

LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

El método y sus aplicaciones

M. Leonardo Satz

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas "José de San Martín"
Facultad de Medicina, UBA

Alberto R. Kornblitt

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET)-
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

Visualización directa (en gel de agarosa) de fragmentos de ADN amplificados mediante la técnica PCR. Foto de los autores

La reacción en cadena de la polimerasa, ya más conocida como PCR, es una técnica que permite replicar entre cientos de miles y millones de veces, en el transcurrir de pocas horas e in vitro, pequeñas cantidades de ADN. Uno de los aportes fundamentales de esta metodología a la investigación básica en biología molecular consiste, precisamente, en la rapidez y eficiencia mediante las cuales se realiza una tarea que antes requería largas y tediosas jornadas. El producto que se obtiene al finalizar la reacción —una gran cantidad de un fragmento génico con alto grado de pureza— favorece la tarea de los investigadores empeñados en ampliar nuestros conocimientos sobre la estructura y función de los genes. Por su alta sensibilidad, esta técnica permite identificar un gen a partir de un solo cabello, una célula somática o un espermatozoide. Ha facilitado, y en muchos casos hecho posible, la tarea de identificación de personas, por ejemplo de hijos de desaparecidos, mediante el análisis de muestras del niño y de su abuela materna. Entre las aplicaciones médicas de la PCR cabe destacar su aporte al desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico. Permite detectar agentes infecciosos como los virus de las hepatitis

B y C o regiones del genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Ha sido aplicada, por ejemplo, para diagnosticar la presencia o ausencia de HIV en recién nacidos de madres seropositivas, pues la existencia de anticuerpos maternos impide obtener resultados confiables, con los métodos convencionales, durante el primer año de vida. También ha facilitado el diagnóstico de enfermedades tales como las hemofilias A y B, la distrofia muscular y la fibrosis quística, e hizo posible reconocer mutaciones de genes vinculadas con enfermedades oncológicas. Su sensibilidad permite detectar poblaciones residuales de células cancerosas en pacientes sometidos a quimioterapia y de este modo se ha podido determinar, con una antelación en extremo valiosa, un nuevo avance de la enfermedad. Existen ya modos de evaluar a través de la PCR el riesgo de padecer dolencias tales como diabetes de tipo I y la enfermedad celíaca. Precisamente los autores del presente trabajo y colaboradores han obtenido, mediante el empleo de esta técnica, resultados que indican la existencia de una vinculación entre determinadas variantes genéticas y dichas enfermedades en la población argentina.

Los genes son porciones de ácido desoxirribonucleico (ADN) que tienen la información necesaria para la fabricación de los ácidos ribonucleicos (ARN) y, en última instancia, a través de éstos, de las proteínas: el ARN "copia" el mensaje contenido en el ADN y a partir de él da lugar a la correcta formación de la cadena o secuencia de aminoácidos que constituyen las proteínas.

Todos los genes están compuestos por la misma materia prima: una sucesión de nucleótidos. Cada nucleótido está formado por un grupo fosfato, un azúcar con cinco carbonos (la desoxirribosa) y una de las siguientes bases nitrogenadas: adenina, timina, guanina o citosina. Los ge-

nes no se distinguen unos de otros por tener una composición fisicoquímica muy diferente, sino por el orden o secuencia en la que estas cuatro bases se disponen a lo largo de la molécula de ADN (véase "Somera descripción del ADN"). El hecho de que los genes no se distingan por su composición fisicoquímica hace prácticamente imposible aislarlos mediante el empleo de métodos bioquímicos de fraccionamiento del tipo de los usados para purificar proteínas como son, por ejemplo, la cromatografía, la electroforesis o la ultracentrifugación.

Por otra parte, cada gen es una unidad de información sin solución de continuidad respecto del resto del ADN en el que

está inmerso. Esto significa que a todo gen lo preceden y suceden otras secuencias de ADN que, en general, no tienen relación con él. El gen que codifica para la insulina, por ejemplo, tiene una "longitud" de 1.700 bases y su masa representa sólo la dos millonésima parte del ADN contenido en el núcleo de una célula humana...

Hasta mediados de la década del ochenta, la única estrategia posible para aislar un gen y obtener grandes cantidades del mismo en estado puro era el "clonado molecular". Este método se basa en la introducción de fragmentos de ADN, uno de los cuales contendrá el gen de interés, en vectores. Éstos son moléculas de

ADN (plásmidos o ADN de bacteriófagos) capaces tanto de transportar fragmentos ajenos a su estructura original como de multiplicarlos dentro de bacterias. Si se conoce un pequeño tramo de la secuencia de aminoácidos de una proteína cuyo gen se desea "clonar" (multiplicar), se pueden diseñar métodos para identificar qué bacterias llevan el vector que transporta dicho gen. Este reconocimiento también se puede realizar si se dispone de un anticuerpo contra la proteína resultante del gen que se desea clonar. En este caso se reconoce la bacteria portadora porque fabrica la proteína codificada por el fragmento de interés, la cual se une específicamente al anticuerpo.

Una vez aislado el gen no sólo resulta posible determinar con exactitud su secuencia de bases o analizar en detalle la información de la que es portador, sino que también se puede estudiar su expresión (la manera en que dirige la síntesis de la proteína correspondiente) en distintos organismos y tipos celulares, introducirlo en células en cultivo o en animales de experimentación, etcétera. Estas técnicas, ya clásicas, han permitido el aislamiento y caracterización de decenas de miles de genes de microorganismos, animales y plantas, lo que provocó un cambio cualitativo en la comprensión del

funcionamiento de la célula.

En 1986, K. Mullis, un investigador de la Corporación Cetus, inventó un método para lograr la multiplicación *in vitro* de fragmentos definidos de ADN sin necesidad de recurrir a los vectores y su replicación en bacterias. Este método revolucionaría en corto tiempo el conjunto de técnicas de la biología molecular. Su uso se extendió rápidamente a miles de laboratorios, no sólo de investigación básica, sino también de diagnóstico clínico. Se trata de la reacción en cadena de la polimerasa, ya muy conocida como PCR, siglas provenientes del inglés *Polymerase Chain Reaction*.

LA TÉCNICA PCR

Esta técnica permite multiplicar ("amplificar" es, en realidad, el término que se ha impuesto) pequeñas cantidades de ADN entre cientos de miles y millones de veces. El tramo destinado a reproducirse puede tener desde cincuenta hasta más de dos mil nucleótidos de longitud. El segmento de ADN que sirve de molde no requiere estar necesariamente en estado puro, sino que puede ser parte de mezclas complejas. Puede ser, por ejemplo, ADN nuclear total.

El método se basa, en su forma más

simple, en la realización de tres reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas. Estas reacciones se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces (véase la figura 1). La muestra se calienta, en el primer paso, hasta lograr la separación de las dos cadenas que constituyen el ADN, hecho que se conoce como "desnaturalización". En el segundo paso, la temperatura se reduce para permitir el "apareamiento" de cada una de las cadenas cortas de nucleótidos (oligonucleótidos) con cada una de las hebras separadas del ADN molde. Se trata de segmentos de ADN de cadena simple, sintetizados en el laboratorio y diseñados de manera tal que permiten definir los límites del tramo de ADN que se desea replicar. Obviamente, para que se pueda producir el apareamiento, cada uno de estos oligonucleótidos, a los que se denomina "iniciadores" o *primers*, debe ser complementario del tramo al que tienen que unirse en las cadenas separadas del ADN molde. En tercer lugar, una enzima ADN polimerasa extiende los *primers*, en el espacio comprendido entre ambos, sintetizando las secuencias complementarias de las hebras del ADN molde. Para ello, la ADN polimerasa usa desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) agregados a la mezcla de reacción. La temperatura a la que se realiza el tercer paso está con-

SOMERA DESCRIPCIÓN DEL ADN

El ADN está formado por dos cadenas complementarias de nucleótidos. Cada nucleótido está constituido por un grupo fosfato, un azúcar de cinco carbonos, la desoxirribosa, y una de cuatro posibles bases nitrogenadas, adenina (A), timina (T), guanina (G) o citosina (C). Son estas bases las que determinan el carácter complementario de las cadenas. Esto significa que dada una secuencia de bases en una de ellas, la otra presentará una única sucesión posible: si en la primera nos encontramos con una molécula de guanina, sabremos que estará unida, en la segunda cadena, a una molécula de citosina; a su vez, una molécula de timina sólo se unirá a una de adenina. El ADN se duplica una y otra vez mediante un proceso que lleva, primero, a la separación de sus dos cadenas y luego a la síntesis de dos nuevas cadenas, cada una de ellas idéntica (salvo error) a

aquella de la cual se separó. Esta exigencia de complementariedad da lugar a una adecuada replicación de las secuencias de nucleótidos, quedando también asegurada, de este modo, la transmisión de la información genética.

Un ácido ribonucleico, el ARN mensajero (ARNm), transportará esa información, luego de haberla copiado en sus propias bases mediante el proceso conocido como "transcripción", desde el núcleo de la célula hasta su citoplasma. Así se originarán las proteínas, que podemos definir, básicamente como secuencias de aminoácidos. Los aminoácidos, que son sólo 20, se organizarán en el orden que corresponda a cada proteína de acuerdo con las instrucciones recibidas por el ARNm en el núcleo celular. Cada aminoácido es codificado por tres bases o "letras" escritas en el ARNm. El triplete de bases se denomina codón. Existen 64 codones posibles. Sin embargo, al haber sólo 20 aminoácidos, muchos de ellos son codificados por más de un tipo de codón. En otras palabras, varios codones pueden leerse

para dar el mismo aminoácido, razón por la cual se califica al código genético como "degenerado". Hemos querido detenernos en este aspecto para que el lector considere lo siguiente: conocer un fragmento de la secuencia de aminoácidos de una proteína no permite inferir la secuencia de bases presente en el ARNm que lo codifica; sólo permite deducir todas las secuencias teóricas posibles (véase "ADN, una molécula maravillosa" en *Ciencia Hoy*, vol. 2, n° 8, págs. 26-35, particularmente 'El lenguaje de la vida', en pág. 31). Llegar a conocer el orden real presente en el gen, es decir en el fragmento de ADN que codifica para una determinada proteína, exige contar con estrategias capaces de aislar y multiplicar ese gen. La reacción en cadena de la polimerasa o técnica PCR, método que hace posible replicar *in vitro* hasta millones de veces fragmentos bien definidos de ADN, se ha constituido en una herramienta invaluable en el ámbito de la biología molecular.

dicionada por aquélla a la cual "trabaja" la enzima ADN polimerasa. Al cabo del primer ciclo de tres reacciones (desnaturalización, apareamiento, extensión) el tramo de ADN elegido se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. El resultado de la aplicación de numerosos ciclos "en cadena" da lugar a la amplificación geométrica del segmento de ADN delimitado por los *primers*.

Para replicar el ADN, la técnica PCR hizo uso, en un principio, de la ADN polimerasa de la bacteria *Escherichia coli*. Pero esta enzima resulta desactivada debido a la alta temperatura requerida para desnaturalizar la doble cadena del ADN, por lo cual debía agregarse enzima fresca al comenzar el tercer paso de cada ciclo. Este inconveniente fue solucionado de manera ingeniosa cuando se la reemplazó por su equivalente de la bacteria "termófila" *Thermus aquaticus*. En efecto, la ADN polimerasa de este microorganismo, denominada Taq polimerasa, actúa eficientemente entre los 75° C y los 80° C y resiste más de dos horas a 93° C. De esta manera es posible mezclar todos los componentes de la PCR al comenzar el primer ciclo y la reacción en cadena puede llevarse a cabo mediante equipos automatizados que realizarán los ciclos térmicos programados. Estos equipos son provistos por numerosas empresas extranjeras, pero ya ha sido fabricado uno por la industria argentina. Todo esto no hace más que confirmar la creciente popularidad de la PCR entre investigadores, médicos y bioquímicos clínicos.

Una vez finalizada la reacción se habrá logrado fabricar, en pocas horas, gran cantidad de un fragmento génico con un alto grado de pureza. Obtener el mismo resultado utilizando las técnicas clásicas de clonado llevaría varios días de tedioso trabajo. Por otra parte, la técnica PCR es el método de detección de secuencias de ADN más sensible conocido hasta la fecha: mediante ella resulta posible identificar un gen a partir de un solo cabello, una célula somática o un espermatozoide. Es, por lo tanto, un instrumento extremadamente valioso para establecer, por ejemplo, lazos de parentesco (véase "Filiación").

EL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

El hecho de que las moléculas de ADN obtenidas al finalizar la reacción en cadena correspondan efectivamente al fragmento de interés queda asegurado por la

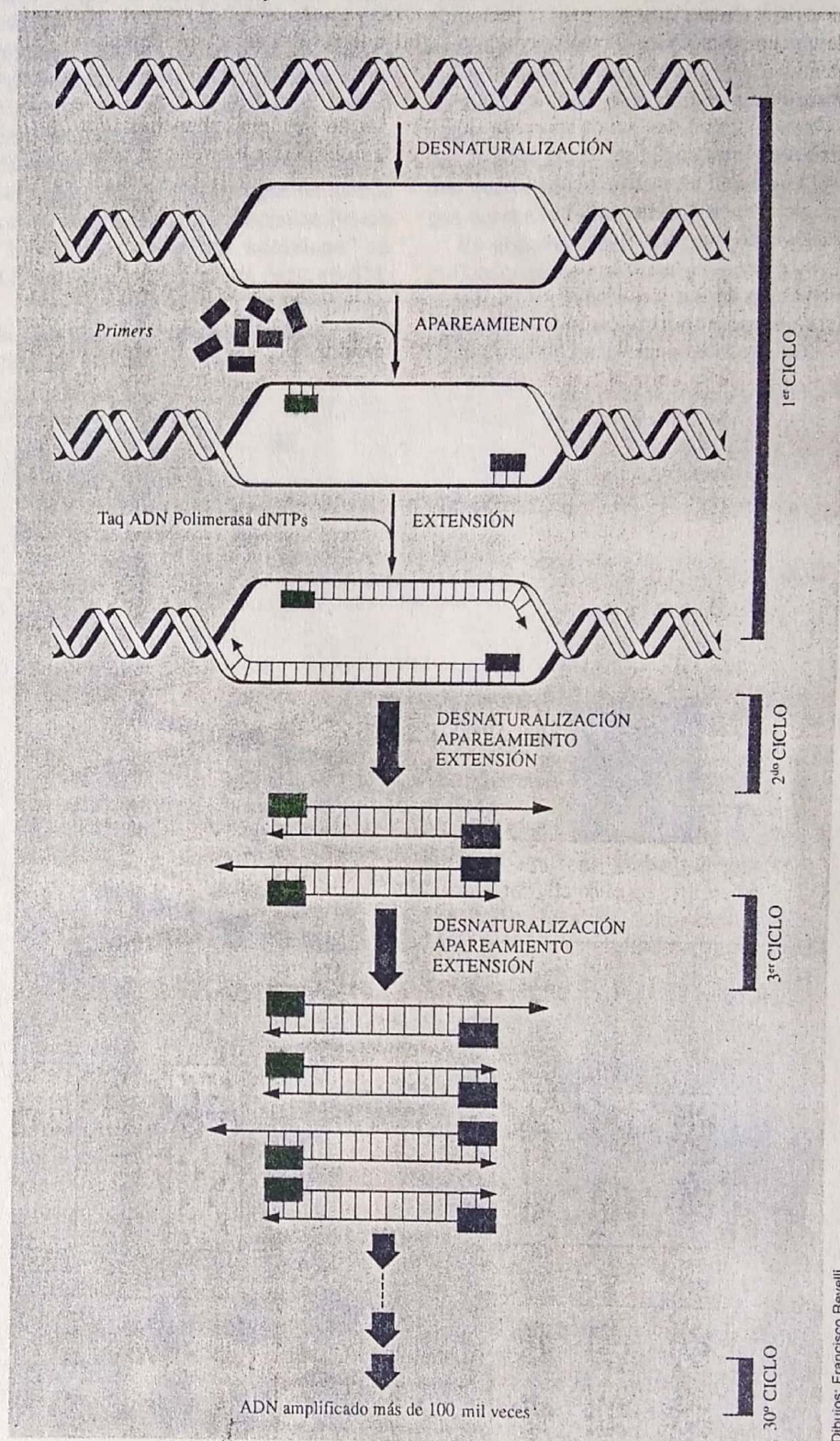


Figura 1. Para lograr la duplicación de un tramo de ADN, cada ciclo de la técnica PCR incluye tres etapas: a) desnaturalización, durante la cual se separan las dos hebras constituyentes del ADN; b) apareamiento de los "iniciadores" o *primers* del tramo a replicar; c) extensión de las cadenas de *primers* gracias a la acción de una enzima ADN polimerasa. La repetición de los ciclos permite multiplicar geométricamente los tramos de ADN elegidos.

intervención de los *primers* que definen los extremos "derecho" e "izquierdo" de ese fragmento. Así, una vez que la reacción ha finalizado, el tamaño del frag-

mento multiplicado puede determinarse sometiendo los productos de la reacción a una electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida, es decir, a un proceso

de separación por difusión bajo la acción de un campo eléctrico. Por otra parte, la identidad del producto puede ser confirmada mediante hibridación (unión complementaria) con una sonda marcada radiactivamente, cuya secuencia de bases esté contenida en el fragmento de interés. En este caso se procede así: el ADN fraccionado por electroforesis es desnaturalizado y luego transferido a una membrana de nitrocelulosa o nylon, que actúa como soporte sólido (*Southern blot*), y luego es puesto en contacto con la sonda, que se unirá al fragmento bus-

cado ya que ha sido preparada de modo tal que resulta ser complementaria del mismo. También es posible colocar el ADN directamente en la membrana en forma de pequeñas manchas (*dot blot*) para su posterior hibridación con la sonda (véase la figura 2). La localización de las sondas radiactivas se logra, en ambos casos, mediante autorradiografías (véase "Las sondas de ácidos nucleicos" en *Ciencia Hoy*, vol. 4, n° 20, págs. 46-51).

Una estrategia distinta para confirmar la identidad del fragmento replicado consiste en realizar dos reacciones de PCR

consecutivas. Al finalizar la primera, una alícuota de la misma es sometida nuevamente al proceso de multiplicación tras haber colocado dos *primers* internos. Mediante el empleo de esta metodología, conocida como *nested PCR* (PCR anidada), la filiación de los fragmentos obtenidos queda confirmada por el hecho de que poseen tamaños previsibles.

En algunos casos, los productos amplificados poseen secuencias que son reconocidas y clivadas por ciertas enzimas llamadas endonucleasas de restricción. La determinación del tamaño al que que-

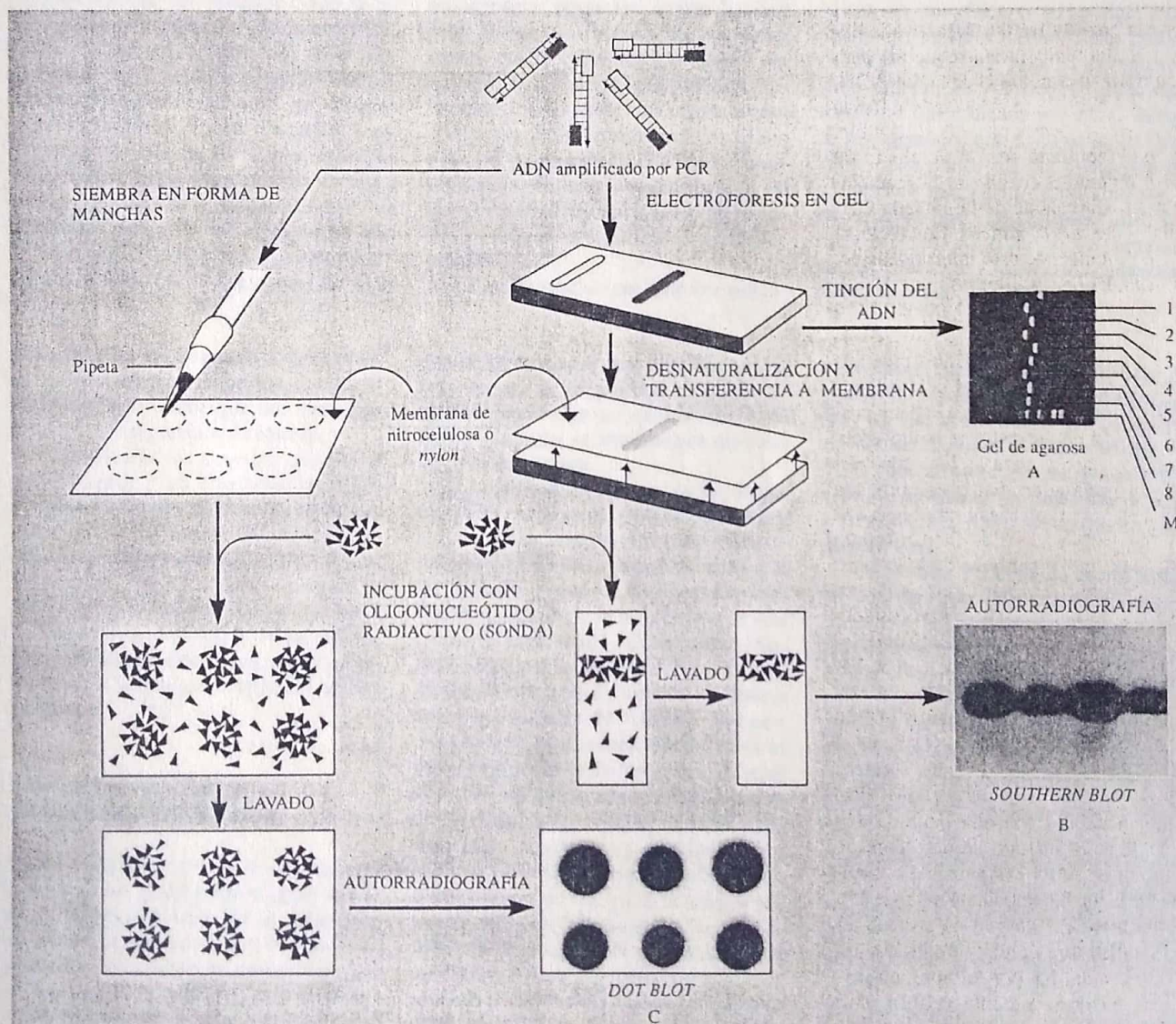


Figura 2. Tres formas de analizar los fragmentos de ADN amplificados mediante la técnica PCR. A: visualización directa. Las muestras colocadas sobre un gel y sometidas a la acción de un campo eléctrico (electroforesis) migran de una manera característica que se puede visualizar por tinción (coloreado) del ADN. (Carriles 1-8: productos de distintas PCRs; carril M: marcadores de ADN de tamaño conocido.) B: *Southern blot*. El ADN es desnaturalizado (separación de sus hebras constituyentes) y transferido a una mem-

brana de nitrocelulosa o nylon para luego incubar la hibridación (unión) con una sonda radiactiva. Ésta quedará fijada donde se encuentre el tramo de ADN de interés y su presencia se revelará a través de una autorradiografía (placa fotográfica sensible a la emisión radiactiva de la sonda). C: *dot blot*. Método análogo al anterior, pero practicado sobre una siembra en forma de manchas de los fragmentos de ADN a analizar previamente desnaturalizados.

FILIACIÓN

Los genes presentan variaciones de su secuencia nucleotídica entre los individuos de la misma especie llamadas polimorfismos. El examen de estos polimorfismos —dicho de otro modo, de patrones característicos presentes en las secuencias de nucleótidos— es hoy la herramienta más poderosa para confirmar o descartar la existencia de parentesco entre individuos. El análisis del ADN nuclear por métodos como la hibridación molecular o la técnica PCR, particularmente considerada en el presente trabajo, permite detectar determinados fragmentos de ADN que difieren en su longitud, según los individuos, porque se trata de secuencias repetidas en tándem cuyo número varía de una a otra persona. Estos polimorfismos, se heredan siguiendo las leyes de Mendel y dan lugar, en el análisis por electroforesis que separa los segmentos de ADN

dan reducidos los fragmentos al ser puestos en contacto con la enzima de restricción adecuada indica que nos encontramos ante los segmentos de interés.

Para diseñar los *primers* que hacen posible replicar un fragmento de ADN mediante la técnica PCR es necesario conocer, en la mayoría de los casos, la secuencia de bases total o parcial de dicho fragmento. Por esta razón, aunque la PCR supera en sensibilidad y rapidez a las técnicas de clonado y de secuenciación convencionales, no se puede prescindir de la información brindada por las mismas.

APLICACIONES EN LA INVESTIGACIÓN BÁSICA

Nuestro conocimiento de la estructura y función de los genes surge en gran medida de la determinación de su secuencia de bases. La secuenciación directa y el grado de multiplicación permitidos por la técnica PCR constituyen aportes esenciales de esta metodología a la investigación básica en biología molecular, ya que facilitan la tarea haciéndola más rápida y eficiente. Aunque los fragmentos de ADN de cadena doble obtenidos por amplificación pueden ser usados como moldes para una posterior secuenciación, resulta más conveniente utilizar cadenas simples. Cabe señalar que por el solo he-

por su masa o longitud, a un patrón de bandas que constituye lo que se ha dado en llamar "huella digital del ADN". Este patrón, que es efectivamente propio y característico de cada individuo, resulta de la combinación de patrones de bandas de los padres. El uso adecuado de esta metodología permite establecer la inclusión de la paternidad con una certeza mayor del 99,99%.

Existe un ADN, el de las mitocondrias (ADNmt), que se hereda sólo a través de la madre. El genoma de las mitocondrias posee una región llamada *loop D* que evoluciona rápidamente, siendo por lo tanto apropiada para determinar la individualidad genética. Cabe señalar que si bien esta región evoluciona con la suficiente rapidez como para que pueda tener una función caracterizadora, lo hace en una medida tal que permite el reconocimiento de patrones comunes con parientes maternos próximos.

La amplificación del *loop D* median-

cho de agregar en la reacción base un exceso de uno de los *primers* se puede lograr que una de las dos cadenas del ADN desnaturalizado se multiplique diez veces más que la otra.

El análisis de los niveles de los distintos ARN mensajeros (ARNm) presentes en una célula ha sido realizado tradicionalmente mediante procedimientos que incluyen los *Northern* (el *Southern* para ADN) y *dot blot* o la hibridación *in situ* (sobre la función del ARNm véase "Somera descripción del ADN"). La importancia de este tipo de análisis se debe a que esos niveles de ARNm, que son principalmente el resultado del control de la transcripción de los genes, reflejan el estado de desarrollo y diferenciación de la célula. La aplicación de la PCR ha dado lugar a una nueva modalidad para analizar el ARNm. Éste es aislado, en primer lugar, de tejidos o células y entonces se lo utiliza como molde para la fabricación de un ADN complementario (cADN) por parte de la enzima transcriptasa reversa (el calificativo de reversa aplicado a esta enzima se debe a que su acción es "inversa" a la cumplida por la enzima transcriptasa, que produce ARN a partir de ADN). El cADN así obtenido es usado a su vez como molde que se replicará mediante la PCR, tras la aplicación de *primers* diseñados para delimitar la región que resulta de interés. El control adecuado de todos los pasos de estas

te la técnica PCR y su posterior secuenciación permiten evaluar si dos individuos son hijos de la misma madre. La probabilidad de que dos personas no emparentadas tengan la misma secuencia de nucleótidos en el *loop D* del ADNmt es muy baja, sólo del 0,27%. Sin embargo, a pesar de la importancia implícita en este hecho, es otro el rasgo que concede un valor inestimable a este método: cuando hay sólo un pariente sobreviviente y éste se encuentra a más de una generación de distancia del individuo en cuestión, la identidad sólo puede ser resuelta mediante este procedimiento, en cuyo caso el parentesco debe ocurrir por vía materna. Esta metodología fue utilizada por M. C. King, de la Universidad de California, en Berkeley, para confirmar las relaciones de parentesco que permitieron restituir a sus abuelos hijos de desaparecidos durante la última dictadura militar argentina, así como para identificar cadáveres NN hallados en fosas comunes.

reacciones hace posible cuantificar con precisión los niveles de ARNm originales. La alta sensibilidad que caracteriza al método, llamado en esta variante RT-PCR (por *Reverse Transcriptase-PCR*), permite su uso en la detección y cuantificación de ARN mensajeros poco abundantes.

La técnica PCR puede ser utilizada, en algunos casos, para clonar genes cuya secuencia de bases es desconocida. Cabe preguntarse cómo se diseñan, en este caso, los *primers* necesarios para realizar la amplificación. La respuesta a esta pregunta la da el conocimiento del código genético (véase "ADN, esa molécula maravillosa", particularmente el recuadro titulado "El lenguaje de la vida", en *Ciencia Hoy*, vol. 2, n° 8, págs. 26-35). Si se determina experimentalmente la secuencia de aminoácidos que constituyen un segmento de la proteína cuyo gen se quiere clonar, se puede deducir cuáles son las secuencias teóricas de todos los posibles ARN mensajeros que codifican para ese segmento. Con esta información se fabrican los dos *primers*, cada uno de los cuales es, en realidad, una mezcla de todos los oligonucleótidos posibles que el código genético permite deducir para codificar el segmento de proteína elegido. Se habla de "degeneración" del código genético aludiendo precisamente al hecho de que dada una secuencia de aminoácidos no se puede deducir con certeza

la secuencia de nucleótidos que la codifica, ya que varias de ellas cumplen la misma función. Dicho de otro modo: varias secuencias de nucleótidos pueden dar lugar a un mismo aminoácido. La reacción de PCR se realiza con estas dos mezclas de "primers degenerados". En cada mezcla, sólo uno de los oligonucleótidos será totalmente complementario del fragmento de ADN a amplificar y funcionará realmente como *primer*. Una vez amplificado el fragmento, se estudia la secuencia y se comprueba su correspondencia con la de la proteína previamente caracterizada.

Señalemos por último que la técnica PCR puede ser utilizada para cambiar la información contenida en un segmento de ADN, pues permite alterar su secuencia de bases. Esta "mutagénesis dirigida" consiste en el reemplazo de la secuencia génica original por otra, que puede diferir, por ejemplo, en una base respecto de la original. Esto se logra usando *primers* que, a pesar de portar la mutación, son igualmente capaces de aparearse con el molde y dar lugar a productos de amplificación con la secuencia cambiada.

APLICACIONES EN EL DIAGNÓSTICO MÉDICO

La PCR ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico en numerosos campos de la medicina. Por ejemplo, existen métodos de detección por PCR de agentes infecciosos como los virus de las hepatitis B y C, del papiloma humano, de Epstein Barr y citomegálico. En relación con el SIDA es posible detectar regiones del genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) amplificadas por PCR a partir de sangre extraída de pacientes seropositivos. Esta técnica puede ayudar a resolver resultados inciertos provenientes de las pruebas habituales y ha sido aplicada en el diagnóstico de la infección en recién nacidos de madres seropositivas. En tales casos, el uso de la técnica PCR evita el problema que se plantea por el hecho de que la presencia de anticuerpos recibidos de la madre impide saber, hasta que éstos desaparecen aproximadamente un año después del nacimiento, si el propio organismo del niño ha generado anticuerpos porque se encuentra infectado (véase "El niño infectado con HIV", en *Ciencia Hoy*, vol. 4, n° 21, págs. 46-47). Pueden detectarse también otros microorganismos patógenos como las clamidias, la bacteria *Escherichia coli* enterotoxigénica, el

vibrión del cólera y los tripanosomas.

La técnica PCR ha facilitado enormemente el diagnóstico de enfermedades hereditarias como hemoglobinopatías (talasemias y anemia falciforme), la fenilcetonuria, las hemofilias A y B, la deficiencia de alfa 1 antitripsina, la distrofia muscular y la fibrosis quística. Esta última es la más común de las enfermedades autosómicas recesivas severas que afectan a la población blanca. El aislamiento del gen afectado ha permitido identificar las mutaciones que causarían esta patología. La anulación de tres bases que provocan la ausencia del aminoácido fenilalanina N° 508 en la proteína que es producto del gen de la fibrosis quística constituye la mutación -llamada $\Delta F508$ - más frecuente en caucásicos (60% de los afectados en la población argentina), por lo que su análisis resulta ser el primer paso destinado tanto a la detección de portadores sanos como a la confirmación del diagnóstico en individuos afectados y al diagnóstico prenatal. La figura 3 muestra el ensayo de PCR utilizado para detectar la mutación $\Delta F508$: se replica un segmento del gen de la fibrosis quística que comprende la zona que codifica para la fenilalanina 508. Los productos de la PCR son inmovilizados por duplicado en forma de manchas en dos filtros de nitrocelulosa (*dot blot*). Uno de los filtros es hibridado con una sonda (un oligonucleótido) marcada que se corresponde con el gen normal, mientras que el otro es hibridado con una sonda correspondiente al gen mutado. Las hibridaciones se realizan en condiciones experimentales destinadas a garantizar que la sonda normal sólo se apareará con el ADN normal amplificado y que la sonda mutada sólo lo hará con el ADN mutado amplificado. De esta manera, el análisis de las manchas de hibridación reveladas en la autorradiografía permitirá reconstruir el genotipo de los pacientes.

En enfermedades oncológicas pueden detectarse, mediante la técnica PCR, mutaciones de oncogenes (literalmente "genes inductores de cáncer") como en el caso del oncogén *ras* en carcinomas de colon, de páncreas y en leucemias mieloides; del "antioncogén" de retinoblastoma, o del llamado cromosoma Philadelphia. Este cromosoma aparece en pacientes con leucemia mieloide crónica y es el resultado de la translocación de una porción del gen *bcr* desde el cromosoma 22 al 9, donde se ubica junto al oncogén *c-abl*. La consiguiente activación de este último, que codifica para una enzima denominada tirosina quinasa, parece ser el

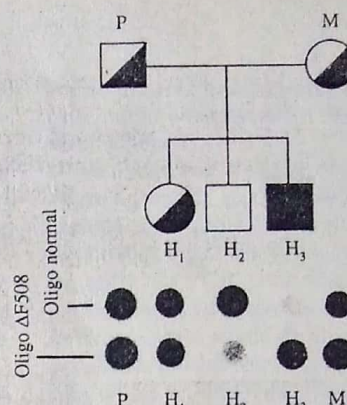


Figura 3. La proteína alterada en los enfermos que padecen fibrosis quística carece del aminoácido fenilalanina N° 508. Esto se debe a la mutación denominada $\Delta F508$. El diagrama muestra la reconstrucción del genotipo de un paciente. En este caso, el padre (P) y la madre (M) son portadores tanto del gen normal (blanco) como del gen mutado (negro); lo mismo ocurre con la hija (H_1). Los hijos varones son portadores de sólo un tipo de gen: el normal en el caso de H_2 y el mutado en el caso de H_3 . La técnica PCR (*dot blot*; véase la figura 2) revela la presencia de los oligonucleótidos característicos.

desencadenante de la enfermedad. La técnica PCR es especialmente útil, en este caso, para detectar la presencia de ARN mensajero híbrido *bcr/abl*. El ARN es analizado mediante la ya mencionada técnica RT-PCR, con *primers* específicos que revelan la presencia de mensajeros normales o híbridos. En pacientes sometidos a quimioterapia, la gran sensibilidad del método lo hace ideal para identificar poblaciones residuales de células cancerosas no detectables mediante técnicas convencionales, de manera tal que permite diagnosticar tempranamente un nuevo avance de la enfermedad.

Se han implementado métodos que utilizan la PCR destinados a la evaluación del riesgo de padecer trastornos autoinmunes (perturbaciones debidas a agresiones "erróneas" realizadas por las defensas inmunitarias a órganos del propio paciente), tales como diabetes de tipo I, enfermedad celíaca, pénfigo vulgaris, miastenia gravis y esclerosis múltiple. Consideremos brevemente algunas situaciones vinculadas con los genes del llamado complejo mayor de histocompatibilidad (HLA), los cuales codifican para una serie de glicoproteínas de la membrana celular que participan en la iniciación de la respuesta inmunitaria. Cada uno de estos genes presenta numerosas variantes (alelos) en la población. Se sabe que la presencia de algunos de esos

alelos en un individuo está asociada a la aparición de ciertas enfermedades autoinmunes. La reciente determinación de la secuencia de nucleótidos de varios alelos HLA permitió el diseño de nuevas estrategias de tipificación molecular de los genes HLA basadas en la amplificación por PCR y en la posterior hibridación con sondas constituidas por oligonucleótidos de secuencia específica que reconocen las variantes de alelos llamadas de riesgo. En colaboración con M. Herrera, M. Pando, V. Bernath y R. Gutman hemos desarrollado recientemente pruebas de tipificación por PCR de los alelos HLA que han indicado la existencia de susceptibilidad genética en relación con la enfermedad celíaca y la diabetes tipo I (insulinodependiente). En individuos blancos argentinos, determinados alelos HLA-DQ confieren treinta veces más riesgo de padecer estas patologías y su detección en familiares de afectados permite adoptar conductas terapéuticas tempranas.

LAS FUENTES QUE APORTAN EL ADN MOLDE

La fuente de la cual procederá el ácido nucleico que se ha de utilizar como molde depende de cada caso: en patologías infecciosas se procesa el tejido donde se desea detectar el agente; en patologías oncológicas se estudian biopsias del tumor; para el diagnóstico prenatal de enfermedades hereditarias se analizan células del líquido amniótico o vellosidades coriónicas junto con el ADN de leucocitos de los padres; para analizar ciertas características genéticas propias de cada individuo (por ejemplo, determinados alelos HLA, portadores heterocigotas sanos de enfermedades hereditarias recesivas) es útil cualquier célula con núcleo del organismo, empleándose habitualmente sangre periférica debido a su fácil obtención. Cabe señalar que la reacción también se ha realizado con éxito sobre ADN parcialmente degradado, extraído de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. Esto no sólo facilita la obtención de muestras de piezas quirúrgicas, sino que permite realizar estudios retrospectivos sobre preparados histológicos de archivo. También es posible extraer ADN de huesos, amplificarlo mediante la técnica PCR y analizarlo con fines tan diversos como la identificación de cadáveres o la determinación de los defectos genéticos que padecían nuestros antepasados remotos.

PROBLEMAS DE LA TÉCNICA PCR

Uno de los problemas más evidentes que presenta esta técnica, sobre todo cuando se la utiliza como herramienta de diagnóstico, es la posible generación de resultados falsamente positivos. Podría llegar a indicar, por ejemplo, la presencia de secuencias virales en personas no infectadas. Esto es consecuencia de la extrema sensibilidad del método. Los falsos positivos pueden generarse por contaminación de una muestra a partir de una única molécula de ADN proveniente de otra muestra. Esta molécula será amplificada en la PCR y aparecerá como una banda en el caso de electroforesis en gel o como una respuesta positiva en una hibridación con una sonda radiactiva. La causa más frecuente de falsos positivos es el "arrastré" de secuencias de ADN amplificadas en reacciones previas. Tales secuencias pueden estar presentes en los equipos de laboratorio y en los reactivos, pudiendo esparcirse por medio de aerosoles. Frente a esto, los expertos recomiendan la realización de controles negativos múltiples (reacciones de amplificación con todos los reactivos, excepto el ADN molde), además del uso de técnicas de esterilidad y de micropipetas que eviten la generación de aerosoles como precaución para prevenir la contaminación de las muestras.

PRESENTE Y FUTURO DE LA TÉCNICA PCR

La PCR se ha sumado a la lista de desarrollos tecnológicos originados en el ámbito industrial que provocaron cambios cualitativos en las ciencias básicas. Uno de los proyectos más ambiciosos de la biología moderna es la determinación de la secuencia completa del genoma humano. Esto permitirá no sólo identificar los genes responsables de numerosas enfermedades hereditarias y trastornos metabólicos, sino descubrir nuevos genes y sus funciones celulares relacionadas. Un paso indispensable para concretar dicho objetivo consiste en realizar un "mapeo" del genoma, es decir, una especie de carta geográfica que permita ubicar los genes con cierta precisión a lo largo de los cromosomas. La PCR se ha revelado como una de las técnicas de apoyo fundamental en tal empresa. Así por ejemplo, un grupo de investigadores de la pujante compañía francesa Genethon ha logrado diseñar recientemente cerca de 1.000 pa-

res de *primers* que han permitido "mapear" aproximadamente el 90% del genoma humano.

En otro orden, el uso de la PCR puede llegar a cambiar aspectos de la vida del hombre tales como la planificación del sexo de los hijos. En forma piloto, ya se ha utilizado PCR para determinación prenatal del sexo después de fertilización *in vitro*. Con la ayuda de un micromanipulador es posible remover una única célula de un embrión de 10 células, sin afectar el normal desarrollo de las restantes. A partir del ADN de la célula aislada, y en menos de 24 horas, una PCR de 60 ciclos, realizada con *primers* que reconocen secuencias exclusivas del cromosoma Y (ausente en las mujeres) permite diagnosticar el sexo del embrión, para luego implantarlo en la madre. Este procedimiento ha sido utilizado clínicamente para familias con riesgo de padecer enfermedades hereditarias que se manifiestan casi exclusivamente en los varones, con el fin de seleccionar embriones hembra para la implantación. La extensión de este procedimiento a familias sin antecedentes de enfermedades hereditarias, con el simple objetivo de "elegir" el sexo del niño, es sin duda una cuestión ética sumamente polémica.

A través de las ciencias básicas, el uso de la PCR se ha diversificado y han surgido variantes del diseño original cuya descripción excede los propósitos de este artículo. Quizá la prueba más contundente de la trascendencia del invento y de su futura expansión sea la venta de su patente por aproximadamente 300 millones de dólares a la poderosa multinacional Hoffmann-La Roche. ○



LECTURAS SUGERIDAS

- ELSENSTEIN, B. I., 1990, "The polymerase chain reaction. A new method for using molecular genetics for medical diagnosis", en *New English Journal of Medicine*, enero 18.
- HANDYSIDE, A., KONTOGIANNI, E. H., HARDY, K. y WINSTON, R. M. L., 1990, "Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification", en *Nature*, vol. 344, págs. 768-770.
- MULLIS, K. B., 1990, "The unusual origin of the polymerase chain reaction", en *Scientific American*, vol. 262, págs. 56-65.
- WATSON, J. D., GILMAN, M., WITKOWSKI, J. y ZOLLER, M., 1992, *Recombinant DNA*, 2^{da} edición, Scientific American Books, Freeman, Nueva York.