



Medicina Humana

Nombre del alumno: Luz Angeles Jiménez
Chamec

Nombre del profesor: Quím. Hugo Nájera
Mijangos

Nombre del trabajo: Ensayo de técnicas
moleculares

Materia: Genética Humana

Grado y grupo: 3° B

INTRODUCCION

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) ha sido la principal herramienta diagnóstica que ha aprovechado las bondades de la biología molecular al punto de alcanzar gran versatilidad como técnica de análisis. La especificidad, el rendimiento y la fidelidad de la RCP se encuentra directamente influenciada por los diferentes componentes que la integran como la mezcla de reacción, régimen de ciclaje y la ADN polimerasa; la técnica permite la amplificación selectiva de cualquier segmento de ADN, conocer las secuencias que lo flanquean, obtener una secuencia de ADN concreta sin recurrir a la clonación en un organismo huésped. Sus aplicaciones son variables e ilimitadas, ejemplo de ello, es la posibilidad de realizar estudios de expresión genética, secuenciación directa de secuencias amplificadas, detección de mutaciones, seguimiento de la efectividad de tratamiento de enfermedades, diagnósticos de enfermedades genéticas e infecciosas y en ciencia forense en la identificación de restos biológicos, determinación de paternidad y pruebas periciales en criminalística. La secuencia del ADN consiste en determinar el orden de las bases A, C, G y T en un fragmento de ADN; este método fue descrito por Sanger en 1977, y permite obtener la secuencia de un fragmento determinado de ADN, un gen o parte de este, y ser empleado en la actualidad. Este método ha ido evolucionando con el tiempo y en la actualidad se han implementado diferentes tipos de secuencias, destacándose la secuencia paralela, masiva o de nueva generación (NGS), que permite la exploración de genomas completos de humanos u otras especies; y la piro secuencia, con la cual es posible determinar la secuencia de una molécula de ADN, identificando bases individuales, o secuencias cortas de ácidos nucleicos en posiciones determinadas. La hibridación, es un método que se basa en la unión de dos cadenas sencillas de ácidos nucleicos que producen estructuras de doble hebra, las cuales son híbridos de ADN, ARN-ARN o ADN- ARN. El método de hibridación se basa en el desarrollo de dos moléculas de ácidos nucleicos: una homogénea de secuencia distinguida como sonda y la otra heterogénea de secuencia desconocida, la cual contiene la secuencia diana que se quiere analizar. Los ácidos nucleicos de cadena sencilla, provienen de ADN clonado y fragmentado por enzimas de restricción, o de oligonucleótidos sintéticos.

TECNICAS MOLECULARES

Epidemiología molecular:

El diagnóstico molecular es un área dinámica en constante desarrollo que ha revolucionado el diagnóstico clínico, mostrando un impacto en las áreas de salud, y obligado a la implementación de herramientas claves para el equipo clínico que generan un beneficio directo para el paciente.

El principio de la epidemiología molecular radica en el estudio de las enfermedades infecciosas a través del empleo de técnicas moleculares que permitan el estudio del genoma de bacterias, virus, viroides, hongos y parásitos, agentes etiológicos de dichas enfermedades.

Aplicaciones:

La epidemiología molecular se emplea como método de diagnóstico para diferentes patologías, su principal aplicación se encuentra en:

1. Métodos moleculares para tipificación:

Se denomina tipificación a la identificación y caracterización de microorganismos patógenos que permite establecer la identidad de los microorganismos causantes de brotes infecciosos, determinando la fuente de infección y sus posibles patrones de diseminación; asimismo establece la prevalencia del agente infeccioso en una población.

La técnica de tipificación a emplear dependerá de los requerimientos y características del sistema analizado; sin embargo, cualquiera que sea el método de tipificación, debe ser evaluado previamente en cuanto a su capacidad para generar la información epidemiológica requerida. La tipificación puede ser evaluada teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- ✚ Detección, identificación y tipificación de la totalidad de los aislados analizados.
- ✚ Repetibilidad y reproducibilidad del método.
- ✚ Estabilidad genética del marcador, neutral por las fuerzas evolutivas. Exclusión de los diferentes grupos de individuos con probabilidades elevadas.

- ✚ Capacidad del método para arrojar resultados similares a los obtenidos a través de otras técnicas.
- ✚ Efectividad entre los costos económicos generados por la aplicación del método y las ganancias obtenidas al lograr la prevención y control de la enfermedad.
- ✚ Relación entre los logros obtenidos a nivel económico, recursos y tiempo empleado.

2. Métodos moleculares fenotípicos y genotípicos:

Los métodos fenotípicos se basan en la determinación de características bioquímicas y/o fisiológicas, constituyen la primera herramienta para la comparación de microorganismos que incluye la determinación de actividades enzimáticas, la capacidad metabólica y los determinantes antigénicos o susceptibilidad a agentes bactericidas; sin embargo, con este tipo de métodos no se pueden identificar genes, polimorfismo o mutaciones que determinen la expresión de las características visibles en medios de cultivos, pruebas bioquímicas y de susceptibilidad.

Los métodos genotípicos estudian el genoma del microorganismo causal de la enfermedad y posibilitan el análisis de características de polimorfismo genético concurrente en los agentes etiológicos. Se basan en la localización del material genético del organismo, lo que permite generar nuevos cambios en el patrón de expresión genética, y brinda alternativas más estables y reproducibles.

Dentro de las técnicas empleadas en genotipificación se describen:

1. Reacción en cadena de la polimerasa (RCP).
2. Secuencia del genoma.
 - a. Secuenciación NGS.
 - b. Pirosecuencia.
3. Hibridación con sondas de ADN.
4. RAPD.
5. RFLP.

Cada técnica ha ofrecido una alternativa para la investigación epidemiológica; sin embargo, también tienen aplicaciones limitadas.

1. Reacción en cadena de la polimerasa (RCP)

Los métodos genotípicos amplifican regiones in vitro específicas de ADN al emplear secuencias que delimitan la zona de amplificación; a partir de una copia de la región a amplificar se adquieren millones de copias que posibilitan su detección y reflejan la presencia de la región de ADN en la muestra a analizar; para esta transformación actúan varias proteínas que cooperan en la síntesis de nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde.

2. Secuenciación del genoma

Es una técnica que determina la secuencia completa de ADN en el genoma de una persona; consiste en determinar el orden de las bases Adenina, Citosina, Guanina y Timina en un fragmento de ADN. Con esta técnica se logra obtener secuencias hasta 500 bases aproximadamente, estas son ensambladas a un genoma de referencia que secuencia un genoma completo. Este método ha cambiado la manera de entender la genética basándose en la identificación de las causas reales de la herencia, centrándose en estudios genéticos de individuos con un fenotipo definido y enfermedades de herencia mendeliana producida por genes conocidos; estas evalúan el fenotipo y la secuencia del gen que puede estar afectado y presentan una sensibilidad muy alta para detectar mutaciones.

a. Secuencia paralela, masiva o de nueva generación (NGS)

La secuencia de ácidos nucleicos permite establecer el orden de los nucleótidos presentes en las moléculas de ADN o ARN a estudiar, razón por la cual, su uso ha aumentado en los últimos años exponencialmente en investigaciones y laboratorios clínicos alrededor del mundo; es así como la NGS se ha implementado gracias a la posibilidad que brinda de realizar secuencia masiva y paralela de millones de fragmentos del ADN y/o ARN presente en la muestra, con el empleo de tecnología de punta, a muy bajo costo y con un muy alto rendimiento, por lo que se pudo amplificar un genoma completo en un solo día. La NGS tiene alta aplicación en estudios epidemiológicos gracias a las ventajas ofrecidas por este tipo de métodos como es el uso de genomas completos para establecimiento de relaciones filogenéticas entre especies, identificación de posibles recombinaciones y marcadores epidemiológicos que aportan a la identificación de posibles mutaciones en una población, por ello, es considerada como una tecnología revolucionaria en estudios epidemiológicos aplicados a la ciencia básica, investigación traslacional, diagnóstico clínico, agronomía, ciencia forense y ciencia aplicada.

b. Pirosecuencia

Se caracteriza por la secuencia por síntesis de ADN con detección en tiempo real; esta técnica es usada para la identificación de bases individuales o secuencias cortas de ácidos nucleicos en posiciones predeterminadas, a través del uso de fosfato durante la incorporación de los nucleótidos a la cadena de ADN, seguido de una serie de reacciones enzimáticas. Es el único método de secuencia que se desarrolló como alternativa a la secuencia clásica de ADN; si se compara con otras técnicas molecular, la pirosecuencia es simple, robusta, rápida, sensible, altamente cuantitativa y precisa, flexible, costo efectiva y tiene la capacidad de automatización de la muestra; se ha empleado en estudios de análisis de variaciones genéticas, estudios agronómicos que permiten el desarrollo de cebadores y sondas específicas que aporten a programas de certificación de la calidad de alimentos, cambios en comunidades microbianas de diferentes ambientes, resolución de casos en ciencias forenses, microbiología, así como en la detección de mutaciones en patologías de interés clínico.

3. Hibridación de sondas de ADN

La hibridación de sondas se conoce como el análisis en muestras para detectar la presencia de ácidos nucleicos (ADN o ARN), realizando una combinación anti paralela de estas con una molécula de doble cadena. Sus técnicas se utilizan para detectar una molécula diana partiendo de una sonda complementaria a ella. Muchas técnicas moleculares están basadas en la hibridación como la RCP; estas se usan en el diagnóstico de enfermedades, la identificación de microorganismos patógenos, estudio de perfiles de expresión génica, localización de genes en cromosomas o de ARNm en tejidos in situ y en la comparación de especies patógenas.

4. RAPD (Polimorfismo amplificado aleatorio ADN)

También conocida como polimorfismo de producto amplificado al azar, es una técnica que emplea marcadores moleculares para amplificación por RCP de secuencias cortas de ADN polimórfico empleando un cebador de secuencia corta (10 a 12 pares de bases –pb). Al ser una técnica basada en la RCP, necesita control sobre ciertos factores que pueden influir directamente en el desempeño de la técnica como los dNTPs, TaqDNA polimerasa, temperatura de hibridación, tiempo de extensión, ciclos y la integridad de la cadena molde.

5. RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción)

Se denomina también fragmentos de restricción de longitud polimórfica, resultante de la variación de una secuencia de ADN reconocida por las enzimas de restricción usadas para cortar secuencias de ADN en lugares conocidos; son empleados principalmente como marcadores en mapas genéticos. Es un método comúnmente empleado por su rapidez en la obtención del resultado, bajo costo y especificidad; necesita ciertas condiciones para su funcionamiento, consistentes en el uso de enzimas de restricción adecuadas, condiciones de optimización y amplificación, y análisis de los productos amplificados (fragmentos de restricción) a través de electroforesis principalmente en gel de azarosa.

CONCLUSION

Las técnicas empleadas en la investigación con fundamento molecular, han permitido un avance significativo en la investigación, y aportado principalmente al desarrollo epidemiología molecular como ciencia aplicada para el conocimiento de características genotípicas de comunidades bacterianas en diferentes ambientes como el ambiental, veterinario y humano, y generado conocimiento sobre el comportamiento epidemiológico y los cambios que las poblaciones principalmente bacterianas han desarrollado como mecanismo de defensa y/o adaptación a sus condiciones de hábitat.

Hoy el uso de técnicas moleculares como la NGS, pirosecuencia, RAPD y RFLP, permite el estudio de un genoma completo o secuencias específicas de ADN de secuencias largas o cortas con el fin de detectar y analizar secuencias de interés para la investigación en las ciencias agronómicas, forenses, diagnóstico clínico e investigación básica, traslacional y aplicada.

Cada método presentado en esta revisión, se caracteriza por la confiabilidad y rapidez en la obtención del resultado, robustez, especificidad, sensibilidad y flexibilidad, si se compara con métodos fenotípicos, siendo este un aporte directo y accesible para el desarrollo de la epidemiología molecular.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Manual de prácticas de laboratorio, Técnicas básicas de biología molecular, Pablo G. Damián Matzumura, Leticia Gonzales Núñez, Alicia López Yáñez, Nancy Yuritz Espino Rivera. Recuperado el 29 de octubre del 2021 de <http://publicacionescbs.izt.uam.mx/DOCS/biomolec.pdf>
- TECNICAS MOLECULARES: UN AVANCE EN EL DIAGNOSTICO Y CONOCIMIENTO DE PATOLOGIAS OCULARES PATRICIA HERNANDEZ RODRIGUEZ MSc. Recuperado el 29 de octubre del 2021.
- Técnicas moleculares como herramientas en la epidemiología. Análisis de la dispersión y posibilidad de reinfestación por *Rhodnius colomhiensis* (Hemiptera: Reduviidae) Molecular techniques as tools in the epidemiology field. Analysis of dispersión and reinfestation possibility by *Rhodnius colomhiensis* (hemiptera: Reduviidae) CAROLINA VERGEL M. , CARLOS JARAMILLO H. , LYDA CASTRO , GUSTAVO VALLEJO\ FELIPE GUHL. Recuperado el 29 de octubre del 2021 de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v29n2/v29n2a04.pdf>
- Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura Molecular Biology Techniques for research development. A literature review Maritza Angarita Merchán, María Inés Torres Caicedo, Andrea Katherine Díaz Torres. Recuperado el 29 de octubre de 2021 http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000500012