

¿Qué es la PCR?

Desde hace unos años se ha introducido una técnica que ha revolucionado el estudio de una gran cantidad de determinaciones de tipo biológico.

Esta es la PCR, llamada así por ser la sigla en inglés de "Polimerase Chain Reaction". Algo que podríamos traducir como "Reacción en Cadena de la Polimerasa".

El objetivo del presente artículo es explicar, de una forma básica, en qué consiste y cómo logra la amplificación de segmentos del ADN.

La PCR

La PCR fue desarrollada en 1983 por el bioquímico estadounidense Kary B. Mullis. Esta técnica revolucionó la biología molecular, permitiendo la amplificación de secuencias específicas de ADN a partir de cantidades muy pequeñas.

Mullis recibió el Premio Nobel de Química en 1993 por este desarrollo.

La PCR ha tenido un gran impacto en una variedad de áreas, como, por ejemplo:

- Investigación básica
- Virología
- Bacteriología
- Diagnóstico
- Medicina forense
- etc.

A lo largo de estos años se han desarrollado modificaciones que han mejorado las funcionalidades de la PCR como la PCR Real Time (en tiempo real) o el NASBA, pero aquí nos ocuparemos de su forma más básica solo para comprender la amplificación de segmentos de ADN.

Pero antes de comenzar debemos analizar brevemente las estructuras de algunas moléculas biológicas.

Proteínas

Existen diferentes tipos de moléculas biológicas pero los fundamentales son solo 3:

- Proteínas
- Lípidos
- Ácidos nucleicos (ADN y ARN)

Por supuesto hay más como, por ejemplo, carbohidratos, vitaminas, hormonas no protéicas, etc., pero las centrales son las 3 indicadas anteriormente. Y de estas, a su vez las proteínas son el núcleo del funcionamiento de una célula viva.

Las proteínas pueden cumplir diferentes funciones:

- Funciones de sostén o estructurales
- Equilibrar presiones osmóticas (albúmina)
- Funciones de defensa (anticuerpos)
- Funciones de transporte de información (hormonas)
- Transporte de otras moléculas (carriers)

Pero existe, además, una función muy especial: las enzimas. Las enzimas son las que hacen el trabajo químico en las células, como: producir nuevas moléculas a partir de otras o romper o transformar moléculas existentes.

Esto significa que si yo sé cómo hacer proteínas, sé como hacer el resto de las moléculas que componen una célula. Es decir voy a saber como hacer lípidos, carbohidratos, ADN, ARN, etc. Lo único que las proteínas no pueden hacer es sintetizarse a sí mismas.

Las proteínas son cadenas en las que cada uno de los eslabones son compuestos simples llamados aminoácidos (AA). Existen sólo 20 AA y con estos 20 se construyen todas las proteínas que utiliza la vida. Lo que define su forma, su función, su tamaño, etc. es el orden (secuencia) que esos AA tienen en la molécula de proteína. Hay desde proteínas pequeñas, con unos pocos AA, hasta otras que contienen miles. Ahora bien, si las proteínas no pueden sintetizarse a sí mismas... ¿cómo se producen? Aquí es donde entra en juego el ADN.

El Acido Desoxirribonucleico (ADN)

Como vimos lo que debemos saber es cómo producir proteínas y esto significa saber cuál es la secuencia de AA que tiene cada proteína y a partir de esa información poder producir la proteína en cuestión y esto es lo que hace el ADN, guarda la información de esas secuencias.

El ADN es una molécula enorme pero su estructura es relativamente simple. Está conformado por dos cadenas de una molécula llamada Desoxirribosa (un carbohidrato) unidas por iones Fosfato (PO_3^{3-}). La estructura de cada una de estas cadenas (o cintas) sería como la que muestra la Figura 1.

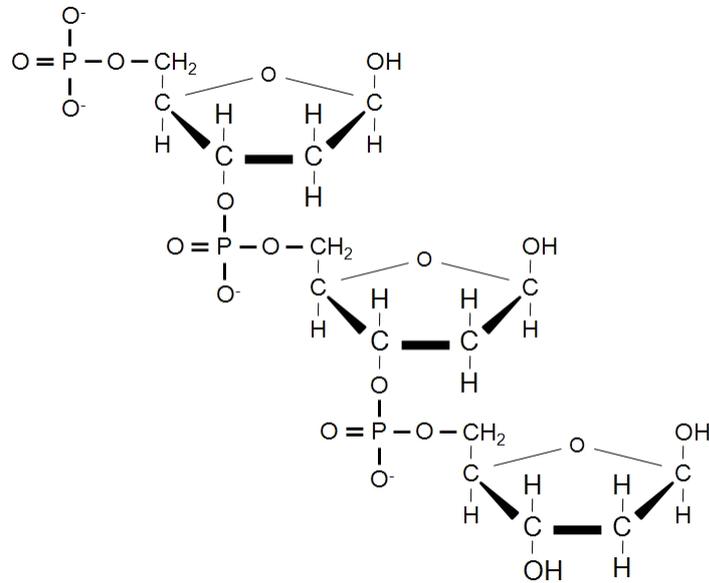


Figura 1

Estas cadenas están, a su vez unidas por unos compuestos llamados "Bases nitrogenadas (BN)". Estas bases son 4: Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) y Guanina (G).

Sus estructuras pueden apreciarse en la Figura 2.

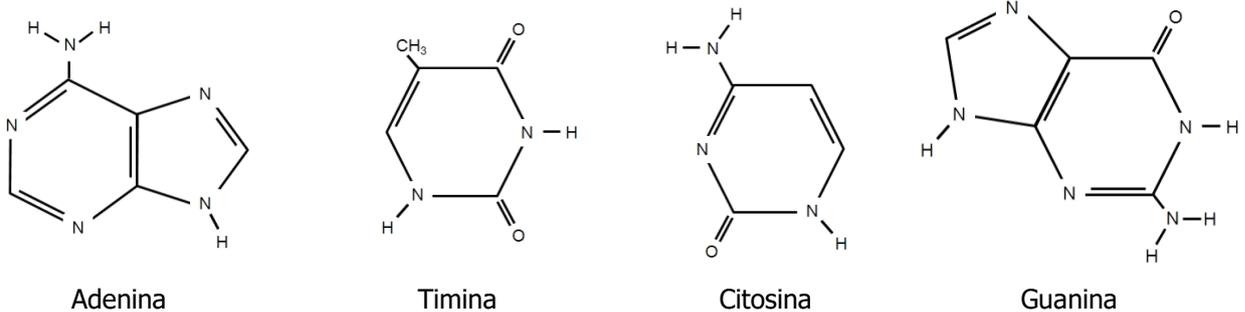
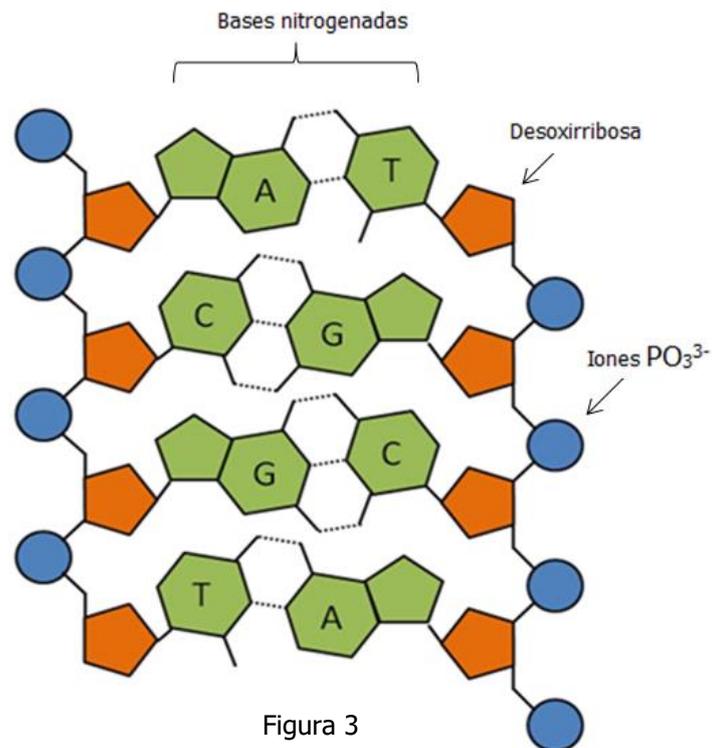


Figura 2

Estos compuestos son, a su vez, capaces de unirse unos a los otros por uniones de tipo electrostático, pero con una característica: A se une a T y C se une a G. Finalmente llegamos a una estructura como la mostrada por la Figura 3.

Pero la pregunta ahora es... ¿cómo está estructura codifica la secuencia de AA de una determinada proteína?



Recordemos que tenemos que codificar 20 AA diferentes, pero acá tenemos sólo 4 BN, es decir que no podemos codificar con cada BN un AA pues no alcanzarían. Tendríamos solo la posibilidad de codificar 4 AA.

Tampoco nos alcanza si los tomamos de a dos ya que en ese caso tendríamos 16 posibilidades.

Recién si los tomamos de a 3 sobrepasamos el número de 20 AA a codificar ya que las combinaciones de 4 elementos tomados de a 3 da 64 (4^3).

Se ha comprobado que grupos de 3 BN son las que indican qué AA se debe incluir en la cadena de la proteína que se está sintetizando. A este grupo de 3 BN se los llama "Codón".

Existen, además, una serie de estructuras y moléculas involucradas en el proceso de la "traducción" es decir, tomar la información de cada codón del ADN e incluir el AA correcto en la cadena protéica que se está sintetizando.

Pero el ADN debe también cumplir otra función fundamental: replicarse. Esto es: debe copiar la secuencia de codones cuando la célula se divide de forma que las dos células resultantes de la división tengan exactamente la misma secuencia de BN es decir que contengan la misma información genética. ¿Cómo se logra esto?

En el momento de la división celular las cadenas de ADN se separan y cada una de ellas se utiliza como molde para sintetizar una nueva cadena que será complementaria, es decir donde haya una A se incluirá una T o donde haya una C se incluirá una G, etc. Este proceso está mostrado en la Figura 4.

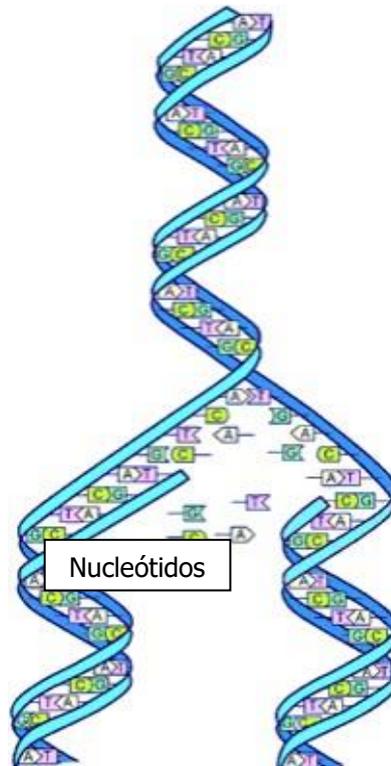


Figura 4

El proceso de sintetizar la nueva cadena es llevado a cabo por una enzima llamada, justamente, "Polimerasa" (el sufijo "-asa" indentifica a las enzimas). En función de todo lo expuesto podemos esquematizar un segmento del ADN como lo muestra la Figura 5.

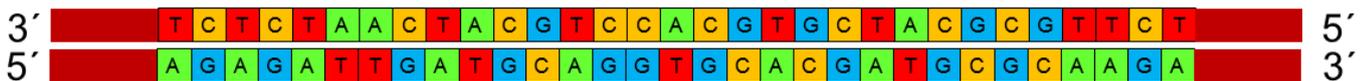


Figura 5

Es de hacer notar que, tal como vimos anteriormente, siempre se enfrentan T con A y C con G.

Cada una de las cadenas del ADN tienen una cierta orientación y los números 3' y 5' indican esa orientación. Es como si una estuviese orientada hacia la derecha y su cadena complementaria hacia la izquierda.

Es importante mencionar que la Polimerasa, para sintetizar una nueva cadena, la genera siempre de 5' a 3'.

Con todos estos conceptos ya podemos comenzar a entender cómo funciona la PCR.

La PCR

Para explicar de la forma más sencilla posible este proceso vamos a tomar un caso concreto: un virus.

Los virus son estructuras en las que hay un ácido nucleico empaquetado en una serie de capas protéicas.

Existen virus en los que el ácido nucleico interno es ADN y otros en los que es ARN. Para tomar el caso más sencillo supondremos que nuestro virus contiene ADN.

Los virus son como parásitos celulares. No pueden reproducirse por sí mismos. Para hacerlo deben invadir una célula, integrar su ADN al ADN presente en el núcleo celular y desde allí tomar el comando de la célula y utilizarle todo su aparato de producción de proteínas y réplica del ADN para formar virus hijos. Existe mucha controversia sobre si un virus está vivo o no.

Tomemos, en particular, el caso de virus del Herpes Simplex, un virus que puede producir lesiones tanto orales como genitales.

Hasta la aparición de la PCR era muy difícil saber si una persona estaba infectada pues las concentraciones del virus son en general pequeñas y las sensibilidades de los diversos métodos de laboratorio para tratar de identificarlo y evaluar su presencia en la muestra de un paciente no eran suficientes.

Por lo tanto se recurría a un método indirecto que era medir los anticuerpos que el sistema inmunológico produce para defenderse del virus. Estos están en una concentración mayor y pueden ser medidos fácilmente.

El problema que tiene esta estrategia es que el aparato inmunológico tarda cierto tiempo en generar esos anticuerpos por lo que no es posible diagnosticar una infección temprana. Este lapso, en el que el paciente está realmente infectado pero aún no hay anticuerpos, es lo que se conoce como "período ventana".

La estrategia de la PCR es amplificar un segmento del ADN que queremos identificar, en este caso, del virus (Herpes Simplex). Decir que lo vamos a amplificar significa que vamos a realizar muchísimas copias de ese segmento.

Supongamos, entonces que la secuencia mostrada en la Figura 5 representa un segmento del ADN del virus que queremos.

Prepararemos una solución que contenga:

- El ADN que queremos amplificar
- Dos primers o cebos

- Los 4 nucleótidos (Adenina, Timina, Citosina y Guanina)
- La Polimerasa

Algunas aclaraciones:

1. ¿Qué son los "nucleótidos"?
Hasta ahora hemos hablado de bases nitrogenadas (BM). Vamos a llamar nucleótido a la unión de una BM con una molécula de desoxirribosa y un ión fosfato.
2. ¿Qué son los "primers"?
Son pequeñas porciones de ADN, de unos pocos nucleótidos que son complementarias a los extremos 3' de cada uno de los segmentos a amplificar.
3. Una aclaración importante respecto de la Polimerasa.
La mayor parte de las proteínas se inactivan por encima de los 65 °C. En el caso de la PCR se utiliza una Polimerasa extraída de un organismo extremófilo que habita en respiraderos volcánicos (*Thermus Aquaticus*) los cuales están a temperaturas cercanas a punto de ebullición del agua (100 °C). Esta Polimerasa, llamada "Taq Polimerasa" puede ser llevada a temperaturas muy altas manteniendo su actividad enzimática.

A partir de acá lo que haremos será ir variando las temperatura de la solución secuencialmente, primero a 95 °C, luego a 60 °C y finalmente a 74 °C.

Terminado este ciclo recomenzaremos llevando nuevamente la temperatura a 95 °C.

Este ciclo se repite muchas veces.

¿Qué ocurre a cada temperatura?

- A 95 °C las cadenas de ADN se separan
- A 60 °C los primers se unen a sus secuencias complementarias
- A 74 °C actúa la Taq Polimerasa

Para poder entenderlo mejor veámoslo gráficamente.

Primeramente veamos qué encontramos en la solución que hemos preparado. Podemos verlo en la Figura 6.

Solución de reacción

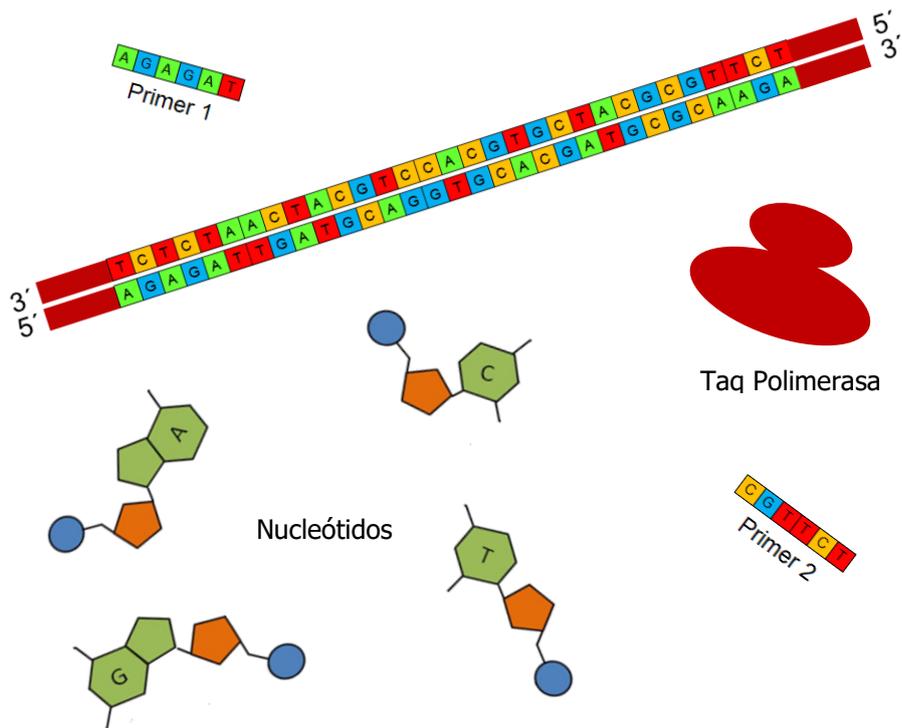
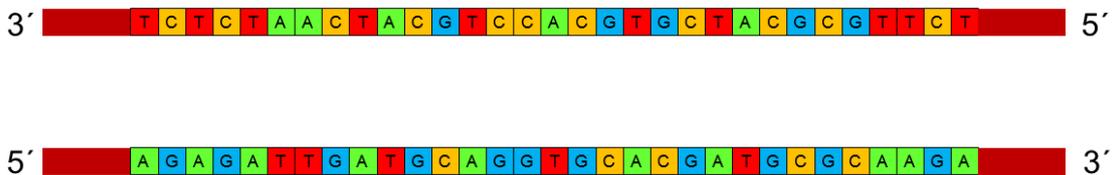


Figura 6

Comencemos con el primer ciclo.

Como dijimos comenzamos llevando la temperatura de la solución a 95 °C. Esto hace que las cadenas de ADN se separen.

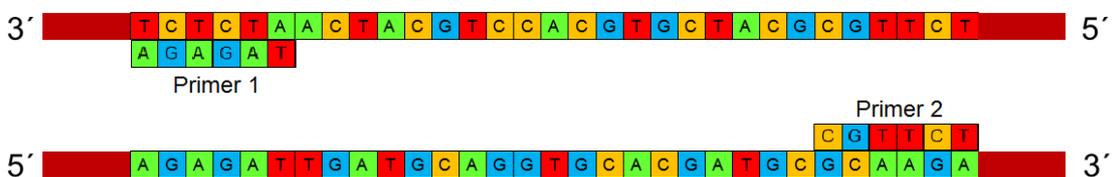


Luego llevamos la temperatura a 60 °C.

A esta temperatura se podrán unir los primers a sus secuencias complementarias.

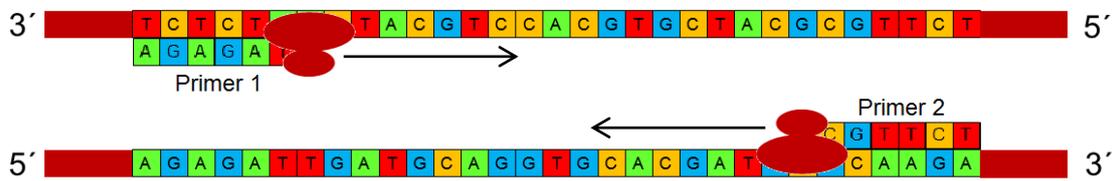
Los primers cumplen una doble función:

- Sirven de anclaje para que la Taq Polimerasa pueda unirse a la cadena de ADN
- Marcan el lugar donde debe comenzar a completar la segunda cadena la Taq Polimerasa

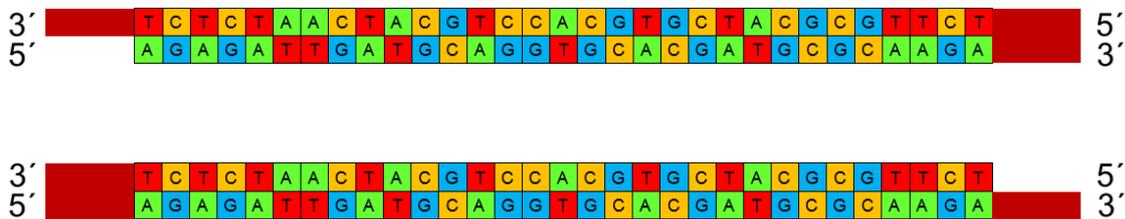


El siguiente paso es llevar la temperatura a 74 °C.

Esto hará que la Taq Polimerasa de una a los primers y comience a copiar una segunda cadena de ADN utilizando como molde la primera. Para ello irá tomando los nucleótidos que se encuentran en la solución.

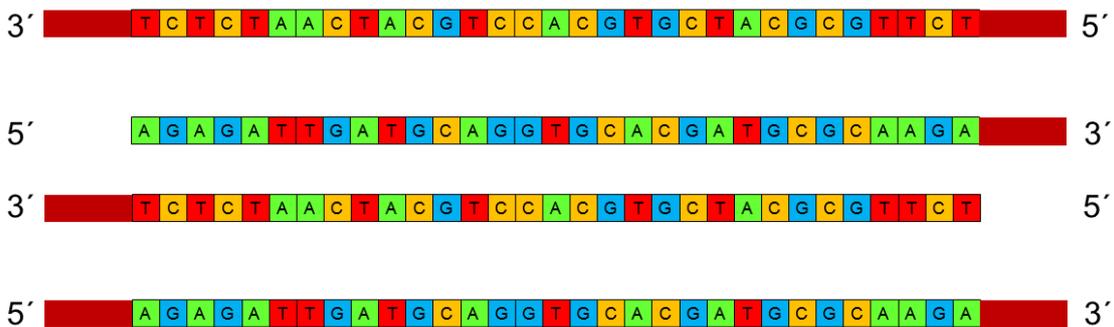


Una vez que la Taq Polimerasa termina de sintetizar la segunda cadena nos encontraremos con esta situación:

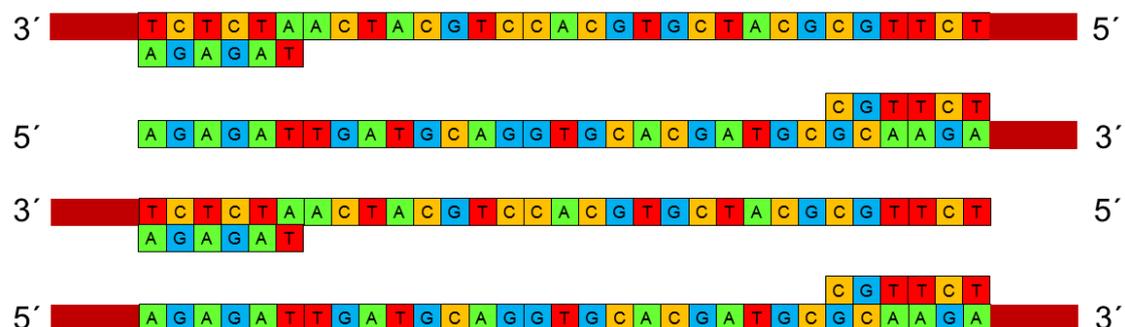


Acá terminaría el primer ciclo.

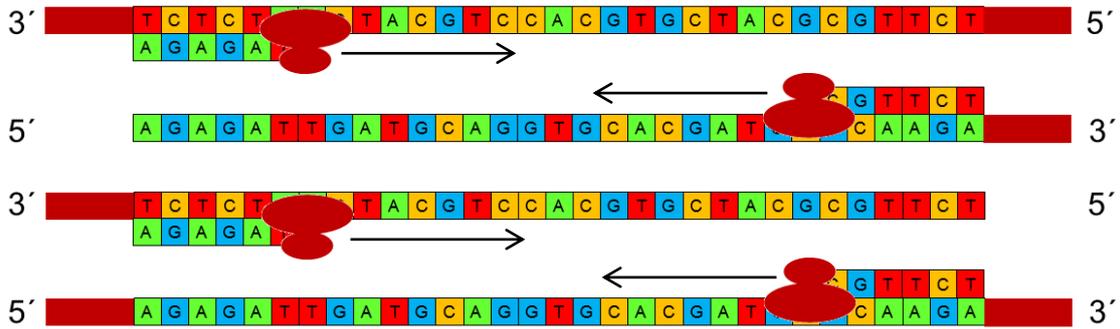
Para comenzar con el segundo ciclo volvemos a llevar la temperatura a 95 °C haciendo que, nuevamente, las cadenas del ADN se separen.



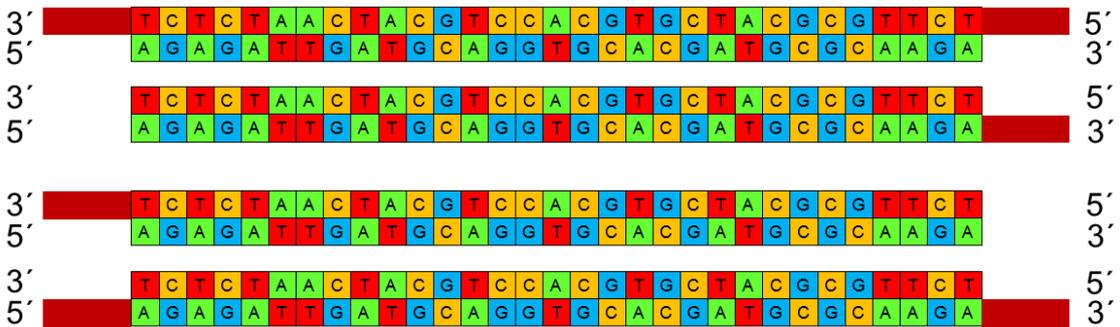
Bajamos la temperatura a 60 °C para que se vuelvan a unir los primers.



Ahora llevamos la temperatura a 74 °C para que la Taq Polimerasa comience su trabajo.



Al terminar el segundo ciclo, entonces, la situación sería la siguiente:



Para comenzar el tercer ciclo elevamos nuevamente la temperatura a 95 °C. Se separan las cadenas de ADN.

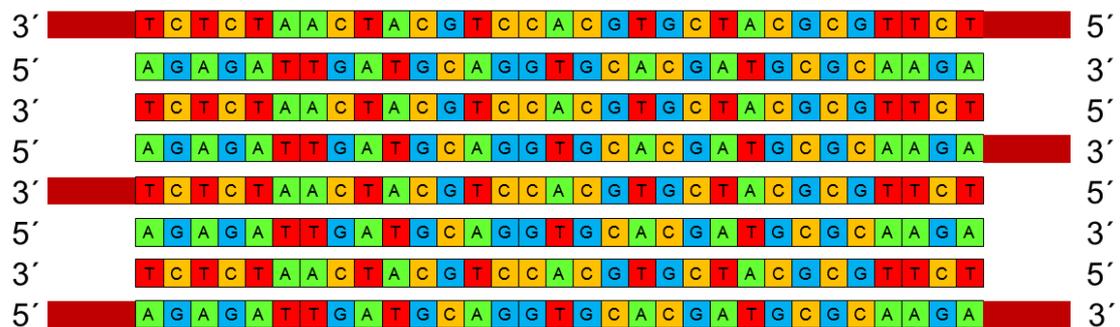


Figura 7

Como puede apreciarse en cada ciclo la cantidad de copias del segmento seleccionado se duplica.

Por supuesto existen instrumentos que los cambios de temperatura y los tiempos en cada una de ellas los realizan automáticamente. Se llaman "Termocicladores".

Un detalle que puede apreciarse en la Figura 7 es que en los primeros ciclos quedarán cadenas que contienen no solo el segmento a amplificar sino que hay

4 copias que contienen, también, partes del ADN original por fuera del segmento seleccionado. Con esta metodología pueden llegarse a las 1000 millones de copias por lo que esas 4 copias que contienen más ADN son totalmente despreciables.

Considerando que en cada ciclo se duplica la cantidad de copias, las 1000 millones de copias se consigue después de, aproximadamente, 30 ciclos.

El revelado

Si la muestra del paciente contenía el virus ese segmento existe y, por lo tanto, los primers van a tener una secuencia complementaria a la cual unirse. Por el contrario, si la muestra no contiene el virus los primers no podrán unirse y la amplificación no sucederá.

Si la muestra contenía el virus cuando se termine la PCR tendremos, como vimos, una gigantesca cantidad de copias del segmento que deseabamos amplificar.

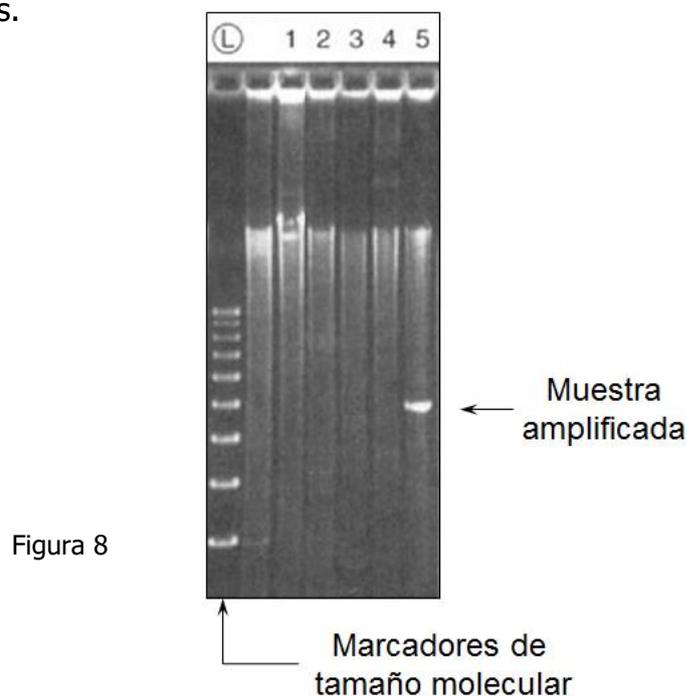
La pregunta es... ¿cómo hacemos para ver si la amplificación se produjo o no?

Lo que vamos a hacer es hacer una electroforesis de los productos de las PCRs de cada paciente en un gel de agarosa.

Esta electroforesis consiste en sembrar en diferentes zonas (calles) cada una de las PCRs resultantes y aplicar una corriente eléctrica para que los segmentos de ADN corran por dentro del gel de agarosa y se separen por tamaño.

En la primera de las calles se siembra una mezcla de segmentos de ADN de tamaños conocidos de manera de poder evaluar los tamaños de los segmentos que pudieran haberse amplificado en las calles de los pacientes. Esto permite una mayor especificidad ya que, como conocemos el tamaño del segmento que debió amplificarse, podemos ver si su tamaño es el esperado.

La Figura 8 muestra la imagen de cómo queda el gel de agarosa luego de la electroforesis.



En la figura precedente puede verse en la primera calle las bandas correspondientes a los marcadores de tamaño molecular y luego las productos de las PCRs de 5 pacientes.

El paciente nro. 5 presenta una clara banda de amplificación mostrando que esa muestra contenía el virus.

La enorme cantidad de copias que se consiguen con esta técnica explica la enorme sensibilidad que tiene, siendo capaz, al menos teóricamente, de detectar, en una muestra, una sola partícula viral.

Dr. Jorge Santiago

NOTA: Si se desea tener más información sobre las diferentes moléculas biológicas, sus estructuras, sus funciones y el proceso sobre la biosíntesis de proteínas, se recomienda leer el artículo llamado "El Byte Biológico I".