

Curso

Biología molecular aplicada al diagnóstico médico

2022

Clase:

Nociones básicas de Biología Molecular y aplicaciones en el diagnóstico clínico

Círculo Médico de Rosario | Fecha: 06/09/22



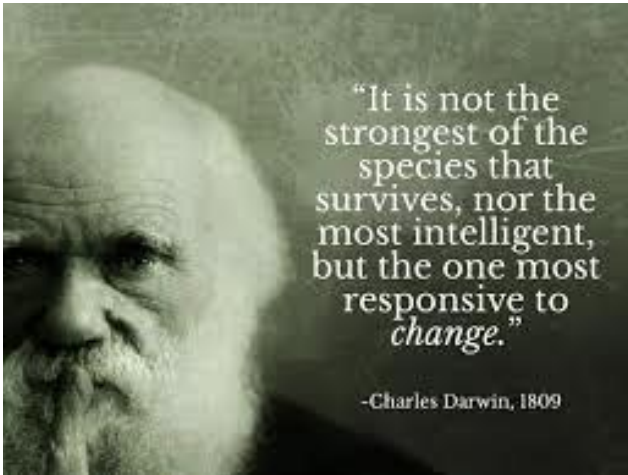
Lic. Alan Gomez
Especialista en Biología Molecular
agomez@cibic.com.ar

¿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"



1865

George Mendel
Leyes Mendelianas
de la Herencia



1871

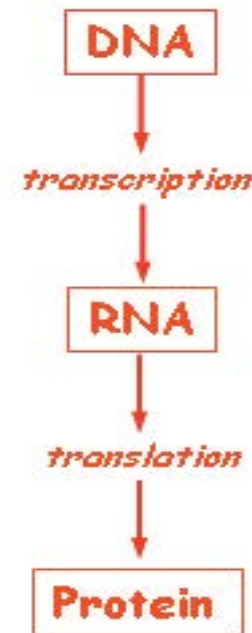
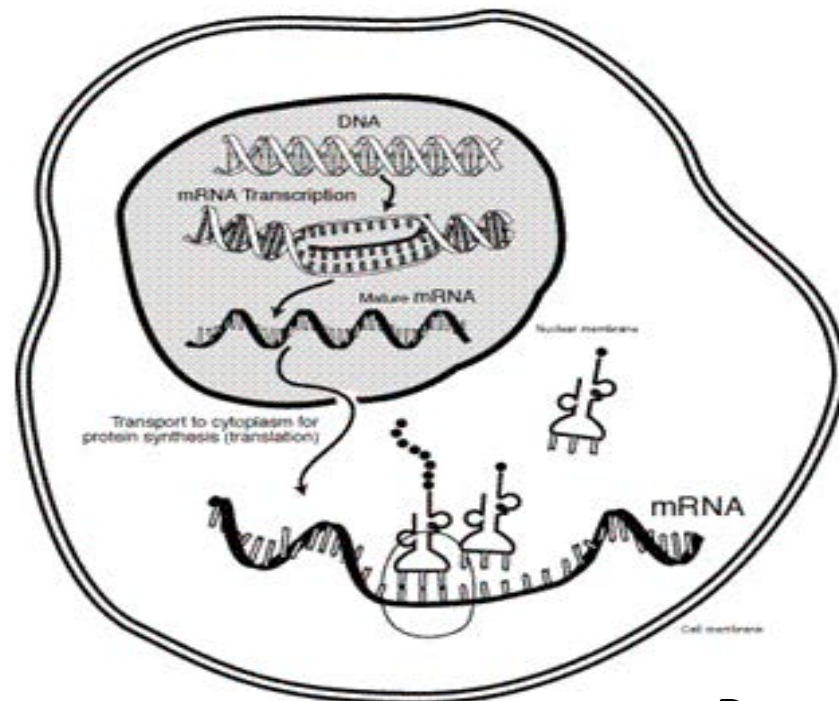
Miescher
Descubrimiento del ADN
("nucleína")

Hitos de la Biología Molecular



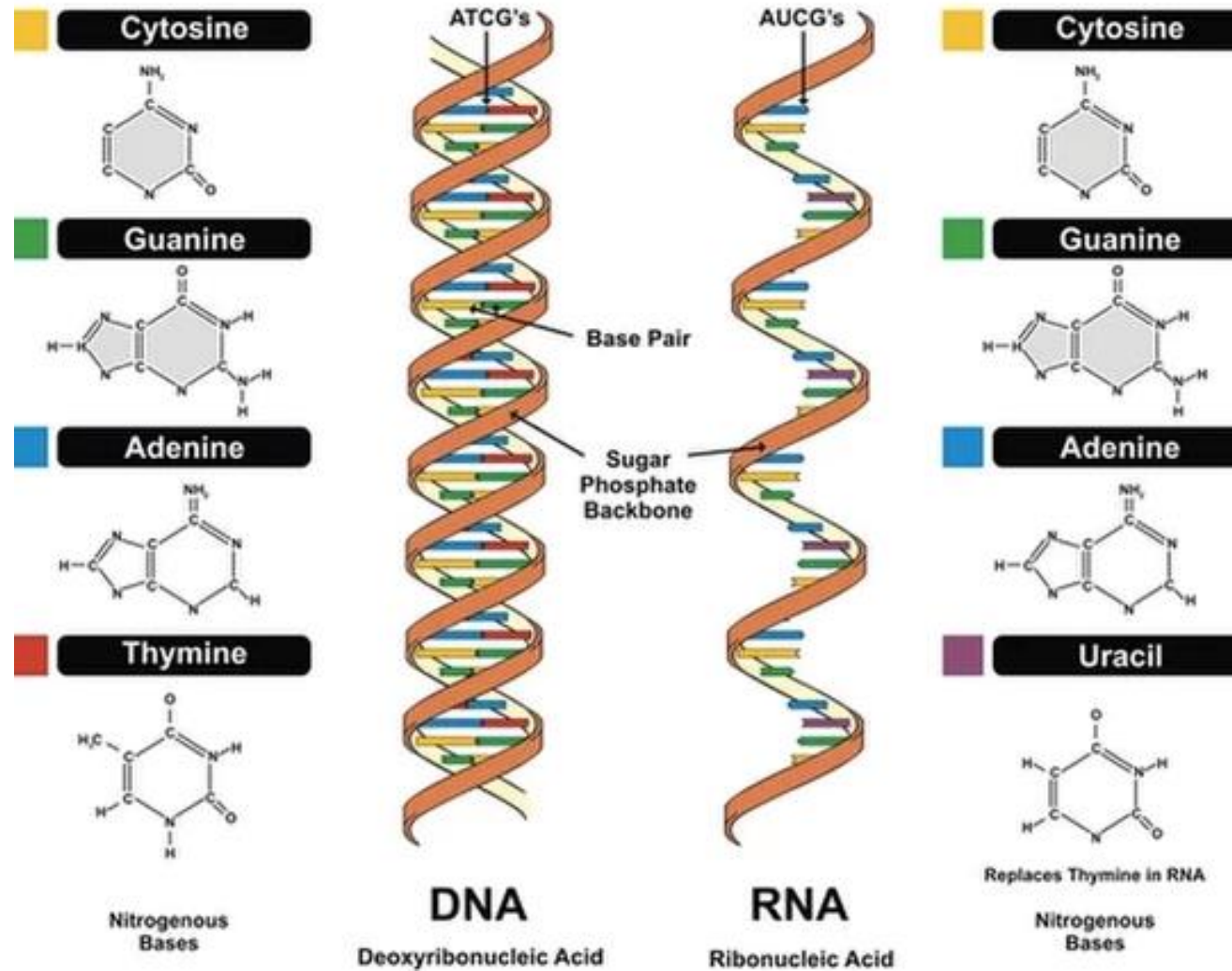
Francis Crick James Watson Maurice Wilkins Rosalind Franklin

1953



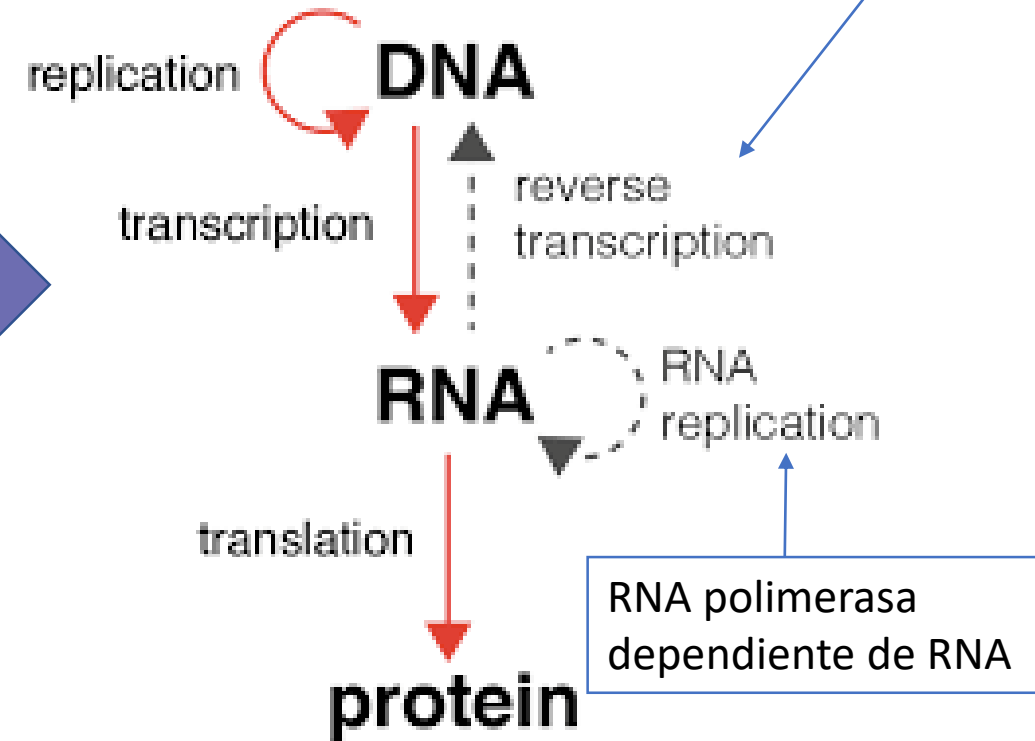
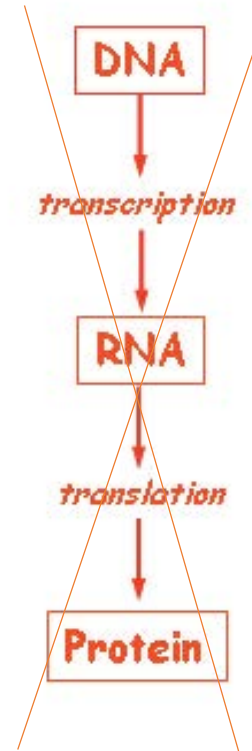
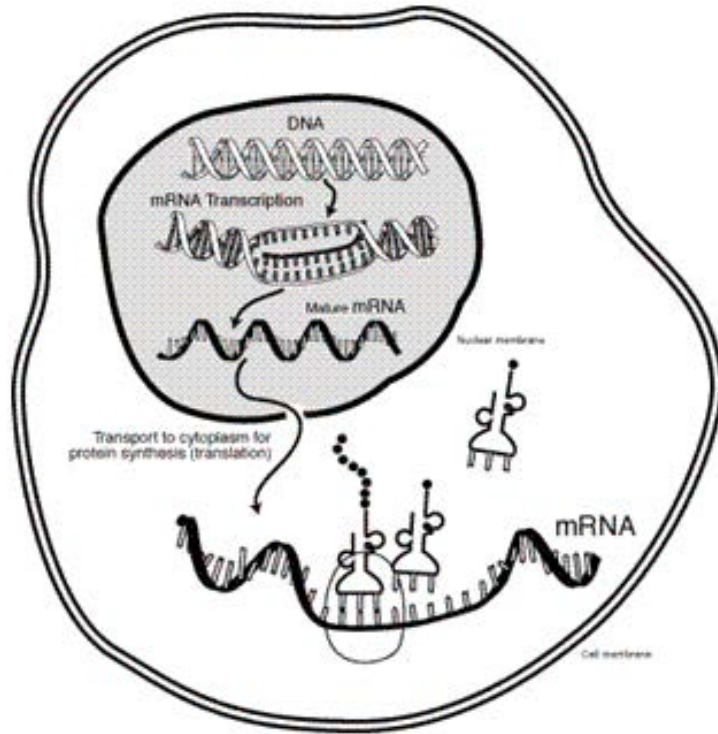
Dogma central de la Biología Molecular

Estructura del ADN/ARN

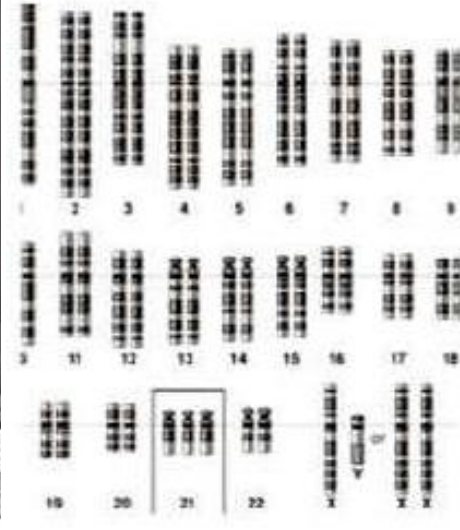


Dogma central de la Biología Molecular

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

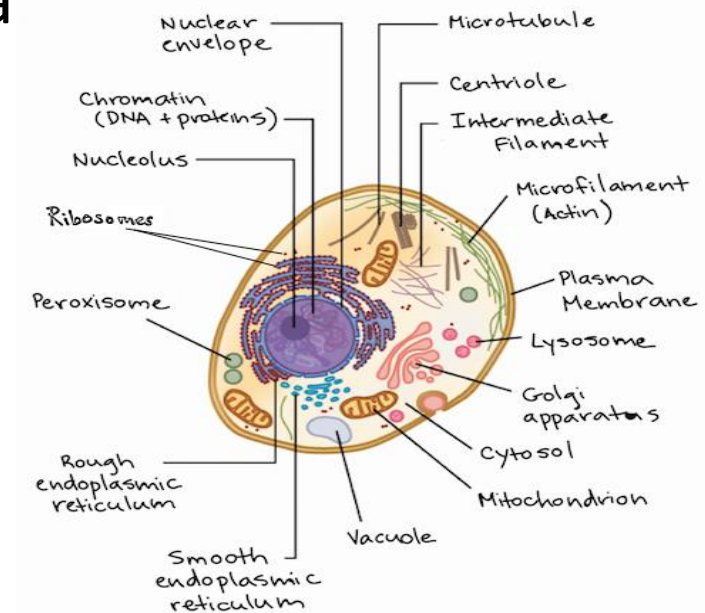
1996

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** → **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.

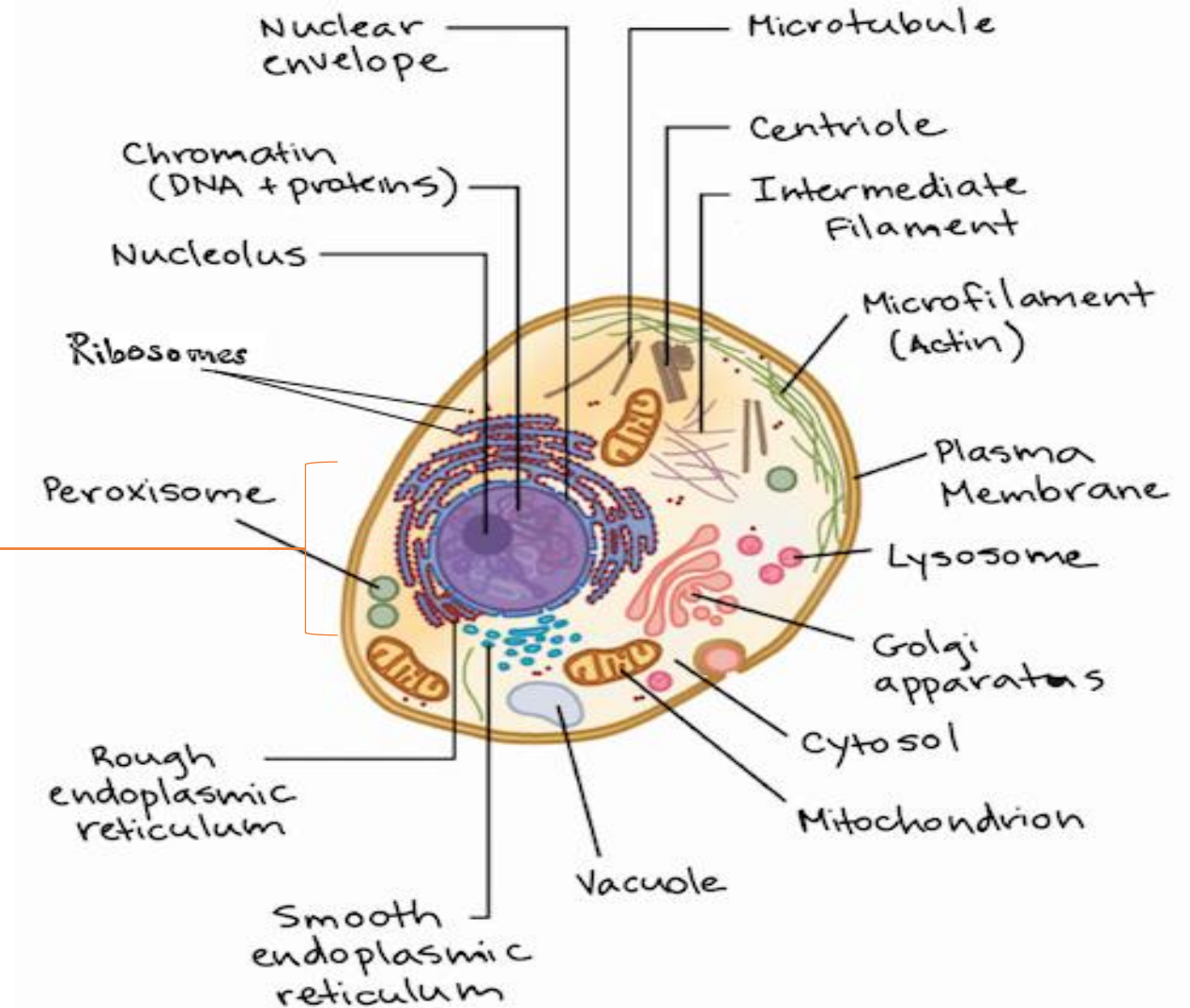
Cada pb mide alrededor de **0,34 nanómetros** de largo, cada célula diploide contiene unos **2 metros de ADN**.

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 tal cantidad de información esté contenida dentro del núcleo celular?

~10 μm de diametro



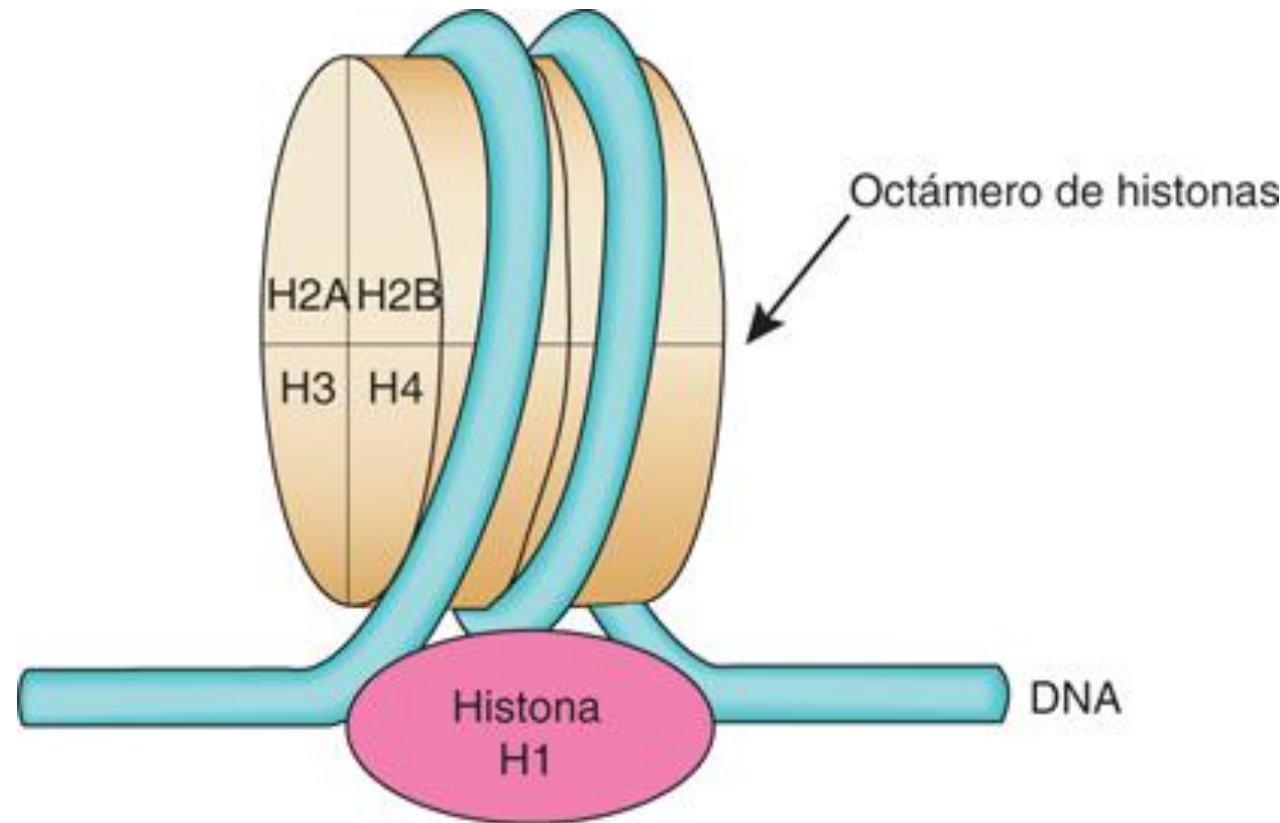
Empaquetamiento del ADN: Histonas y Cromatina



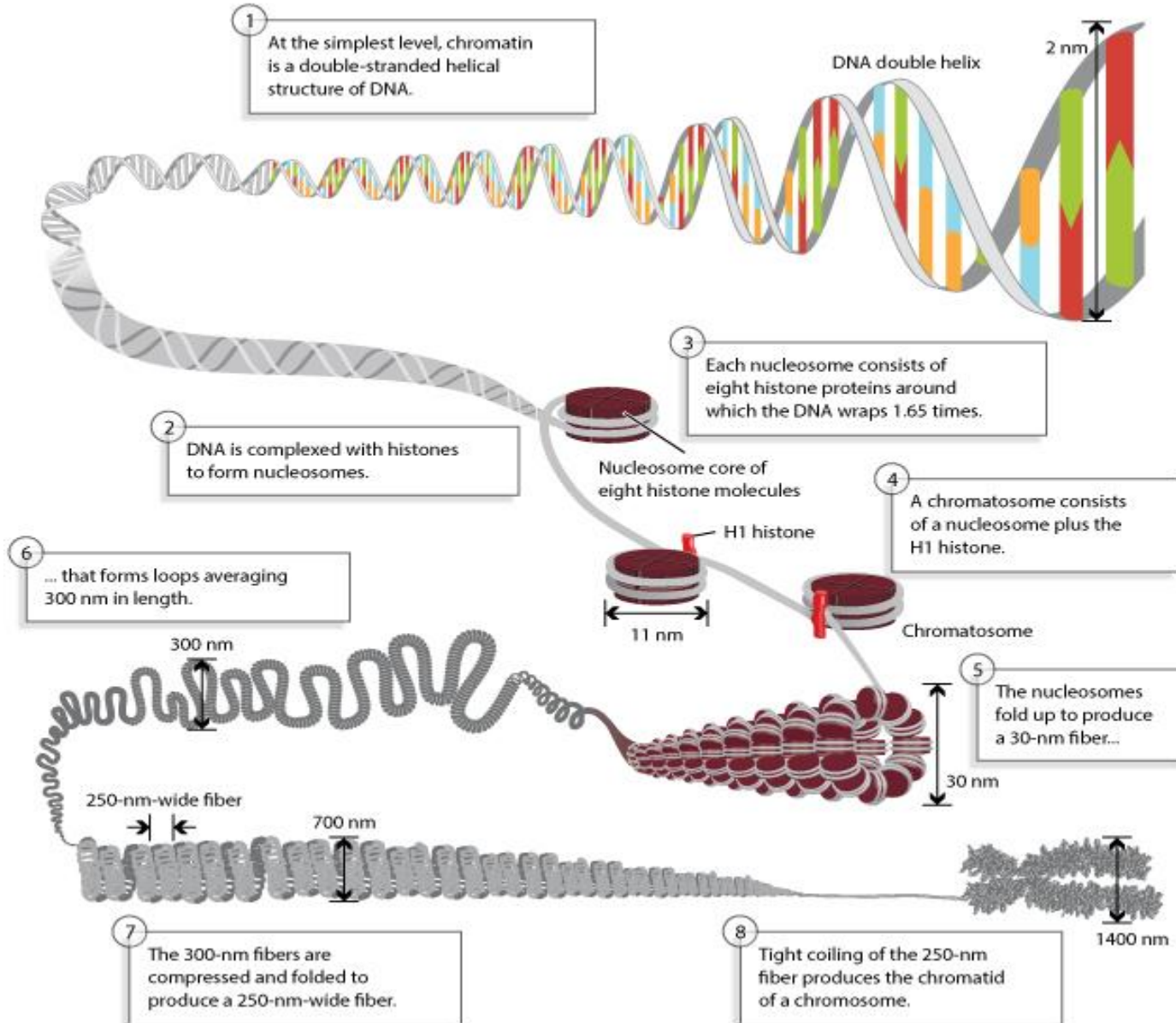
Proteínas llamadas **histonas** se unen al ADN formando un complejo ADN-proteína llamado **cromatina**.

Las histonas son una familia de proteínas pequeñas **cargadas positivamente**: **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**.

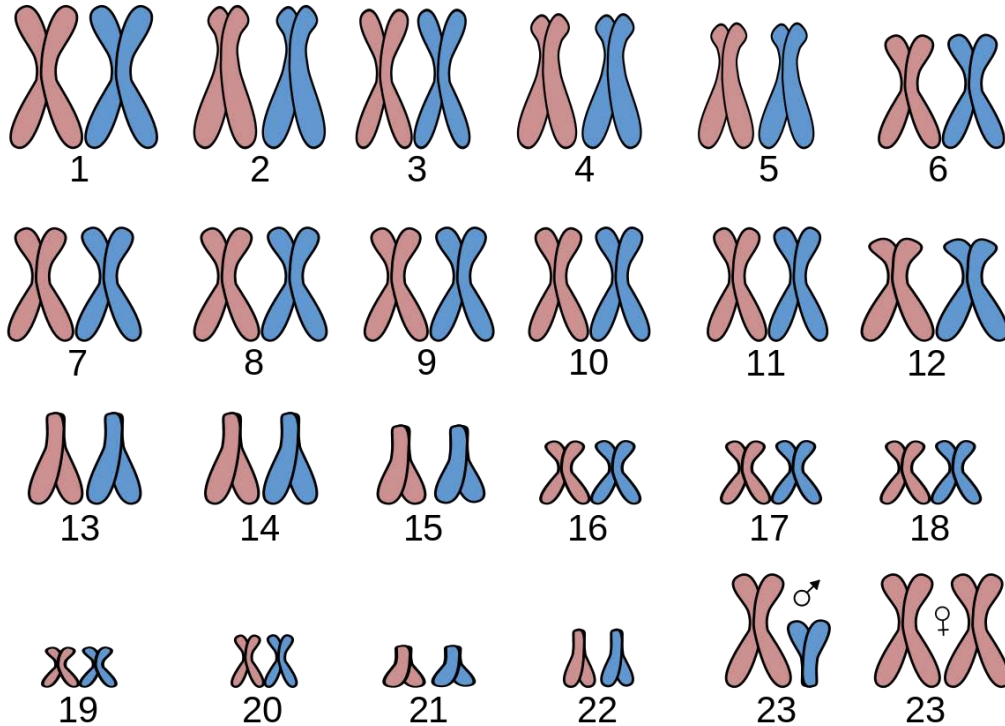


Empaquetamiento del ADN: Histonas y Cromatina



- 1 - La **cromatina** es la forma en la que se presenta el ADN en el núcleo celular.
- 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.

Empaquetamiento del ADN: Cromosomas



Representación de un cariotipo humano con sus 23 pares de cromosomas.

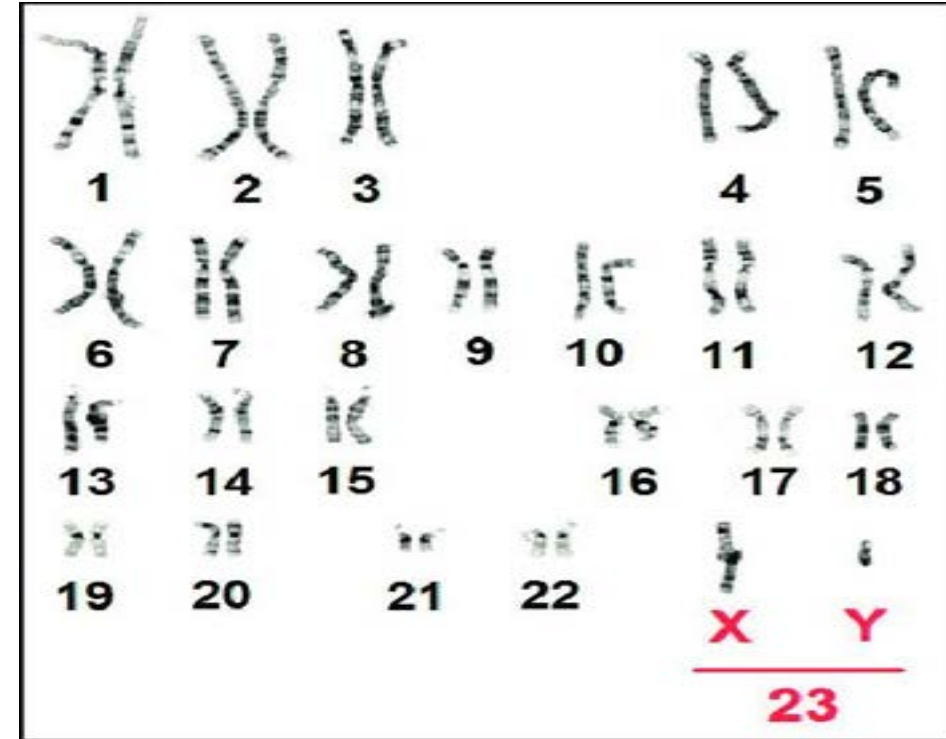
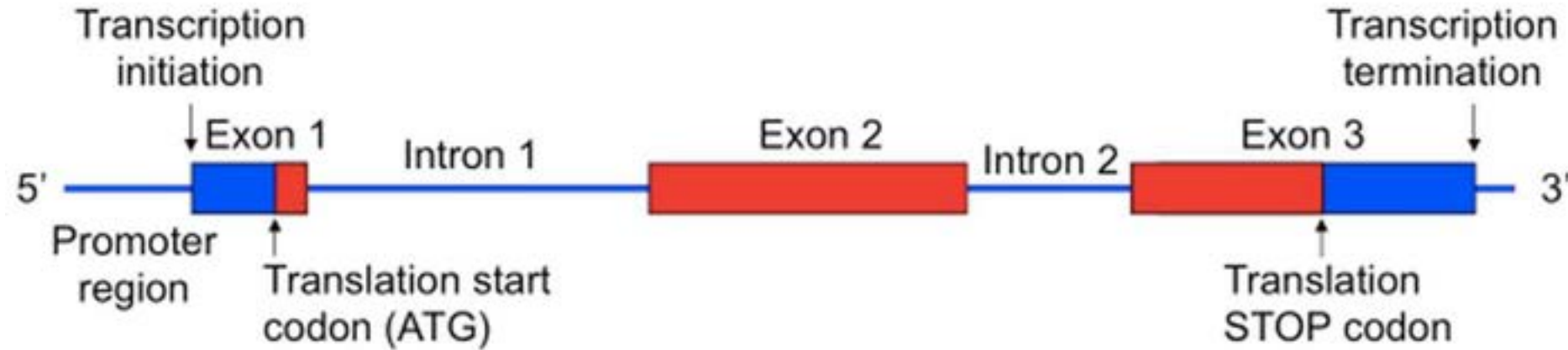


Imagen de un cariotipo humano (XY) con sus 23 pares de cromosomas.

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...2022)



“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*”



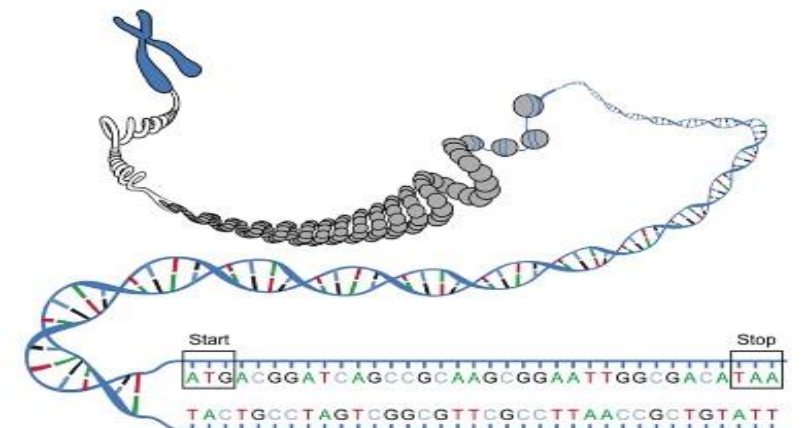
Francis Collins
Director Human Genome Project

Proyecto Genoma Humano (1990 – 2003...2022)



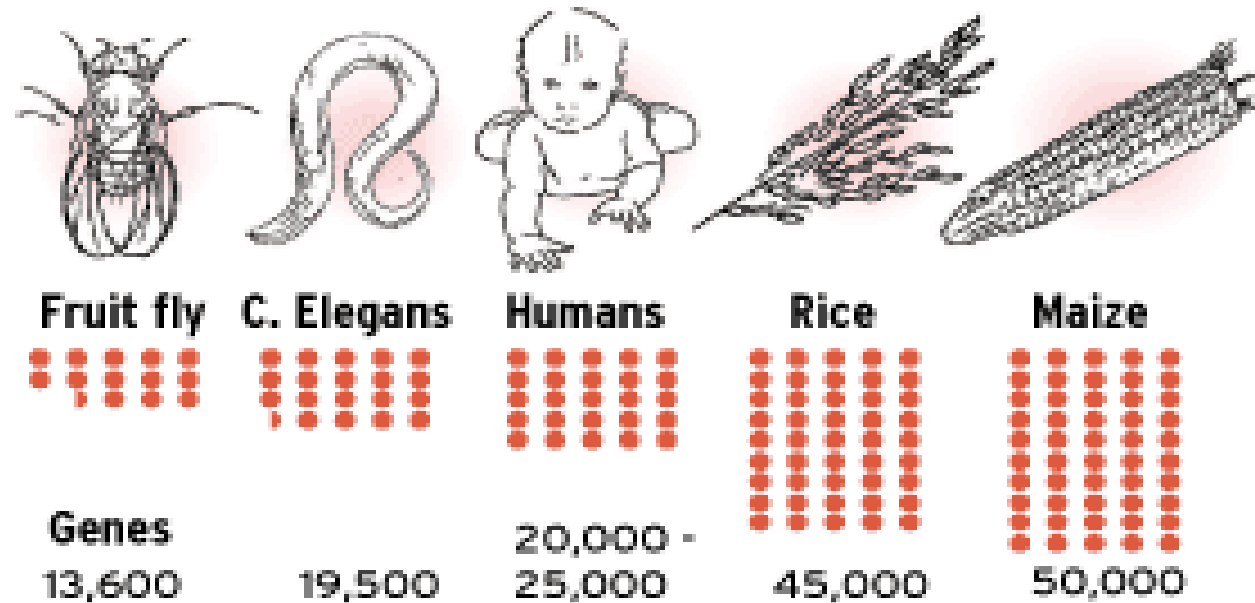
OBJETIVOS

- Identificación de ≈ 30.000 genes (estimación inicial)
- 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



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...2022)

HALLAZGOS



- DNA: **3 mil millones de pb**
- Entre **20,000-25,000** genes (50% con función desconocida)
- **98-99%** del genoma es no-codificante
- Secuencia génica: **99,9%** idéntica entre individuos. Además, compartimos más del **99%** con otras especies

Proyecto Genoma Humano (1990 – 2003...2022)

HALLAZGOS



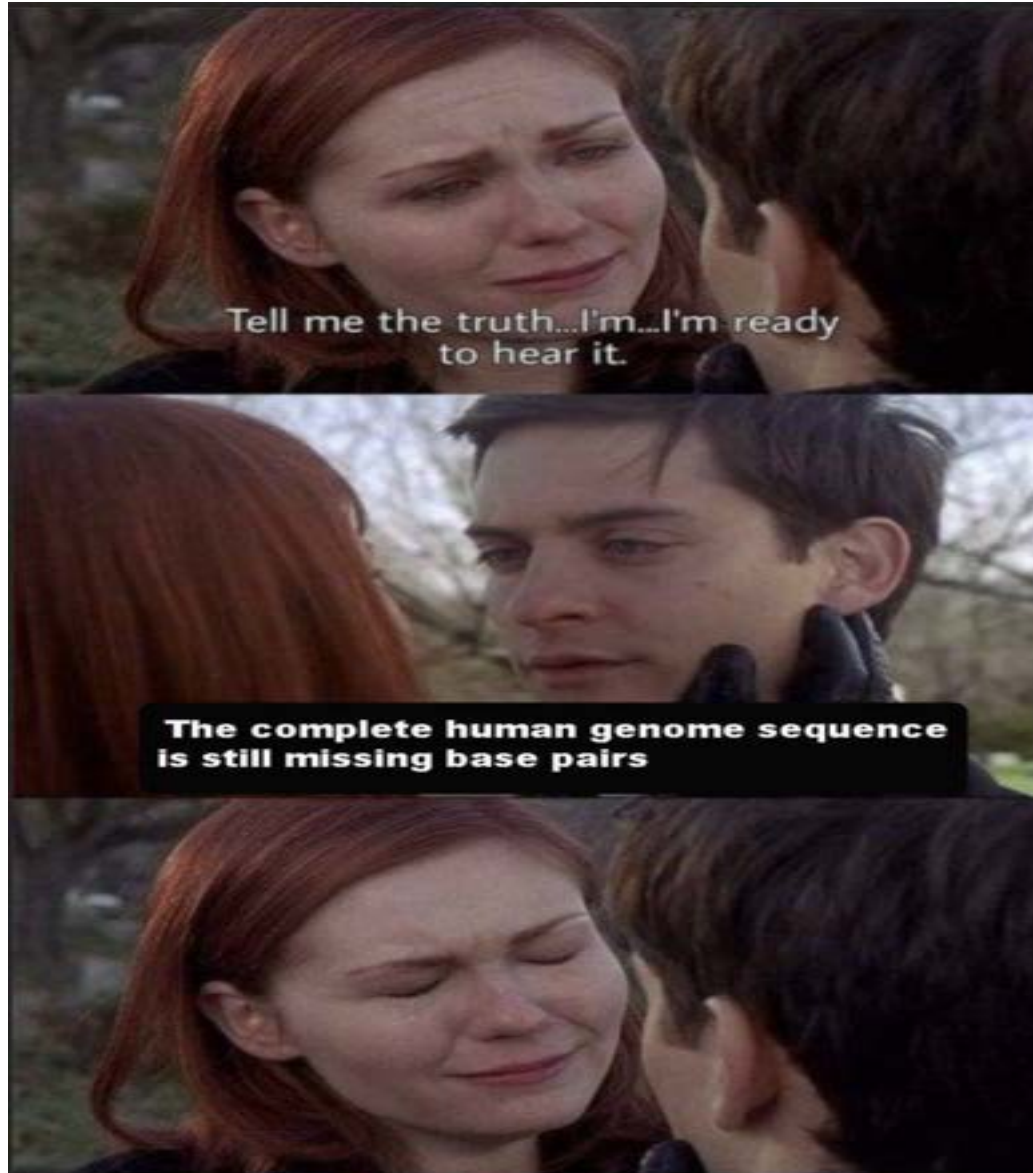
- La complejidad del genoma **no** radica en el nro. de genes, sino en la ***interacción*** entre ellos
 - ➔ Genes reguladores
 - ➔ Genes con más de una función
 - ➔ Moléculas reguladoras (ADN,ARN,mARN,siARN)
 - ➔ La mayoría de los genes son polimórficos (variabilidad genética)

*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)*

Proyecto Genoma Humano (1990 – 2003...2022)

Pero...



La secuencia finalizada en 2003 estaba **completa en un 92%**, con más de 150,000 brechas de ADN por secuenciar.

Ese **8%** contiene secuencias de tramos complejos y repetitivos. → Limitaciones en la tecnología de **secuenciación short-read**

Proyecto Genoma Humano (1990 – 2003...2022)

Ahora sí!



El consorcio **#T2T** terminó de secuenciar ese último **8 %**, gracias a la tecnología de **secuenciación long-read**. <http://genome.gov/T2T>

Contiene **numerosos genes** y es comparable en tamaño a un cromosoma completo.

Estas secuencias de ADN recién agregadas están cerca de los telómeros y centrómeros

Variaciones en el Genoma Humano

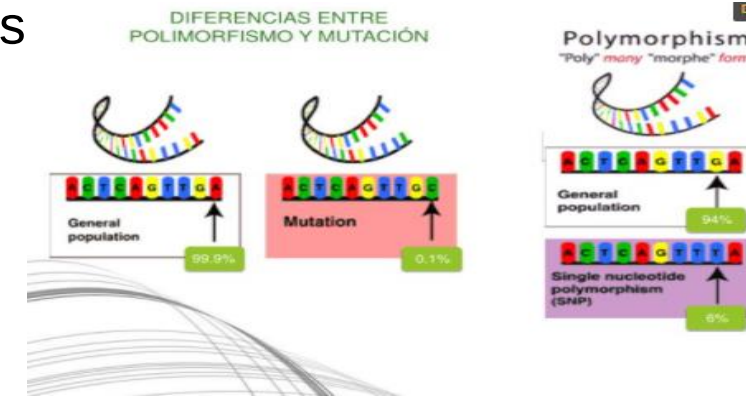


- Las variaciones en el genoma humano son el conjunto de diferencias genéticas que distinguen nuestros genomas, ya sea entre los individuos dentro de una población o entre poblaciones.
- Contribuyen a la **diversidad genómica y fenotípica** humana.
- Aunque también pueden estar directamente relacionadas con ciertas **patologías o susceptibilidad al desarrollo de las mismas, afectar la respuesta ante infecciones o a fármacos.**

Variaciones en el Genoma Humano

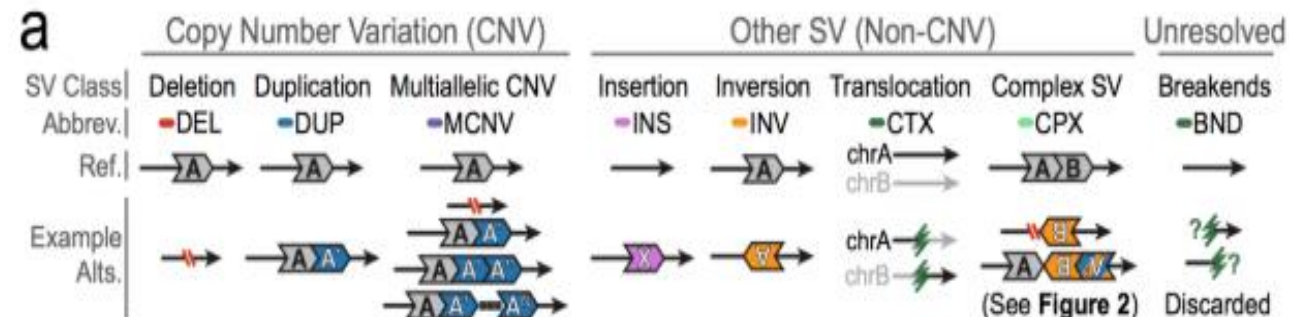
❖ Variantes de Nucleótidos Simples - Simple Nucleotide Variants (SNVs):

- Polimorfismos de una sola base - Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)
- Pequeñas InDels (1-10 bp)
- Microsatélites (2-9bp)



❖ Variantes Estructurales:

- Variantes de Número de Copias - Copy-Number Variants (CNVs)
- Deleciones
- Inversiones
- Duplicaciones



Variaciones en el Genoma Humano



❖ Variantes de Nucleótidos Simples - Simple Nucleotide Variants (SNVs):

- Polimorfismos de una sola base - Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)
- Pequeñas InDels (1-10 bp)
- Microsatélites (2-9bp)

**PCR,
Secuenciación
Sanger / NGS**

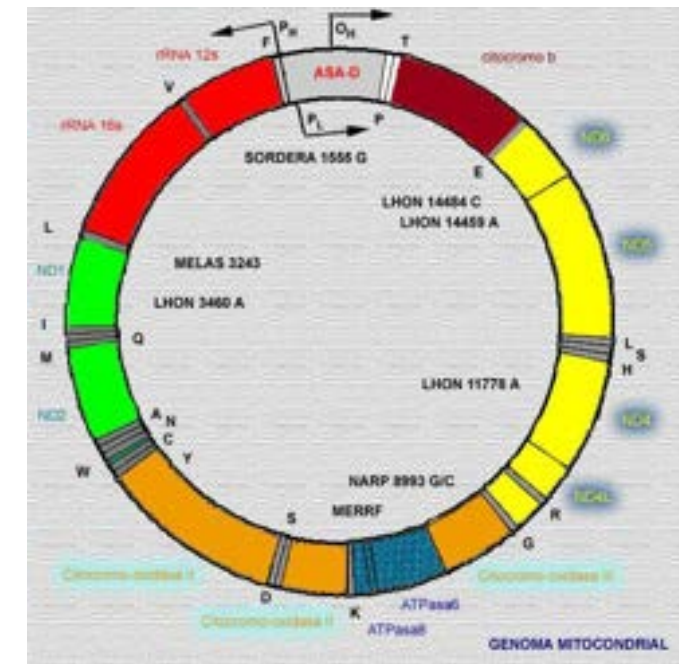
❖ Variantes Estructurales:

- Variantes de Número de Copias - Copy-Number Variants (CNVs)
- Deleciones
- Inversiones
- Duplicaciones

**aCGH, FISH,
MLPA**

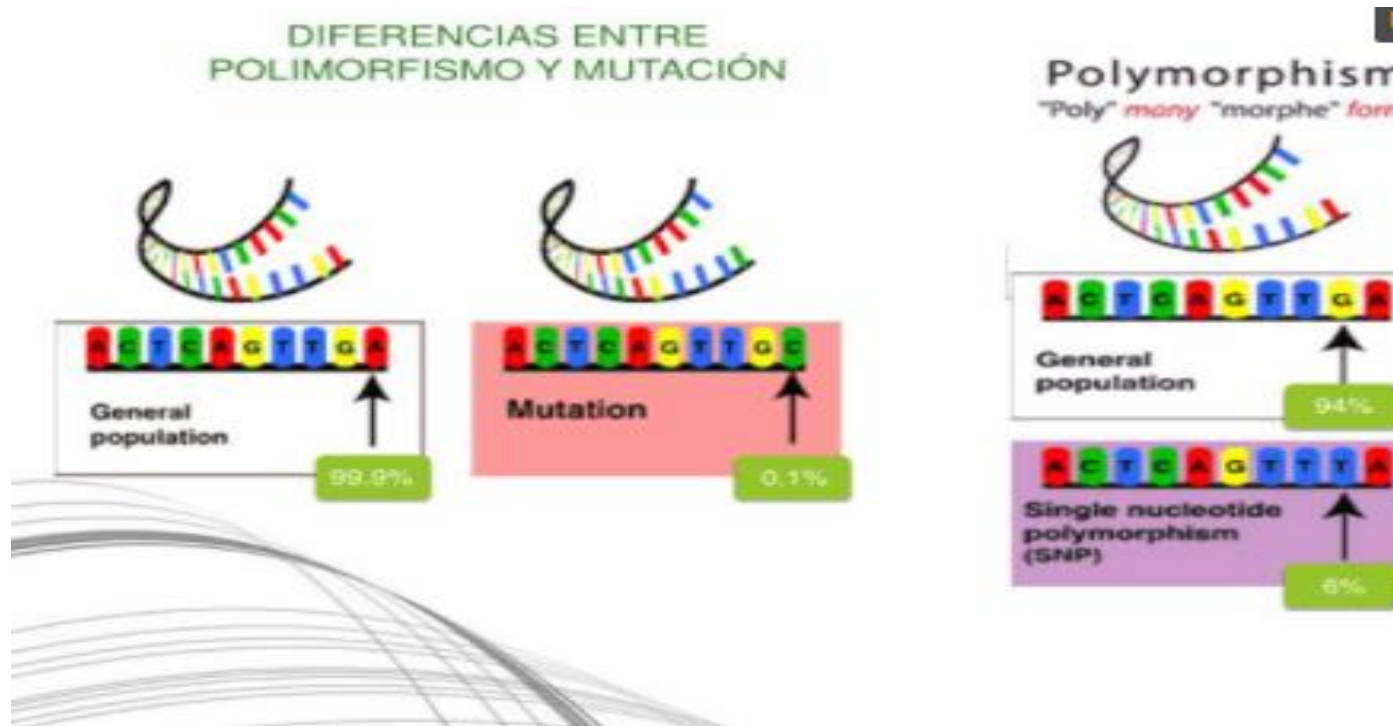
Genoma Mitocondrial

- El **ADN mitocondrial (ADNmt)** es una molécula de ADN circular de 16569 bp que contiene 37 genes.
- La herencia es materna, debido a que durante la fecundación el gameto que aporta las mitocondrias es el óvulo.
- **Heteroplasmia:** En general cada persona tiene un único genoma mitocondrial, sin embargo, en ciertas ocasiones una misma célula puede tener mitocondrias con **diferentes moléculas de ADNmt**.
- **Alteraciones en el ADNmt** están asociadas con trastornos multi-sistémicos, ej: Sme de MELAS, neuropatía hereditaria de Leber, etc.



Mutaciones vs Polimorfismos

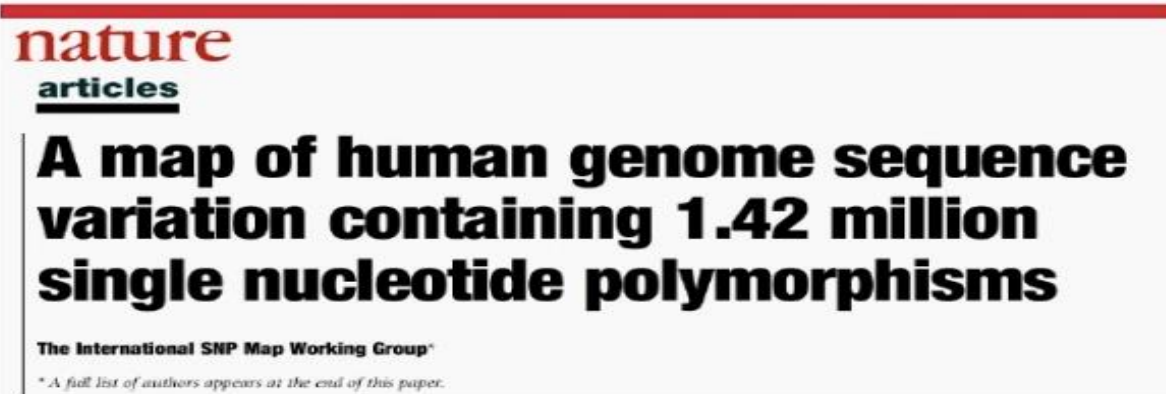
POLIMORFISMO GENÉTICO: cambio en la secuencia del ADN en donde al menos dos secuencias diferentes pueden estar presentes, cada secuencia presente en al menos 1% de la población sin asociarse en forma directa con el desarrollo de enfermedad



MUTACION: MAF (Minor allele frequency) < 1%

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

Mutaciones vs Polimorfismos



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.

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**

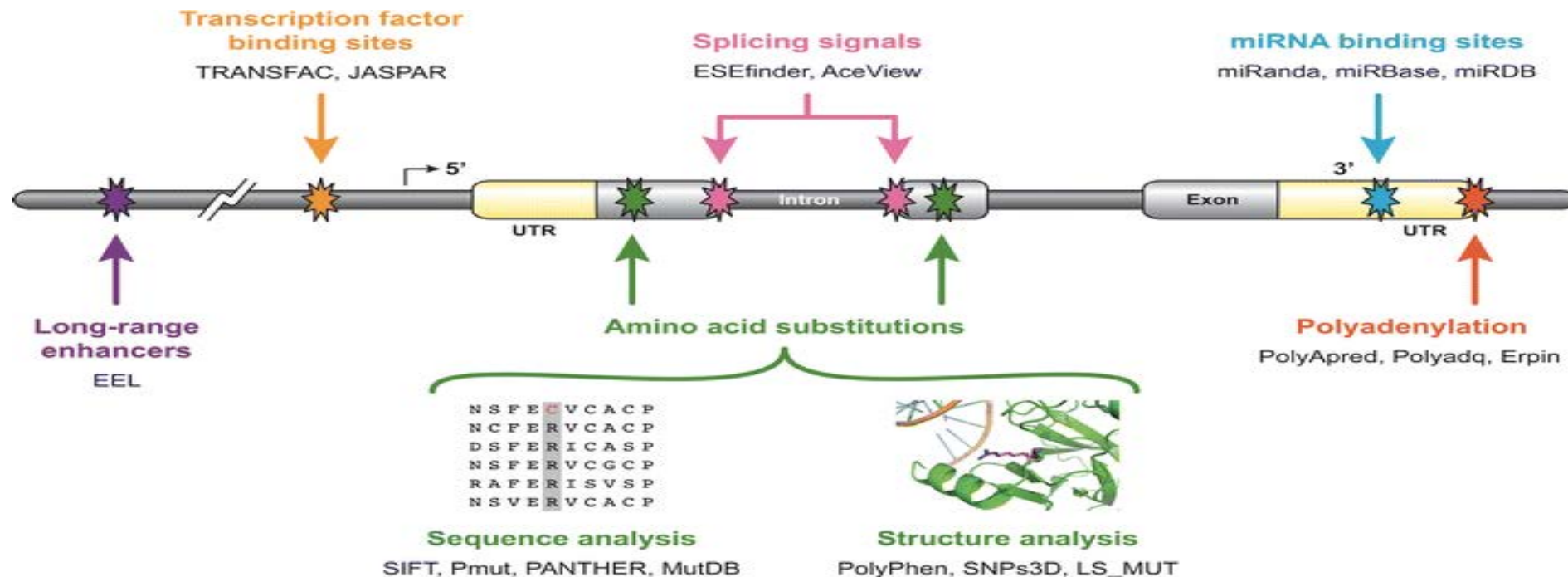
Estas variaciones en la secuencia del ADN pueden afectar la respuesta de los individuos a enfermedades hereditarias, enfermedades infecciosas y respuesta a fármacos

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 intrónicas, 5'UTR, 3'UTR, promotora. Consecuencias en el proceso de traducción (*splicing*, factores de transcripción) > **Reguladores**



Variantes



[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](#)

PMCID: PMC4544753

NIHMSID: NIHMS697486

PMID: [25741868](#)

Author Manuscript

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.

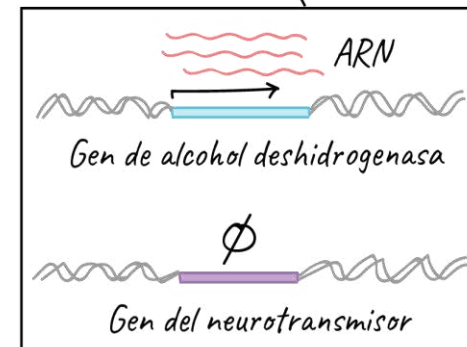
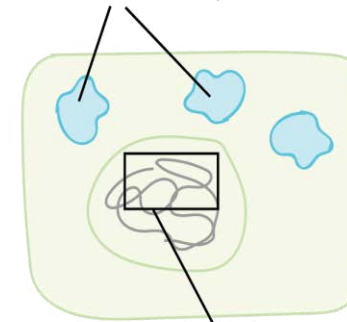
REGULACIÓN GÉNICA

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**.

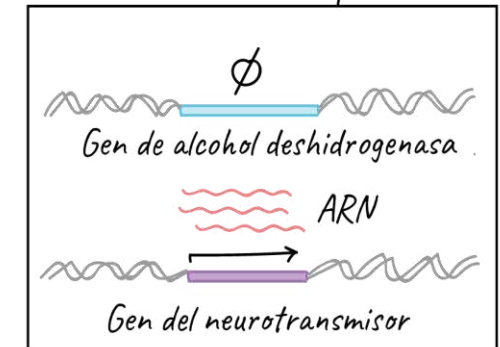
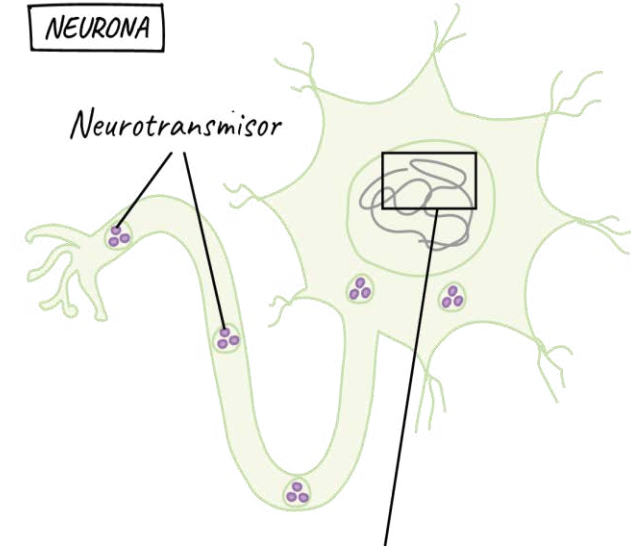
CÉLULA DEL HÍGADO

Alcohol deshidrogenasa



NEURONA

Neurotransmisor



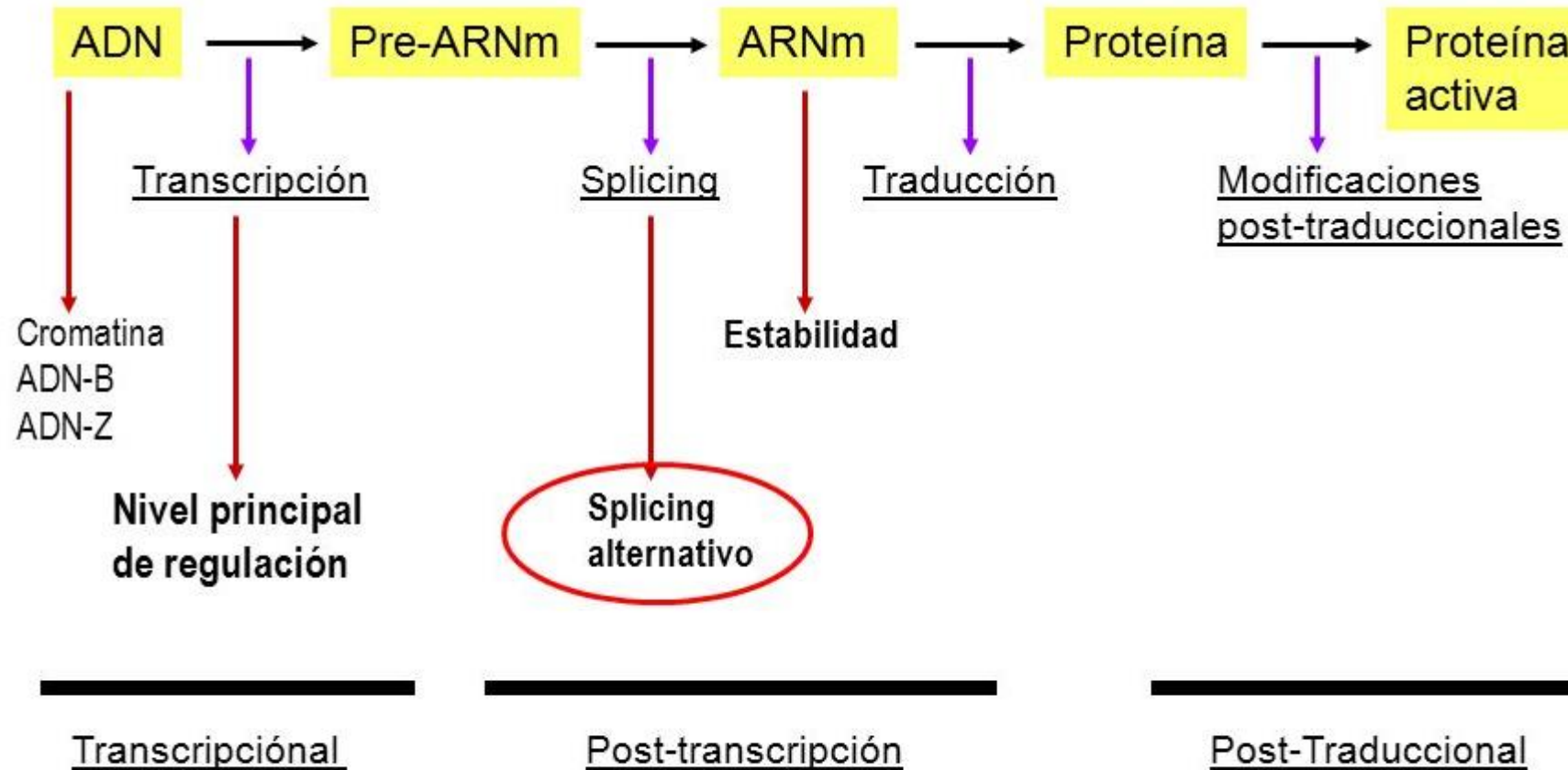
¿Cómo deciden las células cuales genes activar o desactivar?

¿Cómo deciden las células cuales genes activar o desactivar?

- Muchos factores pueden afectar qué genes expresa una célula.
- En general, 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 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

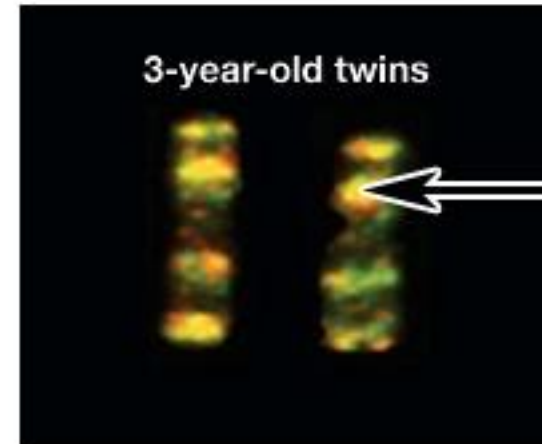
Definición



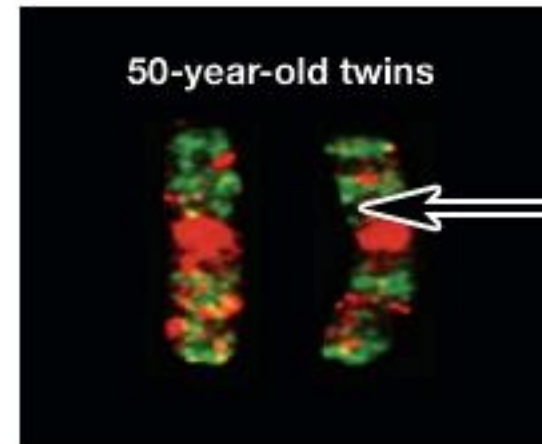
www.ncbi.nlm.nih.gov

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

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



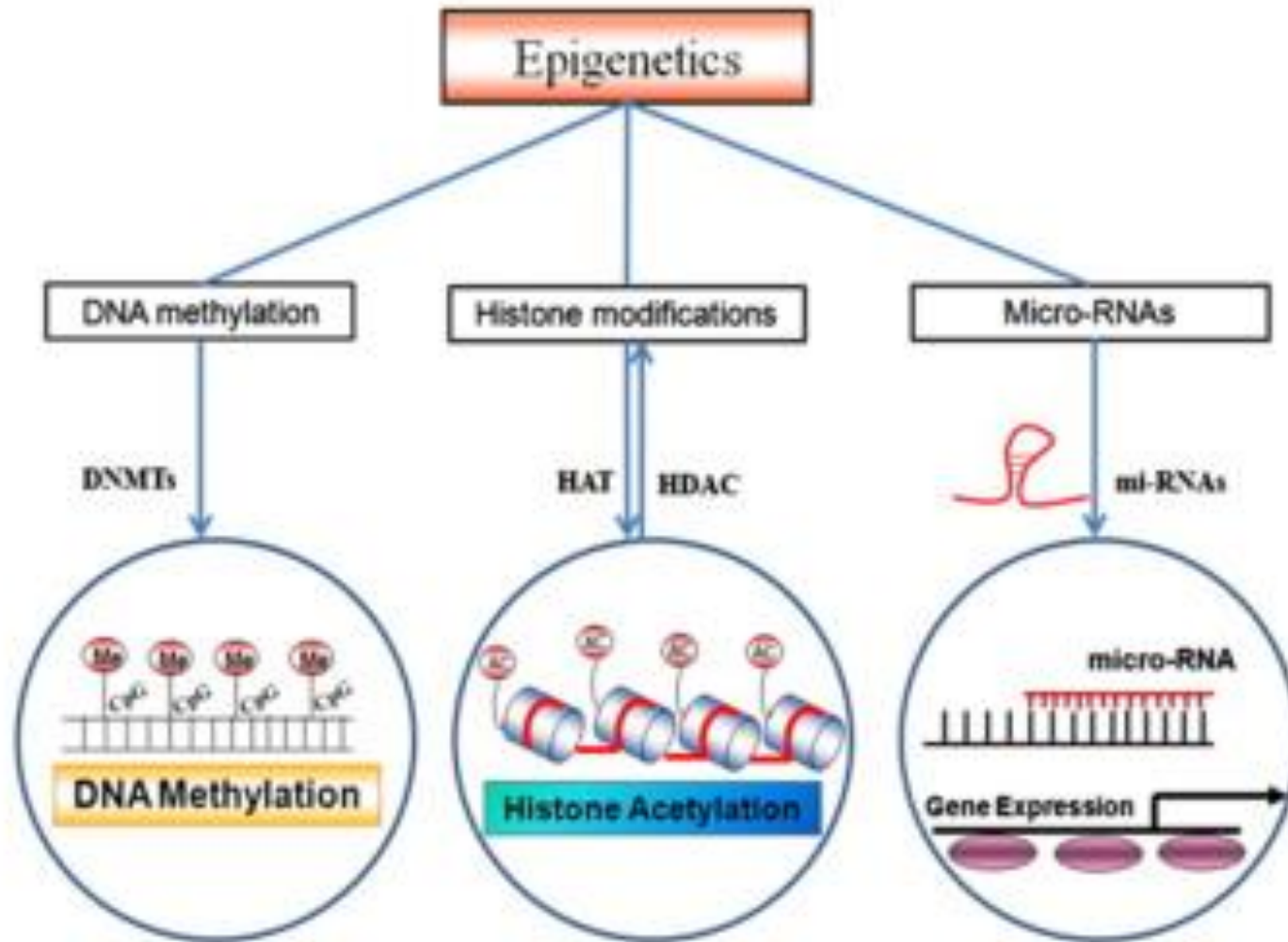
Yellow shows where the twins have epigenetic tags in the same place.



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

REGULACIÓN EPIGENÉTICA

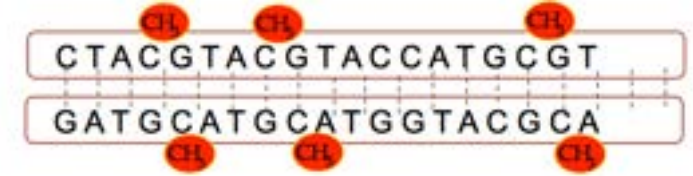
Definición



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 (-CH₃) 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.

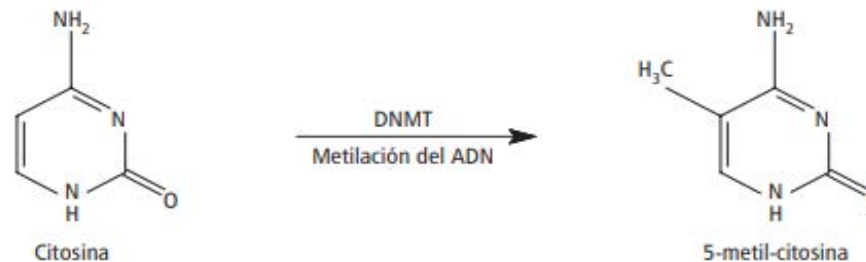


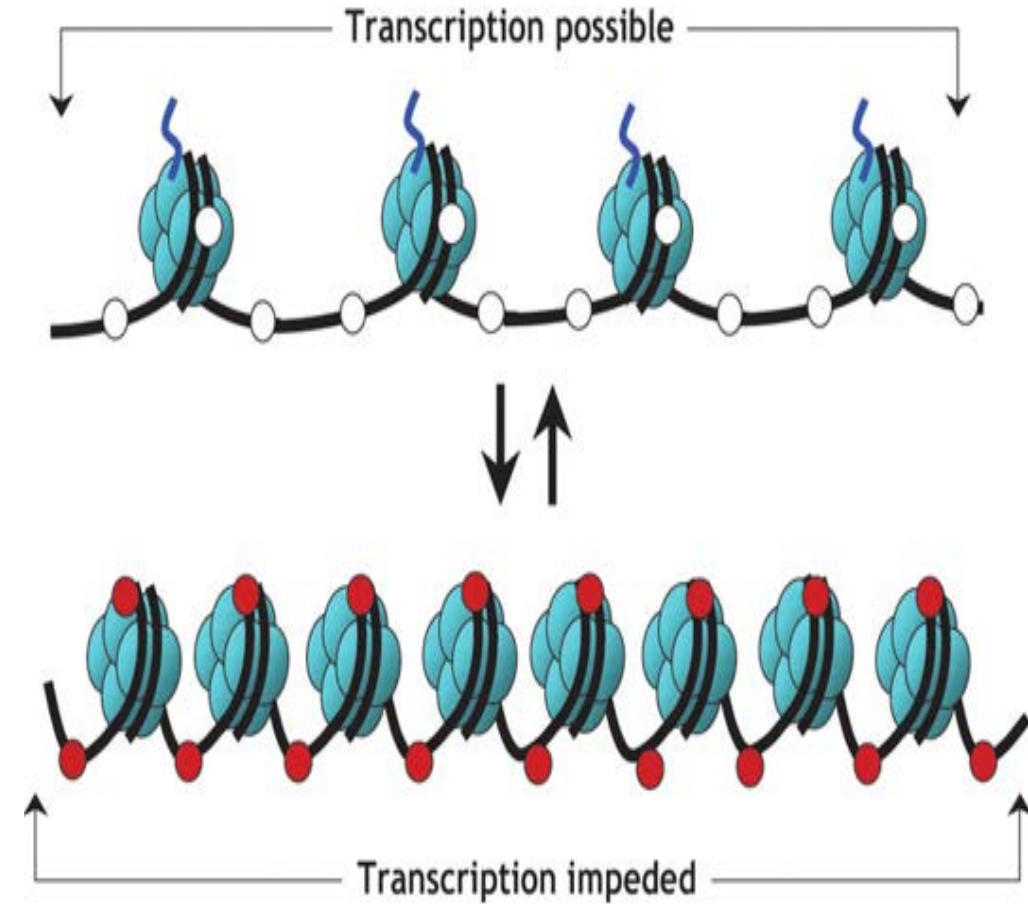
Figura 1: Metilación de la citosina del ADN mediante la ADN metiltransferasa (DNMT).

REGULACIÓN EPIGENÉTICA

Metilación del ADN

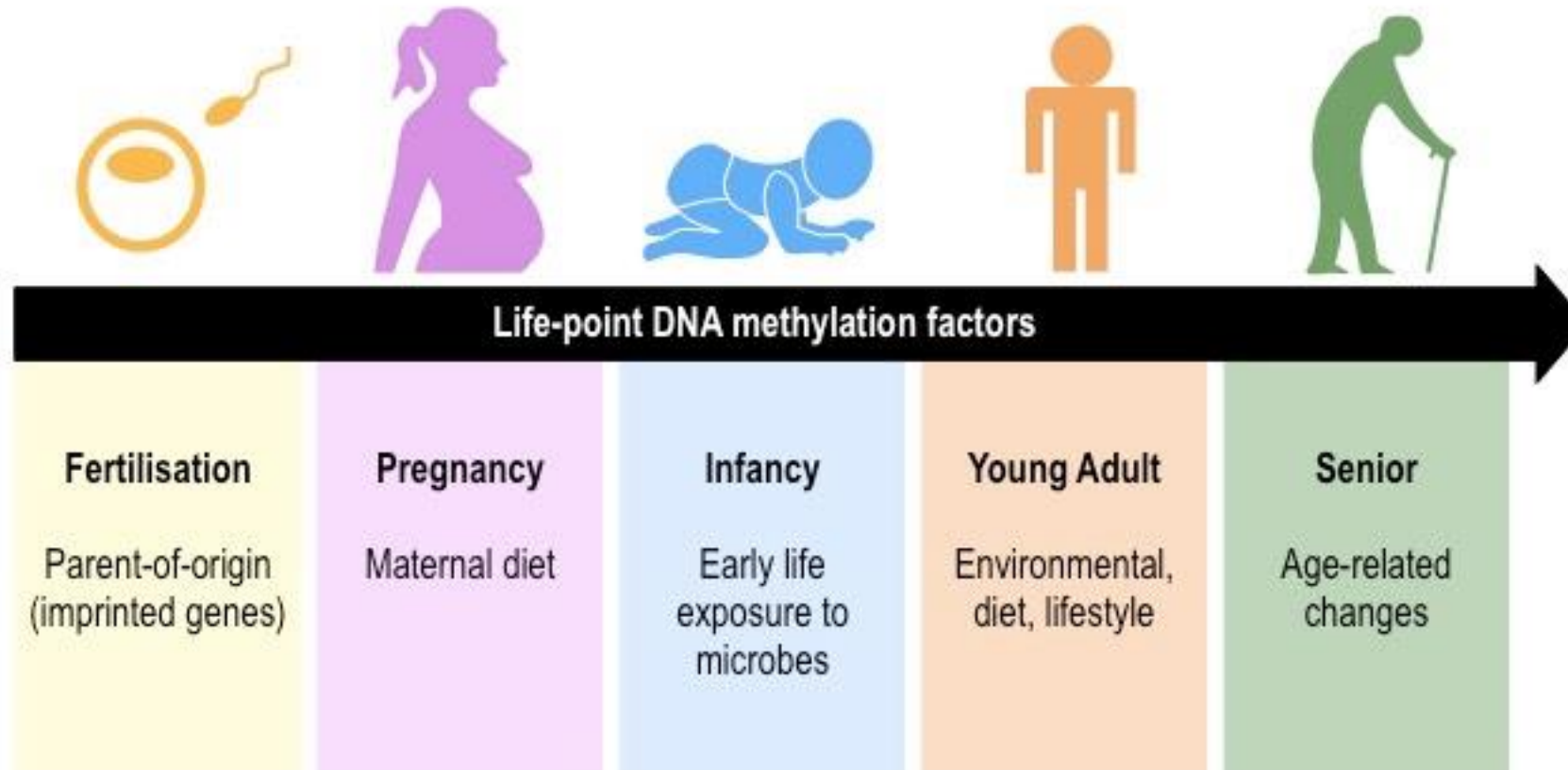
- Metilación del ADN
- Modificación post-traducciona de Histonas
- Silenciamiento de genes mediados por microARN

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

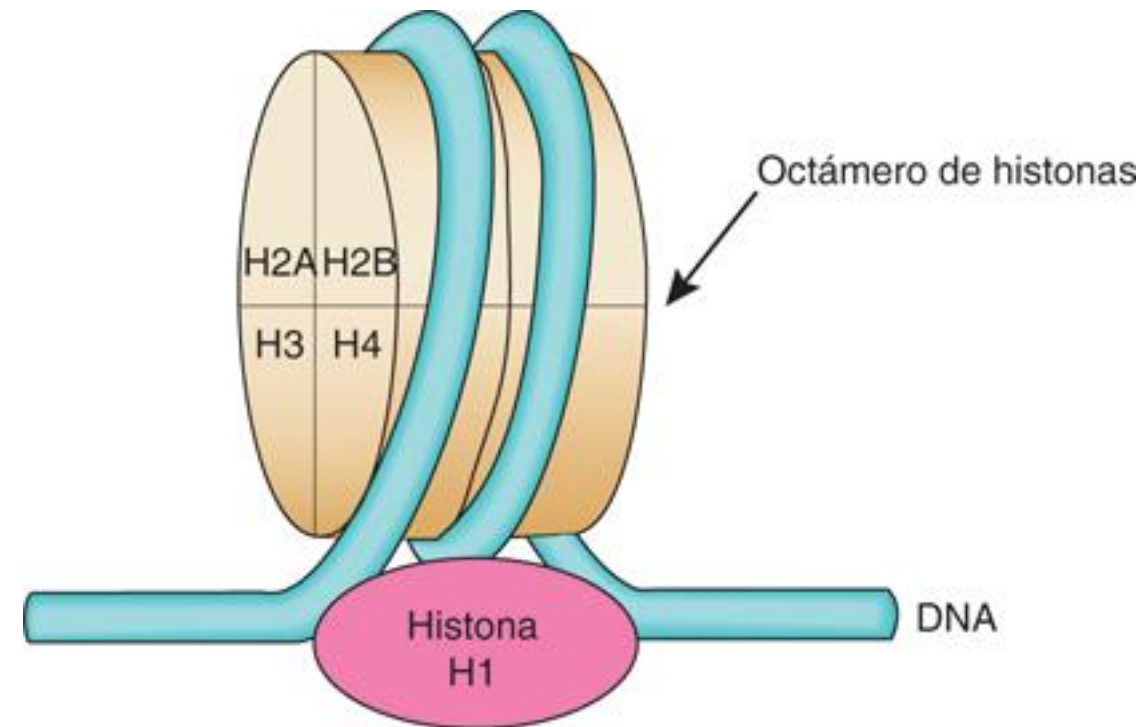
Modificación de Histonas

- 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

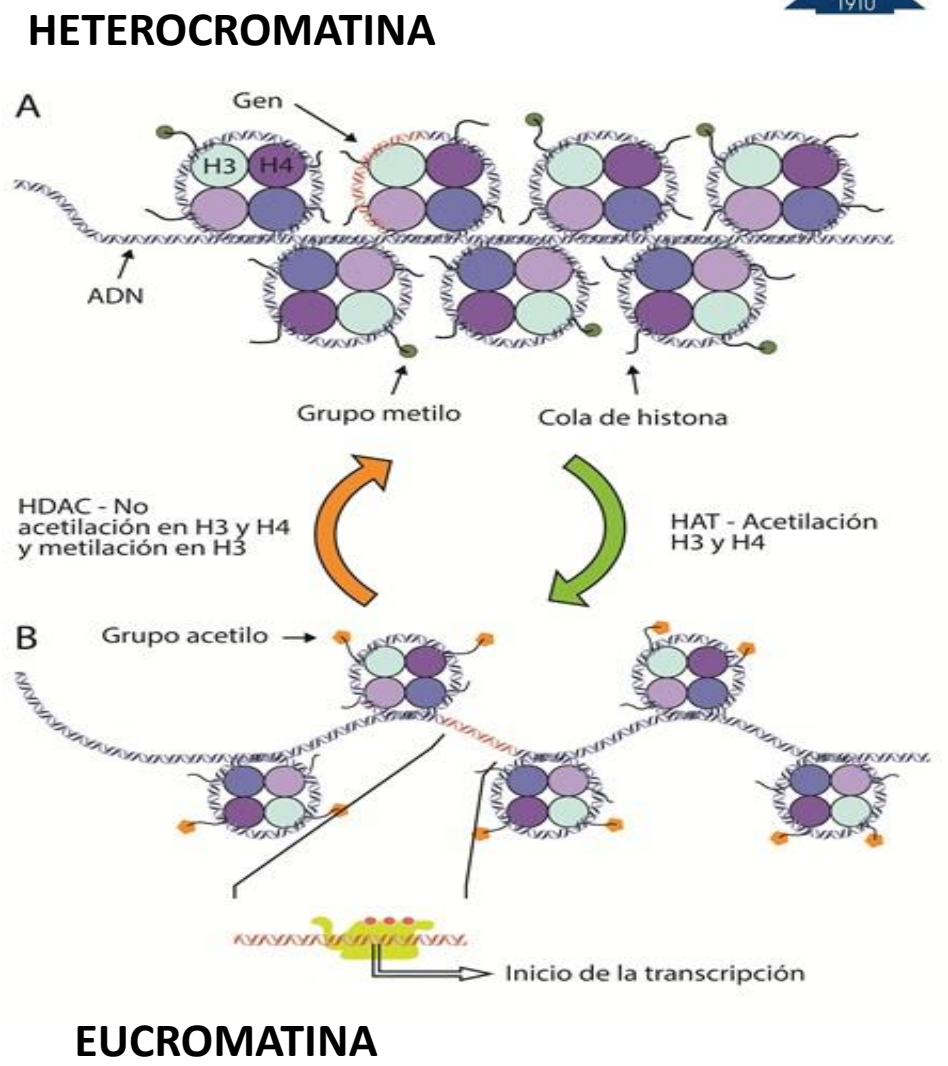
Modificación de Histonas

- 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



REGULACIÓN EPIGENÉTICA

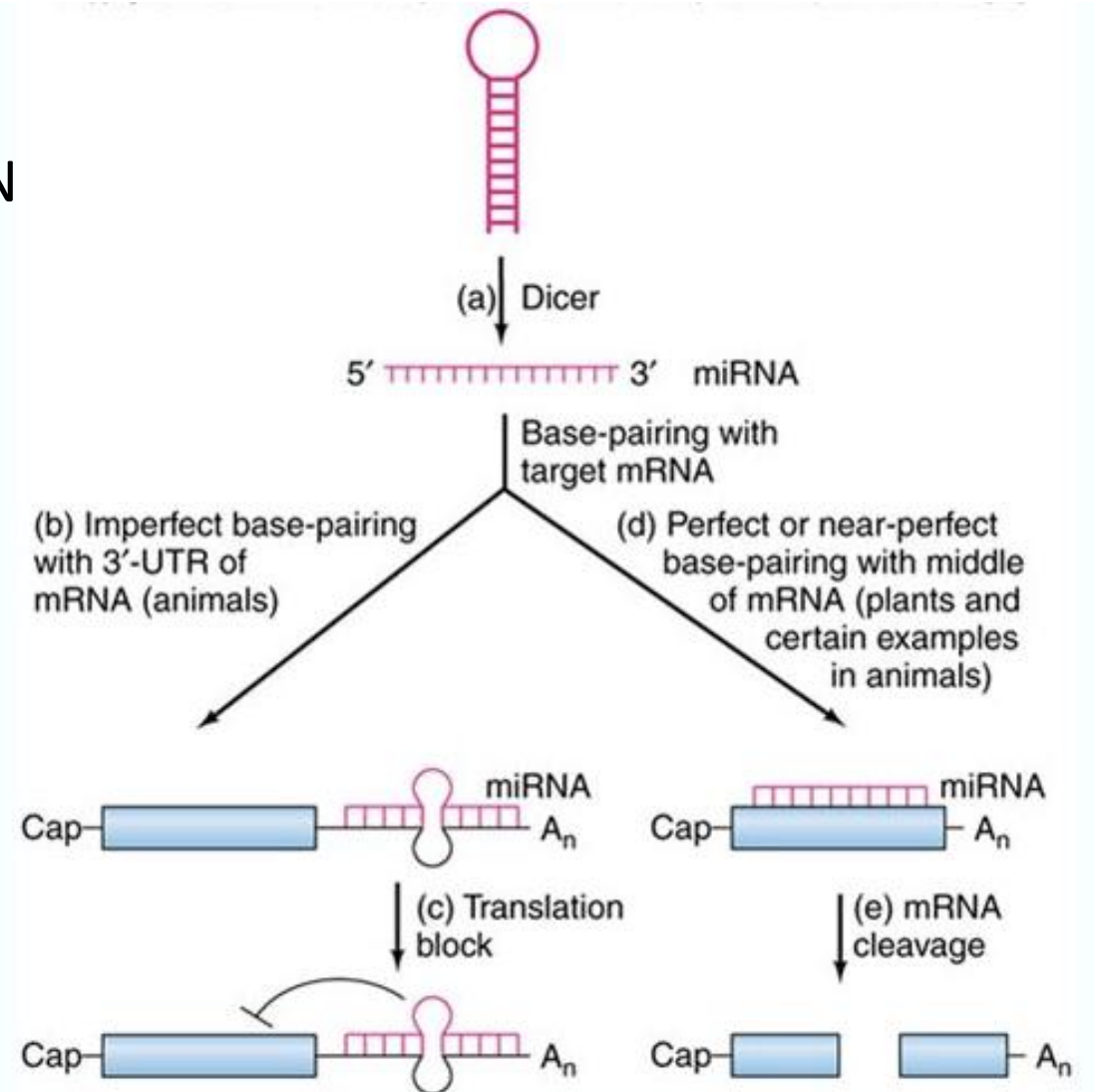
MicroARN (miARN)

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

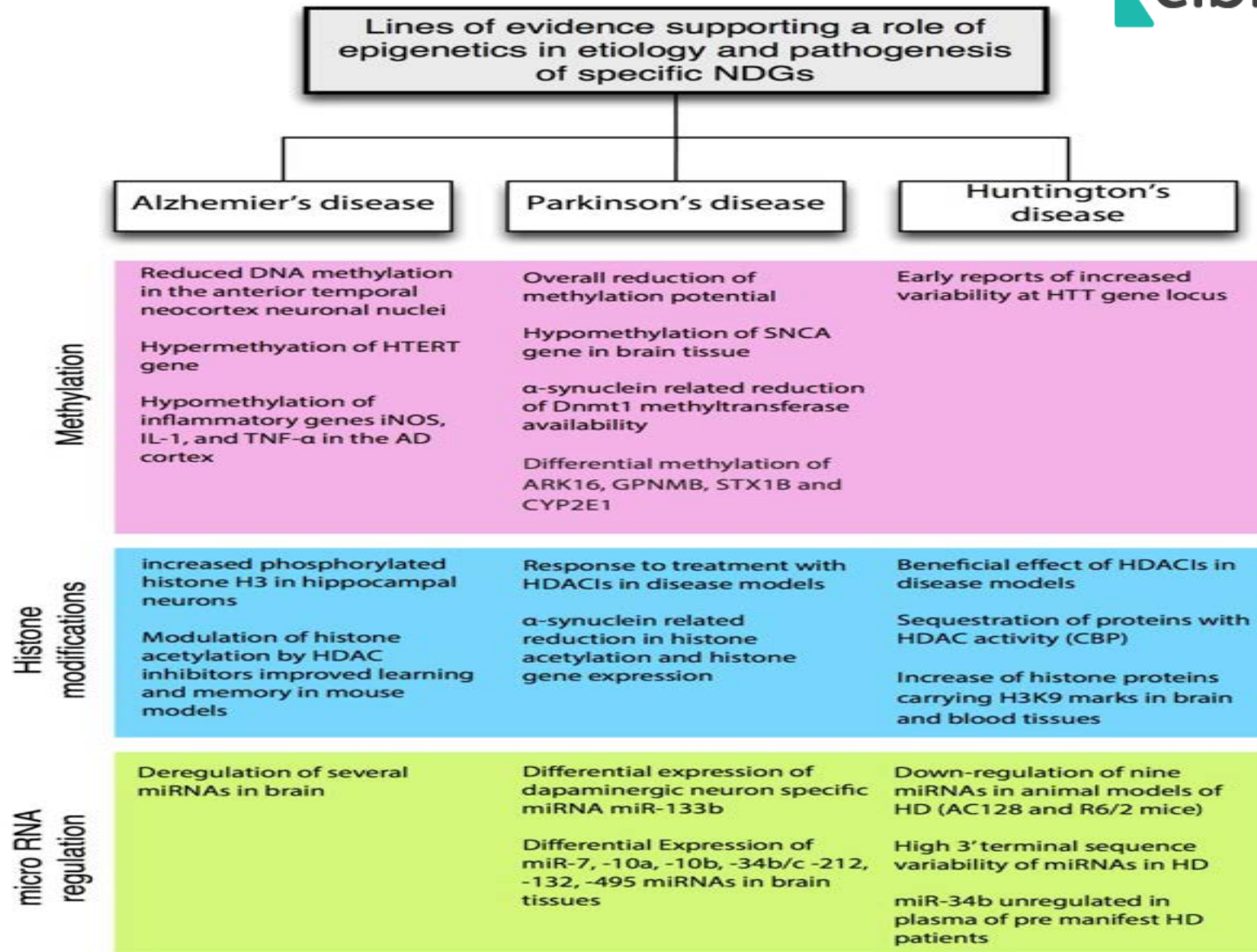
Son ARN pequeños de apenas **18 a 26 nt no codificantes**, su función es reguladora.

Hibridan complementado con sus secuencias blanco localizadas en las regiones 3'UTR de ARN mensajeros (mARN) específicos.

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



REGULACIÓN EPIGENÉTICA



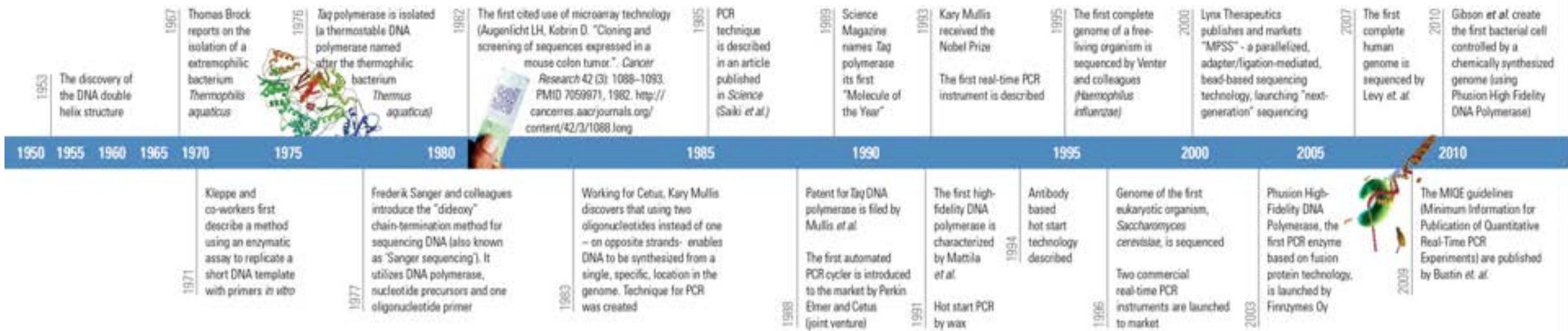
El **diagnóstico** es una etapa crítica en el manejo de un paciente, que implica decisiones médicas que definirán el progreso del cuidado de un individuo.

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.

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

Se han desarrollado **técnicas moleculares** que pueden ser 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

HEREDITARY CANCER SYNDROMES

ASSAYS

- RECURRENT MUTATIONS (PCR)
- SINGLE-GENE ANALYSIS (SANGER SEQUENCING, MLPA)
- MULTIGENE PANELS (NGS)
- WHOLE EXOME SEQUENCING

CANCER PATIENTS

- RISK OF 2ND MALIGNANCY
- CHOICE OF TREATMENT

HEALTHY PEOPLE

- IDENTIFICATION OF SUBJECTS AT-RISK

PREDICTIVE MARKERS

ASSAYS

- DNA
- RNA
- PROTEINS
- CELLS
- TISSUE SLICES
- PDXs

MOLECULAR TARGETS

- HER2
- EGFR-MUT
- BRAF-MUT
- ALK
- ROS

TUMOR PHENOTYPES

- MSI-H
- BRCAness
- MUTATION BURDEN

CIRCULATING TUMOR FRAGMENTS

ASSAYS

- CTCs
- ctDNA
- RNA
- PROTEINS

CANCER PATIENTS

- CONTROL OF TUMOR ERADICATION
- MONITORING OF TUMOR BURDEN
- CHOICE OF THERAPY

HEALTHY PEOPLE

- EARLY DIAGNOSIS

CARCINOMAS OF UNKNOWN PRIMARY

ASSAYS

- SINGLE MARKERS
- INTEGRATIVE ASSAYS

TISSUE-SPECIFIC MARKERS

- RNA
- PROTEINS

TUMOR-SPECIFIC MARKERS

- POINT MUTATIONS
- GENE REARRANGEMENTS
- COPY NUMBER VARIATIONS



¡Muchas gracias!

agomez@cibic.com.ar



www.heritas.com.ar



info@heritas.com.ar



Héritas



HeritasArg