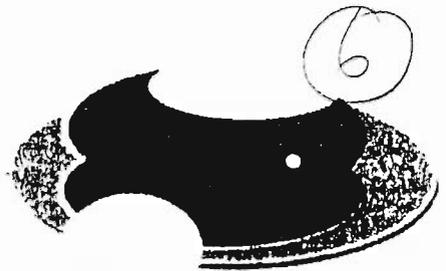


Caja:180
F01-1-BT-080
2001
3362 C.1



DIAGNOTEC
HEALTH CONTROL & ADVISING SERVICE

F01-1-BT-080

F01-1-BT-080

INTRODUCCIÓN AL DIAGNÓSTICO
POR PCR Y APLICACIONES

Pertenece a: _____

Introducción al Diagnóstico por PCR y Aplicaciones

CONTENIDO

Contenido	1
Objetivos	1
¿Por qué el diagnóstico por PCR?	2
¿Qué es PCR y cómo trabaja?	2
Introducción a la estructura del DNA	2
Reacción en cadena de la polimerasa	7
Transcripción reversa PCR (RT-PCR)	10
PROCESO DE PCR	11
Preparación de reactivos	11
Preparación de la muestra	11
Control Interno	11
Amplificación	11
Detección	12
APLICACIONES	12
Analizador de DNA: detección y genotipificación	12

Objetivos

Al final de esta sección Ud. podrá:

1. Explicar por qué la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una nueva y valiosa herramienta para el diagnóstico molecular en el laboratorio clínico.
2. Describir los componentes moleculares del DNA.
3. Explicar la teoría de la PCR y cómo se relaciona tanto al diagnóstico con DNA como con RNA.
4. Explicar el proceso de PCR, incluyendo la preparación de los reactivos, preparación de la muestra, amplificación y detección.
5. Explicar algunas aplicaciones del PCR mediante el uso de analizadores de DNA.

¿Por qué el diagnóstico por PCR?

- PCR es una tecnología patentada que genera múltiples copias de una secuencia específica de nucleótidos proveniente de un organismo.
- PCR proporciona un mecanismo para detectar con alta especificidad concentraciones extremadamente bajas del organismo objetivo.
- Los reactivos de diagnóstico de PCR pueden proporcionar los resultados de una prueba entre 1 y 3 días, cuando originalmente la detección de un organismo puede llevar hasta ocho semanas.
- La tecnología PCR, publicada por primera vez en 1985 en la revista *Science* por Kary B. Mullis, Ph.D. de la Corporación Cetus, ha sido recibida como una de las herramientas más poderosas de la biología molecular. Este descubrimiento fue tan revolucionario que Kary Mullis compartió el Premio Nobel de Química 1993 por su trabajo.
- Entre las muchas áreas de aplicación de PCR están: la arqueología, la medicina forense, pruebas de paternidad, genética, investigación biológica y el diagnóstico clínico.
- En el diagnóstico clínico, los científicos pueden tomar un espécimen de material genético que pese una trillonésima de gramo, copiar la secuencia genética una y otra vez, y generar una muestra suficiente para detectar la presencia o ausencia de un virus o bacteria específicos, o de material genético mutado. Este proceso de amplificación permite al laboratorista detectar la presencia y en algunos casos la cantidad de un patógeno.
- Además, utilizando los analizadores de DNA se pueden conocer las secuencias variables entre los distintos aislados de patógenos, lo que en definitiva permite la identificación de distintas cepas de patógenos.

¿Qué es PCR y cómo trabaja?

PCR es una técnica *in vitro* que imita la habilidad de un organismo para replicar el DNA. A continuación se exponen los fundamentos sobre el DNA y el RNA que servirán de base para la comprensión de PCR.

Introducción al DNA.

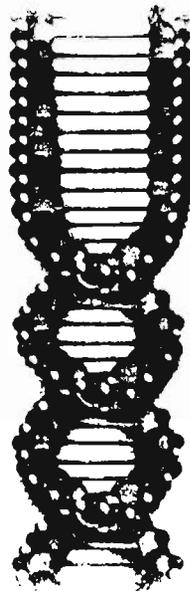
- La replicación natural de la información genética ocurre cada vez que una célula se divide para formar dos nuevas células.
- El DNA de la célula original se replica y pasa a las dos nuevas células.
- Este DNA es el código para la elaboración de proteínas las cuales, a su vez, tienen múltiples funciones como enzimas, mensajeros o transmisores, así como elementos estructurales de las células.
- En el caso de los virus que están compuestos solamente por material genético (DNA o RNA) cubierto por proteínas, se hospedan en células blancas y se aprovechan de la

maquinaria celular para replicarse, es decir son "parásitos intracelulares", sin las células no pueden replicarse.

- A continuación se hará una explicación de DNA doble hebra para mayor facilidad de comprensión del fundamento del PCR.

Figura 1: La Doble Hélice de DNA.

DNA de Doble Hélice



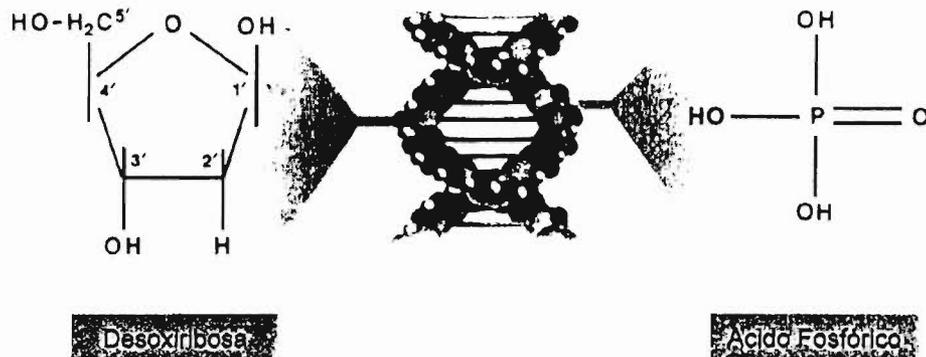
El esqueleto del DNA: Azúcar y Fosfato.

- Los lados de la escalera son moléculas de azúcar y fosfato. Note que la molécula de azúcar tiene la estructura de anillo de una pentosa, donde el carbono 3' tiene un grupo hidroxilo y el carbono 5' es parte del grupo metilo. Estos carbonos 3' y 5' son los lugares de unión de los grupos fosfato y forman el esqueleto de la molécula de DNA.

Figura 2: Deoxirribosa y Acido fosfórico.

Bases

Desoxirribosa y Acido Fosfórico



- Los peldaños de la escalera están compuestos de 4 bases que se unen una a otra en secuencias específicas.
- Estas bases son: **adenina, guanina, timina y citosina**.
- La adenina y la guanina se clasifican como **purinas**. La timina y la citosina se clasifican como **pirimidinas**.

Nomenclatura de las bases del DNA.

Tabla 1: Nomenclatura de las Bases.

Nomenclatura Básica de DNA

Nomenclatura base DNA				
Base	Nucleósido	Nucleótido	Abreviación	Estructura Base anillo
Adenina (A)	Adenosina	Adenosina Trifosfato	dATP	Purina
Guanina (G)	Guanidina	Guanidina Trifosfato	dGTP	Purina
Timina (T)	Timidina	Timidina Trifosfato	dTTP	Pirimidina
Citosina (C)	Cisteina	Cisteina Trifosfato	dCTP	Pirimidina

La Secuencia Nucleotídica.

- La SECUENCIA se refiere al orden de los nucleótidos (bases).

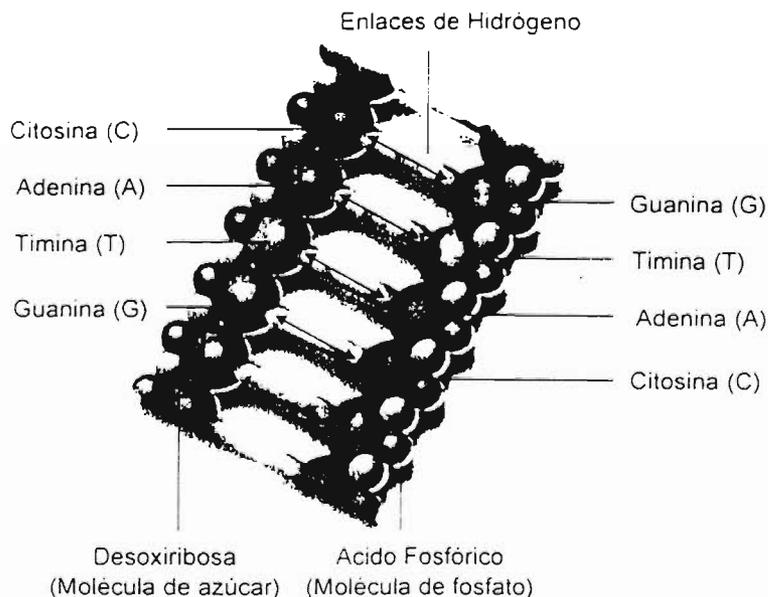
Ejemplo: El orden de nucleótidos de GATC se conoce como secuencia.

Esta secuencia sólo se unirá con su complemento CTAG.

- **Región Altamente Conservada:** La secuencia específica de pares de bases codifica para arreglos específicos de aminoácidos que colectivamente son representativos de cada organismo. Dentro del genoma de cada organismo hay codificadas regiones altamente conservadas que son comunes para un tipo de organismo y regiones variables que resultan en caracteres individuales. La selección de una región altamente conservada del código genético específica del organismo objetivo, permite lograr la alta especificidad de la metodología PCR.
- El proceso de amplificación de esa secuencia específica permite una mayor sensibilidad de una prueba basada en PCR.

Figura 3: La Secuencia Nucleotídica.

La Secuencia Nucleotídica



La Estructura de Escalera del DNA.

- Las moléculas de azúcar están unidas covalentemente una a otra a través de grupos fosfato.
- Las dos cadenas están orientadas en direcciones opuestas (son antiparalelas). Una va en dirección 5' a 3' mientras que la otra va en dirección 3' a 5'. Las dos cadenas son complementarias pero no idénticas.
- Las bases se unen a las moléculas de azúcar.

- La base de una cadena se une a la base de otra cadena mediante puentes de hidrógeno. La guanina siempre se une a la citosina a través de tres puentes de hidrógeno. La timina siempre se une a la adenina vía dos puentes de hidrógeno.

Figura 4: Orientación 5' a 3'.

Orientación 5' a 3' de la cadena Azúcar - Fosfato

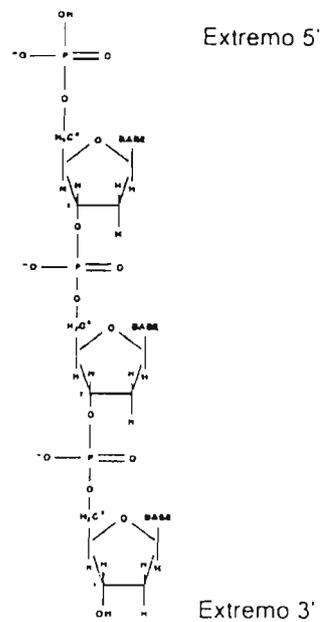
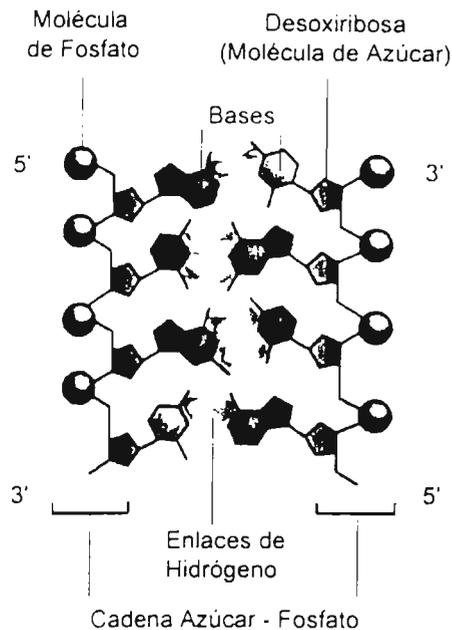


Figura 5: Unión de las bases, azúcares y grupos fosfato.

Unión de las Bases, Azúcar y los Grupos Fosfatos.



La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

- La Reacción en Cadena de la Polimerasa se basa en el principio natural de replicación del DNA. La PCR es un proceso que consta de tres pasos, que se denomina ciclo, que se repite un número determinado de veces.
- Un ciclo de PCR consiste de los siguientes pasos:
 1. Desnaturalización
 2. Unión (alineamiento)
 3. Extensión
- Este proceso se lleva a cabo en un termociclador, un instrumento que automáticamente controla y alterna las temperaturas durante periodos programados de tiempo para el número apropiado de ciclos (usualmente 30-40 ciclos).

Paso 1 de la PCR: Desnaturalización o Denaturación por calor.

- La desnaturalización por calor (usualmente ≥ 90 °C) separa la doble cadena de DNA en dos cadenas sencillas.
- Dado que los enlaces de hidrógeno que unen a las bases son débiles, se rompen a altas temperaturas; mientras que los enlaces entre la desoxirribosa y los grupos fosfato, que son enlaces covalentes mucho más fuertes, permanecen intactos.

Paso 2 de la PCR: Alineación- Unión (Apareamiento) del Primer al Objetivo.

- La meta no es amplificar toda la cadena de DNA sino replicar una secuencia objetivo de aproximadamente 100-600 pares de bases que son representativa del organismo.
- **Los primers delimitan la secuencia objetivo:** Los primers son secuencias sintéticas cortas de DNA de una sola cadena que consisten de 20-30 bases y que

tienen biotinilado el extremo 5'. Son específicos para la región objetivo del genoma del organismo de interés. Se incluyen dos primers en la reacción de la PCR, cada uno complementario de una de las cadenas de DNA que se produjeron durante la desnaturalización. El comienzo de la secuencia de interés se marca por los primers que se unen a las secuencias complementarias, delimitando de esta forma la secuencia de interés.

- **Temperatura:** Usualmente, este proceso se lleva a cabo entre 40 °C y 65 °C, dependiendo de la longitud y de la secuencia de bases de los primers. Esto permite la unión específica de los primers a su cadena complementaria.

Paso 3 de la PCR: Extensión.

- Una vez que los primers se unieron a sus secuencias complementarias, se eleva la temperatura a 72 °C y la enzima *Taq* polimerasa se usa para replicar las cadenas de DNA.
- La polimerasa *Taq* comienza el proceso de síntesis en la región marcada por los primers. Sintetiza dos cadenas de DNA totalmente nuevas, ambas idénticas a la cadena original de DNA, esto se logra facilitando la unión de los nucleótidos complementarios que están libres en solución (dNTPs).
- **La extensión siempre comienza en el extremo 3' del primer** haciendo dos cadenas dobles a partir de dos cadenas sencillas. La polimerasa *Taq* sintetiza exclusivamente en la dirección 5' a 3'. Por lo tanto, los nucleótidos libres en solución sólo son añadidos al extremo 3' de los primers, construyendo la cadena complementaria de la secuencia de DNA delimitada.

Fin del Primer Ciclo de la PCR.

- Al final del primer ciclo de la PCR, hay ahora dos dobles cadenas de DNA idénticas a la original, cada nueva cadena producida se denomina **AMPLICON**.
- **Punto Final:** La polimerasa no reconoce el final de la secuencia. Las cadenas recién formadas tienen un principio, que es precisamente definido por el extremo 5' del primer, pero el extremo 3' no está definido con precisión. A medida que el número de ciclos aumenta, una cadena con una longitud más definida frecuentemente sirve como matriz para la secuencia nuevamente sintetizada. La cadena de DNA sintetizada a partir de tal matriz tiene una longitud más claramente definida, que es delimitada a cada lado por el extremo 5' de cada uno de los dos primers.
- Después de unos cuantos ciclos, las cadenas de DNA que corresponden a la secuencia objetivo, se encuentran presentes en números mayores que las secuencias de longitud variable. Después de unos pocos ciclos, los fragmentos de longitud variable representan sólo una pequeña fracción del total de copias de DNA. En otras palabras. La secuencia flanqueada por los primers es amplificada.

El Poder del PCR.

- Este ciclo de tres pasos (desnaturalización, alineamiento y extensión) que tarda aproximadamente 3 minutos puede ahora repetirse muchas veces. Conforme la PCR continúa, se crean primero dos, luego cuatro, luego ocho copias. Este proceso de la PCR también es llamado **AMPLIFICACION** debido a que la secuencia objetivo es copiada una y otra vez con el objeto de hacer millones de copias.
- Las nuevas secuencias de DNA sirven como matrices para la síntesis enzimática de nuevas cadenas en el siguiente ciclo de la reacción.

- Teóricamente, cada nuevo ciclo duplica la cantidad del DNA objetivo; un ciclo produce 2, luego 4, luego 8, luego 16, luego 32 resultando en el incremento exponencial de la secuencia objetivo. Esta es la **REACCIÓN EN CADENA** del método PCR. En teoría, 20 ciclos producen un millón de copias y 30 ciclos producen mil millones de copias. Ahora ya hay suficiente material para proceder a la detección.

PCR a partir de RNA.

- El genoma de muchos virus de importancia clínica está compuesto de RNA en lugar de DNA, los más sobresalientes son el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV), el Virus de la Hepatitis C (HCV) y la familia de Enterovirus (EV).
- El RNA difiere del DNA en muchas características, las más notables son:

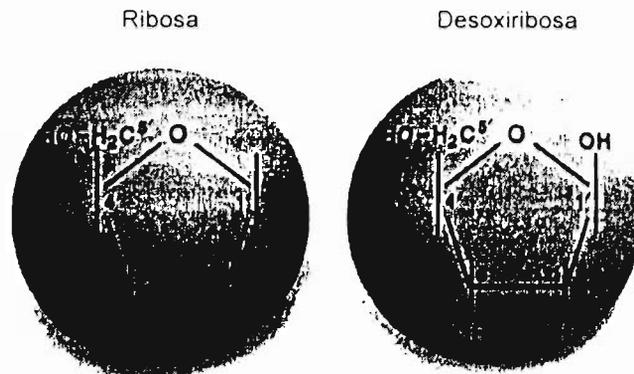
Tabla 2: Diferencias entre RNA y DNA.

Diferencia entre RNA y DNA

Diferencia entre RNA y DNA		
	RNA	DNA
Azúcar	Ribosa	Desoxiribosa
	Adenina (A)	Adenina (A)
Bases	Citosina (C)	Citosina (C)
	Uracilo (U)	Timina (T)
	Guanina (G)	Guanina (G)
Nº de hebras	Usualmente simple	Doble
Estable Calor	No	Si

Figura 6: Estructuras de la Ribosa y de la Deoxirribosa.

Estructuras de la Ribosa y Deoxirribosa



Transcripción Reversa- PCR (RT-PCR).

- En el caso de que el ácido nucleico de interés sea RNA (como es el caso de IPNV, ISAV, IHNV, entre otros) es necesario hacer una transcripción reversa (RT) antes de iniciar la amplificación por PCR. La transcripción reversa genera una copia de la cadena de RNA, pero esta copia es DNA complementario (cDNA) el cual es estable al calor y puede resistir la metodología PCR.
- La Transcriptasa Reversa es una enzima que posee la característica única de llevar a cabo tanto la transcripción reversa del RNA a cDNA y la amplificación del cDNA.
- Los pasos de la RT-PCR son:
 1. Transcripción reversa-Paso 1: Unión del primer biotinilado a la secuencia de RNA objetivo.
 2. Transcripción reversa-Paso 2: La Transcriptasa reversa cataliza la extensión del primer mediante la incorporación de nucleótidos complementarios.
 3. Fin de la transcripción reversa-Paso 3.
 4. PCR-Paso 1: Desnaturalización o Denaturación.
 5. PCR-Paso 2: Alineación o Apareamiento
 6. PCR-Paso 3: Extensión.
 7. Fin del Primer Ciclo de la PCR.
 8. Fin del Segundo Ciclo de la PCR.
 9. Amplificación exponencial.

Proceso de PCR.

El método de PCR consta de cuatro pasos:

1. Preparación del Reactivo (Pre-PCR)
2. Preparación de la Muestra (Pre-PCR)
3. Amplificación (Post-PCR)
4. Detección (Post-PCR)

Preparación del Reactivo (Pre-PCR).

- **Master Mix (Mezcla Maestra):** es el reactivo primario utilizado en PCR. Este reactivo tiene los componentes necesarios que permiten la amplificación específica de la secuencia objetivo:

1. *Nucleótidos:* Unidades individuales de dATP, dGTP, dUTP y dCTP.
2. *Cofactor de la enzima:* Mg^{+2} para la polimerasa *Taq* o Mn^{+2} para la Transcriptasa reversa
3. *Polimerasa *Taq* o Transcriptasa reversa:* Enzima utilizada para la replicación del DNA o RNA.
4. *Buffers:* Se usan para mantener el pH y la concentración de sales adecuados.
5. *Partidores o Primers:* Son pequeñas secuencias sintéticas de DNA de una sola cadena que consisten de no más de 20 a 30 bases. Son complementarios a la secuencia de DNA/RNA de interés.

Preparación de la Muestra.

Las muestras que se pueden usar son: tejido, sangre, ovas, fluido ovárico, semen, etc. Las técnicas de preparación de la muestra variarán dependiendo del tipo de ácido nucleico que se desea extraer o aislar.

Fundamentalmente la muestra debe ser lisada para liberar al patógeno, luego se deben separar las proteínas del ácido nucleico y finalmente se debe recuperar el DNA y/o RNA y una vez extraído de la muestra, se añade al tubo de reacción con la Mezcla Maestra.

Control Interno

Control Interno (CI): Es una secuencia sintética no infecciosa de DNA o RNA que contiene los mismos sitios de unión de los primers que el DNA o RNA objetivo del organismo a ser detectado. Esta secuencia posee distinta longitud de la región amplificada del ácido nucleico objetivo, de modo de diferenciarlo del producto esperado. El CI se detecta conjuntamente con la muestra y actúa como un identificador de inhibición de la reacción de PCR.

Amplificación

Una vez que se ha añadido el DNA/RNA extraído la muestra al tubo de reacción con la Mezcla Maestra, se somete a la reacción de PCR (con Transcripción Reversa si fuese necesario) dentro del termociclador.

Detección

Una vez que ha finalizado la reacción de PCR se debe visualizar si dentro el tubo de reacción ocurrió la amplificación del DNA/RNA de interés, los termocicladores convencionales requieren un paso de visualización del producto amplificado o Post-PCR que generalmente se utiliza sistemas de electroforesis en gel, que permiten visualizar el producto esperado.

APLICACIONES

Analizador de DNA ABIPrism 377

El diagnóstico de patógenos por PCR se puede llevar a cabo de distintas formas. La más simple consiste en determinar cualitativamente la presencia del patógeno (tiene o no tiene). La cual se basa en realizar la reacción de PCR y luego detectar el producto mediante sistemas de electroforesis en gel (tal como se explicó en la sección anterior). Sin embargo, cada día surgen nuevas combinaciones y/u optimizaciones que permiten obtener mayores datos a partir de un fragmento de PCR de interés.

El analizador de DNA ABIPrism 377 es un instrumento automático combinado con programas computacionales cuyo funcionamiento consiste en una separación electroforética de los productos de PCR, luego los productos de PCR (que han sido marcados con una marca fluorescente) son detectados espectralmente. Finalmente mediante programas computacionales se analizan los datos obtenidos.

El instrumento posee dos software que permiten analizar los datos obtenidos. Uno de ellos es "Sequencing Analysis", el cual permite analizar la secuencia del producto de PCR obtenido (secuenciación). El otro software es "Genescan Analysis" el cual permite analizar el tamaño del producto obtenido (detección cualitativa) y la cantidad de producto obtenido (detección cuantitativa). El equipo funciona del mismo modo para ambos programas. Este equipo de detección automático, permite rescatar gran información desde un producto de PCR, lo cual es de gran utilidad cuando se realizan estudios de variabilidad genética entre distintas cepas de un mismo patógeno, además tiene la posibilidad de cuantificar el producto obtenido, es decir permite determinar no sólo la presencia del patógeno sino que conocer la carga o cantidad del patógeno en estudio. Esto es de gran utilidad cuando se quiere monitorear la efectividad de prácticas sanitarias en el tiempo, ya que se puede seguir las variaciones y/o respuestas del patógeno de interés.