

## 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)

### 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 la técnica PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) de punto final, cuyo desarrollo está basado 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](#).

Hay muchas variantes de la técnica, cuando hablamos de PCR *de punto final*, que tiene fines cualitativos, la información proviene de determinar si hubo o no amplificación, y a veces, del tamaño (en pares de bases) del producto amplificado.

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 correspondiente. Es muy importante resolver, o intentar resolverlas 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 2013<sup>1</sup> (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.

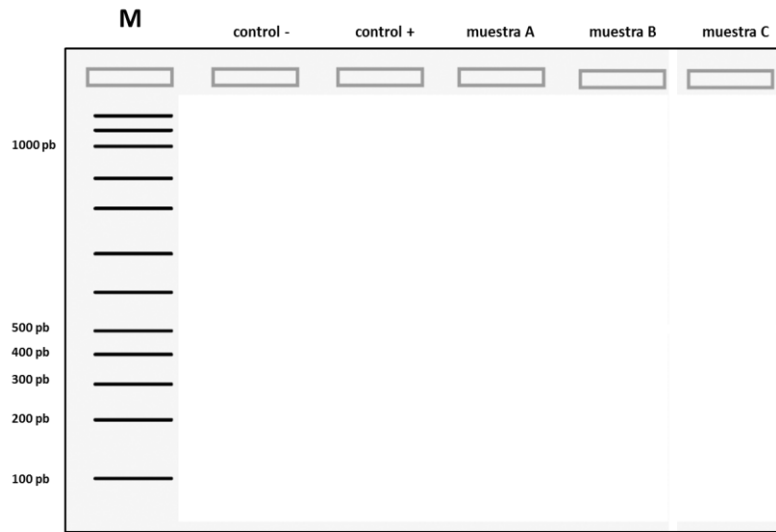
**PASO 2-** Extracción de ADN del suero de las muestras.

**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*.

---

<sup>1</sup>Kamal, 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).

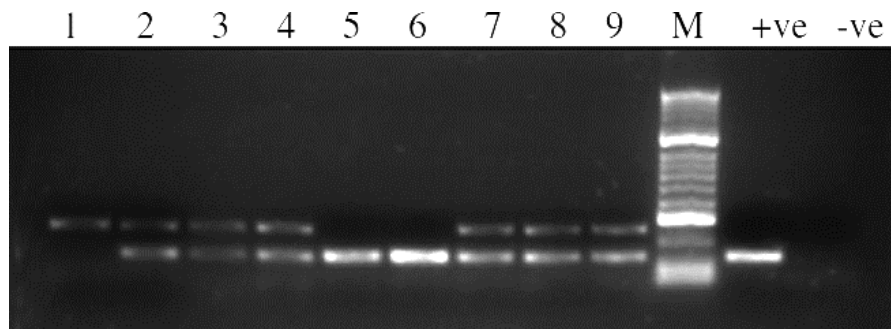


- 2 ¿Cuál es la utilidad de incluir controles positivos y negativos en la reacción de PCR? ¿Qué tipo de muestras podrían utilizarse como controles positivo y negativo?
- 3 Explique cuál es el fundamento de la especificidad de la técnica. ¿Podría esta técnica dar un falso positivo si hubiera ADN del paciente 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.