

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

**Principios básicos de la manipulación
genética. INGENIERÍA GENÉTICA**

Programa de Formación del Profesorado
UNED

Mayo de 2000

Índice

1. Introducción
2. Reacción de PCR estándar: descripción
3. Ventajas y desventajas de la PCR como método de clonación
 - Principales ventajas de la reacción
 - Principales desventajas de la reacción
4. Aplicaciones de la PCR
 - Construcción de bibliotecas de ADNc
 - Amplificación de moléculas de ARNm previo paso a ADNc
 - Clonación de secuencias desconocidas de ADN que flanquean una región ya conocida
 - 4.3 Secuenciación del ADN y obtención de sondas para hibridaciones
 - 4.4 Investigaciones forenses
 - 4.4.1 Marcadores polimórficos: técnica del oligonucleótido alelo-específico
 - Sistema Amplitype para la detección de alelos DQ alfa
 - Caso práctico
 - 4.4.2 Huella del ADN
 - Estudio del primer caso real investigado por huella genética
 - Análisis de ADN en dos casos de agresión sexual
 - Sondas unilocus
 - Amplificación de minisatélites y microsatélites por PCR
 - 4.5 Identificación de pescados mediante PCR
 - 4.5.1 Técnicas de PCR empleadas en la identificación de especies de pescado
 - PCR secuenciación
 - PCR - RFLP
 - 4.6 Diagnóstico médico por PCR
5. Bibliografía

1. Introducción

Dos son las estrategias básicas que se aplican para estudiar una secuencia específica de ADN: *la clonación del ADN y la hibridación molecular*. En la **clonación del ADN**, el fragmento buscado se amplifica y purifica con el fin de estudiar su estructura y su función. Con la **hibridación molecular**, lo que se pretende, no es amplificar la secuencia en cuestión, sino detectar el fragmento de interés dentro de una mezcla compleja de muchas secuencias diferentes; con este sistema se puede determinar la posición en el cromosoma, y también alguna información respecto de su estructura.

La amplificación que tiene lugar durante la clonación del ADN se basa en un aumento del número de copias de las secuencias de ADN seleccionadas. En la práctica esto comporta varias rondas de replicación catalizadas siempre por una *ADN polimerasa*. La amplificación puede tener lugar en el interior de células o en sistemas libres de células.

- **Clonación del ADN en células:** es un método de clonación de ADN *in vivo*, cuyo primer paso consiste en unir *in vitro* fragmentos de ADN de procedencia muy diversa con secuencias de ADN capaces de replicarse de manera autónoma. Los fragmentos así obtenidos son posteriormente transferidos a células huéspedes conocidas para obtener un número elevado de copias idénticas a la original.
- **Clonación del ADN en sistemas libres de células:** La **PCR** (del inglés *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa) es una forma de clonación del ADN, puramente enzimática que se realiza totalmente *in vitro*. Representa uno de los avances más importantes y actuales de la historia de la biotecnología.

Hasta mediados de los años 80 la única estrategia posible para aislar un gen y disponer de grandes cantidades para su análisis era el clonado celular. En 1986, Kary B. Mullis descubrió la PCR, técnica que permite sintetizar grandes cantidades de ADN *in vitro* de una manera simple y elegante basándose en el procedimiento de replicación del ADN que la célula emplea *in vivo*. El descubrimiento le valió a Mullis el Premio Nóbel en 1993.

La PCR ha sustituido en gran medida la amplificación de fragmentos por clonación en células y tiene numerosísimas aplicaciones en diversos aspectos de la biología molecular. Es una técnica fundamental e imprescindible en ingeniería genética.

La clonación en células y la reacción en cadena de la polimerasa si bien son dos métodos distintos de amplificación de secuencias suelen complementarse. Frecuentemente se pasa de la clonación celular a la PCR y viceversa; así por ejemplo, se puede clonar en M13 un producto amplificado por PCR para secuenciarlo, o amplificar un gen clonado en un sistema celular para cambiarle por ejemplo las dianas de restricción de los extremos y poderlo clonar en otro vector.

La tecnología de la PCR está siendo aplicada en numerosos campos de investigación: gracias a esta técnica se pueden detectar enfermedades víricas, o tomar unas cuantas células fetales de la sangre de una mujer embarazada y realizar un análisis genético. La técnica está siendo ampliamente utilizada en medicina forense para aumentar pequeñas muestras, por ejemplo, de la saliva en el reverso de un sello de correos, y construir huellas de ADN que permitan esclarecer delitos. Los historiadores pueden emplear la técnica para estudiar la evolución, o las enfermedades de épocas pasadas, utilizando fragmentos de ADN de momias u otros restos. Los inspectores de sanidad pueden tomar muestras de hamburguesas, por ejemplo, y descubrir con qué carne fueron hechas, o averiguar a partir de una gota de vino la variedad exacta de uva de la que procede.

2. Reacción de la PCR estándar: descripción

La PCR es un método rápido de amplificación *in vitro* de secuencias de ADN específicas dentro de una muestra. Habitualmente la reacción se diseña para permitir la amplificación *selectiva* de una o varias secuencias diana de ADN presente en una mezcla compleja de secuencias (por ejemplo ADN genómico total). Para que la amplificación sea posible es absolutamente necesario disponer de un mínimo de información sobre la secuencia a amplificar. Esta información permite la construcción de dos oligonucleótidos (oligos), habitualmente de 15 a 30 nucleótidos de longitud, complementarios de los extremos 3' de la secuencia diana, que actuarán como **cebadores** (iniciadores, en inglés *primers*) en la reacción.

Cuando se mezclan con ADN genómico desnaturalizado, los cebadores se unen específicamente a las secuencias complementarias de la región genómica que se quiere amplificar, quedando sus extremos 3' OH enfrentados. Los oligos están diseñados para que puedan iniciar la reacción de síntesis de ADN en presencia de una *ADN polimerasa* termoestable adecuada y de los precursores de ADN (los cuatro desoxinucleótidos trifosfato, dATP, dCTP, dGTP y dTTP). Cada oligo servirá para iniciar la síntesis de una hebra de ADN complementaria a una de las hebras del segmento de la diana, y las dos hebras de nueva síntesis serán complementarias entre sí.

La PCR es una reacción en cadena porque las hebras de ADN de nueva síntesis sirven a su vez de molde para reacciones de síntesis en ciclos posteriores. Tras unos 30 ciclos, la PCR habrá generado aproximadamente un millón de copias de la secuencia diana específica.

Una vez amplificado el ADN se dispone ya de cantidad suficiente como para que este pueda ser caracterizado. Como en otros sistemas, se puede utilizar el método de Southern, con digestión enzimática y análisis de los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio y detectarlos como bandas discretas de un tamaño específico; o bien, detectar directamente una cierta secuencia en el producto de amplificación si se cuenta con sondas adecuadas.

Se utiliza una *ADN polimerasa* termoestable debido a que la reacción pasa por ciclos en los que se cambia la temperatura, de esta manera se evita añadir la enzima manualmente en cada ciclo.

Cada uno de los ciclos consta de las tres etapas siguientes:

- i) *Desnaturalización del ADN bicatenario presente en la muestra*: típicamente calentando la muestra a 93-95°C, durante unos 30 segundos, se consigue la separación de la doble hélice en dos cadenas sencillas por rotura de los enlaces de hidrógeno y consiguiente desapareamiento de las bases complementarias.
- ii) *Unión específica de los cebadores a las cadenas sencillas mediante complementariedad de bases*: a temperaturas que varían entre 50 y 70 °C, dependiendo de la T_m (temperatura de fusión) del duplex esperado y durante un tiempo aproximado de unos 20 segundos, cada uno de los *primers* se une a una cadena diferente delimitando la secuencia diana que se pretende amplificar.
- iii) *Síntesis de ADN*: típicamente a 70-75 °C, comienza a funcionar la replicación incorporando nucleótidos sobre los *primers* y haciendo una copia completa y exacta de la cadena molde.

Algunos microorganismos cuyo hábitat natural son las fuentes hidrotermales han servido como base para la purificación de ADN polimerasas termoestables. Por ejemplo, una de las enzimas más utilizadas, la *Taq polimerasa*, proviene de la bacteria *Thermus aquaticus*. Esta enzima es estable hasta 95 °C, y su temperatura de trabajo óptima es de 80 °C, requiere magnesio y carece de actividad correctora de errores (exonucleásica 3'→5'), por lo que puede introducir aproximadamente un nucleótido equivocado por cada 1.000 colocados a concentraciones altas de magnesio y uno por cada 1.000.000 colocados, en otras condiciones. Este índice de error no suele presentar problemas en la mayoría de las aplicaciones, pero ha de tenerse en cuenta y la magnitud puede ser importante si ocurre en las primeras rondas de replicación. Otras polimerasas, como la obtenida de *Pyrococcus furiosus* (Pfu) o la aislada de la bacteria *Thermococcus litoralis* (Vent), incorporan errores con una frecuencia mucho más baja y pueden copiar fragmentos de mayor longitud que la *Taq*.

Para que la especificidad sea máxima, se debe evitar que la polimerasa y el resto de componentes estén a temperatura ambiente antes de iniciar el primer ciclo. La polimerasa puede añadirse una vez que se ha producido la primera desnaturalización del ADN o incluso mejor, para no tener que manipular los tubos una vez iniciado el proceso, se pueden añadir anticuerpos anti-*Taq*, que inhibirán la actividad de la polimerasa hasta que se desnaturalicen por calor.

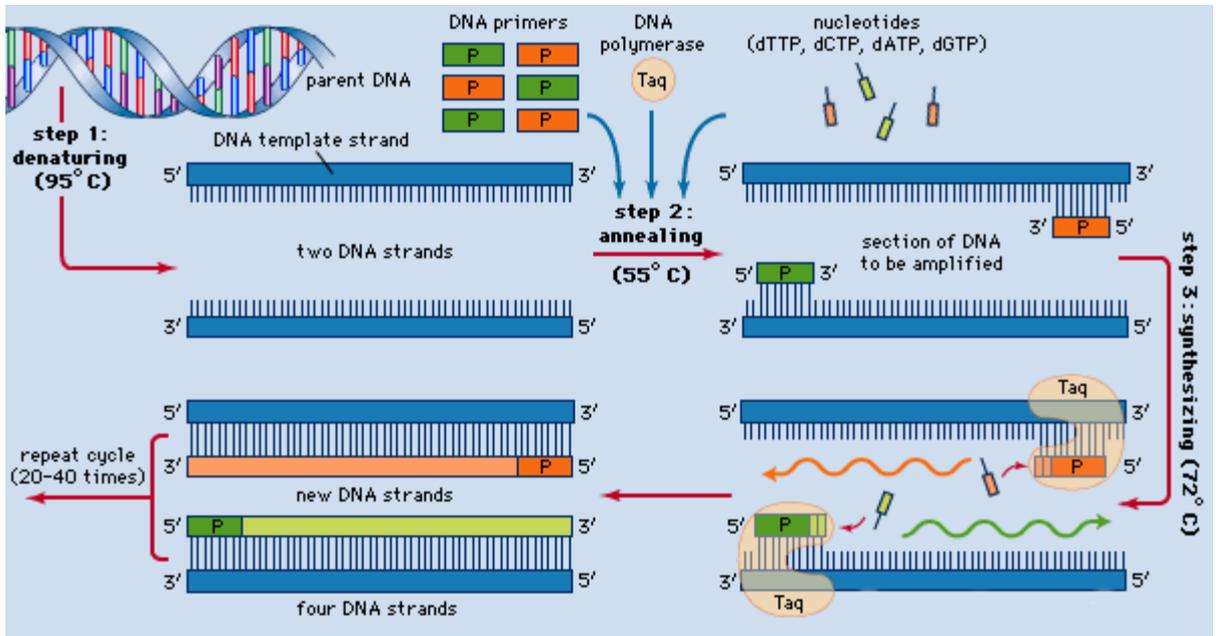


Figura 1

La PCR es un método de amplificación de secuencias de ADN in vitro, que utiliza oligonucleótidos de secuencia definida como cebadores de la reacción. Un ciclo de amplificación comprende tres pasos. La cadena de dos hebras se disocia: se separan cada una de las hebras a 95 °C. La unión de los primers a cada una de las cadenas simples se realiza a menos temperatura. La polimerasa extiende los primers a partir del molde.

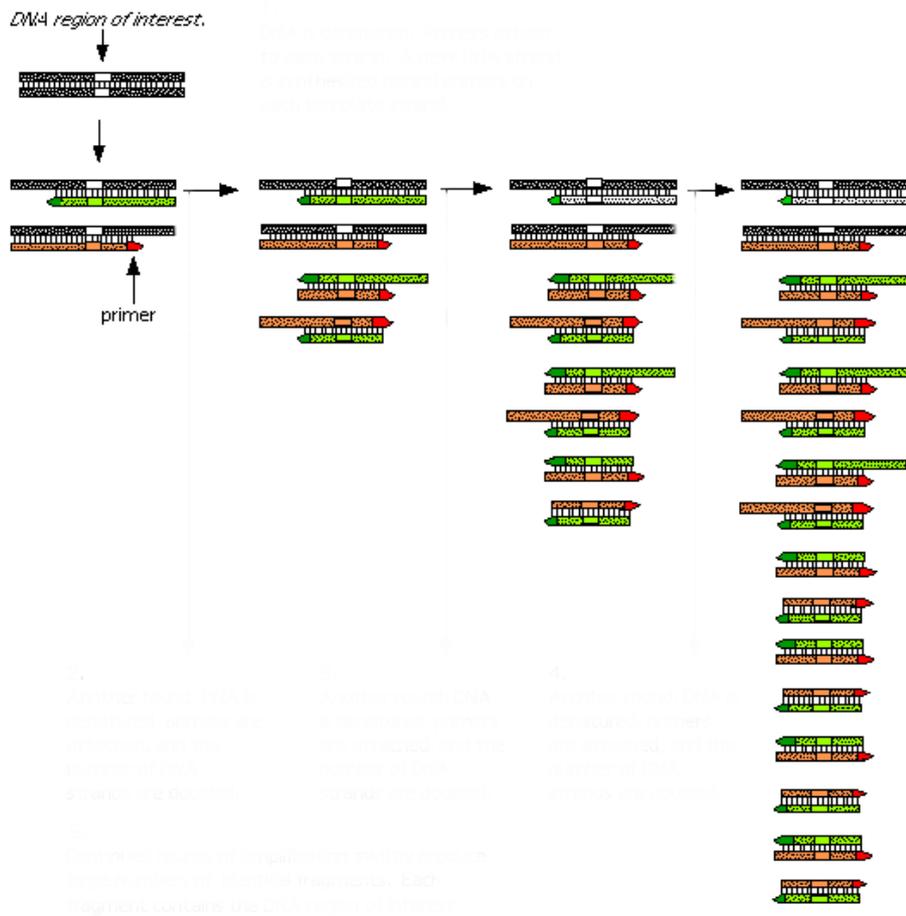


Figura 2

La figura representa 4 ciclos de PCR. Después de cada ciclo se obtiene como resultado la duplicación de la secuencia de ADN delimitada por la pareja de cebadores. Dado que las nuevas copias también sirven como patrones en las subsiguientes etapas, al final de n ciclos, el número de copias de ADN por cada molécula serán de 2^n .

3. Ventajas y desventajas de la PCR como método de clonación

3.1 Principales ventajas de la reacción

I. Rapidez y sencillez de uso.

La PCR permite clonar ADN en pocas horas, utilizando equipos relativamente poco sofisticados. Una reacción de PCR típica consiste en 30 ciclos de desnaturalización, síntesis y reasociación. Cada ciclo dura típicamente de 3 a 5 minutos y se utiliza un *termociclador* que lleva un microprocesador para programar los cambios de temperaturas y el número de ciclos deseado. Esto supera ampliamente el tiempo requerido para la clonación en células, que suele ser de semanas, o incluso meses. Por supuesto, el diseño y síntesis de los oligonucleótidos cebadores también lleva tiempo, pero este proceso ha sido simplificado gracias a la aparición de programas informáticos para el diseño de los cebadores, y a la proliferación de casas comerciales especializadas en la síntesis de oligonucleótidos por encargo. Una vez que se pone a punto, la reacción puede ser repetida de forma sencilla.

II. Sensibilidad.

La PCR puede amplificar secuencias a partir de cantidades ínfimas de ADN diana, incluso a partir de ADN contenido en una sola célula. Esta elevada sensibilidad ha permitido el desarrollo de nuevos métodos para el estudio de la patogénesis molecular y la aparición de numerosas aplicaciones (ciencia forense, diagnóstico, estudios de paleontología molecular, etc) donde las muestras pueden contener muy pocas células. Sin embargo, el hecho de que el método tenga una sensibilidad tan elevada significa también que se deben extremar las precauciones para evitar la contaminación de la muestra con ADN extraño.

III. Robustez.

La PCR permite la amplificación de secuencias específicas de material que contiene ADN muy degradado, o incluido en un medio que hace problemática su purificación convencional. Esto hace que el método resulte muy adecuado para estudios de antropología y paleontología molecular, por ejemplo para el análisis de ADN recuperado de individuos momificados y para intentar identificar ADN de muestras fósiles que contienen poquísimas células de criaturas extintas hace ya mucho tiempo. El método se ha empleado con éxito también para la amplificación de ADN de muestras de tejidos fijadas con formol, lo cual ha tenido importantes aplicaciones en patología molecular.

3.2 Principales desventajas de la reacción

I. Necesidad de disponer de información sobre la secuencia del ADN diana

Para poder construir oligonucleótidos específicos que actúen como cebadores para la amplificación selectiva de una secuencia particular de ADN se necesita disponer de alguna información previa sobre la propia secuencia a amplificar. Esto implica, por regla general, que la región de interés ya haya sido parcialmente caracterizada, a menudo mediante la aplicación de métodos de clonación basados en sistemas celulares. Sin embargo, y para casos concretos, se han desarrollado varias técnicas que reducen o incluso hacen desaparecer esta necesidad de disponer de información previa sobre la secuencia del ADN diana.

II. Tamaño corto de los productos de la PCR

Una desventaja clara de la PCR como método de clonación de ADN ha sido el tamaño de las secuencias de ADN que permite clonar. A diferencia de la clonación de ADN en células, donde pueden clonarse secuencias de hasta 2 Mb, la información de que se dispone sobre la mayor parte de secuencias clonadas por PCR sitúa el tamaño de los fragmentos clonados entre 0 y 5 Kb, tendiendo hacia el extremo inferior. Los fragmentos pequeños se amplifican muy fácilmente, pero conforme aumenta su tamaño se hace más difícil obtener una amplificación eficiente. En la actualidad sin embargo ya es posible amplificar secuencias por PCR de tamaños entre 20 y 40 Kb.

III. Infidelidad en la replicación del ADN

La clonación del ADN en células pasa por la replicación del ADN *in vivo*, proceso asociado a una gran fidelidad de copiado debido a la existencia, en la célula, de mecanismos de lectura y corrección de errores. Sin embargo, cuando el ADN se replica *in vitro* la tasa de errores cometidos durante el copiado se dispara. Ya se ha comentado anteriormente que la Taq polimerasa utilizada en la reacción no tiene actividad exonucleásica.

IV. Peligro de contaminación

La facilidad con que se amplifica el ADN exige evitar el peligro de contaminación inherente al poder multiplicador de la reacción. En un tubo en el que se ha realizado una reacción de PCR hay tal cantidad de ADN, que al salir caliente del termociclador y abrir este, el vapor alcanza el ambiente del laboratorio. *"Si se pasa un papel de filtro por los pomos de las puertas, o la superficie del termociclador, se puede rescatar suficiente ADN como para obtener una señal"*.

4. Aplicaciones de la PCR

Construcción de bibliotecas de ADNc

Una biblioteca de ADNc es el conjunto de clones obtenidos a partir de los ARNm de un tejido determinado de un organismo completo.

El ADNc se sintetiza a partir de un mensajero y un cebador por acción de la *transcriptasa inversa*.

Los clones de ADNc tienen una utilidad especial, ya que al proceder de los mensajeros correspondientes, carecen de intrones. Los procariontes carecen de intrones en sus mensajeros y por eso no son capaces de procesar los ARNm eucarióticos correctamente. Si lo que se pretende es expresar un gen eucariota en un sistema procariontico, se deberá clonar a partir de su ADNc y no de su secuencia genómica.

La mayoría de los genes eucarióticos clonados han sido aislados a partir de bibliotecas de ADNc. La elaboración de una biblioteca de ADNc implica el aislamiento de la población total de mensajeros celulares y su transcripción revertida a ADN.

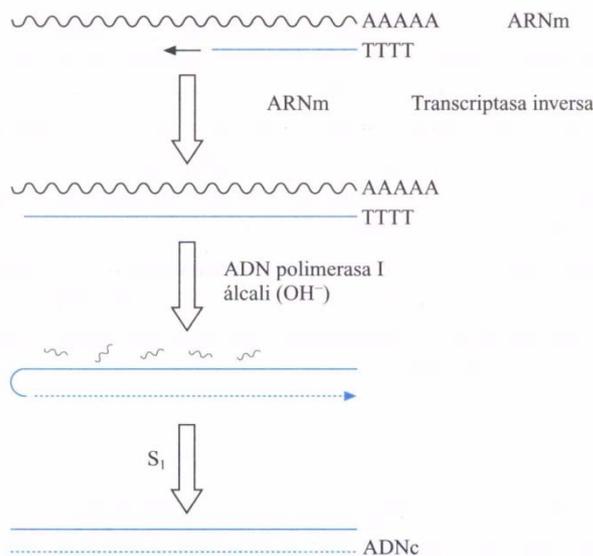


Figura 3

Modo de acción de la transcriptasa inversa en el proceso de construcción de una biblioteca de ADNc.

- La transcriptasa inversa utiliza el ARNm como molde para sintetizar una hebra de ADN complementaria utilizando como cebador una cola de oligo-dT
- La misma polimerasa (gracias a su actividad ARNasa) destruye la hebra de ARNm molde y forma una especie de "gancho" dejando un extremo 3' OH libre. El gancho servirá de cebador a la ADN polimerasa I para sintetizar la segunda cadena del ADNc y posteriormente se eliminará por la acción de la nucleasa S1 que corta específicamente cadenas sencillas del ADN.
- El ADNc así obtenido será convenientemente tratado para ser incorporado a un vector y ser clonado *in vivo* para obtener una biblioteca de ADNc.

4.4.1 Amplificación de moléculas de ARNm previo paso a ADNc

En la mayoría de los casos en que se amplifican moléculas de ARNm es necesario partir de un sistema rico en este. Cuando el mensajero que se va a clonar es abundante no es necesario su enriquecimiento previo, pero cuando no lo es hay que proceder al enriquecimiento ya sea de una forma natural o artificial.

Un enriquecimiento natural lo presentan las células de tejidos especializados o tumores concretos; por ejemplo, las células del páncreas o los insulinomas representarían un sistema de enriquecimiento para aislar el gen que codifica la insulina.

Una *reacción en cadena de la polimerasa* puede amplificar **artificialmente** alguno de los mensajeros previo paso a ADNc facilitando así su posterior clonaje. Uno de los métodos consiste en poner las dos polimerasas, la transcriptasa inversa y una ADN polimerasa termoresistente desde el comienzo en el mismo tubo de reacción, junto con los cebadores de ambos extremos, desoxinucleótidos y sulfato de magnesio. En un principio, durante unos 45 minutos y a 48 °C se sintetiza la primera hebra del ADNc, copia del ARNm; a continuación se sube la temperatura a 94 °C durante unos 2 minutos, con lo que se desnaturaliza el molde, las hebras se separan, sintetizándose seguidamente la segunda hebra del ADNc y las múltiples copias de ambas hebras (una de las cuales es ARNm) durante 40 ciclos.

4.2. Clonación de secuencias desconocidas de ADN que flanquean una región conocida.

Una de las limitaciones con la que se encuentra la reacción de la PCR estándar es que amplifica secuencias de ADN comprendidas entre dos *cebadores convergentes*, es decir, cada uno de ellos inicia la síntesis del ADN en la dirección del otro (extremos 3' OH enfrentados). Muchas veces puede interesar conocer qué tipo de secuencias de ADN no caracterizadas ocupan la región adyacente externa a una región conocida (por ejemplo, conocer la región reguladora flanqueante de un gen de secuencia ya conocida). Una variante de la técnica estándar, la **PCR inversa**, lo permite.

El método se basa en el empleo de *cebadores divergentes*, es decir, cebadores cuyos extremos 3' OH se dirijan hacia el exterior de la secuencia conocida. Con cebadores de este tipo, una reacción PCR estándar no funciona. En la PCR inversa, se trata el ADN con una enzima de restricción de forma que la región deseada quede comprendida en un pequeño fragmento de restricción, al que se permite la circularización por complementariedad de los extremos cohesivos. Una vez circularizado el fragmento, se procede a una reacción de PCR estándar utilizando los cebadores divergentes, que ahora sí permiten que se desarrolle la reacción.

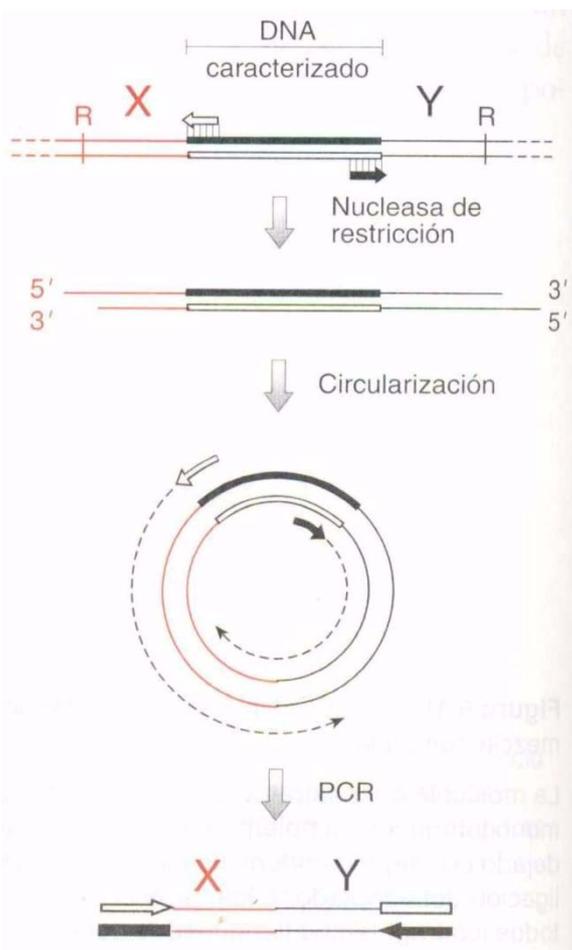


Figura 4
Clonación de secuencias de ADN flanqueantes a partir de un molde circularizado.

Las regiones X e Y representan las secuencias desconocidas que se desea clonar. Los cebadores se diseñan de forma que se unan a la secuencia de ADN caracterizada, pero con sus extremos 3' orientados en sentidos opuestos. Tras la recuperación de la secuencia caracterizada y de sus regiones flanqueantes en forma de un fragmento de restricción, se circulariza la molécula, de manera que las secuencias flanqueantes quedan en contacto y los extremos 3' de los cebadores quedan orientados para que pueda tener lugar ahora la PCR estándar.

4.3 Secuenciación del ADN y obtención de sondas para hibridaciones

El método de secuenciación de ADN requiere que el ADN esté en forma de cadena simple antes de su utilización. Pese a que la desnaturalización del ADN de los productos de PCR puede proporcionar los sustratos monocatenarios necesarios para la secuenciación, la calidad de la secuencia de ADN aumenta si el producto de partida es monocatenario en origen.

La **PCR asimétrica** es una variante de la PCR estándar que permite generar un gran número de moléculas de ADN de banda simple que se pueden utilizar directamente para secuenciar o como sondas para hibridaciones.

El método consiste en poner proporciones diferentes de cebadores de manera que uno de los dos esté a concentración limitante. Así, hasta los primeros 20 a 25 ciclos se amplifican las dos hebras del ADN, pero al agotarse uno de los cebadores, los 5 a 10 ciclos siguientes serán de ADN de banda simple. La concentración de uno de los cebadores suele fijarse en 100 veces la concentración del otro; utilizando, por ejemplo, una relación de 50 picomoles de un cebador y 0,5 del otro, se obtiene después de 30 ciclos, de 1 a 3 picomoles de ADN de banda simple.

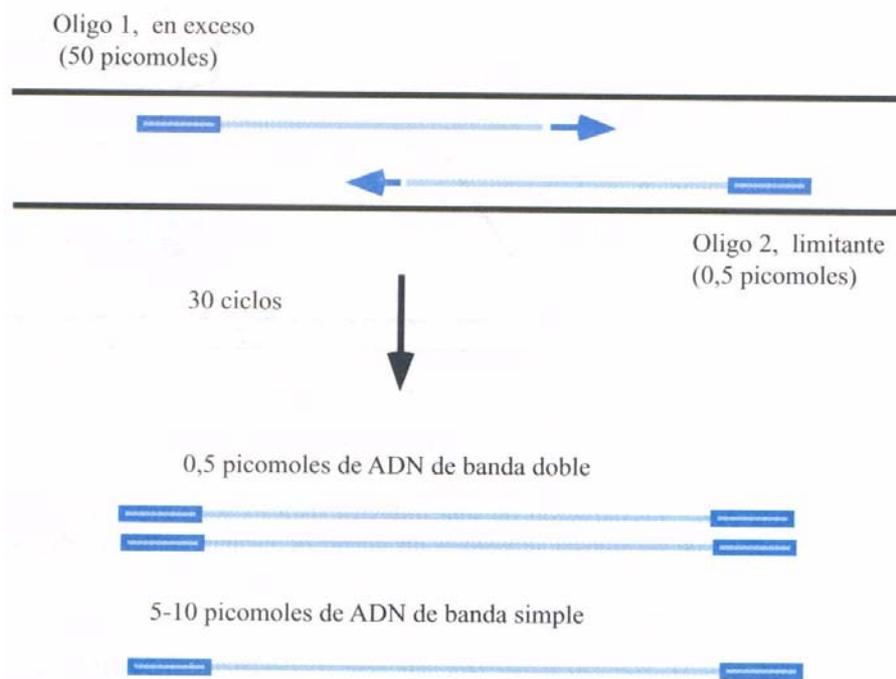


Figura 5
Esquema del procedimiento empleado en la PCR asimétrica para generar ADN de banda simple

4.4 Investigaciones forenses

La PCR resulta ser una herramienta muy poderosa para las aplicaciones forenses ya que las muestras que se requieren para los análisis son minúsculas.

Cada vez con mayor frecuencia se caracterizan muestras forenses a nivel de ADN con el fin de inculpar o exculpar a un sospechoso. Cualquier resto biológico - sangre, semen, saliva, orina, pelos, piel, huesos - puede servir para el análisis. De 2 μ l de sangre, menos de uno de semen, 20 de saliva, o de un pelo arrancado de raíz, se puede extraer suficiente ADN (50 nanogramos) para amplificarlo por PCR y caracterizarlo. Inclusive muestras de ADN degradado, con sólo algunas secuencias maltrechas de nucleótidos, pueden ser amplificadas por PCR.

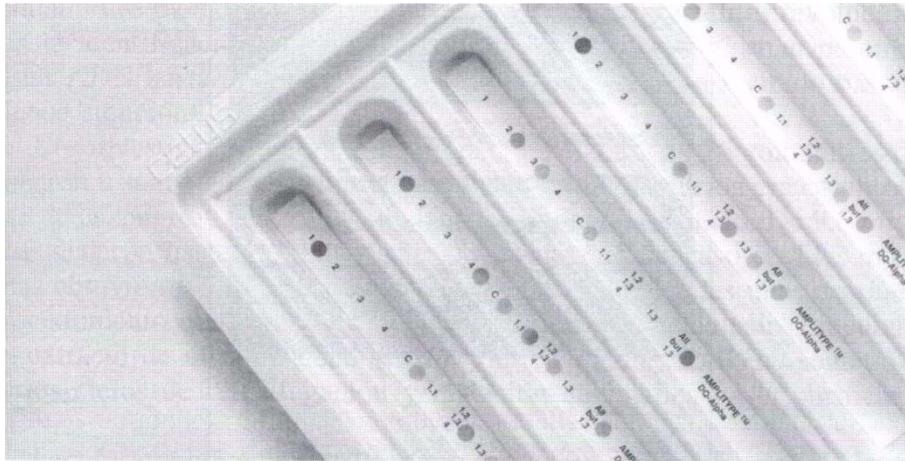
La técnica del oligonucleótido alelo-específico (ASO) para detectar polimorfismos en secuencias y la elaboración de la huella genética del individuo, son dos de los métodos que pueden utilizarse para caracterizar la muestra.

4.4.1 Marcadores polimórficos: Técnica del oligonucleótido alelo-específico (ASO)

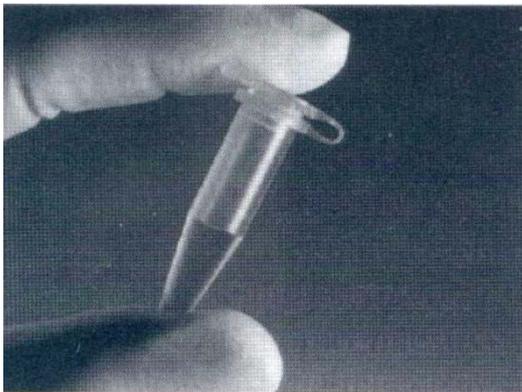
Las regiones polimórficas del genoma son las más adecuadas para estudios forenses. Si bien la PCR amplifica cualquier secuencia de ADN, no todos los loci hipervariables se prestan para la investigación forense. Una secuencia que sea común al 99 por 100 de la población no es informativa para identificar individuos. A parte de regiones muy variables, se escogen también locus que se hereden independientemente, uno de cada progenitor. Otra condición pide un modo de operación sencillo y fiable porque se persigue un resultado reproducible.

Entre las regiones polimórficas del genoma humano, varios loci susceptibles a la amplificación por PCR cumplen los requisitos para la identificación individual. Una de las regiones del genoma humano más utilizada es la *DQ alfa*. Si se amplifica por PCR rinde un producto de 242 pares de bases. Se han identificado 8 alelos denominados: 1.1, 1.2, 1.3, 2, 3, 4.1, 4.2 i 4.3. La identificación individual depende de reconocer el genotipo personal según las combinaciones de estos 8 alelos. En la práctica, esto se consigue exponiendo el producto de amplificación a **sondas alelo específicas (ASO)**, que son secuencias de 15 a 30 nucleótidos, que sólo hibridan con secuencias exactamente complementarias, por lo que se necesita una sonda ASO distinta para cada alelo de un locus particular. Las distintas sondas alelo específicas se fijan a un soporte de nailon en puntos concretos y el filtro se hibrida con las muestras forenses amplificadas y marcadas. Existen compañías biomédicas que venden tiras de nailon con las distintas sondas ya fijadas y listas para la detección de los alelos específicos de un individuo. Las regiones hipervariables del ADN procedente de las muestras forenses (víctimas, sospechosos, material biológico del agresor, etc) se amplifican con cebadores biotinados, así, durante la hibridación se puede añadir a la mezcla un complejo, la *estreptacidina-peroxidasa*, de gran afinidad por la biotina, que en presencia del sustrato *tetrametilbenzidina* origina un cambio de coloración, evitando así el uso de radiactividad.

Sistema Amplitype para la detección de alelos DQ alfa:



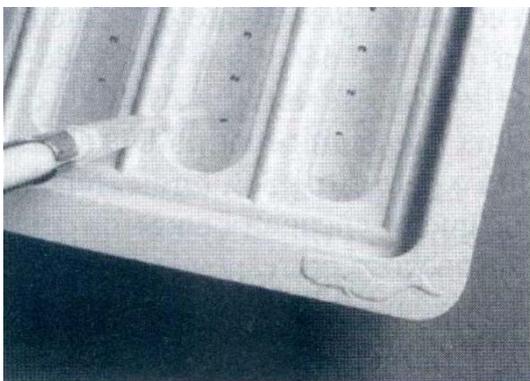
Consiste en un "kit " comercial con los reactivos necesarios para ampliar ADN y detectar los alelos del locus DQ alfa mediante sondas especiales (ASO). En la foto se muestra la bandeja que lleva lunares correspondientes a diferentes alelos DQ alfa



1) El ADN extraído se mezcla en un pequeño tubo de ensayo con los reactivos.



2) El tubo se coloca en un termociclador. Se obtiene un producto de amplificación.



3) Cada producto de amplificación de cada una de las muestras de ADN se aplica sobre una tira Amplitype marcada con un número para distinguir de qué espécimen se trata.



4) Se utiliza una tira para cada muestra. Se producirá una reacción de cambio de color en uno u otro de los lunares, según los alelos que lleve cada muestra.

Caso práctico

En la figura 6 se muestra la identificación de un individuo mediante la técnica ASO como autor de un homicidio con violación. Para ello, se analizan muestras procedentes del escenario del crimen. Se intenta determinar si el pelo encontrado en la ropa de la víctima procede de uno de los sospechosos. Se toman cuatro muestras de ADN: sangre de la víctima, pelo encontrado en la víctima, sangre del sospechoso 1 y sangre del sospechoso 2. Se amplifican por PCR y luego se depositan en las tiras de papel. Las tiras llevan lunares correspondientes a los diferentes alelos.

El genotipo de la víctima resulta ser 1.1, 3; el pelo encontrado en la víctima arroja un genotipo 1.3, 4; en la sangre del sospechoso 1 se identifica el genotipo 1.2, 4 y en la del sospechoso 2 el 1.3, 4. El haplotipo del segundo sospechoso coincide con el del pelo encontrado sobre la víctima. La prueba no excluye al sujeto como origen de esas pruebas.

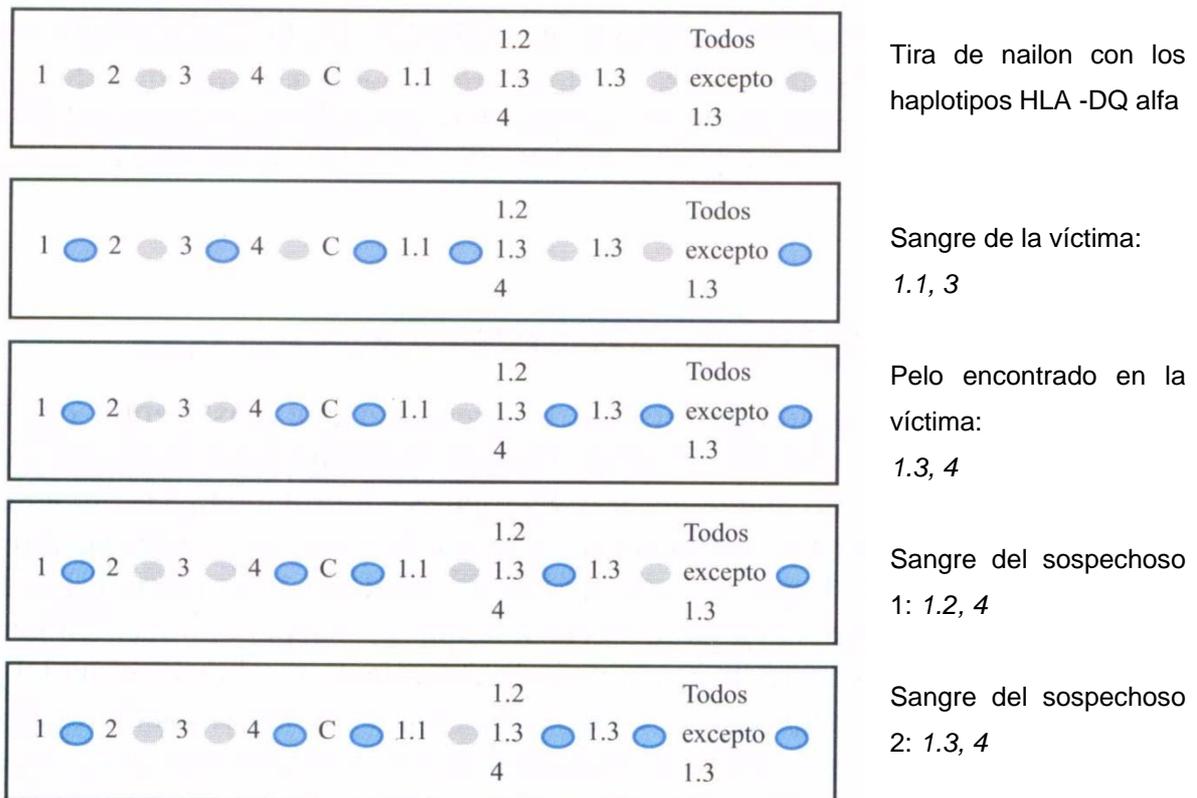


Figura 6
Tiras de nailon con las sondas alelo específicas para el locus HLA-DQ-alfa y resultados de un análisis forense para identificar un sospechoso de asesinato.

4.4.2 Huella del ADN

Las secuencias del genoma humano que se estudian para obtener la *huella genética* de un individuo corresponden a regiones altamente variables del genoma, caracterizadas normalmente por ser ADN no codificante, es decir sin información para la elaboración de proteínas o ARN. Estas regiones no codificantes tienen un margen de variación más amplio que las regiones codificantes ya que las mutaciones que han sufrido a lo largo de la evolución no han sido cribadas por la selección natural y por ello, constituyen regiones hipervariables del genoma.

Las regiones hipervariables del genoma están formadas por distintas repeticiones de una secuencia unidad cuyo número de pares de bases puede ser pequeño, entre 2 y 7 pares de bases, son las secuencias *microsatélite*, o de mayor tamaño, entre 10 y 60 pares de bases llamadas en este caso secuencias *minisatélite*. Las unidades de repetición de cada una de estas regiones hipervariables se disponen una a continuación de la otra en el genoma o en tándem, siendo muy alto el número de veces que se repiten las secuencias unidad de los loci minisatélites y mucho menor el número de repeticiones de las secuencias de los loci microsatélites. El número de repeticiones consecutivas en una posición genómica en particular varía de individuo a individuo.

Marcadores genéticos consistentes en la unidad repetitiva pueden ser utilizados como sondas radiactivas para detectar un gran número de variantes polimórficas, exclusivas y únicas de cada individuo, pero que a la vez presentan una gran estabilidad somática entre distintos tejidos, incluyendo los germinales.

El patrón de restricción observado en un individuo al ser tratado su ADN con una enzima de restricción que no corte dentro de la unidad repetida, y posteriormente transferido el ADN a nailon e hibridado con una sonda radiactiva de un minisatélite, se denomina **huella genética o huella de ADN** (ADN "*fingerprint*") (porque arroja un perfil propio de cada individuo). La probabilidad estimada experimentalmente de que una sola banda de las múltiples que se observan en un individuo esté presente en otro individuo tomado al azar es aproximadamente de 0,2; de esto se deduce que es bajísima la probabilidad (5×10^{-19}) de encontrar otro individuo sin parentesco directo con el primero y con una huella genética idéntica.

La huella genética es completamente específica del individuo. No hay diferencia en los patrones de restricción de ADN obtenida de distintos fluidos corporales, sangre o semen de un mismo individuo. Tampoco la hay entre gemelos univitelinos.

Cuando se preparan y analizan de forma rigurosa, las huellas de ADN pueden proporcionar identificaciones fiables de los individuos. Una pequeña cantidad de sangre, de saliva o de semen que puedan ser encontrados en las ropas de una víctima o de un sospechoso de haber cometido un crimen dan suficiente ADN como para aplicar esta metodología.

Las aplicaciones de la técnica de análisis de huellas en el ADN son muy numerosas, cabe destacar las siguientes:

- Diagnóstico de paternidad biológica y parentesco biológico
- Identificación de vestigios biológicos tales como sangre, semen, saliva, raíces de cabello, tejidos, piezas dentales, etc., en procedimientos penales (por ejemplo en la identificación de individuos sospechosos de delitos), así como identificación de individuos post-mortem.

Estudio del primer caso real investigado por huella genética

El primer caso real investigado con ayuda de la huella de ADN fue una determinación biológica de filiación familiar para satisfacer un trámite migratorio. Los protagonistas eran una familia africana asentada en Gran Bretaña y un hijo ausente.

La ley amenazaba con impedir la reunión de un niño residente en Ghana con el resto de la familia, madre y tres hermanos, afincada en Londres. El menor había nacido en Gran Bretaña pero luego regresó a Ghana con su padre. Cuando su madre intentó traerlo de nuevo a su lado, las autoridades británicas supeditaron el permiso de residencia a que aportaran pruebas legales de filiación, pues había indicios para sospechar que el solicitante de permiso de residencia fuera sobrino y no hijo de la mujer.

En busca de esa respuesta, el genetista Alec Jeffreys analizó ADN de muestras de sangre del niño, de su presunta madre y de los tres hijos de ésta, un chico y dos chicas. Faltaba material del padre que no había podido ser localizado. Se determinó la huella genética de cada una de las muestras. El ADN fue digerido con la enzima Hinf I y se hibridó con sondas de dos minisatélites (33,15 y 33,6), cada una de las cuales identifica un conjunto de bandas distintas en el genoma humano.

El ADN extraído de la sangre del niño africano mostró que la mitad de su patrón de bandas correspondía al de la mujer, como era de esperar si se trataba de su madre. Las otras, heredadas del padre, concordaban parcialmente con las del hijo y las dos hijas de la mujer. Dichas bandas estaban ausentes del perfil de la mujer. Se trataba del ADN heredado del padre. La probabilidad de que un individuo del resto de la población compartiera el perfil del niño ausente era de sólo 7×10^{-22} .

Como consecuencia de los resultados, se concedió al niño el permiso de residencia indefinida en Gran Bretaña.

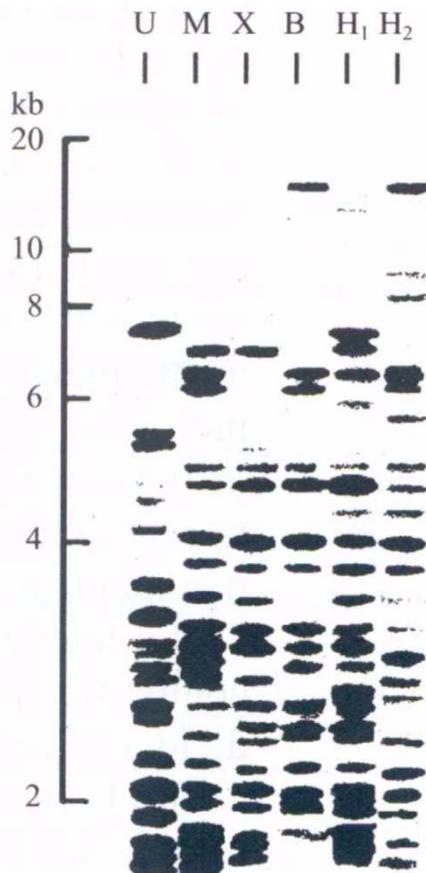


Figura 7
Huella genética de la familia ghanesa: U, sin parentesco; M, madre; N, niño; B, hermano; H₁ y H₂, hermanas

Análisis de ADN en dos casos de agresión sexual

La técnica del perfil de ADN resulta muy útil para la persecución de delitos de índole sexual. Cuando un criminal comete una violación deja su marca personal en forma de ADN. En la investigación de este tipo de delitos se analiza la sangre de la víctima para, en caso de una mezcla de fluidos, reconocer el componente femenino de la muestra.

El caso A de la figura 8 muestra una autoradiografía de un análisis de ADN que dio lugar a la exclusión del sospechoso en la investigación de un delito de violación y asesinato. Se observan en la fotografía tres filas correspondientes, de izquierda a derecha, a la muestra de sangre de la víctima (V), restos de semen encontrados en el lugar del asalto (2), y una muestra de sangre del sospechoso (3). La muestra de ADN de la víctima presenta cuatro bandas bien diferenciadas. El patrón de la prueba de semen encontrado (2) y el del ADN del sospechoso (3) no coincide.

En el caso B de la figura 8 se nota que el patrón de ADN de la muestra, semen encontrado en la ropa de la víctima (2), y el de la sangre del sospechoso (3) sí concuerdan. Hay un mismo número de bandas en el mismo sitio de la autoradiografía y su intensidad es la misma.

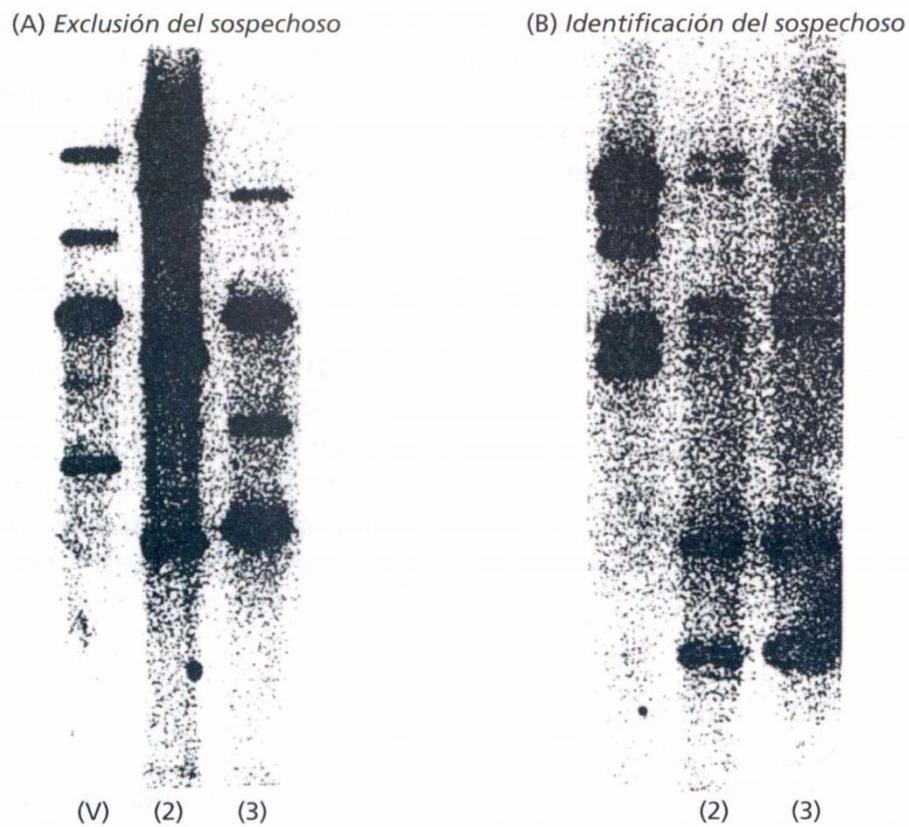


Figura 8.
Análisis de ADN en dos casos de agresión sexual

Sondas unilocus

Además de las sondas que reconocen muchas regiones hipervariables dispersas por el genoma (multiloci), existen otras que detectan un solo lugar en el genoma, igualmente hipervariable (unilocus). Con las sondas unilocus hay solamente dos bandas de distinto tamaño por individuo (alelo paterno y materno).

Una de las ventajas que ofrece la utilización de sondas unilocus es que dan lugar a patrones de ADN con menos bandas y por tanto más fáciles de interpretar que los que proporcionan las sondas multiloci. El análisis con sondas unilocus requiere además menos ADN.

Al marcar un único locus se renuncia al poder de identificación individual de la huella de ADN. El problema queda resuelto utilizando varios marcadores diferentes (de 5 a 10, por ejemplo) originando así un número no muy elevado de bandas específicas que también resulta fácil de interpretar y que dan mayor solidez al diagnóstico.

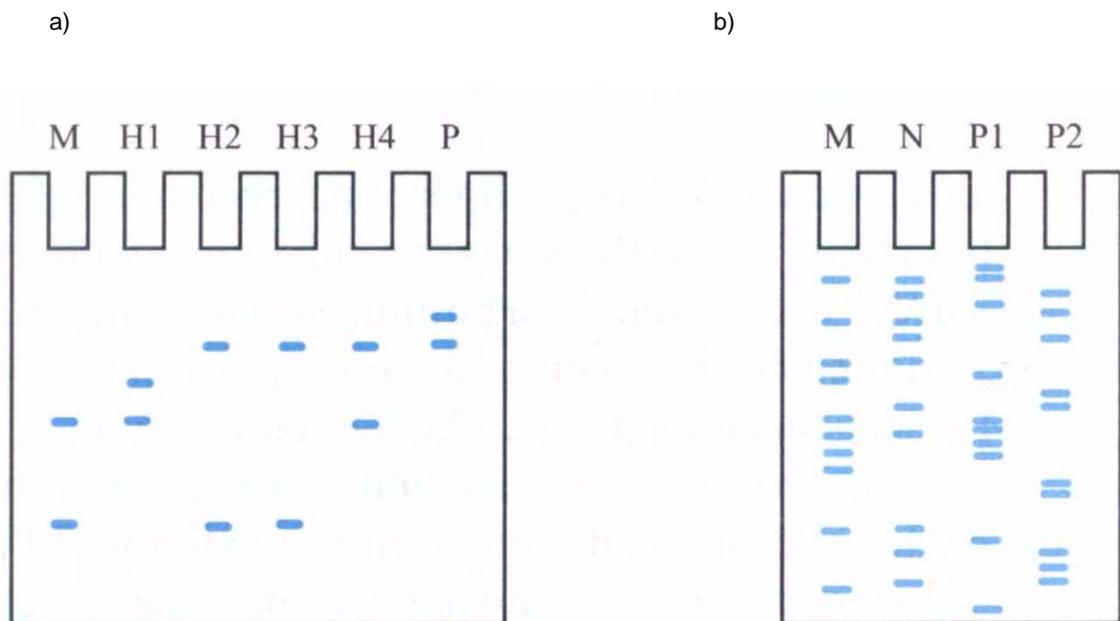


Figura 9

- a) Análisis de la movilidad de los fragmentos de restricción originados en una región unilocus para identificar los alelos paternos (P) y maternos (M) de los cuatro hijos de un matrimonio. Una muestra del ADN de los implicados se trata con una enzima de restricción que no corte dentro de la región hipervariable, se corren las muestras en un gel de agarosa, se desnaturaliza el ADN y se transfiere a nailon. La identificación se hace por hibridación con la sonda unilocus marcada radiactivamente. Los alelos paterno y materno pueden ser identificados en todos los hijos excepto en el primero de ellos, en el que aparece un nuevo alelo.
- b) Determinación de la paternidad entre dos posibles padres, P1 y P2, de un niño (N) empleando una mezcla de cinco sondas unilocus. El padre P2 muestra total identidad con la mitad de las bandas observadas en el niño.

Amplificación de minisatélites y microsatélites por PCR

El análisis de regiones hipervariables del genoma utilizando sondas multiloci o unilocus requiere elevadas cantidades de ADN que además debe de haber estado conservado en condiciones óptimas.

Alec Jeffreys, en los años noventa propuso combinar el método de la PCR con la obtención de la huella genética del individuo: **amplificación de minisatélites por PCR** (*Minisatellite Variant Repeat-Polymerase Chain Reaction*, MVR-PCR). El procedimiento a seguir en el laboratorio consiste en amplificar una secuencia de minisatélite mediante PCR y generar posteriormente un perfil de ADN.

El perfil de ADN basado en la amplificación tiene la ventaja de ser más sensible que el proporcionado por las técnicas de Souther e hibridación. Permite la identificación de individuos por huella genética incluso en aquellos casos en que el material genético de que se dispone es muy escaso (por ejemplo, cuando el resto biológico es una sola raíz de cabello, o la saliva depositada en la boquilla de un solo cigarrillo) o bien cuando el resto biológico proporciona ADN muy degradado, tal como sucede en manchas de sangre sometidas a la radiación solar o a temperaturas muy altas, o se trata de restos biológicos post mortem.

La **amplificación de microsatélites** (STR) es otro sistema utilizado por criminalistas y está adquiriendo cada vez más importancia en ciencia forense. A causa del pequeño tamaño de los fragmentos, los sistemas STR se hacen muy apropiados para el análisis de especímenes viejos o mal conservados.

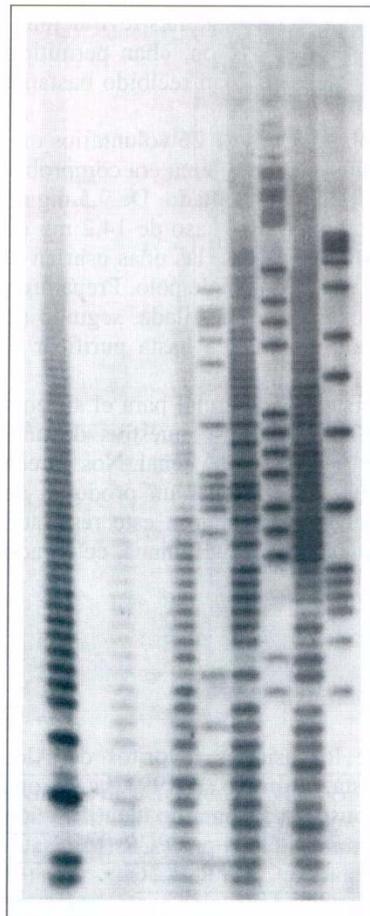


Figura 10
Alec Jeffreys ha amplificado por PCR distintos minisatélites. Una vez amplificados, los minisatélites se caracterizan con el método de Souther. Mediante PCR se pueden amplificar restos de ADN degradado y obtener información a partir de poca cantidad de ADN. La fotografía muestra una membrana con hibridación de varios

4.5 Identificación de pescados mediante PCR

Después de su obtención y antes de su comercialización, muchos tipos de pescado se someten a operaciones de evisceración, fileteado, picado, congelación, etc. Después de esta transformación resulta muy difícil identificar la especie de procedencia. La gran diferencia de precios existente entre especies de pescados afines, lleva en muchas ocasiones a defraudar al consumidor sustituyendo aquellas especies de mayor valor comercial por las menos valoradas.

Uno de los problemas con los que se encuentra este sector es la identificación de pescados planos fileteados, la distinción del lenguado, la solla, la platija y el fletán negro es complicada. La diferenciación de los filetes procedentes de estas especies es difícil ya que ni el tamaño, ni el color de la carne, ni el sabor, constituyen parámetros fiables de identificación. De este modo, es bastante frecuente la sustitución de los filetes de lenguado, por filetes de solla, platija o fletán negro, de valor comercial inferior.

La reacción en cadena de la polimerasa constituye una técnica alternativa a los métodos tradicionales de identificación de especies de pescado, basados en el análisis de proteínas mediante técnicas electroforéticas o cromatográficas. La técnica de la PCR permite analizar muestras conservadas en condiciones deficientes o sometidas a tratamientos térmicos, incluso de esterilización, utilizando una mínima cantidad de muestra.

El punto crítico del ensayo de PCR es la *selección de un marcador genético* apropiado y el *diseño de cebadores* que permitan su amplificación. En la elección de marcadores genéticos es importante considerar varias premisas:

- i) Las regiones de ADN seleccionadas deben acumular mutaciones a una velocidad adecuada para que especies estrechamente relacionadas tengan secuencias de nucleótidos diferentes, sin que exista polimorfismo intraespecífico.
- ii) La longitud del segmento amplificado ha de ser suficiente para detectar diferencias interespecíficas, permitiendo a su vez la secuenciación en un gel estándar.
- iii) Es preferible utilizar regiones del ADN que codifiquen proteínas, ya que los errores en la amplificación o en la secuenciación pueden detectarse fácilmente.
- iv) Es aconsejable trabajar con genes cuya secuencia se haya determinado previamente en diversos organismos, preferiblemente en otras especies de pescado.

El genoma mitocondrial es el más utilizado en la diferenciación genética de especies de pescado. Presenta una serie de ventajas respecto el ADN nuclear que lo hacen más adecuado para este tipo de análisis. Se trata de un genoma haploide, no recombinante, no posee intrones, es mucho más pequeño que el ADN nuclear, cada célula presenta múltiples copias, y presenta una tasa de evolución mayor.

En el diseño de cebadores, se pueden utilizar las secuencias génicas de diversas especies conocidas para buscar regiones conservadas sobre las que diseñar *cebadores universales*, que permitan la amplificación de un mismo gen en una gran variedad de especies.

4.5.1 Técnicas de PCR empleadas en la identificación de especies de pescado

La identificación de especies de pescado mediante PCR, sin utilizar ninguna otra técnica complementaria, requiere la amplificación de fragmentos de distinto tamaño para cada una de las especies que se pretende diferenciar.

Algunos genes presentan una estructura que hace posible amplificar fragmentos específicos de especie utilizando cebadores universales. Es el caso del *gen 5S ADNr*, que en los organismos eucariotas superiores consta de una zona codificante de 120 pares de bases (*gen 5S ARNr*), cuya secuencia se mantiene igual en todas las especies, y de un fragmento no codificante (NTS) que varía de longitud según la especie de que se trate. Esta unidad básica del gen se repite un número variable de veces en el cromosoma dependiendo de la especie.

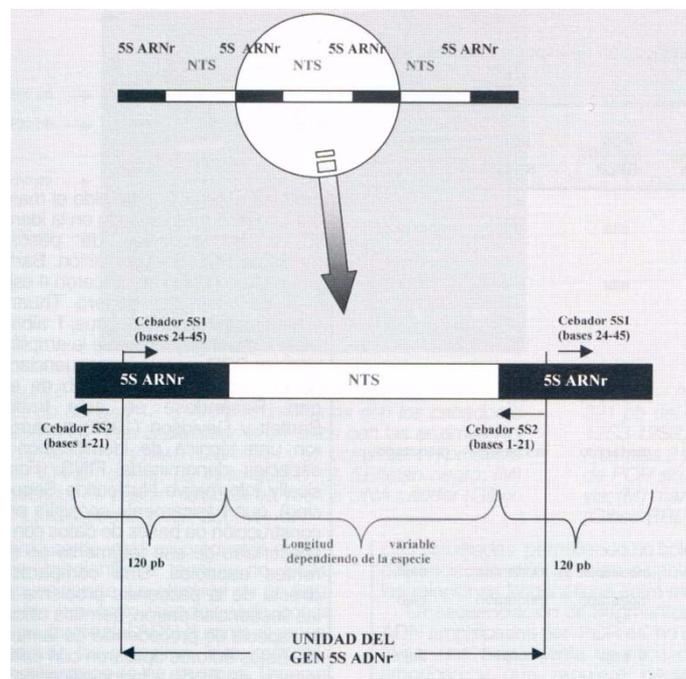


Figura 11
Estructura básica del gen 5S ADNr en eucariotas

Utilizando unos cebadores basados en la secuencia de la zona conservada del gen de la trucha se amplificó el gen en trucha, salmón y en híbridos salmón-trucha. El tamaño de los fragmentos amplificados fue distinto en cada una de las especies analizadas, permitiendo así su diferenciación. En los híbridos salmón-trucha se obtuvieron dos bandas, correspondientes a cada uno de sus progenitores.

A pesar de las numerosas ventajas que reúne la identificación de especies de pescado mediante PCR sin el apoyo de ninguna otra técnica complementaria no siempre es posible. La identificación de especies mediante la utilización de cebadores universales que permitan amplificar fragmentos de tamaño especie-específico, está condicionada por el hecho de que las diferencias en el tamaño de los fragmentos amplificados se puedan detectar mediante electroforesis. Cuando se trata de identificar especies muy próximas

filogenéticamente, es posible amplificar fragmentos de tamaño tan similar que no permitan la diferenciación.

PCR - Secuenciación

Este método consiste en la amplificación de un determinado fragmento génico por PCR y su posterior secuenciación. Mediante el análisis de las secuencias obtenidas se pueden identificar diferencias interespecíficas que permitan distinguir las especies adecuadas. El análisis de las secuencias obtenidas suele requerir la utilización de programas informáticos complejos.

El gen mitocondrial que codifica la proteína *citocromo b* ha sido el marcador genético más utilizado en la identificación de especies de pescado mediante PCR - secuenciación. La técnica se ha aplicado con éxito en la identificación de distintas especies de atún así como de numerosas especies (bacalao, salmón, arenque, etc) sometidas a diferentes procesados (ahumado, enlatado, conservado en etanol, etc.)

La PCR-secuenciación es un método caro, laborioso y requiere de personal especializado por lo cual no resulta adecuada para la identificación de especies en laboratorios de análisis de alimentos y control de calidad, en los que se requiere una técnica sencilla, rápida y barata para llevar a cabo toda una serie de análisis rutinarios.

PCR - RFLP

Esta técnica está siendo ampliamente utilizada en la identificación de especies de pescado. Los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR se tratan con enzimas de restricción, que los cortan en trozos más pequeños. Diferencias en la secuencia nucleotídica entre las distintas especies estudiadas darán lugar a fragmentos de diferentes tamaños que se examinan mediante electroforesis.

Los genes mitocondriales más utilizados para este tipo de análisis han sido el gen que codifica el *citocromo b* y los que codifican para las subunidades *12S* y *16S del ARNr*.

Distintos estudios realizados han permitido identificar distintas especies de anguilas, diversas especies de túnidos en productos enlatados, especies de camarón y esturión, muestras ahumadas de salmón y trucha, etc. En la identificación de pescados planos fileteados la misma técnica permite distinguir entre ellas especies de lenguado, solla, platija y fetán negro.

La técnica de PCR-RFLP, a diferencia de la PCR - secuenciación, es sencilla, rápida y no requiere el uso de instrumental complejo. Por ello resulta muy apropiada para análisis rutinarios en programas de control de calidad.

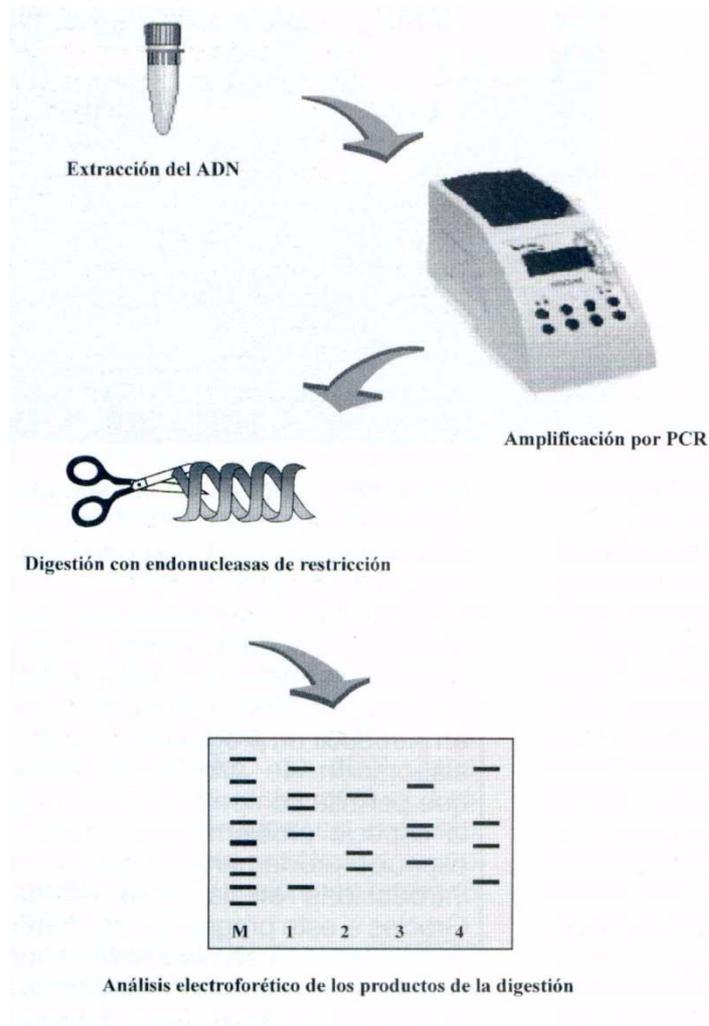


Figura 12
Técnica de PCR-RFLP utilizada en la identificación de especies de pescado

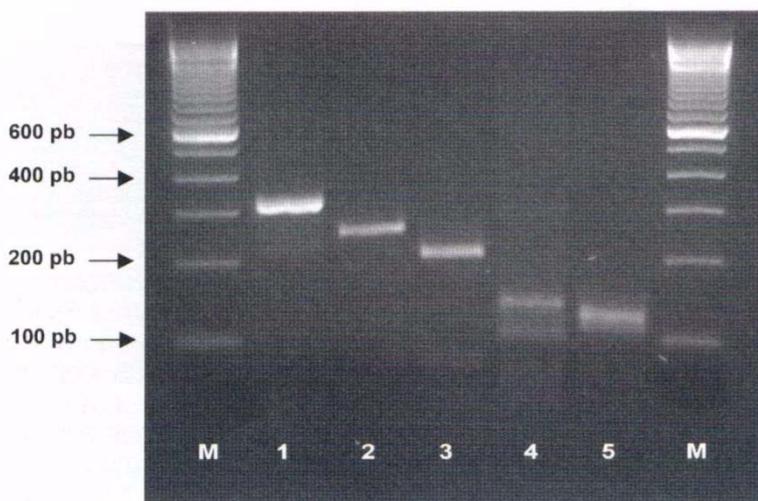


Figura 13
Identificación mediante PCR-RFLP del lenguado (*Solea solea*) y el fletán negro (*Reinhardtius hippoglossoides*). La fotografía muestra el análisis electroforético de los productos de PCR de un fragmento de 321 pb del gen 12S ARNr tras la digestión con distintas enzimas de restricción. Muestras: (1) producto de PCR sin digerir; (2,4) lenguado; (3,5) fletán negro; (M) marcador.

4.6 Diagnóstico médico por PCR

La PCR ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas en numerosos campos de la medicina.

Existen métodos de detección por PCR de agentes infecciosos como los virus de la hepatitis B y C, del papiloma y del sida. También pueden detectarse otros microorganismos patógenos como las clamidias, las micobacterias que causan tuberculosis, los *Helicobacter* causantes de gastritis y los tripanosomas responsables de la enfermedad de Chagas.

La manera clásica de diagnosticar enfermedades infecciosas causadas por virus, consiste en detectar los anticuerpos que el paciente produce contra el virus. Si hay anticuerpos circulantes se sabe que hay o hubo infección, pero no se puede distinguir entre las dos posibilidades. En cambio, la detección directa del genoma del patógeno mediante PCR permite saber con certeza si hay o no infección en el momento del análisis.

La PCR ha facilitado también el diagnóstico de enfermedades hereditarias. Talasemias y otras anemias, fenilcetonuria, hemofilia, distrofia muscular de Duchenne, fibrosis quística, poliquistosis renal, retardo mental asociado a fragilidad del cromosoma X, corea de Huntington, enfermedades de Sandhoff y de Gaucher constituyen los ejemplos más notorios. Los genes responsables de estas enfermedades han sido aislados y caracterizados y se encuentran disponibles pruebas diagnósticas seguras de estas enfermedades.

En enfermedades oncológicas pueden detectarse por PCR mutaciones de oncogenes. Estas mutaciones pueden llevar a la generación de tumores. En algunos casos, saber cuál es el oncogen mutado puede permitir diagnosticar prematuramente cánceres de naturaleza hereditaria o establecer pronósticos.

La PCR permite también evaluar el riesgo de padecer trastornos autoinmunes tales como diabetes insulino dependientes, enfermedad celíaca y esclerosis múltiple. En estos casos se analizan los genes de los antígenos de histocompatibilidad o HLA. Si bien estos genes no son los responsables directos de las enfermedades autoinmunes, existe una correlación comprobada entre la presencia de ciertas variantes de los genes HLA y el riesgo de padecerlas.

5. Bibliografía

El trabajo ha sido realizado básicamente a partir de la siguiente bibliografía:

- MARTA IZQUIERDO ROJO. Ingeniería genética y transferencia génica. Pirámide, 1999
- TOM STRACHAN Y ANDREW READ. Genética molecular humana. Omega, 1999
- ALINA QUEVEDO. Genes en tela de juicio. Pruebas de identificación por ADN: de los laboratorios a los tribunales. Mc Graw Hill, 1996
- ANA CÉSPEDES y colaboradores. Identificación de Pescados Planos Fileteados mediante PCR. "Ibérica. Actualidad tecnológica" nº 426 Enero 2000

Otros libros consultados:

- ESTRELLA CORTÉS y GLORIA MORCILLO. Principios básicos de manipulación génica. Ingeniería genética. Programa de Formación del Profesorado. UNED, 1999
- P. BERG y M. SINGER. Tratar con genes. El lenguaje de la herencia. Omega, 1994
- ERIC S. GRACE. La biotecnología al desnudo. Promesas y realidades. Anagrama, 1998

Soporte electrónico:

- www.amgen.es Biotecnología. Se describen y explican de forma muy sencilla los principales conceptos, herramientas y técnicas empleadas en biotecnología. Es una página de la empresa Amgen.
- www.accesexcellence.com/AB/GG Graphics Gallery. Se encuentran explicaciones y gráficos sobre procesos importantes en biotecnología. Es una página de Genetech.
- www.britannica.com Enciclopedia Británica