

Los laboratorios de Citogenética y Biología Molecular.

Los laboratorios de Citogenética y Biología Molecular.

Caso práctico



Susana, estudiante del Ciclo de Laboratorio de Diagnóstico Clínico y Biomédico. Comenzó sus estudios cuando salió el nuevo Ciclo LOE. En la actualidad acaba de terminar el segundo curso e inicia la FCT. Es una persona seria y responsable. Le gusta terminar las tareas que emprende. Autónoma. Siempre le han atraído los temas relacionados con la salud, es por esto que eligió este Ciclo.



Carlos, estudiante del Ciclo de Laboratorio de Diagnóstico Clínico y Biomédico. En la actualidad acaba de terminar el segundo curso y comienza a hacer la FCT. Es muy trabajador y habilidoso. Tiene pensado realizar los tres años necesarios para la obtención de los Títulos de Laboratorio de Diagnóstico Clínico y Laboratorio de Patología y Citodiagnóstico.

Carlos y Susana han sido compañeros de clase durante estos dos años y se llevan muy bien. Ayer se enteraron de que iban a realizar juntos el período de prácticas y se llevaron una gran alegría. Para comenzar les han asignado el laboratorio de Citogenética y Biología Molecular del Hospital Universitario de su ciudad.

Están un poco nerviosos, sobre todo porque esta es una rotación nueva, ninguno de los antiguos alumnos se ha formado en este área durante un tiempo largo, por lo que no tienen opiniones que les permitan hacerse una idea de lo que se van a encontrar allí. Al mismo tiempo se consideran afortunados, el aprender las técnicas de Citogenética y Biología molecular seguro que les va brindar muchas oportunidades nuevas de trabajo.

En el instituto se dieron cuenta de que los estudios genéticos eran algo más que tratar de solucionar un asesinato estudiando las evidencias que deja el asesino, tal y como cuentan las series de televisión. Los estudios genéticos podían servir también para ayudar al médico en el diagnóstico de muchas enfermedades, algunas curables y otras no. Han tenido suerte de que les hayan asignado un hospital puntero en éste área, aquí van a poder aprender las técnicas de diagnóstico más avanzadas relacionadas con el ADN y a utilizar la tecnología que hasta ahora han visto sólo en las películas. Carlos está ansioso por ver cómo funciona un secuenciador y Susana tiene interés en ver el trabajo que se realiza alrededor del diagnóstico prenatal.

El tutor de la FCT en el instituto llega y se dirigen al Servicio de Genética para realizar las presentaciones. Pronto conocerán a los que van a ser sus compañeros las próximas semanas.



Materiales formativos de FP Online propiedad del Ministerio de Educación y Formación Profesional.

[Aviso Legal](#)

1.- Introducción.

Caso práctico



Cuando llegan les recibe Sagrario la supervisora que tiene asignado este Servicio. Tras el saludo y el papeleo inicial Sagrario habla con ellos para programar sus rotaciones por las diferentes secciones del laboratorio.

Trabajarán juntos al principio unos días aprendiendo las técnicas básicas y luego cada uno de ellos se especializará en una de las dos grandes áreas, Citogenética o Biología Molecular.

Como ambos tipos de estudios se realizan en el mismo laboratorio Carlos y Susana podrán compartir sus experiencias en todo momento y apoyarse el uno al otro cuando la situación lo requiera.

Carlos está ansioso por empezar a trabajar. En su cabeza se amontonan las preguntas que le gustaría realizar a Sagrario. Así que cuando ésta les da la oportunidad Carlos le pregunta

- ¿Nos podrías explicar un poco qué estudios se realizan aquí?

-Por supuesto -responde Sagrario- e introduce a los alumnos en el mundo de la Genética Clínica.

La mayor parte de los análisis genéticos examinan el ADN, una molécula que forma parte de nuestras células y que contiene la información necesaria para que nuestro organismo se desarrolle, crezca y funcione correctamente. El ADN consiste en una cadena de mensajes

codificados y organizados bajo instrucciones específicas, que denominamos [genes](#).

Tenemos unos 30.000 genes distintos, compactados en estructuras con aspecto de carretes de hilo llamados [cromosomas](#). Si consideráramos los cromosomas como capítulos de un libro, el ADN estaría representado por las letras y los genes por las palabras. Heredamos 46 cromosomas de nuestros progenitores, 23 de nuestra madre y 23 de nuestro padre.

Los análisis genéticos están dirigidos a identificar alteraciones en un gen o en un cromosoma en particular. Estos, se realizan normalmente a partir de sangre periférica, pero también a partir de otras muestras como pueden ser saliva, cultivos de células, líquidos orgánicos, tejidos, etc. La muestra se extrae del paciente y se envía al laboratorio para realizar el análisis de los genes o de los cromosomas correspondientes.

Los laboratorios de Biología Molecular y Citogenética, son los laboratorios donde se realizan estudios sobre ácidos nucleicos (ADN y [ARN](#)) y cromosomas, obtenidos a partir de las muestras biológicas.

En la actualidad, según el Real Decreto 1277/2003 de 10 de octubre, ambos laboratorios se consideran laboratorios de Genética, definiendo la Unidad de Genética como "la unidad asistencial que, bajo la responsabilidad de un facultativo con formación adecuada, está dedicada a la realización de pruebas genéticas y a la emisión de los dictámenes correspondientes con fines diagnóstico".

Son laboratorios donde se realizan técnicas de alta complejidad que requieren de equipamientos especializados y costosos.

Los análisis que se realizan buscan signos de enfermedad.

¿Cuáles son estos signos?

- Alteraciones en la secuencia y composición del ADN, que pueden afectar a grandes segmentos fácilmente visibles o bien tan solo a una o a unas pocas bases de su secuencia. ([mutaciones](#)).
- Diferencias en la expresión de los genes (ARN) que permitan determinar si existen múltiples copias de un mismo gen o genes muy activos o la existencia de [deleciones](#) en la secuencia de ADN.

¿Para qué sirve este tipo de estudios?

Los estudios genéticos se pueden utilizar entre otros para los siguientes fines:

- Diagnosticar una enfermedad hereditaria en un individuo que presenta síntomas.
- Diagnosticar el estado de portador de una enfermedad. Los portadores son individuos que no presentan síntomas pero que poseen la alteración en su ADN y pueden transmitirla a su descendencia.
- Diagnosticar una enfermedad neoplásica. En la actualidad existen muchas alteraciones asociadas a diferentes tipos de cánceres que se pueden utilizar para diagnóstico y a veces pronóstico de las mismas.
- Diagnóstico prenatal. El diagnóstico prenatal citogenético tiene como objetivo detectar posibles alteraciones del ADN en el feto.
- Detección de marcadores moleculares en Oncología Médica y Hematología.
- Detección molecular de enfermedades infecciosas y determinación de la carga viral.

Los resultados de los análisis genéticos, ayudan al médico a realizar el asesoramiento a las familias ([consejo genético](#)) y en ocasiones a seleccionar el tratamiento más adecuado para el paciente.

Tanto el laboratorio de Biología Molecular como el de Citogenética requieren:

- de un equipamiento específico (exclusivo de cada laboratorio)
- y de un equipamiento genérico (común a los dos laboratorios) para realizar técnicas complejas

Además, ambos comparten un problema común: la contaminación. Por ello, en cada laboratorio será fundamental estructurar *áreas limpias* y *áreas sucias* de trabajo para minimizar el riesgo de contaminación.

2.- El laboratorio de Citogenética.

Caso práctico

Sagrario comienza su visita al laboratorio por la Sección de Citogenética, allí se encuentra Marta, la técnica responsable de las Sección que estará a cargo de los alumnos durante su rotación.



Lo primero que observa Susana al llegar es la gran cantidad de microscopios que hay en la sala.

— ¿Cuántas personas trabajan aquí? —pregunta Susana.

— Al laboratorio de citogenética llegan una gran cantidad de muestras procedentes de diferentes Servicios del Hospital: Sangres, médula ósea, líquido amniótico, biopsias de tumores y tejidos... En el laboratorio hay un técnico especializado en cada una de estas muestras —explica Marta, y continúa—. Todos los estudios citogenéticos necesitan para su realización microscopios, por eso hay tantos en esta sala. En el análisis citogenético se utilizan tres tipos de microscopios, el microscopio de campo claro, el microscopio invertido y el de fluorescencia.

— Algunos microscopios tienen a su lado un monitor, y otros no ¿Por qué? —pregunta Carlos.

— Los microscopios que tienen a su lado un monitor están conectados a un ordenador que tiene un programa informático de análisis cromosómico. La imagen del microscopio es recogida por la cámara digital acoplada al mismo y el programa realiza la clasificación

de los cromosomas de forma automática. Ahorra mucho tiempo, pero debe ser manejado por una persona con experiencia —responde Marta—. Existe otra parte del laboratorio que utiliza tecnología más moderna, es la parte en la que se realizan pruebas de hibridación. Más adelante os la mostraré.

Marta comienza mostrándoles el laboratorio y sus equipos y explicándoles las labores que se realizan en esta sección.

La Citogenética, es el campo de la genética centrado en el estudio de la estructura, función y comportamiento de los cromosomas. Este estudio permite analizar la estructura y el número de cromosomas de una célula y su implicación en el desarrollo de enfermedades.

El número y la morfología de los cromosomas de una célula, de una especie en particular, son siempre constantes en la mayoría de las células de ese organismo. Esta, es una característica de cada especie. En la especie humana, por ejemplo, el número de cromosomas es de 46.

La Citogenética se encarga de la obtención del [cariotipo](#) a través de la realización de cultivos celulares *in vitro*, la observación microscópica y el empleo de coloraciones adecuadas.

Las técnicas de citogenética comenzaron a realizarse hace relativamente poco tiempo. El cariotipo humano fue establecido por primera vez en 1956 y la primera enfermedad genética fue definida en 1959. Desde entonces y gracias a las mejoras introducidas en las técnicas de preparación de extensiones sobre portaobjetos y su examen al microscopio, se han podido describir numerosas alteraciones en los cromosomas.

Actualmente, la Citogenética ha pasado a ser una importante herramienta de diagnóstico en todas las áreas médicas. La información brindada por el laboratorio de Citogenética es fundamental tanto para la genética médica como para el estudio de los procesos oncohematológicos.

A través de la Citogenética se pueden estudiar enfermedades causadas por anomalías numéricas y/o estructurales de los cromosomas.

- Las alteraciones numéricas consisten en la ganancia o pérdida de uno o varios cromosomas.

- Las alteraciones estructurales consisten en los cambios en la estructura de uno o varios cromosomas (deleciones, duplicaciones, inversiones, traslocaciones, etc.).

El análisis cromosómico se puede realizar por dos tipos de técnicas:

- Técnicas de citogenética convencional: como son el cariotipo de rutina y el cariotipo de alta resolución.
- Técnicas de citogenética molecular: como la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), la hibridación *in situ* fluorescente multicolor (M-FISH o SKY) o la hibridación genómica comparada (CGH).

La citogenética convencional estudia los cromosomas utilizando técnicas de bandeo cromosómico. Requiere un número adecuado de cromosomas en [metafase](#) de buena calidad y no puede detectar cambios submicroscópicos. Esta técnica es actualmente complementada con técnicas más sofisticadas de análisis de citogenética molecular, que pueden aportar información complementaria para identificar anomalías cromosómicas.

2.1.- Funciones.



Términos como [Síndrome de Down](#) , [Síndrome de Turner](#), o la [Trisomía 13](#), son nombres de enfermedades genéticas relacionadas con alteraciones en los cromosomas.

Los cromosomas, son el objeto de estudio de la Citogenética. Los cromosomas de las [células eucariotas](#), son moléculas muy largas de ADN de doble hélice en interacción con proteínas (histonas y no histonas) que se pueden encontrar desde estados relajados o poco compactados como ocurre en los núcleos de las células en [interfase](#), hasta estados altamente compactados, como sucede en la metafase mitótica. Los cromosomas en metafase, representan el estado de máxima condensación del ADN. En esta fase, los cromosomas se hacen claramente visibles al microscopio óptico, por lo que resulta mucho más fácil estudiarlos. El estudio de los cromosomas se realiza mediante la observación al microscopio con el objetivo de 100x. En la imagen puedes observar el aspecto que tienen los cromosomas en metafase vistos al microscopio.

Para saber más

En este vídeo podrás repasar las fases de la mitosis celular y la secuencia de acontecimientos que ocurre en cada una de ellas.

[Resumen textual alternativo](#)

Este otro vídeo muestra los niveles de empaquetamiento o condensación que sufre la hebra de ADN hasta formar los cromosomas.

[Resumen textual alternativo](#)

El laboratorio de Citogenética busca alteraciones en los cromosomas obtenidos a partir del cultivo de células de diferentes tipos de muestras.

¿Qué tipo de alteraciones se buscan en los cromosomas?

Las técnicas de citogenética convencional estudian a la vez todo el ADN de un individuo, no se limitan a una región concreta y permiten ver grandes cambios que se hayan producido en él, como variaciones en el número de cromosomas (cromosomas que están de más o de menos) o grandes modificaciones estructurales como por ejemplo regiones que se hayan duplicado, perdido o partes de los cromosomas que hayan cambiado de sitio.

En la actualidad con el desarrollo de las técnicas de citogenética molecular, este concepto está cambiando y mutaciones pequeñas que antes pasaban desapercibidas al microscopio, pueden ser identificadas mediante el uso de esta tecnología que aplica las técnicas de biología molecular al estudio de los cromosomas.

¿Cuáles son las razones para solicitar un análisis citogenético?

- El médico solicita la realización de técnicas citogenéticas cuando quiere confirmar o descartar la presencia de este tipo de alteraciones llamadas en general cromosomopatías, en individuos que presentan [malformaciones congénitas](#), retraso en el crecimiento, retraso mental o problemas de fertilidad. Estos análisis son realizados en muestras de sangre.
- Otra razón para solicitar un examen citogenético es el diagnóstico prenatal. Consiste en la realización de una serie de pruebas con la finalidad de detectar defectos congénitos en el feto. No se ofrece el diagnóstico prenatal a todas las mujeres, solo a aquellas que tienen factores de riesgo como edad avanzada (mayor de 35 años), una historia familiar con alguna enfermedad genética o en aquellos casos en los que se ha observado alguna alteración en otras pruebas realizadas, como la ecografía. El diagnóstico prenatal estudia el ADN del feto en muestras de [líquido amniótico](#) obtenidas mediante [amniocentesis](#) o [biopsia corial](#).
- Por último las técnicas citogenéticas se utilizan también en el laboratorio de anatomía patológica para orientar el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de algunos tipos de cánceres. Se han descrito alteraciones en el ADN asociadas a [neoplasias](#) hematológicas ([leucemia mieloide crónica](#), [síndromes mielodisplásicos](#) y [linfomas](#)), y a tumores sólidos (cáncer de mama, pulmón o cáncer de colon). La detección de ciertas alteraciones permite en ocasiones definir un pronóstico y orientar un tratamiento.

2.2.- Áreas de trabajo.

Tal como se menciona en la introducción, la Citogenética se encarga de la obtención del cariotipo a través de la realización de cultivos celulares *in vitro*, la observación microscópica y la aplicación de coloraciones adecuadas. Se puede considerar pues al laboratorio de Citogenética, como una ampliación del laboratorio de cultivos celulares, que engloba un área de cultivo celular dirigida a la obtención de células en mitosis y un área de genética enfocada al estudio de los cromosomas en metafase.

¿Cuáles son las condiciones de trabajo?

Uno de los mayores problemas para el establecimiento de los cultivos celulares, es la aparición de contaminaciones. La tasa de crecimiento de las células en cultivo, es mucho más lenta que la de los contaminantes más habituales (hongos, levaduras, bacterias, micoplasmas, etc.), por ello, la característica principal del laboratorio de cultivos celulares es el mantenimiento de estrictas condiciones de asepsia. En este sentido, la aparición de las [cabinas de flujo laminar](#) redujo las necesidades de aislamiento del área de trabajo, pero, aun así, es recomendable mantener un gradiente de esterilidad, desde el medio exterior al interior de las cabinas de flujo, donde se manipularán los cultivos, y de los incubadores.

La prevención de la contaminación condiciona la estructura del laboratorio de Citogenética, de manera, que su distribución se basa en el criterio de separación física entre *áreas limpias* y *áreas sucias*.

- Área limpia será el espacio en el que podamos manipular nuestro producto con la seguridad de que dicha manipulación se lleva a cabo de forma que se evite que resulte contaminado por agentes externos. Básicamente es una sala aislada con suministro de aire climatizado y filtrado ([HEPA](#)) . Esta entrada de aire produce un aumento de presión atmosférica en el interior del laboratorio que impide la entrada de contaminantes del exterior (presión positiva).
- Área sucia es el espacio físico donde puede existir presencia de posibles elementos contaminantes de nuestro producto. Será una sala que se diseñará para tener una ligera presión negativa.

En una sala de presión positiva, la dirección del flujo del aire es de dentro de la habitación hacia el exterior de esta. En una sala de presión negativa, la dirección del flujo del aire es de fuera de la habitación hacia el interior de la misma.

¿Cómo está organizado un laboratorio de Citogenética?

Las instalaciones de un laboratorio de Citogenética, contarán con un área técnica y con un área de estudio.

Área Técnica:

En ella se realizan las siguientes tareas:

- Recepción, registro y conservación de las muestras hasta su análisis.
- Preparación y cultivo de las muestras.
- Procesamiento de los cultivos y preparación de las extensiones cromosómicas para su estudio.
- Conservación de las muestras preprocesadas y postprocesadas.

Área de Estudio:

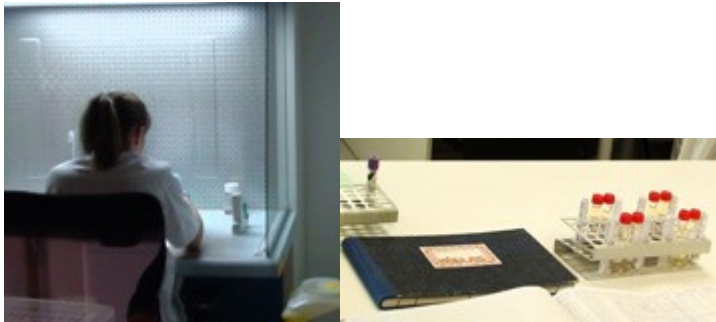
En ella se realiza el estudio cromosómico, la elaboración y emisión de los informes citogenéticos.

- Búsqueda manual o automatizada de metafases.
- Realización del cariotipo.
- Estudio del cariotipo: conteo de cromosomas y revisión de su estructura.
- Interpretación de los resultados obtenidos y emisión del informe.

Por tanto, en el laboratorio de Citogenética nos podemos encontrar las siguientes zonas de trabajo:

Zona de recepción de muestras. Es la zona donde se registran las muestras que van llegando para su estudio y se examina si reúnen las condiciones necesarias para su análisis. Los métodos de registro pueden variar entre los laboratorios y generalmente están informatizados. En todos los casos a la muestra se le asigna un código a su llegada al laboratorio que permitirá tenerla controlada en todo momento. Otro dato que conviene registrar es la fecha de recepción de la muestra para su estudio.

Los estudios genéticos tardan en ser realizados un cierto tiempo (de 2 a 3 semanas) puesto que incluyen una fase inicial de cultivo celular. Las muestras de líquido amniótico tienen que ser informadas en las 3 o 4 semanas siguientes al momento de su recepción.

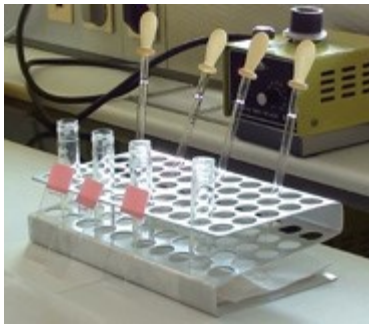


Sala de cultivos celulares: Una vez registrada la muestra, si el análisis solicitado es un estudio citogenético convencional, es necesario realizar un cultivo celular. Los estudios citogenéticos se realizan sobre células en división, por lo que debemos suministrar a las células de la muestra las condiciones idóneas para que comiencen a dividirse. Este cultivo debe realizarse en condiciones que eviten su contaminación. Por tanto esta sala se considera como sala *limpia*, deberá estar situada en una zona alejada de vías de paso para evitar turbulencias y deberá estar dotada de un sistema de aire filtrado con ligera presión positiva que evite en la medida de lo posible la presencia de microorganismos.

La sala de cultivos deberá contar con cabinas de flujo laminar, incubadores de células y microscopio invertido.

Zona de procesamiento de los cultivos: Las operaciones que se realizan en este área reciben el nombre de sacrificio celular. Es considerada como *sala sucia* y en ella se desarrollarán procesos como la preparación de extensiones, técnicas de tinción, etc.

Cuando los cultivos celulares están listos comienza su procesamiento. La división de las células se detiene en metafase y estas se extienden en portaobjetos y se tiñen para su estudio al microscopio óptico. Para poder identificar los cromosomas es necesario realizar técnicas de [bandeo](#).



En los laboratorios donde se desarrollen técnicas de citogenética molecular, podremos distinguir también una Sección de Citogenética Molecular: En esta sección se estudia el ADN mediante la aplicación de [técnicas de hibridación](#). Estas técnicas emplean sondas, que son fragmentos de ADN que se unen de forma complementaria a las regiones del ADN que se quieren analizar. Los términos de [hibridación *in situ*](#), [FISH](#), [CISH](#), pintado cromosómico, y CGH se refieren a nombres de algunas de las técnicas que se realizan en este tipo de laboratorio.

Mientras que las técnicas de citogenética convencional utilizan la microscopía óptica para la visualización de la preparación, en las técnicas de citogenética molecular, las preparaciones se visualizan utilizando un microscopio de fluorescencia. Por eso, en este área, podrá existir una zona oscura para la colocación del microscopio de fluorescencia.

Algunas de estas técnicas pueden hacerse directamente sobre células en interfase. Más adelante estudiarás en qué consisten todas estas técnicas así como su procedimiento y el equipo que se necesita para su realización.



Otra sala que encontraremos habitualmente ligada a los laboratorios de Citogenética y Cultivos Celulares es la Sala de Frío. Esta sala contará con congeladores de -20°C , -80°C y equipos de criogenia. Es conveniente que la sala esté separada de la sala de cultivos celulares, porque los ventiladores y compresores son fuente importante de turbulencias y suciedad en el laboratorio.

2.3.- Equipamiento.

¿Qué equipos forman parte de un laboratorio de Citogenética convencional?

El laboratorio de Citogenética, requiere, por una parte, equipamiento específico de este laboratorio y por otra, equipamiento genérico común a otros laboratorios. La mayor parte de los materiales y equipos utilizados en Citogenética son los mismos que en un laboratorio general. Solo unos pocos son equipos específicos como el cariotipador o los aparatos para realizar las técnicas de hibridación *in situ*.

A continuación puedes observar algunos de los aparatos que forman parte del equipamiento de un laboratorio de Citogenética.

Tabla con las imágenes de los equipos utilizados en el laboratorio de Citogenética.

Microscopio óptico.



El microscopio óptico es una herramienta básica en el diagnóstico citogenético. Se utiliza para realizar el examen de las extensiones cromosómicas. Muchos de ellos llevan acoplada una cámara digital que permite enviar imágenes de las observaciones realizadas a un ordenador donde serán procesadas.

Cariotipador.



El Cariotipador es una aplicación informática que permite realizar de forma automática el análisis de los cromosomas observados en una metafase.

Microscopio de Fluorescencia.



El Microscopio de Fluorescencia se utiliza en Citogenética en la técnica FISH o hibridación *in situ*. Esta técnica permite la excitación de secuencias específicas de ADN sobre cromosomas o tejidos. Utiliza fragmentos de ADN marcados con compuestos fluorescentes que pueden ser visualizados mediante la utilización de un microscopio de estos características.

Cabina de Flujo Laminar.



La Cabina de flujo laminar es un equipo imprescindible para poder realizar el cultivo de las muestras biológicas. Crea un flujo de aire o "corriente" que protege a la muestra de su contaminación durante la manipulación.

Microscopio Invertido.



El microscopio invertido con centrado de fase se utiliza en citogenética para la observación y seguimiento de los cultivos. La posición de los objetivos y del sistema de iluminación difiere respecto del microscopio óptico convencional.

Cámara de cultivo o Incubador.



Cámara de cultivo. Estufa programada a una temperatura de 37 °C donde se realiza el cultivo de las muestras biológicas remitidas al laboratorio de citogenética para su estudio.

Baño Termostatzado.

Vórtex.

Hibridador.



Serán aparatos indispensables para el correcto funcionamiento del laboratorio de Citogenética:

Cabina de flujo Laminar.

En ella se realizarán todos los procesos de manipulación de los cultivos celulares, así como la preparación de reactivos. Se trabajará con una cabina de seguridad biológica de Clase II, que protege al trabajador, al medio ambiente y a la muestra.

- Estas cabinas disponen de dos rejillas, una frontal y una trasera, a través de las cuales es succionado el aire que circula sobre la superficie de trabajo. A través de la rejilla frontal es succionado el aire que proviene de la habitación y que pasa alrededor del trabajador a una determinada velocidad, aislándolo de los agentes existentes en el interior de la cabina.
- Disponen de un filtro HEPA a través del cual se suministra un flujo de aire vertical laminar que protege el producto y evita la posibilidad de que ocurra una contaminación cruzada a lo largo de la superficie de trabajo de la cabina.
- Disponen de un segundo filtro HEPA a través del cual sale el aire de la cabina. Como consecuencia de esta particularidad del diseño, el aire que circula dentro de la cabina está libre de contaminantes y puede ser reciclado.

Incubador de CO₂.

Proporciona un entorno *in vitro* controlado y fiable para el crecimiento óptimo del cultivo de células.

El mantenimiento de la temperatura, en una atmósfera con una tensión controlada de CO₂ y adicionalmente de humedad elevada, es el objetivo del incubador de CO₂. Las condiciones del cultivo: temperatura, humedad atmosférica y niveles de CO₂ son característicos de cada línea celular. El nivel de CO₂ se establece para mantener el equilibrio carbonato-bicarbonato

en el medio de cultivo, habitualmente al 5%. La limpieza y la desinfección, periódicas y sistemáticas, son el método recomendable para reducir los riesgos derivados de la contaminación accidental del personal del laboratorio.

Forman parte de un incubador de CO₂:

- Dispositivo de control de temperatura, con un termostato de seguridad que desconecta la función en caso de anomalía. La estabilidad de la temperatura es una característica esencial del incubador, y por ello suelen estar equipados con camisas de agua ('water jacketed') para proporcionar una temperatura uniforme en toda el incubador.
- Dispositivo de inyección de una mezcla de aire y CO₂, en una proporción entre el 4 y el 7 %. El CO₂ se suministra en botellas presurizadas, y se mezcla en el dispositivo de inyección.
- Dispositivo de control de la humedad ambiente. Para mantener el cultivo se requiere una humedad ambiente elevada, a fin de reducir la evaporación de agua del medio de cultivo. En los incubadores menos sofisticados esto se consigue mediante bandejas de agua en el fondo del incubador. Este recurso es peligroso pues son una fuente importante de contaminaciones al convertirse a los pocos días en caldos de cultivo. En los instrumentos más modernos se dispone de dispositivos que controlan la humedad atmosférica, inyectando agua estéril y filtrada.
- Dispositivo de recircularización de aire. Es importante una recirculación del aire en el interior del incubador, a fin de homogeneizar la temperatura en su interior. Si además en el circuito de circulación de aire se intercala un filtro HEPA se consiguen eliminar las posibles partículas contaminantes, y se asegura la esterilidad del ambiente.

Instrumentos ópticos de observación: microscopio de contraste de fases invertido.

El control morfológico del cultivo se realiza mediante el uso de un microscopio. El hecho de que las células a observar se encuentren en recipientes de un cierto grosor (más de 3 cm en el caso de frascos de Roux de 250 ml) hace que un microscopio convencional no sea adecuado por su pequeña distancia frontal, por lo que se han desarrollado microscopios, en los cuales la fuente de iluminación y los objetivos se encuentran invertidos respecto a la platina de un microscopio óptico convencional. Además, las células en cultivo, son muestras vivas y con poco contraste, por ello el microscopio se equipa con el dispositivo de contraste de fases y de esta forma el contraste de la imagen aumenta y la calidad obtenida es muy superior.

Sistema automatizado para el análisis microscópico y digitalización de imágenes obtenidas tanto a partir de microscopía óptica como de fluorescencia.

Aunque la Citogenética es una técnica relativamente joven, el aumento de la demanda de forma considerable, unido al hecho de que el laboratorio de Citogenética consume mucho tiempo por muestra y emplea gran cantidad de personal, ha provocado la necesidad de automatización.

Actualmente, contar con un sistema automatizado es básico para analizar metafases con el fin de obtener un cariotipo.

Un sistema completo automatizado para el análisis de cromosomas consta de las siguientes partes:

- 1) Microscopio óptico automático con capacidad para alojar más de un portaobjetos.
- 2) Cámara digital.
- 3) Unidad de procesamiento de imagen.
- 4) Unidad central de proceso con la que, a través de programas, se puede manejar todo el sistema. Puede ser un ordenador estándar.
- 5) Software específico para el análisis de las metafases.

Existen también sistemas de cariotipaje. Son sistemas que tan solo son capaces de ordenar el cariotipo de una imagen microscópica seleccionada manualmente, para ello el operador una vez decida qué metafase quiere cariotipar, ajustará la imagen en la cámara de vídeo y la digitalizará, comenzando un proceso igual al descrito anteriormente.

Además la aparición de nuevas técnicas que ya empiezan a ser rutinarias y por lo tanto son susceptibles de automatización, como la técnica de hibridación *in situ*, que permite observar a través del microscopio los lugares donde hibridan sondas de ADN marcadas previamente con moléculas fluorescentes, hace necesaria la presencia de un microscopio de fluorescencia.

Equipos de criogenia.

Para el almacenamiento de las líneas celulares, será fundamental contar con una unidad de almacenamiento en nitrógeno líquido (-196 °C). El nitrógeno es, químicamente, un gas inerte, muy estable que no está considerado peligroso. Sin embargo, en su forma líquida, el N₂ puede provocar quemaduras por congelación, y asfixia por desplazamiento del oxígeno. De ellos, el peligro más real lo representan las quemaduras por frío. El N₂ licuado tiene un punto de ebullición de -196°C y la fase de vapor de los contenedores suele estar a una temperatura inferior a -180°C. La exposición de la piel y mucosas puede provocar lesiones graves, similares a las quemaduras, por lo que debemos manipular este producto adecuadamente.

Es equipamiento común a otros laboratorios:

Equipo de esterilización: autoclave y equipo de filtración.

La necesidad de asepsia para el cultivo de células hace que se necesario el empleo de distintos tipos de métodos: irradiación con radiación gamma o rayos X, esterilización por gas, autoclavado, filtración, etc. En el laboratorio general se suele disponer de : equipo de filtración y autoclave, mientras que la esterilización por gas, y la irradiación son técnicas propias de grandes instalaciones, por ejemplo hospitalarias, o industriales.

- Equipos de filtración: Existen unidades de filtración estéril muy recomendables para el trabajo rutinario. La esterilización se produce al atravesar la solución un filtro de poro 0.22 mm.
- Autoclave: Un autoclave es un instrumento que permite la esterilización por calor tanto de sólidos como de líquidos. La esterilización se realiza habitualmente a 121 °C, 1 atmosfera de presión durante un tiempo superior a 20 min.

Centrífugas.

En el laboratorio de cultivo celular es necesario disponer de una centrífuga refrigerada, preferentemente con posibilidades de usar en ella desde tubos de pequeño volumen (1 a 2 ml) a tubos de mayor capacidad (50 ml), y con rotores apropiados para los tubos con los que se trabaje. Normalmente, para la mayor parte de las aplicaciones bastará con un instrumento que desarrolle hasta 2000 xg. La centrífuga se ha de instalar dentro de lo posible alejada de las cabinas de flujo laminar, para evitar las turbulencias de aire que genera.

Equipo de purificación de agua.

Es de gran importancia en la preparación de los medios, o en cualquier solución que pueda estar en contacto con el cultivo, una completa esterilidad y ausencia de sustancias que puedan provocar alguna alteración al cultivo. Por ello se utiliza siempre agua de la máxima calidad obtenida mediante equipos de doble destilación o de intercambio iónico y filtración.

Pipeteadores.

Se trata de dispositivos o instrumentos para el trasvase de fluidos de uso común en el laboratorio como los pipeteadores automáticos, pipetas y micropipetas, que permiten la aspiración de diferentes volúmenes de fluido.

Autoevaluación

Señala las afirmaciones que sean correctas respecto a los estudios citogenéticos.

- ☐ Los estudios citogenéticos se realizan siempre en cromosomas metafásicos.
- ☐ Los estudios citogenéticos se utilizan en el diagnóstico del cáncer.
- ☐ Las técnicas de FISH forman parte de la genética convencional.
- ☐ Los análisis citogenéticos convencionales son capaces de determinar únicamente grandes alteraciones en la secuencia del ADN.
- ☐ La amniocentesis y la biopsia corial son técnicas de diagnóstico prenatal utilizadas para obtener el ADN de la madre.
- ☐ El seguimiento de los cultivos celulares requiere el uso de un microscopio óptico convencional.

Mostrar retroalimentación

Solución

1. Incorrecto
2. Correcto
3. Incorrecto
4. Correcto
5. Incorrecto
6. Incorrecto

3.- El laboratorio de Biología Molecular.

Caso práctico



El grupo pasa en su visita al laboratorio por la Sección de Biología Molecular. Allí les recibe Maite que se encuentra realizando en ese momento una técnica de PCR a tiempo real. Los alumnos esperan a que Maite acabe el procedimiento mientras observan cómo se desenvuelve con las micropipetas. Es increíble lo rápido que las maneja.

Cuando Maite termina explica a los alumnos las características del laboratorio de Biología Molecular.

— Como podréis observar, el laboratorio de Biología Molecular no se parece nada al de Citogenética. Este está lleno de aparatos cada vez más sofisticados. Aquí se realiza el estudio del ADN a nivel molecular, centrándose en sus bases o nucleótidos. Se analiza si se han producido mutaciones en ellos que se hayan relacionado con el padecimiento de alguna enfermedad.

Carlos se muestra especialmente contento de que le hayan asignado a esta Sección para especializarse, siempre le ha atraído todo lo relacionado con el ADN, y la detección de mutaciones, es por eso que está pensando en pasar una temporada en un laboratorio forense cuando termine los tres años de estudio.

Maite explica cómo está organizada la sección y hace un recorrido por las distintas partes explicando los aparatos que hay en ella.

— En Clínica, las técnicas de biología molecular se utilizan en todas las áreas de diagnóstico. Se realizan estudios moleculares en bioquímica, en microbiología (para

detectar cantidades mínimas de bacterias presentes en muestras biológicas), en hematología, patología y en inmunología. De hecho en la actualidad hay varios facultativos residentes que están completando su formación rotando también por el laboratorio para familiarizarse con las técnicas de análisis.

Se denomina Biología Molecular a la disciplina científica que estudia la estructura y función de macromoléculas esenciales para la vida, ADN y ARN, así como las características genéticas transmitidas de generación en generación, los patrones moleculares, la síntesis de proteínas y la interacción que ocurre entre el ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico).

En los años 50, la Biología Molecular se estableció definitivamente como una ciencia autónoma gracias a los estudios sobre la estructura del ADN realizados por Watson y Crick, junto con la previa demostración del papel fundamental del ADN como material genético del individuo.

Desde principios de los años 60, los biólogos moleculares han estudiado cómo caracterizar, aislar y manipular los componentes moleculares de las células, destacando entre estos, el ADN, como repositorio de la información genética; el ARN, como copia temporal operativa del ADN desempeñando una función estructural; y las proteínas, que cubren las funciones estructurales y enzimáticas en las células. Gracias a la rápida evolución de las técnicas, la Biología Molecular junto con la Genética se han convertido en la base para la comprensión de muchas de las enfermedades conocidas actualmente.

Durante los últimos años se ha producido un gran desarrollo en cuanto a equipamiento y reactivos usados para llevar a cabo dichas técnicas, reduciendo tanto el tiempo requerido como el coste de las mismas. Esto ha hecho que, además de ser usadas para investigación, en muchos hospitales han podido ya ser implementadas y usadas para realizar diagnósticos de rutina de muchas enfermedades, siendo éste método mucho más fiable y rápido que los usados hasta entonces.

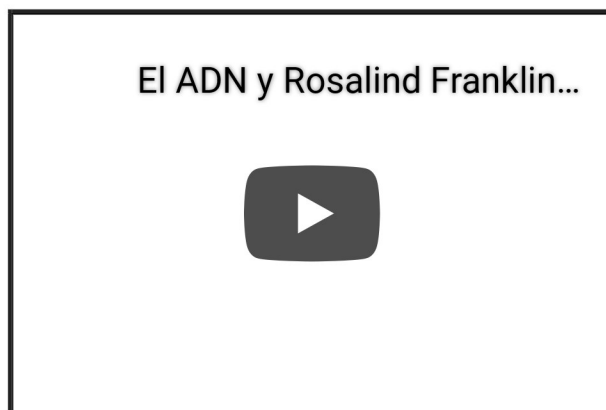
La extracción y purificación de los ácidos nucleicos es la primera etapa de casi todos los estudios de biología molecular. A la hora de obtener un resultado final fiable y sólido, la calidad del ácido nucleico de partida es muy importante.

Normalmente, el material de partida es muy escaso así que tenemos que amplificarlo para obtener mayor cantidad. La posibilidad de amplificar fragmentos de ADN fue una de las

mayores revoluciones en las técnicas de biología molecular en los años 90. Esta técnica, llamada PCR (*Polimerase Chain Reaction*), se basa en la habilidad de la enzima ADN polimerasa para sintetizar nuevas cadenas de ADN a partir de una única hebra “molde”. De esta manera, podemos amplificar una enorme cantidad de fragmentos de ADN *in vitro*. Estos fragmentos son el punto de partida de distintas técnicas de biología molecular (tales como arrays, hibridaciones, clonación o secuenciación, ya sea mediante técnica de Sanger o de Secuenciación Masiva) para el estudio y diagnóstico de enfermedades moleculares y genéticas.

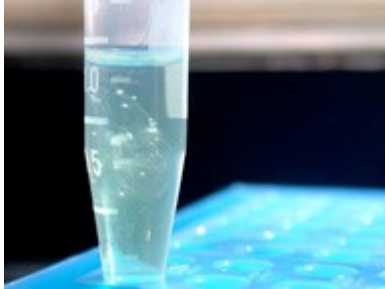
Para saber más

Este vídeo te permitirá conocer la secuencia de acontecimientos que contribuyeron al descubrimiento de la estructura del ADN. Desde entonces las técnicas que permiten su análisis han evolucionado mucho y constituyen la base del diagnóstico de muchos tipos de enfermedades.



[Resumen textual alternativo](#)

3.1.- Funciones.



En la imagen puedes observar el ADN precipitado en forma de maraña de filamentos, justo después de haber sido extraído.

El 25 de abril se celebra el día del ADN en el que se conmemora el descubrimiento de su estructura por parte de Watson y Crick en el año 1953. Esta fecha coincide con otro hito importante en la historia del ADN como es abril del año 2003, en el que se culmina el Proyecto Genoma Humano. Ambos descubrimientos, supusieron una verdadera revolución y un punto de inflexión en la investigación de las bases moleculares de la herencia genética.

La celebración de estos dos acontecimientos a nivel mundial, pone en evidencia la importancia de esta molécula y sus implicaciones en nuestra vida diaria. El ADN está cada día más presente en nuestras vidas. Los análisis genéticos son solicitados cada vez con más frecuencia por los médicos para conocer el origen de nuestras enfermedades y en algunos casos realizar terapias a medida en función de nuestro perfil genético (medicina personalizada). Esta labor de diagnóstico se ha visto facilitada por un gran avance en las tecnologías para el análisis del ADN. El laboratorio de Biología Molecular de un Hospital recibe una gran variedad de muestras para análisis de ácidos nucleicos. Sangre, médula ósea, líquidos y tejidos provenientes de biopsias realizadas a los pacientes son algunos ejemplos de muestras que podemos encontrar en este tipo de laboratorio.

El laboratorio de Biología Molecular analiza cambios que se han producido en el ADN a nivel molecular, esto es, a nivel de sus bases o nucleótidos. Al igual que ocurría con la Citogenética, los estudios moleculares ayudan al médico en el diagnóstico tanto de individuos sintomáticos como de portadores.

Se realizan técnicas de análisis molecular de ácidos nucleicos para:

Diagnosticar enfermedades hereditarias:

- [Distrofias musculares](#): [Enfermedad de Duchenne](#), [Distrofia miotónica](#),
- Enfermedades neurodegenerativas: [Enfermedad de Huntington](#).
- Hematológicas: [Talasemia](#), [Hemofilia](#).
- Bioquímicas: [Hipercolesterolemia familiar](#), [Fenilcetonuria](#).
- Inmunológicas: [Espondilitis anquilosante](#).

Al igual que ocurría con la Citogenética, las técnicas de Biología Molecular proporcionan la posibilidad de detectar alteraciones cromosómicas en el feto (diagnóstico prenatal) y en embriones ([diagnóstico preimplantacional](#)).



Diagnosticar neoplasias:

- Hematológicas: Leucemias, linfomas...en estas enfermedades las técnicas de biología molecular permiten además del diagnóstico, el estudio de la evolución de la enfermedad realizando la detección de la [enfermedad mínima residual](#).
- De tumores sólidos: El laboratorio de patología molecular realiza el estudio de diversos marcadores biológicos asociados al pronóstico del cáncer de mama, cáncer colorectal y de tiroides entre otros.
- Diagnóstico microbiológico: Las técnicas de biología molecular se utilizan para diagnosticar infecciones por microorganismos difíciles de aislar en el laboratorio como las infecciones víricas ([papilomavirus](#)) o infecciones por [micobacterias](#).

¿Cuáles son las técnicas que forman parte de la biología molecular?

Los estudios moleculares se llevan a cabo utilizando 3 estrategias básicas:

- Técnicas de hibridación que utilizan sondas específicas que se unen a determinadas secuencias en el ADN.
- Técnicas de amplificación que hacen múltiples copias de regiones concretas del ADN a estudio.

- Técnicas de clonación y secuenciación. Que permiten determinar la posición de cada uno de los nucleótidos en la hebra de ADN. Estas técnicas son también utilizadas en investigación.

Ficheros adjuntos

- [\(Ventana nueva\)](#)

3.2.- Áreas de trabajo.

¿Cuáles son las condiciones de trabajo en el laboratorio de Biología Molecular?

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica más importante en el laboratorio de Biología Molecular. Una de las grandes ventajas de la PCR es su exquisita sensibilidad. En ella, se pueden sintetizar millones de copias de moléculas de ADN a partir de unas pocas copias de la secuencia objetivo después de solo unos ciclos de amplificación. La sensibilidad de la PCR, permite a los científicos extraer y amplificar el ADN de muestras con muy poca cantidad de ácido nucleico de partida. Si bien este hecho constituye una ventaja para el investigador, también puede crear problemas si no se tiene cuidado para evitar la contaminación con otras fuentes de material genético presentes en el entorno del laboratorio. Estos problemas de contaminación pueden dar como resultado que se amplifique la secuencia incorrecta. A diferencia de lo que ocurría con el Laboratorio de Citogenética, donde el mayor riesgo de contaminación era por microorganismos, en este laboratorio el mayor riesgo lo supone la contaminación por ADN distinto al ADN de interés. Por ello, tanto las condiciones de trabajo, como la distribución de las diferentes áreas, deben estar encaminadas a evitar dicha contaminación.

La estructura del laboratorio de Biología Molecular, está por tanto condicionada por la técnica de PCR. Esta técnica implica:

- Extracción y purificación de los ácidos nucleicos
- Preparación de reactivos
- Reacción de amplificación
- Análisis de los productos de reacción

Cada una de estas actividades deberá ser desarrollada en áreas de trabajo independientes, físicamente separadas, donde cada una cuente con su propio instrumental como puede ser vórtex, centrífugas, pipetas, tips, etc. Es decir, muchos de los materiales deberán estar duplicados para evitar posibles contaminaciones. Cabe destacar que las puntas para micropipetas utilizadas en todas las áreas deben tener filtro para evitar la contaminación de las mismas por formación de aerosoles.

Asimismo, el flujo de trabajo deberá ser unidireccional, es decir, desde la zona de “pre-PCR”

a la de "PCR" y de ahí a la de "post-PCR". De manera que al realizar las actividades propias de un laboratorio de PCR se trabajará siempre desde el área más limpia hacia las áreas más sucias.

En el área de "pre-PCR" existirá una primera sala donde se realizará la preparación y el almacenamiento de reactivos. Para evitar contaminaciones, en esta zona no estará permitida la entrada de ADN, de manera que se considerará "área limpia" (libre de ADN). También existirá una sala de manipulación y preparación de muestras para la extracción, purificación y cuantificación de ácidos nucleicos y de almacenamiento de muestras y de extractos de ADN de uso cotidiano.

El área de "post-PCR", se dedicará a la manipulación y el análisis de productos de PCR (electroforesis, documentación de geles, cuantificación, secuenciación y análisis de fragmentos). Para prevenir problemas de contaminación, toda manipulación de productos de PCR se realiza solo en este laboratorio.

¿Cómo está organizado un laboratorio de Biología Molecular?

Por tanto, en el laboratorio de Biología Molecular se pueden diferenciar las siguientes áreas de trabajo.

Sala de preparación de reactivos: El área de preparación de reactivos se define como aquella "área limpia" donde se utilizan protocolos y equipamientos para preparar las mezclas de reacción que serán utilizadas en la PCR. Todo el equipamiento utilizado, será exclusivo de esta área. Debe haber un congelador de -20°C de uso exclusivo para almacenar los reactivos y nunca se mezclará con material biológico (extractos de ADN o ARN, [amplicones](#)). Las batas y guantes utilizados en esta área deben ser exclusivos, por lo tanto, el personal que ingrese a esta sala deberá quitarse previamente los elementos de protección que esté utilizando, y vestir elementos de protección limpios una vez dentro. Este espacio debe contar con una cabina de bioseguridad de Clase II, cerrada que posea luz ultravioleta (UV). Dentro de esta cabina deben manipularse todos los reactivos para preparar las mezclas de PCR. En su interior deben mantenerse micropipetas, tubos y gradillas de uso diario. La cabina cerrada va a permitir irradiar la superficie de trabajo dentro de la cabina con luz ultravioleta previo a su uso, de forma que las [pirimidinas](#) de cualquier resto de ácido nucleico presente en la cabina formen dímeros entre sí (cross-link) bloqueando el paso de la [polimerasa](#) en una futura reacción de PCR.



Sala de procesamiento de muestras y extracción de ácidos nucleicos: El área de procesamiento de muestras debe estar separada del área de amplificación y detección así como del área preparación de reactivos. La extracción de ácidos nucleicos debe realizarse en una cabina de bioseguridad clase II, de forma que el personal que manipule muestras biológicas se mantenga protegido y, al mismo tiempo, se aísle el producto de posibles contaminaciones externas. Se considera "área sucia" por ser un área con presencia de ADN. Para mantener el flujo unidireccional de trabajo y evitar retroceder desde áreas sucias hacia áreas limpias, cada una de las áreas debe contar con recursos exclusivos tales como: agua libre de [nucleasas](#), centrífugas, vortex, refrigeradores/congeladores, micropipetas, puntas para micropipetas así como los kits de extracción de ácidos nucleicos y todo lo que sea necesario para la realización de la técnica. Se incluye además, elementos adicionales como ordenadores, rotuladores y calculadoras que deben ser exclusivos de cada área y no intercambiables. Asimismo, deberán mantenerse cantidades suficientes de guantes y batas, de forma que su uso sea exclusivo en este área y se disminuya al mínimo el riesgo de contaminación.



Área de Carga: Se considera "área sucia". En esta área deben añadirse la muestra de ADN molde a la mezcla de reacción que han sido preparadas en el área limpia. El personal deberá utilizar los elementos de protección exclusivos de esta área. Además, debe contar con cabina de seguridad biológica de clase II cerrada que posea luz ultravioleta, micropipetas, gradillas y microcentrífuga de uso exclusivo. Antes de abrir los tubos que contienen el ADN molde, debe realizarse una breve centrifugación (spin) para evitar el escape de aerosoles al abrir el tubo. Una vez añadido el ácido nucleico, los tubos se cerrarán herméticamente y se llevarán al área de amplificación.

Sala de PCR: Se considera "área sucia". Dispone de termocicladores para llevar a cabo la reacción de PCR.

Sala de Post-PCR: Dispondrá de equipos para la verificación de los resultados. Debe contar con equipos para realizar electroforesis, transiluminadores y documentadores de geles, que deberían situarse en una sala oscura dentro del laboratorio. La sala post-PCR, es una sala "sucia", fuente importante de contaminación por producto terminado o *carryover*.

Área de secuenciación: Incluye todos los aparatos necesarios para realizar el procedimiento de secuenciación automática de las muestras de ADN. Estos equipos los estudiarás con detalle en la unidad correspondiente. En la imagen puedes observar en primer plano el secuenciador.



Cámara fría: Estancia que se mantiene a una temperatura de 4 °C utilizada para almacenamiento de muestras y reactivos y para la realización de procedimientos que necesiten ser realizados a baja temperatura, como las electroforesis de larga duración.

Autoevaluación

Indica cuales de las siguientes afirmaciones en relación a las técnicas de biología molecular son correctas.

- ☐ Las técnicas de biología molecular permiten analizar grandes cambios producidos en la secuencia de bases de ADN.
- ☐ Utilizan procedimientos de hibridación.
- ☐ Permiten realizar el estudio de alteraciones cromosómicas en individuos portadores.
- ☐ Pueden ser utilizadas en reproducción asistida para detectar alteraciones en los embriones antes de su implantación.
- ☐ Son utilizadas por la citogenética molecular para detectar alteraciones en el ADN.

Mostrar retroalimentación

Solución

1. Incorrecto
2. Correcto
3. Incorrecto
4. Correcto
5. Correcto

3.3.- Equipamiento.

¿Qué equipos forman parte de un laboratorio de Biología molecular?

En el laboratorio de Biología Molecular, existe equipamiento específico del laboratorio así como equipamiento genérico, común a otros laboratorios.

Es equipamiento específico:

- El termociclador
- El equipo de electroforesis
- El documentador de geles

Termociclador.

Aparato que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para la amplificación de diversas hebras de ADN en la técnica de la PCR. El modelo más común, consiste en un bloque de resistencia eléctrica que distribuye una temperatura homogénea a través de una placa durante tiempos que pueden ser programables, normalmente con rangos de temperatura de 4 °C a 96 °C donde ocurre la desnaturalización, hibridación y extensión de una molécula de ADN. Dado que las reacciones incubadas en el aparato son en soluciones acuosas, suelen incluir en la tapa una placa calentada constantemente a 103 °C para evitar la condensación del agua en las tapas de los tubos donde ocurre la reacción, y así evitar que los solutos se concentren, lo que modificaría las condiciones óptimas para la enzima polimerizante (*Taq* Polimerasa) y la termodinámica del apareamiento de los [cebadores](#) o *primers*.

Desde hace unos años se ha implementado un nuevo método para cambiar la resistencia de estos termocicladores, utilizando para ello la tecnología o efecto Peltier aprovechando las propiedades de los semiconductores. El efecto Peltier hace referencia a la creación de una diferencia de temperatura debido a un voltaje eléctrico. Esto ocurre cuando una corriente se hace pasar por dos metales o semiconductores conectados por dos soldaduras. La corriente, propicia una transferencia de calor de una soldadura a la otra: una se enfría, mientras que la otra se calienta. Este material ofrece mayor uniformidad en la temperatura y rampas de incremento y descenso de la temperatura mucho más pronunciadas, obteniendo mejores resultados en los procesos de la PCR.

Una variante de termociclador, es el termociclador a tiempo real, que se utiliza realizar la técnica de la PCR a tiempo real. Esta última, es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de amplificación. La mezcla de reacción, contiene un [fluoróforo](#) que permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. El termociclador a tiempo real, es un termociclador provisto de sensores de fluorescencia, que detecta la fluorescencia emitida tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada. Dicha medición se realiza tras cada ciclo de amplificación, y es por esto que se le denomina PCR en tiempo real.

Equipo de electroforesis.

La electroforesis es una técnica de laboratorio realizada con el objetivo de separar moléculas de acuerdo con su tamaño y carga eléctrica. Es un procedimiento simple y de bajo coste, utilizado como técnica de rutina en los laboratorios. Para realizar la electroforesis es necesario contar con una matriz (gel), que puede ser de poliacrilamida o agarosa (según la resolución que queramos obtener), un tampón que aportará un determinado pH y cubeta de electroforesis, marcador de peso molecular, fuente de y un colorante fluorescente, además de un equipo de luz UV, también conocido como transiluminador.

La electroforesis se lleva a cabo aplicando un campo eléctrico en una disolución tampón de pH 7,5-7,8, en la que se sumerge el gel que contiene las muestras de ácidos nucleicos. En ese pH, las muestras tendrán carga neta negativa de manera que migrarán en función de su tamaño y su conformación tridimensional. Finalizada la electroforesis, podremos visualizar el resultado por medio del transiluminador. Cuando el gel es colocado bajo la luz UV, es posible visualizar el patrón de bandas: las moléculas más pesadas migrarán menos, permaneciendo más cerca del origen de carga, en tanto que las menos pesadas migrarán más.

Documentador de geles.

Sistema documentador para la captura de imagen y análisis de geles

Es un sistema de documentación de geles que sirve para observar, tomar fotos y analizar bandas de los geles posteriores a la electroforesis. Cuenta con un transiluminador para la visualización de los ácidos nucleicos y una cámara fotográfica para fotografiar las bandas fluorescentes de ácidos nucleicos en los geles una vez concluida la electroforesis. Está cámara irá acoplada a un software específico, que podrá mejorar la obtención de la imagen. Contará al menos con una fuente de luz UV, sobre la que se coloca el gel a analizar que contendrá las

bandas de ácido nucleico teñidas con agentes intercalantes que emitirán fluorescencia al ser iluminados con luz UV.

Será equipamiento genérico:

Cabina de bioseguridad de Clase II: Importante para evitar la contaminación de reactivos y de muestras. También importante cuando se trabaja con ARN, el ácido nucleico más sensible a la acción de nucleasas, en particular, de tipo ARNasas.

Sistemas de purificación de agua: En el laboratorio de Biología Molecular, es necesario el uso de agua purificada de tipo II (Ideal para la preparación de reactivos y tampones. Es también la mejor alimentación para todos los sistemas de agua) y agua ultrapura tipo I (para resuspender los ácidos nucleicos, y para realizar la mezcla de reacción para realizar la PCR)

Espectrofotómetro: Mide la cantidad de luz absorbida por una muestra en los espectros de luz ultravioleta y visible (200 a 850 nm). Nos permite confirmar que contamos con cantidad suficiente de ácidos nucleicos (ADN/ARN) de calidad adecuada antes de llevar a cabo ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) u otras técnicas. Los ácidos nucleicos, absorben luz UV debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas en su estructura. La absorción de luz UV es una característica de la molécula, que es usada eficientemente para determinar su concentración y pureza. Los ácidos nucleicos tiene un máximo de absorción a una longitud de onda de 260nm. A esta longitud por lo tanto, la absorción es proporcional a la concentración. Actualmente se usan también espectrofotómetros de dimensiones reducidas, (nanodrop®) que necesitan cantidades mínimas de ácido nucleico para poder realizar una lectura de absorbancia.

Equipos utilizados en el laboratorio de biología molecular.

Sistema automático de extracción de ADN y ARN.



de Termociclador.



Termociclador a tiempo Real.

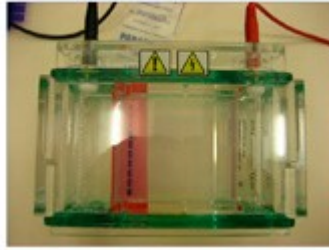


Sistemas de electroforesis horizontal.

Sistemas de electroforesis vertical.

Transiluminador.

Sistema de electroforesis horizontal. Permite realizar la separación de fragmentos de ADN. Utiliza como soporte gel de agarosa.



Centrífuga refrigerada.

Centrífuga refrigerada. Centrífuga que permite controlar la temperatura a la que se lleva a cabo la centrifugación. Utilizada en el procedimiento de extracción manual de los ácidos nucleicos.

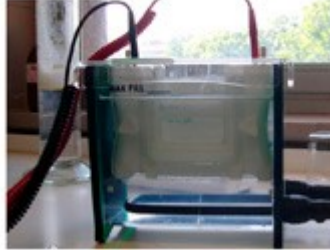


Secuenciador.

Secuenciador. Aparato que realiza la secuenciación automática del ADN.



Sistema de electroforesis vertical. Permite realizar la separación de los fragmentos de ADN en gel de agarosa. Utiliza como soporte gel de agarosa.



Microcentrífuga.

Microcentrífuga. Centrífuga para tubos con capacidad de 0.5 ml a 2 ml. Utilizada en el procedimiento de extracción manual de los ácidos nucleicos.

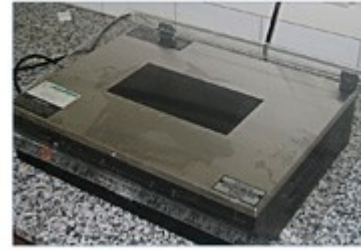


Ultracongelador -80 °C.

Ultracongelador. Congelador que permite almacenar muestras a -80 °C.



Transiluminador. Aparato que permite visualizar los fragmentos de ADN en gel de agarosa. Se ilumina con luz ultravioleta. Utiliza como soporte gel de agarosa.



Termocicladores para secuenciación.

Termocicladores. Empleados en la secuenciación del ADN.



Sistema de fotodocumentación de

Sistema de fotodocumentación. Colocado sobre el transiluminador. Permite obtener imágenes de la posición de los fragmentos de ADN tras su electroforesis en un gel de agarosa.



Para saber más

En este vídeo se repasan el proceso de PCR. Presta especial atención al flujo y las condiciones de trabajo

Protocolo técnica PCR – ...



[Resumen textual alternativo](#)

En este vídeo podrás recorrer un laboratorio de biología molecular incluido en el departamento de bioquímica clínica de un hospital. Intenta identificar algunos de los aparatos que aparecen en él.

[Resumen textual alternativo](#)

4.- Operaciones básicas.

Caso práctico



En su recorrido por el laboratorio, Susana observa que en todos puestos de trabajo hay un juego de micropipetas y se lo comenta a Maite.

— Todas las técnicas de biología molecular utilizan pequeños volúmenes y requieren saber utilizar las micropipetas. Los reactivos y enzimas utilizados en estas técnicas son carísimos y no debemos malgastarlos. Supongo que ya sabréis manejar una micropipeta ¿Verdad? —pregunta Maite.

— Sí, hemos practicado bastante en el instituto —responde Susana.

— De todas maneras mañana podréis practicar un poco con ellas para que os vayáis acostumbrando —comenta Maite—. Siempre es conveniente hacer algunos ensayos previos antes de utilizar las muestras de ADN. Si estas se estropean suele ser difícil volver a conseguir otra muestra del paciente.

Maite les explica que las operaciones básicas a realizar en el laboratorio de citogenética y biología molecular son similares a las de cualquier otro laboratorio. La preparación de reactivos se realiza de igual manera, lo único que cambian son las unidades de concentración y los volúmenes. En la preparación de todos los reactivos se utiliza [agua bidestilada](#).

— Como esta semana va a ser de "toma de contacto" con el laboratorio, es conveniente que a la vez que os vais familiarizando con la rutina de trabajo aprovechéis para repasar la realización de estas operaciones básicas, así como el uso del microscopio —continúa diciendo Maite.

— Cuando tengáis un momento a lo largo de esta semana sería conveniente, que ambos me acompañarais a la hora de preparar los reactivos que se utilizan en las técnicas de biología molecular. La preparación se lleva a cabo en la cabina de flujo laminar o en una cabina de seguridad biológica y aunque no es conveniente que haya muchas personas cerca cuando se manipulan estos reactivos, para evitar que se contaminen, creo que es importante que vayáis viendo cómo se hace. Pronto os dejaré prepararlos a vosotros —comenta Maite.

Carlos y Susana se dan cuenta de que en este laboratorio hay que poner un cuidado especial en la realización de los procedimientos y deciden hacer caso a Maite y repasar lo aprendido en el instituto.

4.1.- Preparación de tampones y reactivos (I).

Como ya ha comentado Maite, en biología molecular es necesario preparar reactivos a unas concentraciones algo diferentes de las usadas en el laboratorio general. En este apartado se repasarán algunos de los puntos a tener en cuenta a la hora de prepararlos.



Todos los reactivos de biología molecular se preparan con agua bidestilada. Para la realización de algunas técnicas se compran ampollas comerciales libre de ADNasas y ARNasas, enzimas que pueden degradar el ADN y el ARN respectivamente.

- Las técnicas de biología molecular emplean volúmenes pequeños, microlitros: En la tabla se indican las equivalencias de las unidades utilizadas en biología molecular.

Prefijo	Abreviatura	Definición (valor de la unidad multiplicado por)
Pico	p	10^{-12}
Nano	n	10^{-9}
Micro	μ	10^{-6}
Mil	m	10^{-3}

Ejemplos:

Un mililitro (ml) es 10^{-3} litros. Es lo mismo que decir que hay 1000 ml en 1 litro (l).

Un microlitro (μ l) es 10^{-6} ml, o lo que es lo mismo hay 1000 μ l en 1 ml.

Un microlitro (μ l) es 10^{-6} litros o lo que es lo mismo, hay 1.000.000 μ l en 1 litro.

- Lo mismo ocurre con las concentraciones. En biología molecular se utilizan

concentraciones expresadas en términos de milimolaridad (milimoles/litro) o micromolaridad (micromoles/litro).

Una concentración $1 \text{ mM} = 1 \text{ mmol/l} = 10^{-3} \text{ M}$.

Una concentración $1 \text{ }\mu\text{M} = 1 \text{ }\mu\text{mol/l} = 10^{-6} \text{ M}$.

Una concentración $1 \text{ nM} = 1 \text{ nmol/l} = 10^{-9} \text{ M}$.

- Cuando se prepara un reactivo generalmente se hace a partir de una [solución madre o solución stock](#). Esta es una solución mucho más concentrada que la solución que luego se utiliza al hacer la técnica (solución de trabajo) Por definición a la concentración de trabajo de un reactivo de un reactivo se le denomina "1x". Así por ejemplo, un tampón 10x (independientemente de sus ingredientes o molaridad) tiene una concentración 10 veces superior a la concentración de trabajo.

Ejercicio resuelto

¿Cómo prepararías 1 litro de una solución de trabajo a partir de un stock 50x?

Mostrar retroalimentación

La solución de trabajo solicitada (1x) está 50 veces menos concentrada que la del stock. Por lo tanto se deberán añadir: 1 litro (1000 ml) dividido por 50 = 20 ml del stock y añadir agua hasta un final de 1000 ml (980 ml de agua).

4.1.1.- Preparación de tampones y reactivos (II).

Carlos y Susana contemplan el armario donde se guardan los reactivos en el laboratorio de biología molecular, ni los nombres ni las concentraciones de muchos de ellos les son familiares. Juntos intentan recordar las reglas que había que seguir para su preparación y que tantas veces habían aplicado en el instituto.



Muchas veces en el laboratorio de biología molecular necesitarás preparar reactivos utilizando soluciones madre que están mucho más concentradas. La fórmula que debes recordar en estos casos es:

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

Siendo:

- V_2 El volumen de la solución que quieres preparar; y C_2 la concentración final de la solución que quieres preparar.
- V_1 El volumen de la solución madre de la que partes; y C_1 la concentración de la solución madre de la partes.

Generalmente lo que sabrás será C_2 , V_2 , y C_1 y lo que necesitarás conocer será V_1 . Pero puedes utilizar esta fórmula para conocer una de las variables siempre que conozcas seguro las otras tres.

Para hacer el cálculo debes poner mucho cuidado en colocar todas las cifras con sus unidades correspondientes.

Ejercicio resuelto

¿Cómo prepararías 100 ml de una solución que esté a una concentración 0,25 M NaCl, utilizando una solución madre de concentración 5 M?

Mostrar retroalimentación

Utilizando la fórmula. $V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$ tendremos:

$V_1 \text{ ml} \cdot 5 \text{ M NaCl} = 100 \text{ ml} \cdot 0,25 \text{ M NaCl}$; Se necesitaría tomar $V_1 = 5 \text{ ml}$ de la solución 5 M de NaCl.

Para finalizar se mezclarían los 5 ml de NaCl con 95 ml de agua destilada.

Ejercicio resuelto

Indica como prepararías 100 ml de una solución 2 mM de NaCl a partir de una solución madre 0,5 M de NaCl.

Mostrar retroalimentación

Utilizando la fórmula. $V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$ tendremos

$$V_1 \cdot 0,5 \text{ M} = 100 \text{ ml} \cdot 2 \text{ mM}$$

Mirando la fórmula observamos que las concentraciones no tienen las mismas unidades.

$$0,5 \text{ M} = 500 \text{ mM}$$

$$V_1 \cdot 500 \text{ mM} = 100 \text{ ml} \cdot 2 \text{ mM}$$

$$V_1 = 0,4 \text{ ml}$$

Para preparar la solución se mezclarían 0,4 ml de 0,5 M NaCl con 99,6 ml de agua destilada.

Autoevaluación

Quieres preparar 50 ml de un reactivo que tenga una concentración 50 mM de Tris (un tampón utilizado en biología molecular). Tienes en el laboratorio una solución stock de Tris 1 M. Indica qué volumen de la misma (Tris 1 M) deberías coger para preparar el reactivo que necesitas.

- ☐ a) 5 ml.
- ☐ b) 2,5 ml.
- ☐ c) 25 ml.
- ☐ d) 2500 ml.

No es correcta. Aplica la fórmula, teniendo en cuenta las unidades.

Efectivamente es correcta.

No es correcta. Debes aplicar la fórmula teniendo cuidado de poner las mismas unidades.

No es correcta. Debes aplicar la fórmula teniendo cuidado de poner las mismas unidades.

Solución

1. Incorrecto
2. Opción correcta
3. Incorrecto
4. Incorrecto

4.2.- Manejo de micropipetas.



¿Has utilizado alguna vez una micropipeta? El manejo apropiado de la micropipeta es una de las destrezas que todo técnico que trabaje en biología molecular debe alcanzar.

Las micropipetas se utilizan para transferir volúmenes pequeños (de hasta 0,5 μl), a unos microtubos especiales que se utilizan en biología molecular y que reciben el nombre de [tubos eppendorf](#). En el mercado existen varios tipos de micropipetas que dispensan volúmenes entre 0,5 μl y 1000 μl .

El volumen máximo que cada micropipeta puede dispensar viene indicado en la parte superior su pulsador (o pistón), junto a la letra P.

En el lateral de cada micropipeta se indica también el intervalo o rango de volúmenes con el que se puede trabajar con ella.

Así una P1000: Será una pipeta que se utilice para trabajar con volúmenes grandes entre 100 y 1000 μl . Estas pipetas utilizan un tipo de punta de color azul.

Una P100: Será una pipeta que se utilice para medir volúmenes en el rango de 10 a 100 μl . Estas pipetas utilizan puntas amarillas.

Una P10: Será una micropipeta que se utilice para medir volúmenes de 0,5 hasta 10 μl . Utilizan puntas blancas.



La mayor parte de las micropipetas que se utilizan en biología molecular son regulables, se puede ajustar el volumen a medir a la cantidad deseada, dentro del rango. Existen asimismo micropipetas que dispensan volúmenes fijos.

Para ajustar el volumen en una micropipeta regulable deberemos rotar el dispositivo de graduación de volumen de la pipeta hasta que aparezca la cifra que queremos transferir. Cuidado con los dígitos, las micropipetas pueden coger décimas de microlitro, por ejemplo en el caso de la imagen 15,04 µl y 25,0 µl respectivamente.

Debes conocer

En esta presentación se indican los pasos más importantes a tener en cuenta a la hora de utilizar una micropipeta para transferir un volumen de líquido de un recipiente a otro.

[Resumen textual alternativo](#)

Para saber más

En este vídeo puedes repasar la forma de utilización de una micropipeta tanto para tomar como para dispensar volúmenes.

[Resumen textual alternativo](#)

4.3.- Microscopios.

El microscopio es una herramienta imprescindible en un laboratorio de citogenética.
¿Recuerdas cómo manejarlo?

A continuación podrás repasar las partes principales de los dos microscopios utilizados en las técnicas de citogenética convencional: el microscopio óptico, necesario para estudiar las metafases celulares y el microscopio invertido utilizado para controlar el crecimiento de las células durante la fase de cultivo celular.

Debes conocer

En la siguiente animación conocerás las partes de un microscopio óptico. Pasa el puntero del ratón por encima de los números de la imagen.



[Resumen textual alternativo](#)

Debes conocer

En la siguiente animación conocerás las partes de un microscopio invertido. Pasa el puntero del ratón por encima de los números de la imagen.



[Resumen textual alternativo](#)

Para saber más

Mirando este vídeo podrás repasar además de las partes del microscopio los pasos que debes seguir cuando quieras enfocar una preparación.

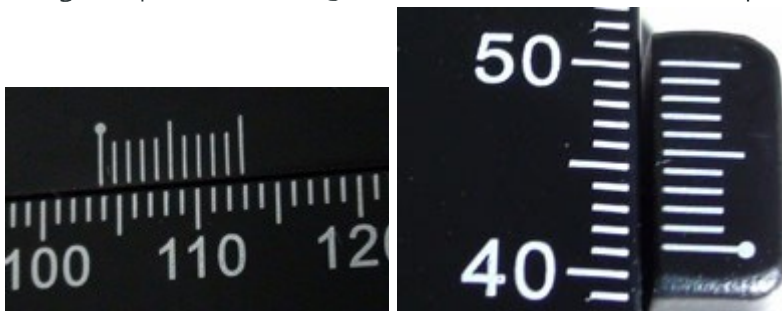
[Resumen textual alternativo](#)

4.4.- Localización de metafases con el microscopio óptico.

En citogenética, una vez que ya has localizado la metafase con el microscopio óptico y la vas a estudiar es conveniente registrar su posición para poder volver sobre ella en caso de que sea necesaria su revisión.

¿Cómo se registran las metafases estudiadas? Cuando localices y estudies una metafase debes apuntar las coordenadas de la misma en la hoja de trabajo. Para ello actúa de la siguiente forma:

- Colocar la metafase en el centro del campo de observación y mirar las dos escalas tipo [nonius](#) situadas en la platina, una en posición horizontal y la otra vertical. Cada una de estas escalas tiene dos partes, una escala principal fija y numerada sobre la que desliza otra escala más pequeña subdividida en 10 partes. En este caso la escala móvil no está numerada y la posición cero de la misma viene señalada con un punto blanco. Imagina que ves esto: ¿Qué coordenadas deberías apuntar?



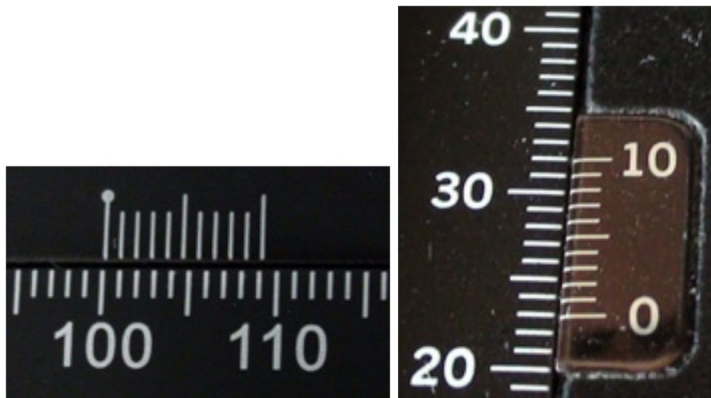
- Para determinar la posición de la metafase deberás apuntar el valor entero de las coordenadas en la escala principal hasta llegar a la división cero del nonius.
- A partir de ahí mira cual es la subdivisión de la escala pequeña que coincide exactamente con las subdivisiones de la escala principal. Este será el valor de la fracción que deberemos añadir a la coordenada de la regla principal.
 - En nuestro caso en la regla horizontal, la coordenada sería: 103,7.
 - En la regla vertical: 41,4. Las coordenadas de la metafase vendrían indicadas de la siguiente manera: 103,7 / 41,4

No olvides colocar la metafase en el centro del campo de observación antes de apuntar la

referencia, si no lo haces te será más difícil encontrarla.

Ejercicio resuelto

Indica las coordenadas de la metafase correspondientes a esta posición:



Mostrar retroalimentación

Las coordenadas serían: 100 / 22,8.

Para saber más

Si visitas la siguiente página web podrás seguir practicando la utilización del nonius.

[Practica la medidas con nonius](#)

5.- Buenas prácticas en los laboratorios de Citogenética y Biología Molecular.

Caso práctico



Maite continúa explicando a Carlos y a Susana las peculiaridades que tiene este Servicio.

A Carlos le llama la atención la cantidad de señales de señales de peligro o carteles de advertencia que hay colocados en las paredes y puertas del laboratorio. Y el hecho de que la sala de cultivos tenga conectada la luz ultravioleta en su interior. Lo mismo ocurre con las cabinas de seguridad.

— ¿Por qué se toman todas estas medidas? —pregunta Carlos.

— Tienen que ver con el tipo de análisis que se realizan en el laboratorio. Los cultivos que se llevan a cabo en citogenética y todas las técnicas de biología molecular en general son muy sensibles a la contaminación, por lo que hay que tomar medidas para que esta no se produzca. Todas las normas y precauciones que se deben seguir al realizar las técnicas vienen indicadas en el manual de procedimientos. Os aconsejo que cuando tengáis tiempo lo consultéis. Es una buena manera de familiarizarse con el laboratorio —comenta Maite.

Carlos y Susana ya tienen tarea para el día siguiente.



Existen una serie de medidas generales de buenas prácticas, comunes a todos los laboratorios, que ayudan a que nuestro trabajo sea reproducible, fiable y se realice en condiciones seguras. Estas medidas se tratan a fondo en otros módulos de este Ciclo: Desinfectar las superficies de trabajo con alcohol al 70%, utilizar ropa protectora, mantener el orden en puesto de trabajo, no comer, beber o fumar en el laboratorio etc.

Además de estas medidas, en los laboratorios de Biología Molecular y Citogenética, se debe prestar una atención especial a la esterilidad. En gran parte de las técnicas es absolutamente necesario utilizar material estéril.

Muchos de los materiales utilizados se compran ya esterilizados. Es el caso de los materiales plásticos, tubos, frascos de cultivos y pipetas, utilizados en las técnicas de biología molecular y citogenética. El procedimiento utilizado para su esterilización es la [radiación gamma](#).

De igual forma, todos los tubos, botellas de vidrio y soluciones de reactivos, empleados en los procedimientos de cultivos y en las técnicas de biología molecular deben esterilizarse mediante [calor húmedo](#), utilizando el autoclave a una temperatura de 121 °C durante 20 minutos.

Los líquidos termosensibles, que llevan componentes que se degradan con el calor y por tanto no pueden ser autoclavados, deben filtrarse a través de filtros con un tamaño de poro más pequeño que el de las bacterias, entre 0,22 y 0,45 μm de diámetro.

Autoevaluación

En la tabla se muestran los pasos del procedimiento de toma de un volumen utilizando una micropipeta. Ordénalos según la secuencia de realización del procedimiento.

Ejercicio de relacionar

Pasos del procedimiento

Relación Secuencia de

Introducir la punta de la pipeta en el tubo.

☐

1. Paso 1.

Enviar

Levantar suavemente el pistón para recoger el líquido.

☐

2. Paso 2.

Se debe bajar el pistón de la pipeta antes de introducirla en el tubo. Después se deja de ejercer presión sobre el pistón para que el líquido ascienda por la punta. Para finalizar se saca la punta de la pipeta del tubo.

5.1.- Técnica aséptica.



¿Te suena de algo el término aséptico? Quiere decir libre de contaminación.

Se denomina técnica aséptica al conjunto de pasos que tienen como finalidad disminuir la posibilidad de contaminación a la hora de realizar los procedimientos de análisis en un laboratorio.

No sirve de nada esterilizar el material con el que vamos a trabajar si luego no lo utilizamos correctamente. Al trabajar con material estéril deberemos poner mucho cuidado en que este no se contamine al realizar los procedimientos.

- En citogenética, si introducimos inadvertidamente microorganismos en el cultivo que estamos realizando, las células que pretendemos cultivar crecerán más lentamente que la mayoría de esos microorganismos contaminantes y la mayor parte de las veces nuestras células morirán.
- De la misma manera, al realizar técnicas como la PCR (amplificación en cadena de la polimerasa) deberemos poner un cuidado especial para no introducir en los tubos de reacción material "extraño", generalmente ADN nuestro o medioambiental, que se amplificará junto al de la muestra invalidando el procedimiento.

Para reducir al mínimo las posibilidades de contaminación del material y de los reactivos, todos los procedimientos en los que se requiera esterilidad deben ser llevados a cabo en el interior de una cabina de flujo laminar o una cabina de seguridad biológica. Estas cabinas son recintos que contienen unos filtros especiales denominados HEPA, que eliminan el 99,9% de las partículas suspendidas en el aire, evitando de esta manera la contaminación de las muestras, materiales y reactivos colocados en ella. La cabina crea un flujo, una "cortina" de aire, vertical u horizontal que hace que la muestra esté protegida en todo

momento. Es importante que este flujo laminar no sea interrumpido durante el trabajo del operador, las turbulencias generadas en este flujo pueden poner en peligro la esterilidad de las muestras.

¿Cómo podemos contaminar un cultivo sin querer?

- Tocando materiales estériles que van a entrar en contacto directo con la muestra, con el [medio de cultivo](#) o los contenedores. Por ejemplo tocando con la mano el cuello de un frasco de cultivo o la boca de un tubo cuando intentamos cerrarlo.
- Tosiendo, estornudando, hablando o respirando directamente sobre el material estéril que se va a utilizar en un cultivo.
- Dejando materiales (tapones de tubos y botellas) en la superficie de trabajo y luego volviéndolos a utilizar. Por ejemplo, colocando el tapón de un tubo o botella hacia abajo en la superficie de trabajo y luego volviéndolo a colocar.
- Rozando con la punta de la pipeta parte de un material no estéril y luego utilizando esa misma pipeta para por ejemplo, retirar medio de unos frascos de cultivo.
- Moviendo la mano o el brazo por encima de un frasco o medio de cultivo abierto. Al hacer esto puede hacer que caigan contaminantes en el medio. Por ejemplo para alcanzar un bote o echar una pipeta al contenedor pasar con el brazo por encima de recipientes abiertos.
- Decantar directamente el líquido del interior de tubos, las gotas de líquido se pueden quedar en la boca del tubo posibilitando la entrada de microorganismos.

La técnica aséptica en el laboratorio de citogenética:

La característica principal, que define el laboratorio de cultivos celulares, es el mantenimiento de la asepsia. Por tanto, para el mantenimiento del cultivo será vital evitar la aparición de cualquier microorganismo no deseado.

Además de cumplir las normas básicas de laboratorio, para trabajar en la sala de cultivos celulares se exigirá el cumplimiento de unas ciertas medidas encaminadas a evitar la contaminación. Entre las normas más importantes se pueden citar las siguientes:

- Al laboratorio de cultivos celulares sólo entrará el personal autorizado.
- La puerta de la sala siempre debe de estar cerrada.
- El material desechable estéril no es intercambiable con el de otras salas.

- Encender la luz germicida UV y el flujo unos 10 minutos antes de empezar a trabajar.
- Todas las manipulaciones se realizarán dentro de la cabina de flujo laminar.
- Para entrar a las salas de cultivos se ha de llevar bata limpia de manga larga, preferiblemente batas exclusivas para el trabajo en el laboratorio de cultivos celulares.
- Evitar la introducción de libretas, calculadoras, cajas de cartón o papel dentro de la campana, pueden ser fuente de contaminación.
- Se han de utilizar guantes en todos los casos de manipulación de células.
- Una vez finalizado el trabajo, el tubo de aspiración se tiene que limpiar con lejía y etanol hasta neutralizar los líquidos contaminantes o medios de cultivo aspirados (cambio de color del rojo-fenol del medio a transparente) y cerrar el vacío para evitar el uso constante de la bomba.
- Limpiar la cabina con etanol al 70% al finalizar cada sesión de trabajo. No utilizar en la mampara de metacrilato, ya que este no es resistente y al reaccionar provoca opacidad.
- Dejar el UV funcionando 5- 10 minutos (la mayoría de campanas se pueden programar durante 20 minutos)
- No se ha de salir del laboratorio con los guantes puestos.

Debes conocer

En la siguiente presentación te explicamos cómo trabajar en la cabina de flujo laminar de forma aséptica durante la realización de los procedimientos de cultivo celular y las técnicas moleculares de amplificación de ADN.

[Resumen textual alternativo](#)

5.2.- Protección frente al riesgo químico y radiaciones.

Caso práctico



Maite emplea la última parte de la visita en recordar a los alumnos los aspectos más importantes relacionados con la seguridad a la hora de trabajar en estos laboratorios. Les indica la ubicación del armario donde almacenan los productos químicos peligrosos utilizados en las técnicas de citogenética y molecular.

— ¿Veis la cantidad de productos peligrosos que tenemos almacenados aquí?— pregunta Maite.

Ellos asienten y Maite sigue contando.

— En el laboratorio de citogenética y biología molecular se almacenan una gran cantidad de productos tóxicos. La mayor parte de ellos son productos químicos irritantes aunque también trabajamos con algunos que puede ocasionar un grave peligro para la salud como el [bromuro de etidio](#) y la [formamida](#).

Todos los productos empleados en el laboratorio deben ser almacenados de acuerdo a sus características y utilizados siguiendo estrictas medidas de seguridad. La información relativa a cada producto puede consultarse en su [ficha de seguridad](#).



¿Cuáles son los principales peligros a los que estarás expuesto al trabajar en un laboratorio de estas características?

Tres son los peligros o riesgos más importantes que debes considerar:

- Exposición a productos químicos tóxicos.
- Exposición a la radiación ultravioleta.
- Exposición a agentes biológicos presentes en las muestras biológicas que se estudian: Virus de la hepatitis y SIDA entre otros.

El riesgo químico es junto al riesgo de radiación por [luz ultravioleta](#) uno de los peligros más importantes a considerar en los laboratorios de biología molecular y citogenética. Algunos productos químicos que se almacenan en ellos están considerados por la legislación como peligrosos:

- Fijadores como el metanol y el ácido acético utilizado en los procedimientos de citogenética son tóxicos por inhalación (irritan la mucosa de la vía respiratoria), contacto (causan enrojecimiento de la piel al absorberse) y pueden tener efectos a nivel del sistema nervioso central, produciendo mareos y dolores de cabeza.
- Compuestos como la formamida utilizada en las técnicas hibridación de ácidos nucleicos, tienen efectos similares, causando dolores de cabeza, náuseas y enrojecimiento de los ojos si no se trabaja con precaución.
- La [acrilamida](#) y el bromuro de etidio, un [agente intercalante](#), son utilizados en las técnicas de electroforesis de ácidos nucleicos y ambos tienen efectos [carcinogénicos](#), y son nocivos por ingestión, contacto e inhalación. La acrilamida puede afectar al sistema nervioso causando debilidad en manos y pies.
- Incluso los productos de limpieza pueden tener un efecto tóxico para el organismo.

Es importante por tanto que cuando trabajes en el laboratorio adoptes una serie de medidas preventivas como:

- Utilizar siempre los [equipos de protección personal](#) (EPIs): bata, guantes, gafas, mascarilla y en ocasiones pantallas protectoras cuando trabajes con los reactivos anteriormente señalados. Utiliza guantes de nitrilo para manejar geles que lleven bromuro de etidio, los guantes de látex no te protegerán.
- Utiliza la cabina de extracción de gases cuando vayas a preparar un gel al que hayas añadido bromuro de etidio.
- Utiliza gafas y pantalla facial para protegerte de la radiación ultravioleta, este tipo de radiación no ionizante, es invisible al ojo humano y puede producir quemaduras en ojos y piel a la hora de examinar los geles en el transiluminador (este equipo contiene una fuente de luz ultravioleta). Protege también el resto de la piel, no dejes zonas expuestas. Recuerda que la luz ultravioleta no sólo es cancerígena cuando actúa de forma directa, sino también cuando es reflejada por cualquier objeto del laboratorio.

5.3.- Protección frente al riesgo biológico.

¿Qué entiendes por riesgo biológico?

Podemos definirlo como el riesgo de adquirir una infección por exposición a [agentes biológicos](#), que pueden estar presentes en las muestras analizadas en un laboratorio, en nuestro caso de diagnóstico clínico o de anatomía patológica.



Reflexiona

Fíjate en la imagen anterior. ¿Crees que esta persona está actuando de forma adecuada?

Mostrar retroalimentación

Evidentemente no. No lleva ni guantes ni bata mientras maneja un tubo eppendorf abierto que contiene ADN. El procedimiento de trabajo no es correcto.

Si no manejamos las muestras con cuidado o los procedimientos que utilizamos en el análisis no son los adecuados corremos el riesgo de entrar en contacto con estos patógenos potenciales. Los principales agentes de riesgo que podemos encontrarnos en las muestras

que llegan al laboratorio son el virus de la hepatitis (B y C) y virus del SIDA.

La posibilidad de contraer una infección por exposición a microorganismos debe estar adecuadamente advertida a la entrada al laboratorio mediante la señal de riesgo biológico como la que puedes ver en la siguiente imagen.



A continuación se exponen una serie de medidas que seguro que te interesarán, dirigidas a disminuir este riesgo de infección:

- Utiliza siempre ropa protectora cuando trabajes con muestras biológicas para evitar un contacto directo de la muestra con la piel: bata, guantes, mascarilla, y si hay riesgo de salpicaduras, también gafas.
- Lava frecuentemente tus manos. Hazlo siempre después de quitarte los guantes y antes de salir del laboratorio.
- No pipetees nada con la boca, utiliza los dispositivos auxiliares.
- Realiza todos los procedimientos que incluyan la manipulación de muestras en una cabina de seguridad biológica, para minimizar las posibilidades de exposición accidental.
- En el laboratorio de citogenética ten cuidado con la manipulación de los cultivos obtenidos a partir de las muestras. No están exentos de riesgo.
- Desinfecta la superficie de trabajo al menos una vez al día y siempre que haya un derrame.
- Vacúnate frente a la hepatitis si no lo estás ya.

Autoevaluación

¿Cuál de los siguientes productos es carcinogénico?

- ☐ a) Metanol.
- ☐ b) Formamida.
- ☐ c) Bromuro de etidio.
- ☐ d) Acrilamida.

Mostrar retroalimentación

Solución

1. Incorrecto
2. Incorrecto
3. Correcto
4. Correcto

5.4.- Gestión de residuos.



¿Has pensado alguna vez qué se hace con los residuos que se generan en los laboratorios de un hospital?

El protocolo de gestión de residuos hospitalarios exige:

1. Identificarlos.
2. Segregarlos.
3. Almacenarlos, transportarlos y eliminarlos.

Los residuos sanitarios están clasificados en dos grupos:

Residuos inespecíficos.

- Grupo I: Sanitarios asimilables a urbanos: cartón, papel, material de oficina, basura orgánica.
- Grupo II: Inertes generados en la actividad sanitaria (gasas, apósitos, ropa de un solo uso manchada de sangre). Eliminados utilizando bolsas de basura de [galga](#) superior a la habitual.

Residuos de riesgo o específicos.

- Grupo III: Residuos especiales que por sus riesgos sobre la salud laboral o comunitaria requieren unas medidas especiales de recogida, almacenamiento, transporte y eliminación.
- Grupo IV: Residuos de alto riesgo no incluidos en el grupo III y los citostáticos, que tienen una normativa especial y deben ser eliminados aparte. Sustancias cancerígenas, de elevada toxicidad, compuestos como el bromuro de etidio, pilas de "botón", mercurio...

Muchos de los residuos generados en los laboratorios de citogenética y biología molecular son semejantes a los de un laboratorio general de diagnóstico o anatomía patológica, colorantes, fijadores...y forman parte del grupo III de riesgo.

Hay que hacer una mención especial a los residuos generados en los laboratorios de biología molecular que utilizan bromuro de etidio para poner de manifiesto al ADN en los geles de electroforesis. Todos los productos sólidos que hayan estado en contacto con el bromuro de etidio se deben colocar en contenedores especiales que se eliminarán por incineración como el de la imagen anterior.

Los productos líquidos, como los tampones utilizados en la electroforesis, se pueden recoger en contenedores especiales que son gestionados por empresas de eliminación de residuos o descontaminarlos en el propio laboratorio utilizando filtros de carbón activo. Una vez descontaminados estos tampones pueden ser eliminados por la fregadera.

El resto de los residuos, se elimina siguiendo los procedimientos habituales:

Los fijadores utilizados en las técnicas de citogenética son almacenados y recogidos por empresas que se dedican a la gestión de este tipo de residuos.

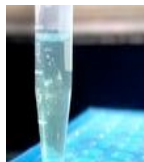
Los recipientes de las muestras biológicas estudiadas y de los cultivos realizados en el laboratorio de citogenética son eliminados en las bolsas rojas e incinerados.

Anexo.- Licencias de recursos.

Licencias de recursos utilizados en la Unidad de Trabajo.

Recurso
(1)

Datos del recurso (1)



Autoría: Gravitywave

Licencia: CC by-nc-sa

Procedencia:

<http://www.flickr.com/photos/gravitywave/7715395/>

Autoría: Manic Street Preacher



Licencia: CC by-nc-sa 2.0

Procedencia:

<http://www.flickr.com/photos/manicstreetpreacher/323055083/>

Autoría: M. Janicki

Licencia: CC by 2.0

Procedencia:

<http://www.flickr.com/photos/mjanicki/3793323347/sizes/o/in/photostream>

Autoría: Kqedquest.

Licencia: CC by-nc

Procedencia:

<http://www.flickr.com/photos/kqedquest/2404607846/sizes/o/in/photostream>

Autoría: Maticulous.

Licencia: CC by

Procedencia:

<http://www.flickr.com/photos/maticulous/2552655893>



Recurso
(2)

Datos del recurso (2)



Autoría: Tahe Fertilidad

Licencia: CC by-nd

Procedencia: <http://www.flickr.com/photos/tahefertilidad/5453881334/sizes/l/in/faves-65845666@N05/>

Autoría: CdePaz

Licencia: CC by-sa 2.0

Procedencia: <http://www.flickr.com/photos/cdepaz/2859389402/in/photostream>



Autoría: CdePaz

Licencia: CC by-sa 2.0

Procedencia: <http://www.flickr.com/photos/cdepaz/2859344468/in/faves-65845666@N05/>



Autoría: senc01a

Licencia: CC by-sa

Procedencia: <http://www.flickr.com/photos/senc01a/3535353269/sizes/l/in/photostream>



Autoría: Moleitau.

Licencia: CC by-nc-sa 2.0

Procedencia: <http://www.flickr.com/photos/blackbeltjones/3344297605/>



