

Una mirada a la técnica PCR

Proceso que posibilita la obtención masiva de ADN para poder develar sus secretos.

Lo natural y las necesidades

Todas las células de un organismo y también seres unicelulares como las bacterias y las levaduras requieren, en su proceso de reproducción por mitosis (división celular), la duplicación de su ADN, el cual debe ser idéntico en ambas células descendientes. Esto es llevado a cabo por una serie de enzimas, principalmente por la ADNpolimerasa. El tiempo en el cual se produce la multiplicación del material genético puede variar entre algunos minutos en bacterias y hasta aproximadamente 6 a 8 horas en células de mamíferos.

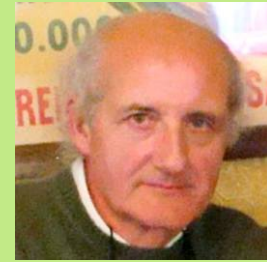
Hasta hace algunos años, una de las limitaciones más importantes en los estudios bioquímicos que involucran al ADN, era la escasa cantidad de muestra, a veces insuficiente para superar los requerimientos de las técnicas disponibles de detección. Ante esta restricción, los investigadores se realizaron las siguientes preguntas: ¿Es posible reproducir el mecanismo de replicación del ADN in vitro, es decir dentro de un tubo de ensayo? ¿En lugar de copiar una sola molécula, se podría amplificar, o sea, obtener del orden de millones de copias idénticas, de al menos la parte de interés de ese ADN y en poco tiempo?

Desarrollo histórico y su aplicabilidad

A partir de 1970, aproximadamente, se iniciaron una serie de experiencias que establecieron las bases de la futura técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés "Polymerase Chain Reaction", que imita la habilidad natural de la célula de duplicar su ADN. Esta técnica fue propuesta en 1986 por el científico estadounidense Kary Mullis, por la cual recibió el premio Nobel de química en 1993. La misma permite obtener in vitro un gran número de copias de una pequeña y única región específica de interés del ADN, que de otra manera no hubiese sido descubierta o no se dispondría de material suficiente para su análisis molecular.

Sus aplicaciones

EN MEDICINA: La técnica PCR tiene múltiples



Autor:

Severino Michelin

Doctor en Química (UBA)
Especialista en Radiobiología
Docente Universitario
(UBA – UNSAM)
Investigador Científico (ARN)

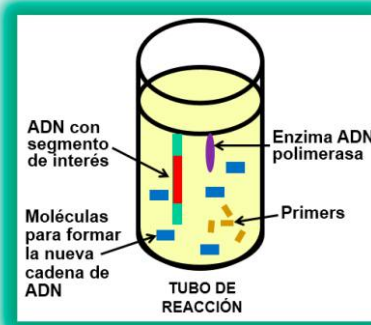


Fig. 1 Tubo de reacción conteniendo los componentes necesarios para realizar la PCR.

utilidades dentro de ésta área, ya que permite realizar estudios genéticos; identificar con una muy alta eficiencia, pequeñas concentraciones de virus o bacterias causantes de enfermedades infecciosas presentes en el individuo, en el agua, en alimentos o en el suelo; detectar el virus VIH, el virus de la Hepatitis C y la familia de Enterovirus; detectar en forma prenatal enfermedades genéticas y trastornos hereditarios; determinar el nivel de remisión en enfermedades oncohematológicas; confirmar la compatibilidad de individuos receptores y donantes de órganos y realizar análisis de paternidad humana y de animales.

EN INVESTIGACIÓN: Se puede enumerar su ayuda en la trazabilidad y autenticación de alimentos como carnes o pescados; la detección de plagas de importancia económica, su origen y desplazamiento a través de los continentes y el estudio del ADN proveniente de especies que han dejado de existir hace millones de años y que se ha preservado en inclusiones de resinas.

EN INVESTIGACIÓN FORENSE: No se puede omitir el importante uso de esta técnica en la identificación de posibles sospechosos en escenarios de crimen a través de rastros dejados por el culpable (sangre, semen, pelos); exonerar personas falsamente acusadas de delitos e identificar cadáveres en catástrofes o crímenes.

Utilidad en estudios radiobiológicos básicos y de radiosensibilidad individual

En el estudio del efecto de las radiaciones ionizantes, la técnica de PCR permitió el análisis de las modificaciones en la estructura de los

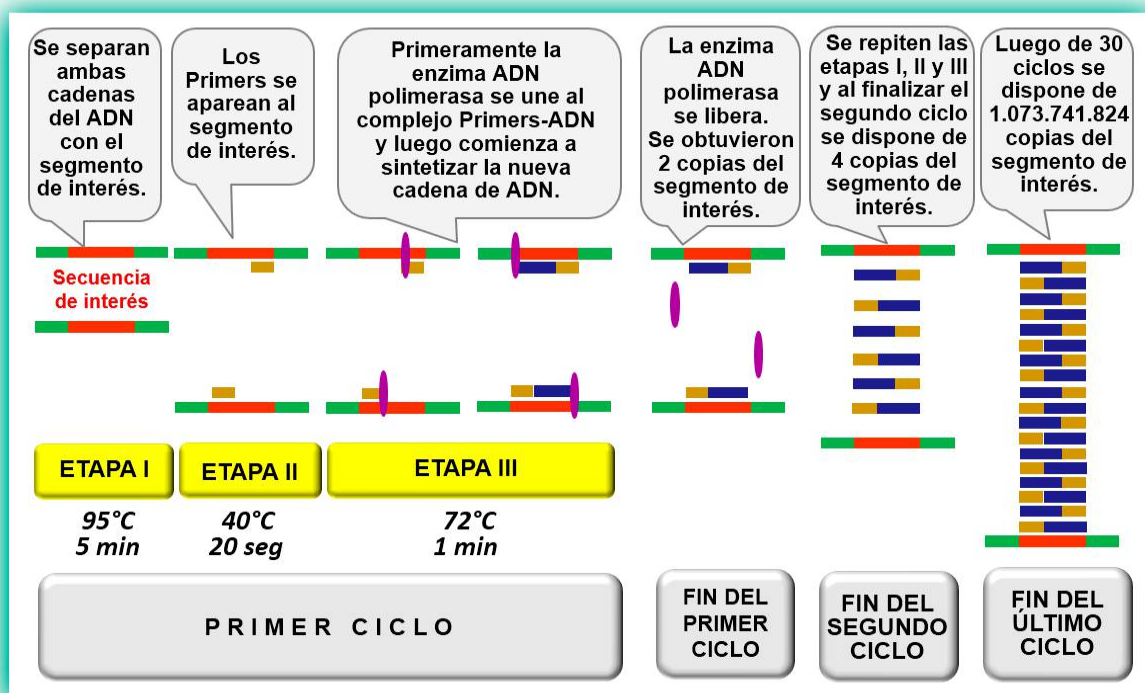


Fig. 2 Representación esquemática de dos ciclos de PCR.

genes y por lo tanto en el comportamiento celular, debido a distintas calidades de radiación, diferentes dosis, tasas de dosis o modalidades de irradiación, ya sea aguda o crónica. Considerando un individuo o una célula aislada, se ha definido la radiosensibilidad como la respuesta de un sistema biológico frente a la radiación. En los seres humanos se comprueba una variación en la frecuencia y severidad de los efectos que pueden presentarse por una exposición a radiaciones ionizantes, fundamentalmente luego de accidentes, radioterapia o por otro tipo de tratamientos que involucre el uso de radiaciones ionizantes. Estas diferencias individuales tienen fundamentalmente asociado un componente genético.

Metodología de desarrollo

En cuanto a su ejecución, es posible realizarla en pocas horas y con un costo relativamente bajo debido a su automatización mediante un aparato llamado termociclador, que está al alcance de numerosos laboratorios públicos y privados.

La técnica de PCR consiste en una serie de 25 a 30 ciclos y cada uno de ellos está constituido por 3 etapas que requieren diferentes temperaturas. En cada ciclo, la primera etapa (desnaturalización) es la separación de las 2 hebras que constituyen la molécula de ADN calentando a 94-95 °C durante aproximadamente 5 minutos. A continuación se disminuye la temperatura

hasta 40-50 °C durante 20-40 segundos (según el caso), permitiendo así el alineamiento y apareamiento de una secuencia de ADN construida especialmente y denominada "primer", que se unirá al ADN que sirve como molde. Finalmente, durante la fase de elongación, la mezcla se calienta a 72 °C y la enzima ADN polimerasa comienza el proceso de extensión del "primer" durante aproximadamente un minuto, constituyendo el tercer paso y la finalización del primer ciclo. Al finalizar cada ciclo, la cantidad de ADN disponible para el ciclo siguiente aumenta al doble. Si se realizaran 31 ciclos se obtendrían 2.147.483.648 fragmentos del ADN de interés.

En la Fig. 1 se ejemplifican todos los componentes de la reacción en una solución contenida en el tubo de reacción y en la Fig. 2 se esquematiza el procedimiento de amplificación para dos ciclos.

Conclusión

Esta técnica, junto a otras que la precedieron como el aislamiento y purificación del ADN en 1944 y la utilización de ADN circular presente en bacterias para estudios de ingeniería genética a comienzos de 1970, contribuyeron a grandes avances en el conocimiento teórico de los procesos bioquímicos.

ABREVIATURAS

ARN: Autoridad Regulatoria Nuclear.

UBA: Universidad Nacional de Buenos Aires.

UNSAM: Universidad Nacional de San Martín.

Publicación a cargo del Dr. Daniel Pasquevich y la Lic. Stella Maris Spurio.
Comité Asesor: Ing. Hugo Luis Corso - Ing. José Luis Aprea.
Responsable Científico: Dr. Gustavo Durfó.
Versión digital en www.cnea.gov.ar/ieds
Los contenidos de este fascículo son de responsabilidad exclusiva del autor.



Instituto de Energía y Desarrollo Sustentable
Comisión Nacional de Energía Atómica

Tel: 011-4704-1485 www.cnea.gov.ar/ieds

Av. del Libertador 8250 (C1429BNP) C. A. de Buenos Aires - República Argentina

Año de edición: 2017 ISBN: 978-987-1323-12-8