

Artículos de revisión:

REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA

Q.C. Nilda Alejandra Ramírez Rivera, Dr. Armando Méndez Pérez,

Dra. Bertha E. Cocotle Ronzón. José Arenas Benhumea.

Departamento de Patología Experimental Fac. Medicina U.V.

Desde que Watson y Crick publicaron el modelo de la estructura en doble hélice del ácido desoxirribonucleico o ADN, se ha producido una verdadera revolución que ha llevado a crear una nueva rama de la ciencia, la Biología Molecular, cuyo objetivo fundamental es la comprensión de todos aquellos procesos celulares que contribuyen a que la información genética se transmita eficientemente de unos seres a otros y se exprese en los nuevos individuos, es decir, aquellos procesos celulares en los que participan los ácidos nucleicos; por tanto utiliza varias herramientas y técnicas para su estudio.

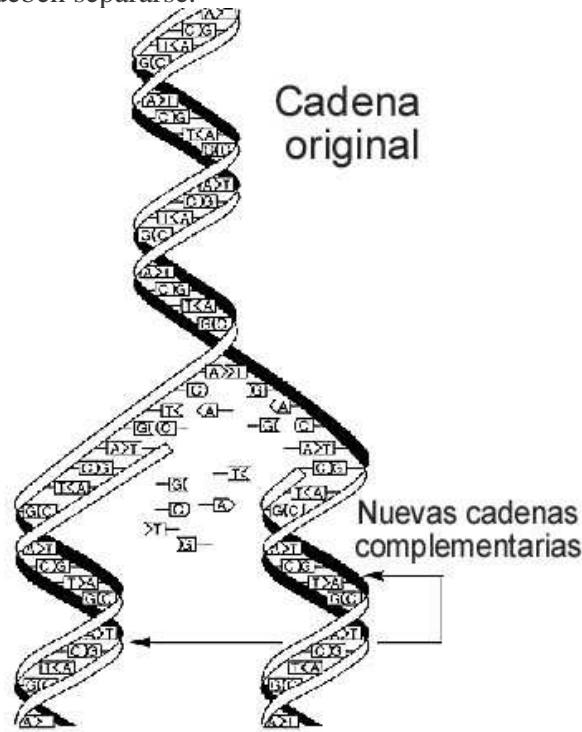
Los ácidos nucleicos son el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN), se consideran como polímeros de alto peso molecular, y se localizan principalmente en el núcleo de las células,. Están constituidos por nucleótidos formados por una molécula de azúcar (ribosa para el ARN y desoxirribosa para ADN), una base orgánica nitrogenada (adenina, guanina, citosina y timina para el ADN y adenina, guanina, citosina y uracilo para el ARN), y un grupo fosfato.

El ADN es una estructura de forma helicoidal constituida por dos cadenas complementarias entre si; en la parte externa se localizan las moléculas de azúcar-fosfato y en la parte central se encuentran las bases orgánicas nitrogenadas unidas las de una cadena con las de la otra, a través de puentes de hidrógeno, lo que da así estabilidad a la doble hélice; las dos cadenas tienen sentidos opuestos, una va en sentido 5' → 3' y la otra lo hace en sentido 3' → 5'.

El ADN regula la naturaleza y composición de las células, transmite la información hereditaria, determina la

estructura de las proteínas y a través de enzimas controla el resto de las funciones celulares.

Estas actividades las lleva a cabo al realizarse una copia de un fragmento de la molécula o de toda, ya sea que se requiera la síntesis de una proteína o la transmisión de la información genética de la célula. Para que ambas situaciones se lleven a cabo eficientemente, las dos cadenas de ADN deben separarse.



Todas las enfermedades genéticas y algunas no heredadas se asocian a cambios en la molécula de ADN; estos padecimientos se pueden analizar en términos moleculares, con lo que, eventualmente, algunos podrán ser tratados o curados al detectarse el defecto que existe.

La reacción en cadena de polimerasa o PCR (de sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) fue descubierta en 1985 por Karry Mullis en el laboratorio de Cetus Corporation, California, USA, lo que le representó el premio Nobel en 1993. Su nombre lo debe a que la actividad de la enzima ADN polimerasa permite fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Es una técnica empleada en Biología Molecular que permite la copia in vitro de fragmentos específicos de ADN; consiste en la separación por calor de las dos cadenas del ADN que se quiere amplificar a partir de un punto marcado por dos segmentos pequeños de ADN conocidos como cebadores (primers o iniciadores), que están constituidos de 10 a 30 nucleótidos e indican el inicio y el final del fragmento a duplicar. Mediante la acción de una enzima

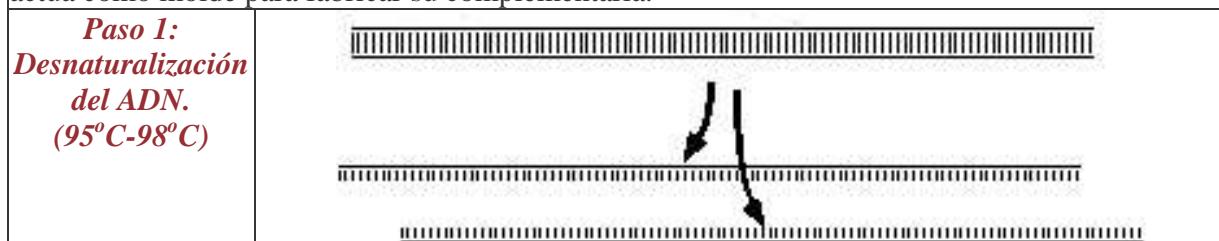
denominada ADN polimerasa, se van agregando en forma complementaria los nucleótidos necesarios para obtener una replica exacta de la cadena original. Este procedimiento se repite varias veces y se obtienen múltiples copias del fragmento de ADN escogido.

Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio (adenina, guanina, citosina y timina), cebadores, ADN original y la enzima DNA polimerasa. Debido a que para el desarrollo de la técnica se emplean temperaturas mayores de 70°, se requiere de una enzima que no se inactice a temperaturas elevadas, por lo que se emplea la DNA polimerasa de la bacteria *thermus aquaticus* que vive en aguas termales y cuya enzima puede trabajar a altas temperaturas.

La reacción en cadena de polimerasa se desarrolla en tres etapas:

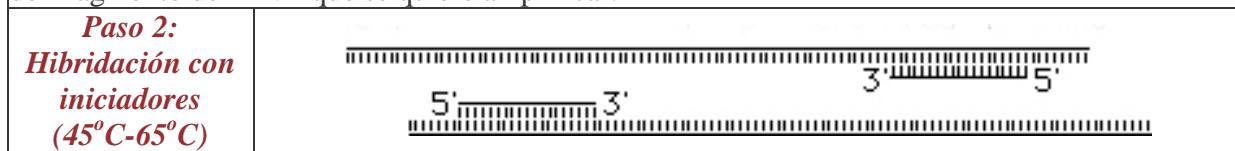
1^a. – Desnaturalización del ADN.

Por medio de la aplicación de calor a 94°C, se produce la separación de las dos cadenas de la molécula de DNA que se quiere amplificar. Al romperse los enlaces de hidrógeno, cada cadena actúa como molde para fabricar su complementaria.



2^a. – Hibridación con cebadores.

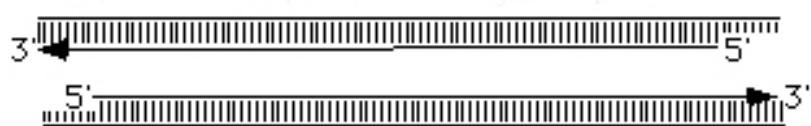
La temperatura se disminuye rápidamente a 55° C, para lograr que los cebadores o primers “reconozcan” sus secuencias complementarias en las cadenas de DNA correspondientes y se unan con ellas. Los primers no deben ser complementarios entre sí y deben corresponder a los extremos del fragmento del DNA que se quiere amplificar.



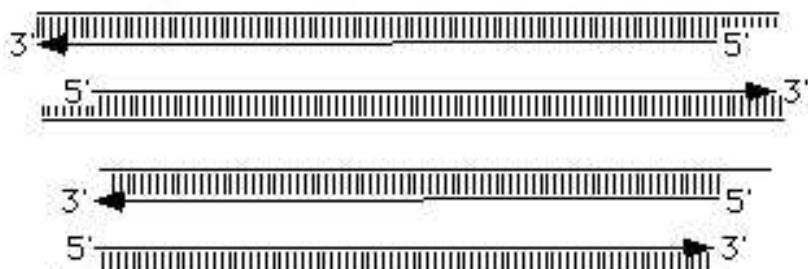
3^a. – Extensión con Taq polimerasa.

Para esta etapa, la temperatura se eleva a 72° C, con lo que la taq polimerasa agrega los diferentes nucleótidos complementarios siguiendo el orden de la cadena que sirve de molde.

Paso 3: Extensión con Taq polimerasa (65° C-75° C)



Después de completar el ciclo 2 tendremos cuatro copias.



El proceso se repite un número determinado de veces o ciclos, generalmente 30, y se consigue un aumento o amplificación exponencial del número de copias del fragmento de ADN que sirvió como molde.^(1, 2, 3)

Una ventaja de la técnica es que amplifica únicamente el fragmento de ADN que queremos, aunque esté en cantidades mínimas (alta sensibilidad) o en presencia de grandes cantidades de ADN semejantes (alta especificidad). La reacción es eficaz incluso si se parte de muestras de ADN muy poco purificadas, es decir, que se encuentran en presencia de otros componentes.

Una vez amplificada la molécula del DNA que se desea, se coloca la muestra en gel de poliacrilamida, en el que se agrega azul de bromofenol que nos permitirá visualizar cómo la muestra corre a través del gel, para lo que se emplea corriente eléctrica a 100 mV, durante 30 a 40 minutos.

De acuerdo con el tamaño de la molécula de ADN, será la distancia que correrá en el gel; posteriormente este se tiñe con bromuro de etidio que permite visualizar la extensión en forma de bandas con el empleo de luz ultravioleta. La banda obtenida se compara con un marcador de peso

molecular para poder establecer su tamaño y así verificar si corresponde al fragmento que se busca o se puede correr al mismo tiempo que un control conocido y establecer comparaciones entre ambas bandas. (fig 1).

El material biológico a partir del cual se pueden obtener muestras para el análisis del DNA es múltiple e incluye sangre, piel, semen, cabellos, material de biopsia, o puede conseguirse a partir de los instrumentos utilizados para la recolección de las muestras como son cotonetes o cepillos.

La PCR se aplicó inicialmente como una técnica de laboratorio de investigación, pero su gran especificidad y sensibilidad ha permitido el desarrollo de técnicas específicas basadas en ella con aplicación en muchos campos de la investigación y el análisis. Así, se ha convertido en una herramienta fundamental en campos tan diversos como la investigación (clonación de genes, detección de clones recombinantes, estudio de ADN de fósiles), medicina forense y criminalística (determinación de paternidad, identificación de individuos y de sospechosos, así como en el análisis de la evidencia en casos de asesinato, violación, etc.), sanidad animal y mejora genética (detección de enfermedades

genéticas e infecciosas, pureza de razas, etc.) | y medicina (diagnóstico de enfermedades).

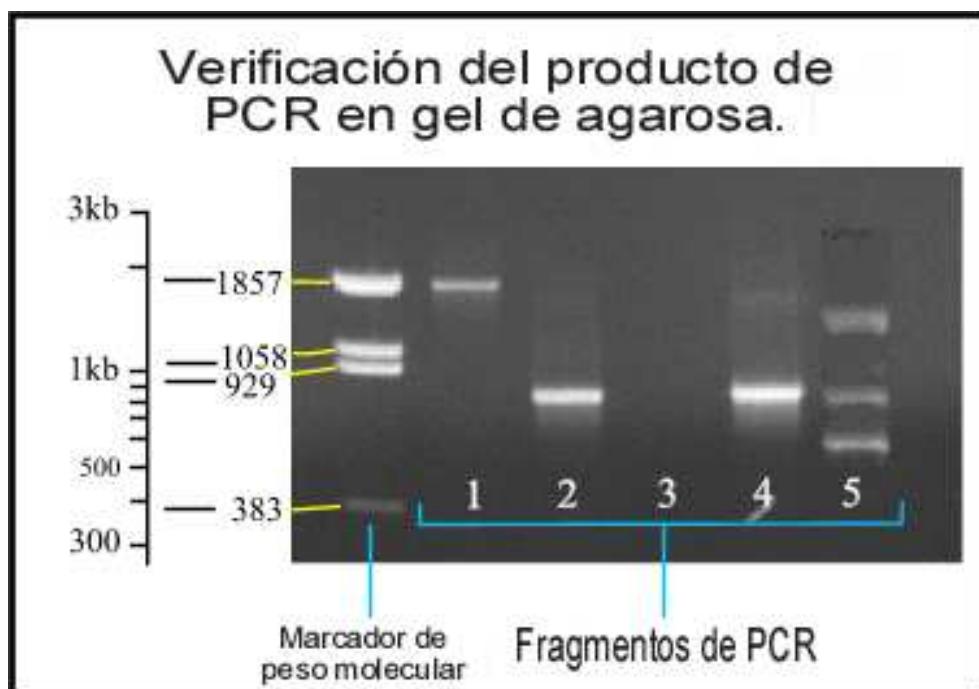


Figura 1. Migración en gel de los pares de bases de una molécula de DNA amplificada.

En esta última, la PCR se encuentra en un amplio campo de investigación y desarrollo, por lo que se ha empleado en la exploración de enfermedades genéticas como en casos de anemia de células falciformes, fibrosis quística, distrofia miotónica y el Síndrome del cromosoma X frágil.⁽⁴⁾ Además se ha utilizado para el diagnóstico prenatal, creación de mapas genéticos y en la detección de esperma aneuploide.⁽⁵⁾

También se ha utilizado para realizar la subtipificación de neoplasias, para vigilar la respuesta al tratamiento y en la detección de las recurrencias o de recaídas tempranas (se menciona que tiene una sensibilidad para detectar una sola célula tumoral entre un millón de células sanas), lo que permite establecer un pronóstico de la enfermedad.⁽⁶⁾

Dentro de este campo, también se ha utilizado para el estudio de la estructura y expresión de los oncogenes, y para detectar el reordenamiento de tumores humanos con anomalías del cariotipo, así como de anomalías de la expresión genética en

ausencia de alteraciones del cariotipo. Una de las aplicaciones más útiles de la PCR en la oncología pediátrica es en la detección de traslocaciones cromosómicas.^(7,8)

En el campo del laboratorio clínico y de aplicación en la endocrinología, se ha utilizado para detectar la producción de hormonas ectópicas.⁽⁹⁾

Dentro de la microbiología e infectología, se ha utilizado para identificar el DNA de parásitos, virus o bacterias, incluyendo también la detección de resistencia a los antibióticos.⁽¹⁰⁾ De la misma forma puede detectar rápida y exactamente la presencia de agentes infecciosos de lento crecimiento como Chlamydia trachomatis, Toxoplasma gondii, Pneumocystis carinii, virus de la inmunodeficiencia humana, Mycobacterium tuberculosis, Micoplasmas, herpesvirus, citomegalovirus, virus de la Hepatitis C, por lo que se puede emplear en: diagnóstico rápido de infecciones víricas, detección de microorganismos en células infectadas o transformadas, determinación de

la relación genética entre varios tipos de microorganismos similares, para correlacionar la presencia de agentes virales o infecciosos en tejidos neoplásicos, determinar la resistencia a los antibióticos de las bacterias, además de detectar y cuantificar microorganismos difíciles de cultivar o para los que no existen reactivos serológicos. La técnica de PCR tiene el potencial de realizar una rápida detección del DNA bacteriano en muestras de sangre, y evita los contratiempos encontrados con los cultivos sanguíneos en el diagnóstico de bacteremia (11).

Otro aspecto importante de la prueba es que se ha utilizado para determinar si los individuos son genéticamente compatibles en caso de trasplante renal, con lo que se disminuye de forma importante la posibilidad de rechazo.

Conclusiones

La técnica de la PCR presenta ventajas sobre las técnicas convencionales de diagnóstico debido a que tiene una mayor sensibilidad y especificidad, presenta un menor número de falsos positivos y negativos, emplea un tiempo mucho menor para obtener los resultados y puede utilizarse en todas las ramas de la medicina.

Por lo tanto, los médicos deben familiarizarse con esta técnica, su empleo e interpretación, para poder proporcionarle beneficios a los pacientes.

Bibliografía

1. Lodish H, Baltimore D. "Recombinant DNA technology". En: Lodish H, Baltimore D. Molecular Cell Biology. Scientific American books. 1997: 254-6.
2. Larrick JW. The PCR Technique: Quantitative PCR. Biotechniques Books. Eaton Publishing. 1997
3. Siebert P. The PCR Technique. RT-PCR. Biotechniques Books. Eaton Publishing. 1997
4. Thornton C. "The myotonic dystrophies". Semin Neurol 1999; 19: 25 – 33
5. Thornhill, AR Snow K. 2Molecular Diagnostics in Preimplantation Genetic Diagnosis". J Mol Diagn 2002 4: 11-29.
6. Lindblom A, Liljegren A. Tumor markers in malignancies. BMJ 2000; 320: 424 – 7.
7. Rowland, JM. "Molecular genetic diagnosis of pediatric cancer: current and emerging methods". Pediatric Clinics of North America. 2002; 49 (6): 1415.
8. Hirose Y, Aldape K, Takahashi M, Berger MS, and Burt GF. "Tissue Microdissection and Degenerate Oligonucleotide Primed-Polymerase Chain Reaction Is an Effective Method to Analyze Genetic Aberrations in Invasive Tumors". J Mol Diagn 2001 3: 62-67.
9. White PC, Speiser PW: "Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency". Endocr Rev 2000, 21:245-291
10. Louie M, Louie L, Simor A. "The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases". CMAJ 2000; 163 (3): 301 – 9.
11. Teba L. "Polymerase chain reaction: A new chapter in critical care diagnosis". Critical Care Medicine 1999; 27:860-86.