

## Guía de problemas *PCR cuantitativa*

### Problema 1

Una gran variedad de animales son el reservorio natural para la replicación de muchos virus. En este sentido, la gripe aviar es una enfermedad infecciosa vírica que afecta principalmente a las aves. Este tipo de virus pertenece al género *Influenza* de la familia *Orthomyxoviridae*. Poseen un genoma de ARN segmentado, de cadena negativa. **H5N1** es una cepa altamente virulenta de gripe aviar, y la primera aparición de este tipo de gripe en humanos se dio en Hong Kong en el año 1997.

Para la detección del virus de la influenza aviar **H5N1**, la *Real Time* PCR permite un diagnóstico específico y sensible a través de la amplificación parcial de los genes M (matriz), H5 (hemaglutinina), y/o N1 (neuraminidasa).

Para la determinación de la carga viral en muestras clínicas se construyeron patrones de muestras de suero humano conteniendo concentraciones conocidas de virus. Así, muestras de suero extraídas de individuos sanos, se mezclaron con diferentes proporciones del virus de la influenza aviar **H5N1** multiplicado en cultivo celular, y previamente titulado. De estas muestras, se aislaron los ARNs que fueron utilizados en el ensayo para calibrar la metodología.

En la tabla 1 se muestra el número de copias de ARN genómico viral presente en las muestras patrón, mientras que en la tabla 2 se lista el valor de fluorescencia emitido por cada una de las muestras patrón (columnas 1 a 7) y de las muestras problema (columnas M1 y M2), durante el transcurso de la *real time* PCR.

Patrón N°	N° de copias de ARN genómico en la muestra
1	400,000,000
2	40,000,000
3	400,000
4	40,000
5	4,000
6	600
7	4

Tabla 1

Número de Ciclos	Fluorescencia de muestras patrón							Fluorescencia de muestras problema	
	1	2	3	4	5	6	7	M1	M2
1	0.0002	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.0004	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0.0008	0.0001	0	0	0	0	0	0	0
4	0.0015	0.0002	0	0	0	0	0	0	0
5	0.003	0.0003	0	0	0	0	0	0	0

Número de Ciclos	Fluorescencia de muestras patrón							Fluorescencia de muestras problema	
6	0.0059	0.0006	0	0	0	0	0	0	0
7	0.0115	0.0012	0	0	0	0	0	0	0
8	0.0226	0.0023	0	0	0	0	0	0	0
9	0.0441	0.0045	0	0	0	0	0	0	0
10	0.0852	0.0088	0.0001	0	0	0	0	0	0
11	0.162	0.0173	0.0002	0	0	0	0	0	0
12	0.2975	0.0339	0.0003	0	0	0	0	0	0
13	0.5129	0.0658	0.0007	0.0001	0	0	0	0	0
14	0.7926	0.1262	0.0013	0.0001	0	0	0	0	0
15	1.0409	0.2355	0.0026	0.0003	0	0	0	0.0001	0
16	1.1524	0.4182	0.0052	0.0005	0.0001	0	0	0.0002	0
17	1.1692	0.6791	0.0102	0.001	0.0001	0	0	0.0003	0
18	1.17	0.9558	0.02	0.002	0.0002	0	0	0.0006	0
19	1.17	1.1257	0.0391	0.004	0.0004	0.0001	0	0.0012	0
20	1.17	1.1671	0.0758	0.0078	0.0008	0.0001	0	0.0023	0
21	1.17	1.1699	0.1446	0.0153	0.0015	0.0002	0	0.0046	0
22	1.17	1.17	0.2676	0.0301	0.003	0.0004	0	0.0091	0
23	1.17	1.17	0.4681	0.0585	0.006	0.0009	0	0.0179	0
24	1.17	1.17	0.7408	0.1124	0.0118	0.0017	0	0.035	0.0001
25	1.17	1.17	1.0047	0.2111	0.0231	0.0033	0	0.0679	0.0001
26	1.17	1.17	1.1425	0.3792	0.0451	0.0066	0	0.13	0.0002
27	1.17	1.17	1.1686	0.6281	0.0871	0.0129	0.0001	0.2422	0.0005
28	1.17	1.17	1.17	0.9106	0.1654	0.0253	0.0002	0.4287	0.0009
29	1.17	1.17	1.17	1.1066	0.3034	0.0493	0.0004	0.6924	0.0018
30	1.17	1.17	1.17	1.1648	0.5216	0.0951	0.0007	0.9669	0.0035
31	1.17	1.17	1.17	1.1698	0.8023	0.1799	0.0014	1.1299	0.0068
32	1.17	1.17	1.17	1.17	1.0472	0.3277	0.0027	1.1675	0.0134
33	1.17	1.17	1.17	1.17	1.1539	0.5568	0.0053	1.1699	0.0263
34	1.17	1.17	1.17	1.17	1.1693	0.8402	0.0104	1.17	0.0512
35	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.0702	0.0205	1.17	0.0987
36	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.1589	0.04	1.17	0.1865
37	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.1696	0.0775	1.17	0.3388
38	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	0.1477	1.17	0.5725
39	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	0.2731	1.17	0.8564
40	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	0.4764	1.17	1.0793
41	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	0.7507	1.17	1.1606
42	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.0119	1.17	1.1697
43	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.1447	1.17	1.17
44	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.1687	1.17	1.17
45	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17

Tabla 2

- a) Indique esquemáticamente las etapas experimentales necesarias para la detección del virus influenza **H5N1** mediante *real time* PCR. La química utilizada en este experimento fue *SyBrGreen*. No se olvide de incluir los controles adecuados.

- b) Con el conjunto de datos suministrados, determinar el número de copias de ARN viral presentes en las muestras clínicas M1 y M2.
- c) Indique las diferentes alternativas de detección de *real time* PCR que conoce, planteando sus ventajas y desventajas.

## Problema 2

En 2011, un grupo de investigadores de la Escuela de Medicina de la Universidad de Washington descubrió un virus capaz de infectar al nematodo *Caenorhabditis elegans*. Estos investigadores recolectaron ejemplares de *C. elegans* de frutas en descomposición provenientes de diferentes regiones de Francia y, mediante la observación al microscopio electrónico, pudieron ver que algunos de los aislamientos mostraba una morfología inusual de las células intestinales. Posteriormente, a través del uso de técnicas moleculares y herramientas bioinformáticas, el grupo de trabajo pudo demostrar que *C. elegans* puede contraer infecciones virales de manera natural.

El virus hallado (denominado virus Orsay) pertenece a la familia *Nodaviridae*. Este tipo de entidades posee un genoma de ARN monocatenario positivo bipartito (Figura 1). **ARN1** codifica para una ARN polimerasa dependiente de ARN, la cual replica el genoma viral. **ARN2** codifica para la proteína de la cápside. **ARN3** codifica para las proteínas B1/B2. La función de la proteína B1 aún es desconocida, mientras que la proteína B2 es capaz de inhibir el silenciamiento génico mediado por ARNi.

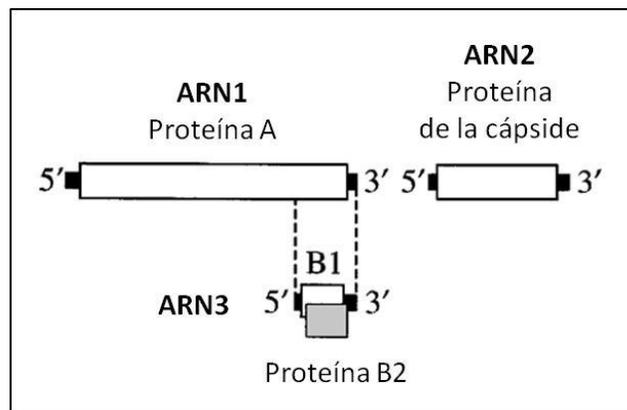


Figura 1

- a) Considerando que usted formó parte del grupo que detectó los efectos citopáticos en *C. elegans* por primera vez, formule un flujo de trabajo que le permita identificar la presencia de un virus en tales individuos, describiendo su secuencia total.
- b) Que experimentos realizaría para confirmar la presencia del virus en otros *C. elegans*. Formule un método para corroborar que las cepas del nematodo en condiciones de laboratorio están libres del patógeno.

Con el fin de determinar por PCR cuantitativa *End Point* el número de moléculas de ARN viral presentes en nematodos adultos, se diseñó un ensayo que utiliza la amplificación de un

fragmento de 350 pb del ORF A del virus Orsay. Además, se preparó un plásmido recombinante que contiene el ORF A viral (pZero-ORFA) a una concentración de 3 ng/ul (determinada con exactitud por absorbancia). A partir de esta muestra de plásmido se realizaron diluciones seriadas al medio hasta la dilución 1/64. El ARN de las muestras problema (A, B y C) fue preparado por métodos estándares a partir de tejido de gusanos adultos que presentaban signos de infección.

Los productos de las reacciones de PCR se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa 2 %, junto con un marcador de masa. El análisis densitométrico del mismo se realizó mediante el programa Kodak Digital Science 1D (Eastman-Kodak Company). Los resultados del análisis se muestran en la tabla 1.

Estándar	Masa	P(ng)
1	(Directo)	60.31
2	(dil1/2)	41.29
3	(dil1/4)	30.04
4	(dil 1/8)	22.3
5	(dil1/16)	13.7
6	(dil1/32)	7.36
7	(dil1/64)	3.37
<b>Muestra</b>	A	37.2
<b>Muestra</b>	B	5.76
<b>Muestra</b>	C	10.8

Tabla 1

#### Datos útiles:

Masa de un par de bases = 660 g/mol

pZero = 3,3 Kb

- c) Con los datos suministrados Ud. debe calcular la masa y número de moléculas virales que están presentes en las muestras A, B y C.

#### Problema 3

Usted está caracterizando el modo de acción de una nueva droga llamada **Dicumarina**, la cual se supone que inhibe la transcripción de la proteína P77 implicada en el desarrollo de cáncer hepático. Para ello Ud. debe diseñar un plan de trabajo que le permita verificar la acción de la misma, en el cual se debería monitorear la disminución del transcripto p77 con el paso del tiempo (4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas) a diferentes concentraciones de la droga (I y II), sobre un cultivo de tejido tumoral y normal. Para tal ensayo, en su laboratorio cuentan con un *primer* poli-T y *primers* específicos para amplificar los transcriptos de p77 y actina G. Indicar como realizaría los ensayos. No se olvide de los controles necesarios.