

26

Aplicación de técnicas de extracción de ácidos nucleicos

● INTRODUCCIÓN

El **ácido desoxirribonucleico (ADN)** es la molécula orgánica que codifica la herencia. El análisis de los genes, formados por cadenas de ADN, mediante diversas técnicas de genética molecular, permite el diagnóstico rápido y preciso de muchas enfermedades hereditarias. Estas técnicas tienen un papel crucial a diario en los laboratorios clínicos y el técnico especialista de laboratorio (TEL) desempeña una función esencial. La obtención de ADN de óptima calidad y pureza a partir de diferentes tipos de especímenes o muestras de pacientes, en la fase preanalítica, es un punto crítico que se debe controlar para lograr un resultado, después de aplicar las técnicas de genética molecular en el laboratorio, que facilite el diagnóstico de diferentes enfermedades o síndromes genéticos.

- Estructura y extracción del ADN
- Enzimas de restricción
- Mutación
- Polimorfismo
- Estructura y extracción del ARN



● CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

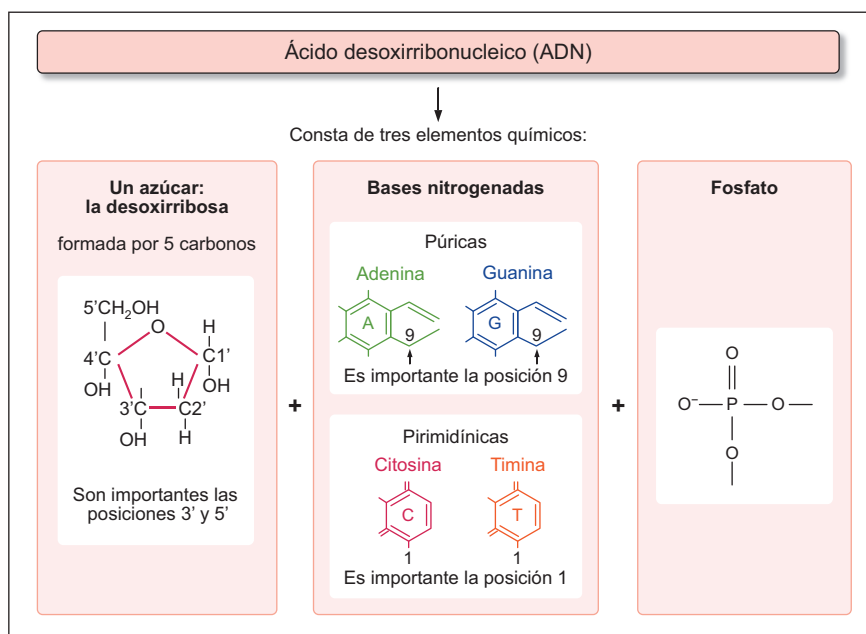
El ADN es un polímero de alto peso molecular, cuyas unidades monoméricas son los desoxirribonucleótidos; tiene como función principal mantener, a través del código genético, la información necesaria para engendrar un ser vivo idéntico a aquel del que proviene. El ADN que se encuentra en las células está formado por dos cadenas de nucleótidos (dos largas cadenas enrolladas una sobre la otra, que componen una doble hélice), una de las cuales va en sentido opuesto y se conoce como cadena complementaria. En la estructura del ADN se halla la unión de un nucleósido más un **grupo fosfato** o más de uno, es decir, que consta de tres elementos químicos (Fig. 26-1). El **nucleósido** que integra el ADN es la unión de una **pentosa** (azúcar) con una **base nitrogenada**. Los nucleótidos se unen para formar la cadena de ADN. El enlace se efectúa entre el carbono 3' de la pentosa con el fosfato del siguiente nucleótido, de tal forma que la cadena crece en dirección 5' a 3'. Se empareja específicamente la adenina (A) con la timina (T) y la guanina (G) con la citosina (C). Entre la A y la T se forman dos enlaces (puentes de hidrógeno) y tres enlaces (puentes de hidrógeno) entre la G y C. La unión G-C es más fuerte que la unión A-T. La doble cadena es estable, porque hay la misma distancia entre los enlaces A-T y G-C. En el ADN bicatenario las proporciones A:T y G:C son siempre igual a 1. Las bases unidas a las desoxirribosas de cada cadena quedan hacia dentro de la doble hélice, perpendicularmente a su eje y se aparean formando puentes de hidrógeno, A frente a T y G frente a C (Fig. 26-2). El esqueleto desoxirribosa-fosfato es hidrófilo, mientras que las bases del interior de la hélice son hidrófobas.

El **ácido ribonucleico (ARN)** está formado por un solo filamento (cadena) de nucleótidos, es **monocatenario**; la pentosa es una ribosa y posee uracilo (U) en lugar de T (Fig. 26-3). Es un polímero de ribonucleótidos. Los enlaces químicos para formar un nucleósido y un nucleótido son los mismos que en el ADN. La cadena de ARN, igual que la de ADN, crece en sentido 5' a 3'. Existen varios tipos de ARN;

El técnico especialista de laboratorio (TEL) desempeña un papel clave en la obtención de ADN de calidad para su posterior análisis mediante diferentes técnicas moleculares.

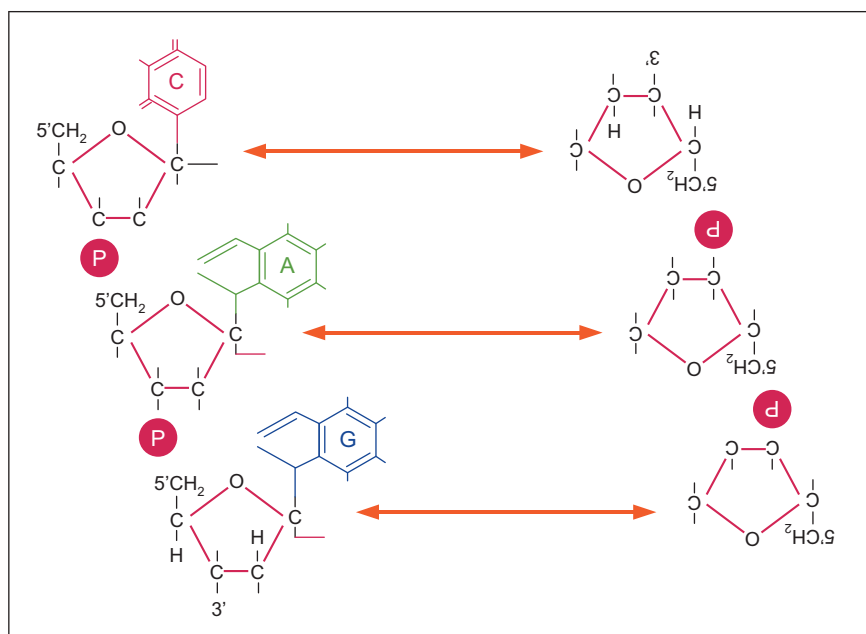


► **Figura 26-1.** Componentes químicos en la estructura del ADN.

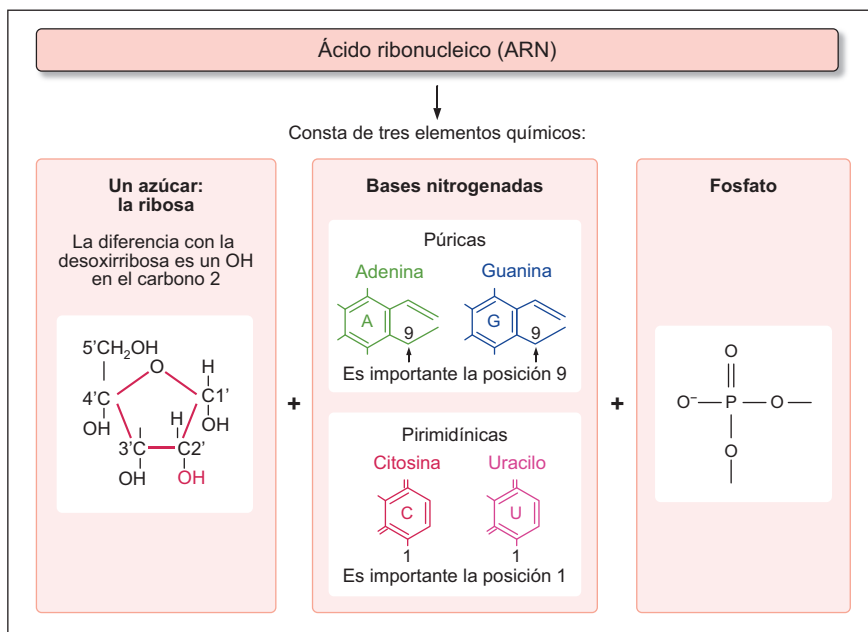


todos ellos tienen la misma composición química, pero ejercen distintas funciones: **ARN mensajero (ARNm)**, **ARN ribosómico (ARNr)** y **ARN de transferencia (ARNt)**.

- **ARNm:** contiene información para dirigir la síntesis de una proteína específica o más de una. La información se encuentra en grupos de tres nucleótidos o **codón**, los cuales determinan el aminoácido que ha de incorporarse en la proteína que se va a sintetizar. El nombre de mensajero deriva de su papel de intermediario, porque actúa como vehículo de transporte de la información genética entre el ADN y las proteínas.
- **ARNt:** interviene en la síntesis de proteínas y complementa la función del ARNm. Contiene entre 75 y 90 nucleótidos dispuestos en forma de trébol. Cada ARN tiene



► **Figura 26-2.** Estructura de doble cadena del ADN.



◀ **Figura 26-3.** Elementos químicos que integran la estructura del ARN.

una secuencia de tres nucleótidos o **anticodón** y está unido a un aminoácido específico. La secuencia del anticodón es complementaria a la del codón del ARNm y determina que cada codón sea leído como un aminoácido específico por el ribosoma. Los ARNt son un grupo de moléculas que actúan como transportadoras y activadoras de los aminoácidos en el proceso de la biosíntesis de una proteína.

- **ARNr:** es el más abundante en las células y desempeña una función estructural como componente de un importante complejo supramolecular llamado ribosoma. Los ribosomas, formados por proteínas (40%) y ARNr (60%), participan activamente en la lectura de la molécula de ARNm para sintetizar las proteínas que contiene la secuencia de codones del ARNm.

La **duplicación o replicación del ADN** es el proceso que permite copiar exactamente las dos hebras de ADN. El primer paso es el desenrollamiento de la doble hélice y la separación de las dos hebras de ADN. La helicasa es la enzima responsable de la separación de las dos hebras de ADN. El paso siguiente es la síntesis de las nuevas cadenas de ADN en cada una de las hebras. La ADN polimerasa es la enzima que permite esta síntesis.

La **transcripción** es la formación del ARNm, que supone la síntesis de nucleótidos complementarios sobre una sola hebra del ADN. La hebra de ADN actúa como molde o patrón (en inglés, *template*). Consta de tres fases:

1. **Iniciación:** tiene lugar la activación de la zona promotora y desenrollamiento de la hélice de ADN.
2. **Elongación:** sobre una de las hebras del ADN empieza la síntesis de una cadena de ARN. No se sintetizan con T, en su lugar se incorpora U. La ARN polimerasa es la enzima que cataliza estas reacciones.
3. **Terminación:** se produce el *splicing*, que implica la pérdida de intrones y la formación del ARNm definitivo. Tras el *splicing*, el ARNm está listo para desplazarse al citoplasma.

La secuencia de nucleótidos es la forma química de cifrar la información para elaborar una proteína, que luego es descifrada por los ribosomas y los ARNt. Existen 64 combinaciones posibles de las 4 bases nitrogenadas y sólo 20 aminoácidos en las proteínas. Cada codón codifica para un solo aminoácido, pero un aminoácido puede estar codificado por varios triplete de bases nitrogenadas.

El número de exones y de intrones varía, pero cada gen tiene un número determinado de exones e intrones.



Los **ácidos nucleicos** tienen propiedades ácido-base, gracias a los grupos fosfato y las bases nitrogenadas.



En el proceso de **traducción** tiene lugar la síntesis de proteínas, que consta de tres fases: la **activación de los aminoácidos** previa a la síntesis de proteínas, la **iniciación y elongación** y, por último, la **terminación**. A medida que se van sintetizando las proteínas adquieren la estructura secundaria y terciaria que les corresponde.

Todas las células del organismo comparten el mismo ADN, pero no todas transcriben el mismo ARN. El ADN se localiza en el núcleo o en las mitocondrias, tiene capacidad de mutación y es el que contiene la información genética. En cambio, el ARN se localiza en el citoplasma y participa en la traducción de proteínas. Un gen es una secuencia de intrones (secuencias de nucleótidos que separan los exones y que no codifican para las proteínas) y exones (secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas) (Fig. 26-4).

● PROPIEDADES FÍSICAS RELACIONADAS CON LAS TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

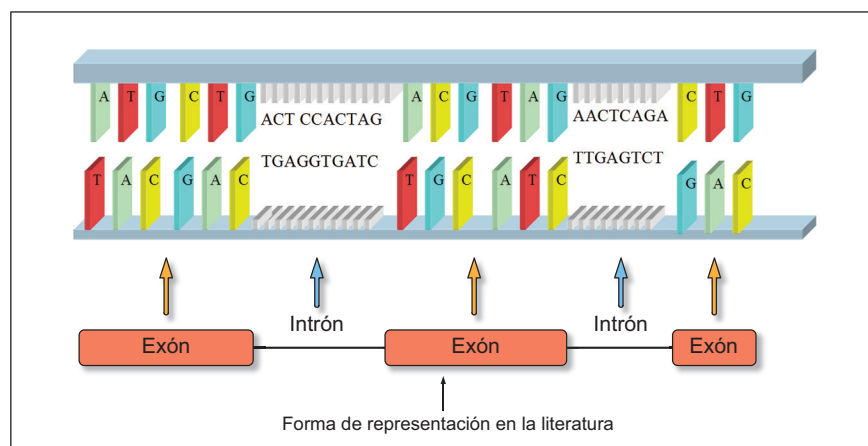
Los ácidos nucleicos son solubles en agua, por su carácter polar, e insolubles en disolventes orgánicos. Al pH celular, los grupos fosfato se encuentran con carga negativa, neutralizados con iones Ca^{2+} , Mg^{2+} y los grupos positivos de las proteínas básicas. Las bases púricas y pirimidínicas mantienen la doble hélice del ADN mediante enlaces de hidrógeno entre los pares (A-T y G-C), que alcanza la máxima estabilidad a pH comprendido entre 4 y 7. Fuera de estos límites fisiológicos, la doble hélice de ADN se hace inestable y se pierde.

La viscosidad es mayor en el ADN que en el ARN y la densidad es mayor en el ARN que en el ADN.

Otra propiedad característica es la absorbancia, que puede variar según la estructura de los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta con un máximo alrededor de 260 nm, debido a las bases nitrogenadas. La absorbancia aumenta de ADN de doble cadena a ADN de una sola cadena, es decir, que la absorbancia es mayor en los ácidos nucleicos de cadena sencilla que en los de doble cadena.

Entre las propiedades físicas del ADN destacan la desnaturalización, que es la rotura de la doble hélice del ADN para dar lugar a dos cadenas sencillas. El tratamiento del ADN de doble cadena con calor, ácidos o bases, u otros agentes químicos, provoca su desnaturalización. Durante este proceso se rompen los enlaces no covalentes y se separan las dos hebras. Se denomina temperatura media de fusión (T_m) aquella a la que se desnaturaliza el 50% de la doble cadena. La temperatura de desnaturalización es la temperatura a la que el 50% del ADN está desnaturalizado y, puesto que la unión G-C es más fuerte que la unión A-T, es más difícil de romper. Por este motivo, la temperatura de desnaturalización depende de la cantidad de G-C que tiene una secuencia determinada. La T_m es un reflejo de la composición promedio de un ADN.

El **efecto hipercrómico** es el incremento de absorbancia que se produce cuando una solución de ADN de doble hélice pierde esta estructura.



► **Figura 26-4.** Secuencia de intrones y exones en la estructura del ADN.



● ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN Y OTRAS ENZIMAS ASOCIADAS A LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

En las diferentes técnicas utilizadas en los laboratorios de genética molecular se pueden emplear diferentes tipos de enzimas. Destacan las endonucleasas de restricción (ER), las ADN ligasas, las ADN polimerasas y la transcriptasa inversa:

- **Endonucleasas de restricción:** son enzimas que hidrolizan enlaces fosfodiéster de ADN de doble hebra en secuencias específicas. Sus nombres se basan en los nombres científicos de las bacterias de las cuales se extrajeron. La nomenclatura consiste en tres o cuatro letras, más un número romano: las primeras letras corresponden al nombre de la bacteria. La primera letra mayúscula es la inicial del género, la segunda y tercera letras se corresponden con el nombre de la especie y la cuarta letra, que es opcional, refiere si es una cepa especial. El número romano indica el orden histórico de las enzimas descubiertas en esa bacteria. Algunos ejemplos son:
 - EcoRI (de *Escherichia* (género) *coli* (especie), cepa RY13, primera descubierta).
 - HindIII (de *Haemophilus influenzae*, cepa d, tercera que se aisló).
 - NotI (de *Nocardia otitidis*, primera que se aisló).
 - BamHI (de *Bacillus amyloliquefaciens*, cepa H, primera que se aisló).

Las ER son proteínas que reconocen secuencias concretas de ADN, denominadas dianas de restricción, con actividad endonucleasa (cortan la doble hélice). En algunos casos las mutaciones codifican las secuencias que son diana de las ER. El estudio del ADN con una determinada ER, cuya diana se ve afectada por la mutación, permite comprobar si los fragmentos de ADN contienen dicha mutación o no. Las ER fragmentan el ADN en partes siempre iguales y previsibles, por lo que una mutación en una zona de restricción altera ese corte y, por lo tanto, el tamaño del fragmento. Casi todas las secuencias de nucleótidos que reconocen las enzimas de restricción poseen un eje de simetría impropio, esto es, que la lectura de las secuencias en ambas direcciones es idéntica, lo que recibe el nombre de palíndromo.

Las ER cortan el ADN, generando extremos 3' o 5', monocatenarios, de unos cuatro nucleótidos de longitud, denominados extremos cohesivos o extremos romos.

- **ADN ligasas:** son enzimas que forman enlaces covalentes entre el extremo 5' de una cadena polinucleotídica y el extremo 3' de otra cadena polinucleotídica. También se denominan enzimas de unión de polinucleótidos.
- **ADN polimerasas:** intervienen en la replicación del ADN para dar a cada célula hija una copia del ADN original en el proceso de la mitosis. Llevan a cabo la síntesis de la nueva cadena de ADN emparejando desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) con los desoxirribonucleótidos complementarios que corresponden del ADN molde. Los dNTP que se usan en la replicación del ADN contienen tres fosfatos unidos al grupo hidroxilo 5' de la desoxirribosa y, depende de la base nitrogenada, serán dATP, dTTP, dCTP o dGTP. La reacción fundamental es una transferencia de un grupo fosfato en la que el grupo hidroxilo 3'-OH actúa como nucleófilo en el extremo 3' de la cadena que está en crecimiento. Las ADN polimerasas también realizan otras funciones durante el proceso de replicación. Además de participar en la elongación, desempeñan una función correctora y reparadora gracias a su actividad exonucleasa 3', que les confiere la capacidad de degradar el ADN partiendo de un extremo de éste. Es muy importante la existencia de estos mecanismos de corrección, ya que de lo contrario los errores que se producen durante la copia del ADN darían lugar a mutaciones.
- **Transcriptasa inversa o retrotranscriptasa:** es una enzima de tipo ADN polimerasa cuya función es sintetizar ADN de doble cadena utilizando como molde ARN monocatenario, es decir, catalizar la retrotranscripción o transcripción inversa.

La rotura se produce en ambas hebras de ADN y es simétrica con respecto al eje de simetría binario.



MUTACIONES Y POLIMORFISMOS

Una **mutación** es cualquier alteración de la secuencia normal de un gen y un **polimorfismo** es una mutación que no tiene efectos adversos sobre la función del gen y no da lugar a un fenotipo alterado (enfermedad). Una mutación puede ser:

- **Germinal:** la presencia de un gen alterado en el óvulo o espermatozoide (célula germinal) que puede transmitirse a las generaciones siguientes.
- **Somática:** la alteración de un gen que ocurre en una célula no germinal del individuo y que, por lo tanto, no se transmitirá a su descendencia. Son mutaciones que se hallan generalmente en las células que forman los tumores.
- **De novo:** alteración de un gen que está presente por primera vez en un miembro de la familia como resultado de una mutación producida en una célula germinal (óvulo o espermatozoide) de uno de los progenitores.

El ADN del genoma humano no es una entidad estática e inalterable: la secuencia de bases del ADN, tanto nuclear como mitocondrial, es susceptible a una gran variedad de efectos que provocan cambios, denominados mutaciones, que pueden aparecer en cualquier célula, tanto de la línea germinal como de la somática. La variación en la secuencia genómica de las células germinales, que puede tener o no consecuencias clínicas, se comporta como un alelo segregable y permite describirla como un polimorfismo del ADN en la localización, el *locus*, en el que se encuentra cuando aparece en la población con una frecuencia superior al 1%. Sólo aquellas mutaciones que aparecen en las células de la línea germinal pueden ser perpetuadas de una generación a la siguiente y son la causa de las enfermedades hereditarias. Las mutaciones en el ADN nuclear de las células somáticas no se heredan y se asocian principalmente con el desarrollo del cáncer, mientras que las mutaciones adquiridas del ADN mitocondrial suelen asociarse a procesos degenerativos.

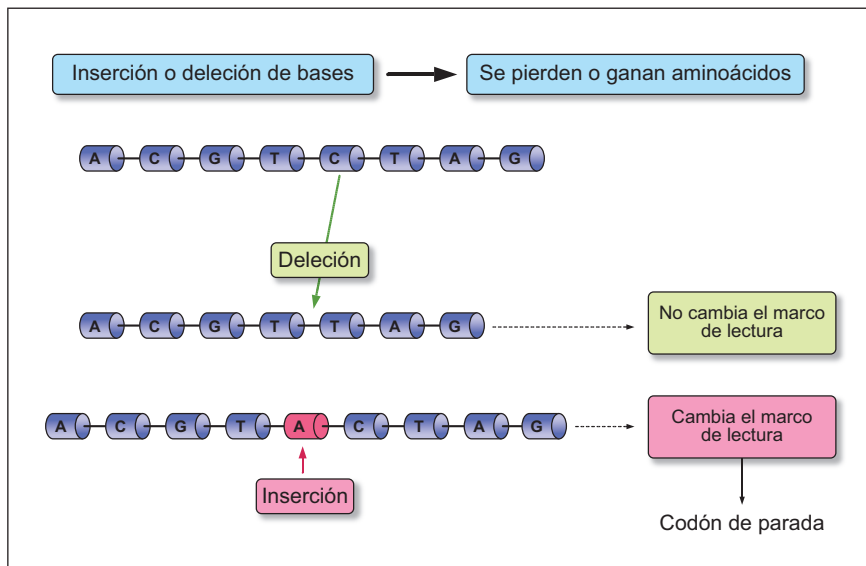
Las mutaciones pueden clasificarse en tres categorías: **genómicas**, **cromosómicas** y **génicas**. Las **génicas** se pueden clasificar atendiendo a su naturaleza y a los mecanismos genéticos, tal y como se refleja en la **tabla 26-1**. Tanto en las secuencias de ADN codificantes como en las no codificantes está favorecida la aparición de transiciones sobre las transversiones. En las inserciones un nucleótido o más de uno se insertan dentro de esa secuencia (**Fig. 26-5**).

Se pueden clasificar en general en dos grandes categorías: *a)* **mutaciones simples**, cuando las sustituciones, deleciones o inserciones afectan a una única secuencia de ADN, *b)* **mutaciones de intercambio**, cuando las mutaciones génicas son el resultado de mecanismos aberrantes que implican a varias secuencias de ADN y que pueden aparecer como consecuencia de: 1) **deslizamientos durante la replicación**, debido a apareamientos incorrectos entre secuencias repetidas en tándem, que provocan deleciones

Tabla 26-1. Clasificación de las mutaciones génicas

Sustitución de nucleótidos: Mutaciones puntuales que dan lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos, a un final anticipado de la traducción (proteína truncada) y a un cambio en el procesamiento del ARNm o en su regulación	Transiciones
	Una pirimidina (C o T) es sustituida por otra pirimidina o una purina (A o G) es sustituida por otra purina
Deleciones (pérdida) o inserciones (ganancia) de un pequeño número de nucleótidos	Transversiones
	Una pirimidina (C o T) es sustituida por una purina (A o G) y viceversa
	Deleciones
	Eliminación en una secuencia de un nucleótido o más de uno
	Inserciones
	Un nucleótido o más de uno se insertan dentro de una secuencia

A: adenina; ARNm: ácido ribonucleico mensajero; C: citosina; G: guanina; T: timina.



◀ **Figura 26-5.** Inserción y deleción de bases (nucleótidos) en una secuencia de ADN.

o inserciones; 2) **secundarias a sobrecruzamientos erróneos entre cromátidas**, que generan la aparición de genes de fusión, inserciones, deleciones, duplicaciones génicas y homogeneización de secuencias, o 3) **como resultado de transferencias no recíprocas entre secuencias alélicas o no alélicas** que dan lugar a conversiones génicas.

Las **mutaciones debidas a sustituciones de un nucleótido** se subclasifican en tres grandes grupos, como se indica en la **tabla 26-2**.

En las **deleciones e inserciones que afectan a regiones codificantes de un gen**, se pueden dar distintas situaciones: 1) **deleciones e inserciones que afectan a codones**, en las que el número de bases involucradas puede ser múltiplo de 3 (codón entero), y la importancia patológica que presentan depende de si ocasionan o no cambios en la fase de lectura del gen; 2) **deleciones y duplicaciones de genes**, provocadas por sobrecruzamientos erróneos y que ocasionan importantes cambios en el grado total de expresión de los productos génicos implicados, 3) **interacciones entre elementos repetitivos, expansiones de trinucleótidos y tetranucleótidos** (repeticiones en tándem de tres o cuatro nucleótidos), que son expansiones de tripletes o tetrapletes intragénicos y ocasionan mutaciones dinámicas.

Es importante distinguir entre: *a)* **inserción**, cuando un nucleótido o más de uno se insertan entre dos originales (pero no son una copia de éstos); *b)* **duplicación**, la copia de un nucleótido o más de uno se inserta directamente en dirección 3'; *c)* **inversión**, un nucleótido o más de uno que reemplazan la secuencia original son el reverso de dicha secuencia, *d)* **conversión**, un rango de nucleótidos que reemplazan la secuencia original son copia de una secuencia de otro lugar cualquiera del genoma.

Tabla 26-2. Clasificación de las mutaciones debidas a sustituciones de un nucleótido

Mutaciones debidas a sustituciones de un nucleótido	Silenciosas (<i>silent</i>)
	El cambio de base no provoca ninguna modificación en la secuencia de aminoácidos
	Sin sentido (<i>no sense</i>)
	El cambio de base provoca la conversión de un codón específico para un aminoácido en un codón de parada. Suelen estar asociadas a fenotipos graves de la enfermedad
	De cambio de sentido (<i>missense</i>)
	El cambio de base provoca la conversión de un codón específico para un aminoácido en otro codón específico para un aminoácido distinto

El **TEL** debe familiarizarse con la nomenclatura internacional que se emplea para las mutaciones cuando hay que detectar, por ejemplo, una mutación familiar concreta.



Son varios los factores que influyen en la patogenicidad de las mutaciones. Entre ellos destacan: *a)* la clase de mutación y su localización; *b)* la forma en que la expresión del gen mutante se ve alterada (ganancia o pérdida de función); *c)* el patrón de herencia (recesiva, dominante, o el origen parental de la mutación o impronta parental), *d)* la proporción y la naturaleza de las células que sufren la mutación (mutaciones heredadas o somáticas adquiridas en etapas tempranas de desarrollo).

Los caracteres internacionales habituales son:

- Secuencia de referencia:
 - **g.** secuencia genómica.
 - **c.** ADN codificante.
 - **m.** secuencia mitocondrial.
 - **r.** secuencia de ARN.
 - **p.** secuencia de proteína.
- + nucleótido dirección 3'.
- - nucleótido dirección 5'.
- * codón de parada.
- _ rango de la mutación.
- > sustitución de nucleótido o proteína.
- : para separar anterior y actual descripción de una variante.
- ; para separar diferentes cambios en un alelo.
- , separador entre diferentes nucleótidos o proteínas.
- [] varios cambios en un alelo.
- () duda en la descripción de un cambio.
- { } acceso a las bases de datos, número de acceso.
- ? desconocido.
- = no hay cambio, secuencia salvaje.
- 0 no hay producto, nada.
- **chr** cromosoma.
- **del** deleción.
- **dup** duplicación.
- **ins** inserción.
- **inv** inversión.
- **con** conversión.
- **t** translocación.
- **fs** *frame shit*.
- **X** codón parada.

El **TEL** se puede encontrar con variantes de significado clínico desconocido, de las que no se informa en la literatura médica como mutaciones patogénicas ni como polimorfismos, que habrá que investigar en el futuro.



Hay que destacar la nomenclatura en las enfermedades recesivas, en las que hay cambio de la secuencia en los dos alelos y hay que hacer referencia a los dos cambios: [] + [], por ejemplo: c.[546C>T] + [1398delT].

● TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE ADN EN SANGRE PERIFÉRICA, BIOPSIAS Y TEJIDOS

El TEL desempeña un papel fundamental en los laboratorios de genética molecular dedicados al diagnóstico clínico, en la fase preanalítica de la preparación de la muestra; por ello es vital que se realice una correcta y apropiada extracción de los ácidos nucleicos (ADN, ARN) en función del estudio genético que se haya solicitado y se vaya a realizar. En la mayoría de los laboratorios de genética molecular, la primera etapa es la obtención de ADN en los diferentes tipos de muestras recibidas en el centro. Las muestras a partir de las cuales se puede obtener ADN (Fig. 26-6) son varias, entre las que destacan:



◀ **Figura 26-6.** Tipos de muestras en las que se puede realizar extracción de ADN.

- **La sangre periférica:** con anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), que señaliza el contenedor con tapón malva, es quizá la muestra más fácil para la obtención de ADN. El ADN aislado de los leucocitos de sangre periférica es la muestra de elección mayoritaria, ya que es el más adecuado para el diagnóstico de las enfermedades genéticas. El contenido de ADN de las células humanas es de unos 5 picogramos (pg), de forma que, a partir de 20 mL de sangre anticoagulada con EDTA pueden obtenerse entre 250 y 500 microgramos (µg) de ADN. En ocasiones, especialmente para el diagnóstico molecular de enfermedades metabólicas, se puede usar sangre seca impregnada en cartón de Guthrie Cards.
- **El suero o el plasma:** muestras en las que el ADN que se obtiene no es de muy buena calidad y requiere una amplia experiencia por parte del TEL que la realiza.
- **El tejido fresco o congelado:** se puede obtener ADN en cantidad suficiente y de buena calidad.
- **El bloque de parafina de tejido tumoral:** presenta el inconveniente de que hay que eliminar la parafina y presenta como limitación que el ADN suele degradarse en poco tiempo, por lo que los fragmentos de ADN que se obtienen son muy pequeños.
- **Las laminillas histológicas:** requieren desmontar la laminilla, eliminar los restos de parafina, así como los colorantes que se han aplicado, por lo que generalmente se obtiene poca cantidad de ADN.
- **Otras muestras:** también es viable la extracción de ADN del **semen**, el **pelo**, la **orina** o la **saliva** (que se emplean especialmente ante extracciones dificultosas en cierto tipo de pacientes) y de las **vellosidades coriónicas** o el **líquido amniótico**; estas últimas se emplean con frecuencia para obtener ADN de cara a un diagnóstico prenatal de una determinada enfermedad o síndrome genético, principalmente el ADN aislado de biopsias de vellosidades coriónicas.

Diga cinco tipos de muestras de los que se pueda extraer el ADN.



El fundamento en la extracción de ADN es eliminar las proteínas, ya que el ADN está protegido por proteínas que interfieren en los procesos de amplificación del ADN que tienen lugar en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para mantener la integridad de la estructura del ADN se emplean reactivos que no provoquen roturas y mantengan lo más entero posible el ADN, ya que esas roturas generarían pequeños fragmentos que pueden producir dificultades en la amplificación oportuna del ADN.

Técnicas manuales

El ADN se encuentra en las células enredado con las proteínas. En el laboratorio debe liberarse de estas moléculas, para que puedan atacarlo las enzimas que se emplean

Tras la **lisis celular**, se procede a la extracción de ADN propiamente dicha, seguida de una precipitación y purificación del ADN.



en los estudios moleculares. Esto se lleva a cabo mediante pasos secuenciales de **lisis celular**, **digestión proteica con una proteinasa** y **eliminación de los péptidos del lisado mediante extracción orgánica**. Los ácidos nucleicos se recuperan por precipitación con etanol y cloruro sódico. La **lisis celular** (disociación de las proteínas asociadas al ADN) puede realizarse mediante los tres métodos que se describen en la **tabla 23-3**.

En ocasiones, para extraer ADN a partir de sangre entera se puede preparar un ficoll, para obtener células mononucleadas. El ficoll es un polisacárido sintético de alto peso molecular (400 kDa) que presenta un alto contenido en grupos hidroxilo (OH-), por lo que es soluble en medio acuoso, no presenta grupos ionizables que puedan servir de unión a las muestras, es estable a pH neutro y alcalino y no altera la presión osmótica del medio; por eso se emplea como soluto para la formación del gradiente. Se realiza una técnica de ultracentrifugación por gradiente de densidad para separar los linfocitos y monocitos de otras células de la sangre. Después de la centrifugación se forman varias capas y se recoge la fase intermedia y se lava.

Técnica de extracción salina o salting-out

Esta técnica se basa en que las proteínas son menos solubles a altas concentraciones de sal, de modo que precipitan mientras el ADN se mantiene en disolución (sales como los acetatos hacen que precipiten las proteínas, pero no el ADN). Las etapas son cuatro: 1) **lavado de las células con suero fisiológico**; 2) **lisis de los eritrocitos**; se emplea un tampón de lisis de eritrocitos como el STMT: sacarosa + tris + $MgCl_2$ + H_2O desionizada, hay que repetir el proceso dos veces, pero la segunda vez incubar sólo 5 minutos en hielo y no 5 minutos como en la primera; 3) **lisis de leucocitos**; se emplea un tampón de lisis de leucocitos TLL: NaCl + EDTA + tris + H_2O desionizada y **digestión de proteínas**, con una solución de proteinasa K (enzima proteolítica) + dodecilsulfato sódico (SDS) + EDTA + H_2O desionizada; 4) **extracción salina**, mediante el empleo de NaCl saturado e isopropanol, 5) **conservación de la muestra**, mediante el uso de EtOH y TE (tris-EDTA) (**Figs. 26-7 y 26-8**).

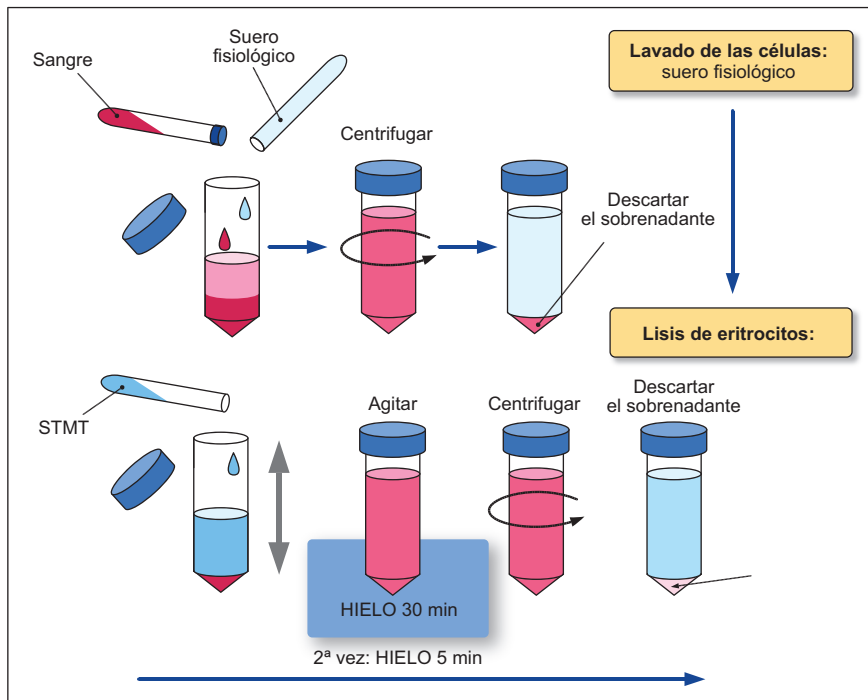
Técnica del fenol-cloroformo-alcohol isoamílico

Esta técnica consiste en que los ácidos nucleicos, al contrario que las restantes sustancias bioquímicas (proteínas, hidratos de carbono, lípidos) no se disuelven en fenol. El cloroformo y el fenol «atrapan» los lípidos y proteínas y dejan el ADN disuelto en agua. La **proteínasa K más SDS** elimina proteínas; el **fenol cloroformo** procura la separación de las fases acuosa y orgánica y el **isoamilalcohol** (o alcohol isoamílico) impide la formación de espuma. Los pasos que se siguen son:

- Añadir un volumen igual al de la muestra de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y agitar con vórtex.

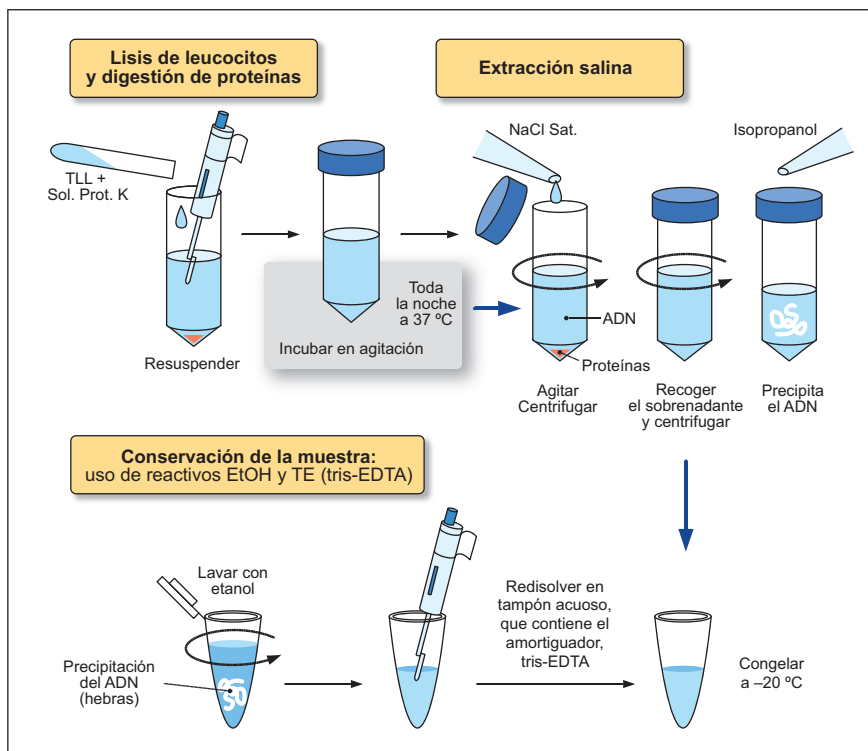
Tabla 26-3. Tipos de métodos para realizar la lisis celular

Lisis celular	Métodos físicos	<ul style="list-style-type: none"> • Homogeneización mecánica • Molienda manual en mortero • Bolitas de vidrio • Sonicación • Temperatura
	Métodos químicos	<ul style="list-style-type: none"> • Empleo de detergentes que solubilizan las proteínas, componentes de tejidos y membranas, para ello se varían el pH, la concentración salina y la temperatura. Por ejemplo detergentes iónicos: aniónicos dodecilsulfato sódico (SDS)
	Métodos enzimáticos	<ul style="list-style-type: none"> • Enzimas: lisozima (bacterias) y litiasa (levaduras) • Proteasas (rompen enlaces en la pared de la membrana plasmática e interacciones célula-célula)



◀ **Figura 26-7.** Etapas de lavado de células y lisis de eritrocitos en la técnica *salting-out*.

- Centrifugar a temperatura ambiente y transferir la parte acuosa (fase acuosa, fase superior) que contiene el ácido nucleico a otro tubo.
- Añadir acetato sódico para facilitar la precipitación con etanol y después añadir etanol al 100% frío.
- Dejar precipitar a -20°C durante 30 minutos.
- Centrifugar y eliminar el sobrenadante.



◀ **Figura 26-8.** Etapas de lisis de leucocitos y digestión de proteínas y extracción salina en la técnica *salting-out*.

En estos **kits** se suele utilizar un sistema de columnas para obtener, retener y disolver el ADN.



- Lavar con etanol al 70% para reprecipitar.
- Centrifugar y eliminar el sobrenadante de nuevo.
- Resuspender el tampón TE (tris-EDTA).

Kits comerciales con columnas de gel de sílice

En el mercado existen muchos kits comerciales para llevar a cabo la extracción de ADN de diferentes tipos de muestras, en los que los reactivos están preparados ya para ser utilizados directamente.

Técnicas automatizadas

En la mayoría de los laboratorios de genética en el ámbito hospitalario, debido al gran volumen asistencial y al número considerable de muestras que se reciben a diario, se emplean equipos robotizados para la extracción de ADN, en que la extracción se realiza a partir de muestras de sangre total con EDTA y se fundamentan en la cualidad que tiene el ADN de unirse al sílice en presencia de alta concentración de sales caotrópicas (hidrocloruro de guanidinio y tiocianato de guanidinio). El ADN se une a partículas magnéticas recubiertas de sílice y hay una separación magnética. Se consigue obtener un ADN puro de alta calidad, siendo el cociente de absorbancia $260/280 = 1,8$.

● TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE ARN

Entre los objetivos de las técnicas de obtención de ARN se encuentran: *a)* la **eliminación de ARNr y ARNt**, que no son de utilidad para el análisis de expresión y cuantificación de un gen; *b)* **mantener la integridad de la estructura**, para lo que se deben emplear reactivos que no provoquen roturas del ARNm, pues los segmentos muy pequeños son muy difíciles de amplificar; *c)* **obtener ARN en cantidad suficiente y de buena calidad**.

El ARNr es el más abundante (75%) y forma parte de los ribosomas; el ARNt es el segundo más abundante (15%) y se encarga del transporte y la transferencia de los aminoácidos y el ARNm (10%) transporta y transfiere la información del ADN (genes). Las fases para la obtención de ARNm consisten en:

- Lisis eficaz de las células y desnaturalización de los complejos de nucleoproteínas que se encuentran en los extractos celulares.
- Inactivación de la actividad de las ribonucleasas dentro de la célula.
- Eliminación de las proteínas (cuando quiere aislarse ARN deben eliminarse las ribonucleasas).
- Eliminación del ADN contaminante de las células.
- Elución del ARNm.

Durante la extracción del ARNm se deben tomar una serie de precauciones: las superficies de trabajo deben tratarse con inhibidores de ribonucleasas (EtOH 70% + RNA se Zap), evitar la contaminación corporal por parte del técnico, mediante el empleo de guantes estériles y cambiarlos con frecuencia, emplear material fungible y reactivos certificados libres de nucleasas y no realizar la limpieza en autoclave. A continuación se detallan las diferentes técnicas para la obtención de ARN.

Técnica del tiocianato de guanidino/fenol/cloroformo

La extracción mediante la técnica del tiocianato de guanidino (inhibidor de las ribonucleasas)/fenol/cloroformo es cada vez menos frecuente. El primer paso consiste en centrifugar el contenedor de sangre periférica con EDTA para obtener el «*Buffy coat*», el cual se transfiere a un nuevo tubo que contiene una solución D (tiocianato de

¿Qué ARN es el más abundante?





guanidino + citrato de sodio + sarcosil + beta mercaptoetanol), y se homogeneiza la muestra y se conserva a -20°C . Las etapas detalladas son:

1. Añadir al tubo que contiene la fase de leucocitos: acetato de sodio + cloroformo + alcohol isoamílico.
2. Agitar, incubar en hielo durante 15 minutos y centrifugar.
3. Transferir la fase superior, fase acuosa donde se encuentra el ARN, a un nuevo tubo; en la interfase se quedan las proteínas y el cloroformo se queda en la fase inferior.
4. Añadir isopropanol, incubar durante 1 hora a -20°C y centrifugar.
5. Desechar el sobrenadante.
6. Añadir EtOH frío y resuspender el *pellet* (dar un vortex).
7. Repetir de nuevo los pasos 5 y 6.
8. Centrifugar y descartar el sobrenadante.
9. Dejar secar el *pellet* (no dejar secarlo mucho tiempo).
10. Añadir agua estéril, vortexear e incubar durante 10 minutos a 65°C .
11. Guardar a -20°C .

Existe también una variación de esta técnica que consiste en el empleo de trizol en lugar de citrato de sodio y fenol, se conoce como **técnica de trizol**.

Kits comerciales

Se aconseja el empleo de kits comerciales, debido a que el ARN se degrada con gran rapidez, con el fin de agilizar el proceso. La metodología de estos kits comerciales es muy similar a la de los que se emplean para la extracción de ADN y se basa en columnas de sílica gel. Se emplean partículas magnéticas que, a pH bajo, están cargadas positivamente, lo que hace que atraigan a los ácidos nucleicos y con la ayuda de unos soportes magnéticos con gradillas para colocar los tubos, se someten al magnetismo. Las fases de la extracción de ARNm mediante los kits comerciales son:

1. Colocar la muestra del paciente en un tubo Eppendorf y añadir unas bolitas magnéticas (y un reactivo con un pH 6).
2. Mezclar e incubar.
3. Colocarlas en el soporte, dejar actuar bajo el imán y, una vez que se obtiene el *pellet*, descartar el sobrenadante.
4. Tratar con ADNasas para purificar el ARN, degradando el ADN.
5. Quitar el soporte y añadir el reactivo de lavado.
6. Volver a colocar en el soporte, dejar actuar el imán y eliminar el sobrenadante.
7. Repetir el lavado.
8. Quitar el soporte y añadir el reactivo de elución.
9. Colocar en el soporte, dejar actuar al imán y guardar el sobrenadante a -80°C .

¿Puede decir una ventaja del uso de los kits comerciales?



No debo olvidar que...

- El técnico especialista de laboratorio tiene una labor importante en la fase de extracción de ADN en los diferentes tipos de muestras de pacientes que se reciben en los laboratorios de genética molecular.
- La combinación de una base y un azúcar se denomina nucleósido.
- La adición de un grupo fosfato al carbono 5' de la pentosa da lugar a un nucleótido.

(Continúa en la página siguiente)

- Los nucleótidos se unen entre sí mediante enlaces fosfodiéster entre el grupo fosfato de un nucleótido y el carbono 3' de la pentosa del siguiente nucleótido.
- Un polímero de nucleótidos (una hebra de ADN) tiene siempre un extremo 5'-fosfato y un extremo 3'-hidroxilo.
- En el ADN bicatenario las proporciones A:T y G:C son siempre igual a 1. La suma de purinas (A + G) es igual a la suma de pirimidinas (C + T).
- El ADN es bicatenario y el ARN es monocatenario.
- Las principales técnicas para la extracción de ADN que se emplean actualmente en los laboratorios de genética en el ámbito hospitalario son los sistemas automatizados (robotizados).
- La muestra de elección para la obtención de ADN en la mayoría de los estudios genéticos moleculares es la sangre periférica con EDTA.

Actividades de evaluación



Preguntas de repaso

1. Respecto a la extracción de ADN de diferentes muestras, señalar la afirmación falsa:
 - a. En los robots y equipos automatizados de extracción de ADN que se usan en los laboratorios de genética molecular, para la extracción de ADN de sangre periférica con EDTA se emplean reactivos que no provocan roturas del ADN.
 - b. La primera etapa en la obtención de ADN es la lisis celular, la cual se puede llevar a cabo por métodos físicos, químicos y enzimáticos.
 - c. La lisis celular en el proceso de obtención de ADN sólo se realiza mediante métodos enzimáticos.
 - d. En cierto tipo de muestras, como en los bloques de parafina, es muy difícil conseguir fragmentos grandes de ADN.
2. De las siguientes afirmaciones, indicar cuál no es cierta:
 - a. La metodología para la obtención del ARN es muy parecida a la que usan los kits comerciales de extracción de ADN (columnas de sílica gel).
 - b. En la extracción de ARN hay que tomar menos precauciones que en la extracción de ADN.
 - c. En la extracción de ARN, por su rápida degradación, se aconseja utilizar kits comercializados preparados, para agilizar la técnica.
 - d. Hay que tener especial cuidado durante la extracción de ARN de evitar la contaminación propia, del técnico, mediante el uso obligatorio de guantes estériles y que éstos se renueven a menudo durante el proceso.

Caso práctico

El TEL en el laboratorio de genética molecular recibe un tubo de Eppendorf que contiene una alícuota de sangre periférica etiquetada con un número de identificación, que corresponde a un hombre de 42 años que acude a urgencias y se somete a un examen neurológico debido a una corea progresiva que cursa con cierta rigidez y un episodio de convulsiones. En el formulario de petición sólo se indica que ruegan efectuar el estudio genético de la mutación familiar. El TEL tiene dudas y no sabe qué hacer con la muestra recibida. ¿Cómo debe proceder con la muestra? ¿Podrá obtener ADN de ella?



● BIBLIOGRAFÍA

Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. Clin Rev Biochem Molec Biol. 1991;26:301-34.

Guillén E, Glover G. Técnicas diagnósticas mediante ADN. An Pediatr Contin. 2004;2(6): 360-4.

Lodish H, et al. Biología celular y molecular. 5ª ed. Madrid: Editorial Panamericana, 2006.

Material complementario



- Casos prácticos desarrollados
- Más preguntas de repaso