

Reacción en cadena de la polimerasa

Alfredo G. Torres Tejeda y Beatriz Eugenia Baca

Centro de Investigaciones Microbiológicas

Instituto de Ciencias

Universidad Autónoma de Puebla

La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) fue desarrollada por Kary Mullis en los años ochenta. Al igual que la técnica de secuenciación del ácido desoxirribonucleico (DNA), la RCP ha revolucionado la genética molecular, haciendo posible el estudio y análisis de una amplia gama de genes, que incluso pueden obtenerse a partir de un genoma complejo, como es el de los mamíferos donde pueden existir alrededor de cien mil genes.

Muchas de las técnicas en genética molecular son muy costosas y laboriosas. La mayoría de ellas tiene que ver con la clonación y los métodos que están diseñados para detectar secuencias específicas de DNA. En cambio, la técnica de RCP permite producir un enorme número de copias de una secuencia de DNA específica (amplificarla), sin recurrir a la clonación (véase figura 1).

La reacción en cadena de la polimerasa

El método se basa en las características de la estructura química del DNA y su replicación semiconservativa. Es decir, de acuerdo con el modelo de Watson y Crick, el DNA es un polímero formado por dos cadenas complementarias (cadenas antiparalelas), constituido por unidades de desoxirribonucleótidos de cuatro bases nitrogenadas adenina, guanina, citocina y timina unidas al azúcar desoxiribosa. La parte que no varía en la molécula del DNA consiste en desoxirribosas unidas por grupos fosfato. Específicamente el hidroxilo 3' del azúcar de un desoxirribonucleótido se une al hidroxilo 5' del siguiente azúcar a través del puente fosfodiester (véase figura 2). Para duplicarse, el DNA se separa en sus dos cadenas com-

plementarias; así, cada una de ellas sirve de molde o plantilla. Al final del proceso se obtendrán dos moléculas de DNA, cada una de ellas formada por una cadena original y una cadena complementaria que ha sido sintetizada “*de novo*.” La enzima que realiza este proceso se denomina DNA polimerasa. Esta enzima añade los nucleótidos en el hidroxilo 3' terminal de la cadena de DNA paterna. En otras palabras, se requiere una cadena con un grupo 3' OH disponible, el cual es el iniciador, para formar el enlace covalente fosfodiester 3'-5'. La reacción de alargamiento, catalizada por la DNA polimerasa, consiste en un ataque nucleofílico del átomo de fósforo del desoxirribonucleótido (dNTP) al 3' OH del iniciador, para formar la unión covalente fosfodiester (véase figura 2).

El aspecto más importante de la doble hélice de DNA es la especificidad de apareamiento de las bases del modelo de Watson y Crick, quienes dedujeron que la adenina debe aparearse con la timina, y la guanina con la citocina, debido a las uniones hidrógeno que se establecen entre las bases y a la restricción estérica que se produce.

Las dos cadenas de DNA se separan fácilmente cuando las uniones hidrógeno de las bases se rompen. Esto se realiza cuando una solución de DNA es calentada entre 77 y 100°C. Las bases complementarias se reasocian espontáneamente para formar la doble hélice cuando la temperatura descende. Este proceso de renaturalización se denomina alineamiento. La facilidad con la cual la doble hélice puede separarse y reasociarse es crucial para las funciones biológicas del DNA.

El método RCP emplea ciclos repetidos

de síntesis *in vitro* del DNA dirigida por un oligonucleótido iniciador. Las secuencias de los oligonucleótidos iniciadores se determinan en base a una parte conocida de la secuencia del DNA molde, ya que deben ser complementarias a cada una de las cadenas del DNA, dejando libres los lados opuestos para poder ser amplificados. Dichos oligonucleótidos sirven como iniciadores para la síntesis *in vitro* del DNA, la cual es catalizada por la enzima DNA polimerasa, y ellos también determinan los extremos del fragmento del DNA final que se obtiene. El principio de la técnica de RCP está ilustrado en las figuras 3 y 4.

La distancia entre los oligonucleótidos iniciadores es determinada empíricamente y depende de muchos factores. La longitud entre los oligonucleótidos iniciadores para ensayos de diagnóstico puede ser entre 50 y 1,500 bases de nucleótidos.

Básicamente, cada ciclo de RCP consiste de tres etapas (figuras 3 y 4).

I) En la primera etapa, el DNA molde es incubado a alta temperatura (92-98°C, de 30-90 segundos), para separar las cadenas complementarias, desnaturación del DNA y así hacerlas accesibles al apareamiento con el iniciador específico.

II) La etapa de alineamiento, en la cual la mezcla de reacción es enfriada para permitir que los oligonucleótidos iniciadores se alineen o hibriden las secuencias complementarias del DNA blanco.

III) La reacción de extensión, generalmente llevada a cabo a una temperatura intermedia, en la cual la DNA polimerasa copia el DNA entre las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos iniciadores.

Estas tres etapas de la reacción constituyen un ciclo térmico. Un protocolo típico de la RCP incluye de 30 a 50 ciclos. Cuando cada ciclo térmico se completa, los fragmentos recientemente sintetizados sirven como DNA blanco, y en unos pocos ciclos más, el producto predominante será una única clase de fragmento de DNA cuya longitud corresponde a la distancia entre los oligonucleótidos iniciadores. Así, la repetición del ciclo origina una acumulación geométrica de las secuencias amplificadas.

Los componentes de la reacción

1) La DNA polimerasa. Inicialmente se empleó la DNA polimerasa de *Escherichia coli*, como enzima polimerizadora, pero debido a su inestabilidad térmica era necesario agregarla en cada ciclo, haciendo muy costosa la prueba. Tomando en cuenta la serie de problemas técnicos que se presentaban al usar enzimas que perdían su actividad por las altas temperaturas, se purificó una enzima termoestable a partir de bacterias *Thermus aquaticus*, que actualmente se conoce como Taq DNA polimerasa. Esta enzima tiene un peso molecular cercano a los 93,910 Da y su temperatura óptima, en que se observa su actividad máxima, es entre 75 y 80°C; su tasa de incorporación de nucleótidos, Kcat, es de unos 150 nucleótidos/seg./enzima.

2) El DNA molde. La concentración de

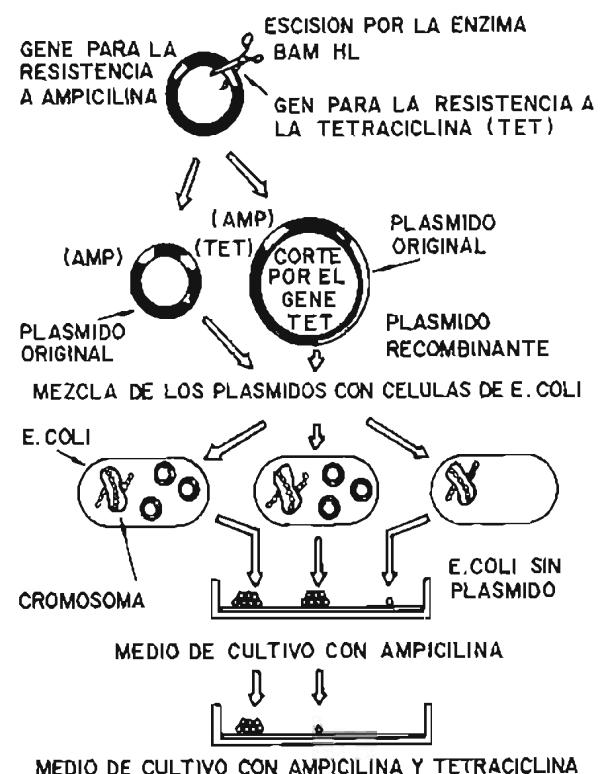


Figura 1. Clonación del DNA. Las etapas en la clonación de genes implican: el corte del DNA que se va a clonar con enzimas de restricción (endonucleasas), la incorporación del genoma en un vector (plásmido), el cual fue cortado con la misma enzima de restricción. La mezcla se liga dando lugar al plásmido recombinante. Los plásmidos son introducidos a una bacteria: usualmente *Escherichia coli*. Una manera sencilla de detectarlos posteriormente en el laboratorio, es haciendo crecer las bacterias en un medio de cultivo con un antibiótico, que permite la selección de las bacterias portando plásmidos recombinantes.

DNA molde en la reacción depende de la fuente utilizada, e idealmente se requieren aproximadamente de 300 nanogramos a 1 microgramo de DNA genómico. En el caso de usarse genes clonados en plásmidos, de 25 a 100 nanogramos de su DNA son más que suficientes.

3) Los oligonucleótidos sintéticos iniciadores. Se deben seleccionar dos oligonucleótidos, que hibriden con regiones del DNA molde y que estén localizados en los extremos de la región de interés. La longitud de los oligonucleótidos es de 15 a 30 nucleótidos y su secuencia debe presentar la mayor similitud posible con la secuencia del DNA blanco, ya que de ello depende el éxito y la especificidad de la amplificación. Se recomienda que la complementariedad entre el oligonucleótido y la secuencia molde sea cercana al 100%, en las últimas 5 a 6 bases del extremo 3' del oligonucleótido, para asegurar la amplificación. Se debe evitar la complementariedad entre los dos oligonucleótidos, para que no se formen dímeros o concatenámeros, además de evitar oligonucleótidos que favorezcan la formación de estructuras secundarias que interfieren con el alineamiento correcto. Idealmente, en cada 100 μ l de reacción, la concentración aceptable de cada oligonucleótido oscila entre 0.05 y 1.0 μ M.

4) Los desoxirribonucleótidos de trifosfato, dNTPs. Las concentraciones mínimas de dNTPs disminuyen el índice de incorporación errónea de los nucleótidos, mientras que concentraciones muy altas disminuyen la especificidad de la reacción, por lo que la concentración debe optimizarse.

Concentraciones entre 20 y 200 μ M proporcionan resultados óptimos, debiéndose igualar la concentración de cada uno de los cuatro dNTPs en concentraciones equimolares.

Contaminación de las reacciones de RCP

Debido a que el RCP puede generar trillones de copias del DNA de la secuencia molde, la contaminación de las reacciones de amplificación con productos de una reacción previa, ya sea con DNA exógeno o con otro

material celular, puede crear problemas tanto en la investigación como en la aplicación diagnóstica.

En general, la atención debe ser muy cuidadosa en el procedimiento del laboratorio; tan es así, que la zona de preparación de la reacción debe estar separada del área de análisis del producto de la reacción y, de esta forma, se minimiza el riesgo de contaminación. Además, se debe tener a la mano un sinnúmero de controles negativos para monitorear y revelar los contaminantes. Se debe prevenir la formación de aerosoles e incluir también un testigo positivo, particularmente en el caso de reacciones con fines diagnósticos.

Análisis del producto de una RCP

Después de la amplificación, al finalizar la reacción, el DNA de interés puede ser colocado en un gel de agarosa (menos de la décima parte del volumen obtenido), realizar el corrimiento electroforético, teñirlo y observar en luz ultravioleta el producto de la RCP.

El análisis fino y la caracterización se realizan empleando metodologías adecuadas para cada caso en particular, como es el análisis electroforético en geles de poliacrilamida, digestiones con enzimas de restricción, hibridación con detectores específicos (genes clonados) o secuenciación nucleotídica, por mencionar sólo algunas.

Aplicaciones de la RCP

- Clonación. En el campo de la biología molecular, el RCP se utiliza para la clonación molecular de genes y su secuenciación nucleotídica. El RCP favorece la clonación si se incorporan regiones de restricción (sitios específicos donde las enzimas endonucleasas de restricción, cortan específicamente el DNA), en los extremos 5', cuando se sintetizan los oligonucleótidos, de tal manera que es posible clonar los fragmentos que se amplifiquen al aprovechar estos sitios de restricción del vector (véase figura 1).

- Análisis y cuantificación de la expresión genética, basado en el estudio de la

cantidad de RNA mensajero (RNAm). En estos casos se requiere de la síntesis de un DNA copia (DNAc), a partir del RNA muestra, por medio de la enzima transcriptasa reversa (enzima replicasa viral que sintetiza DNA a partir del RNAm). Este DNAc se utiliza como molde para amplificar las secuencias de interés al utilizar los oligonucleótidos adecuados.

• Diagnóstico clínico. En este campo, la RCP se usa en la genética médica para el diagnóstico de enfermedades hereditarias y de algunas cromosomopatías comunes; en el campo de la inmunología se emplea para determinar asociaciones entre el complejo mayor de histocompatibilidad y la predisposición genética para el desarrollo de enfermedades autoinmunes; en el campo de la oncología, para probar mutaciones activadoras de oncogenes o supresoras de antioncogenes, para detectar arreglos cromosómicos presentes en procesos neoplásicos y para la detección de virus y de las secuencias oncogénicas.

Entre las enfermedades genéticas en las que la técnica de RCP se ha empleado con éxito, y como apoyo al diagnóstico, debemos mencionar: la fenilcetonuria, debida a mutaciones autosómicas recesivas del gen de la fenilalanina hidrolasa; la fibrosis quística que se presenta como resultado de mutaciones que afectan la función de un canal de cloro; y la distrofia muscular, que resulta de mutaciones en el gen de la distrofina, que se hereda como un rasgo ligado al cromosoma X.

En la microbiología, la RCP se ha utilizado en el diagnóstico rápido y preciso de infecciones producidas por bacterias, hongos y virus, particularmente de aquellos microorganismos difíciles de detectar por análisis microbiológico directo y cultivo. Por ejemplo, en el caso del género *Mycobacteria*, que consiste en un grupo de bacilos ácido-resistentes, los cuales incluyen a patógenos humanos y animales, existen tres especies conocidas como patógenas humanas: *Mycobacterium tuberculosis*, *M bovis*, y *M leprae*. Sin embargo, en las últimas décadas se describieron un número importante de otras especies patógenas oportunistas (*M avium*,

M intracellulare, *M kansaii* y *M simiae*), las cuales pueden causar enfermedad severa cuando las defensas celulares normales están deprimidas temporalmente. El ejemplo más sorprendente es, probablemente, la prevalencia de la infección diseminada por *M avium* en pacientes con SIDA. El establecimiento del diagnóstico definitivo de infección por micobacterias radica en el aislamiento, cultivo e identificación del microorganismo. Debido a su largo periodo de generación, las técnicas de

cultivo requieren de tres-ocho semanas. El diseño y empleo del método de amplificación del DNA ribosomal (DNAr) (secuencias del DNA que codifican para el RNA ribosomal de la subunidad 30S) por la técnica de RCP, proporciona una identificación exacta del microorganismo, por el hecho de que este DNA está muy conservado en las diferentes especies, y es específico del microorganismo a nivel de especie. Así, la identificación puede ser obtenida en sólo dos días.

Actualmente se han diseñado marcadores o detectores que permiten la identificación de parásitos como *Plasmodium* sp, responsable del paludismo; *Leishmania* sp, responsable de la enfermedad de Chagas; y *Tripelosoma* sp, responsable de la tripanosomiasis.

También se ha empleado la técnica de RCP para detectar aquellos microorganismos que son resistentes a los antibióticos y, por ende, los genes responsables de esa resistencia. Ello se ha podido realizar en pus y en otros líquidos corporales, sin que sea necesario aislar y caracterizar al microorganismo. Esta práctica puede ser de gran utilidad en el manejo adecuado de antibióticos a nivel hospitalario.

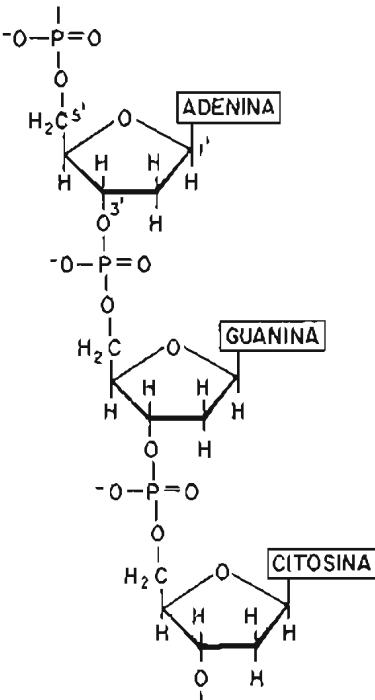


Figura 2. Estructura de la cadena de DNA.

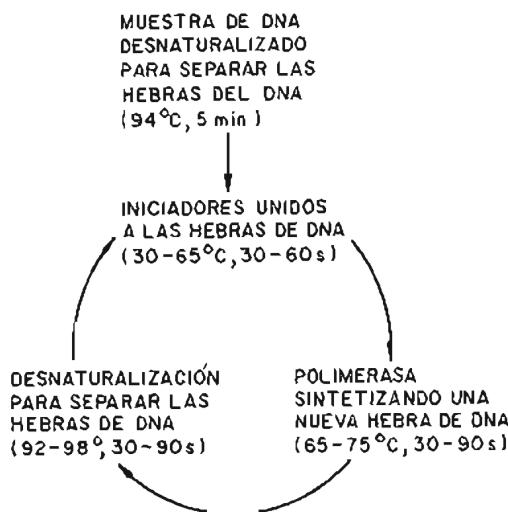


Figura 3. El ciclo de la RCP. La muestra de DNA es calentada para separar las hebras de DNA (desnaturalización inicial), y entonces la mezcla de reacción realiza ciclos repetitivos que incluyen el alineamiento con los iniciadores, síntesis del DNA.

Uno de los campos principales de aplicación de RCP en la detección de agentes patógenos es el desarrollo de métodos rápidos y sensibles para detectar el virus HIV-1, que causa el SIDA. Gracias a que se conoce la secuencia completa del genoma del HIV-1, se utilizan pares de oligonucleótidos para amplificar los fragmentos conservados de las regiones *env* y *gag* de este virus, las cuales codifican para la síntesis de las proteínas que forman las envolturas del virus y que se localizan en los linfocitos humanos. Otro campo de aplicación del RCP es la detección del papiloma-virus del humano, HPV, el cual se asocia con ciertos tipos de cáncer cérvico-uterino.

- La amplificación por RCP también permite la detección de DNA de poco menos de 100 células por 100 gramos de muestra, y es usado en la ingeniería genética de microorganismos y el monitoreo de poblaciones indicadoras y patógenas en suelo, agua y sedimentos. El producto de la RCP puede ser cuantificado, permitiendo la estimación de microorganismos y de ARNm específico en muestras del medio ambiente. Otro uso es la medición de la expresión genética de los microorganismos viables. La RCP es usada para clonar genes, permitiendo la secuenciación

ción de los mismos, aun de aquellos microorganismos ambientales importantes que todavía no han podido ser cultivados.

- Una de las características de la evolución, es la capacidad de cambio en las especies, las que aunque estén cercanas filogenéticamente, pueden tener una variabilidad genética enorme. La RCP contribuye al conocimiento de la variabilidad de grupos de organismos, ya que al diseñar oligonucleótidos adecuados, ésta será evidente en el análisis del resultado de la amplificación. Es posible detectar diferencias tan sólo en una posición y en la secuencia del DNA donde haya ocurrido una sustitución o una delección de bases.

- En el proceso de evolución, la RCP se ha aplicado a estudios de secuencias conservadas del DNA, acelerando la reconstrucción de árboles filogenéticos y se ha convertido en el instrumento más accesible para el análisis de especies en vías de extinción.

La arqueología también ha encontrado una herramienta poderosa en el análisis genético de las muestras biológicas antiguas como, por ejemplo, las provenientes de momias y fósiles en donde se lograron amplificar algunos fragmentos de secuencias del DNA mitocondrial. En este sentido, ha resultado de mucho interés la amplificación de estos fragmentos del DNA a partir de muestras de tejido del mamut siberiano, cuya preservación fue por congelación.

- Uno de los campos más ampliamente estudiados en los últimos años es el que concierne al proyecto "genoma humano", en el cual se ha recurrido al método de RCP para identificar nuevos genes, sus secuencias y mutaciones. A largo plazo este esfuerzo permitirá entender las bases moleculares de muchas enfermedades.

- Aspectos legales. Una de las áreas que más se ha visto enriquecida con la implementación de la RCP, es la medicina legal, donde actualmente se realiza un análisis más veraz de las pruebas de paternidad y de la identificación de individuos a través de la tipificación de regiones cromosómicas con secuencias de DNA altamente variables o polimórficas. El principio de esta aplicación se basa en la variabilidad genética que existe

entre los individuos, además de la gran sensibilidad del método, ya que por medio de él, se amplifican fragmentos a partir de cantidades pequeñas de DNA que se obtienen de los restos del tejido epitelial, sangre seca, seno o cabello. Comparando los patrones que específicamente se obtienen de cada individuo, se puede determinar a quién pertenece esa muestra de DNA. Debido a que este proceso se ha comercializado, su práctica en criminalística es común en diversos países, entre ellos México.

Aspectos éticos

La habilidad para amplificar un segmento específico de DNA en una simple reacción automatizada ha tenido un gran impacto en muchas áreas, como se ha descrito en los párrafos anteriores. Sin embargo, esta metodología ha permitido un acceso incrementando al análisis del DNA, el cual ha sido definido como la "democratización de la secuencia de DNA" o, en otras palabras, como "la práctica de la biología molecular sin un permiso". Esto hace referencia a lo señalado por Chargaff sobre la biología molecular cuando afirma que ésta es por sí misma "la práctica de la bioquímica sin una licencia", lo que sin lugar a dudas plantea un problema ético legal, al que la humanidad en su conjunto se enfrenta.

En los Estados Unidos de Norteamérica, en la Comunidad Económica Europea y, recientemente, en nuestro país, se ha iniciado un debate sobre el uso de esta metodología, sus aplicaciones y sus consecuencias sobre la integridad biológica del ser humano.

Desgraciadamente este debate parece que se desarrolla a un ritmo muy inferior con respecto al acelerado avance en el desarrollo de los reactivos, instrumentos y protocolos de investigación relacionados con la RCP. Aunque, por otra parte, no podemos soslayar que la técnica está permitiendo tanto a investigadores como a aquellos dedicados a la clínica, hacer más accesible la información codificada en las secuencias nucleotídicas y aplicar la reacción en cadena de la polimerasa a la solución de una muy amplia gama de problemas.

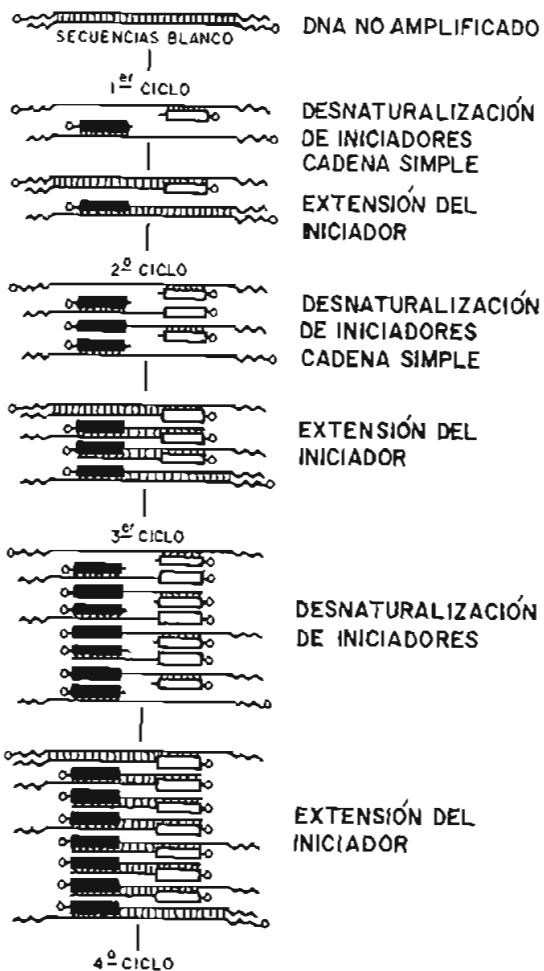


Figura 4. Reacción en cadena de la polimerasa. En la figura se muestran los pasos de la RCP, así como la amplificación resultante de las copias de DNA de la región blanca.

Lecturas recomendadas

Barrera, H.A., Ortiz, R., Rojas, A., y Resendez, D., "Reacción en cadena de la polimerasa. Una nueva época dorada en la biología molecular". *Ciencia y Desarrollo*. 18. (108), 1993, pp. 50-60.

Bloch, W., "A Biochemical Perspective of the Polymerase Chain Reaction". *Biochemistry*. 30. 1991, pp. 2735-2747.

Erlich, H.A., Gelfand, D. y Sninsky, J.J., "Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction". *Science*. 252. 1991, pp. 1643-1651.

Erlich, H.A. y Arnheim, N., "Genetic Analysis using the Polymerase Chain Reaction". *Annual Review of Genetics*. 26. 1992, pp. 479-506.

Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C. y White, T.J. "Diagnostic molecular microbiology: Principles and application". ed. American Society of Microbiology. Washington, D.C., 1993.

Steffan, R.J. y Atlas, R.M., "Polymerase Chain Reaction: Applications in Environmental Microbiology". *Annual Review of Microbiology*. 45. 1991, pp. 137-161.

$$F_x = \Gamma(\lambda + Y_x) \text{ be}$$

new

$$F_{x+1} = \dots$$

$$z \rightarrow \left(\frac{d}{dz} \right) \quad \tilde{F}_{x-1} = \tilde{F}_x,$$

$$\frac{d}{dz} \rightarrow z$$

$$f_n = \alpha z^{n+1} \frac{d}{dz} + (1-\alpha) \frac{d}{dz} z^{n+1}$$

$$\tilde{f}_n = \alpha \left[\left(\frac{d}{dz} \right)^{n+1}, z \right] + (1-\alpha) z \left(\frac{d}{dz} \right)^{n+1} \\ + \frac{1}{z} \left(\frac{d}{dz} \right)$$

$$\tilde{f}_n = \alpha^2 \left[\left(\frac{d}{dz} \right), \left(\frac{d}{dz} \right) \right] \left(\frac{d}{dz} \right)^n + \dots$$

$$\int dx = \int dz + \alpha \left(\frac{d}{dz} \right)^n$$