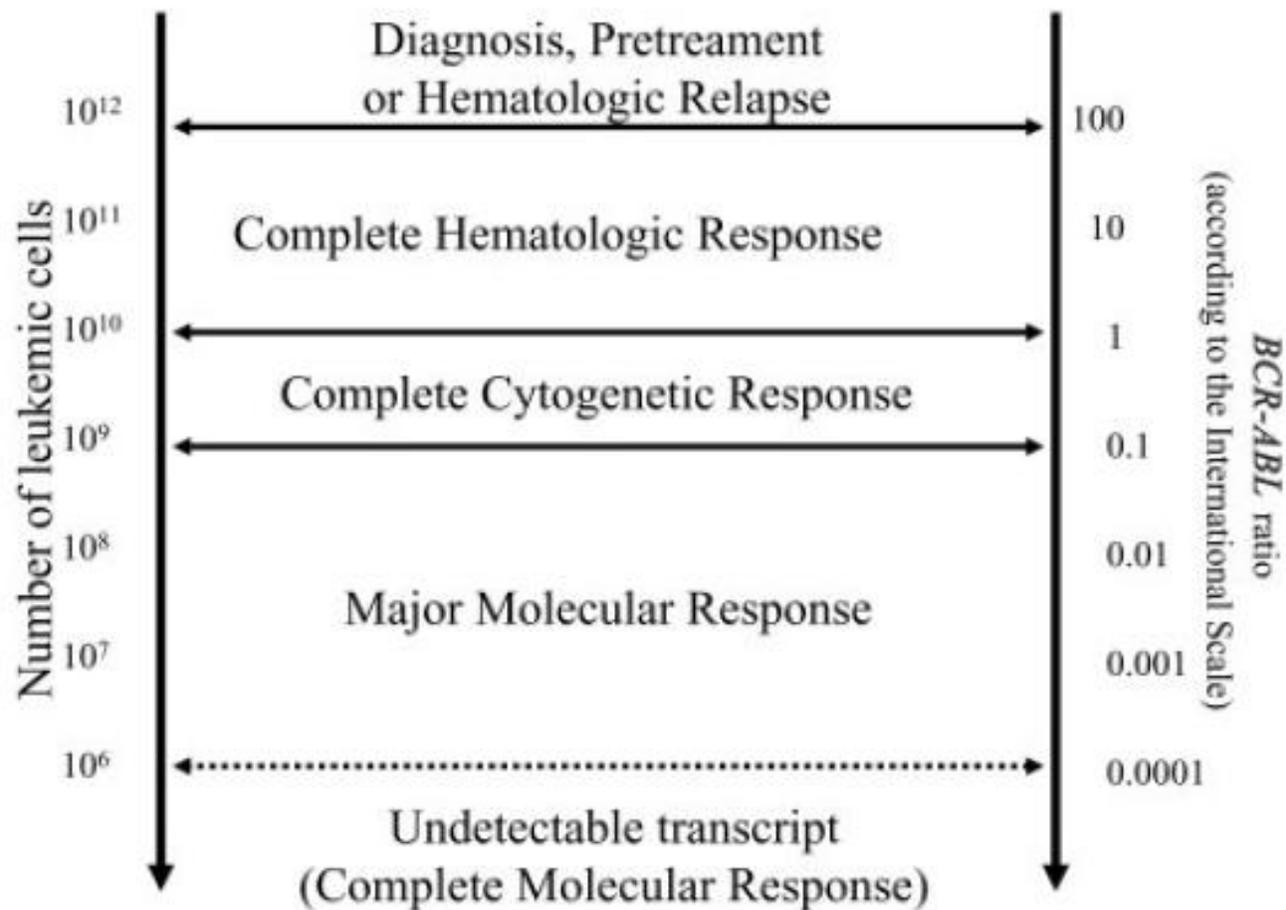
HPV

Historia natural de la infección por VPH

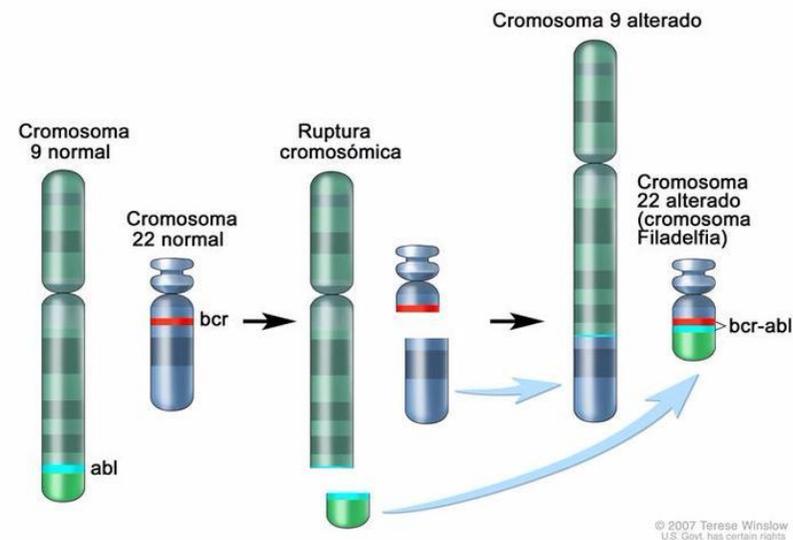


CIN= Cervical Intraepithelial Neoplasia
SIL= Squamous Intraepithelial Lesion

¿Cómo?



Tratamiento – P210



Tecnologías aplicadas al estudio de biomarcadores moleculares

1. Aspectos Pre-analíticos:

1. Toma de muestra
2. Conservación de la muestra
3. Preparación de la muestra para el análisis

2. Aspectos Técnicos:

1. Extracción de Ácidos nucleicos
2. PCR / RT-PCR
3. Real time PCR
4. Secuenciación
5. MLPA
6. Microarray

3. Aspectos analíticos:

1. Controles de calidad
2. Validación técnica
3. Validación clínica

4. Aspectos Post- analíticos:

1. Modelo de informe
2. Interpretación del resultado

1. Aspectos Pre-análiticos:

Entre un **40 %** y un **70 %** de los errores cometidos en un laboratorio clínico se originan en dicha etapa.

En la fase pre-analítica pueden diferenciarse dos etapas; una primera extra-laboratorio y la segunda dentro del laboratorio.

Los errores que pueden generarse son de significancia distinta y su medida es difícil ya que algunos de ellos se ponen de manifiesto en la fase analítica y otros no se evidenciarán.

1. Aspectos Pre-análiticos:

Consideraciones:

Un almacenamiento de las muestras sin las condiciones adecuadas, puede alterar las condiciones físico-químicas de las mismas hasta llegar al punto de deteriorarlas.

Algunos errores no afectan clínicamente al paciente, pero otros implican la repetición de la solicitud analítica, dando como resultado un incremento de los costos y en ocasiones, incluso un diagnóstico incorrecto o un tratamiento inadecuado que incide en la salud del paciente.

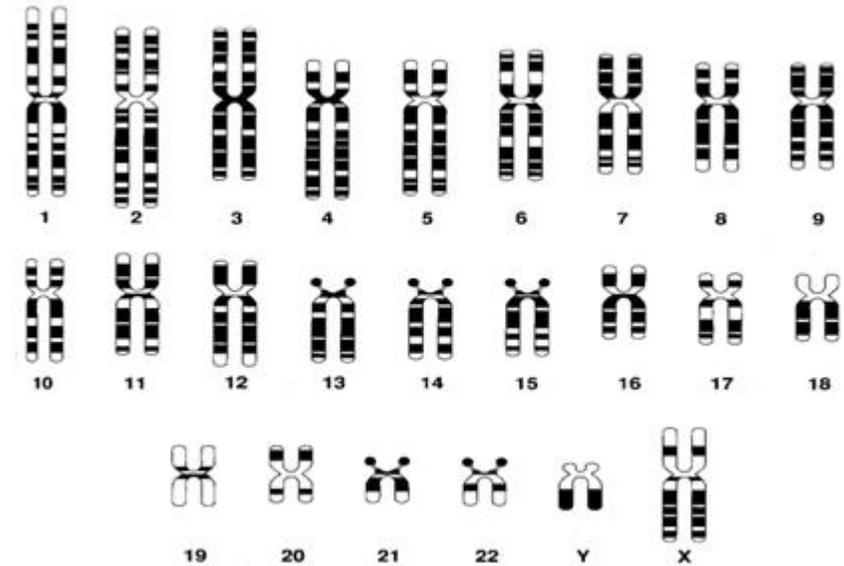
Debe tenerse en cuenta que muchas veces, en la evolución de un paciente o en el monitoreo de la eficacia terapéutica, son muestras irrepetibles, es decir, que no pueden volver a tomarse (ejemplo: monitoreo de la carga viral en un paciente en tratamiento antiviral en Hepatitis C).

***En Biología Molecular, los
ácidos nucleicos son el analito.
(ADN – ARN)***

Extracción manual de Ácidos Nucleicos:

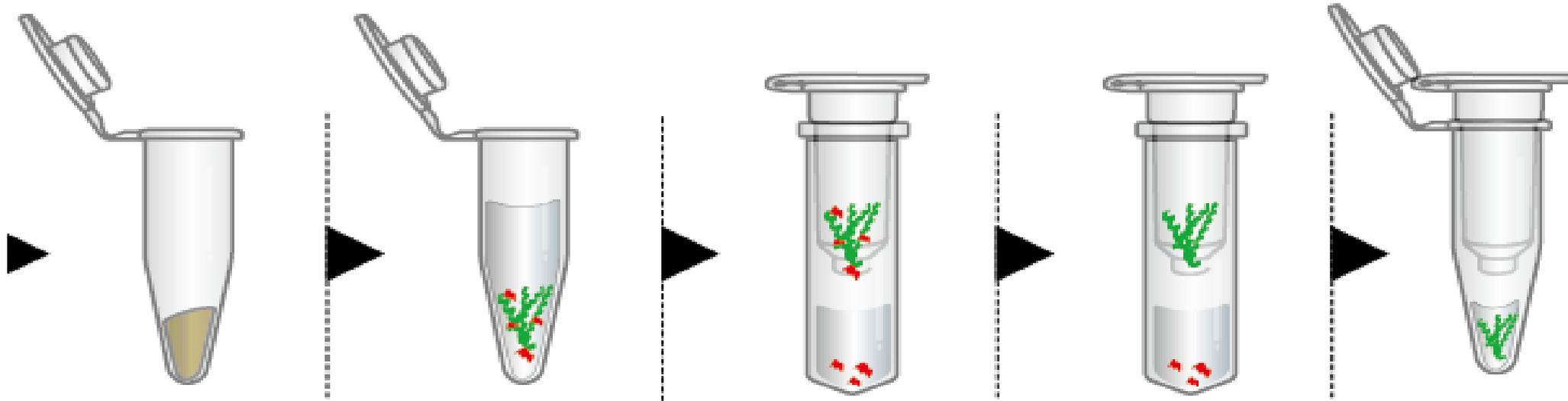
Los pasos necesarios para una correcta extracción y purificación mediante un procedimiento químico son:

1. Lisis de las células.
2. Degradación de la fracción proteica asociada al ADN.
3. Purificación. Consta de 3 fases:
 - a. Precipitación.
 - b. Lavado del pellet
 - c. Recuperación.



Extracción semi-automatizada de Ácidos Nucleicos:

El procedimiento puede realizarse por separación física con la ayuda de minicolumnas equipadas con una membrana de sílica que retiene específicamente los ácidos nucleicos.



Kits comerciales: High Pure Template (Roche), Stool Mini Kit (Quiagen)

Ej: CMV Cualitativo, CMV CV, EBV Cualitativo, EBV CV.

Extracción automatizada de Ácidos nucleicos:



sistema de extracción basado en el uso de partículas magnéticas que permite el aislamiento rápido y automatizado de ácidos nucleicos.

El ácido nucleico obtenido es altamente puro y puede ser usado en múltiples aplicaciones, tales como PCR convencional o cuantitativa, secuenciación, análisis mediante arrays, etc.

Ej: MagNA Pure (Roche)



Cuantificación y estimación de la pureza del ADN obtenido:



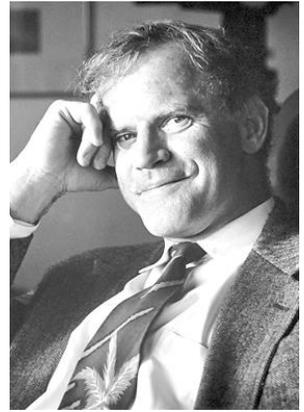
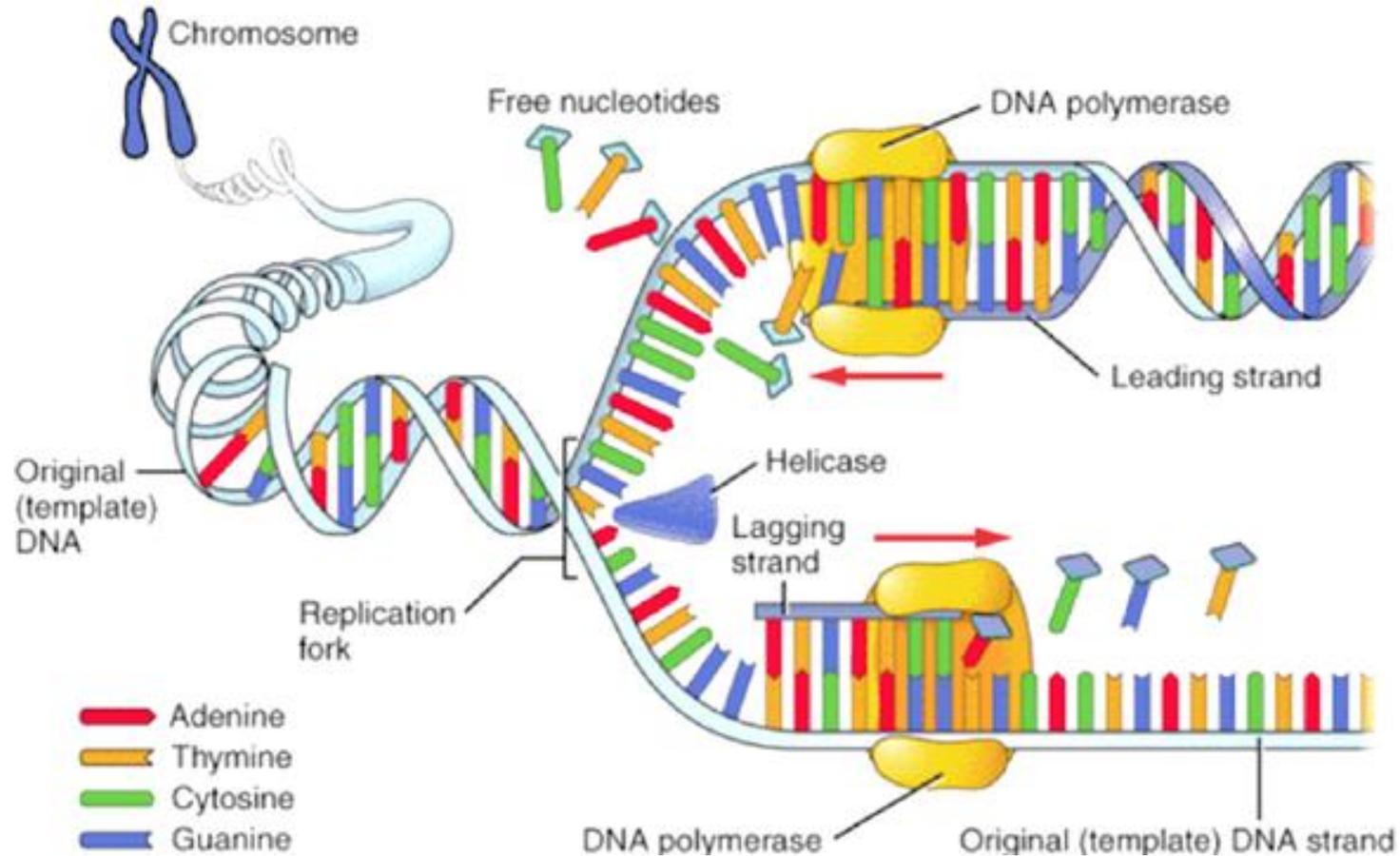
El ADN presenta un máximo de absorbancia a 260 nm, mientras que las proteínas lo tienen a 280 nm, aunque a 260 nm también presentan absorbancia.

Si calculamos la relación A_{260}/A_{280} podemos determinar si el ADN es más o menos puro:

$A_{260}/A_{280} = 1,9-1,7$ (ADN puro)

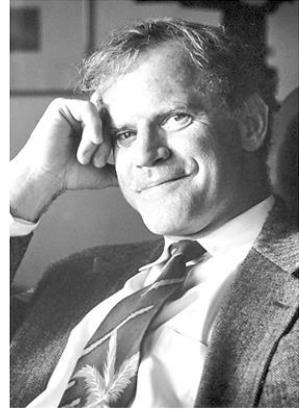
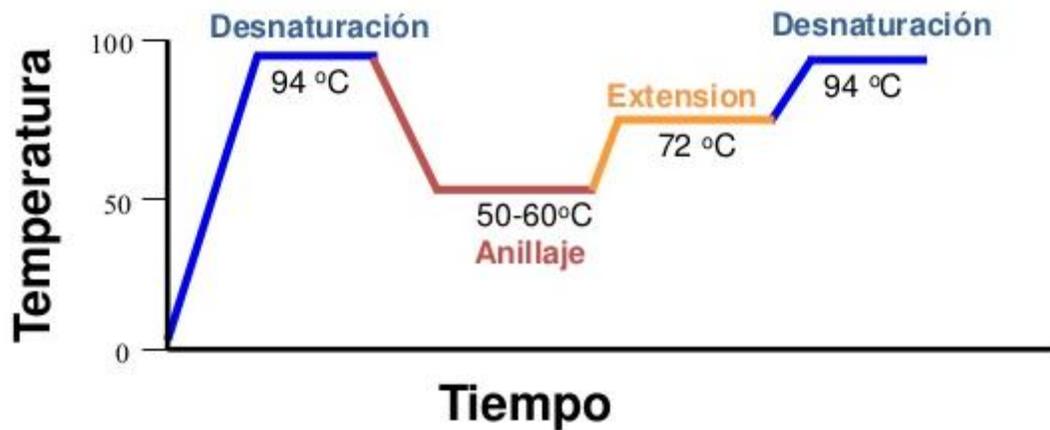
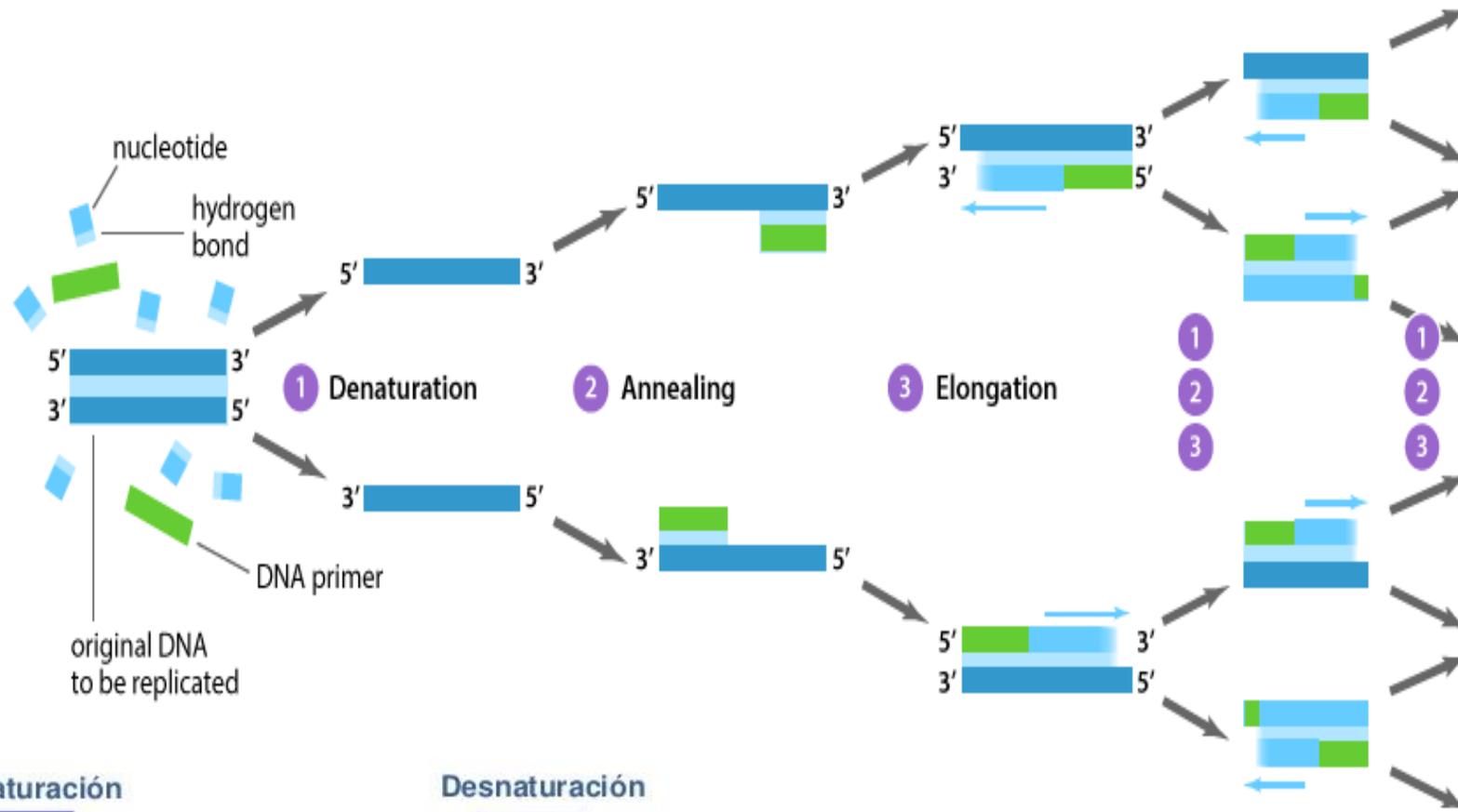
Ej: NanoDrop (Thermo Scientific)

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa:



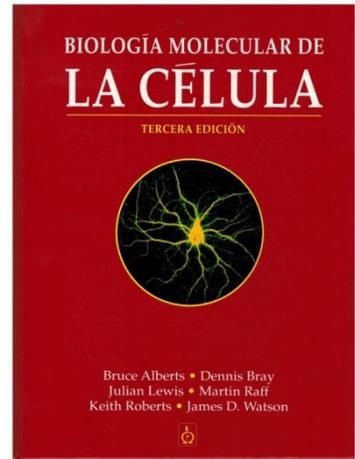
Kary Mullis

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa:

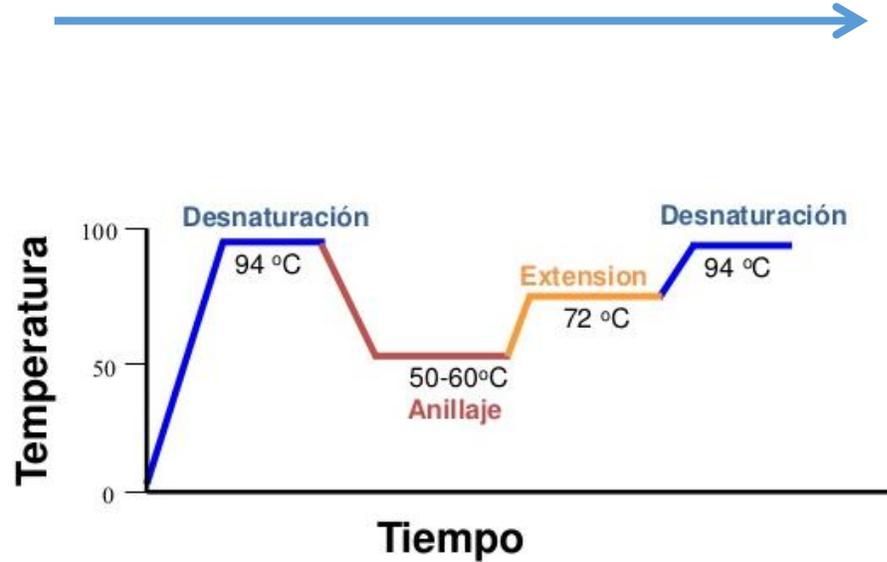


Kary Mullis

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa:



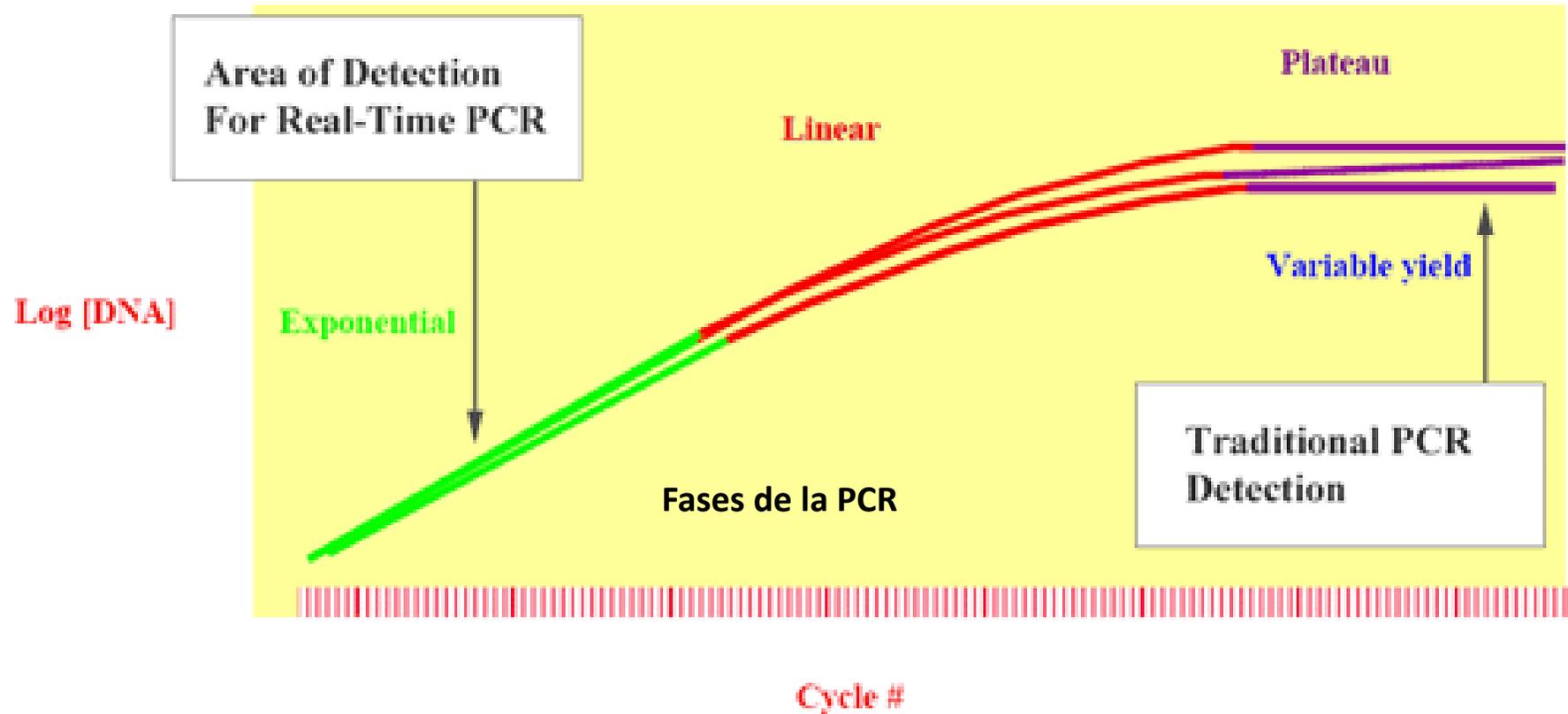
35 – 60 Ciclos



PCR – Reacción en cadena de la polimerasa:

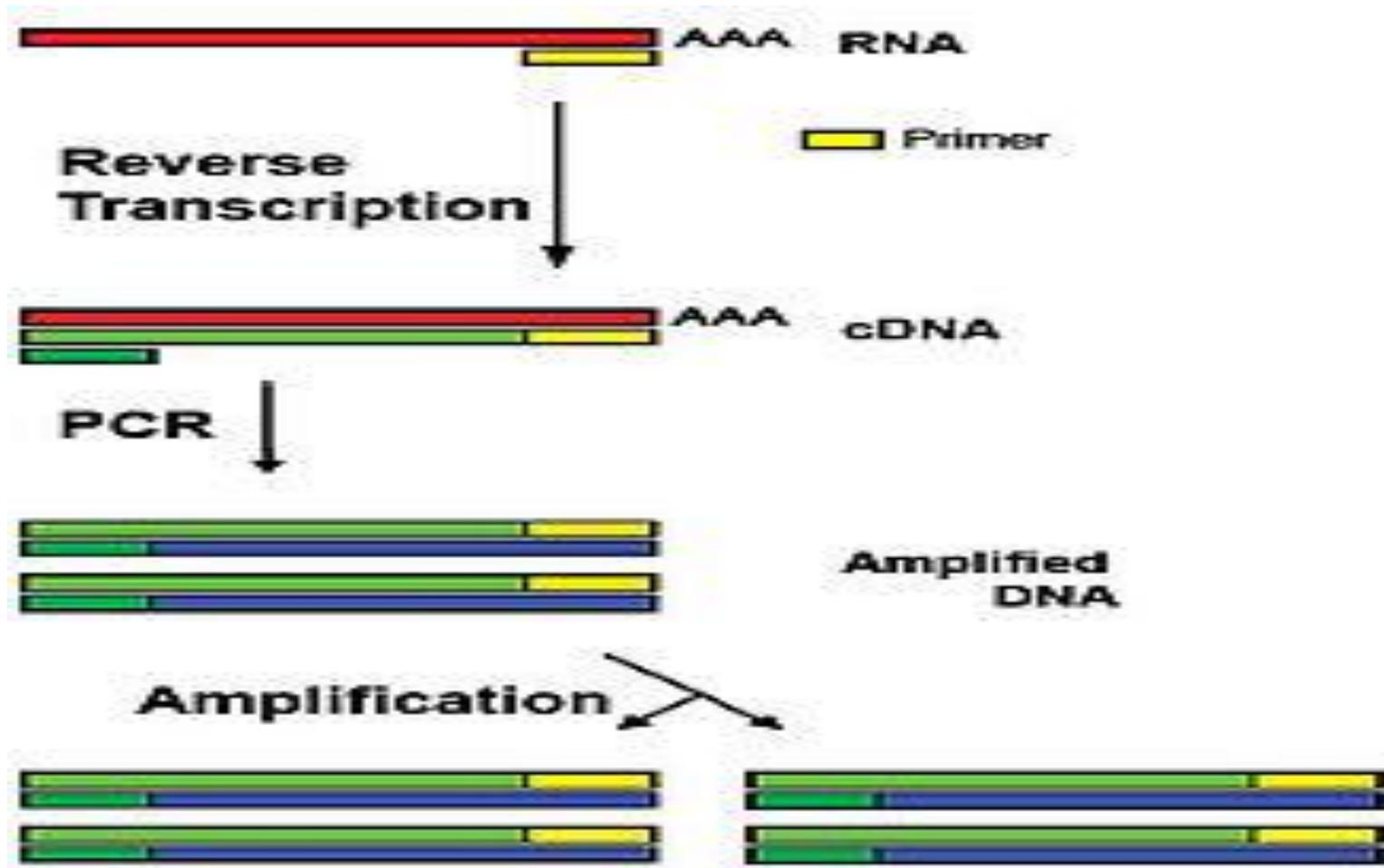


PCR – Reacción en cadena de la polimerasa:

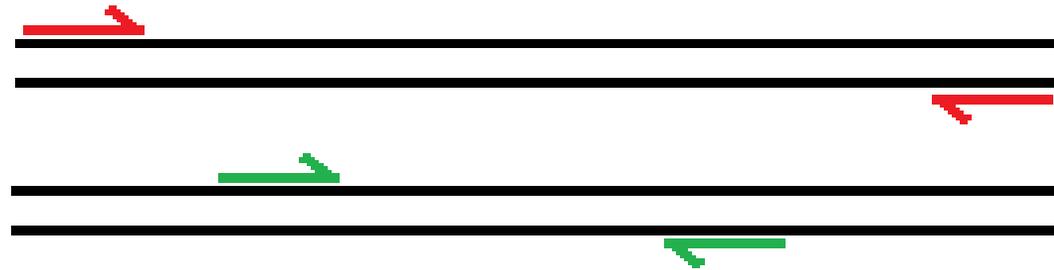


Una PCR ideal debería ser altamente **específica**, **sensible** y de **gran rendimiento**.

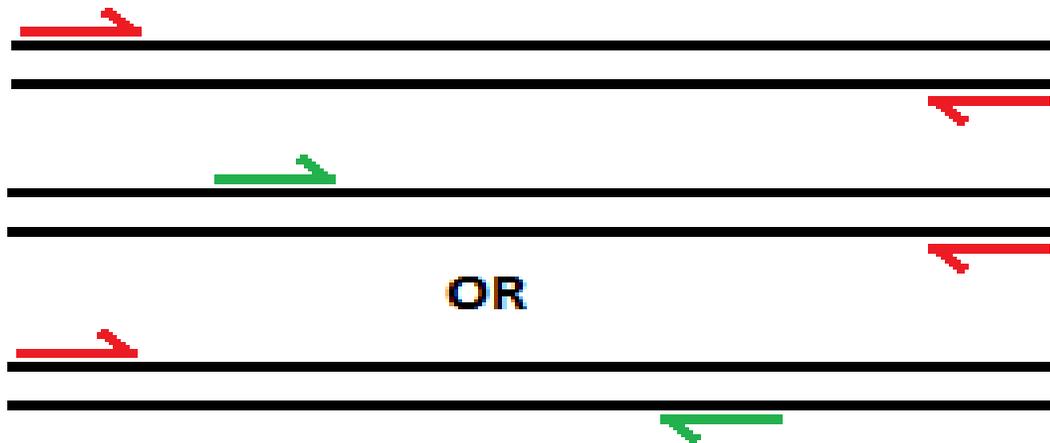
RT-PCR – Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa:



Seminested – Nested PCR:



Nested PCR

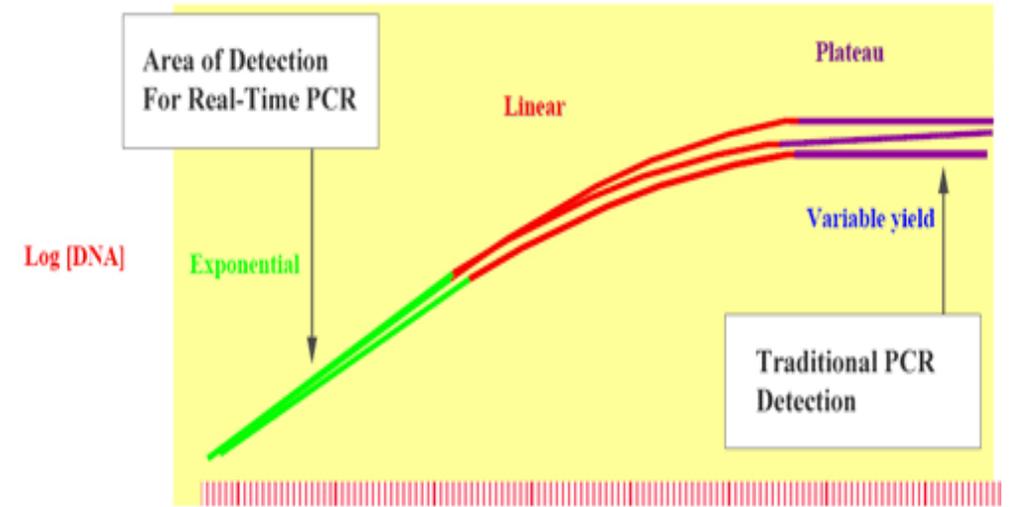


Semi-Nested PCR

Se aumenta la **sensibilidad** y la **especificidad** de la PCR.

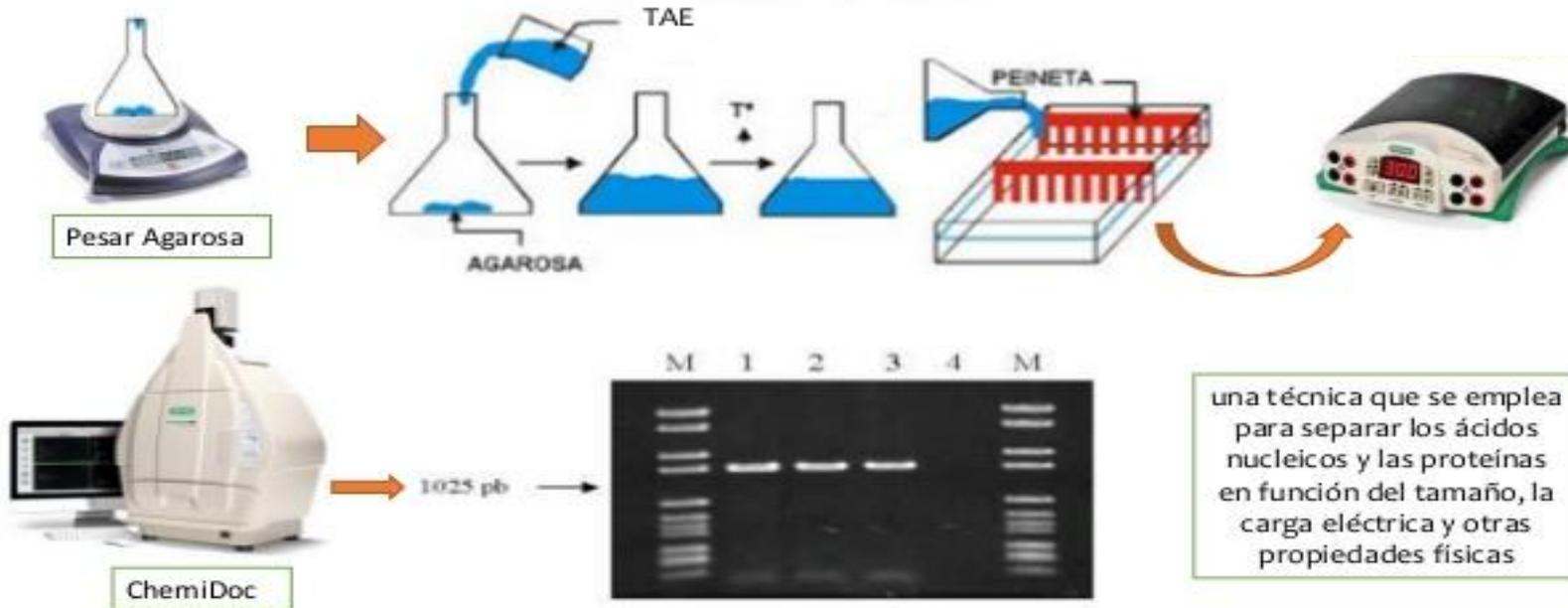
Electroforesis en gel de agarosa (PCR punto final) :

Los procesos de **amplificación** y **detección** ocurren desfasados.

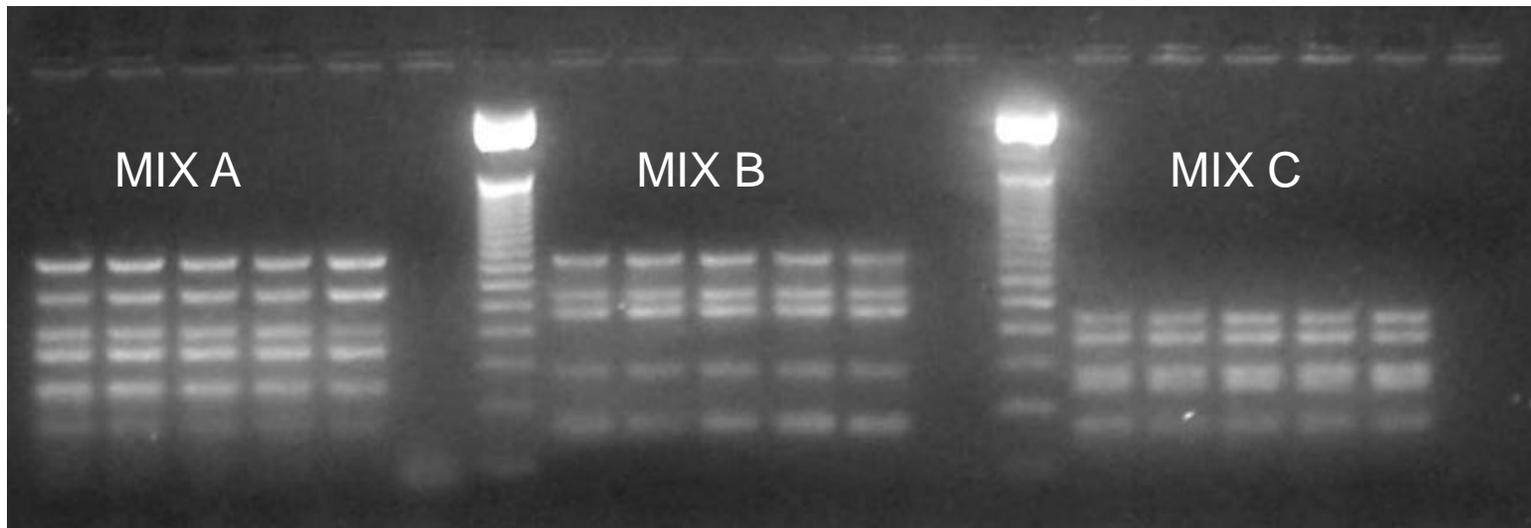
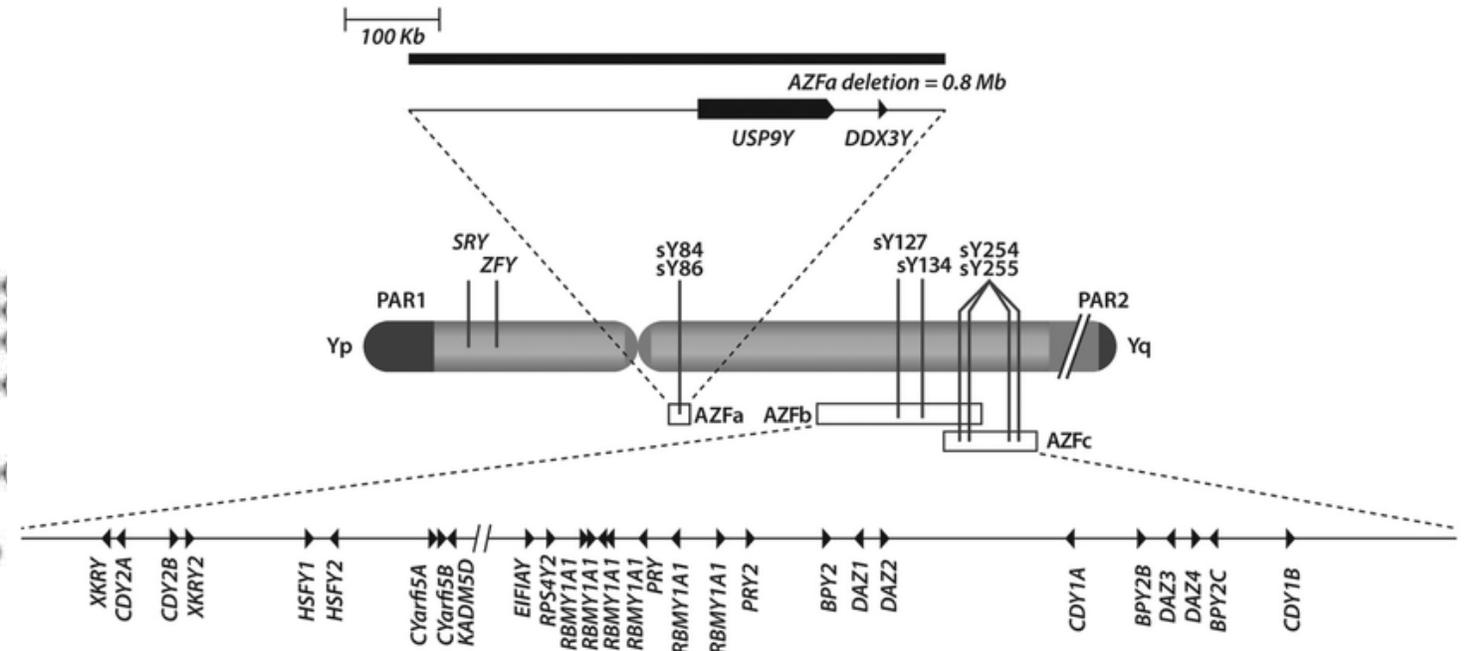
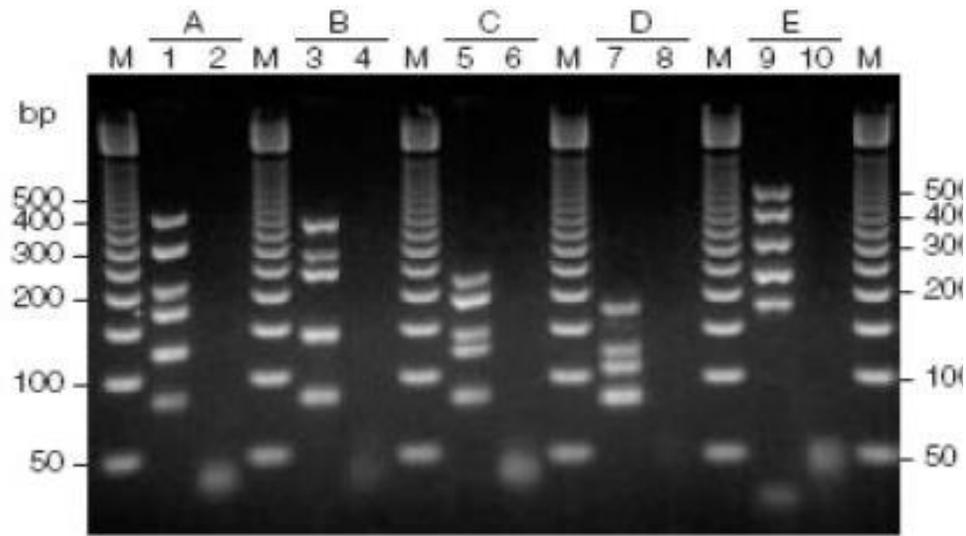


Fases de la PCR

GEL DE AGAROSA



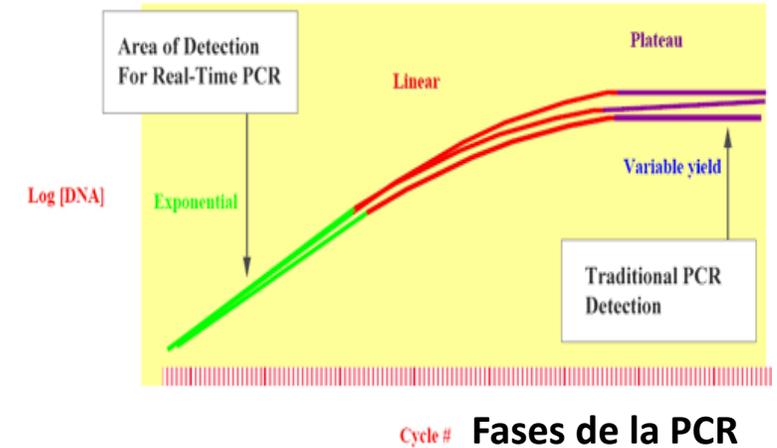
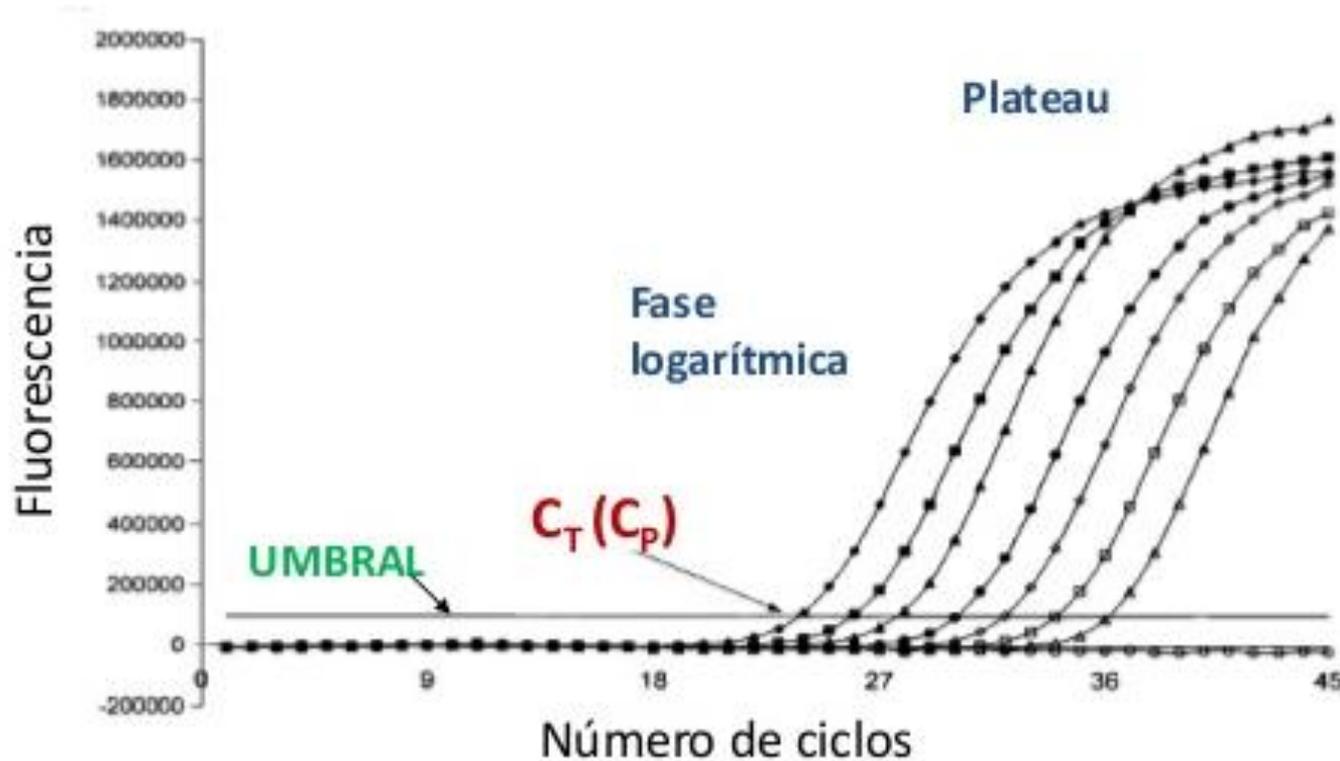
PCR Multiplex punto final :



1 2 3 4 P N M 1 2 3 4 P N M 1 2 3 4 P N

Real time PCR:

La real time PCR es cinética: Los procesos de **amplificación** y **detección** ocurren dentro del mismo vial cerrado.



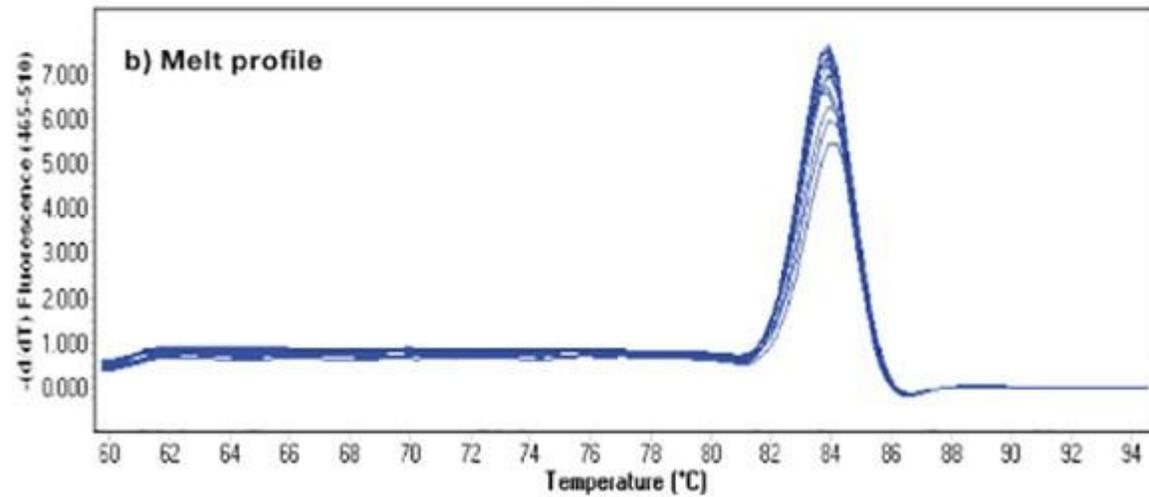
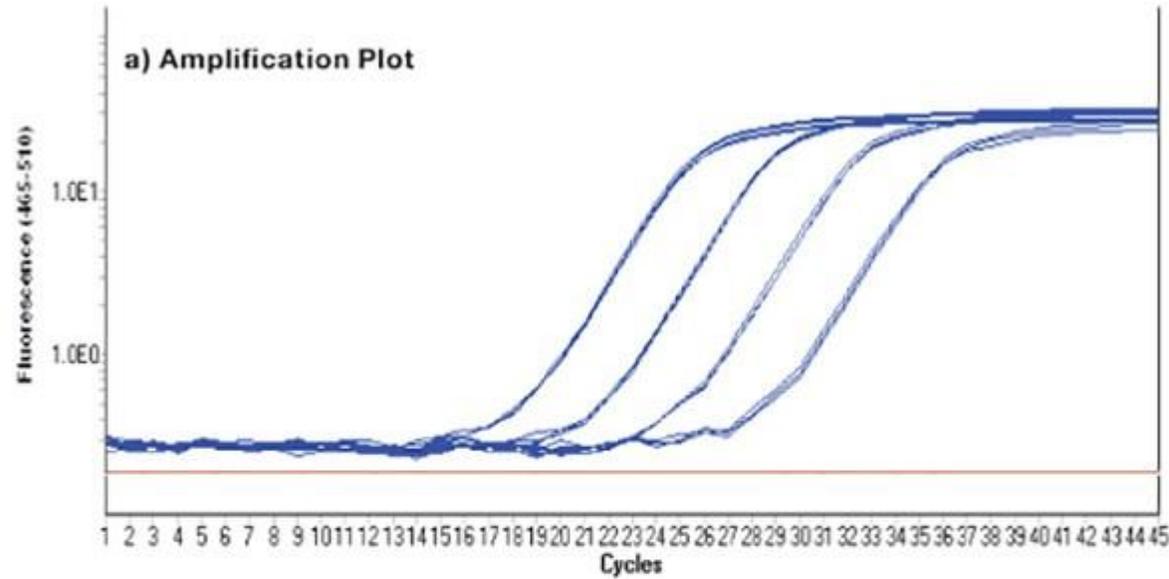
Existen dos métodos para la detección: 1- **Métodos No Específicos.**
2- **Métodos Específicos.**

Real time PCR:

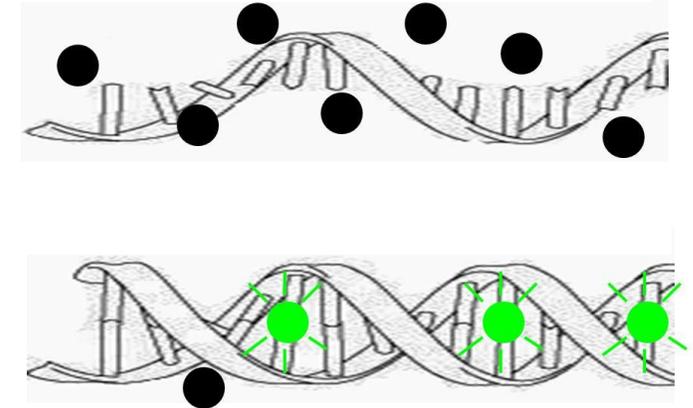
Los **métodos no específicos** se basan en el uso de moléculas intercalantes que tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente (**SYBR**).

Real time PCR:

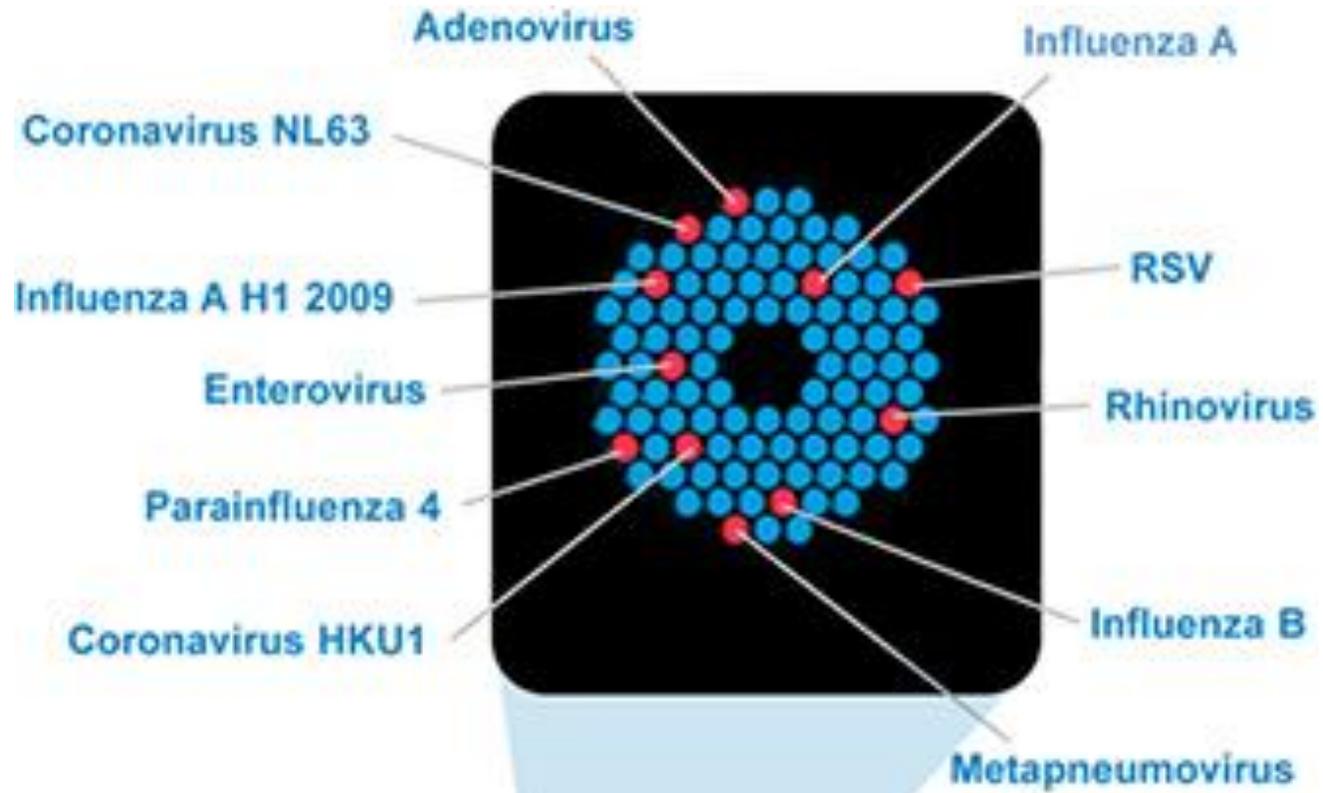
métodos no específicos



SYBR Green



PCR Multiplex Real Time No Especifico :



The FilmArray® Respiratory Panel 2 (RP2)

Sample type: Nasopharyngeal Swab

Viruses

Adenovirus
 Coronavirus HKU1
 Coronavirus NL63
 Coronavirus 229E
 Coronavirus OC43
 Human Metapneumovirus
 Human Rhinovirus/Enterovirus
 Influenza A
 Influenza A/H1
 Influenza A/H1-2009
 Influenza A/H3
 Influenza B
 Parainfluenza Virus 1
 Parainfluenza Virus 2
 Parainfluenza Virus 3
 Parainfluenza Virus 4
 Respiratory Syncytial Virus

Bacteria

Bordetella parapertussis
Bordetella pertussis
Chlamydia pneumoniae
Mycoplasma pneumoniae



21 | 1
 Pathogens | Test

97.1%
 Sensitivity*
99.3%
 Specificity*



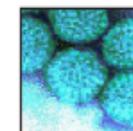
Bacteria

Campylobacter (jejuni, coli and upsaliensis)
Clostridium difficile (toxin A/B)
Plesiomonas shigelloides
Salmonella
Yersinia enterocolitica
Vibrio (parahaemolyticus, vulnificus and cholerae)
Vibrio cholerae
Diarrheagenic E. coli/Shigella
 Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)
 Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)
 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) *lt/st*
 Shiga-like toxin-producing *E. coli* (STEC) *stx1/stx2*
E. coli O157
Shigella/Enteroinvasive E. coli (EIEC)



Parasites

Cryptosporidium
Cyclospora cayetanensis
Entamoeba histolytica
Giardia lamblia



Viruses

Adenovirus F 40/41
 Astrovirus
 Norovirus GI/GII
 Rotavirus A
 Sapovirus (I, II, IV and V)

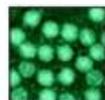
FilmArray® Meningitis/Encephalitis Panel

1 Test. 14 Targets. All in about an hour.



Bacteria

Escherichia coli K1
Haemophilus influenzae
Listeria monocytogenes
Neisseria meningitidis
Streptococcus agalactiae
Streptococcus pneumoniae



Viruses

Cytomegalovirus (CMV)
 Enterovirus
 Herpes simplex virus 1 (HSV-1)
 Herpes simplex virus 2 (HSV-2)
 Human herpesvirus 6 (HHV-6)
 Human parechovirus
 Varicella zoster virus (VZV)



Fungi

Cryptococcus neoformans/gattii



FilmArray® GI Panel		BIO F I R E	
Run Summary		www.BioFireOx.com	
Sample ID:	4973948	Run Date:	09 Apr 2018 10:51 AM
Detected:	Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAEC) Shigella/Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	Controls:	Passed
Result Summary			
		Bacteria	
Not Detected	<i>Campylobacter</i>		
Not Detected	<i>Clostridium difficile</i> toxin A/B		
Not Detected	<i>Plesiomonas shigelloides</i>		
Not Detected	<i>Salmonella</i>		
Not Detected	<i>Vibrio</i>		
Not Detected	<i>Vibrio cholerae</i>		
Not Detected	<i>Yersinia enterocolitica</i>		
		Diarrheagenic <i>E. coli</i> /Shigella	
✓ Detected	Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAEC)		
Not Detected	Enteropathogenic <i>E. coli</i> (EPEC)		
Not Detected	Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (ETEC) <i>lt/st</i>		
Not Detected	Shiga-like toxin-producing <i>E. coli</i> (STEC) <i>stx1/stx2</i>		
⊘ N/A	<i>E. coli</i> O157		
✓ Detected	Shigella/Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)		
		Parasites	
Not Detected	<i>Cryptosporidium</i>		
Not Detected	<i>Cyclospora cayetanensis</i>		
Not Detected	<i>Entamoeba histolytica</i>		
Not Detected	<i>Giardia lamblia</i>		
		Viruses	
Not Detected	Adenovirus F 40/41		
Not Detected	Astrovirus		
Not Detected	Norovirus GI/GII		
Not Detected	Rotavirus A		
Not Detected	Sapovirus		

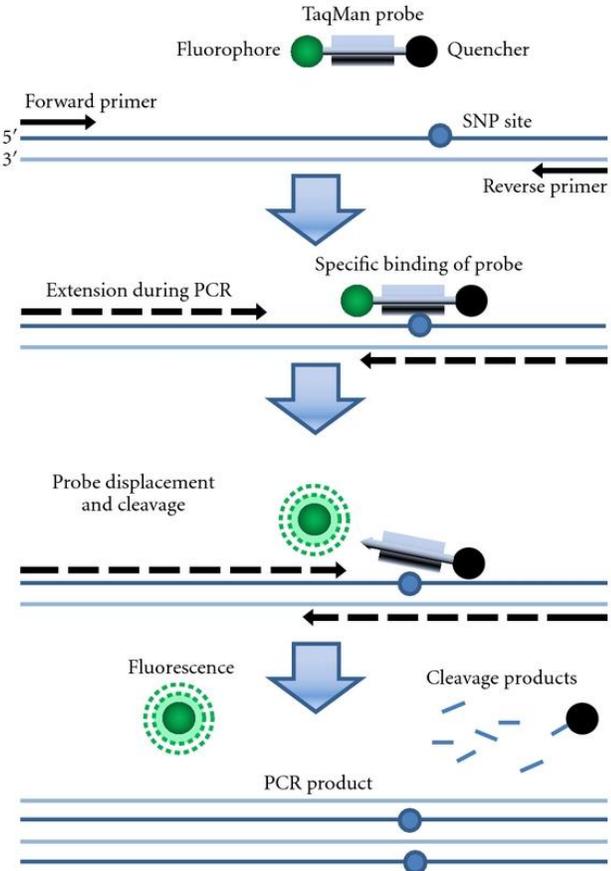
Real time PCR:

Los **métodos específicos** siguen el principio conocido como FRET para generar la señal.

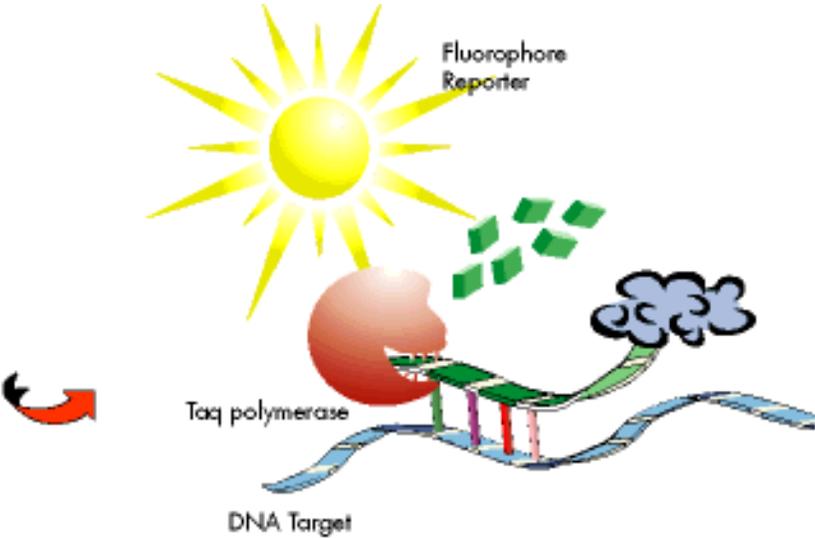
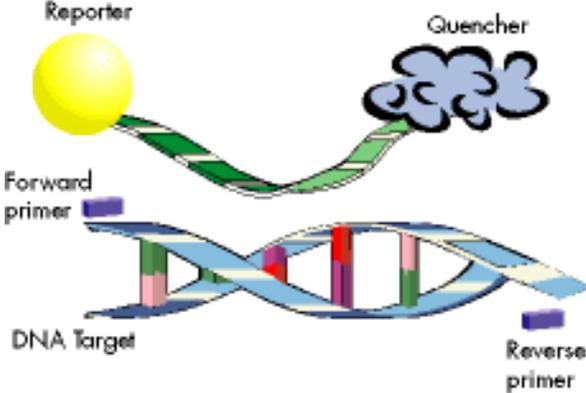
Utilizan **sondas** de secuencia conocida para realizar la detección.

Real time PCR:

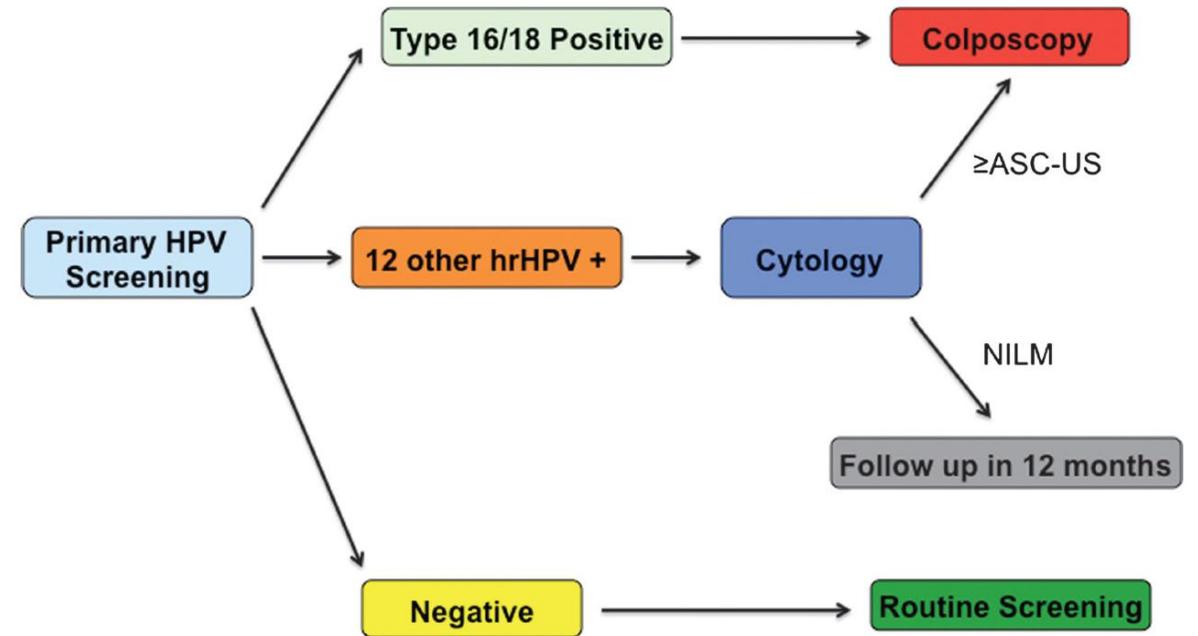
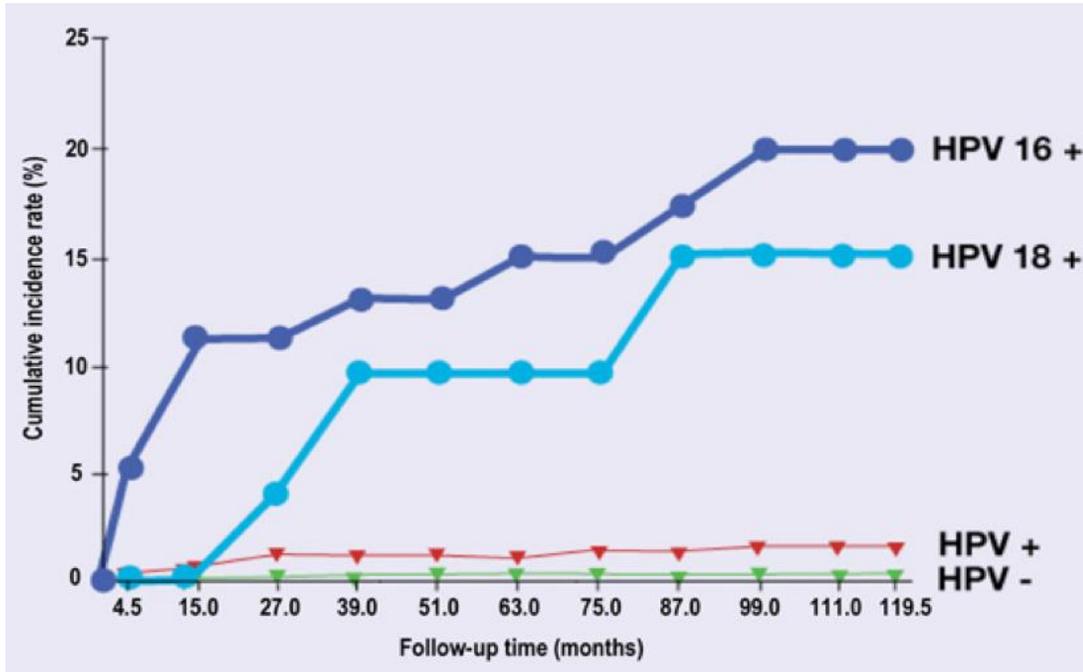
métodos específicos - TaqMan



Taqman™ probe



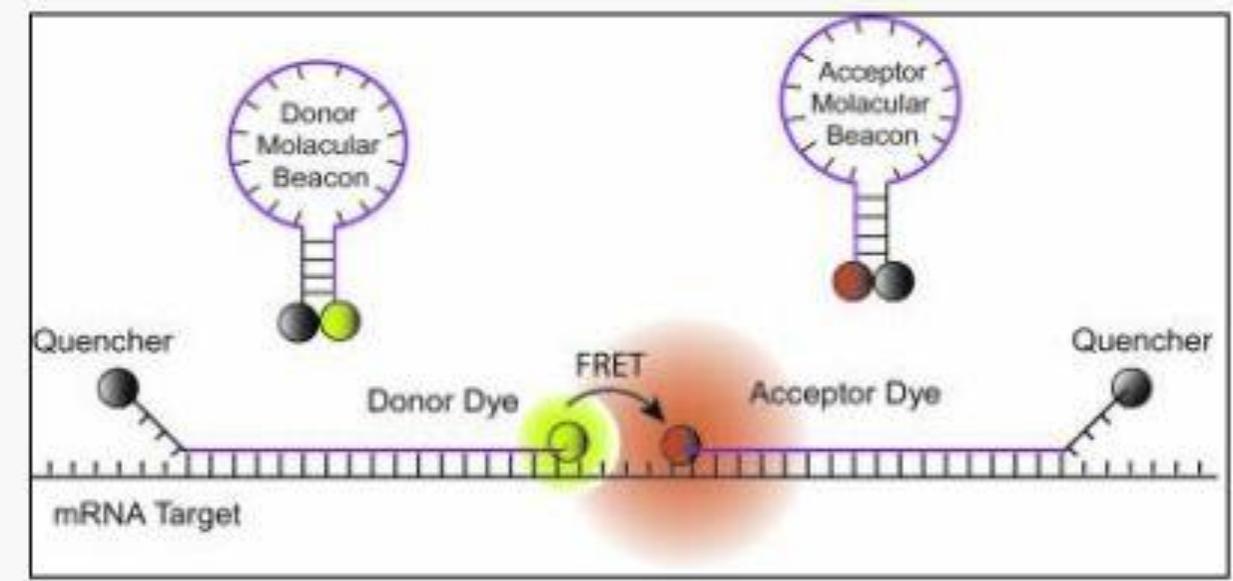
PCR Multiplex Real Time Especifico :



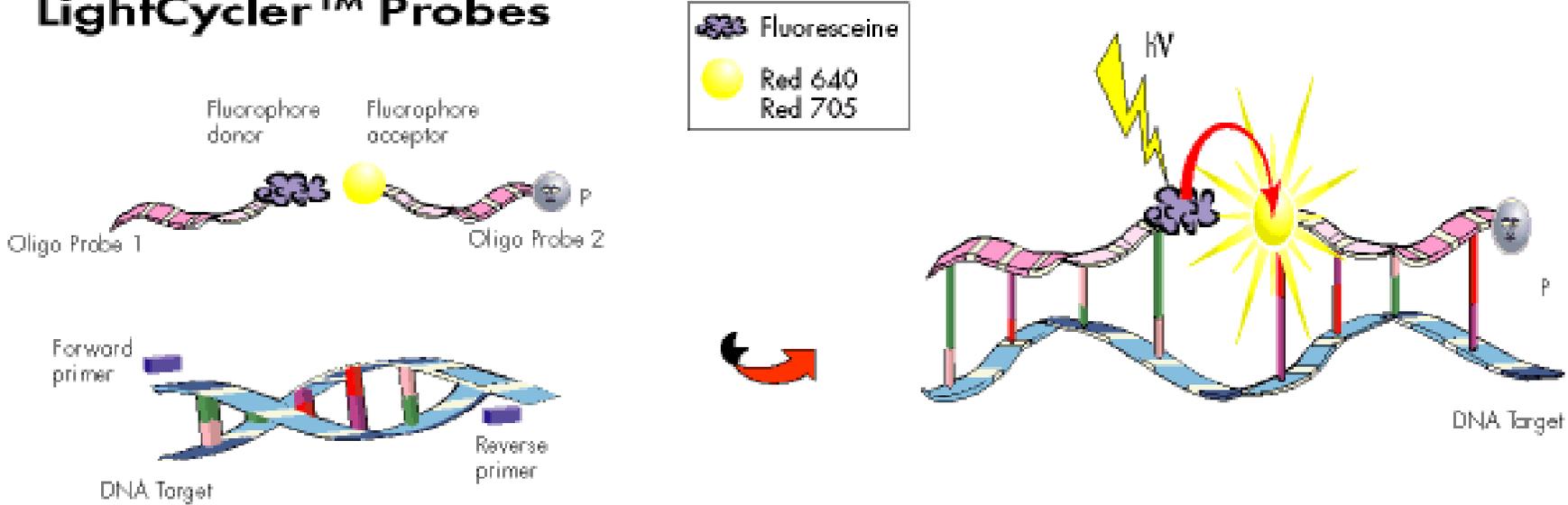
Channel 1	Channel 2	Channel 3	Channel 4
31 33 35 39 45 51 52 56 58 59 66 68	16	18	
12 hrHPV genotypes as a pooled result	Individually detects HPV16	Individually detects HPV18	Internal cellular control (β-globin)

Real time PCR:

métodos específicos - Probes

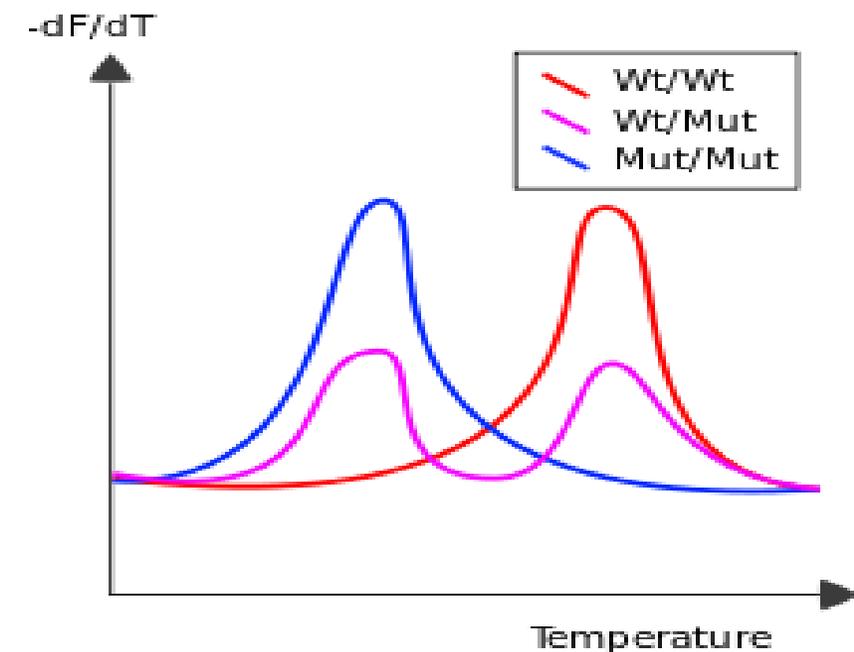
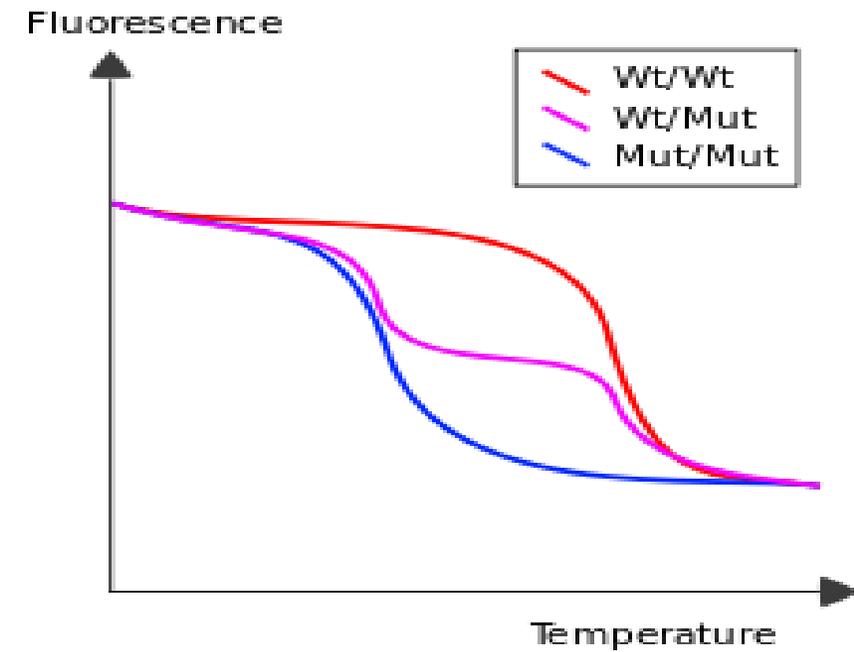
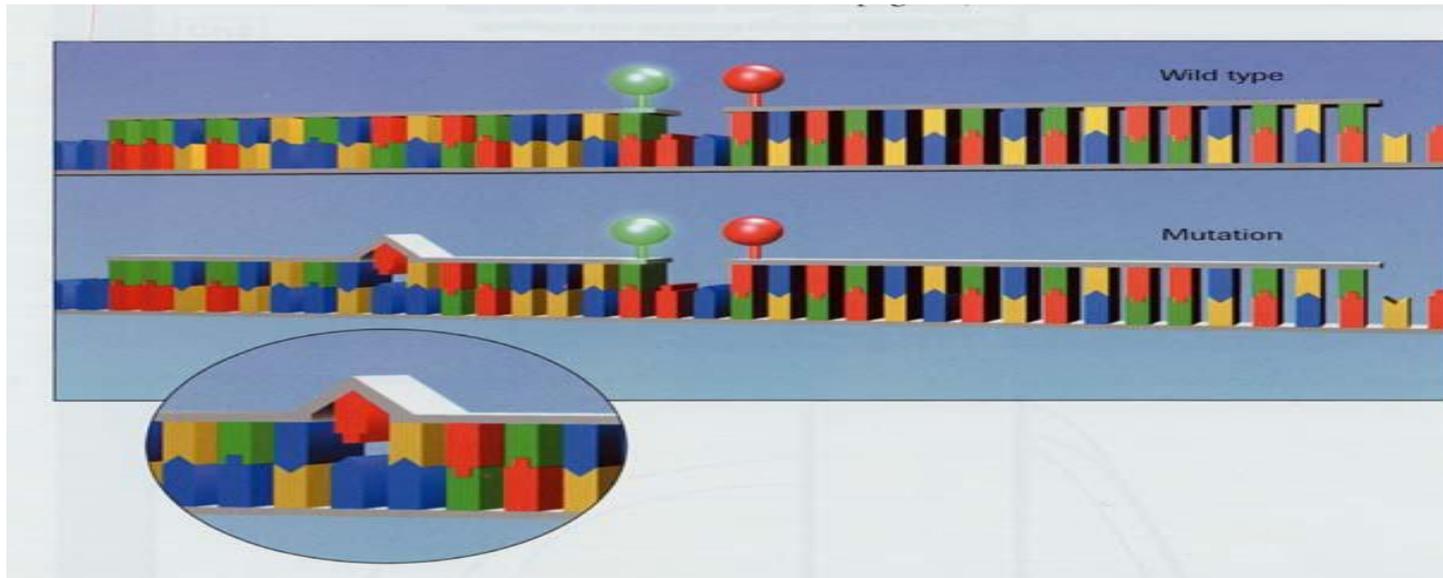


LightCycler™ Probes



Análisis de mutaciones y polimorfismos utilizando Curvas de Disociación:

- 1- Se realizan curvas de Fluorescencia vs. Temperatura luego de finalizada la reacción
- 2- De estas curvas se determina el **T_m** (temperatura de fusión de cada producto generado, que es directamente dependiente de la secuencia del mismo)
- 3- Tan solo la diferencia en una base entre dos secuencias genera una diferencia en la T_m, lo cual Nos permite diferenciarlos



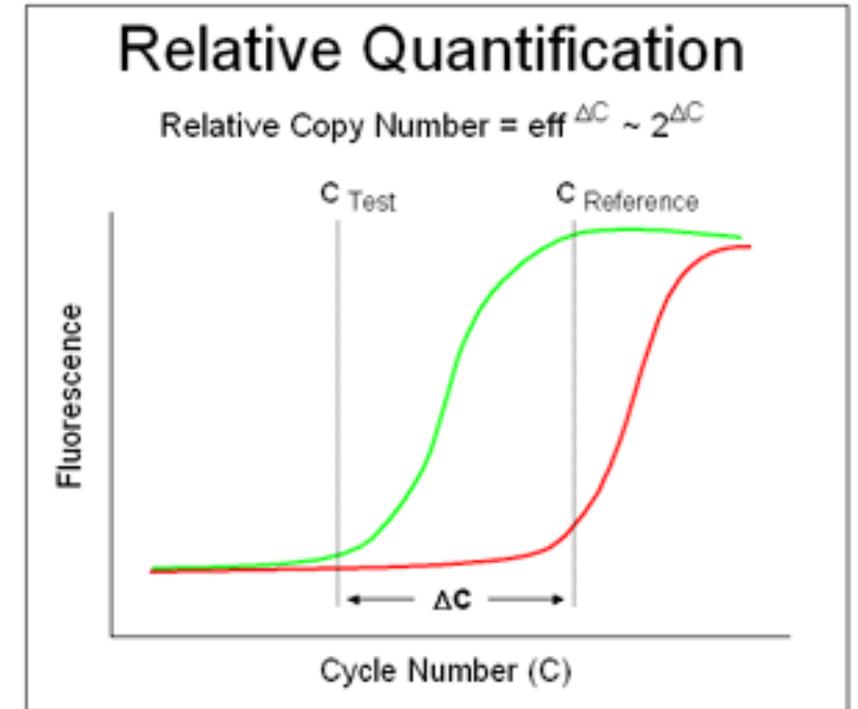
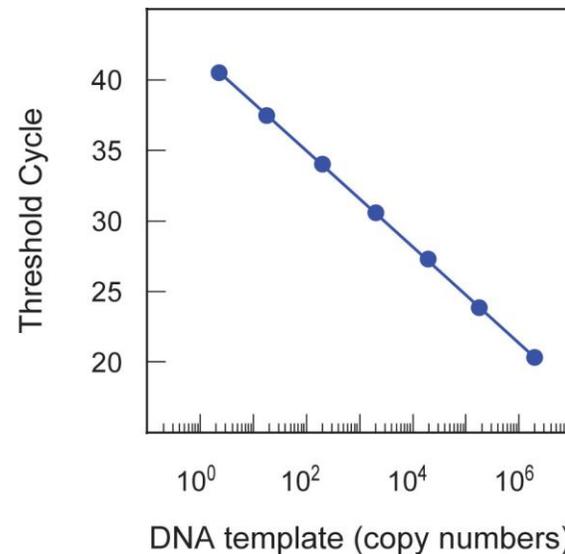
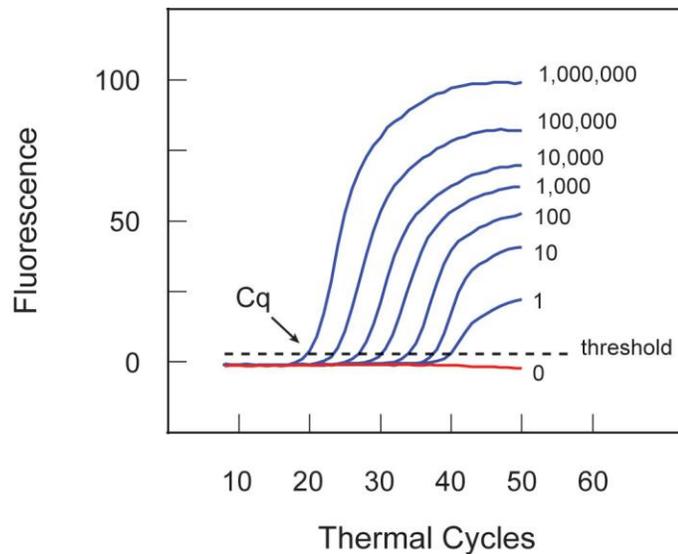
¿Como se **cuantifica** en la PCR Tiempo Real?

A través de STD o por medio de
un gen de expresión
constitutiva.

Cuantificación Absoluta

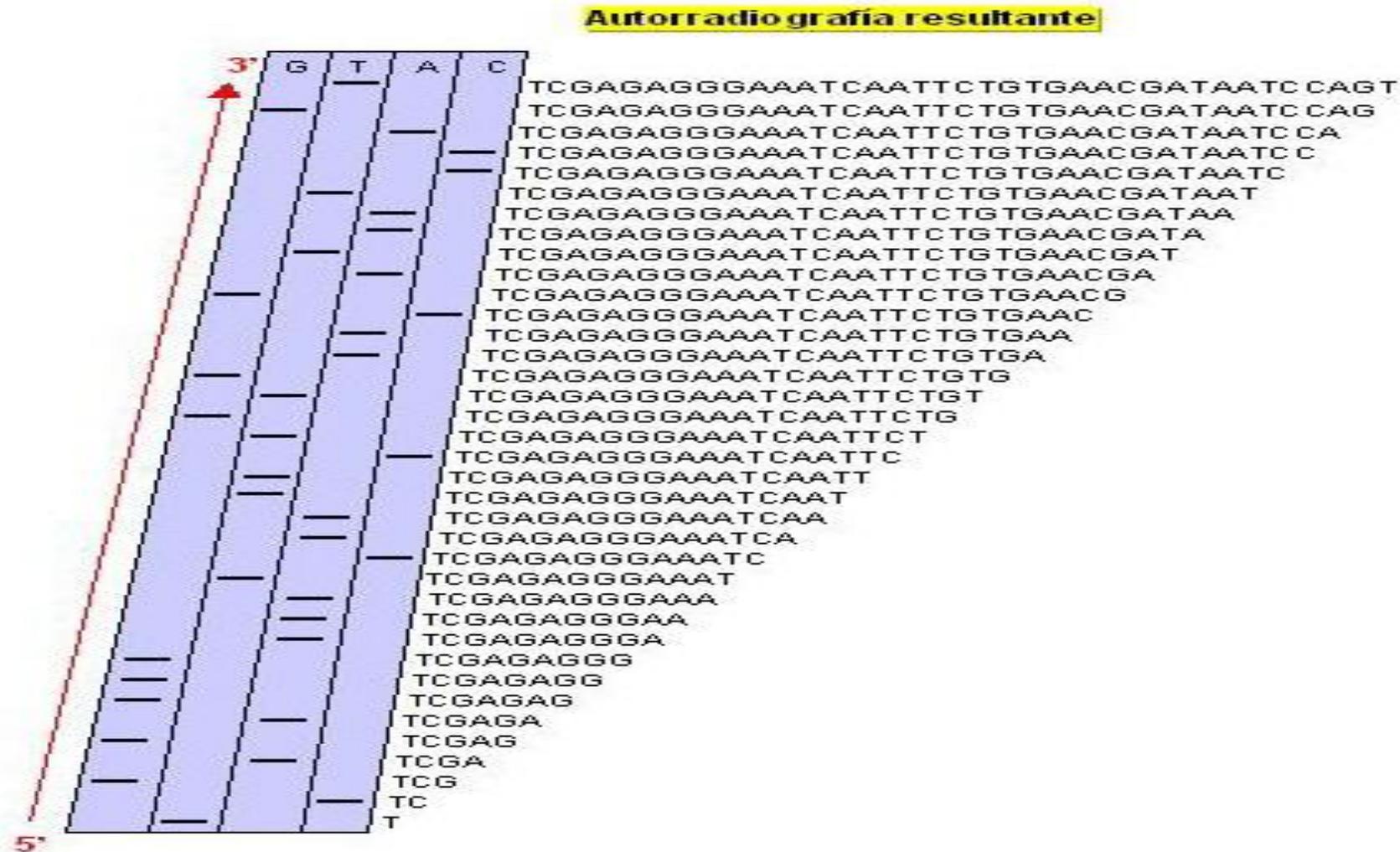
VS

Cuantificación Relativa



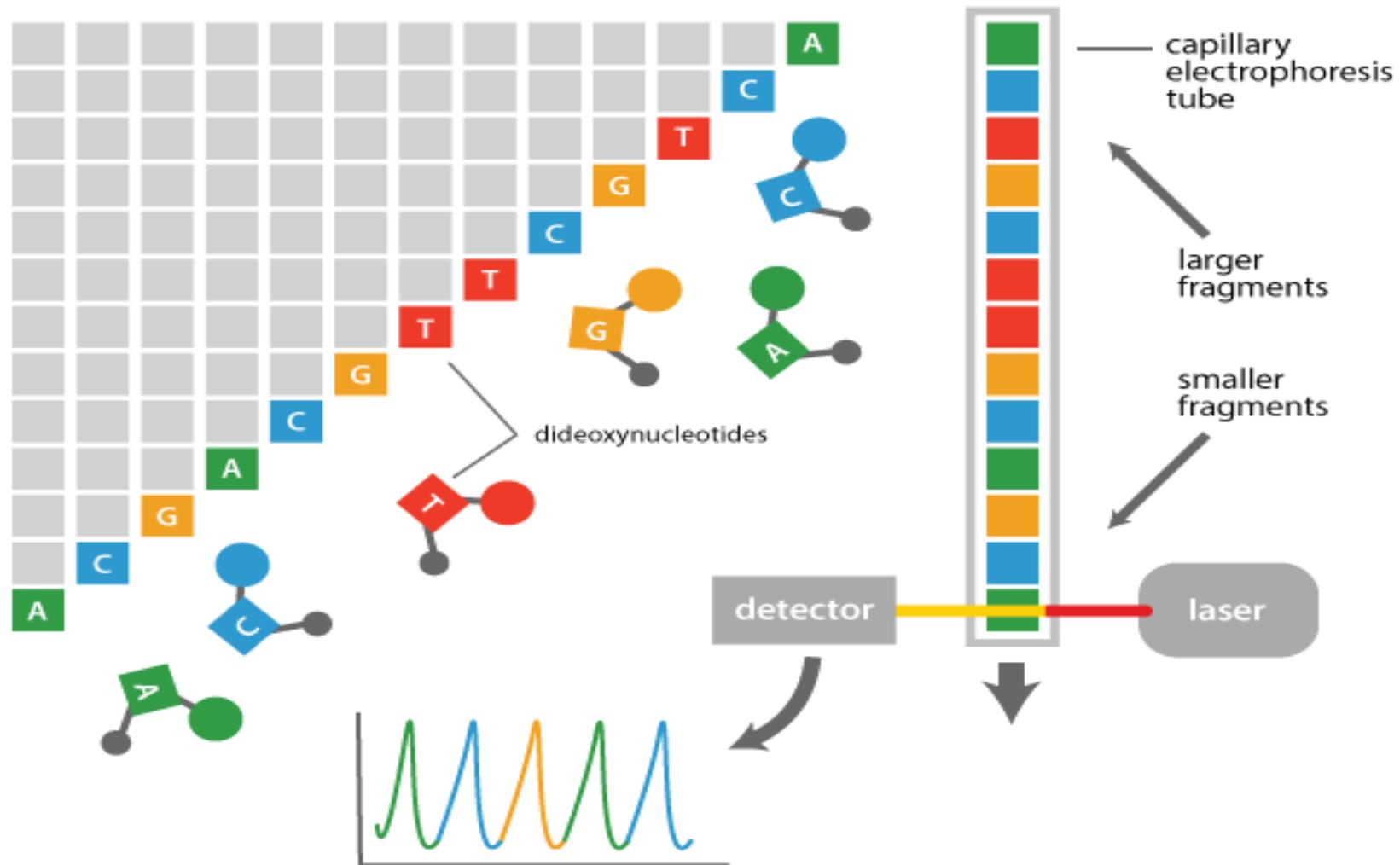
Secuenciación por método enzimático:

El método de **Sanger (1977)** se basa en el uso de la ADN polimerasa para sintetizar cadenas de ADN con una terminación específica.

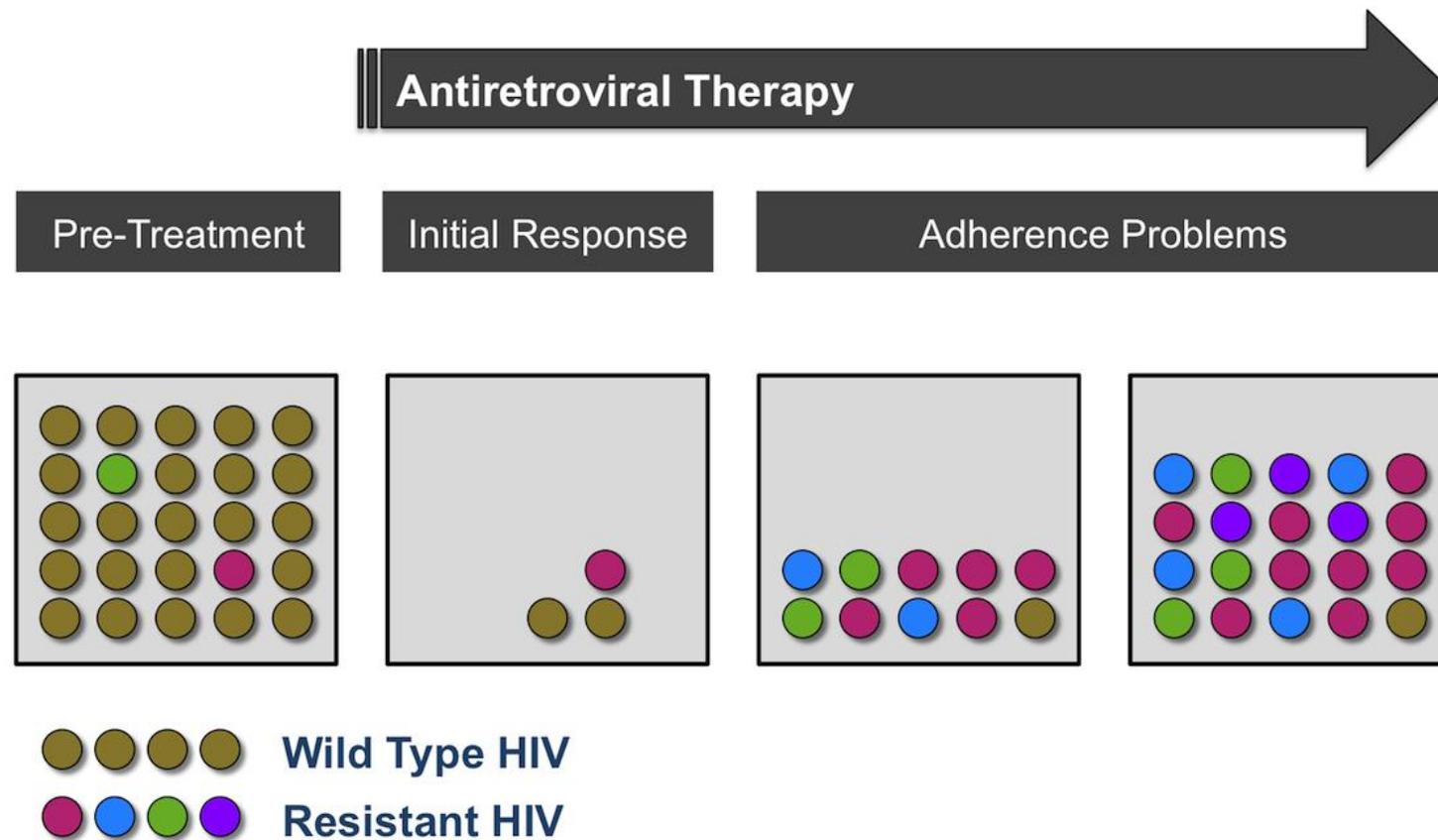


Secuenciación por método enzimático automatizado:

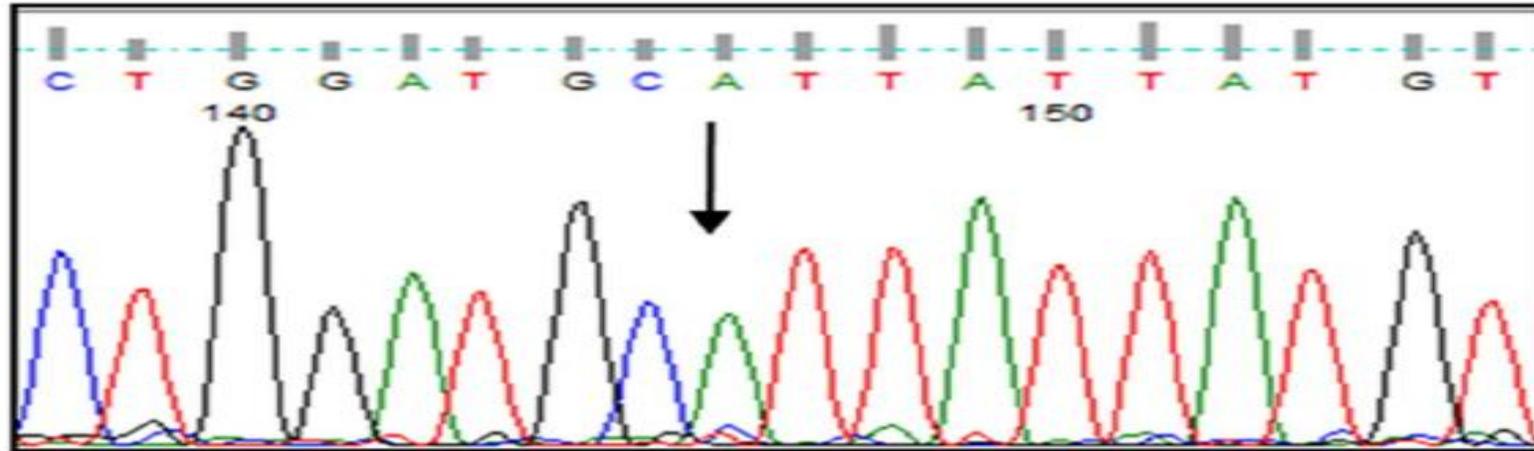
Secuenciación en electroforesis capilar: En la actualidad la reacción de secuenciación se basa en una modificación de la PCR con dideoxynucleótidos marcados con fluoróforos y se resuelve mediante una electroforesis capilar.



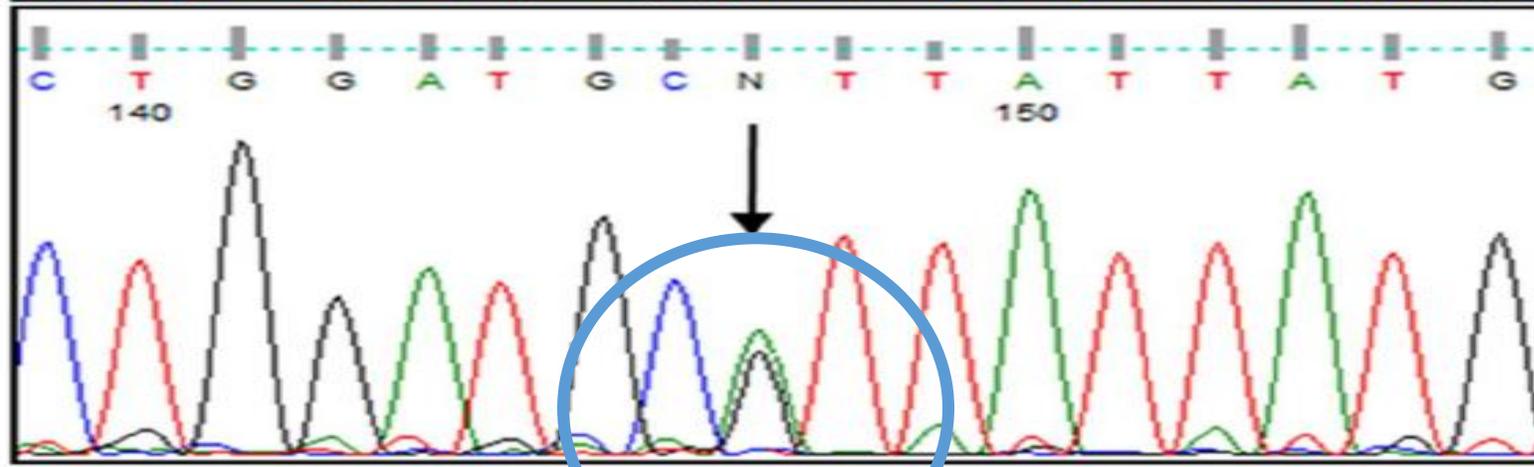
Secuenciación:



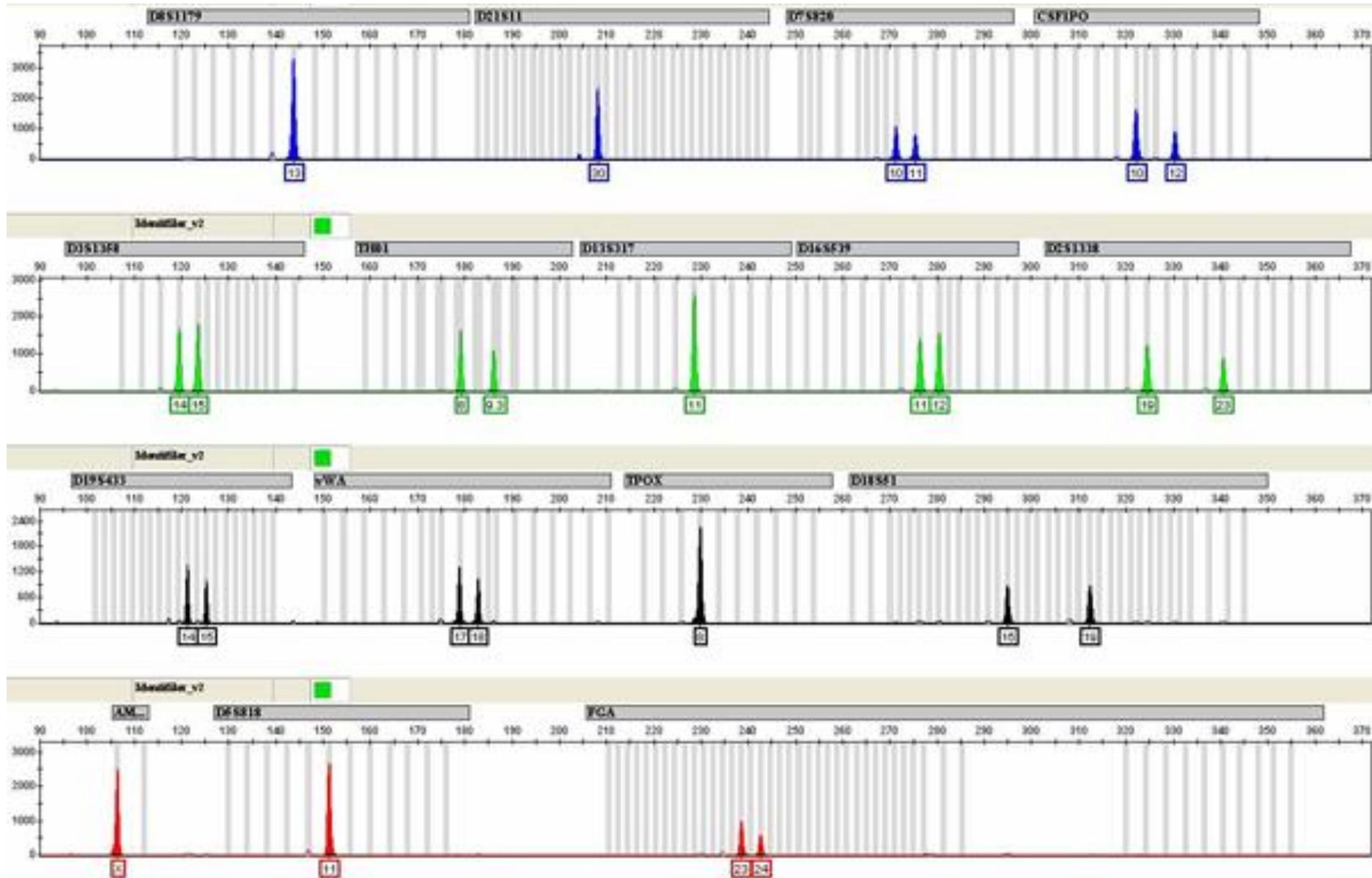
A



B



Genética forense:

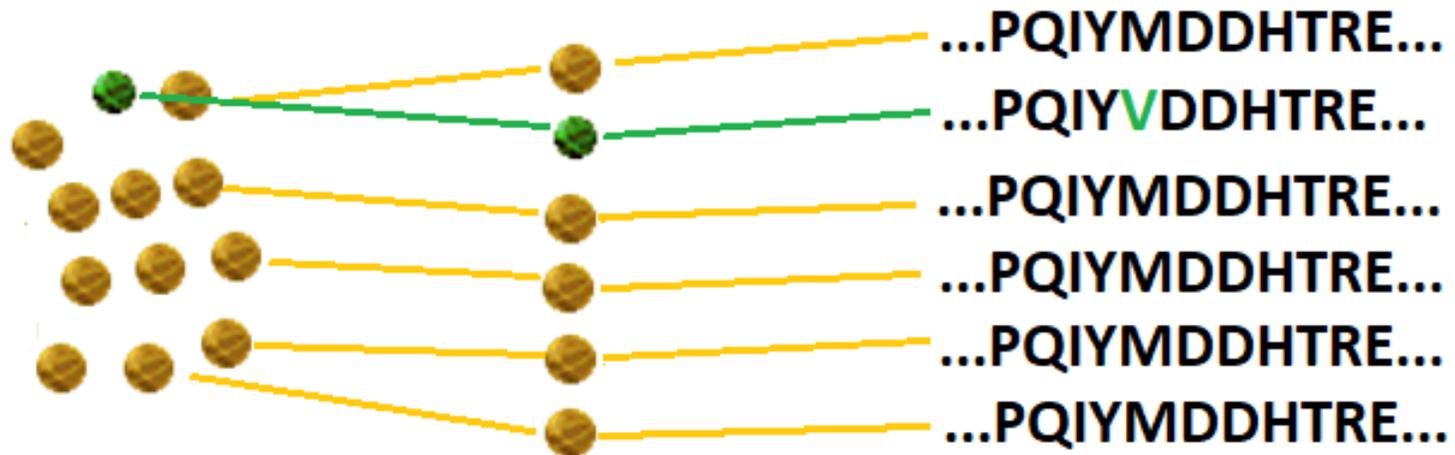


Secuenciación NGS (Next Generation Sequencing):

SECUENCIACION POBLACIONAL



SECUENCIACION NGS

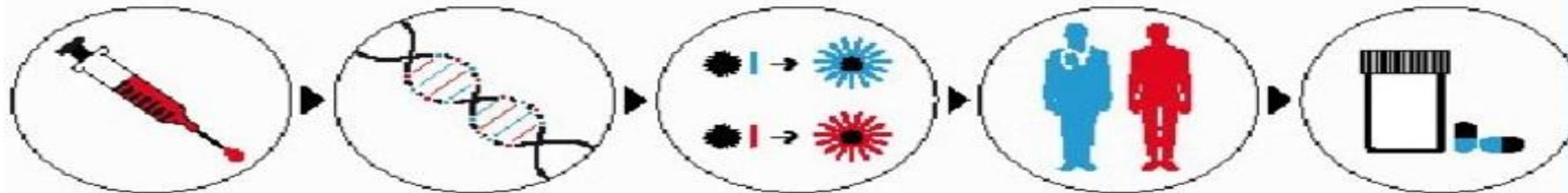


Secuenciación NGS:

Drug	20%	10%	5%	1%
NRTI				
lamivudine (3TC)	M184V			
abacavir (ABC)	M184V			
zidovudine (AZT)	M184V			
stavudine (D4T)	M184V			
didanosine (DDI)	M184V			
emtricitabine (FTC)	M184V			
tenofovir (TDF)	M184V			
NNRTI				
efavirenz (EFV)		K103N		
etravirine (ETR)				
nevirapine (NVP)		K103N		
rilpivirine (RPV)				
PI				
atazanavir/r (ATV/r)				
darunavir/r (DRV/r)				
fosamprenavir/r (FPV/r)				
indinavir/r (IDV/r)				
lopinavir/r (LPV/r)				
nelfinavir (NFV)				
saquinavir/r (SQV/r)				
tipranavir/r (TPV/r)				
INSTI				
dolutegravir (DTG)				
elvitegravir (EVG)				
raltegravir (RAL)				

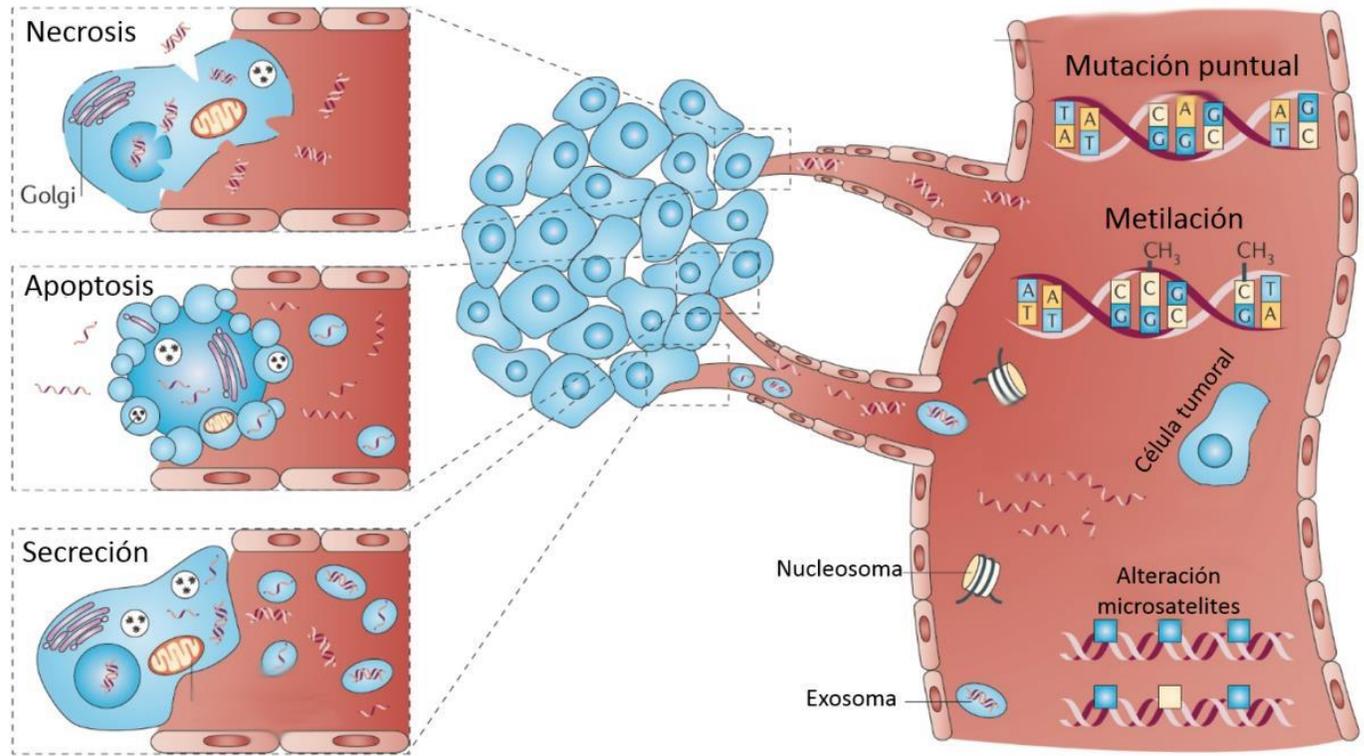
Table columns show additional mutations found at each threshold of sensitivity

Cómo es la biopsia líquida • Con un análisis de sangre se buscan células cancerosas. Es menos invasiva y más rápida.



- 1 Se extrae del paciente una muestra de sangre, de entre 7 a 10 ml. Es una extracción común.
- 2 Se separan los glóbulos rojos del plasma. Y luego se obtiene el ADN del tumor.
- 3 Usando una tecnología digital específica, se identifica el estado de mutación del tumor.
- 4 Médico y paciente evalúan opciones de tratamiento según el resultado del estudio.
- 5 El paciente inicia el protocolo que fue necesario para tratar la enfermedad.

CLARIN



EFICACIA DIAGNÓSTICA



80 RECIÉN NACIDOS
sospechados de
tener un trastorno
monogénico



SECUENCIACION DE
EXOMA

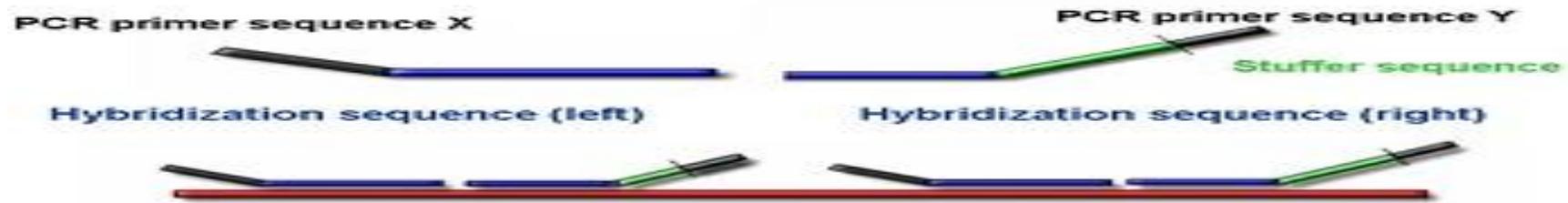
PROCEDIMIENTO
ESTÁNDAR



MLPA - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification :

MLPA es una Multiplex PCR, que permite que en una misma reacción se pueda detectar copias anormales de secuencias genómicas diferentes de ARN o ADN.

1. Denaturation and Hybridization



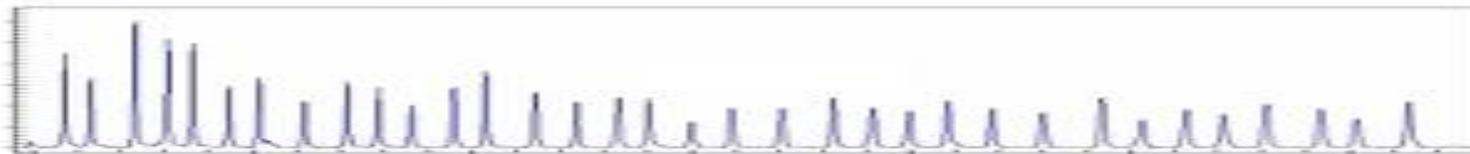
2. Ligation

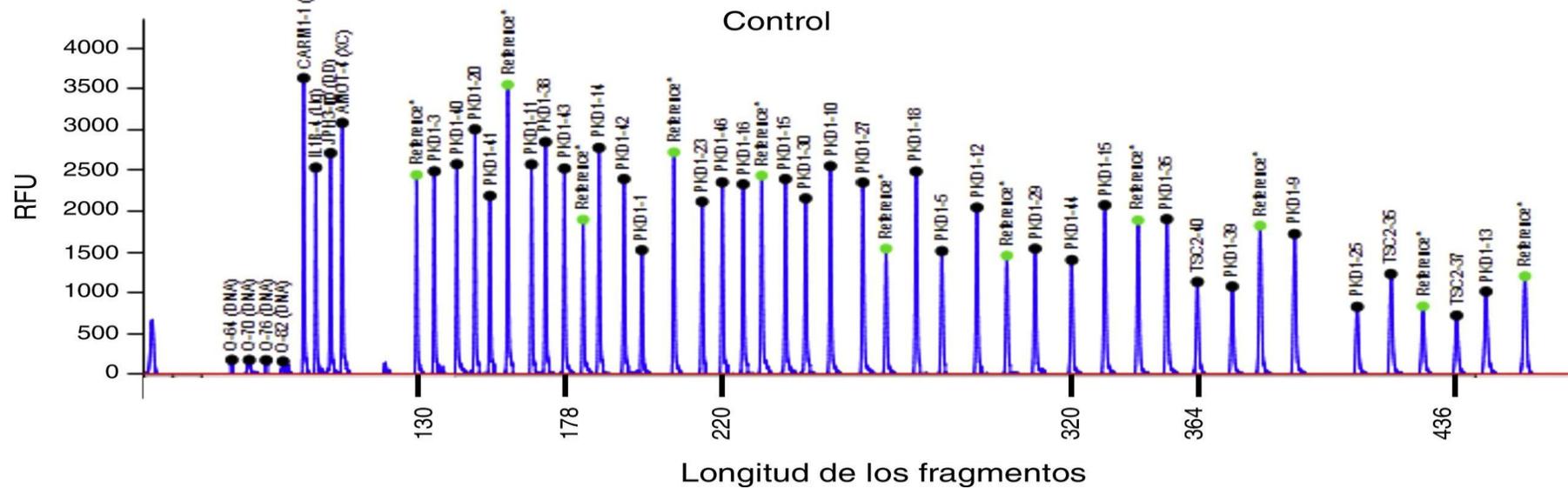
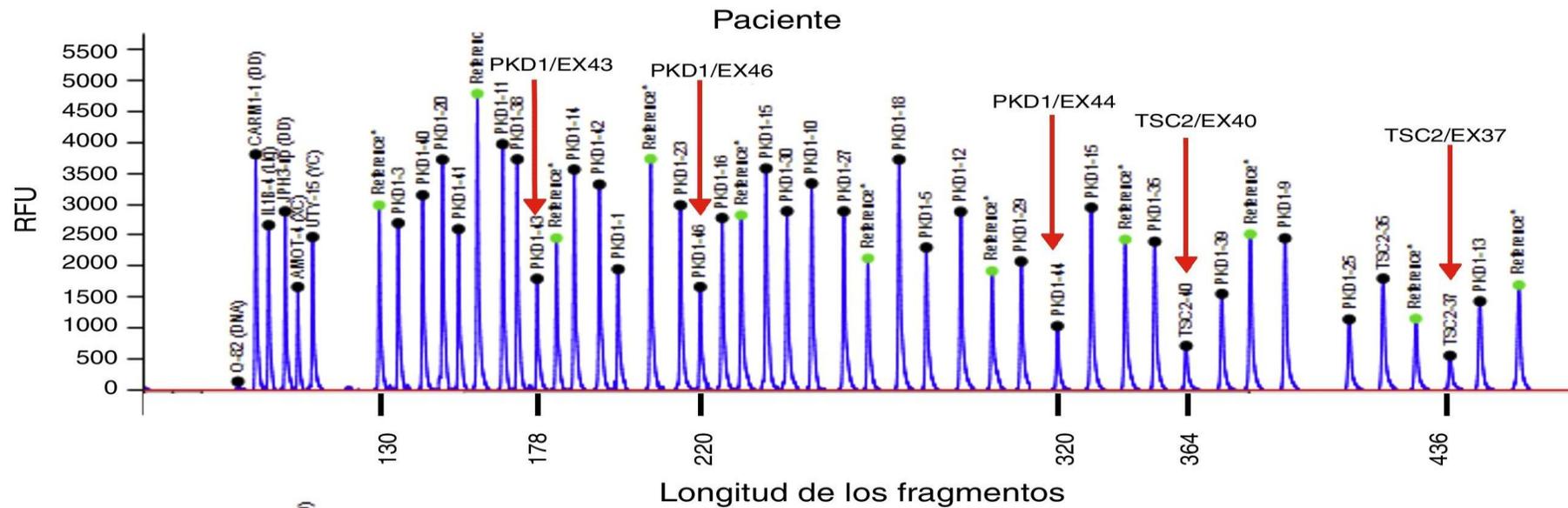


3. PCR with universal primers X and Y exponential amplification of ligated probes only



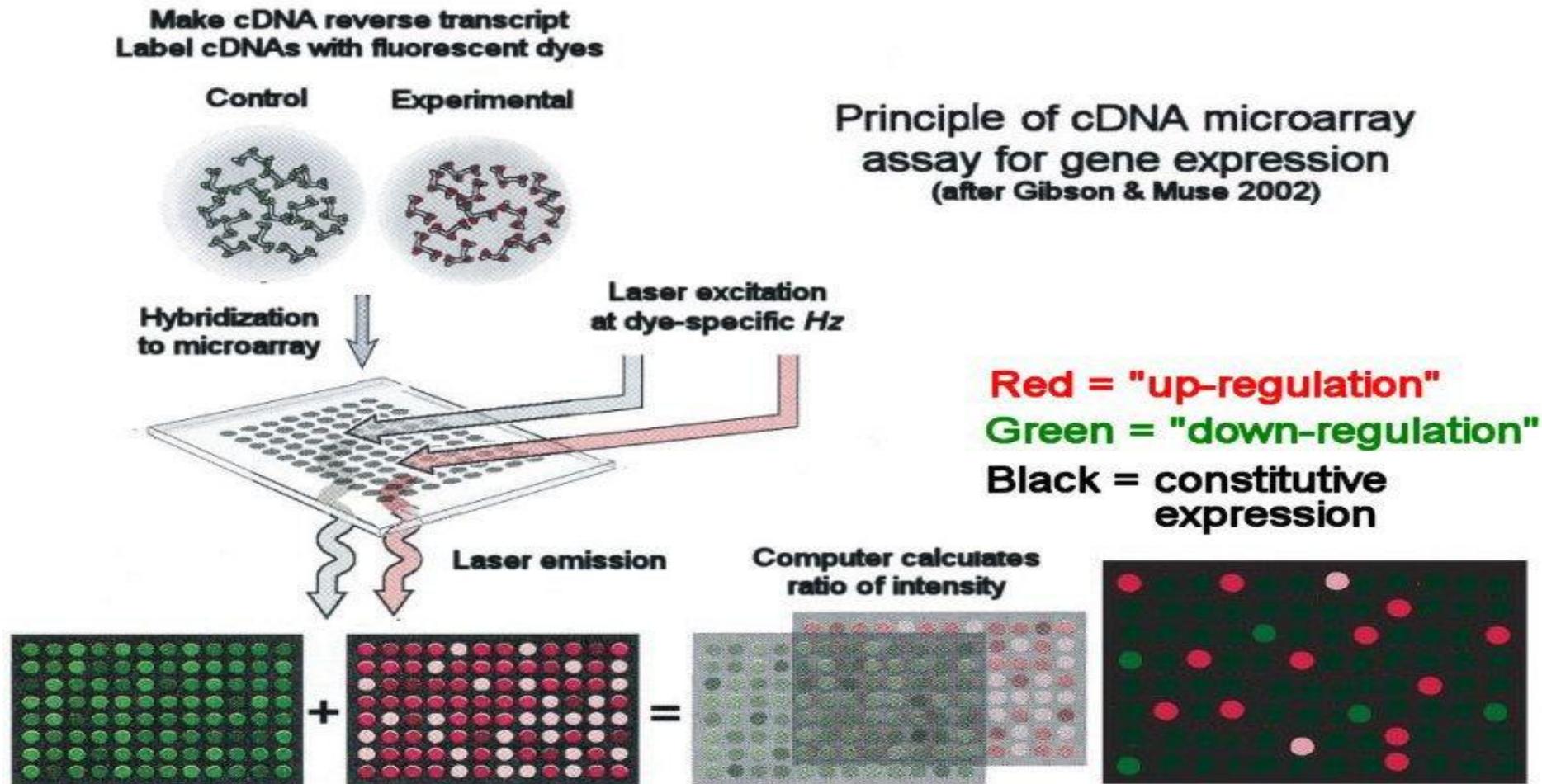
4. Fragment analysis

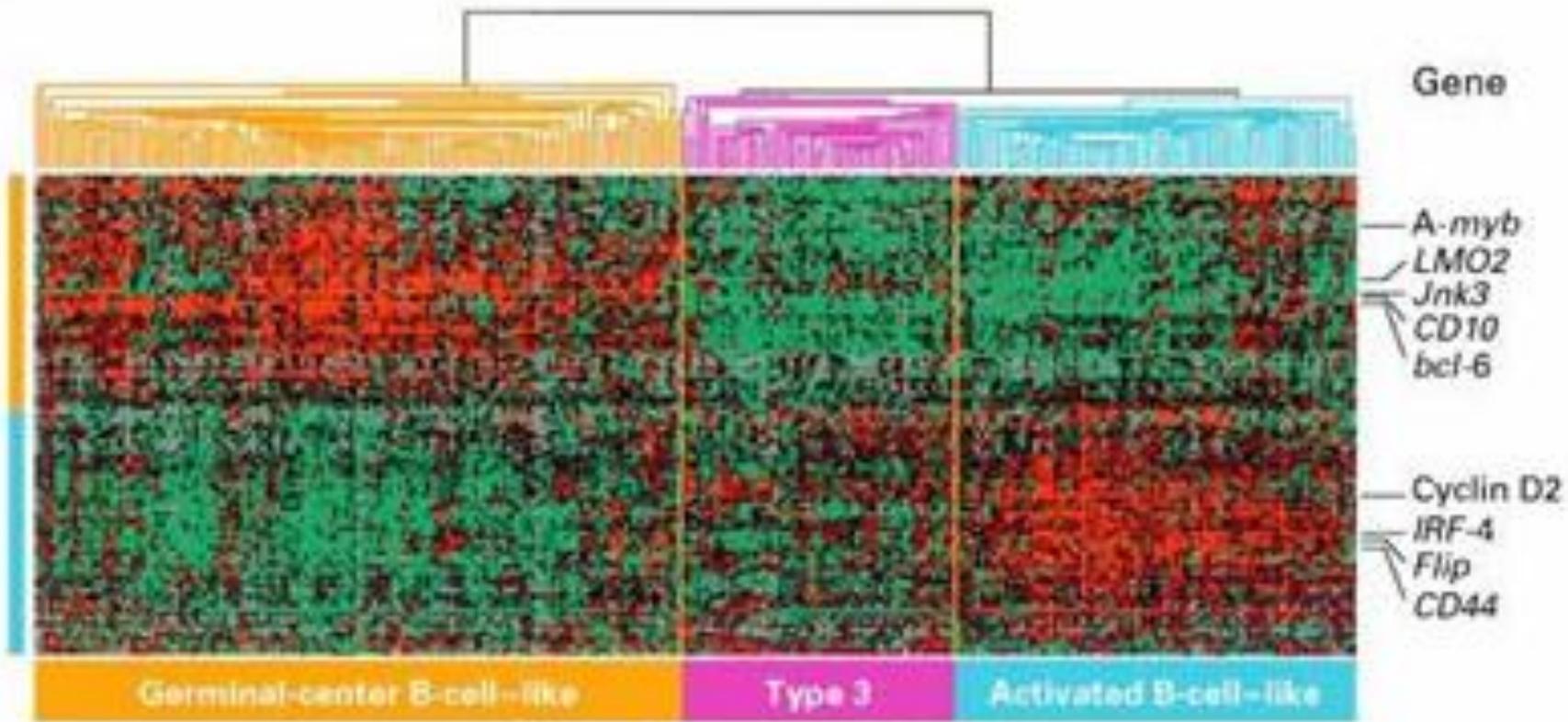




MicroArrays:

Es una superficie sólida a la cual se une una colección de fragmentos de ADN. Se usan para analizar expresión diferencial de genes. Su funcionamiento consiste en medir el nivel de hibridación entre la sonda específica, y su target, que se refleja comúnmente mediante análisis de imágenes de la intensidad de fluorescencia.





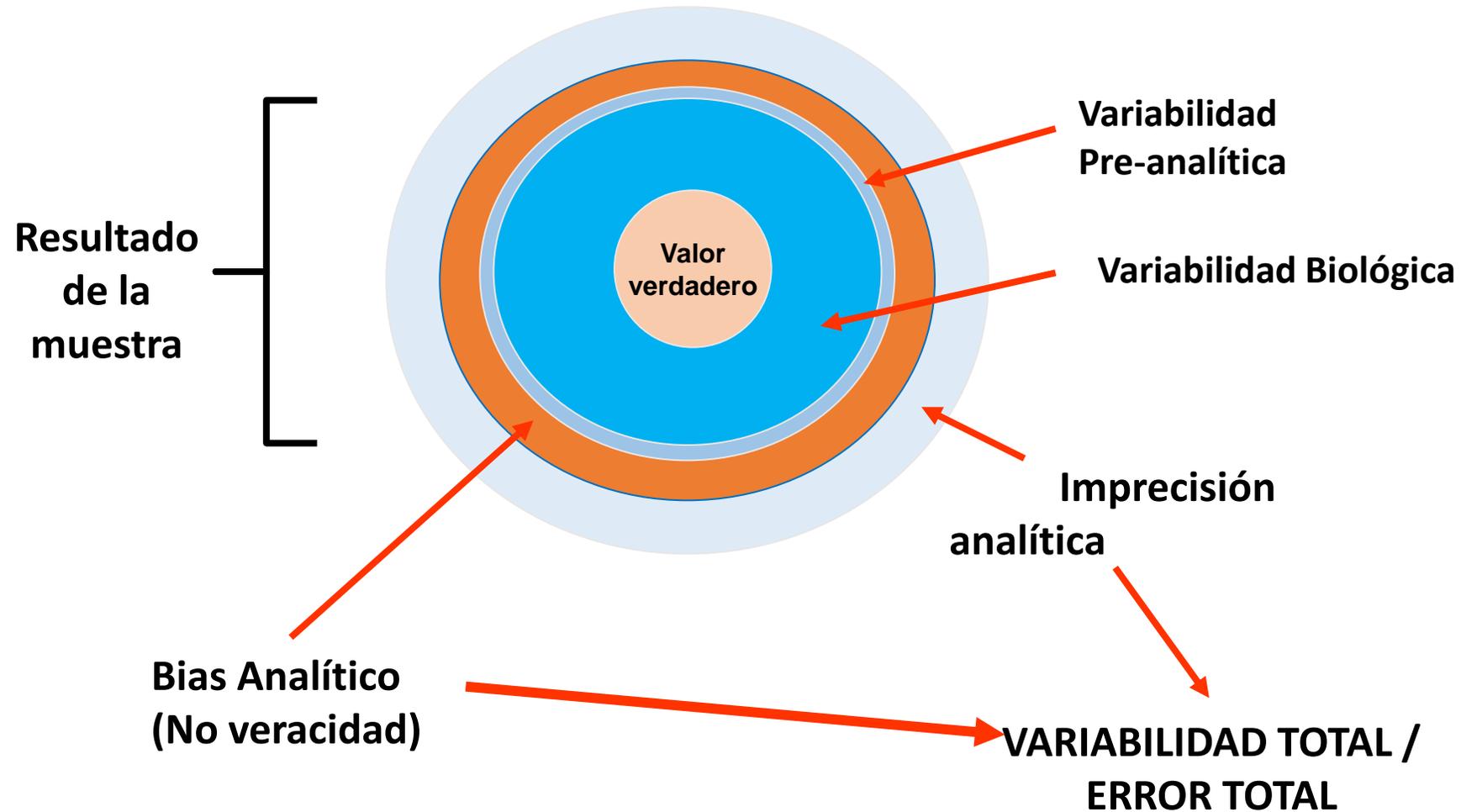
Subgroup of Diffuse Large-B-Cell Lymphoma



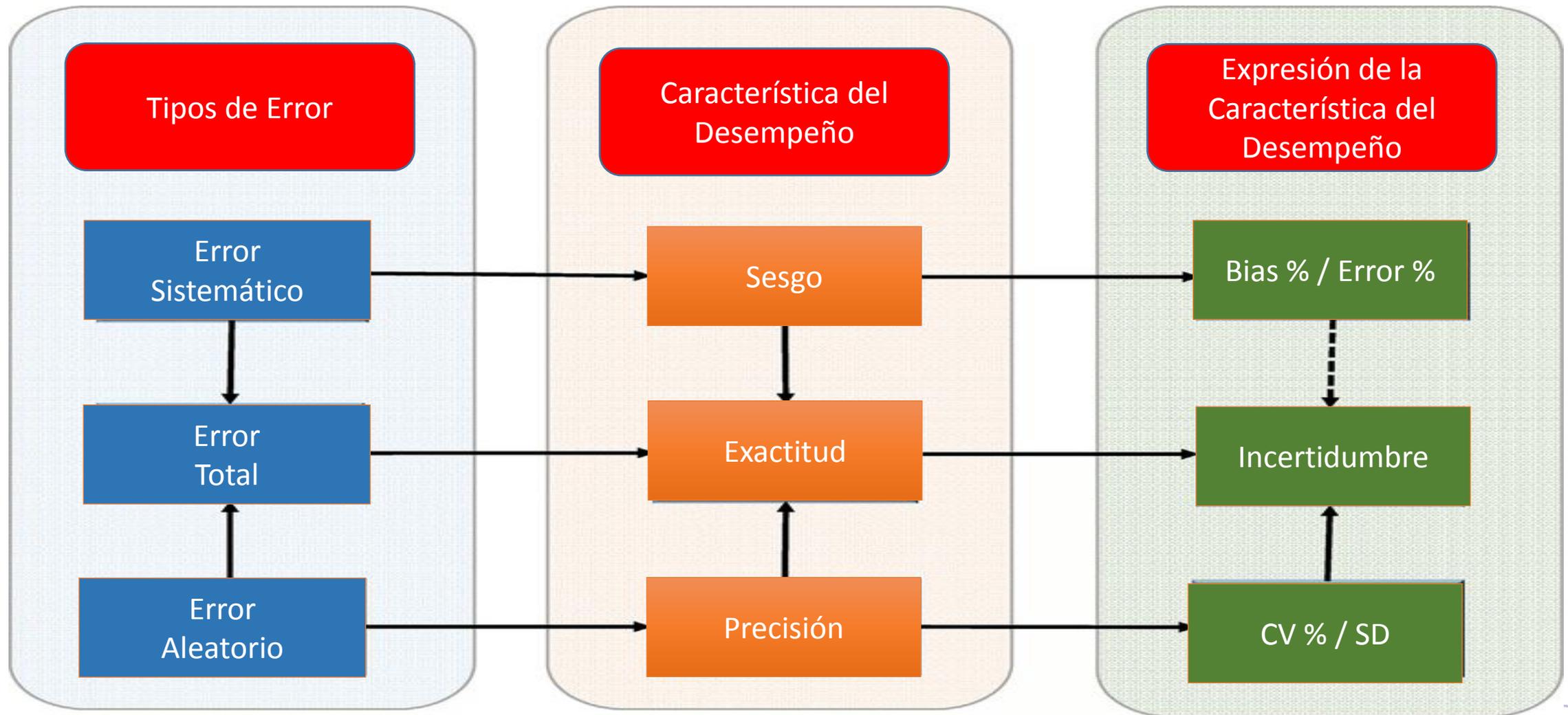
Relative Level of Expression (\times median value)

¿Para **informar - liberar** un
resultado debemos conocer
algo más?

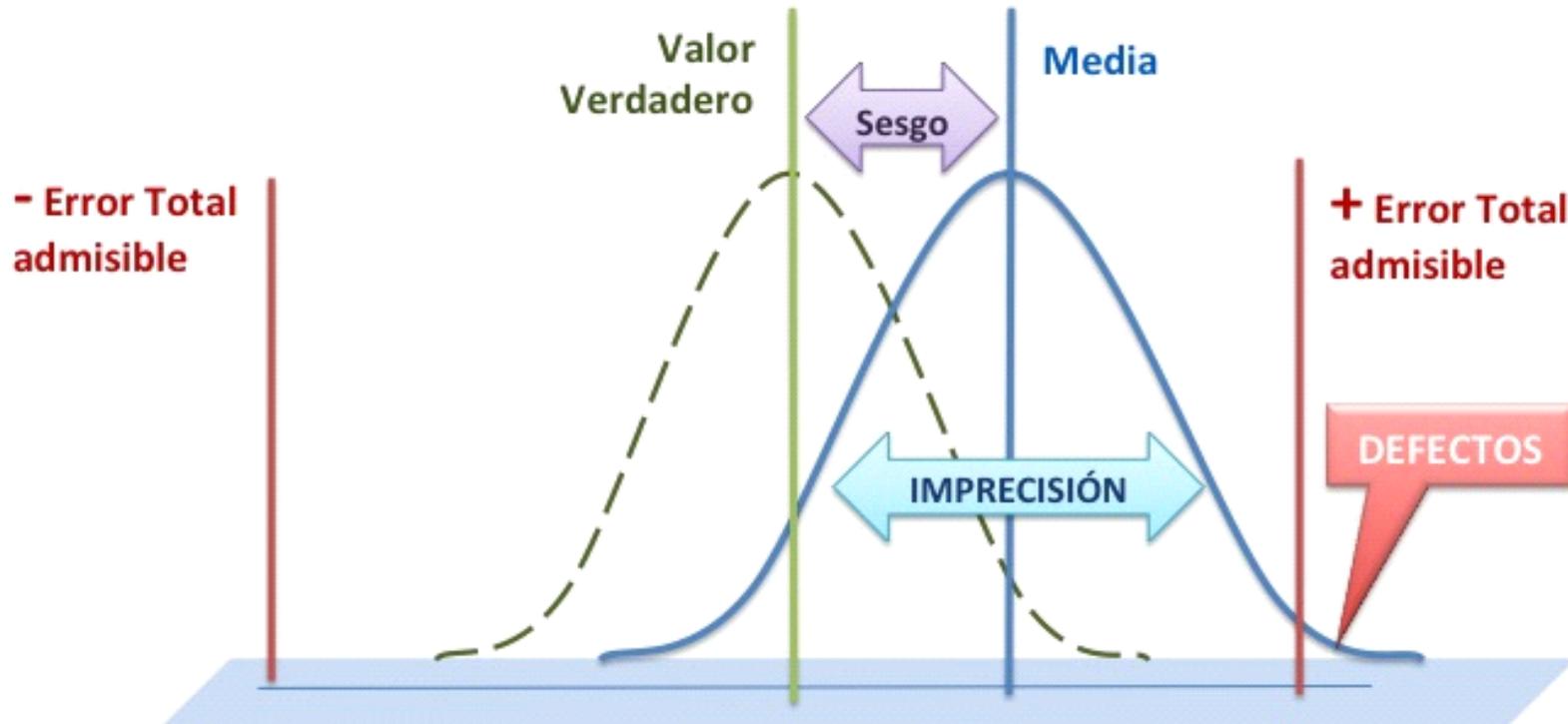
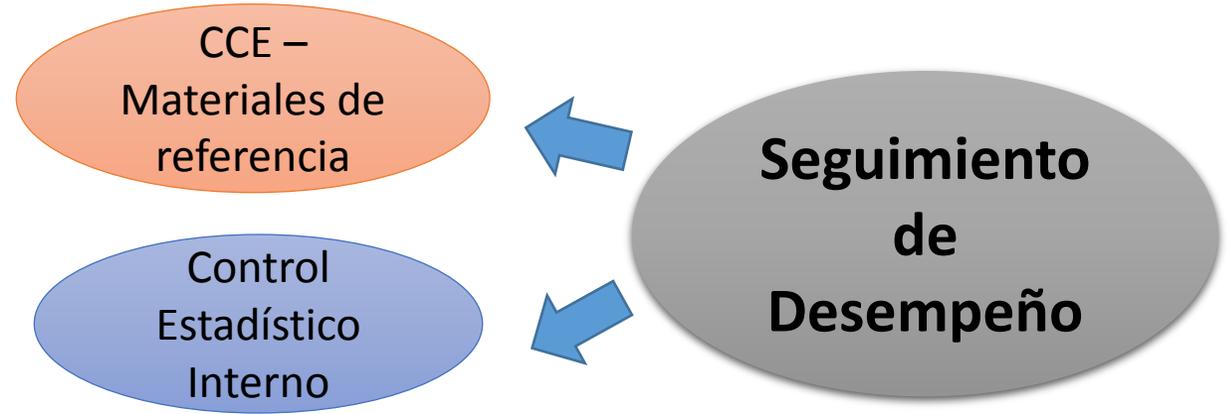
Debemos conocer la composición de un dato de Laboratorio...



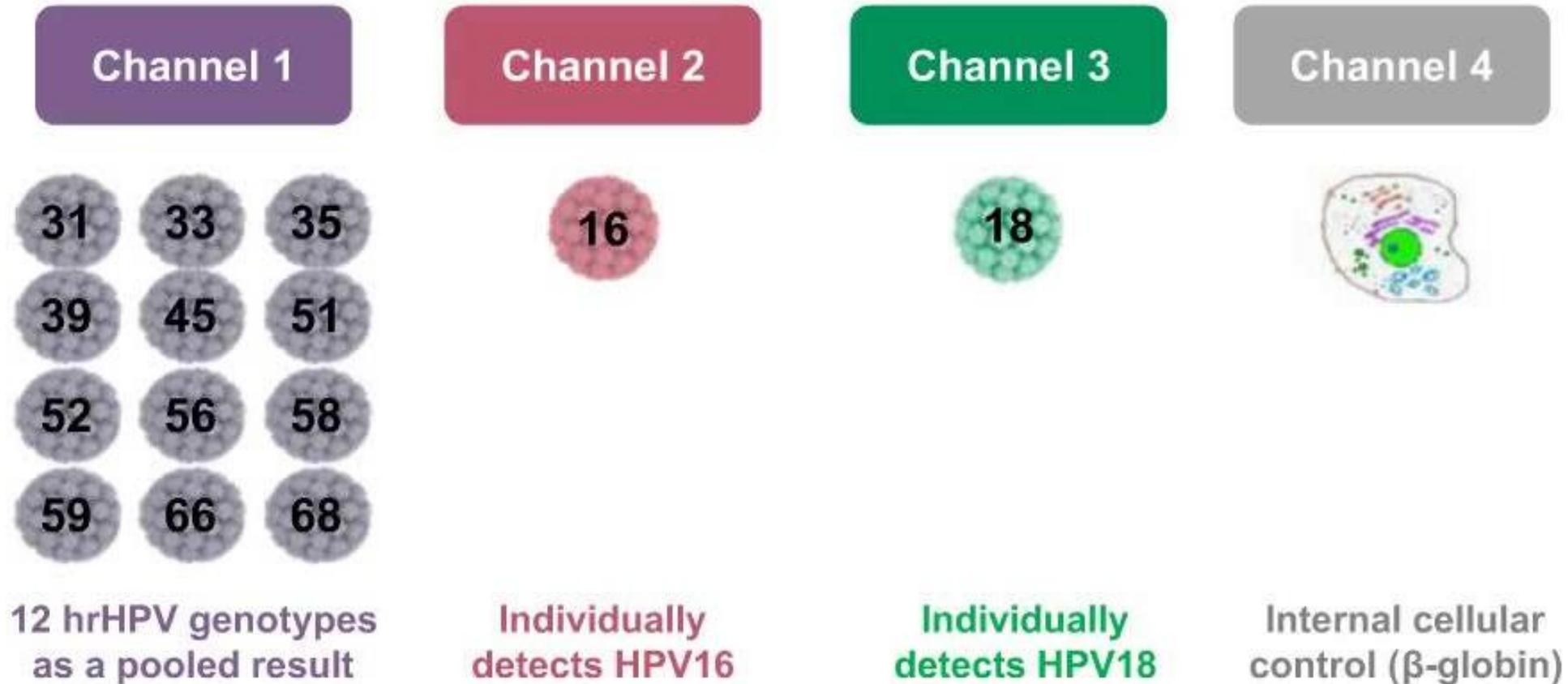
¿ De que esta compuesto el Error Total?



Control de Calidad:



Controles de Calidad – Control de muestra:



Validación Técnica:

El **control interno** debe haber amplificado.

El **control positivo** debe haber amplificado. Su desempeño se debe ajustar a los parámetros establecidos.

El **control negativo** no debe presentar amplificación.



Validación Clínica:

En este punto vuelven a ser importantes los aspectos Pre-analíticos, la información aportada por el medico en la orden es fundamental para la validación clínica.

Es necesario conocer el estado fisiológico del paciente, sexo, edad, medicación y adherencia a la misma y el diagnostico. Además de útil contar con los test realizados sobre la misma muestra (ej: serología, citogenética, etc.).

El resultado obtenido debe concordar el estado del paciente al momento del realizar el estudio y para eso es necesario cruzar toda la información disponible.

En caso de no tener información previa se deben realizar test reflejos para confirmar la validez de nuestro resultado.

La validación clínica es el paso mas importante en la generación de resultados, ya que engloba los aspectos pre-analíticos y analíticos, establecer criterios y el uso de test reflejos para la misma es indispensable para conseguir buenas practicas en el laboratorio de análisis clínicos.

Modelo de informe:

El modelo de informe debe tener las siguientes características:

- a. Test realizado:
- b. Tipo de muestra:
- c. Resultado:
- d. Observaciones:

Se debe dar información sobre el método utilizado para la obtención del resultado, y de ser necesario una aclaración de que los resultados obtenidos deben ser interpretados en función del estado fisiológico del paciente.

Ej: Tamizaje de HPV:

- a. Tipo de muestra: (Hisopo, cepillo, semen)
- b. HPV 16: (Detectable / No Detectable)
- c. HPV 18: (Detectable / No Detectable)
- d. Otros genotipos de alto riesgo: (Detectable / No Detectable)
- e. Observaciones:

Modelo de informe:

Detección cualitativa del ADN del virus del papiloma humano.

El estudio es realizado por medio de la plataforma Cobas 4800 (Roche) – Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Se amplifica la región L1 del genoma de HPV.

El ensayo detecta los siguientes genotipos (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 66)

Aclaración: “Otros genotipos de alto riesgo” implica la detección de uno o mas de los siguientes genotipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 66.

Nota: Los resultados obtenidos en este estudio deben interpretarse en conjunto con la información clinico-ginecologica, histológica, anatomopatológica y colposcópica del paciente.

Interpretación del resultado:

BRCA 1 y BCRA 2:

Descripción genética:

En la paciente indicada se ha realizado un estudio molecular para el análisis de pequeñas deleciones/inserciones y mutaciones puntuales en la región codificante y los sitios de splicing (10 pb intrónicas flanqueantes) del gen *BRCA1* y del gen *BRCA2* mediante secuenciación masiva o NGS (Next Generation Sequencing).

Metodología:

- 1- Amplificación mediante PCR de los exones codificantes, así como de las regiones intrónicas flanqueantes tanto del gen *BRCA1* como del gen *BRCA2*.
- 2- Preparación de librerías.
- 3- Secuenciación de las librerías.
- 4- Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.

Resultados:

En las siguientes tablas se resumen los cambios detectados, con una cobertura mayor a 100x, en todas las regiones analizadas de los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Todos los cambios identificados han sido contrastados con distintas bases de datos internacionales (BIC, NCBI, LOVD, HGMD):

Interpretación del resultado:

Gen	Cambio Detectado*			Referencia	Frecuencia de heterocigotos
	Condición	RefSeq	Proteína		
MIM*113705		NM_007294.2	NP_009225.1		
BRCA1	Homocigosis	c.2082C>T	p.Ser694Ser	rs1799949	39,90%
	Homocigosis	c.2311T>C	p.Leu771Leu	rs16940	43,30%
	Homocigosis	c.2612C>T	p.Pro871Leu	rs799917	45-45,8%
	Homocigosis	c.3113A>G	p.Glu1038Gly	rs16941	43,3-45%
	Homocigosis	c.3548A>G	p.Lys1183Arg	rs16942	41,10%
	Homocigosis	c.4308T>C	p.Ser1436Ser	rs1060915	39,60%
	Homocigosis	c.4837A>T	p.Ser1613Cys	rs1799966	43,30%

Gen	Cambio Detectado*			Referencia	Frecuencia de heterocigotos
	Condición	RefSeq	Proteína		
MIM*600185		NM_000059.3	NP_000050.2		
BRCA2	Heterocigosis	c.865A>C	p.Asn289Asp	rs766173	10,90%
	Heterocigosis	c.1365A>G	p.Ser455Ser	rs1801439	11,10%
	Heterocigosis	c.2229T>C	p.His743His	rs1801499	5,80%
	Heterocigosis	c.2971A>G	p.Asn991Asp	rs1799944	6,20%
	Heterocigosis	c.3396A>G	p.Lys1132Lys	rs1801406	33,30%
	Homocigosis	c.4563A>G	p.Leu1521Leu	rs206075	2,60%
	Homocigosis	c.6513G>C	p.Val2171Val	rs206076	5,30%
	Heterocigosis	c.7242A>G	p.Ser2414Ser	rs1799955	38,80%

Interpretación:

Mediante el análisis directo de los genes BRCA1 y BRCA2, en la paciente indicada, no se ha detectado ningún cambio claramente patogénico asociado con la susceptibilidad al cáncer.

El cambio **c.2971A>G (p.Asn991Asp)** en el gen **BRCA2**, cuya frecuencia de heterocigotos ha sido descrita, es considerada variante sin importancia clínica (BIC).

El resto de los cambios detectados son sinónimos (no producen un cambio en la proteína) y/o han sido descritos en un porcentaje considerable en población control, por lo que se podrían considerar cambios polimórficos sin ningún significado clínico, aunque esto queda abierto a nuevas investigaciones sobre la susceptibilidad al cáncer.

Interpretación del resultado:

Conclusión:

La paciente **no es portadora de cambios, ni en la secuencia analizada del gen BRCA1 ni en la secuencia analizada del gen BRCA2**, que estén claramente asociados con la susceptibilidad al cáncer.

Este resultado no permite confirmar ni descartar que exista una predisposición familiar al cáncer de mama.

Recomendaciones:

Este estudio no permite detectar grandes deleciones ni duplicaciones (5-10% de las mutaciones en BRCA1 y un porcentaje algo menor en BRCA2), por lo que se recomienda su análisis mediante MLPA, en la paciente arriba indicada

Los resultados del presente estudio han de ser evaluados teniendo en cuenta la clínica de la paciente.

La paciente debe recibir consejo genético en una consulta especializada.



Muchas gracias.....