

TALLER 1 DE BIOLOGÍA CELULAR

Atención: Este documento contiene hipervínculos (fuente azul, subrayados) que les permitirán acceder a fuentes de información adicionales.

Los contenidos del TALLER 1 están asociados a las Unidades 1 y 2 del [Programa de Contenidos](#)

Objetivos del Taller 1:

- Conocer los fundamentos moleculares del mecanismo de replicación de los ácidos nucleicos.
- Identificar las diferencias de la replicación de ácidos nucleicos en el contexto celular de la replicación *in vitro*.
- Comprender algunas aplicaciones de uso clínico de las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

PARTE A

Introducción:

El conocimiento científico acerca de los procesos moleculares que subyacen al mantenimiento del genoma y que permiten simultáneamente su variabilidad, han permitido comprender los fenómenos biológicos de replicación, reparación, mutación y reorganización del ADN.

Pero, además, este conocimiento ha permitido desarrollar procedimientos tecnológicos innovadores que poseen múltiples aplicaciones en la clínica y en la investigación básica. En este taller analizaremos dos de estas técnicas: PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) y RT-qPCR (PCR cuantitativa con retrotranscripción), cuyos desarrollos están basados en los procesos de replicación de los ácidos nucleicos.

La técnica de PCR y sus variantes

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymearse Chain Reaction*) permite la amplificación de un fragmento de ADN en una reacción *in vitro*. Como consecuencia de la aplicación de esta técnica pueden generarse millones de copias del fragmento de ADN amplificado a partir de un número muy bajo de copias iniciales. Esta técnica fue desarrollada en 1983 por el bioquímico estadounidense Kary Mullis por la que recibió el [premio Nobel de Química en 1993](#).

Una variante de esa técnica, denominada RT-PCR, permite la amplificación indirecta de moléculas de ARN. Para ello, incluye un paso de retrotranscripción (RT) que es seguido por la amplificación de moléculas de ADN complementario (cADN) a moléculas de ARN.

Ambas variantes de la técnica, PCR y RT-PCR, pueden, a su vez, subclasificarse por el momento en el que se detectan y analizan los productos de la amplificación. Si esta detección se hace una vez finalizada la amplificación, hablamos de PCR (o RT-PCR) *de punto final*, que tiene usualmente fines cualitativos. Es decir, la información proviene de determinar si hubo o no amplificación, y a veces, del tamaño (en pares de bases) del producto amplificado. Cuando, por el contrario, la detección se realiza de manera continua – en *tiempo real* – a lo largo de los ciclos de amplificación, esto permite una interpretación cuantitativa de los datos (qPCR o RT-qPCR, ‘q’ por *quantitative*), lo que implica poder inferir con precisión las cantidades de moléculas de ácidos nucleicos que actuaron como molde en el inicio del proceso.

Para contestar las siguientes preguntas, le sugerimos que lea previamente los fundamentos de la técnica de PCR de la bibliografía recomendada en la materia.

Para quienes quieran profundizar la lectura, sugerimos el siguiente artículo de lectura optativa (también disponible en el campus):

[Tamay DL, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa \(PCR\) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*. 2013;2\(2\):70-78.](#)

IMPORTANTE:

Se trabajará sobre la resolución de esas preguntas durante la clase o videollamada (según el turno asignado a su comisión) correspondiente. Es muy importante resolver, o intentar resolver las preguntas previamente para aprovechar la clase.

Guía de Actividades

Aplicaciones de la PCR en medicina: Diagnóstico de enfermedades infecciosas

Una aplicación de rutina de la técnica de PCR en el ámbito clínico es en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, mediante la detección de ADN específico del agente patógeno (bacterias, virus, hongos, etc.) en muestras de pacientes.

Un ejemplo de esta aplicación se describe en un trabajo de investigación publicado en el año 2013¹ (ver anexo), en el que se utiliza una reacción de PCR para la detección de brucelosis humana en áreas endémicas.

La brucelosis es una enfermedad infecciosa de distribución mundial, frecuente en zonas rurales, que constituye un problema persistente en muchos países en desarrollo. Esta enfermedad es producida por bacterias del género *Brucella*, que suelen transmitirse de animales utilizados como ganado a los seres humanos (zoonosis), en los que produce un síndrome febril agudo severo.

Los síntomas producidos por la brucelosis suelen solaparse con aquellos producidos por otros agentes etiológicos, por lo que es alta la probabilidad de diagnóstico incorrecto basado únicamente en la sintomatología, lo que puede conducir a la administración de tratamientos ineficaces a los pacientes.

El trabajo de investigación mencionado propone un método de diagnóstico de la brucelosis que consiste en los siguientes pasos:

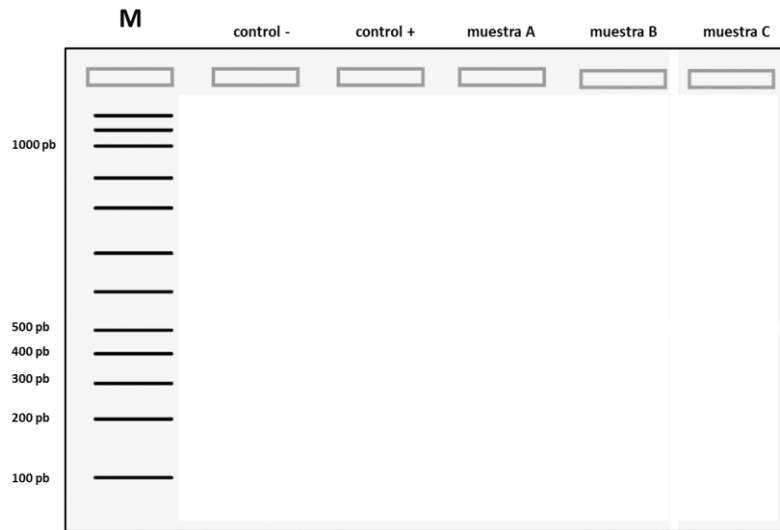
PASO 1- Toma de muestras de sangre de pacientes con síntomas de síndrome febril agudo.

PASO 2- Extracción de ADN del suero de las muestras.

PASO 3- Utilización del ADN extraído en el paso anterior como molde en una reacción de PCR de punto final, con primers diseñados para amplificar un fragmento de 223 pb del gen *bcsp31*, específico de bacterias del género *Brucella*.

¹Kamal, I. H., Gashgari, B. Al, Moselhy, S. S. & Abdullah, T. "Two-stage PCR assay for detection of human brucellosis in endemic areas". *BMC Infectious Dis.* **13**, 145 (2013)

- 1 Represente en el siguiente esquema de un gel de agarosa el patrón de bandas esperado al realizar la detección por PCR de brucelosis. Considere que las muestras de los pacientes A y C resultaron positivas para la presencia de *Brucella* y que la muestra del paciente B resultó negativa. (M: marcador de peso molecular).

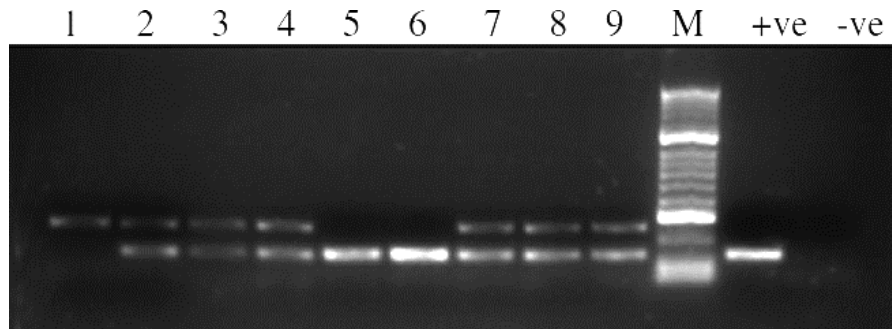


- 2 ¿Cuál es la utilidad de incluir controles positivos y negativos en la reacción de PCR? ¿Qué tipo de muestras podrían utilizarse como controles positivo y negativo?
- 3 Explique cuál es el fundamento de la especificidad de la técnica. ¿Podría esta técnica dar un falso positivo si hubiera ADN del paciente en la muestra de suero?
- 4 ¿Cuáles son las principales diferencias que encuentra entre la replicación *in vitro* de ácidos nucleicos y la replicación celular del genoma?

Cuatro especies de bacterias del género *Brucella* son patogénicas para humanos, siendo las más prevalentes *B.melittensis* (transmitida por ganado caprino y ovino) y *B.abortus* (transmitida por bovinos).

Determinar cuál es la especie de *Brucella* responsable de la enfermedad de cada uno de los pacientes puede brindar información epidemiológica que permita elaborar estrategias de prevención primaria. Con ese objetivo, los autores del trabajo de investigación mencionado desarrollaron una segunda reacción de PCR para realizar con aquellas muestras que hubieran resultado positivas para la presencia de *Brucella*. Para ello, realizaron una PCR *multiplex*: una variante de la técnica que PCR que utiliza varios pares de primers simultáneamente en una misma reacción. En este caso, se utilizaron primers para amplificar un producto de 113 pb, específico de *B.abortus*, y otros para amplificar un producto de 252 pb específico de *B.melittensis*.

- 5- Interprete la siguiente figura extraída del trabajo de investigación y determine para cada uno de los pacientes (del 1 al 9) la(s) especie(s) de *Brucella* encontradas en sus muestras.



NOTA 1: El trabajo de investigación en el que está basado este ejercicio puede encontrarlo en este [hipervínculo](#). Los trabajos de investigación, usualmente denominados informalmente con de la palabra inglesa '*papers*', son el vehículo de comunicación de resultados que utiliza la comunidad científica. Recomendamos la lectura de ese trabajo de investigación (optativo). Si le resultara muy difícil, puede concentrarse en la lectura e interpretación del resumen (*abstract*) al inicio del trabajo.

NOTA 2: La PCR también se utiliza como técnica para detectar mutaciones en el contexto del diagnóstico molecular de algunas enfermedades genéticas. Profundizaremos en ese uso de la técnica de PCR durante la cursada de Genética.

PARTE B

Aplicación clínica de la técnica de RT-qPCR: Determinación de la carga viral de VIH-1 en muestras de plasma.

La infección con el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) afecta aproximadamente a 38 millones de personas. De ellas, 36,2 millones son adultos y 1,8 millones niños (estadísticas del año 2019, fuente [ONUSIDA](https://onusa.org/es)). En Argentina más de 140 mil personas vive con VIH y el 13% desconoce su diagnóstico (año 2022, Boletín de respuesta al VIH e ITS en Argentina N°39 <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-ndeg-39-respuesta-al-vih-y-las-its-en-la-argentina>)

La determinación de la carga viral VIH-1 es casi imprescindible para el manejo de los pacientes infectados por este virus, sobre todo, por su utilidad como marcador de eficiencia del tratamiento antirretroviral. En este momento, la metodología empleada en la mayoría de los servicios de microbiología clínica es la RT-qPCT. Esta metodología presenta como ventajas respecto a otras metodologías utilizadas anteriormente: un mayor rango de cuantificación, mayor sensibilidad y que los resultados se pueden obtener en un período muy corto.

El genoma del VIH está formado por una molécula de ARN que mide aproximadamente 9,8 Kb y consta de 3 genes esenciales: ***gag***, ***pol*** y ***env***. Cuando infecta una célula humana (CD4+), el ARN es inmediatamente transcrito por la acción de una ADN-polimerasa-ARN dependiente, comúnmente conocida como retrotranscriptasa o transcriptasa inversa, generándose un ADN de doble hebra que atraviesa la membrana nuclear y que, por la acción de otra enzima viral, la integrasa, se integra de manera crónica en el genoma humano. El provirus integrado sirve como molde para la transcripción de genes virales por ARN polimerasas endógenas, generando copias de ARN de VIH-1.

La cuantificación del ARN del VIH-1 es un reflejo de la replicación viral activa y es esencial en algunas situaciones clínicas de la infección por este virus. Las indicaciones principales son las siguientes:

- A- La **carga viral** es un marcador predictivo del tiempo de progresión de los síntomas del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) independientemente del número de linfocitos CD4+.
- B- Hay situaciones excepcionales en las que la carga viral es muy útil para el diagnóstico o confirmación de infección por VIH-1. Por ejemplo, en el diagnóstico de infección neonatal (la determinación de anticuerpos no es útil) e incluso cuando se sospecha infección aguda (reduce el período ventana).
Reflexión sobre el uso diagnóstico.
- C- La cuantificación de la carga viral de VIH-1 debe ser realizada antes de iniciar un tratamiento con antirretrovirales, y periódicamente durante su administración, para **medir la eficacia o respuesta al tratamiento** y en el caso de que se sustituya o añada algún fármaco (bien por efectos secundarios, o por sospecha de fracaso).

Caso clínico: infección por HIV- diagnóstico y seguimiento

1. Testeo y Profilaxis Post-Exposición.

Isabel, trabaja en la parte administrativa de hospital, es heterosexual, tiene 60 años y está casada hace 38. Se acerca a su consultorio refiriendo que su marido fue recientemente

diagnosticado con VIH (durante una internación por evento cardiovascular) y le solicita realizar los testeos en un centro externo al hospital donde trabajan.

1.1. Usted le brinda los siguientes centros de testeo donde el resultado demora aproximadamente 20 minutos:

- Fundación Huésped (<https://www.huesped.org.ar/servicios/centro-de-testeo/>): Lunes a Viernes de 8 a 20 hs vía WhatsApp al 11-6468-1673 o vía mail a testeo@huesped.org.ar
- CeSAC, hospitales y organizaciones comunitarias en CABA (<https://www.buenosaires.gob.ar/salud/coordinacion-salud-sexual-sida-e-infecciones-de-transmision-sexual-its/test-de-vih-y-sifilis-y>)
- Helios Salud (<https://www.heliossalud.com.ar/servicios/vih/test>): Perú 1511, San Telmo (Lun. a Vie. de 8 a 19 Hs.; Sáb de 8 a 18 Hs.; Dom. y Feriados (*) de 9 a 18 Hs)- Mendoza 2772, Belgrano (Lun. a Vie. de 8 a 19 Hs.; Sáb de 8 a 11 Hs.)- Av. Carabobo 825, Flores (Lun. a Vie. de 8 a 19 Hs.; Sáb de 8 a 11 Hs.).

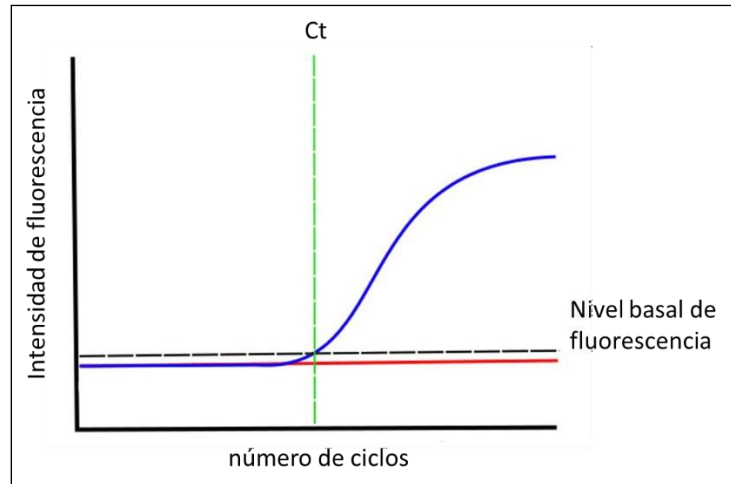
Ella asiste al CESAC N° 10 y recibe su primer resultado positivo para VIH. Isabel le envía un mensaje comentándole el resultado positivo y que le tomaron una segunda muestra para realizar la prueba confirmatoria. También le dice que estuvo buscando información por internet y que encontró información sobre Profilaxis Post-Exposición (PEP) (<https://www.huesped.org.ar/vos-cuidate/profilaxis-post-exposicion/>)

1.2. Isabel quiere saber si puede recibir Profilaxis Post-Exposición (PEP) ¿Qué información le brindaría?

2. *Cuantificación de CARGA VIRAL*

Tras haber recibido un segundo resultado positivo para VIH, confirmando el diagnóstico, es derivada al Hospital Muñiz, un centro especializado. Con el objetivo de poder establecer un tratamiento para Isabel, el equipo tratante indica la realización de una cuantificación de la carga viral y solicita un recuento de linfocitos CD4+ (población celular que se ve severamente comprometida en caso de infección por VIH). Para ello, el servicio de virología utiliza la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción, en su variante cuantitativa o en tiempo real (RT-qPCR). Tras la obtención de una muestra de sangre, se realiza un primer paso de retrotranscripción que permite la obtención de ADNc a partir del ARN viral detectado. Este ADNc es luego utilizado en la técnica de qPCR que, utilizando primers específicos, produce la amplificación de la región de interés del genoma viral y puede visualizarse ciclo a ciclo con el uso de material fluorescente y un equipo que permita su lectura.

Considere el siguiente gráfico que representa un resultado típico de la técnica de PCR cuantitativa.



En el gráfico se representa la intensidad de fluorescencia detectada en una muestra en función del número de ciclos de amplificación. Allí puede observarse en azul a una curva correspondiente a una muestra en la que se observa acumulación del producto de amplificación, y en rojo una curva correspondiente a una muestra que no amplifica.

Explique por qué la curva correspondiente a la muestra en la que hay amplificación tiene forma sigmoidea, respondiendo las siguientes preguntas:

2.1 ¿Por qué durante los primeros ciclos no se observa un incremento en la fluorescencia?

2.2 ¿Qué representa el valor Ct (*Cycle threshold*)?

2.3 ¿Por qué en los últimos ciclos la curva deja de crecer (llega a un *plateau*)?

3. Tratamiento

El infectólogo que trata a Isabel recibe el siguiente resultado:

* HIV-1 CARGA VIRAL		
Método : Amplipreb Cobas Taqman (Roche)		
Resultado	: 261.200	Copias/ml
Rango dinámico: 20 - 10.000.000 copias RNA/ml		

Isabel asiste a la consulta y su médico tratante le recomienda que comience Terapia Anti Retro-Viral (TARV). El médico le explica que el tratamiento consiste en tomar, de forma regular y crónica, un conjunto de fármacos que tienen por objetivo disminuir la carga viral. Isabel acepta comenzar el tratamiento.

El doctor elije una combinación de tres drogas:

- Bictegravir, un medicamento antirretroviral conocido como inhibidor de la transferencia de las hebras de la integrasa (INI)
- Emtricitabina, un medicamento antirretroviral de un tipo conocido como nucleósido inhibidor de la transcriptasa inversa (ITIAN)
- Tenofovir alafenamida, un medicamento antirretroviral de un tipo conocido como nucleótido inhibidor de la transcriptasa inversa (ITIANt)

3.1 Tanto la Emtricitabina como el Tenofovir son inhibidores de la transcriptasa inversa ¿Por

qué cree que son utilizados en este abordaje terapéutico? Justifique su respuesta.

Isabel comienza la Terapia Anti Retroviral y agenda dos consultas con su médico tratante para realizar controles sobre la efectividad del tratamiento.

Transcurrido un mes del comienzo de la Terapia los resultados de la RT-qPCR son los siguientes:

* HIV-1 CARGA VIRAL		
Método : Amplipreb Cobas Taqman (Roche)		
Resultado	:	5.400 Copias/ml
Rango dinamico: 20 - 10.000.000 copias RNA/ml		

3.2 ¿A qué se debe la disminución de copias ARN/ml? ¿Hubiese sido posible obtener esta información mediante una RT-PCR punto final? Justifique.

Al realizar la tercera cuantificación de carga viral, a los 6 meses de iniciado el tratamiento, los estudios arrojan:

* HIV-1 CARGA VIRAL		
Método : Amplipreb Cobas Taqman (Roche)		
Resultado	:	Menor a 20 Copias/ml
Rango dinamico: 20 - 10.000.000 copias RNA/ml		

Lograr una carga viral indetectable es uno de los objetivos primordiales del tratamiento, no sólo por los efectos en la salud del paciente, sino por su impacto poblacional.

3.3 ¿Qué significa el concepto "[indetectable= intransmisible](#)"?

¿Por qué el resultado es indetectable y no negativo? ¿Cuál es la sensibilidad de esta técnica?

¿Podría afirmarse que "Indetectable= Intransmisible" en técnicas con menor sensibilidad?