

Curso

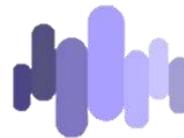
# Biología molecular aplicada al diagnóstico médico

2021

# Clase:

## Nociones básicas de Biología Molecular y aplicaciones en el diagnóstico clínico

Círculo Médico de Rosario | Fecha: 05/10/21

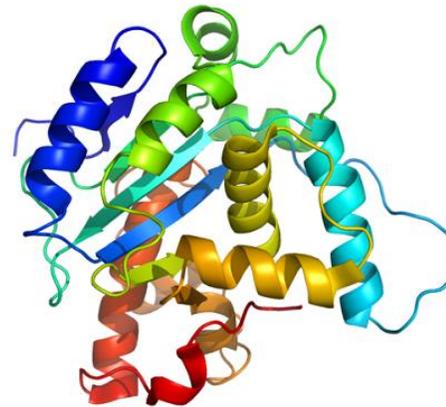


**Lic. Alan Gomez**  
Especialista en Biología Molecular  
agomez@cibic.com.ar

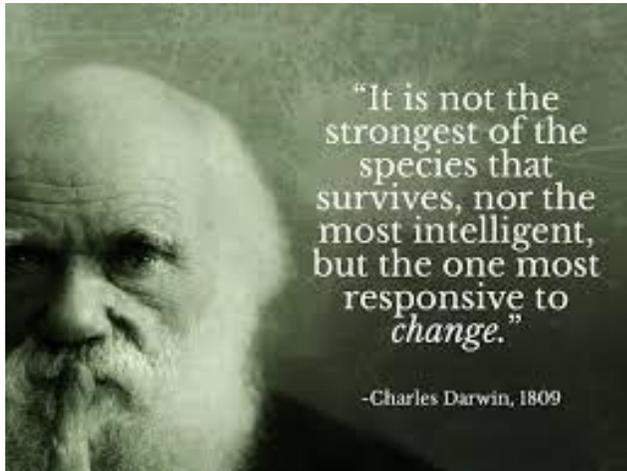
# ¿Qué es la Biología Molecular?



La **biología molecular** es el campo de la biología que estudia la composición, estructura e interacciones de las moléculas, como los **ácidos nucleicos (ADN, ARN)** y las **proteínas**, que llevan a cabo los procesos biológicos esenciales para las funciones y el mantenimiento de la célula.



# Hitos de la Biología Molecular



**1859**  
**Charles Darwin**  
"Origin of Species"



**1859**  
**George Mendel**  
Leyes Mendelianas  
de la Herencia



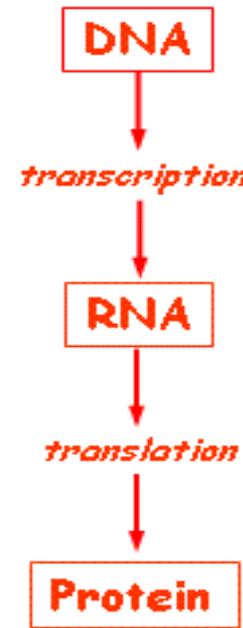
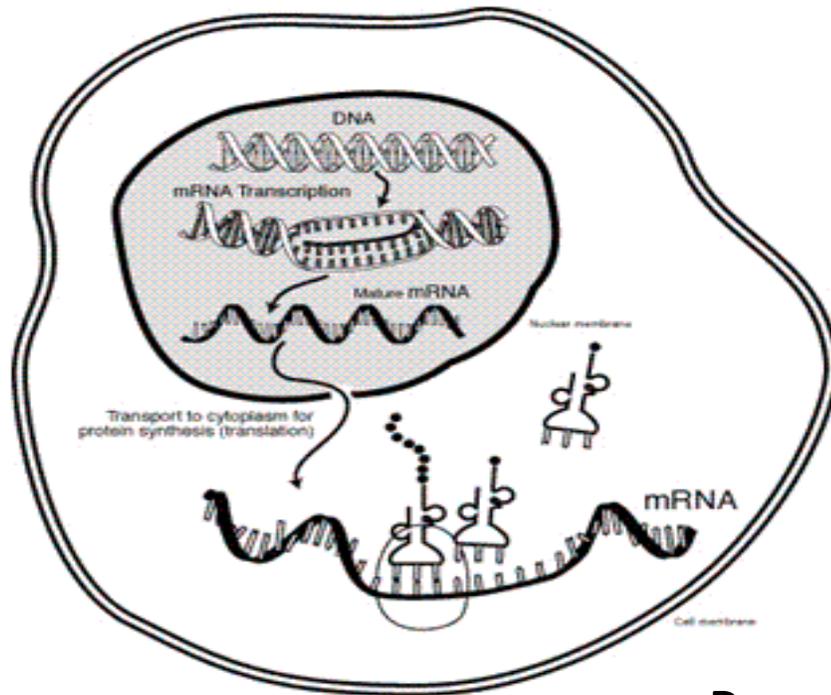
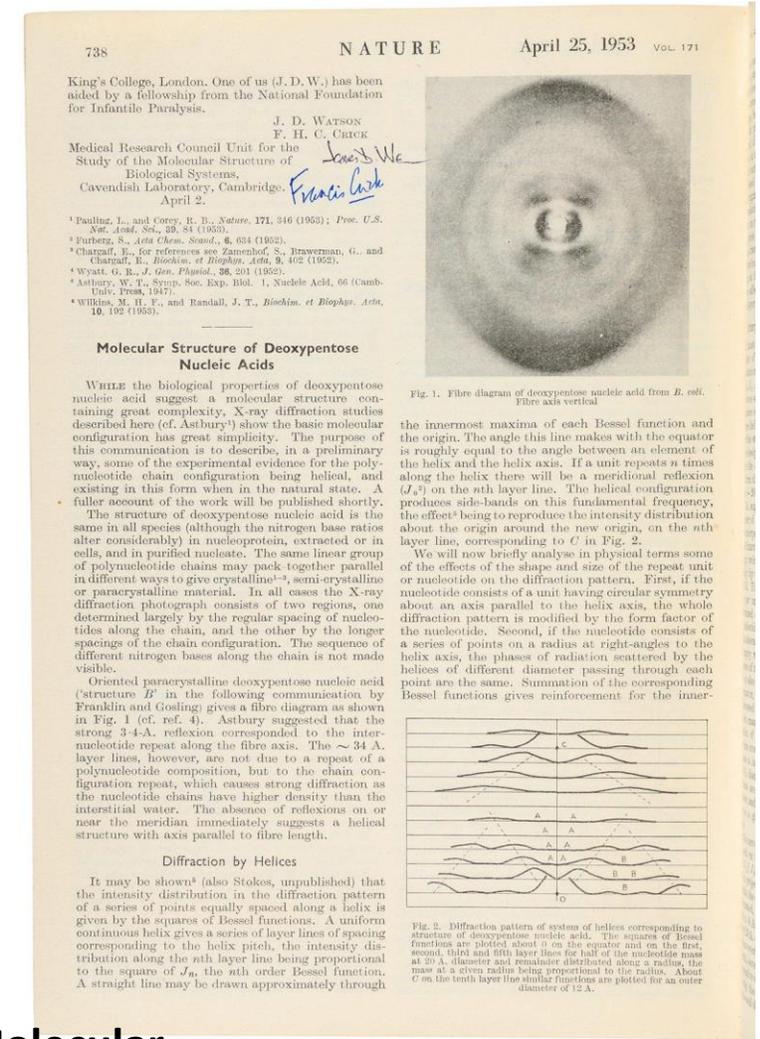
**1871**  
**Miescher**  
Descubrimiento del ADN  
("nucleína")

# Hitos de la Biología Molecular



Francis Crick    James Watson    Maurice Wilkins    Rosalind Franklin

1953



Dogma central de la Biología Molecular

# Estructura del ADN

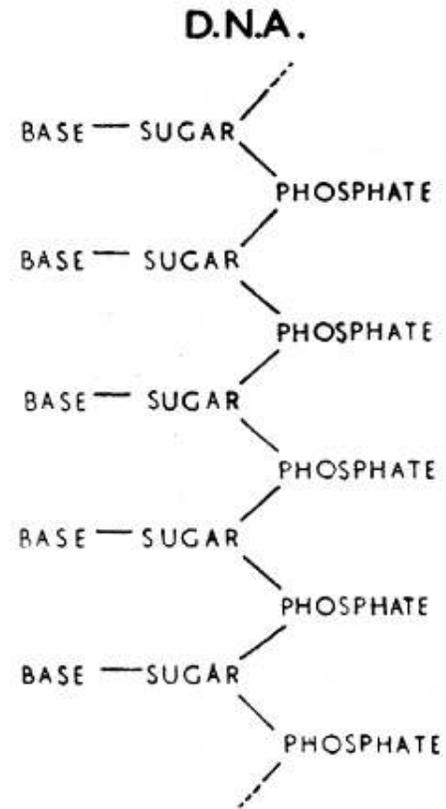


Fig. 1. Chemical formula of a single chain of deoxyribonucleic acid

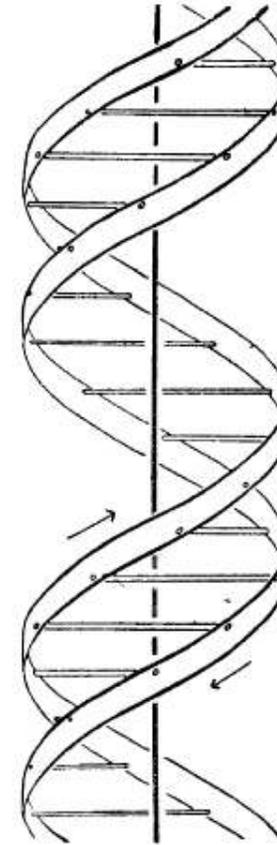
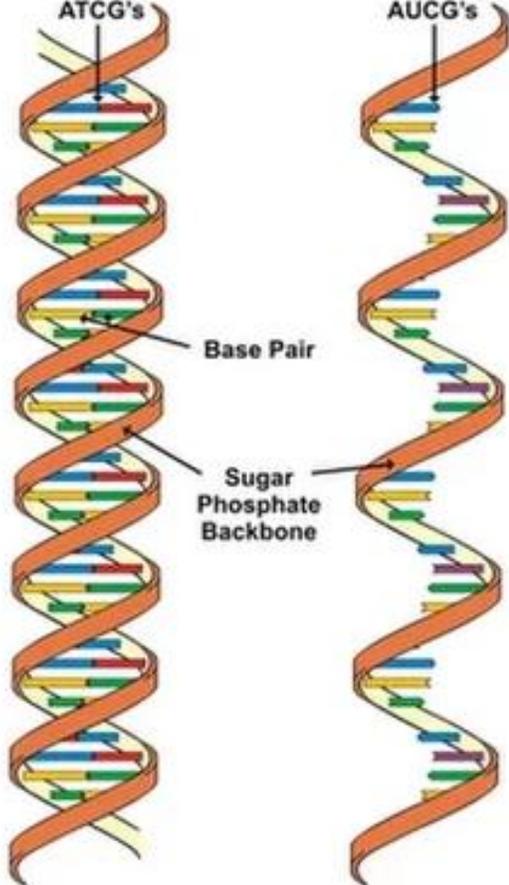


Fig. 2. This figure is purely diagrammatic. The two ribbons symbolize the two phosphate-sugar chains, and the horizontal rods the pairs of bases holding the chains together. The vertical line marks the fibre axis

# Estructura del ADN/ARN

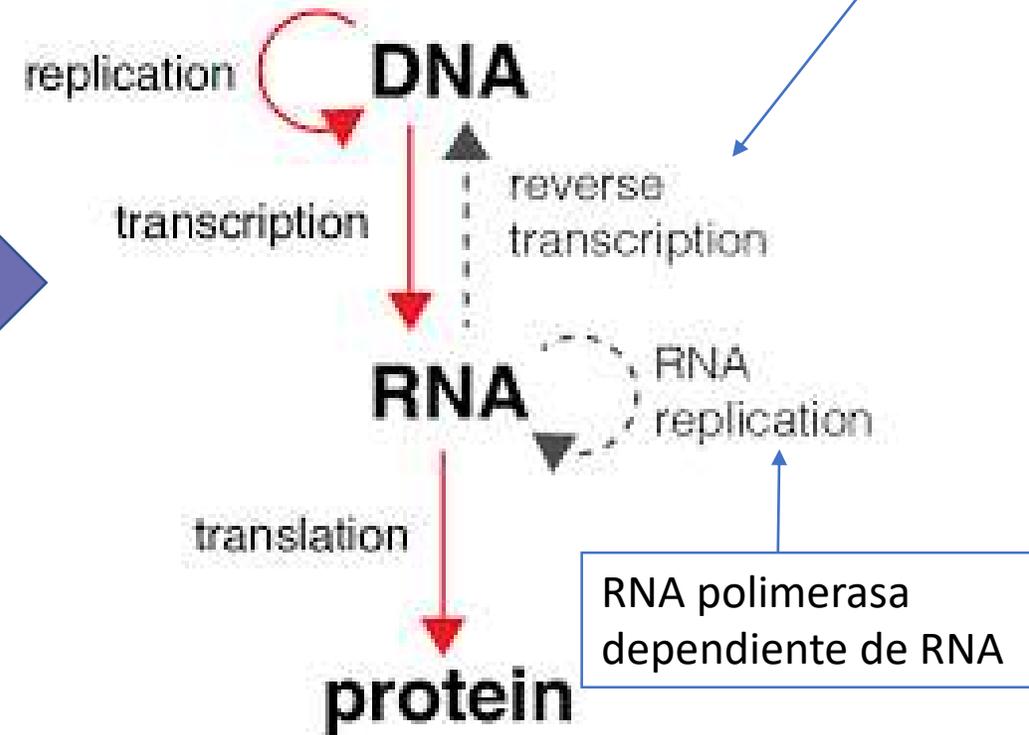
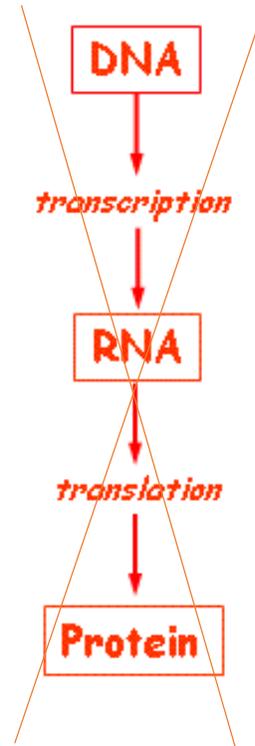
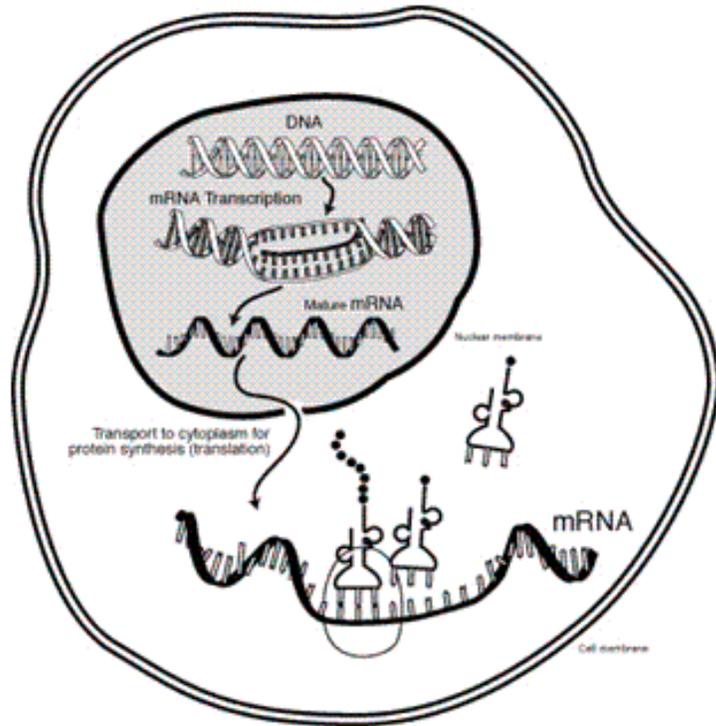


 <b>Cytosine</b> <chem>NC1=NC(=O)NC=C1</chem>	 <p><b>DNA</b> Deoxyribonucleic Acid</p>	 <b>AUCG's</b>	 <b>Cytosine</b> <chem>NC1=NC(=O)NC=C1</chem>	
 <b>Guanine</b> <chem>O=C1NC2=C(N1)N=CN=C2</chem>			 <b>Guanine</b> <chem>O=C1NC2=C(N1)N=CN=C2</chem>	
 <b>Adenine</b> <chem>NC1=NC=NC2=C1N=CN2</chem>			 <b>Adenine</b> <chem>NC1=NC=NC2=C1N=CN2</chem>	
 <b>Thymine</b> <chem>CC1=CNC(=O)NC1=O</chem>				 <b>Uracil</b> <chem>O=C1NC=CC(=O)N1</chem> <p>Replaces Thymine in RNA</p>
<p>Nitrogenous Bases</p>			<p><b>RNA</b> Ribonucleic Acid</p>	<p>Nitrogenous Bases</p>

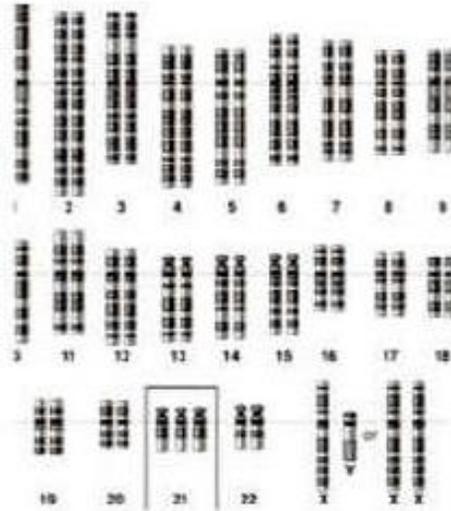
# Dogma central de la Biología Molecular



Baltimore,  
Dulbecco y Temin



# Hitos de la Biología Molecular



1959

**Jerome Lejeune**  
Síndrome de Down

1983-85

**Kary Mullis**  
PCR

Polimerase chain reaction

1990

**Proyecto Genoma Humano**

1996

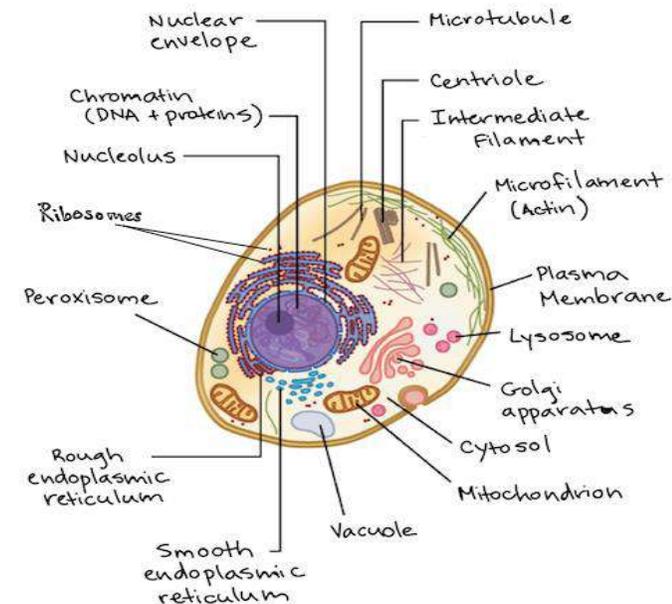
**Clonación (Dolly)**

# Células e información



Las células archivan información en el ADN, el cual sirve como un conjunto maestro de instrucciones para construir proteínas.

**Funciones de las proteínas:** biosíntesis de organelas, soportes estructurales, catalizadores de reacciones bioquímicas y ayuda en los entornos / señalización internos y externos de la célula.



# Empaquetamiento del ADN



El **genoma humano haploide** contiene aproximadamente **3 mil millones** de pares de bases (pb) de ADN empaquetados en 23 cromosomas.

La mayoría de las células del cuerpo son **diploides**, con 23 pares de cromosomas → **6 mil millones** de pb de ADN por célula.

Cada pb mide alrededor de **0,34 nanómetros** de largo, cada célula diploide contiene unos **2 metros de ADN**.

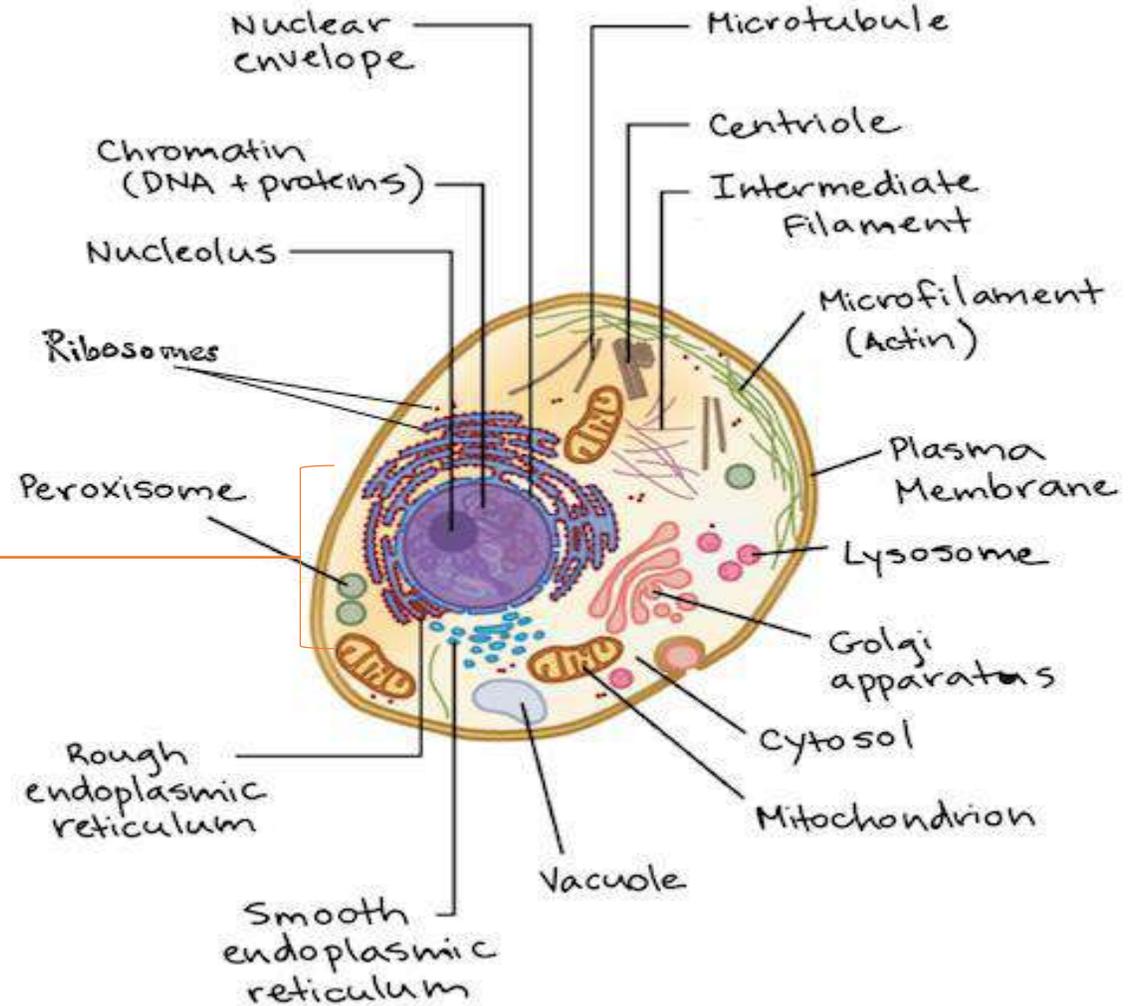
Se estima que el cuerpo humano contiene alrededor de **50 billones de células**, lo que equivale a **100 billones de metros** de ADN por humano → ir de la tierra al Sol y regresar **más de 300 veces**, o alrededor del ecuador de la Tierra **2,5 millones de veces**.

# Empaquetamiento del ADN



¿Cómo es posible que semejante cantidad de información esté contenida dentro del núcleo celular?

~10  $\mu\text{m}$  de diametro



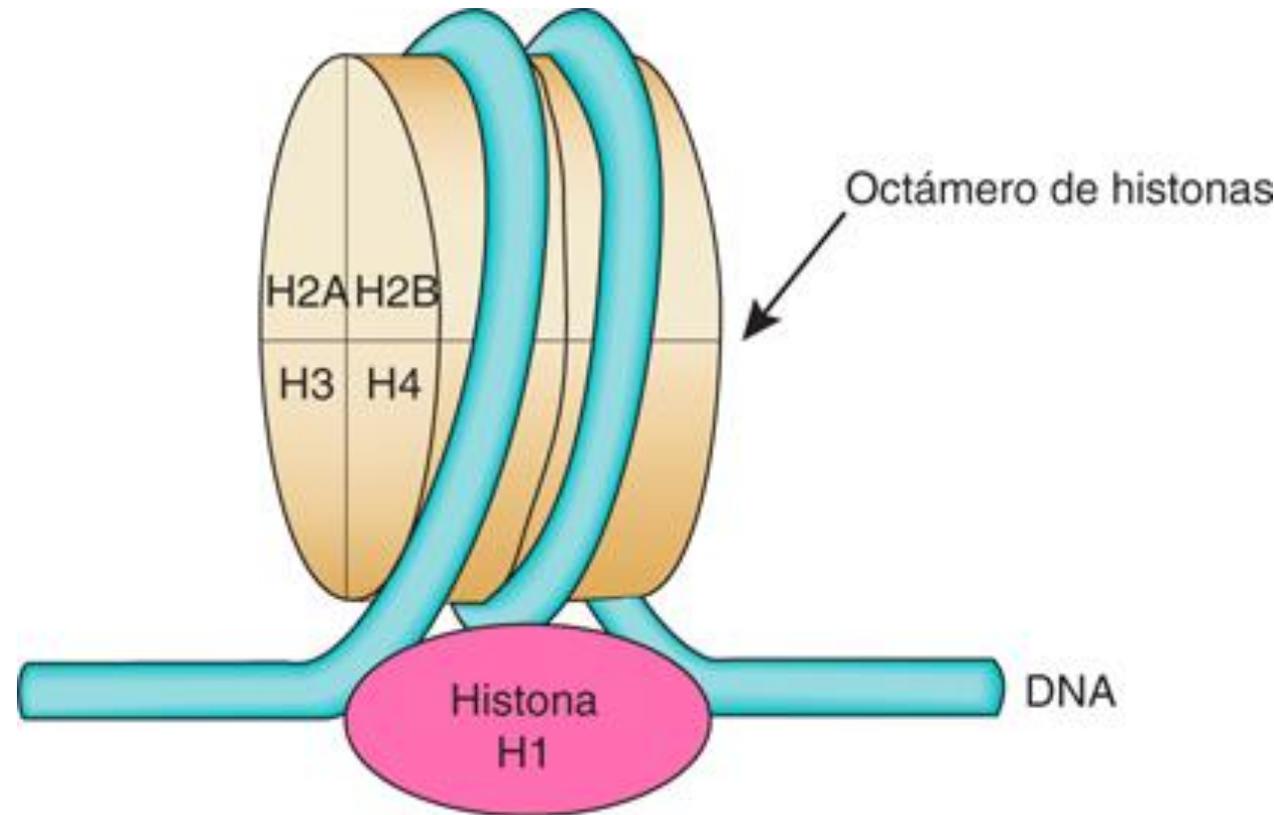
# Empaquetamiento del ADN: Histonas y Cromatina



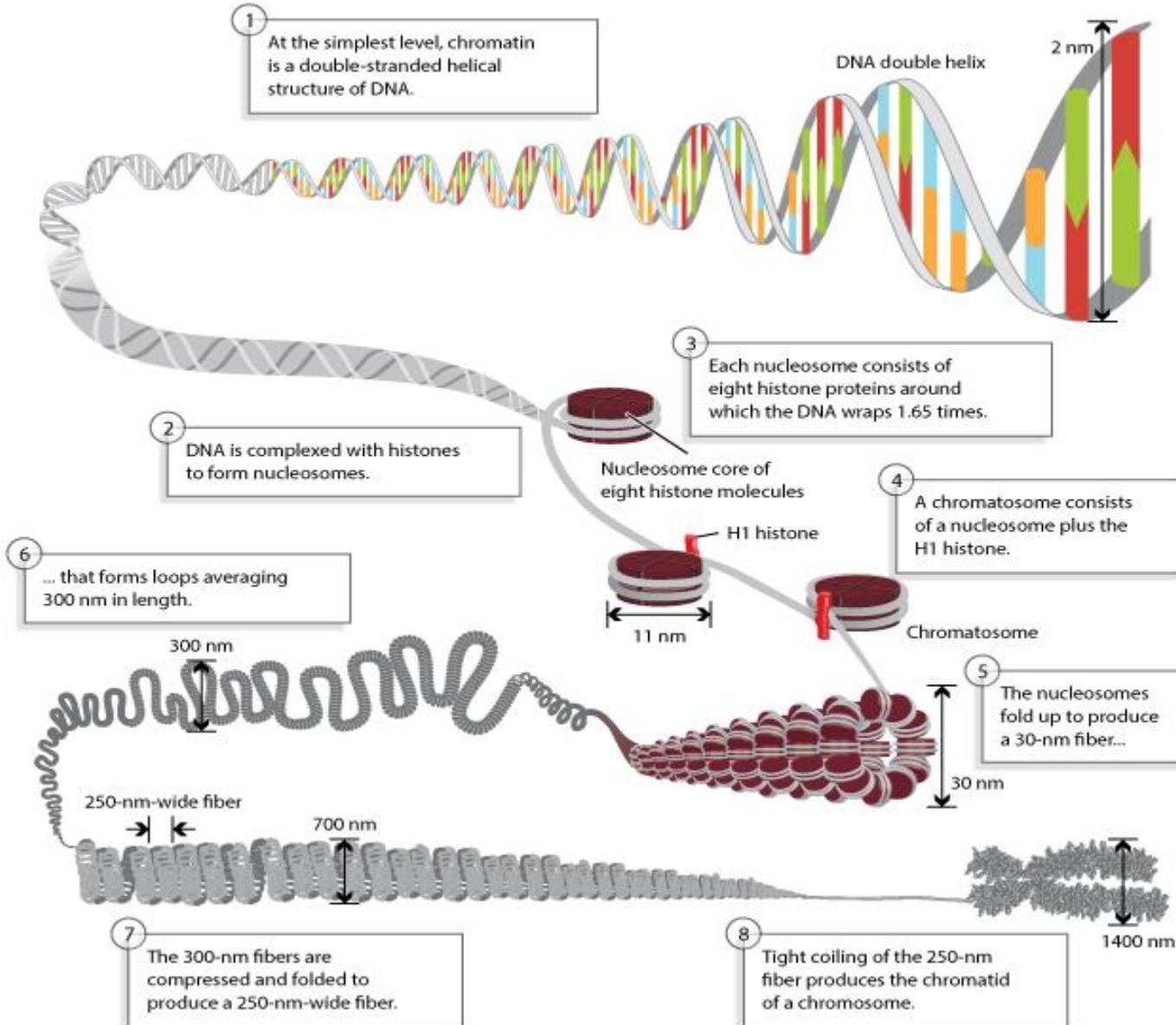
Proteínas llamadas **histonas** se unen al ADN formando un complejo ADN-proteína llamado **cromatina**.

Las histonas son una familia de proteínas pequeñas **cargadas positivamente** denominadas **H1, H2A, H2B, H3 y H4**.

El ADN está **cargado negativamente**, debido a los grupos fosfato en su esqueleto fosfato-azúcar, por lo que las histonas se unen con el ADN de manera muy estrecha.

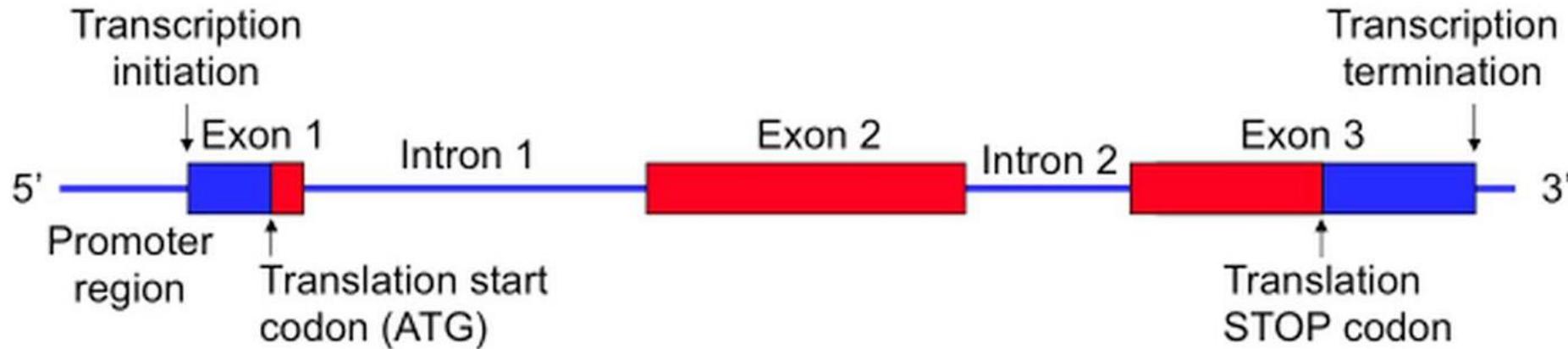


# Empaquetamiento del ADN: Histonas y Cromatina



- 1 - La cromatina es una estructura helicoidal de doble hebra del ADN + proteínas .
- 2 - ADN + histonas → **nucleosomas**.
- 3 – **nucleosoma**: ocho proteínas histonas alrededor de las cuales el ADN se envuelve 1,65 veces.
- 4 – **cromatosoma**: consta de un **nucleosoma** + **histona H1**.
- 5 – 6 - el nucleosoma se pliega para producir una **fibra de 30 nm** → forma bucles con un promedio de **300 nm de longitud**.
- 7 - estas se comprimen y pliegan para producir una **fibra de 250 nm de ancho**.
- 8 - el enrollamiento apretado de la fibra de 250 nm produce la **cromátida** del cromosoma.

# Estructura de un gen Eucariota

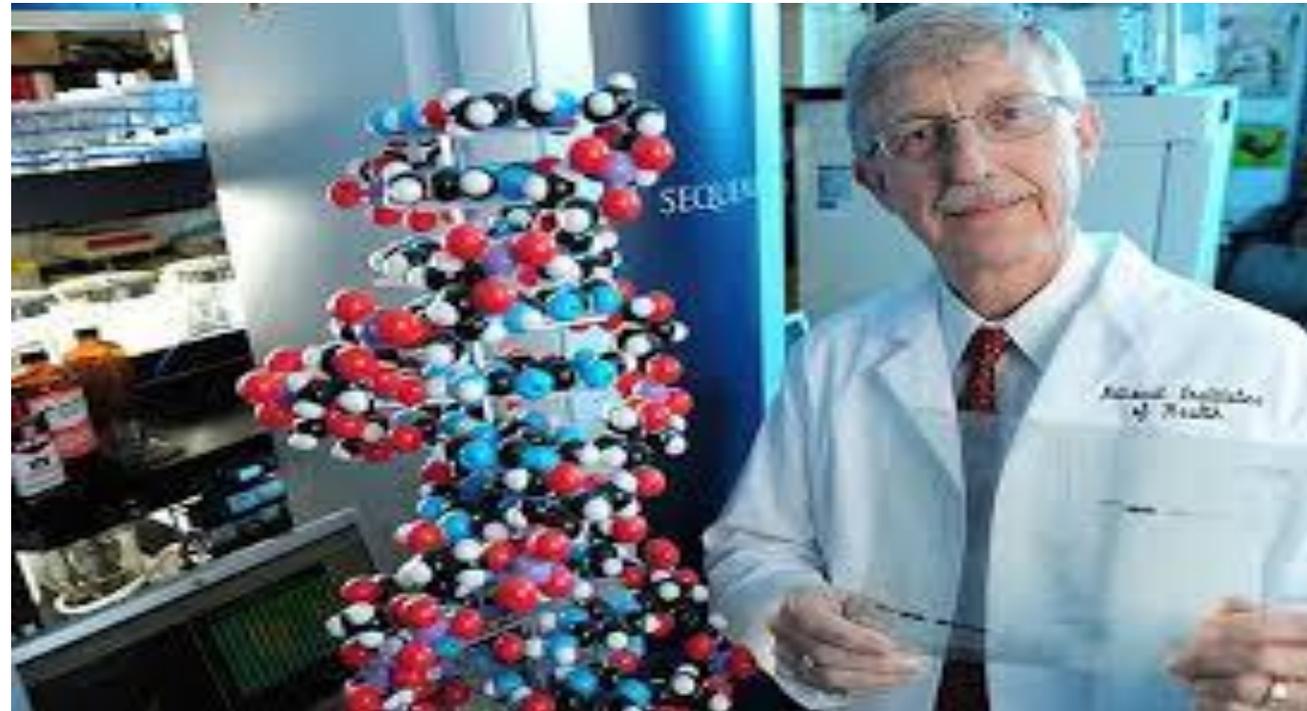


- Es un segmento de ADN que contiene el código para generar una proteína específica que realiza una función, también específica, en uno o más tipos de células.
- Es la unidad física básica de la herencia.

## Hitos de la Biología Molecular: Proyecto Genoma Humano (1990 – 2003)



“Adquirir la **información** fundamental sobre nuestro material genético para profundizar en el conocimiento de la genética humana y el *papel de los distintos genes en la salud y la enfermedad*”



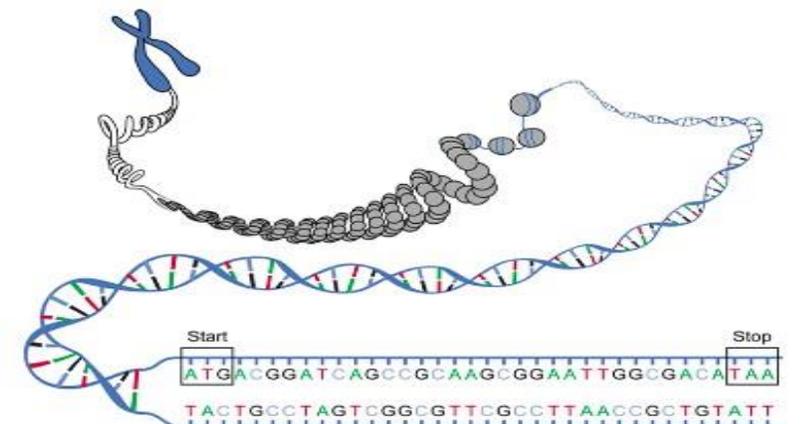
*Francis Collins*  
Director Human Genome Project

# Proyecto Genoma Humano (1990 – 2003)



## OBJETIVOS

- Identificación de  $\approx 30.000$  genes
- Determinar la secuencia de ADN
- Generación de Bases de Datos públicas
- Mejorar herramientas para análisis de datos
- Transferencia de tecnología asociada al sector privado
- Redefinir principios éticos, legales y sociales



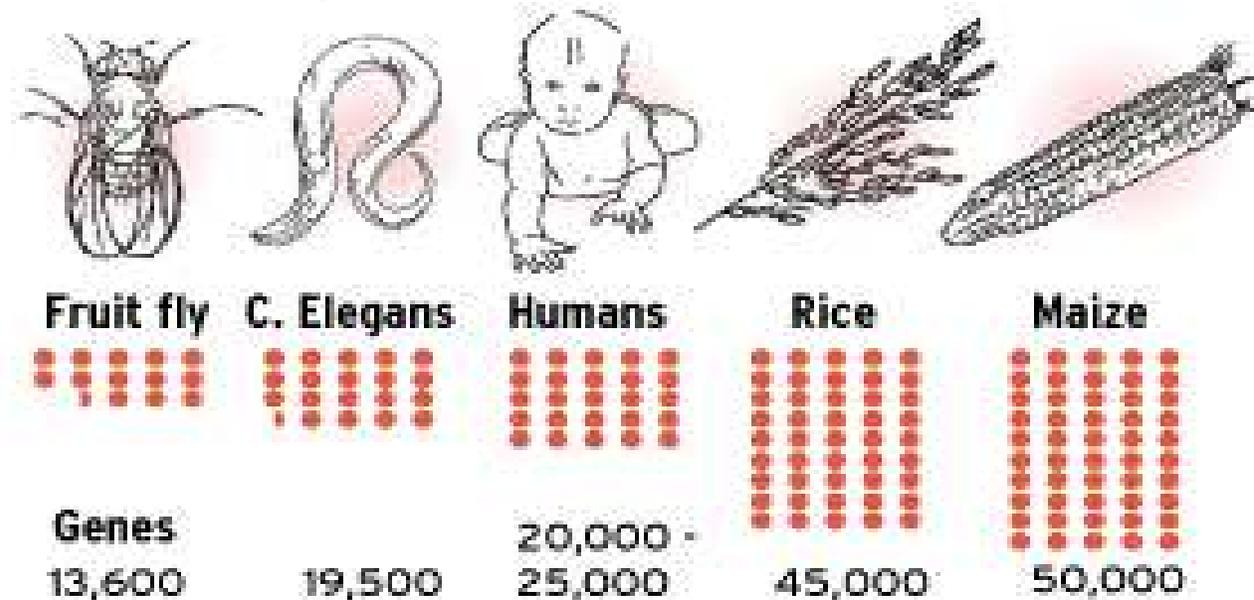
# Proyecto Genoma Humano (1990 – 2003)

## HALLAZGOS



### Humans have fewer genes

In Thursday's issue of the journal *Nature*, researchers who decoded the human genome concluded that people have only 20,000 to 25,000 genes, a drop from the 30,000 to 40,000 estimated in 2001.



SOURCE: *Nature*

AP

# Proyecto Genoma Humano (1990 – 2003)

## HALLAZGOS

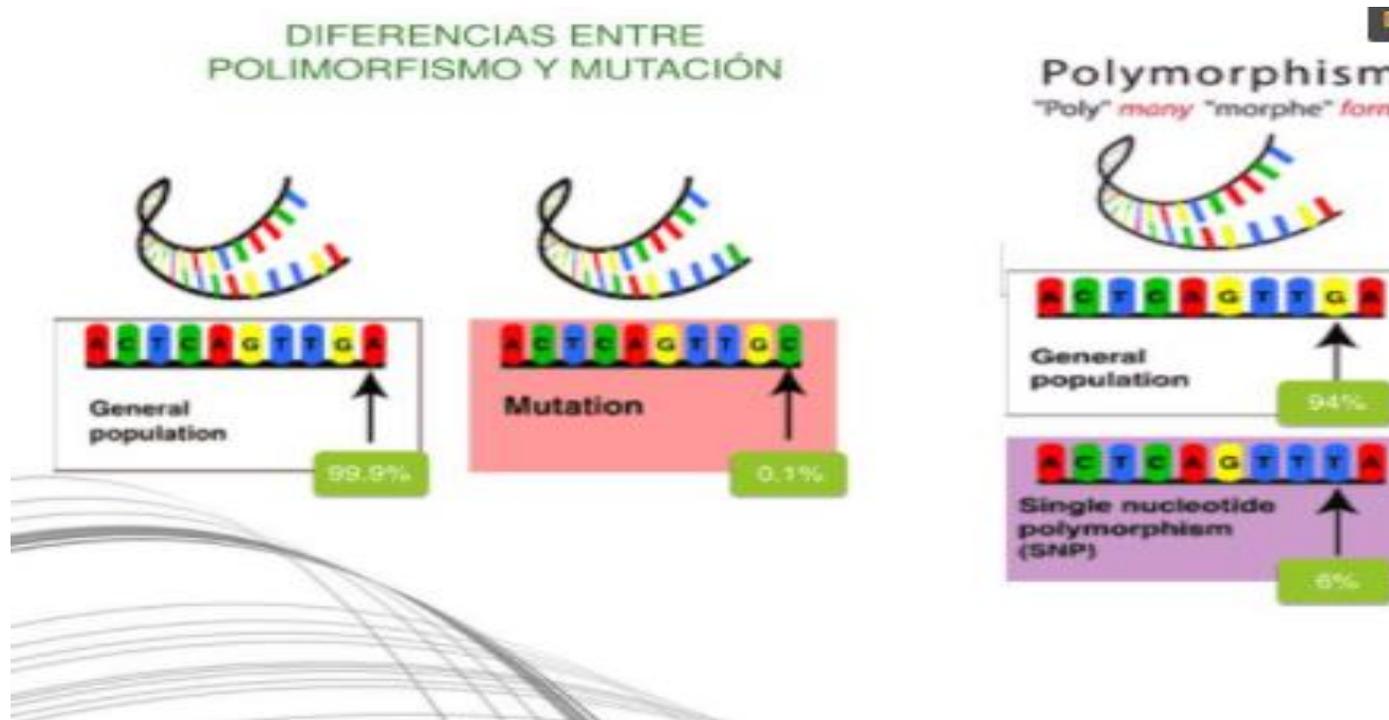
- DNA: 3 billones de pb
- Entre 20,000-25,000 genes (50% con función desconocida)
- 98-99% del genoma es no-codificante
- 99,9% idéntico entre individuos
- Compartimos el 99,9% de nuestra secuencia génica con nuestros congéneres, y más del 99% con otras especies
- Se estiman alrededor de  $10 \times 10^6$  SNPs  
Single Nucleotide Polimorphism (1 SNP c/1000 pb)



# Mutaciones vs Polimorfismos



**POLIMORFISMO:** cambio en la secuencia del ADN en donde al menos dos secuencias diferentes pueden estar presentes, cada secuencia presente en al menos 1% de la población sin asociarse en forma directa con el desarrollo de enfermedad



**MUTACION:** MAF (Minor allele frequency) < 1%

**POLIMORFISMO:** MAF >1%, existen por lo menos 2 alelos

# Mutaciones vs Polimorfismos



Los **SNP** (pronunciado "snip"), son un tipo de polimorfismo que implica la variación de un solo par de bases.

Los **SNP** constituyen hasta el 90% de todas las variaciones genómicas humanas, y aparecen en promedio, cada **1,000 pb**

*Estas variaciones en la secuencia del ADN pueden afectar la respuesta de los individuos a enfermedades hereditarias, enfermedades infecciosas y respuesta a fármacos*

**nature**  
articles

## A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms

The International SNP Map Working Group\*

\* A full list of authors appears at the end of this paper.

We describe a map of 1.42 million single nucleotide polymorphisms (SNPs) distributed throughout the human genome, providing an average density on available sequence of one SNP every 1.9 kilobases. These SNPs were primarily discovered by two projects: The SNP Consortium and the analysis of clone overlaps by the International Human Genome Sequencing Consortium. The map integrates all publicly available SNPs with described genes and other genomic features. We estimate that 60,000 SNPs fall within exon (coding and untranslated regions), and 85% of exons are within 5 kb of the nearest SNP. Nucleotide diversity varies greatly across the genome, in a manner broadly consistent with a standard population genetic model of human history. This high-density SNP map provides a public resource for defining haplotype variation across the genome, and should help to identify biomedically important genes for diagnosis and therapy.

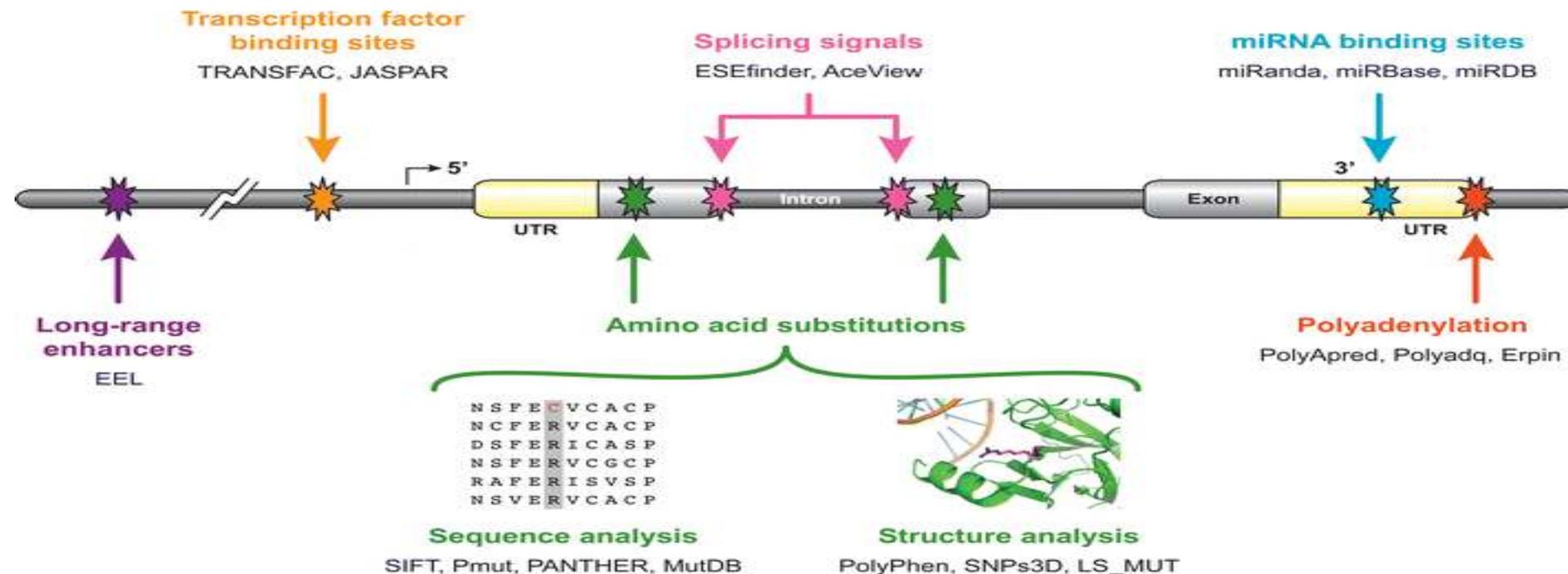
# Polimorfismos

## DEFINICIONES



**SNP codificantes:** se localizan en la secuencia codificante y pueden modificar, o no, la cadena de aminoácidos de proteínas > **Variabilidad genética poblacional**

**SNP no-codificantes:** en regiones intronicas, 5'UTR, 3'UTR, promotora. Consecuencias en el proceso de traducción (*splicing*, factores de transcripción) > **Reguladores**



# Variantes



Author Manuscript

[Genet Med.](#) Author manuscript; available in PMC 2015 Nov 1.

Published in final edited form as:

[Genet Med.](#) 2015 May; 17(5): 405–424.

Published online 2015 Mar 5. doi: [10.1038/gim.2015.30](https://doi.org/10.1038/gim.2015.30)

PMCID: PMC4544753

NIHMSID: NIHMS697486

PMID: [25741868](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25741868/)

## **Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology**

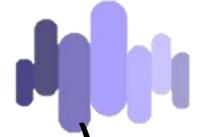
[Sue Richards](#), Chair, ACMG, [Nazneen Aziz](#), CAP, [Sherri Bale](#), ACMG, [David Bick](#), ACMG, [Soma Das](#), ACMG, [Julie Gastier-Foster](#), AMP, [Wayne W. Grody](#), ACMG, [Madhuri Hegde](#), ACMG, [Elaine Lyon](#), AMP, [Elaine Spector](#), ACMG, [Karl Voelkerding](#), CAP, and [Heidi L. Rehm](#), Co-Chair, ACMG, On behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee

▶ [Author information](#) ▶ [Copyright and License information](#) [Disclaimer](#)

“Mutaciones” y “Polimorfismos” → VARIANTES

Se han utilizado ampliamente, pero a menudo generan confusión debido a suposiciones incorrectas de efectos patógenos y benignos, respectivamente.

# Variantes



Se recomienda que ambos términos (mutaciones y polimorfismos) sean reemplazados por el término “variante” con los siguientes modificadores:

- (1)patogénica**
- (2)probablemente patogénica**
- (3)significado incierto**
- (4)probable benigna**
- (5)benigna**

Si bien estos modificadores pueden no abordar todos los fenotipos humanos, comprenden un sistema de clasificación de cinco niveles para las variantes relevantes en las enfermedades mendelianas.

# Proyecto Genoma Humano (1990 – 2003)



## HALLAZGOS

- La complejidad del genoma **no** radica en el nro. de genes, sino en la ***interacción*** entre ellos
  - ➔ Genes reguladores
  - ➔ Genes con más de una función
  - ➔ Moléculas reguladoras (ADN,ARN,mARN,siARN)
  - ➔ La mayoría de los genes son polimórficos (variabilidad genética)

*Estrategia biológica para la evolución y para la supervivencia  
(HGP 2001)*

*“It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent, but the one most responsive to change”  
(Charles Darwin, 1809)*



# REGULACIÓN GÉNICA

## Definición

La **regulación génica** es la forma en como una célula controla qué genes, de los muchos genes en su genoma, se "encienden" (expresan).

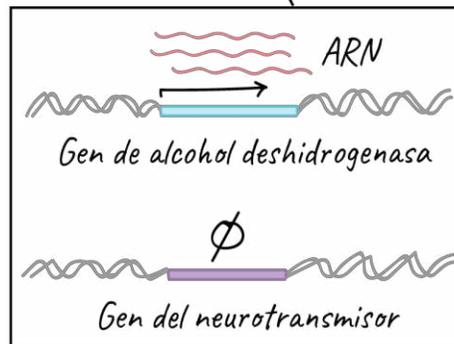
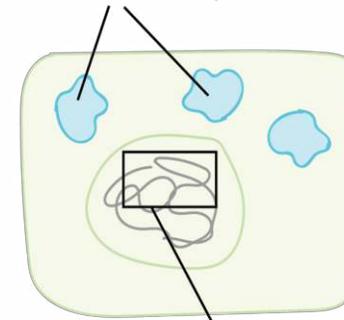
Asegura que los genes apropiados se expresen en los momentos adecuados.

Puede ayudar a un organismo a responder a su entorno.

Se logra mediante una variedad de mecanismos que incluyen la modificación química de genes y el uso de proteínas reguladoras.

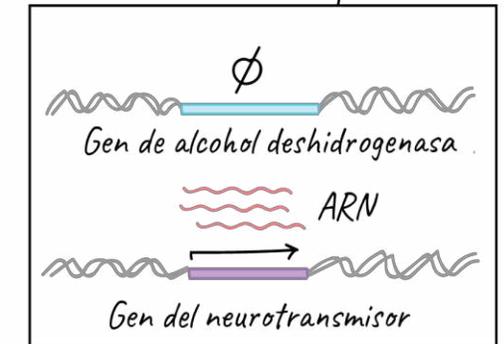
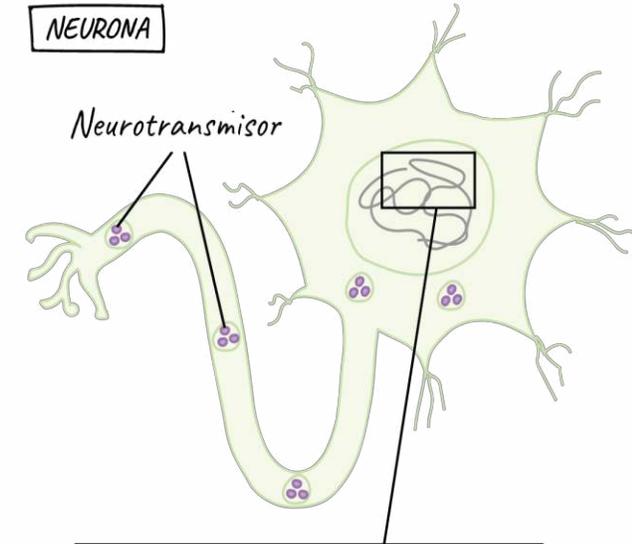
CÉLULA DEL HÍGADO

Alcohol deshidrogenasa



NEURONA

Neurotransmisor





**¿Cómo deciden las células cuales genes activar o desactivar?**

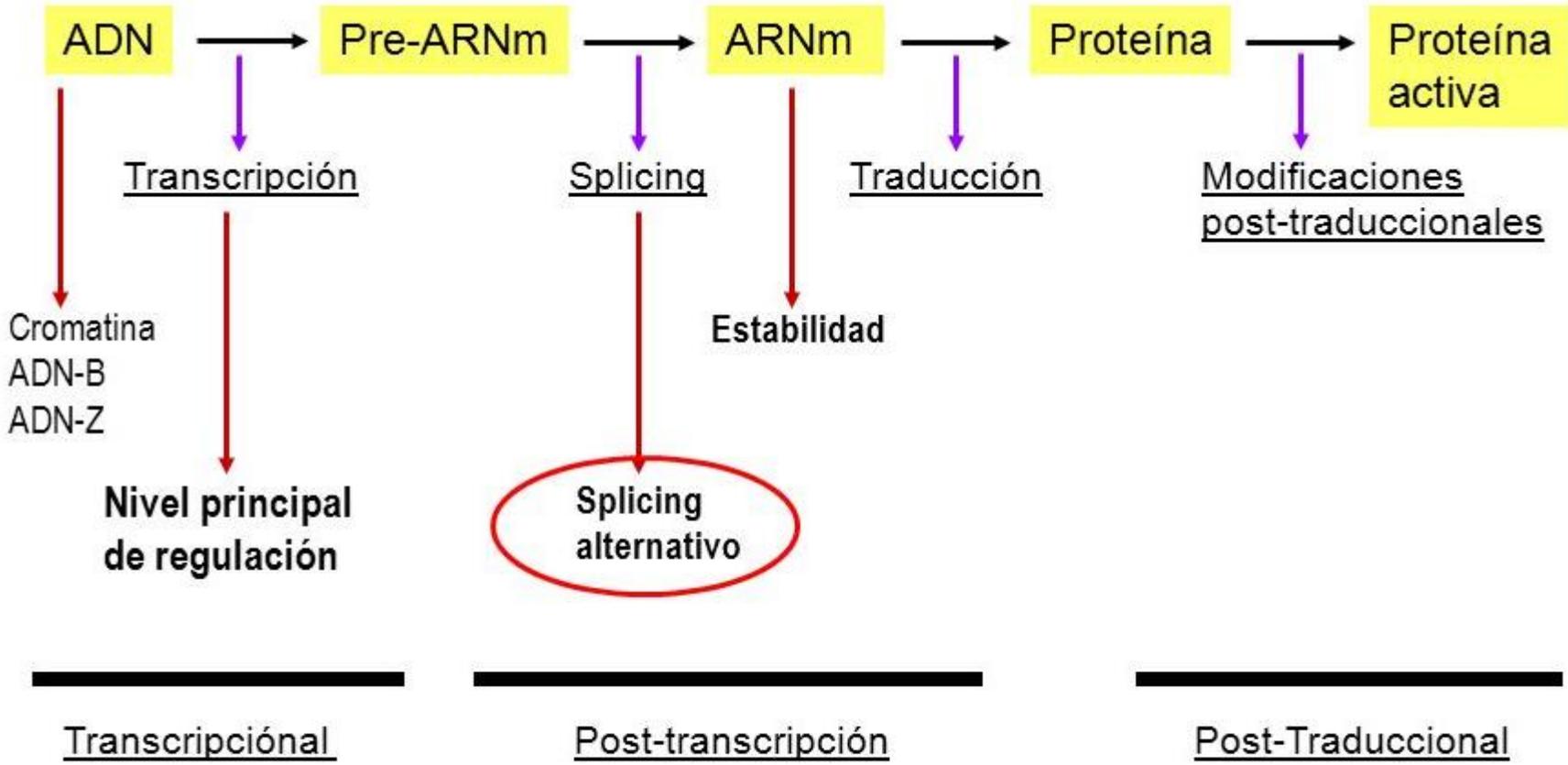


## ¿Cómo deciden las células cuales genes activar o desactivar?

- Muchos factores pueden afectar qué genes expresa una célula.
- En general, podemos decir que el patrón de la expresión génica de una célula lo determina la información tanto del interior (proteínas heredadas de su célula progenitora, cantidad de ATP, etc) como el exterior (señales químicas de otras células, señales mecánicas de la matriz extracelular y niveles de nutrientes) de la misma.

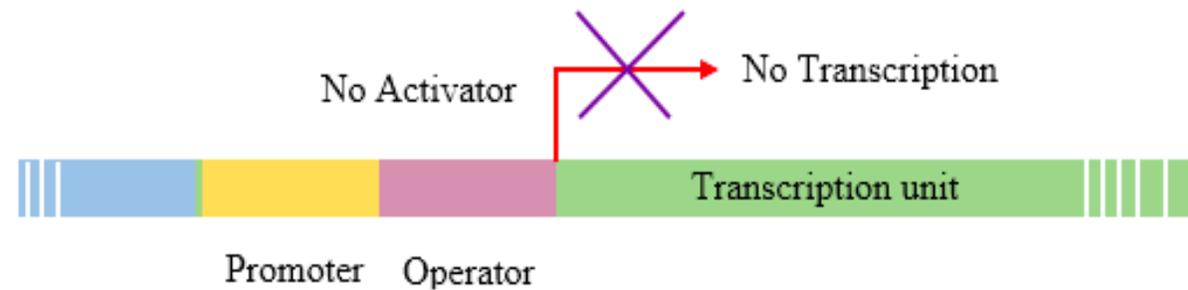
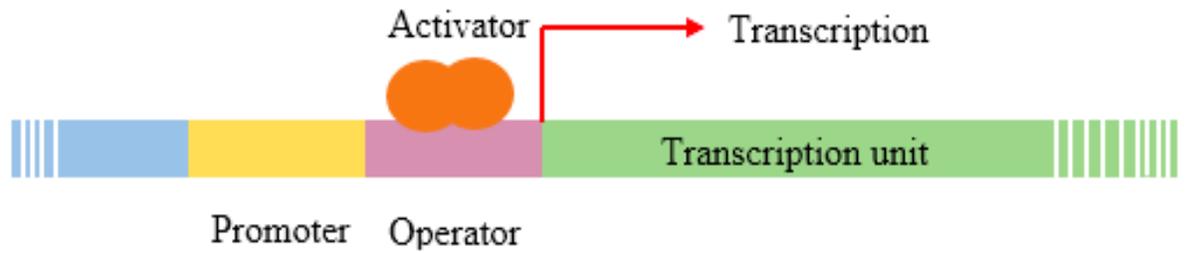
# REGULACIÓN GENICA

## Clasificación

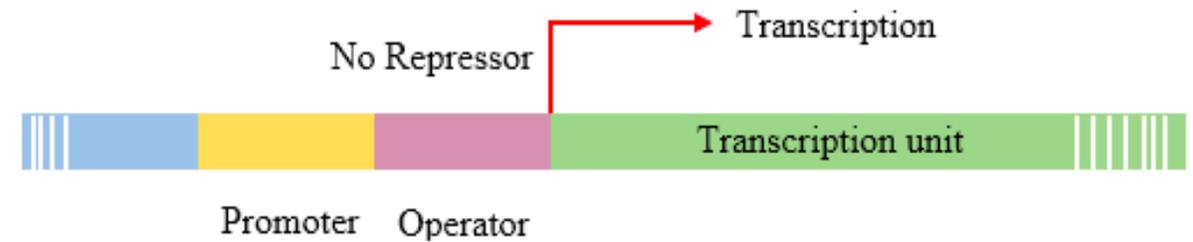
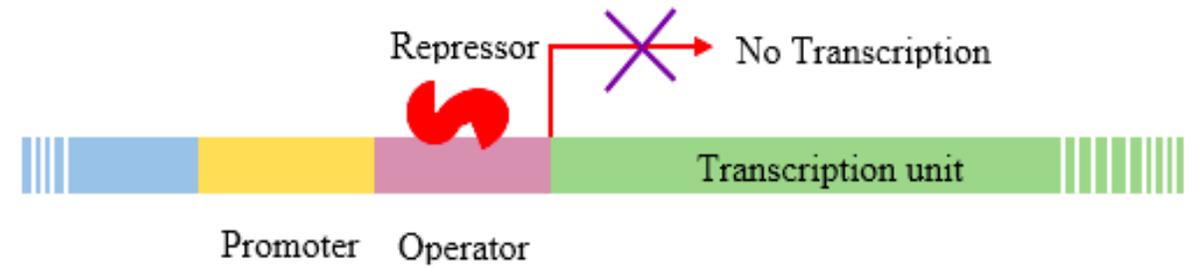


# REGULACIÓN GENICA

## Transcripcional



**REGULACIÓN POSITIVA**



**REGULACIÓN NEGATIVA**

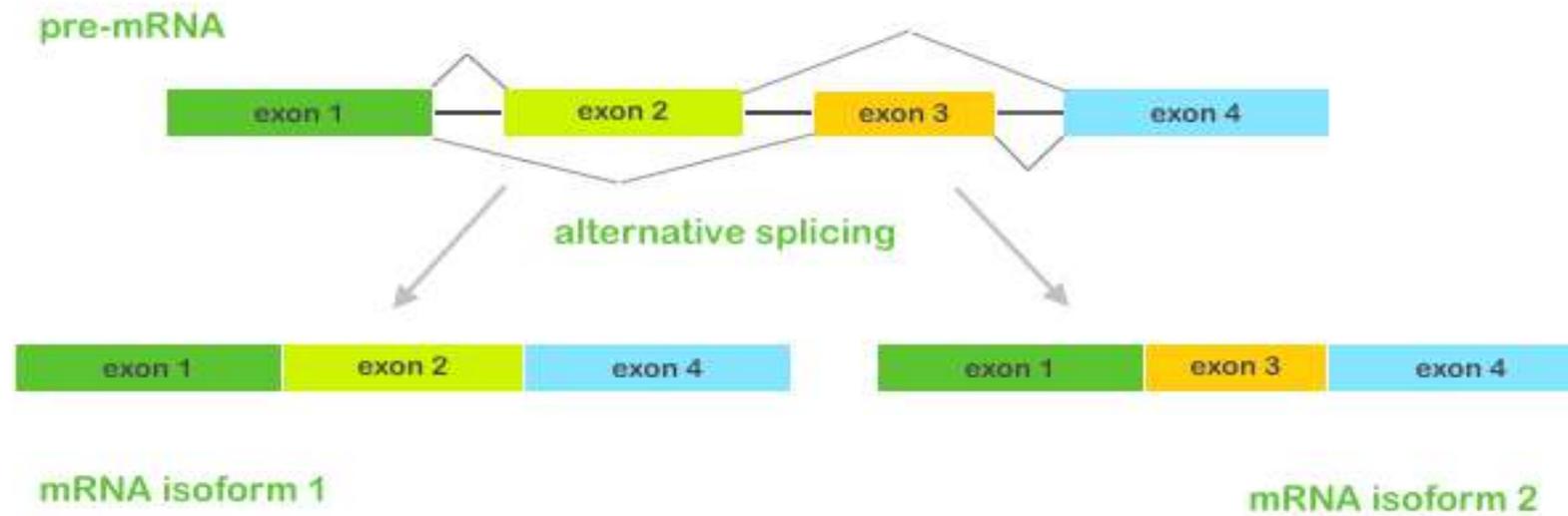
# REGULACIÓN GENICA

## Post-Transcripcional



### Splicing alternativo del RNA mensajero

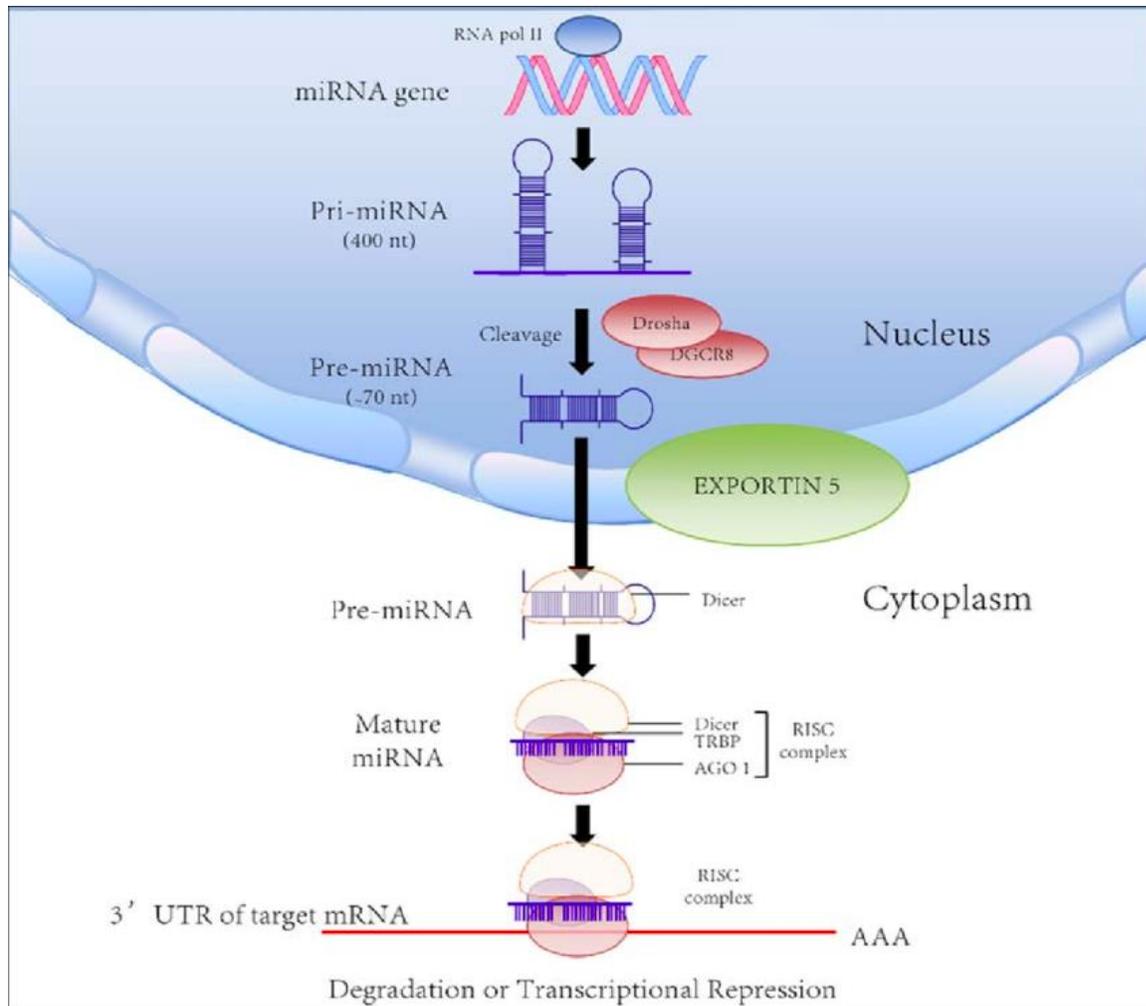
- “Sintonía fina” de la expresión genética a nivel post-trascripcional
- Variabilidad de proteínas a partir de un número finito de genes
- Expresión diferencial de proteínas



# REGULACIÓN GENICA Post-Transcripcional



## Regulación de la expresión genética mediada por microRNAs (miARNs)



- Secuencias cortas de mRNA (18-26 nt)
- Interacción en region 3'UTR
- Esenciales durante embriogénesis



# REGULACIÓN EPIGENÉTICA

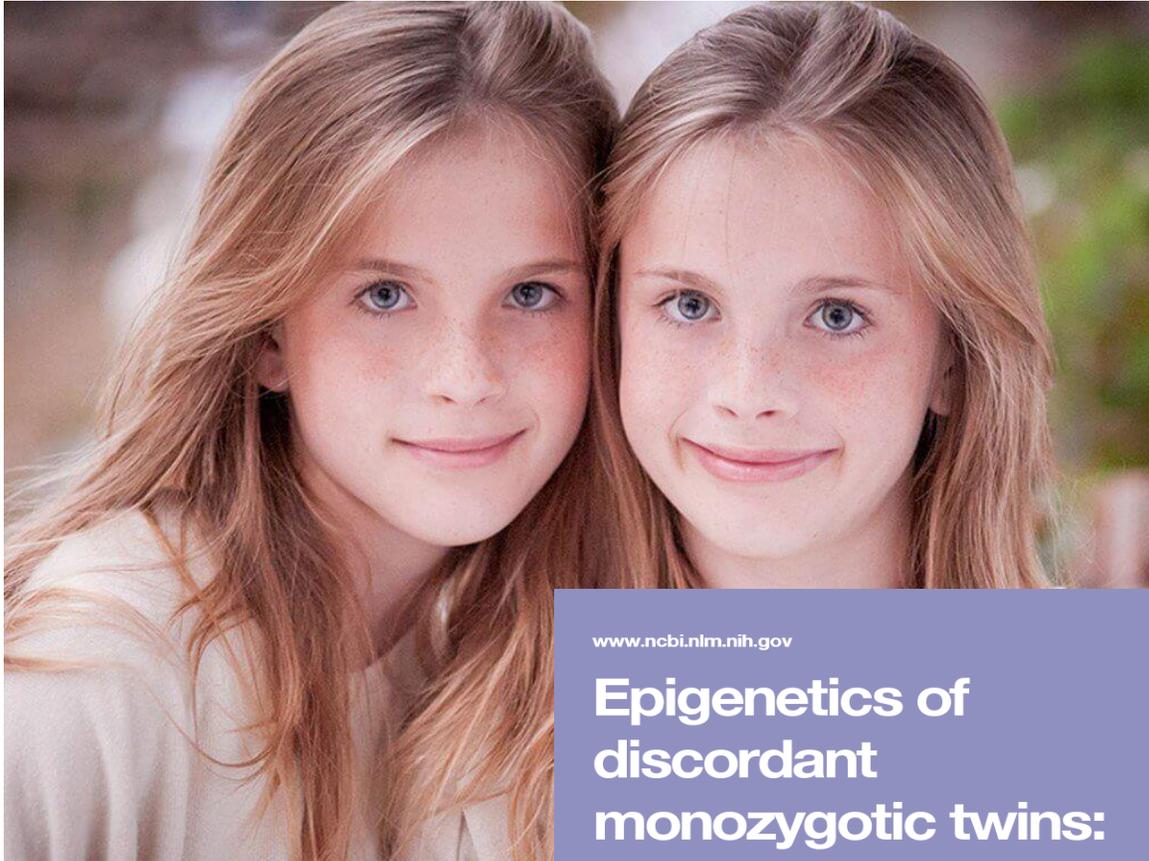
## Definición



Cambios mitóticamente y meióticamente heredables de la expresión génica que ocurren sin que se presenten modificaciones en la secuencia de ADN

# REGULACIÓN EPIGENÉTICA

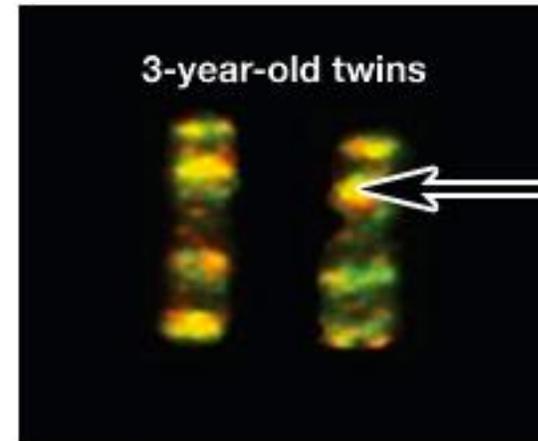
## Definición



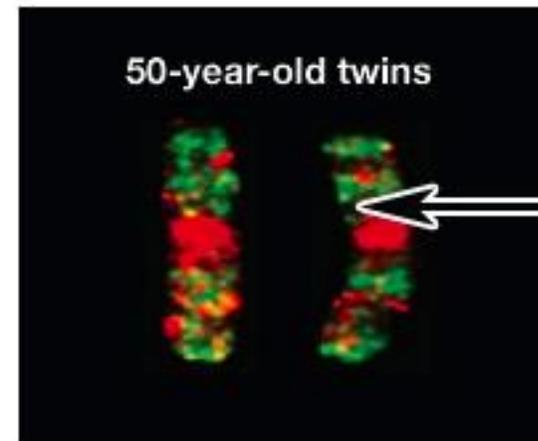
[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

**Epigenetics of discordant monozygotic twins: implications for disease**

**Chromosome 3 Pairs**  
*3-year old twins vs. 50-year-old twins*



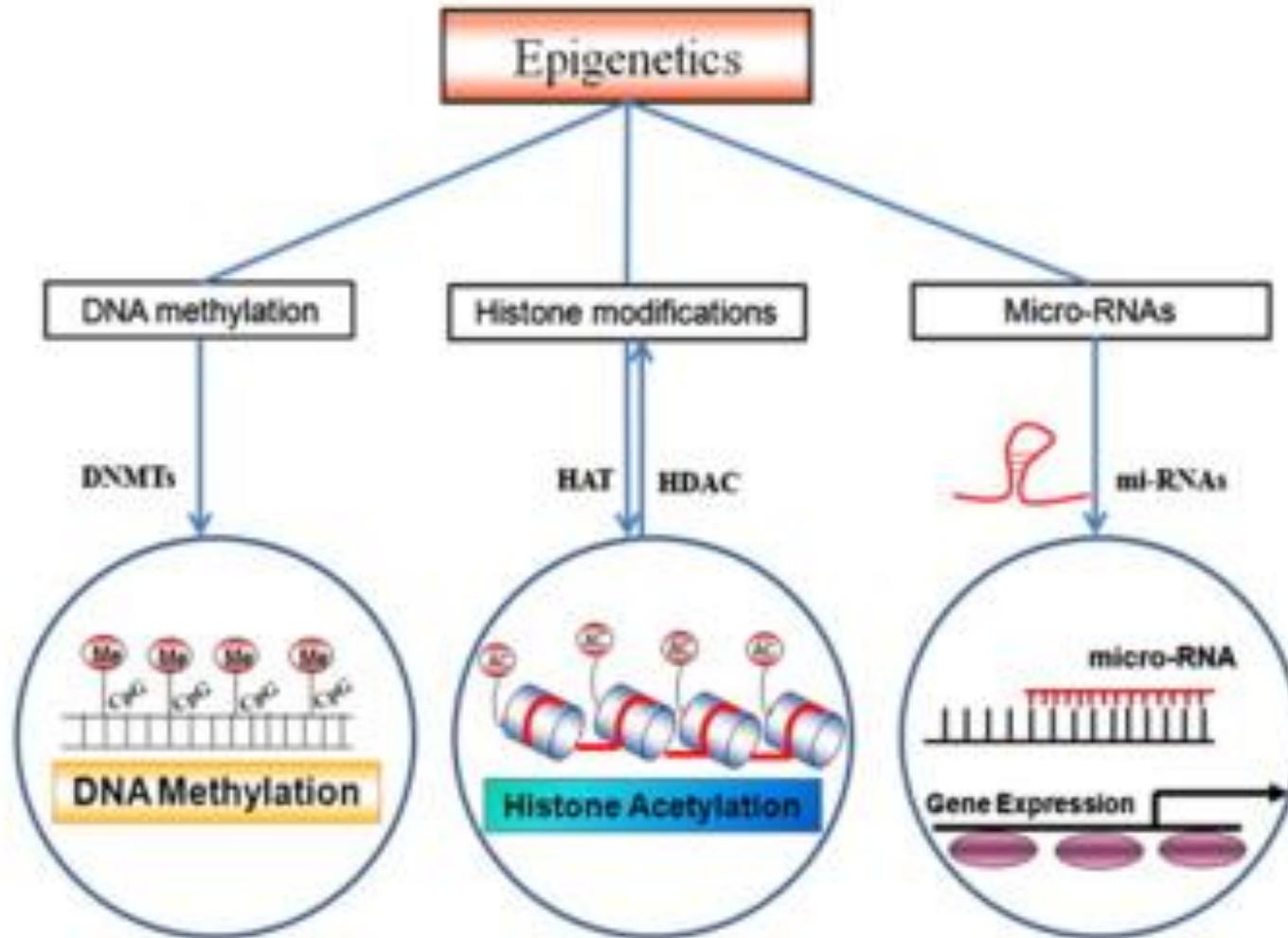
Yellow shows where the twins have epigenetic tags in the same place.



Red and green show where the twins have epigenetic tags in different places.

# REGULACIÓN EPIGENÉTICA

## Definición

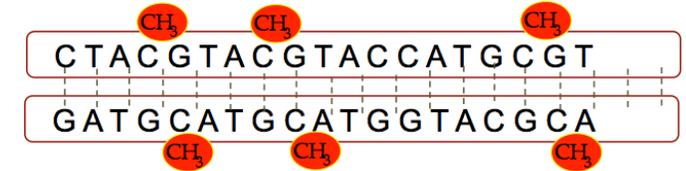


# REGULACIÓN EPIGENÉTICA

## Metilación del ADN



- Metilación del ADN
- Modificación post-traducciona de Histonas
- Silenciamiento de genes mediados por microARN



La **metilación del ADN** ocurre cuando un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) se une covalentemente al carbono 5 de la citosina en el ADN genómico por medio de una enzima conocida como ADN metiltransferasa (DNMT).

Por lo general la metilación se da en mayor grado en las **islas CpG** (regiones con alta concentración de citosina y guanina) las cuales forman parte de la región promotora de los genes.



Figura 1: Metilación de la citosina del ADN mediante la ADN metiltransferasa (DNMT).

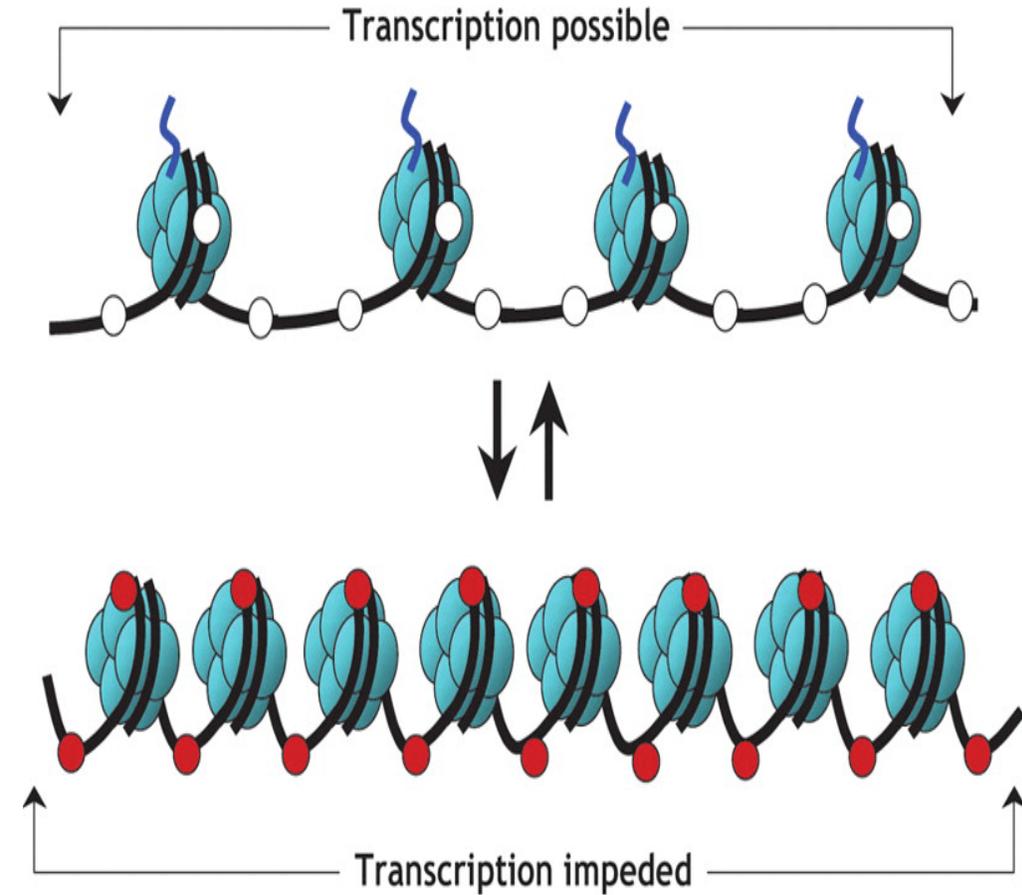
# REGULACIÓN EPIGENÉTICA

## Metilación del ADN

- Metilación del ADN
- Modificación post-traducciona de Histonas
- Silenciamiento de genes mediados por microARN

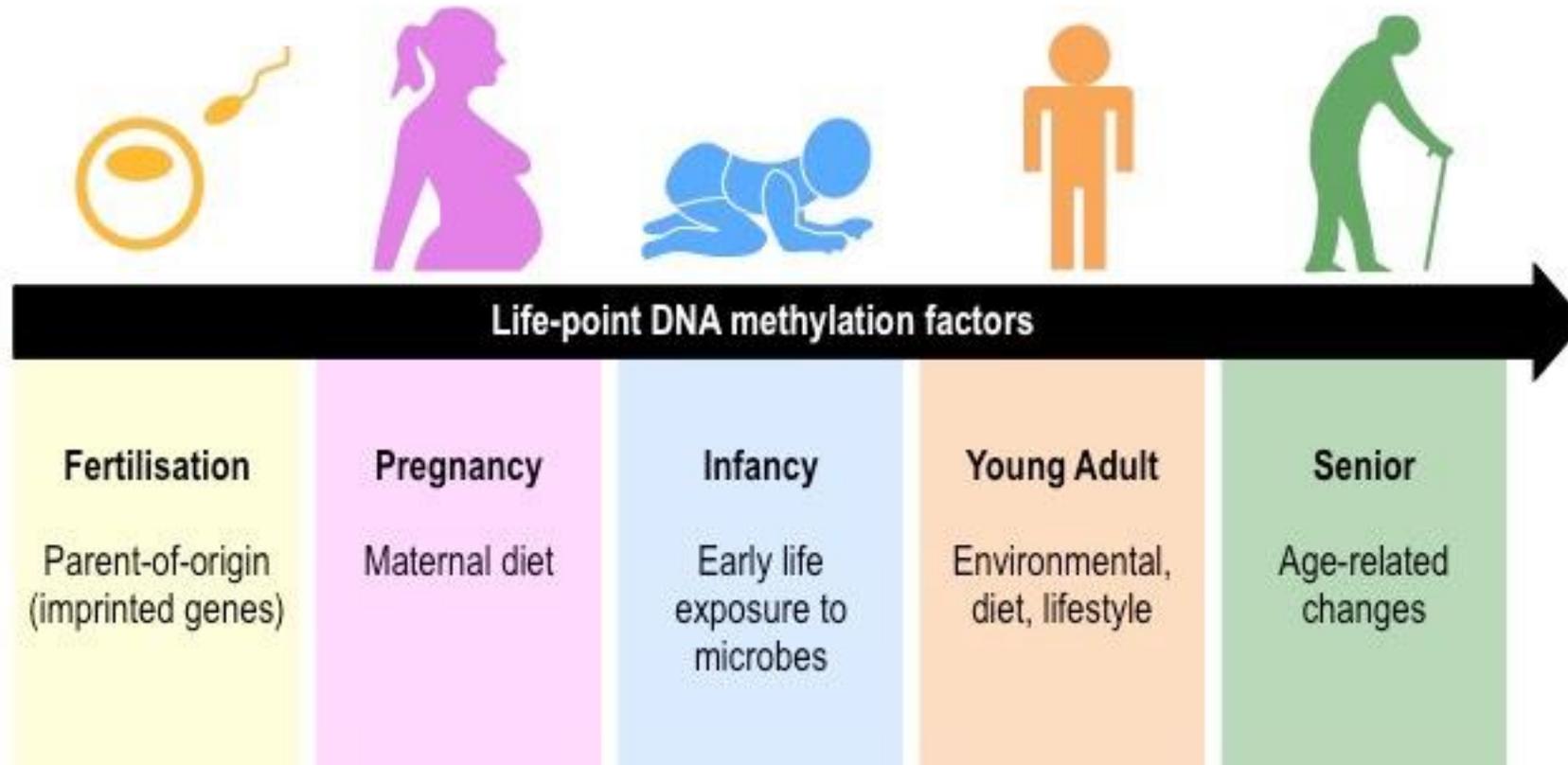


Químicamente muy estable  
Mecanismo de silenciamiento de genes,  
impronta genómica, inactivación  
cromosoma X



# REGULACIÓN EPIGENÉTICA

## Metilación del ADN



# REGULACIÓN EPIGENÉTICA

## Metilación del ADN



Metilación aberrante

Cáncer: hipometilación (inestabilidad del ADN, activación de oncogenes) e hipermetilación (mutación de genes y silenciamiento de genes supresores de tumores)

Mutaciones



Síndromes de X frágil, Bockwith Wiedemann, Prader Willi/Abgelman, ICF, ATRX, Rull

Metilación fisiológica

Inactivación del cromosoma X

Silenciamiento de transposones

Mantenimiento de la estabilidad cromosómica

Modulación de la estructura de la cromatina

Regulación transcripcional

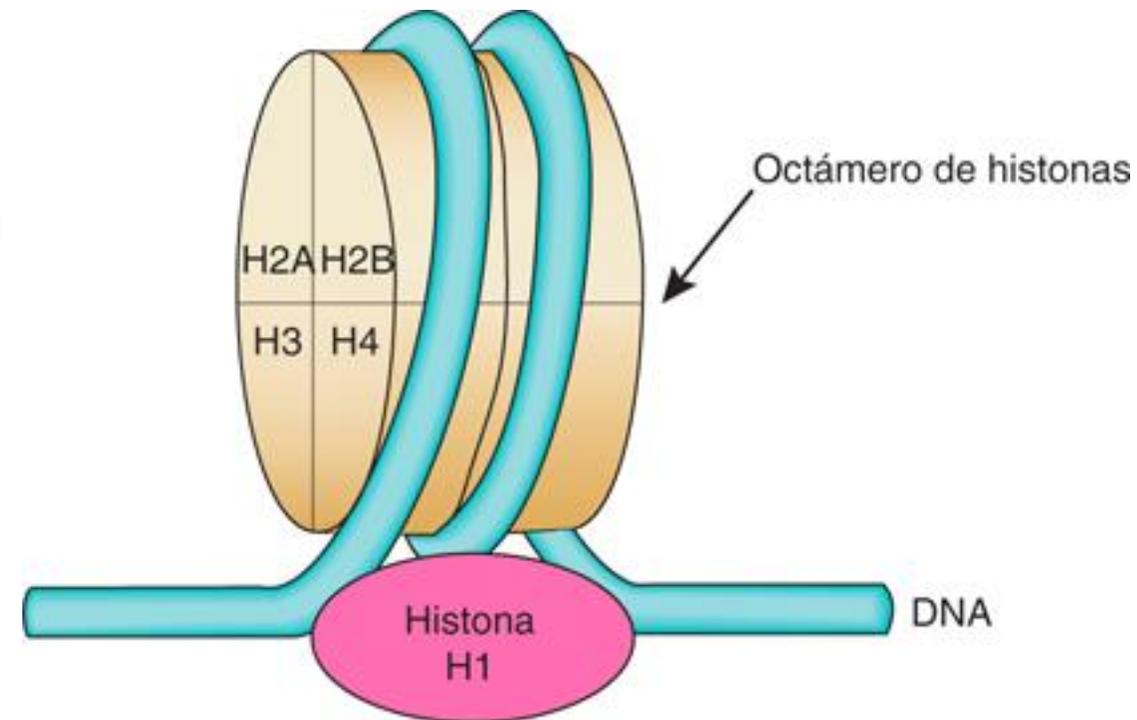
# REGULACIÓN EPIGENÉTICA

## Modificación de Histonas



- Metilación del ADN
- Modificación post-traducciona de Histonas
- Silenciamiento de genes mediados por microARN

**Histonas:** unidades fundamentales de la cromatina  
**CORE:** histonas del cuerpo central del *Nucleosoma*  
(H2A, H2b, H3, H4)  
**LINKER:** Histonas de enlace (H1)



# REGULACIÓN EPIGENÉTICA

## Modificación de Histonas

- Metilación del ADN
- Modificación post-traducciona de Histonas
- Silenciamiento de genes mediados por microARN

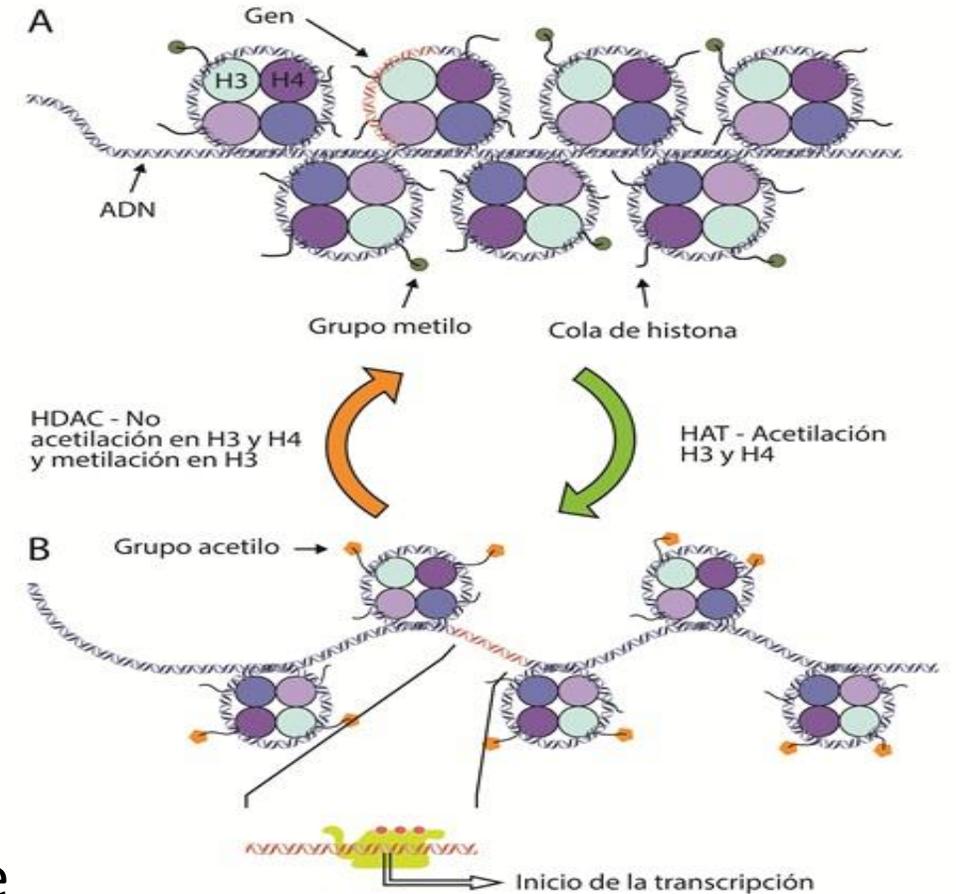


Ricas en residuos de lisina y arginina, susceptibles a modificaciones químicas.

**Acetilación:** incorporación de grupo acetilo mediada por enzima acetil-transferasa de histonas (HAT)->relajación de la cromatina (**eucromatina**)->permite la transcripción

**Desacetilación:** remoción de grupo acetilo mediada por enzima desacetilasa de histonas (HDAC)->compactación de la cromatina (**heterocromatina**)->transcripción bloqueada

### HETEROCROMATINA



### EUCROMATINA

# REGULACIÓN EPIGENÉTICA

## MicroARN (miARN)

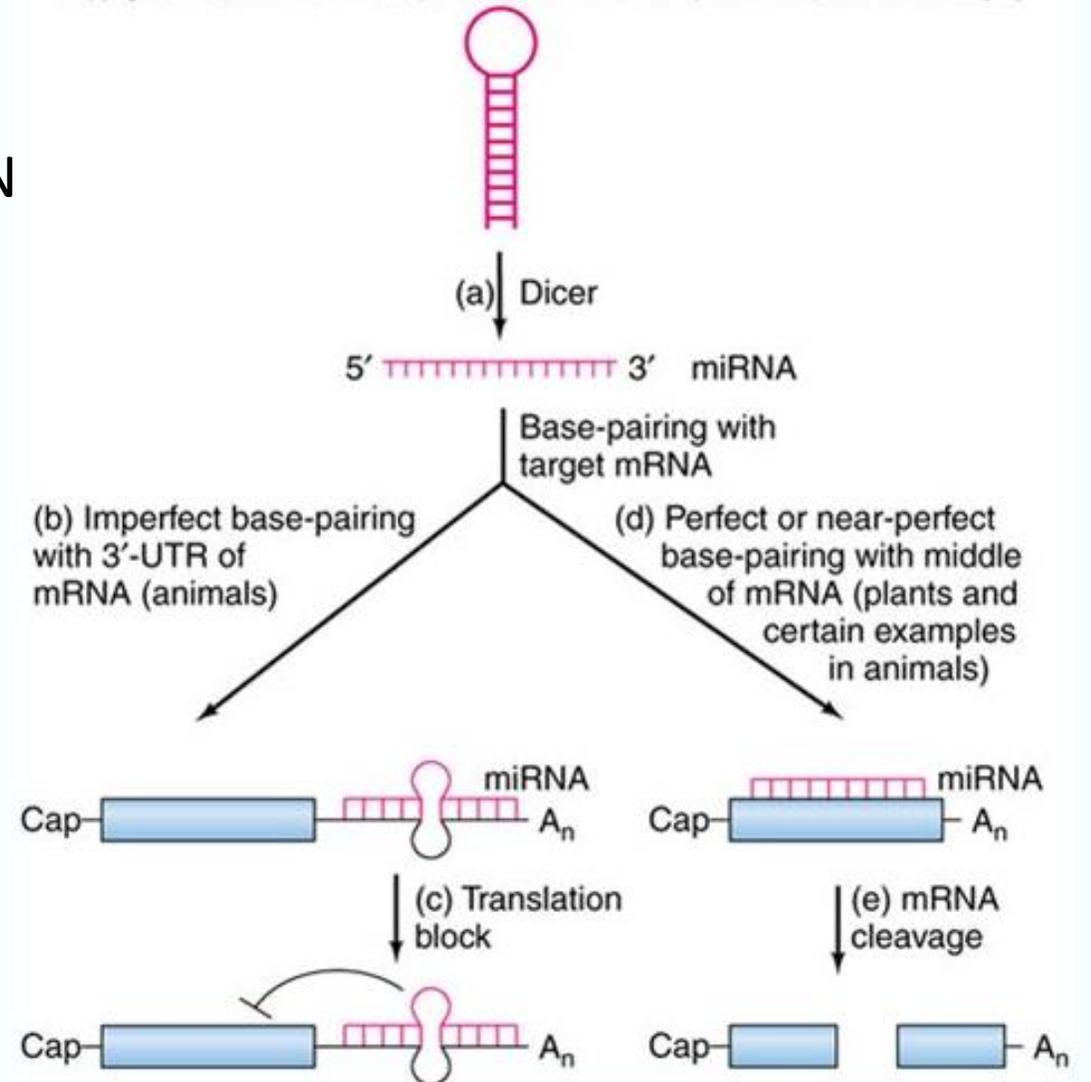


- Metilación del ADN
- Modificación post-traducciona de Histonas
- Silenciamiento de genes mediados por microARN

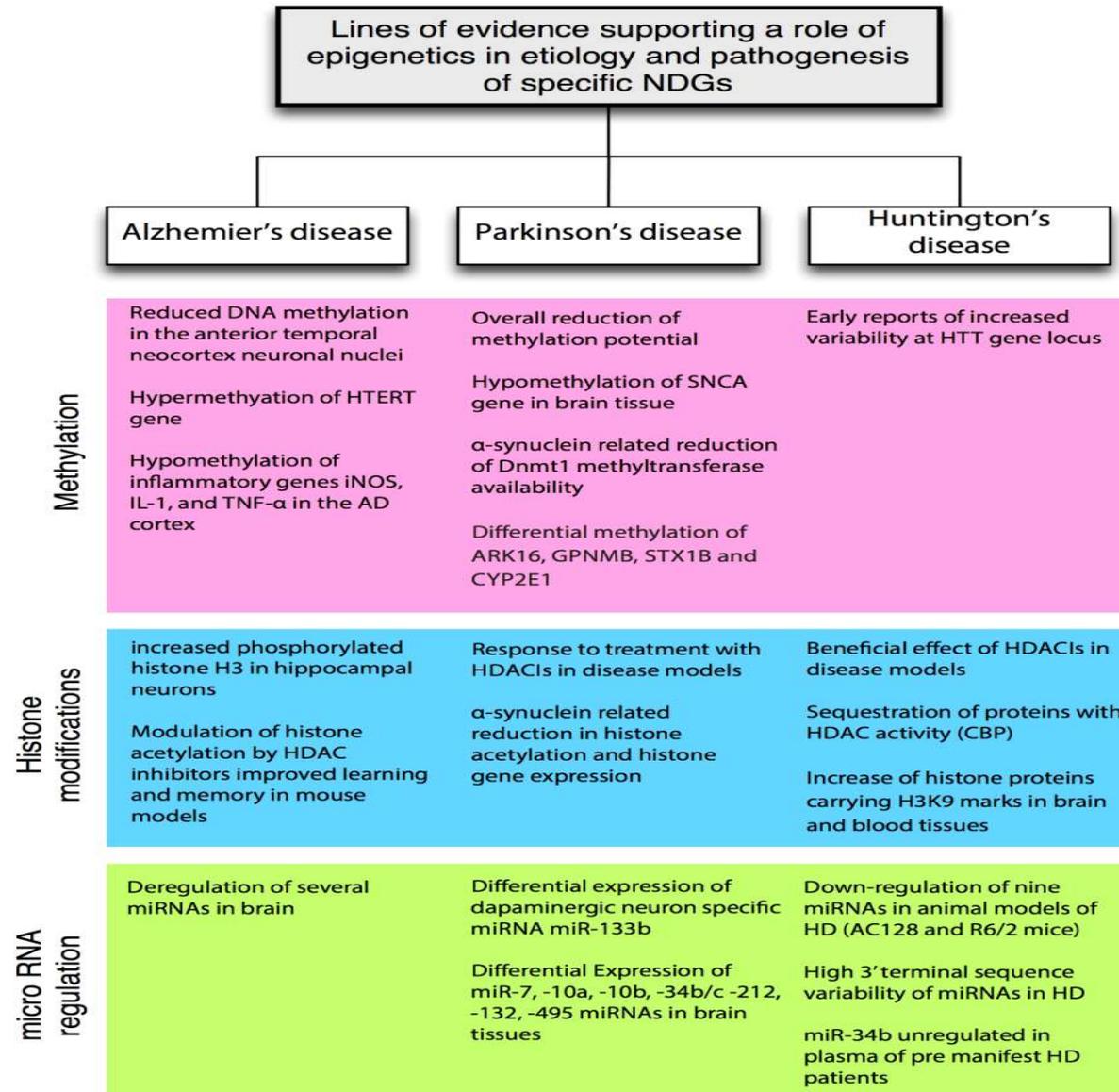
Son ARN pequeños de apenas **18 a 26** nucleótidos no codificantes, su función es reguladora.

Hibridan complementado con sus secuencias blanco que se localizan en las regiones 3'UTR de ARN mensajeros (mARN) específicos

Complejo mARN/miARN->bloqueo de la traducción / degradación del mARN.



# REGULACIÓN EPIGENÉTICA





El **diagnóstico** es una etapa crítica en el manejo de un paciente, que implica decisiones médicas que definirán el progreso del cuidado de un individuo.

El concepto de “**diagnóstico molecular**” es un término amplio que incluye técnicas de biología molecular aplicadas al beneficio de la salud humana.

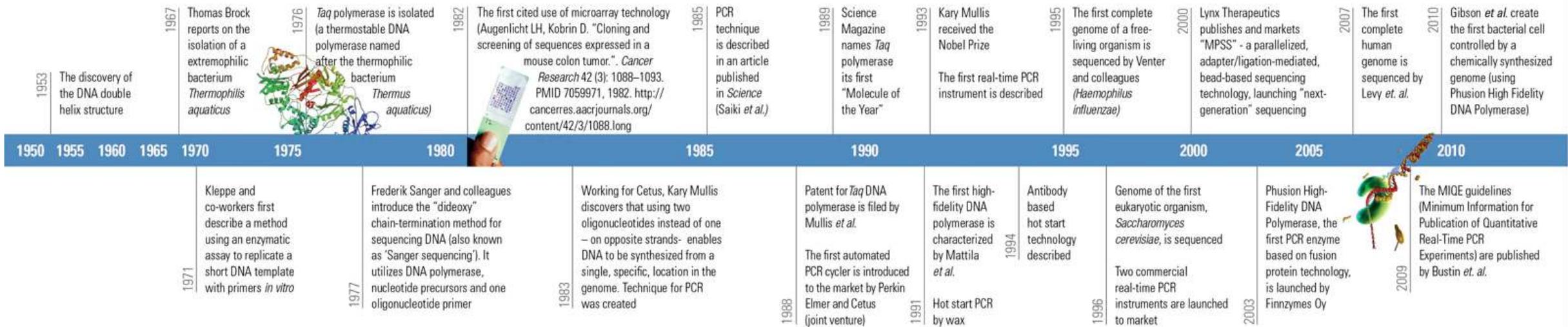
¿**Cómo?**, detectando, cuantificando y/o determinando secuencias específicas ADN, ARN o proteínas.

# BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AL DIAGNOSTICO



El desarrollo de **nuevas técnicas** de diagnóstico en medicina tiene su origen en los problemas clínicos que requieren con urgencia un método de diagnóstico, idealmente con una **alta sensibilidad y especificidad**.

## PCR through the ages



# BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AL DIAGNOSTICO

## Aplicaciones



- Genética de Poblaciones
- Medicina Forense
- Enfermedades Hereditarias Mendelianas
- Infectología
- Farmacogenética
- Cáncer hereditario y somático
- Fertilidad y Reproducción

# BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AL DIAGNOSTICO

## Aplicaciones



Algunas **técnicas moleculares** aplicadas a diferentes etapas del cuidado del paciente:

Screening	Diagnóstico	Terapia	Monitoreo
HIV (trasplante) MRSA (IAS) HPV (CCU)	<i>B. pertussis</i> CT/NG VRS SARS-CoV-2	<i>KRAS</i> <i>BRAF</i> <i>Her2</i>	Carga viral CMV BCR-ABL Carga viral HIV

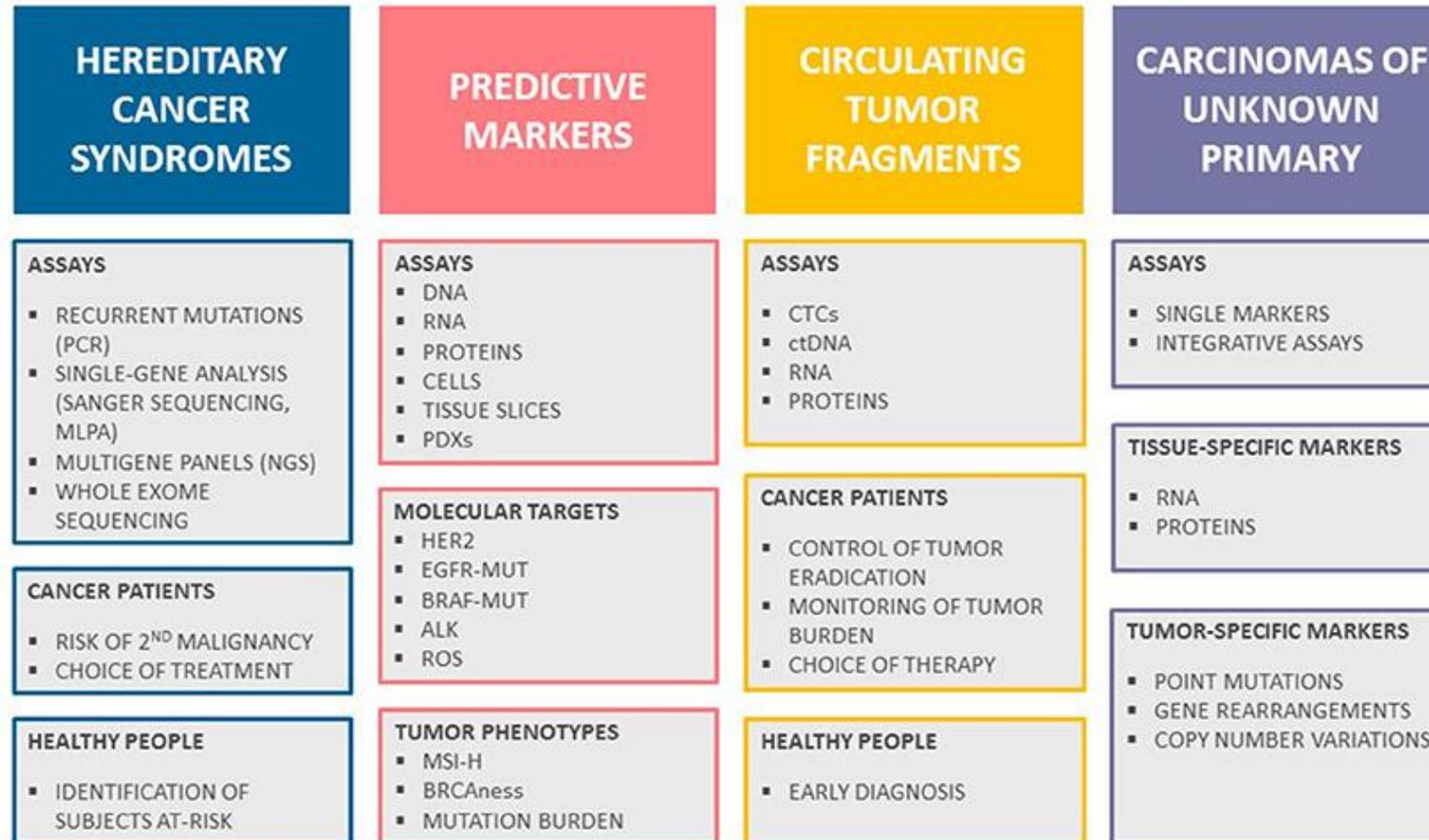
HIV, virus de la inmunodeficiencia humana; MRSA, ***Staphylococcus aureus*** resistente a meticilina; IAS, infecciones asociadas a atención de salud; virus del papiloma humano; CCU, cáncer del cuello uterino; CT, ***Chlamydia trachomatis***; NG, ***Neisseria gonorrhoeae***; CMV, citomegalovirus. SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2.

# BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AL DIAGNOSTICO

## Aplicaciones



### MOLECULAR DIAGNOSTICS IN ONCOLOGY



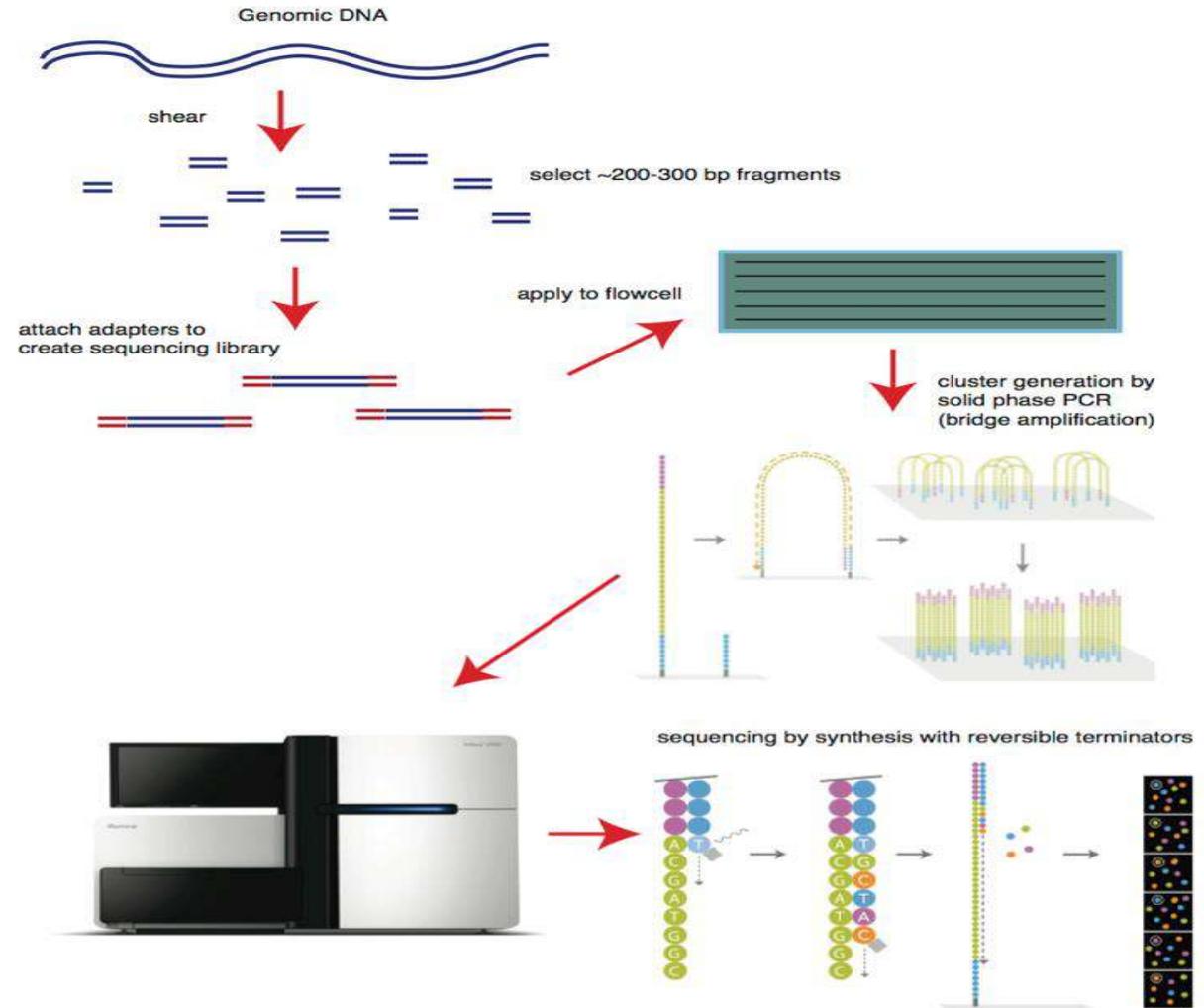
# Next Generation Sequencing (NGS)



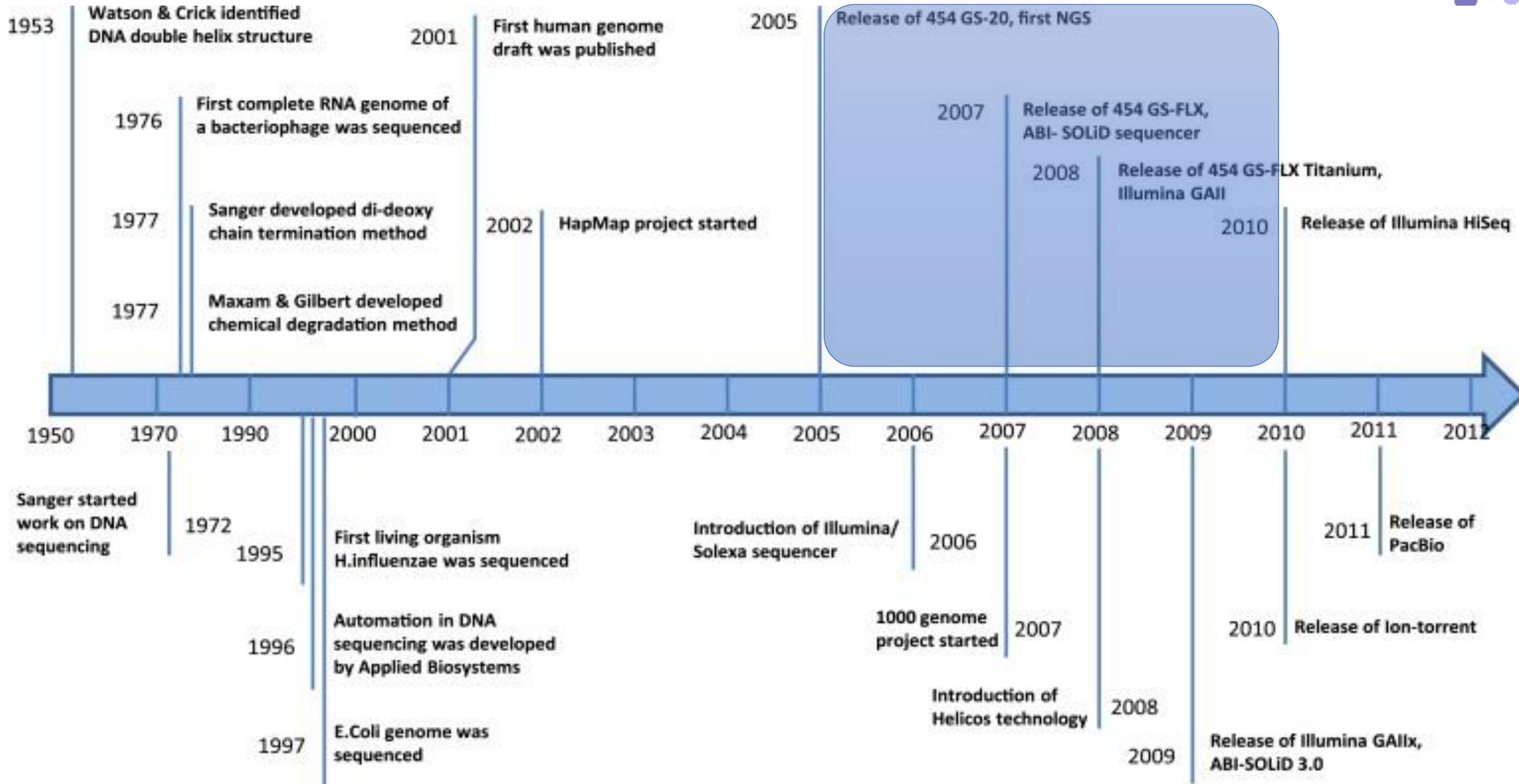
El concepto de **NGS** engloba todas las tecnologías destinadas a llevar a cabo la secuenciación masiva a gran escala de cualquier ácido nucleico (ADN/ARN) en la actualidad.

Tal capacidad le da a NGS un gran potencial de aplicación en diferentes entornos clínicos:

- Enfermedades Hereditarias
- Cáncer Hereditario y somático
- Estudios prenatales (NIPT)
- Microbioma



# Next Generation Sequencing (NGS)



# Next Generation Sequencing (NGS)



**1990-2003**

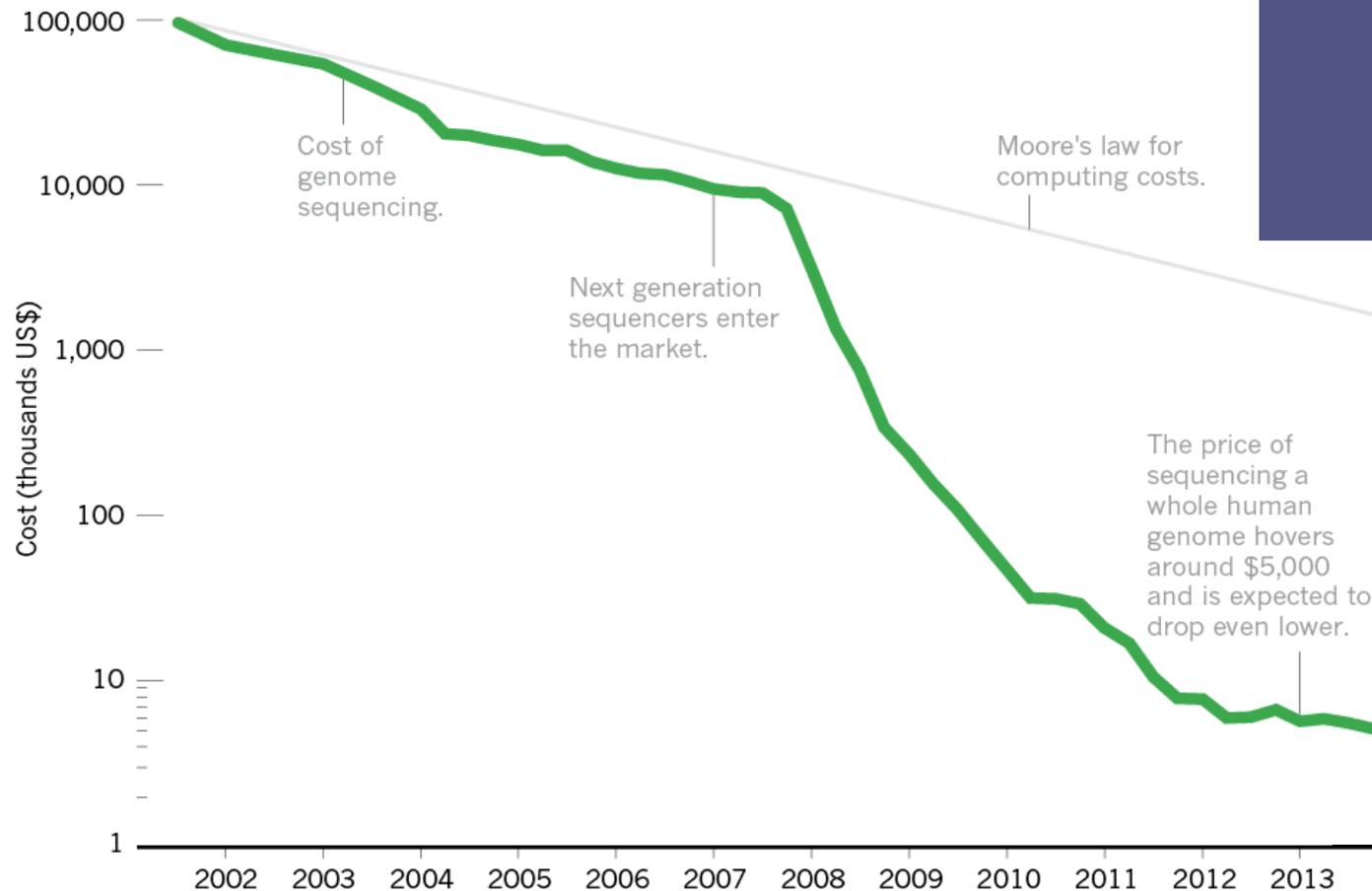
Proyecto Genoma Humano

13 años

U\$D 3,000,000,000

## Falling fast

In the first few years after the end of the Human Genome Project, the cost of genome sequencing roughly followed Moore's law, which predicts exponential declines in computing costs. After 2007, sequencing costs dropped precipitously.



**2020**  
**Exoma Clínico**  
**dirigido**  
**2-4 semanas**  
**U\$D < 700**

natureportfolio

SPONSOR FEATURE Sponsor retains sole responsibility for the content of this article

**Innovation at Illumina: The road to the \$600 human genome**

Jeremy Preston, Ashley VanZeeland & Daniel A. Peiffer PhD

# Next Generation Sequencing (NGS)



**¿COMO UTILIZAR EFICIENTEMENTE  
LA INFORMACION GENERADA VIA NGS ?**



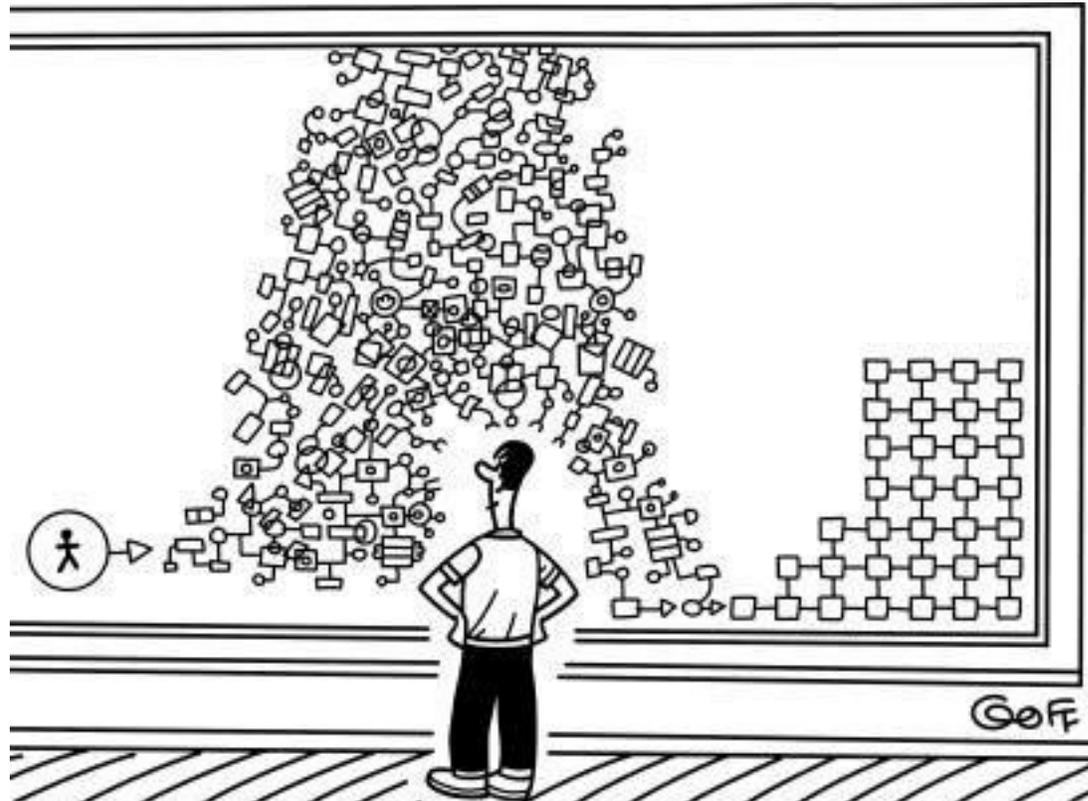
# Next Generation Sequencing (NGS)



  
Harvard Business Review  
FOUNDED 1883

ANALYTICS

## Data Scientist: The Sexiest Job of the 21st Century





**¡Muchas gracias!**

agomez@cibic.com.ar



[www.heritas.com.ar](http://www.heritas.com.ar)



[info@heritas.com.ar](mailto:info@heritas.com.ar)



[Héritas](#)



[HeritasArg](#)