

47
25



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“ La Reacción en Cadena de la Polimerasa
(PCR) y Algunas Aplicaciones Clínicas ”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A:

CYNTHIA GERSON BAUM

ASESORA: DRA. ANGELINA QUINTERO RUIZ



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1994



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

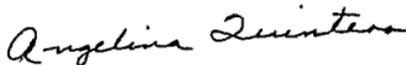
Jurado asignado:

Presidente:	Prof. Angelina Quintero Ruiz
Vocal:	Prof. Beatriz Albina Medina Jiménez
Secretario:	Prof. Marisol López López
1° Suplente:	Prof. Alicia Cervantes Peredo
2° Suplente:	Prof. Maria Estela Cevallos Ferriz

Sitio donde se realizó la tesis:

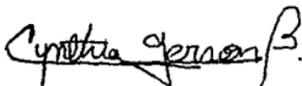
- Laboratorio de Investigación en Cáncer,
Departamento de Biología, Facultad de Química.
- Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas
- Hemerobiblioteca de la Facultad de Medicina
- Hemeroteca de la Facultad de Química
- Biblioteca del Instituto Nacional de la Nutrición
- Biblioteca de la Facultad de Química (Posgrado)

Asesor del tema:



Dra. Angelina Quintero Rufz.

Sustentante:



Cynthia Gerson Baum

A Dios:

Gracias por darme la vida y hacer que su amor y presencia originen en mí la fe que siempre me ha mantenido optimista.

A mis padres **Mauricio y Silvia** por tanta vida compartida...
Con cariño y apoyo me enseñaron a confiar en mí, a soñar, a trazarme metas y a luchar para lograrlas; gracias por motivar mi profesión y llenar mi vida de amor y confianza, sabiéndolos conmigo a lo largo de todos mi logros.

Me siento afortunada de que sean mis padres y tenerlos tan cerca. Son para mí, ejemplo de amor, dedicación y fortaleza.

Para mi esposo Ari, mi amor:

Gracias a tí he llenado mi vida de momentos maravillosos, descubriendo de esta manera el verdadero concepto del amor.

Con tu ejemplo, ayuda y cariño he logrado llegar a esta importante meta y porque tu amor y confianza me dan la fuerza para seguir superándome.

Por seguir teniendo la suerte de compartir mi vida contigo.

A mi hermano **Arturo**: Porque con tu presencia has llenado mi vida de alegría, por los momentos inolvidables que hemos pasado juntos y los que todavía nos faltan. Tu cariño y amistad son un tesoro para mí.

A mis abuelitos: Salomón y Anita Gerson, a quienes llevo en mi corazón, y a Abe y Poly Baum, a los que por fortuna continúo disfrutando; a todos los adoro y admiro.

A mis suegros, cuñados, Bobe Sonia y Hilel gracias por ser para mí, una inagotable fuente de cariño y apoyo. Los quiero mucho.

A mi familia, a quien quiero mucho, con el deseo de seguir compartiendo momentos felices y logros importantes como éste. *

Agradezco a la **Universidad Nacional Autónoma de México**, y en especial a la **Facultad de Química** por haber sido durante cinco años mi segunda casa; porque de ella recibí más que una estupenda formación profesional.

A mis **queridos profesores** un valioso reconocimiento por su trabajo; les agradezco su ejemplo, entusiasmo, paciencia y amistad, elementos que me motivaron siempre a dar lo mejor de mi misma. Me siento afortunada de haber cursado la carrera en esta Facultad, donde la mayoría de los profesores quedarán en mi memoria con gran cariño y admiración.

Mención especial al **Q.F.B. Raúl Garza** quien además de ser un extraordinario profesor de Bacteriología, dedica una parte importante de su tiempo y talento a mejorar la formación profesional en la Facultad de Química y a resolver los problemas de los alumnos, quienes nos sentimos muy apoyados por contar con personas tan valiosas como él.

Con especial cariño a mis **compañeros y amigos** por todos los momentos que compartimos juntos, porque juntos logramos conquistar nuestras metas disfrutando el camino.

A **Rossy, Rocío y Vero**, gracias por haberme hecho sentir el verdadero deleite de la amistad.

Muy especialmente agradezco a la **Dra. Angelina Quintero Rufz** por ser una fuente de inspiración para mi vida profesional; su profunda dedicación, tenacidad, amor al trabajo y a la investigación me inclinaron a seguir su ejemplo en el camino científico.

Por compartir su valioso tiempo, conocimientos y experiencia profesional conmigo a lo largo de la carrera, escuchando y encauzando mis inquietudes científicas con cariño e inteligencia.

Muchas gracias

Agradezco a los integrantes de Jurado:

Dra. Angelina Quintero Rufz
Dra. Beatriz Albina Medina Jiménez
M.en C. Marisol López López
Q.F.B. Alicia Cervantes Peredo
Q.F.B. Ma. Estela Cevallos Ferriz

Sus valiosos comentarios y sugerencias lo que permitió el enriquecimiento de este trabajo.

Dedico este trabajo a todos los que por medio de la ciencia buscan respuesta a sus preguntas y una mejor vida para la humanidad.

CONTENIDO

Tema	Página
Introducción	1
Objetivos	3
Historia	4
Bases Teóricas: Replicación del DNA	12
Fundamento de la Técnica de PCR	22
DNA polimerasas en PCR	25
Componentes y Condiciones Generales de PCR	29
Etapas de la Reacción de PCR	38
Fidelidad de las DNA polimerasas	48
Muestras para PCR	51
Preparación de Muestras para PCR	51
Métodos para evitar la Contaminación	67
Aplicaciones Clínicas:	
-Infectedología:	76
Diagnóstico de HIV-1	76
-Enfermedades Genéticas:	91
Diagnóstico de la Enfermedad de Huntington	93
-Medicina Legal:	107
Identificación de Individuos	107
-Investigación de Cáncer	118
Conclusiones	138
Apéndice I (Abreviaturas)	140
Bibliografía	143

INTRODUCCION

La técnica de PCR, así como la tecnología recombinante del DNA, ha tenido un enorme impacto tanto en aspectos básicos como de diagnóstico en la clínica, ya que puede producir grandes cantidades de un fragmento específico de DNA a partir de pequeñas cantidades de una muestra. Las técnicas de DNA recombinante crean clonas moleculares al conferirle a una secuencia específica la habilidad de replicarse al insertarla en un vector e introducir el vector a una célula huésped. La PCR representa una forma de "clonación *in vitro*" que puede generar, así como modificar, fragmentos de DNA de longitud y secuencia definida en una reacción, rápida, sencilla y automatizada.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias específicas de DNA, empleando dos cebadores (oligonucleótidos) que hibridan, en el extremo 3', a las dos cadenas complementarias de DNA que limitan la región de interés del DNA blanco. Una serie repetitiva de ciclos que involucran la desnaturalización del DNA molde, unión con el cebador, y la elongación de los cebadores unidos por medio de la DNA polimerasa resulta en la acumulación exponencial del fragmento específico cuyo término está marcado por los extremos 5' de los cebadores. Ya que los productos sintetizados por la extensión de los cebadores en un ciclo puede servir como DNA molde en el siguiente, el número de copias del DNA sintetizado se duplica en cada ciclo.

Este método, fue inventado por el Dr. Kary Mullis en 1985 y se aplicó originalmente por un grupo de investigación en el departamento de Genética Humana en Cetus, para la amplificación del DNA de la beta-globina humana y al diagnóstico prenatal de anemia drepanocítica.

A causa de su extraordinaria sensibilidad, la técnica de PCR ha permitido ampliar considerablemente los límites del análisis del DNA. Sus aplicaciones en los campos de la investigación básica, diagnóstico clínico, incluso prenatal, de deficiencias o anomalías genéticas, padecimientos infecciosos, inmunológicos e incluso el cáncer, medicina legal (investigaciones de paternidad, identificación de culpables en asuntos criminales), biología de la evolución y del desarrollo, son actualmente numerosas y están creciendo sin cesar.

OBJETIVOS:

a) Revisar la información bibliográfica más relevante y reciente sobre la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con el fin de poder implementarla en el laboratorio de investigación.

b) Conocer el fundamento de la reacción de PCR, los principales parámetros involucrados en su optimización así como la importancia de optimizar esta técnica para cada sistema.

c) Conocer las principales ventajas y desventajas que presenta esta técnica y poseer los elementos para resolver favorablemente los posibles problemas que se puedan presentar al desarrollar esta técnica.

d) Conocer algunos de los casos relevantes en donde esta técnica ha contribuido al diagnóstico o investigación de algún problema de la salud, a manera de ejemplo.

HISTORIA

El DNA es una macromolécula compuesta de cuatro tipos de desoxinucleótidos: desoxiadenilato (A), desoxitimidilato (T), desoxiguanilato (G) y desoxicitidilato (C). La secuencia de estas bases codifica la información genética, en tanto que los grupos de azúcar y fosfato poseen un papel estructural^(1,2).

En la naturaleza el DNA generalmente se encuentra formado por dos hebras apareadas, las cuales poseen secuencias complementarias.

Dentro de la célula, la hélice de DNA se encuentra rodeada y enrollada por proteínas. Cuando los investigadores tratan de aislar una cadena de DNA desnuda, la molécula es tan larga y delgada que cualquier manipulación la rompe al azar en diversos sitios⁽¹⁾.

En 1955 Arthur Kornberg^(2a) de la Universidad de Stanford y su personal asociado, descubrieron una enzima celular llamada la **polimerasa del DNA**. Esta enzima presenta diversas funciones naturales entre las que se incluyen la replicación y reparación del DNA. Estas enzimas pueden extender un pequeño oligonucleótido cebador ("primer") al unirle nucleótidos trifosfato adicionales al extremo 3', siempre y cuando el cebador se encuentre hibridado o unido a una hebra complementaria (templado)^(2a).

El nucleótido que la polimerasa incorpora será complementario a la base en la posición correspondiente en la hebra molde de DNA. Al repetir este proceso, la polimerasa puede extender el extremo 3' del cebador hasta el extremo 5' del DNA molde o matriz. En la doble hélice de DNA, cada hebra sirve de molde para la otra

durante la replicación^(2a).

En 1970 se descubrieron unas enzimas a las que se les llamó **endonucleasas de restricción** que son capaces de fragmentar el DNA en lugares específicos. Estas enzimas permitieron cortar el DNA en fragmentos más pequeños y fáciles de identificar en regiones en las cuales se encontraba el gen de interés^(2b,2c).

A finales de los setentas, los biólogos moleculares se ocupaban en estudiar el DNA por medio de las endonucleasas y la ayuda de otras moléculas conocidas como **sondas de oligonucleótidos**^(1,2b). Un oligonucleótido es una cadena pequeña de nucleótidos con una secuencia específica. Bajo condiciones de reacción adecuadas, un oligonucleótido se va a unir específicamente a una hebra sencilla de DNA que presente una secuencia complementaria, por lo tanto, los nucleótidos sintetizados por el hombre, marcados de forma radiactiva, pueden servir como sondas para determinar si una muestra de DNA contiene una secuencia de bases específica o un gen^(2b,2c).

En 1977 se desarrolló una técnica para secuenciar el DNA llamada **dideoxi secuenciación o técnica de Sanger**^(1,2b) (uno de sus inventores fue Frederick Sanger del British Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, quien recibió el premio Nobel de Química en 1980) la cual emplea una polimerasa del DNA, una muestra de DNA, cebadores, nucleótidos trifosfato y dideoxinucleótidos específicos (ddNTPs).

Como los nucleótidos normales, los ddNTP pueden ser adicionados a cebadores que van creciendo por el efecto de las polimerasas, sin embargo los ddNTPS encapsulan químicamente (cap) el extremo 3' del cebador impidiendo la adición de

más bases. La técnica de Sanger produce cebadores que han sido extendidos a diferentes longitudes y posteriormente encapsulados por un ddNTP. Al ordenar estos fragmentos de acuerdo a su longitud y conociendo qué ddNTP ha sido añadido, se puede determinar la secuencia de bases en la muestra de DNA^(1,2b).

En 1979 la Corporación Cetus de Emeryville, California contrató a Kary B. Mullis para sintetizar sondas de oligonucleótidos⁽¹⁾.

En 1983 los científicos lograron automatizar la síntesis de oligonucleótidos⁽¹⁾, lo cual fue un notable adelanto puesto que la técnica manual resultaba muy laboriosa.

La automatización proporcionó mayor tiempo para que los investigadores desarrollaran nuevas ideas. Inicialmente Mullis contempló el uso de polimerasas, muestra de DNA, ddNTPs, moléculas cebadoras (omitiendo los nucleótidos trifosfato), por lo cual la extensión del cebador terminaría inmediatamente después de la adición de una base de ddNTP a la cadena. Sabiendo que ddNTP se une en sitios específicos se puede conocer la secuencia que posee la muestra de DNA⁽¹⁾. Esta técnica presentaba los siguientes problemas:

Los oligonucleótidos en ocasiones se hibridan con secuencias que no son las correspondientes, este apareamiento inesquivable haría los resultados ambiguos. Es por esta limitación que los investigadores habían recurrido a procedimientos más complicados para analizar el DNA humano. Por ejemplo las enzimas de restricción pueden ser empleadas para dividir el DNA en varios fragmentos que pueden ser separados entre sí por electroforesis. De esta manera la muestra es "purificada" del DNA total antes de que se lleve a cabo la hibridación del DNA

que se desea analizar⁽¹⁾. Este camino reduce la hibridación errónea en cierto grado.

Este procedimiento además de extenso y tedioso no era funcional para muestras de DNA degradado o desnaturalizado⁽¹⁾.

Otra técnica que se ha empleado es la clonación^(2b,2c), pero también presenta el inconveniente de ser muy larga y lenta para el análisis rutinario del DNA. La secuencia de interés del DNA humano puede ser clonada, o copiada en un pequeño anillo de DNA conocido como plásmido. Por medio de una bacteria se pueden producir copias del plásmido y la secuencia deseada, así como obtener la información de la secuencia por medio de la hibridación con oligonucleótidos y la dideoxi-secuenciación. A principios de los ochenta, la dideoxi-secuenciación del DNA clonado era la técnica mediante la cual se había obtenido la mayoría de la información acerca de las secuencias del DNA⁽¹⁾.

En el caso de la estrategia que pensaba seguir K. Mullis⁽¹⁾, se fundamentaba inicialmente en desnaturalizar el DNA muestra por medio de calentamiento. Posteriormente en hibridar un oligonucleótido a la secuencia complementaria en una de las hebras. El experimento planeado consistía en colocar una muestra del DNA en cuatro tubos de reacción diferentes. Cada tubo contendría los cuatro tipos de ddNTPs, pero en cada tubo habría un ddNTP marcado radiactivamente. Los oligonucleótidos hibridados, se extenderían por medio de la DNA polimerasa en una sola base, en cada uno de los tubos. Posteriormente mediante el análisis por electroforesis se pueden separar los oligonucleótidos extendidos de los ddNTPs residuales, y se podría conocer la secuencia del DNA de la muestra al identificar cual de los ddNTP radiactivos había sido incorporado al oligonucleótido⁽¹⁾.

Posteriormente se le ocurrió la idea de que en vez de emplear un solo oligonucleótido, usar dos. Los dos cebadores flanquearían el par de bases que se deseaba identificar. En vista de que cada uno de los oligonucleótidos va dirigido a una de las cadenas del DNA muestra, se puede obtener al mismo tiempo la información sobre la secuencia de ambas cadenas, las cuales deben ser complementarias por lo que ésto a su vez funciona como un control interno. Siendo los oligonucleótidos de diferente tamaño, se puede distinguir uno del otro fácilmente.

Las muestras de DNA pueden contener trazas de dNTPs, los cuales se podrían introducir y extender el extremo 3' del cebador, antes de la adición de los ddNTP, esto haría difícil la interpretación de los resultados del análisis electroforético.

Para resolver este problema al Dr. K. Mullis⁽¹⁾ se le ocurrió destruir las trazas de los dNTPs que se encontraran en la muestra por medio de la enzima fosfatasa alcalina, una enzima bacteriana. Esta enzima es capaz de hidrolizar el grupo fosfato de los nucleótidos. Posteriormente se requería eliminar la enzima de la mezcla para evitar que inactivara también los ddNTPs. Generalmente se puede inactivar a las enzimas por medio de calentamiento, lo cual altera su forma esencial y funcional, sin embargo K. Mullis consideró, errónea pero afortunadamente, que esta enzima era capaz de renaturalizarse. Por lo que tuvo que buscar otra solución para resolver este problema. K. Mullis se enteró tiempo después de que la enzima fosfatasa alcalina puede ser desnaturalizada de forma irreversible al ser calentada en ausencia de zinc⁽¹⁾.

Una noche de abril de 1983⁽¹⁾ encontró la solución a ese problema y muchas otras

cosas más que ni se imaginaba, al realizar un experimento con la enzima DNA polimerasa dos veces para:

- 1.- Eliminar los NTPs extraños de la muestra
- 2.- Incorporar los ddNTP marcados.

El razonamiento que siguió para llegar a esta solución fue que si existían suficientes nucleótidos para interferir con el experimento, también serían suficientes para que la DNA polimerasa actuara sobre ellos.

Al correr la muestra en una reacción preliminar simulada en presencia de los cebadores y la polimerasa pero sin ddNTPs, se observa que se agotan los nucleótidos presentes en la muestra al ser incorporados por la extensión de los oligonucleótidos. Al aumentar la temperatura de la muestra, se logra la separación de los oligonucleótidos sintetizados e hibridados a la muestra de DNA. Los oligonucleótidos que han sido extendidos también se encontrarán presentes en la muestra, pero como habrá mayor cantidad de cebador sin extender en la mezcla, la muestra de DNA probablemente se hibridará con los cebadores que no han sido extendidos cuando la mezcla se enfríe. Posteriormente se puede añadir los ddNTPs y más DNA polimerasa para lograr realizar el experimento de secuenciación.

El doctor K. Mullis preocupado en si podría haber interferencia en la extensión de los cebadores de la reacción preliminar con la reacción subsecuente, repentinamente se dio cuenta que los oligonucleótidos extendidos presentarían la misma secuencia de bases que la muestra de DNA . **La reacción preliminar duplica el número de moléculas de DNA muestra.** Ese fue el principio de la reacción en cadena de la DNA polimerasa⁽¹⁾.

Posteriormente se percató de que podía producir secuencias de mayor tamaño

del DNA muestra, al diseñar cebadores que hibridaran a mayor distancia uno del otro. Los fragmentos siempre serían entidades discretas de una longitud específica.⁽¹⁾

Dado que la desnaturalización del DNA debe de hacerse a temperaturas elevadas donde la polimerasa es destruida, era preciso añadir enzima en cada ciclo, con lo que la técnica era cara y complicada⁽¹⁾.

Mullis convenció a un colega de Cetus que estudiaba bacterias que viven en los geisers (manantiales de agua caliente) submarinos, para que aislara una polimerasa que fuera termorresistente y obviara este último problema. Con el aislamiento de la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*⁽¹⁾ (o polimerasa Taq) la técnica de PCR se volvió un método sencillo susceptible de automatización, por lo que rápidamente fue patentada por Cetus. Esta polimerasa ahora se produce por ingeniería genética en bacterias⁽¹⁾.

Existen hoy en día numerosas variantes de la técnica original de PCR que permiten amplificar el DNA en las más diversas condiciones, introducir cambios aleatorios o dirigidos en regiones génicas determinadas, así como realizar pruebas diagnósticas para localizar mutaciones en secuencias problema. PCR es una de las técnicas más empleadas tanto en la investigación básica de biología molecular como en el diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias⁽³⁾. Dado el potencial de amplificar secuencias de DNA a partir incluso de una molécula, esta técnica ha sido acoplada a metodologías de identificación de individuos por medio de las llamadas *huellas génicas*, usadas en medicina forense e investigaciones criminalísticas, así como es el caso de restos arqueológicos orgánicos, dando

origen a una nueva ciencia: la paleontología molecular.

La polémica patente de Cetus, que cubre el concepto general de PCR, está actualmente en posesión de Hoffmann La Roche⁽³⁾ e impide a cualquier compañía o investigador realizar el proceso sin el uso de la enzima Amplitaq™ o similar.

En 1993, Karl Mullis recibió el premio Nobel de Química⁽³⁾.

BASES TEORICAS: REPLICACION DEL DNA

La estructura de doble helicoide del DNA, propuesta por Watson y Crick en 1953⁽²⁾ y basada en patrones de difracción de rayos X de fibras de DNA posee entre otras las siguientes características⁽²⁾:

- a) Existen dos cadenas helicoidales de polinucleótidos que se encuentran orientadas en direcciones opuestas y giran alrededor de un eje común formando una doble hélice dextrógira.
- b) Las bases de purina y de pirimidina se encuentran ubicadas en el interior de la hélice, mientras que las unidades de fosfato y de desoxiribosa lo están en el exterior. Los planos que contienen las bases son perpendiculares al eje de la hélice. Los planos que contienen los azúcares forman ángulos casi rectos con las bases.
- c) La adenina (A) se aparea con la timina (T), y la guanina (G) con la citosina (C); los pares de bases AT son estabilizados por dos puentes de hidrógeno dirigidos con precisión, y los pares GC lo están por tres puentes. Asimismo la hélice es estabilizada por interacciones entre las bases pertenecientes a la misma hebra.
- d) El diámetro de la hélice es de 20 Å. Las bases adyacentes son separadas 3.4 Å a lo largo del eje de la hélice y desplazadas por una rotación de 36 grados. Por lo tanto, la estructura helicoidal se repite cada diez residuos; es decir a intervalos de 34 Å.
- e) La secuencia de bases a lo largo de la cadena del polinucleótido no está restringida en modo alguno. **La secuencia precisa de bases codifica y transporta la información genética.**

La replicación del DNA es semiconservativa, cada una de las dos hebras sirve de molde para su replicación. El mecanismo semiconservativo de la replicación, significa que una de las dos cadenas de cada molécula hija de DNA se sintetiza de nuevo, mientras que la otra que deriva de la molécula de DNA parental, se conserva^(2,3a).

Las dos hebras pueden separarse fácilmente cuando se escinden los enlaces de hidrógeno entre las bases apareadas. Esto puede lograrse calentando la disolución del DNA o bien añadiendo un ácido o álcali para ionizar sus bases. El desenrollamiento de la doble hélice se conoce como fusión porque ocurre bruscamente a una temperatura determinada. La temperatura de fusión (T_m) se define como aquella temperatura en la cual se desnaturaliza la mitad de la estructura helicoidal. La fusión del DNA se puede determinar midiendo la absorbancia a 260 nm⁽²⁾.

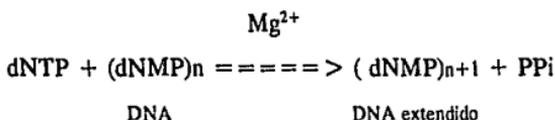
La temperatura de fusión de una molécula de DNA depende en gran medida de su composición de bases. Las moléculas ricas en pares de bases GC tienen temperaturas de fusión más elevadas que las que tiene abundancia de pares AT. Los pares GC son más estables que los AT porque se mantienen unidos por tres enlaces de hidrógeno en vez de dos⁽²⁾.

Las hebras complementarias de DNA separadas se reasocian espontáneamente formando una doble hélice cuando la temperatura desciende por debajo de la T_m .

Durante la replicación del DNA intervienen de un modo interrelacionado y coordinado más de 20 proteínas, entre ellas las DNA polimerasas^(2a,3a).

La DNA polimerasa I no es la enzima que replica la mayor parte del DNA en *E. coli*, sin embargo juega un papel crítico en la replicación y también en la reparación del DNA. Por otra parte, es la DNA polimerasa más sencilla y la mejor conocida^(2a).

La DNA polimerasa I es un monómero de 103 kd, que cataliza la adición de las unidades desoxirribonucleotídicas a la cadena de DNA. Para ello requiere de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), además de Mg^{2+} . Esta enzima adiciona desoxirribonucleótidos en el 3'-OH libre de la cadena que sufre la elongación, la cual avanza en sentido 5'-->3'.



Se requiere para comenzar una cadena cebadora con un grupo 3'-OH libre. También es esencial un DNA molde que contenga una región con una sola hebra. La DNA polimerasa cataliza el ataque nucleofílico del 3'-OH terminal de la cadena cebadora al átomo de fósforo más interno de un dNTP. Se forma un puente fosfodiéster con eliminación de pirofosfato. La subsecuente hidrólisis del pirofosfato PPi por una pirofosfatasa inorgánica favorece la reacción. La DNA polimerasa I es una enzima moderadamente progresiva: cataliza múltiples pasos de polimerización (aproximadamente 20) antes de disociarse del DNA molde.^(2a,4)

Una característica que llama la atención sobre esta enzima, es que recoge las instrucciones de secuencia de su molde. Fue la primera enzima dirigida por molde

que se descubrió. La polimerización se cataliza por un solo centro activo que puede enlazarse a cualquiera de los cuatro dNTPs. El enlace a uno u otro depende de la base correspondiente de la hebra molde. La probabilidad de que se forme un enlace y de que se establezca un puente fosfodiéster es muy pequeña, a menos que el nucleótido que llegue forme puentes de hidrógeno con el nucleótido complementario de la hebra molde^(2a).

Otro aspecto llamativo de la DNA polimerasa I es que corrige los errores del DNA eliminando los nucleótidos erróneamente apareados. Estas propiedades de la DNA polimerasa I contribuyen a la excepcional fidelidad en la replicación del DNA, que tiene una tasa de error inferior a uno por cada 10^8 bases^(2a).

La DNA polimerasa I posee un grupo sulfhidrilo, que no participa en la reacción, también presenta un puente disulfuro. La enzima contiene un átomo de zinc en el sitio activo, el cual es esencial para su actividad. La molécula es esférica y tiene un diámetro aproximadamente de 6.5nm, en comparación con el diámetro de la doble hélice de DNA que es de 2nm. La enzima puede adicionar hasta 1,000 nucleótidos por minuto por molécula de enzima a 37°C ⁽⁴⁾.

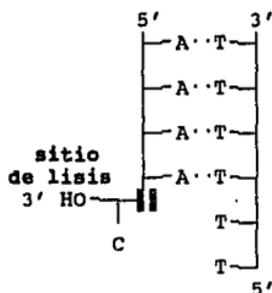
ACTIVIDAD DE EXONUCLEASA 3'-->5'

La DNA polimerasa puede catalizar la hidrólisis de cadenas de DNA además de la actividad como polimerasa que ya había sido mencionada^(2a). La enzima, como se observa en la figura N. 1a, cataliza la hidrólisis de los nucleótidos del extremo 3' de las cadenas de DNA, las condiciones^(2a,3a) que debe de cumplir este nucleótido además de no ser complementario son : el tener un extremo 3'-OH

libre y no ser parte de una doble hélice. por lo tanto, la DNA polimerasa I presenta actividad de exonucleasa 3'-->5' lo cual tiene una función correctora en la polimerización.

La DNA polimerasa I elimina los residuos no complementarios del extremo cebador antes de proseguir con la polimerización, y examina el resultado de cada polimerización que cataliza antes de la incorporación del siguiente nucleótido. Esta actividad mejora en gran medida la exactitud de la replicación del DNA porque sirve como segundo examen de corrección del emparejamiento de las bases. Los virus que poseen una DNA polimerasa con actividad de exonucleasa 3'-->5' disminuida tienen una tasa de mutación mucho mayor de lo normal. Por el contrario, los fagos con actividad de exonucleasa mejorada tienen disminuida la tasa de mutaciones espontáneas.

Figura N° 1a. Actividad de exonucleasa 3'-->5' (2a)



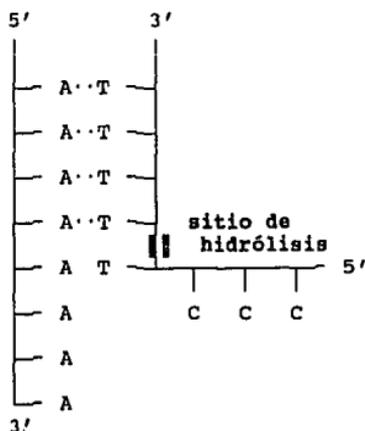
ACTIVIDAD DE EXONUCLESA 5'-->3'

La DNA polimerasa I también puede hidrolizar al DNA a partir del extremo 5' de la cadena, siendo ésta una función muy diferente a la antes mencionada^(2a)

(figura N° 1b). El enlace escindido debe de estar situado en una región de doble hélice. En segundo lugar, la escisión puede ocurrir en el enlace fosfodiéster terminal o en un enlace situado a varios residuos de distancia del extremo 5' (el cual puede llevar un grupo hidroxilo libre o fosforilado). Además, la actividad de exonucleasa 5'-->3'^(2a) aumenta cuando hay síntesis simultánea de DNA. El centro activo para esta actividad, se encuentra separado del centro activo para la polimerización y la hidrólisis 3'-->5'. La DNA polimerasa I posee tres diferentes sitios activos en una sola cadena polipeptídica^(2a) (figura N° 1c).

La actividad exonucleásica 5'-->3' juega un papel clave en la replicación del DNA porque elimina al RNA cebador, además participa corrigiendo errores de diferente tipo a los que corrige la polimerasa por su acción 3'-->5'. Por ejemplo la exonucleasa 5'-->3' participa en la escisión de los dímeros de pirimidina que se forman por exposición del DNA a la luz ultravioleta^(2a).

Figura N° 1b. Actividad de exonucleasa 5'-->3'^(2a)



La monocadena polipeptídica de la DNA polimerasa puede dividirse por la acción de ciertas enzimas proteolíticas en dos fragmentos (figura N° 1c) . El primero es pequeño, de 36 kd con toda la actividad de exonucleasa 5'-->3' original, y el segundo es de 67 kd, también llamado fragmento de Klenow, con el conjunto de las actividades de polimerasa y de exonucleasa 3'-->5'^(2a).

Figura N°1c. DNA polimerasa I de *E. coli*^(2a)

Exonucleasa 5'-->3'	Exonucleasa 3'-->5'	Polimerasa
Fragmento pequeño	Fragmento grande (fragmento de Klenow)	

Los estudios de cristalografía con rayos X realizados al fragmento de Klenow han revelado que está formado por dos dominios distintos. El dominio pequeño, probablemente contiene el centro exonucleásico 3'-->5' porque se une a los desoxirribonucleósidos monofosfato, lo que inhibe la actividad de nucleasa pero no la de polimerasa. El grupo fosfato del dTMP se une en seguida a un ión Zn²⁺. El dominio mayor forma una estructura con una hendidura profunda que se parece a una mano derecha que sostienen una varilla. La hendidura tiene una anchura de 25 Å, una profundidad de 30 Å y una longitud de alrededor de 50 Å. El centro exonucleásico del dominio pequeño está a 25 Å del centro de la polimerasa del dominio grande. Una posibilidad sugestiva es que la cadena de DNA en crecimiento permanezca en el centro de la polimerasa hasta que se detecte un par de bases erróneas, lo que desencadenaría su translocación al centro exonucleásico

3'-->5' para la escisión^(2a).

La actividad de DNA polimerasa también se ha encontrado en otras bacterias. Gracias al trabajo efectuado en los laboratorios de F. J. Bollum, J.N. Davidson y el de otros investigadores^(2a), se ha encontrado esta actividad en células animales y vegetales. Además, las células eucariontes contienen múltiples formas de DNA polimerasas, las cuales difieren en peso molecular, en localización (nucleares, citoplasmáticas, mitocondriales)⁽⁴⁾.

La **DNA polimerasa II** fue descubierta en los laboratorios de M. L. Gefter, C.C. Richardson y R. Knippers de forma casi simultánea^(2a). Es característica su inhibición por agentes bloqueadores de grupos sulfhidrilo, a diferencia de la DNA polimerasa I que no se ve afectada por este tipo de compuestos. Su masa molecular relativa es muy similar, pero su actividad es mucho menor, alrededor del 5% del de la DNA polimerasa I. No posee actividad de exonucleasa 5'-->3', y sus requerimientos son más estrictos tanto para el cebador como para la hebra molde, ya que únicamente es efectivo para DNA de doble cadena con espacios vacíos o extremos con cadena sencilla de menos de 100 nucleótidos. Se cree que puede estar involucrada en procesos de reparación del DNA, pero las mutantes de *E. coli* que carecen de esta enzima, no muestran deficiencias en la replicación ni en su crecimiento^(3a).

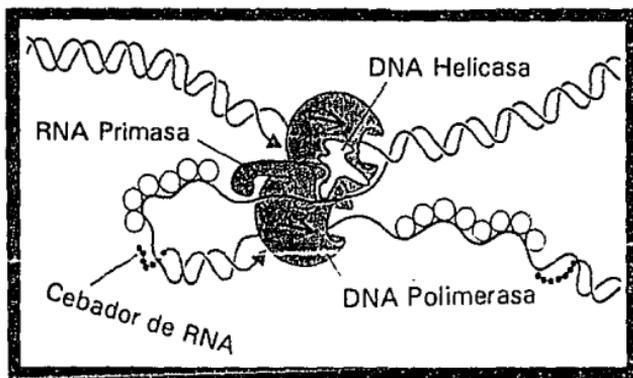
La **DNA polimerasa III** fue descubierta en 1972 por T. Kornberg (quien es hijo de A. Kornberg) y M.L. Gefter^(2a). Es la polimerasa más activa de las tres, siendo

15 veces más activa que la polimerasa I y 300 veces más activa que la II. Esta polimerasa, también es inhibida por los reactivos bloqueadores de grupos sulfhidrilo y presenta actividad de exonucleasa 3'-->5'^(2a).

REPLICACION DEL DNA

La replicación del DNA en *E. coli* comienza en un origen único (oriC) y prosigue secuencialmente en direcciones opuestas. La proteína dnaB, una helicasa dependiente de ATP, desenrolla la región oriC para crear una horquilla de replicación. En esta horquilla, ambas hebras del DNA parental sirven de molde para la síntesis del nuevo DNA (figura N° 2). La síntesis del DNA se inicia con un fragmento corto de RNA formado por la "primasa", una RNA polimerasa. Una hebra de DNA (la hebra líder) se sintetiza de forma continua, mientras que la hebra rezagada se sintetiza de forma discontinua, por medio de fragmentos de 1kb de longitud conocidos como fragmentos de Okazaki. Ambas hebras nuevas se forman por la acción de la holoenzima DNA polimerasa III en la horquilla de replicación. El ensamblaje discontinuo de la hebra rezagada permite que la polimerización 5'-->3' a nivel atómico produzca un crecimiento global de esta hebra en sentido 3'-->5'. La primera porción de RNA (cebador) se hidroliza por la actividad exonucleasa 5'-->3' de la DNA polimerasa I, que también es quien rellena los huecos. Finalmente, los fragmentos del nuevo DNA se unen por la DNA ligasa en una reacción dirigida por ATP o NAD⁺. El desenrollamiento del DNA de la horquilla de replicación está catalizado por la proteína rep, una helicasa dependiente de ATP. La DNA girasa también realiza un papel clave introduciendo superenrollamientos negativos y permitiendo que el dúplex hijo se separe del parental^(2a,5,6,7).

Figura N° 2. Mecanismo de Replicación del DNA^(6,7)



FUNDAMENTO DE LA TECNICA DE PCR

Esta técnica se basa en la acción de una enzima, la DNA polimerasa, la cual es capaz de replicar una hebra nueva formada por nucleótidos complementarios, tomando como modelo una de las hebras del DNA. La estrategia consiste en amplificar una secuencia de DNA por medio de la DNA polimerasa a partir de una pequeña muestra de DNA, en presencia de dos oligonucleótidos o cebadores, que delimitan la región que se va a amplificar, los cuales se unen al extremo 3' de cada una de las cadenas de DNA. El fragmento de DNA sintetizado, generalmente posee de 50 a 2,500 nucleótidos^(8,9).

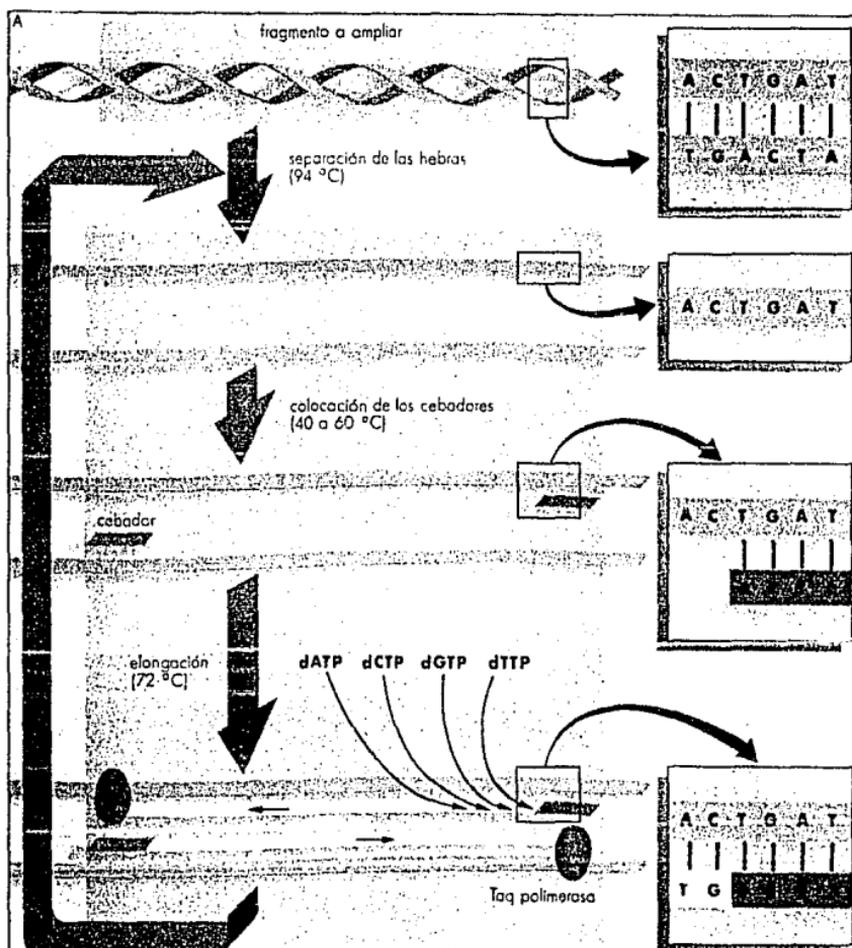
Cada ciclo de amplificación consta de tres etapas (**figura N°3**) :

1.- **DESNATURALIZACION.**- La doble hélice de DNA se calienta a 94°C, lo que permite romper los puentes de hidrógeno existentes entre las bases de las dos hebras.

2.-**UNION DE LOS CEBADORES.**- La temperatura se disminuye hasta aproximadamente 50°C en presencia de los cebadores. Entonces, estos se unen específicamente en los extremos de la región a amplificar, cada uno en la hebra que le corresponde.

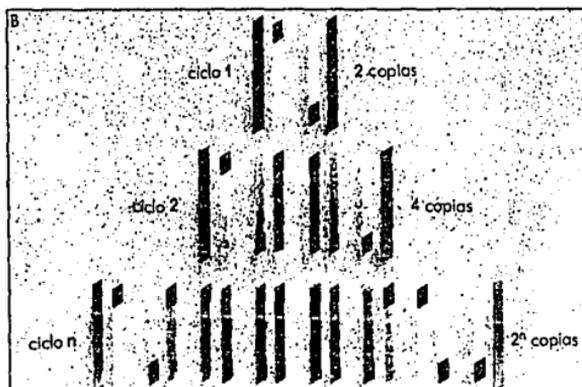
3.-**ELONGACION.**- La temperatura se eleva a 72°C; la DNA polimerasa alarga las nuevas hebras de DNA a partir de los cebadores, uniendo nucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dTTP y dCTP).

Figura N° 3. Fundamento de la Técnica de PCR⁽⁸⁾



Estas operaciones constituyen un ciclo de amplificación y resultan dos nuevas copias del fragmento de DNA. En el ciclo de amplificación siguiente, que pasa por las mismas tres etapas (desnaturalización y separación de hebras, unión de los cebadores y elongación), estas nuevas hebras servirán, a su vez, de matrices para la DNA polimerasa. De este modo se obtienen 2^n fragmentos después de n ciclos. El aumento del número de moléculas de DNA es exponencial, como se observa en la figura N° 4. En la práctica el rendimiento es menor, y desciende cuando el número de copias es alto con respecto al número inicial.

Figura N° 4. Amplificación Exponencial⁽⁶⁾



DNA POLIMERASAS EN PCR

Inicialmente, la técnica de PCR empleaba la polimerasa I de *E. coli*, específicamente el fragmento Klenow (PO1I-kF) para la extensión de los cebadores. Esta enzima se inactivaba por las elevadas temperaturas que se requieren para separar las dos hebras del DNA al comienzo de cada ciclo, por lo tanto se requería adicionar enzima fresca a cada nuevo ciclo.⁽¹⁰⁾

Características y Propiedades de la Enzima DNA Polimerasa Taq

Thermus aquaticus cepa YT1, es una eubacteria termófila, capaz de desarrollarse a 70-75°C. Originalmente, fue aislada de un manantial de agua caliente en el Parque Nacional de Yellowstone y descrita por primera vez hace más de veinte años (Brock y Freeze 1969⁽¹⁰⁾).

Puede presentar actividad específica de polimerasa de 200,000 U/mg (S. Sofftel, en preparación), migra en SDS-PAGE ligeramente más rápido que la Fosforilasa B (97.3 kDa) y tiene una masa molecular relativa inferida (de acuerdo a la información de su secuencia) de 93,910 Da (Lawyer et al 1989)^(10,11,12).

Efecto de la Temperatura

La temperatura óptima que presenta depende de la secuencia de DNA a extender pero se encuentra entre 75-80°C. Su velocidad de polimerización es cercana a 150 nucleótidos/ segundo / enzima. A temperaturas inferiores su actividad disminuye, esto puede implicar un deterioro en la habilidad de la polimerasa para extender a través de regiones que presentan estructura secundaria intramolecular. También se observa baja actividad a temperaturas mayores a 90°C. La enzima resiste altas

temperaturas, la limitante es más bien la estabilidad del cebador y del DNA.⁽¹¹⁾

Mg²⁺ / dNTPs

La enzima es sensible a las concentraciones del ión magnesio, así como a la naturaleza y concentración de los iones monovalentes (D.H. Gelfand, en preparación) . El magnesio a altas concentraciones es inhibitorio, con 40-50% de inhibición a 10mM MgCl₂. Ya que los dNTP pueden unir Mg²⁺, la concentración precisa de magnesio que se requiere para la máxima activación de la enzima depende de la concentración en la que se encuentren los dNTPs^(11,12).

Actividad de Nucleasa / Fidelidad

La enzima DNA polimerasa Taq (94kD) purificada, además de la capacidad de polimerización, posee actividad de exonucleasa 5'-->3' pero carece de actividad de de exonucleasa 3'-->5' a diferencia de la polimerasa I de *E. coli* que presenta las tres actividades. A pesar que no se ha medido cinéticamente, la DNA polimerasa Taq parece elongar en forma menos eficiente un complejo cebador-DNA molde mal apareado que uno correctamente apareado. No sabe si la DNA polimerasa Taq contiene una actividad de exonucleasa 3'-->5' separada, que pueda estar asociada con la polimerasa *in vivo*. Debido a que el protocolo que se empleó para purificar la DNA polimerasa Taq nativa estaba destinado a obtener una enzima con una única cadena polipeptídica, podría ser que la subunidad asociada con esta actividad exonucleásica no se hubiera detectado^(11,12).

Sales Monovalentes e Inhibidores

Concentraciones modestas de cloruro de potasio (KCl) estimulan la velocidad de síntesis de la polimerasa Taq en un 50-60%, con un óptimo aparentemente a

50mM. Concentraciones mayores son inhibitorias.

Concentraciones bajas de urea, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), o formamida no modifican la actividad de la polimerasa Taq, a diferencia de la enzima Klenow que aumentan su actividad. Concentraciones mayores de algunos de ellos son inhibitorias^(11,12).

VENTAJAS DE EMPLEARLA:

a) La introducción de la DNA polimerasa termoc estable, polimerasa Taq, aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* transformó el método de PCR en una simple y robusta reacción, la cual pudo ser automatizada por un ciclizador térmico⁽¹⁴⁾.

b) El método de PCR inicial, empleando la enzima Klenow a 37°C, no era muy específico, se amplificaba el DNA hasta un millón de veces, pero lo que se obtenía, no era el fragmento deseado. Se calcula que su especificidad era de aproximadamente 10^7 . El uso de la polimerasa Taq, no sólo simplificó el procedimiento, sino que también aumentó la especificidad de la reacción. La más elevada temperatura óptima para esta enzima, (aproximadamente 75°C) permite el uso de temperaturas más elevadas para que ocurra la unión al cebador y la extensión aumentando el rigor de la reacción y minimizando la extensión de cebadores que se emparejan erróneamente con el DNA⁽¹⁴⁾.

c) Un problema que se presenta en esta técnica es que en los ciclos avanzados del proceso llega el momento en que la enzima no es suficiente para realizar la extensión de todos los complejos cebador-DNA molde que existen para ese ciclo, lo que conduce a una reducción en la eficiencia y la aparición de una meseta en la amplificación de la reacción. Esto ocurre mucho más tarde si se emplea la

polimerasa Taq en vez de la Klenow (en 30 ciclos en vez de 20 ciclos para 1 μ g de DNA genómico) debido a la mayor especificidad de la primera⁽¹⁴⁾.

d) El uso de la polimerasa Taq también permite la amplificación de fragmentos más largos (hasta de 10,000 pares de bases, aunque con menor eficiencia) que la enzima Klenow (menos de 400 pares de bases)⁽¹⁴⁾.

Además del aislamiento y purificación de la DNA polimerasa de *T. aquaticus*, también se han estudiado y parcialmente caracterizado las polimerasas de *Bacillus stearothermophilus*⁽¹¹⁾, otras especies de *Thermus*⁽¹¹⁾ y otras especies divergentes de las arqueobacterias. Estos organismos se incuban a temperaturas entre 60°C (*B. stearothermophilus*)⁽¹¹⁾ y 87°C (*S. solfataricus*)⁽¹¹⁾.

Existen otras enzimas se que se han explotado recientemente como la DNA polimerasa UITma⁽¹³⁾ la cual provino inicialmente de una eubacteria gram negativa y termorresistente llamada *Thermotoga maritima* (Tma), y ahora se obtiene por clonación y expresión en *E. coli*. Su temperatura óptima se encuentra entre 80 y 85°C, por lo que presenta una mayor estabilidad térmica que la DNA polimerasa Taq, además por el hecho de poseer la actividad exonucleásica 3'--> 5', muestra también una mayor fidelidad⁽¹³⁾. Sin embargo, esta enzima presenta ciertas desventajas, entre las que destaca el hecho de que hidroliza el DNA de cadena sencilla, además de ser mucho más lenta que la DNA polimerasa Taq para incorporar los nucleótidos. Esta enzima posee ciertos usos muy específicos entre los que sobresale la clonación. La DNA polimerasa Taq sigue siendo la enzima más ampliamente utilizada para PCR⁽¹³⁾.

COMPONENTES Y CONDICIONES GENERALES DE LA REACCION DE PCR

En vista de la gran cantidad de aplicaciones que presenta esta técnica, es casi imposible describir un juego de condiciones que garanticen éxito en todas las situaciones. Las condiciones de la reacción de PCR que se presentan a continuación deben de ser adecuadas para la mayoría de los casos, o por lo menos sirven como condiciones iniciales.

1.- La técnica de PCR generalmente se realiza en un volumen total de 100 μ l contenidos en un microtubo de 0.5 ml, se mezclan los componentes especificados en la tabla N° 1 y se cubre con aceite mineral.

Tabla N°1. Componentes de Reacción

Componente	Saiki R K (1989) ⁽¹⁴⁾	Innis M A et al (1990) ⁽¹⁵⁾	Saiki R K (1989) ⁽¹⁶⁾
DNA muestra	10 ² a 10 ⁶ moléculas *	10 ⁵ a 10 ⁶ moléculas *	0.01 μ g
Cebadores	0.25 μ M	0.2 μ M	0.1-1 μ M
Amortiguador Tris-HCl (pH 8.4)	10 mM	20 mM	10 mM
DNA polimerasa Taq	2.5 unidades	2 unidades	2 unidades
dNTPs	200 μ M c/uno	50 μ M c/uno	200 μ M c/uno
MgCl ₂	1.5 mM	1.5 mM	1.5 mM
gelatina o albúmina sérica bovina	100 μ g/ml	100 μ g/ml	100 μ g/ml
KCl	50 mM	25 mM	50 mM

* 1 μg de DNA genómico humano de copia sencilla equivale a 3×10^5 moléculas blanco. 10 ng de DNA de levadura equivale a 3×10^5 moléculas blanco. 1 ng de DNA de *Escherichia coli* equivale a 3×10^5 moléculas blanco⁽¹³⁾.

La técnica de PCR se realiza al incubar las muestras a tres temperaturas diferentes, correspondiendo cada una de ellas a las etapas del ciclo: amplificación-desnaturalización, unión al cebador y extensión. Estos ciclos se pueden lograr de forma manual, mediante baños a las temperaturas adecuadas, o automáticamente con un ciclizador térmico⁽¹⁴⁾.

2.- El número de ciclos que se recomienda realizar es de 25 a 35 ciclos usando el siguiente perfil de temperaturas:

Desnaturalización : 94°C por 20 segundos⁽¹⁴⁾ o 96°C por 15 segundos⁽¹⁵⁾
(Generalmente es deseable un tiempo inicial mayor)

Unión del cebador : 55°C de 20-30 segundos.

Extensión : 72°C de 30 a 90 segundos.

3.- Los ciclos deben de finalizar con una extensión final a 72°C de 5 minutos. La reacción se detiene al enfriarla a 4°C y/o adicionar EDTA hasta una concentración de 10 mM.

Para optimizar la amplificación, o en aquellos casos en los cuales las condiciones antes mencionadas no producen los resultados deseados, la siguiente sección

describe la función y efectos de cada componente, así como algunas de las maneras en que se puede mejorar la técnica.

COMPONENTES DE LA REACCION

Concentración de Enzima:

Un rango de concentraciones recomendado para la enzima DNA polimerasa Taq (Perkin-Elmer Cetus) es entre 1 y 2.5 unidades (TSA = 20 unidades /pmol) para un volumen de reacción de 100 μ l cuando los demás parámetros se encuentran optimizados^(14,15). Sin embargo los requerimientos de enzima pueden variar con respecto a cebadores o a muestras de DNA particulares⁽¹⁵⁾.

Cuando se desea optimizar una técnica de PCR es recomendable ensayar con concentraciones de enzima que varíen desde 0.5 a 5 unidades / 100 μ l y valorar los resultados por electroforesis en gel⁽¹⁵⁾.

Si la concentración de enzima es muy alta, se pueden llegar a acumular productos inespecíficos de fondo y, si la concentración es muy baja, se produce una cantidad insuficiente del producto descado⁽¹⁵⁾.

La DNA polimerasa Taq se encuentra disponible de un número de distribuidores (Perkin-Elmer Cetus Instruments, New England Biolabs, Stratagene) por lo que se puede comportar de forma diferente ya que se trata de diferentes formulaciones, condiciones de ensayo y/o unidades^(14,15).

Desoxirribonucleótidos Trifosfato (dNTPs):

Las concentraciones de desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dTTP y dGTP)

deben ser entre 20 y 200 μM de cada uno, resultando en el balance óptimo de producción, especificidad y fidelidad^(14,15).

Los cuatro desoxirribonucleótidos deben de adicionarse en concentraciones equivalentes para minimizar errores de mala incorporación.

Las soluciones patrón de dNTPs deben de neutralizarse a pH 7 y sus concentraciones se determinan por espectrofotometría ultravioleta. Las soluciones ya neutralizadas se pueden obtener de diversas fuentes (USB, Sigma, Pharmacia). Se pueden adquirir a menor costo en forma de liofilizados, los cuales requieren su preparación en forma acuosa incluyendo la neutralización con NaOH y valorar su concentración⁽¹⁴⁾.

Los estándares primarios se diluyen a 10 mM, se alicuotan y almacenan a -20°C . es recomendable contar con una solución de trabajo de 1 mM de cada dNTP. La estabilidad de los dNTPs durante los ciclos de PCR es tal que el 50% permanece como dNTP después de 50 ciclos⁽¹⁵⁾.

La especificidad y la fidelidad del PCR se incrementan al emplear menores concentraciones de dNTPs que las que se empleaban cuando se utilizaba el fragmento Klenow de *E. coli* (1.5nM de cada uno)⁽¹⁵⁾.

Bajas concentraciones de dNTP minimizan los errores de unión del cebador y reducen la posibilidad de extender los nucleótidos mal incorporados.

En cada caso se debe elegir la concentración mínima de dNTPs que sea suficiente

para la composición y longitud de la secuencia blanco. Por ejemplo 20 μM de cada dNTP en una reacción de 100 μl es teóricamente suficiente para sintetizar 2.6 μg de DNA ó 10 pmol de una secuencia de 400 pares de bases⁽¹⁵⁾.

Concentración de Magnesio:

Aporta gran beneficio a la técnica optimizar la concentración de magnesio. La concentración de magnesio puede afectar lo siguiente⁽¹⁵⁾:

- a) unión del cebador
- b) temperatura de disociación del DNA muestra y del producto
- c) especificidad del producto
- d) formación de artefactos como los dímeros de cebador
- e) fidelidad y actividad de la enzima.

Generalmente concentraciones excesivas de magnesio resultarán en la acumulación de productos inespecíficos de amplificación, y concentraciones subóptimas del ión disminuyen la producción de DNA⁽¹⁴⁾.

En vista de que los dNTPs aparentemente se unen en forma cuantitativa al ión Mg^{2+} , la cantidad de dNTPs presente en la reacción determinará la cantidad de magnesio libre disponible para la enzima. La concentración de magnesio debe de ser de 0.5 a 2.5 mM por encima de la concentración total de dNTPs⁽¹⁵⁾. Por ejemplo cuando la concentración total de dNTPs es de 0.8 mM, si se adiciona 1.5 mM de MgCl_2 queda libre 0.7 mM de magnesio para la enzima. Cuando se modifican las concentraciones de dNTPs hay que compensar modificando también la concentración en el MgCl_2 ⁽¹⁴⁾.

La presencia de EDTA u otro agente quelante en alguna de la soluciones o en la muestra de DNA puede perturbar la concentración, aparentemente óptima, de magnesio⁽¹⁵⁾.

Selección de Cebadores

Las concentraciones óptimas de cebadores son generalmente de 0.05 a 0.5 μM ^(15,16). Concentraciones mayores promueven la unión equivocada al DNA molde y la acumulación de producto inespecífico, además pueden aumentar la probabilidad de generar artefactos como los llamados **dímeros de cebador**⁽¹⁵⁾.

Los productos inespecíficos y los dímeros de cebador se vuelven sustrato para los subsecuentes ciclos de PCR y compiten con el producto deseado por la enzima, dNTPs y cebadores, resultando una baja síntesis del producto deseado⁽¹⁵⁾.

La mayoría de los cebadores poseen de 20 a 30 pares de bases y presentan una composición de G + C del 50 al 60%⁽¹⁵⁾. Se pueden sintetizar cebadores más largos, pero generalmente no son necesarios.

Desafortunadamente la selección o diseño de un cebador específico y eficiente sigue siendo de forma empírica. No existe un juego de reglas que asegure un par de cebadores efectivos. Sin embargo existe una serie de reglas o guías para ayudar en el diseño de un cebador eficiente. Entre ellas se encuentran las siguientes⁽¹⁴⁾:

a) Generalmente los cebadores poseen 20 a 30 pares de bases y su composición es de 50 al 60% G + C⁽¹⁵⁾.

b) Las T_m calculadas para un par de cebadores deben ser balanceadas. Para este propósito se pueden calcular otorgándole 2°C a cada A ó T y 4°C a cada G ó C (dependiendo de la aplicación, las T_m varían entre 55 y 80°C)⁽¹⁵⁾.

c) Se debe evitar cuando sea posible, secuencias (de 3 o más) de C ó G en el extremo 3' de los cebadores pues esto puede promover una unión equivocada en regiones ricas en G + C y también secuencias palindrómicas⁽¹⁵⁾.

d) Se recomienda elegir un cebador con una distribución al azar de bases y un contenido de G,C similar al fragmento que se desea amplificar. Se debe de tratar de evitar cebadores que contengan secuencias de polipurinas, polipirimidinas u otras secuencias inusuales⁽¹⁴⁾.

e) Evitar secuencias con estructura secundaria significativa, particularmente en el extremo 3'. Existen programas de computación como el " Squiggles" o " Circles" que son muy útiles para detectar estas estructuras⁽¹⁴⁾.

f) Hay que analizar los cebadores entre sí para asegurarnos de que no exista complementaridad entre sus bases. En particular hay que evitar la complementaridad en los extremos 3' de los cebadores, ya que ésto promueve la formación de dímeros de cebadores, lo que disminuye la síntesis del producto deseado^(14,15).

Secuencias que no sean complementarias al DNA matriz pueden ser incorporadas al extremo 5' del cebador. Estas secuencias exógenas son incorporadas al producto de PCR (doble hélice) y representan un instrumento para introducir sitios de

restricción, un codon de inicio ATG o elementos regulatorios (por ejemplo: promotores) al final de las secuencias amplificadas^(14,15).

Se puede incorporar internamente bases mal apareadas para analizar mutagénesis⁽¹⁵⁾. Los cebadores degenerados se pueden emplear para aislar genes nuevos en base a su similaridad y/o secuencia de aminoácidos. Si se requieren cebadores cortos o degenerados, estos se pueden usar siempre y cuando el perfil térmico de la reacción se encuentre adaptado para reflejar la baja estabilidad del DNA matriz unido al cebador. (Para cebadores altamente degenerados, es preferible que la secuencia menos ambigua se encuentre en el extremo 3' del cebador, hasta el grado de sintetizar una serie múltiple en la cual las diferentes permutaciones de la secuencia 3' se mantengan constantes)⁽¹⁴⁾.

Dímeros de Cebador:

Son artefactos producto de la amplificación del DNA que se observan en el producto del PCR, especialmente cuando se realizan muchos ciclos de amplificación en una muestra que contiene inicialmente muy pocas copias del DNA matriz⁽¹⁵⁾. Los fragmentos de DNA de doble cadena que se forman, son de longitud similar a la suma del tamaño de los dos cebadores, debido a que estos se producen por la superposición de algunas bases entre ellos. El resultado de esto, es una elongación de ambos cebadores en la misma molécula. La concatenación resultante, es DNA matriz muy eficiente que si ocurre en los primeros ciclos del proceso, su amplificación sobrepasa a la del DNA muestra volviéndose el producto mayoritario al final de la reacción⁽¹⁵⁾.

El mecanismo por el que se forman los dímeros de cebador aún no es completamente claro, la observación de que cebadores que son complementarios

en el extremo 3' están predispuestos a formar estos dímeros sugiere que el evento inicial sea la interacción pasajera que ocasiona que los extremos terminales se encuentren cerca el uno del otro. Diversas polimerasas, incluyendo a la Taq, han demostrado poseer una débil actividad de polimerización no dirigida por un DNA molde, por la cual pueden adicionar bases a un dúplex despuntado ("blunt-ended"). Si esta actividad ocurriera también en el DNA de cadena sencilla, existe una buena posibilidad de que la extensión formara un pequeño traslape en el extremo 3' con el otro cebador, suficiente para producir la dimerización⁽¹⁵⁾.

OTROS COMPONENTES DE LA REACCION:

Amortiguador

Un amortiguador que se recomienda para la técnica de PCR es Tris-HCl de 10 a 50 mM (con un pH entre 8.3 y 8.8 medido a 20°C). No se ha realizado un estudio acerca de otros amortiguadores diferentes⁽¹⁵⁾.

El amortiguador de Tris es un amortiguador iónico, dipolar, que presenta un pKa de 8.3 a 20°C y un delta pKa de -0.021/°C . El valor real de pH del Tris 20 mM (pH 8.3 a 20°C) varía entre 7.8 y 6.8 en las condiciones típicas de ciclización térmica⁽¹⁵⁾.

Sales

Para facilitar la unión del cebador con el DNA matriz se puede adicionar hasta 50 mM de KCl. Concentraciones mayores a 50 mM inhiben la actividad de la DNA polimerasa Taq . El NaCl puede ser adicionado pero en concentraciones menores a 50 mM, pues de otra forma resulta inhibitorio para la enzima⁽¹⁵⁾.

Disolventes:

Mientras que el DMSO es útil para PCR con el fragmento Klenow de *E. coli* (ayuda a reducir la estructura secundaria del DNA muestra), al 10% inhibe la actividad de la DNA polimerasa Taq en un 50%, por lo que no se recomienda para la mayoría de las aplicaciones⁽¹⁵⁾.

Detergentes y Proteínas

La gelatina o albúmina sérica bovina en concentraciones de 100 µg/ml y detergentes no iónicos como el Twin 20 o el Laureth 12 (0.05 al 0.1%; Mazner Chemicals, Gurnee, Illinois) se incluyen para estabilizar a la enzima. Se prefiere la gelatina a la albúmina sérica bovina, ya que esta última es más fácil que se coagule durante la etapa de desnaturalización, además la gelatina se puede esterilizar en autoclave. Varios de los protocolos funcionan adecuadamente sin la presencia de proteína⁽¹⁵⁾.

ETAPAS DE LA REACCION

Tiempo y Temperatura de Desnaturalización

La causa más frecuente de falla de la técnica de PCR es por una **desnaturalización incompleta** del complejo DNA molde y/o del producto de PCR⁽¹⁵⁾.

Las condiciones típicas de desnaturalización son de **95°C por 30 segundos** o **97°C por 15 segundos**; sin embargo temperaturas mayores pueden ser apropiadas, especialmente para moléculas ricas en pares G + C, por las razones antes mencionadas⁽¹⁵⁾. Solamente se requiere de unos segundos para desnaturalizar al

DNA en su T_m , sin embargo puede haber un intervalo requerido para alcanzar la T_m dentro del tubo de reacción, con respecto a la del baño. Por esta razón es conveniente monitorear la temperatura dentro del seno de la reacción⁽¹⁵⁾, ésto se puede lograr por medio de un termopar (Cole Parmer) y un multímetro digital⁽¹⁴⁾.

La desnaturalización incompleta permite al DNA reasociarse entre sí, ocasionando que se reduzca la amplificación⁽¹⁵⁾.

En cambio, procesos de desnaturalización que son muy largos y/o que la temperatura es muy alta, conducen a una innecesaria pérdida de la actividad enzimática⁽¹⁵⁾. La vida media de la DNA polimerasa Taq es: mayor a 2 horas a 92.5°C, 40 minutos a 95°C y 5 minutos a 97.5°C⁽¹⁵⁾.

Unión al Cebador

La temperatura y tiempo requeridos para la unión del cebador depende de varios factores intrínsecos de los cebadores⁽¹⁴⁾:

- a) composición de bases (G + C)
- b) longitud
- c) concentración a la que se encuentran

Una temperatura aplicable para la unión es de 5°C por debajo del T_m verdadero de los cebadores. En vista de que la DNA polimerasa Taq es activa en un amplio intervalo de temperaturas, la extensión del cebador ocurre a bajas temperaturas, incluyendo la de la etapa de unión al DNA molde⁽¹⁵⁾.

El intervalo de actividad enzimática varía dos órdenes de magnitud entre los

20°C y 85°C. Las temperaturas de unión entre 55°C y 72°C generalmente dan los mejores resultados⁽¹⁵⁾. A las concentraciones típicas de cebador (0.2 μ M) el proceso de unión al DNA molde requiere únicamente de unos segundos, ya que el cebador en la muestra se encuentra en exceso lo que permite una hibridación con el DNA molde casi instantánea⁽¹⁴⁾.

Al incrementar la temperatura de unión, aumenta la discriminación del cebador hacia el apareamiento a secuencias incorrectas y se reduce la extensión con nucleótidos incorrectos en el extremo 3' de los cebadores. Por lo tanto, temperaturas de unión estrictas en los primeros ciclos, ayudan a aumentar la especificidad⁽¹⁵⁾.

Para lograr la máxima especificidad en los ciclos iniciales (que son los que presentan el mayor problema potencial de amplificación parásita) la polimerasa puede ser adicionada después del primer paso de desnaturalización, durante el primer período de unión⁽¹⁵⁾.

Las temperaturas bajas de extensión, junto con altas concentraciones de dNTPs favorecen las extensiones erróneas de los cebadores, así como la extensión de nucleótidos incorporados en forma equivocada⁽¹⁵⁾.

Por las razones antes mencionadas, algunos investigadores argumentan que las técnicas de PCR se deben desarrollar usando cebadores más largos y sometiendo la reacción a sólo dos temperaturas. Por ejemplo de 55° a 75°C para la unión y extensión y de 94° a 97°C para la desnaturalización y separación de hebras^(14,15).

En algunas situaciones, únicamente se encuentran disponibles cebadores constituidos por 12 a 15 bases y que requieren de una temperatura de unión de 40 a 45°C⁽¹⁴⁾. Sin embargo, los cebadores de esta longitud no permanecen unidos al DNA molde a la temperatura de elongación (72°C). El problema puede resolverse aprovechando la actividad parcial enzimática de la polimerasa a bajas temperaturas para elongar los cebadores en cierto número de bases, lo cual los estabiliza. Esto se logra en la práctica por medio de una incubación intermedia a 50-60°C o por un calentamiento gradual de 40 a 72°C⁽¹⁴⁾.

Los cebadores degenerados frecuentemente presentan múltiples pares mal apareados con el DNA molde, por lo que se sugiere un tratamiento como el antes mencionado⁽¹⁴⁾.

Elongación del Cebador

El tiempo requerido para la elongación del cebador depende de⁽¹⁵⁾:

- a) la longitud del DNA molde
- b) la concentración del DNA molde
- c) la temperatura de reacción

Las extensiones se realizan tradicionalmente a 72°C ya que esta temperatura está muy cerca de la temperatura óptima encontrada para la extensión de cebadores unidos al DNA del fago M13⁽¹⁵⁾.

Estimando la velocidad de incorporación de nucleótidos a 72°C varían de 35 a 100 nucleótidos / segundo dependiendo del amortiguador, pH, concentración de sales y naturaleza del DNA molde⁽¹⁵⁾.

Un tiempo de elongación de un minuto a 72°C se considera suficiente para productos hasta de 2 kb de longitud. Sin embargo, tiempos mayores de elongación pueden ser útiles en los primeros ciclos si la concentración de sustrato es muy baja, o en ciclos avanzados cuando la concentración de producto excede a la concentración de la enzima (aproximadamente 1nM)⁽¹⁵⁾.

El paso de extensión puede ser eliminado si la secuencia blanco posee 150 pares de bases o menos, ya que la polimerasa conserva en forma significativa su actividad a temperaturas menores y la elongación completa ocurrirá durante la transición térmica de la temperatura de unión a la de desnaturalización⁽¹²⁾.

Número de Ciclos

El número óptimo de ciclo depende principalmente de la concentración inicial del DNA muestra, cuando los demás parámetros se encuentran ya optimizados⁽¹⁵⁾.

Un error común es realizar demasiados ciclos. Citando al Dr Kary Mullis "If you have to go more than 40 cycles to amplify a single-copy gene, there is something seriously wrong with your PCR"⁽¹⁵⁾. Si requiere más de 40 ciclos para la amplificación de una sola copia de un gen, es que algo está seriamente mal con su técnica de PCR.

Demasiados ciclos pueden aumentar la cantidad y complejidad de productos inespecíficos de fondo (efecto meseta o "plateau"). Por otro lado, pocos ciclos generan poco producto⁽¹⁵⁾.

La tabla N° 2 proporciona una guía del número de ciclos propuestos de acuerdo a la concentración inicial de DNA molde:⁽¹⁵⁾

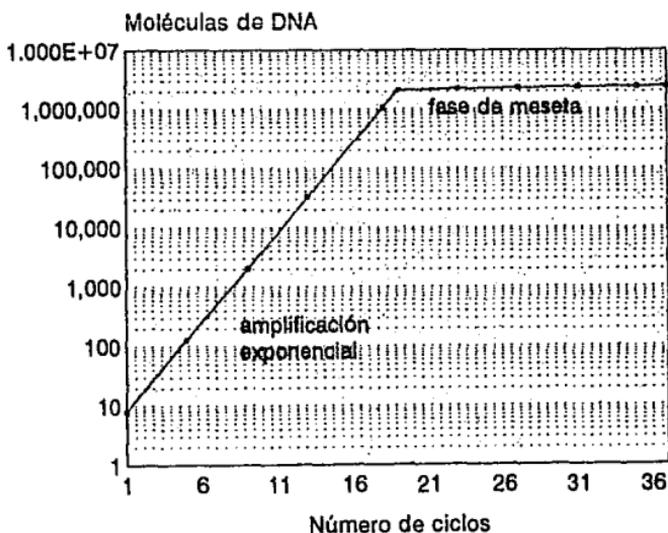
Tabla N° 2. Número de Ciclos de Amplificación⁽¹⁵⁾

Número de moléculas de DNA blanco	Número de ciclos
3×10^5	25 a 30
1.5×10^4	30 a 35
1×10^3	35 a 40
50	40 a 45

EFECTO MESETA O " PLATEAU"

La reacción de amplificación no es infinita, después de un cierto número de ciclos la amplificación del producto deseado deja de acumularse de forma exponencial y entra en una fase lineal o estacionaria como se observa en la figura N° 5.

Figura N° 5. Efecto Meseta o "Plateau"⁽¹⁷⁾



El término **efecto meseta** o "**plateau**" se emplea para describir la atenuación en la velocidad exponencial de la acumulación de producto, la cual ocurre en los ciclos avanzados de la técnica de PCR concomitantemente con la acumulación de 0.3 a 1 pmol del producto deseado^(15,14).

Dependiendo de las condiciones y ciclización térmica en que se realice la reacción, uno o más de los siguientes parámetros pueden influir en el tiempo en que se alcance la meseta⁽¹⁷⁾:

- 1.- Utilización de sustratos (dNTPs o cebadores, enzima)
- 2.- Competencia del DNA molde frente a los productos inespecíficos y los dímeros de cebador por los reactivos.
- 3.- Estabilidad de los reactivos (enzima o dNTPs)
- 4.- Retroinhibición por el producto (pirofosfato, DNA dúplex)
- 5.- Reasociación de los productos a concentraciones superiores a 10^8 .
- 6.- Desnaturalización o separación incompleta de los productos cuando éstos se encuentran en alta concentración.
- 7.- Destrucción del producto por la actividad exonucleásica 5'-->3' de la DNA polimerasa Taq.

Utilización de Reactivos y Competencia por ellos

Al inicio de la reacción la DNA polimerasa se encuentra en exceso, pero en ciclos más avanzados, puede ser insuficiente para extender todos los sistemas cebador-DNA molde que se formen⁽¹⁷⁾.

Los cebadores a su vez pueden llegar a ser insuficientes para unirse a todas las moléculas de DNA existentes en el medio, así como los dNTPs también pueden agotarse en el seno de la reacción⁽¹⁴⁾.

Las medidas para evitar estas causas de efecto meseta son el adicionar mayores cantidades de reactivos, pero ésto puede traer como consecuencia el problema de

aumentar la cantidad de productos inespecíficos que se formen, aunque se puede titular la cantidad de enzima en fases finales del ciclo cuando se sospeche que ésta sea el factor limitante⁽¹⁷⁾.

El producto deseado, los productos inespecíficos y los dímeros de cebador compiten por los reactivos, disminuyendo rápidamente su concentración. Para evitar las reacciones de competencia, se requiere que la reacción sea lo más específica posible, reduciendo así, la formación de productos inespecíficos⁽¹⁷⁾.

Estabilidad de reactivos

La actividad de la enzima en las condiciones de tiempo y temperatura normales es mayor al 50% después de 50 ciclos, pero si se realizan más ciclos su actividad disminuye considerablemente. Si se emplean temperaturas o tiempos mayores, la estabilidad no sólo de la enzima, sino también de los demás reactivos disminuye reduciéndose el tiempo requerido para alcanzar la meseta⁽¹⁷⁾.

Retroinhibición por el producto

Algunas reacciones enzimáticas se encuentran reguladas por la concentración de el o los productos finales, este tipo de control se conoce como retroinhibición o inhibición por productos finales. Es un mecanismo que permite ahorrar energía, ya que sigue la ley de acción de masas: a medida que se incrementa la concentración de producto, disminuye su síntesis⁽¹⁷⁾.

Reasociación del Producto

La cinética de la reacción (unión al DNA molde) está determinada por la molécula que se encuentre en mayor proporción. Al principio de la reacción, los cebadores se encuentran en exceso en el medio de reacción. A medida que progresa la reacción, la concentración de DNA molde aumenta y la concentración

de cebadores disminuye ligeramente, por lo que se requiere de mayor tiempo para que se forme el complejo cebador-DNA molde. Si las hebras del producto de DNA tienen la posibilidad de reasociarse entre sí, formando un complejo estable, los cebadores carecerán de un sitio de unión para realizar la elongación y por lo tanto no se duplicará el fragmento de DNA. Esta reasociación del DNA puede ocurrir en segundos (o en un tiempo más corto) cuando se trata de altas concentraciones de DNA⁽¹⁷⁾.

Disminución en la eficiencia de Desnaturalización

A medida que la concentración de DNA blanco aumenta, la temperatura de fusión (T_m) de ese dúplex también se incrementa⁽¹⁷⁾.

Si la temperatura que se emplea para desnaturalizar al DNA es muy cercana a la T_m inicial (90 a 92°C), a medida que avanzan los ciclos aumenta la concentración del DNA molde, la temperatura que existe en el seno de la reacción se vuelve insuficiente para lograr una desnaturalización completa (menor a la T_m), por lo que no habrá una síntesis exponencial del producto. Para evitar esta limitación es conveniente emplear una temperatura de desnaturalización un poco mayor (94 a 95°C) y tiempos suficientes para alcanzar la T_m ⁽¹⁷⁾.

Destrucción del DNA por la actividad de exonucleasa 5'-->3' de la Polimerasa

Esta actividad separa a los nucleótidos que se encuentren en el extremo 5' de la doble hebra de DNA. Cuando el DNA se encuentra en altas concentraciones en la reacción como resultado de los ciclos de amplificación, hay competencia entre la formación del complejo DNA molde-cebador con la reasociación de las hebras complementarias del DNA molde como fue descrito previamente. Si el cebador que está siendo elongado se encuentra con las hebras complementarias reasociadas, la

DNA polimerasa hidroliza la hebra que se reasoció. Ya que el producto hidrolizado es generalmente un DNA blanco generado en un ciclo previo, la amplificación se vuelve lineal, en vez de exponencial. Otro sustrato para la actividad exonucleásica 5'-->3' son los productos que poseen una estructura secundaria estable⁽¹⁷⁾.

La **MESETA** es un estado inevitable y por lo tanto, una limitación de la técnica de PCR. El tratar de amplificar más allá de la meseta inevitablemente conducirá a la amplificación de productos inespecíficos pudiendo llegar al grado de pérdida del fragmento deseado por la actividad de exonucleasa inherente de la DNA polimerasa. Sin embargo, cuando ésto ocurra, ya habrá sido generada una gran cantidad de DNA. En aquellos casos en donde se requiera una mayor cantidad de DNA, la mejor alternativa es realizar reacciones múltiples de la misma naturaleza⁽¹⁷⁾.

Para obtener mejores resultados se deben optimizar para cada caso las concentraciones de los componentes, los tiempos y las temperaturas de cada etapa⁽¹⁷⁾

Debido a las complejas interacciones que ocurren entre los componentes de esta técnica (principalmente entre los cebadores y el DNA muestra) y la amplia variedad de aplicaciones en que se utiliza esta técnica, es poco probable que algún día exista un juego de condiciones de amplificación que sean óptimas para todas las situaciones. En la mayoría de los casos, las condiciones generales que aquí se describen han dado buenos resultados. Cuando es necesario, ajustes menores a estos parámetros transforman un PCR marginal en uno con excelente productividad y especificidad⁽¹⁴⁾.

FIDELIDAD DE LAS DNA POLIMERASAS

El coeficiente de error se define como la proporción de nucleótidos no complementarios con respecto a los nucleótidos totales, que se incorporan en la replicación del DNA sintetizado⁽¹⁸⁾.

Estos coeficientes varían de acuerdo al tipo de polimerasa de que se trate. Las de mayor fidelidad, son las que poseen la actividad exonucleásica de corrección, ya que esta actividad permite quitar las bases mal insertadas. Esta corrección puede llegar a aumentar en algunos casos hasta el 100% la fidelidad⁽¹⁸⁾.

La polimerasa Taq no posee la actividad exonucleásica 3'→5' de corrección, por lo que su fidelidad no es tan buena presentando un error de sustitución de una base por cada 10,000 a 50,000 bases polimerizadas⁽¹⁸⁾.

En un estudio comparativo en el que se analizó la fidelidad de algunas DNA polimerasas (polimerasa I de *E. coli*, polimerasa T4, polimerasa Taq y polimerasa AMV (del virus de la mieloblastosis aviaria)) se encontró que la de menor fidelidad para catalizar la síntesis de DNA es la polimerasa Taq, la cual a 70°C presentó errores de sustitución de bases, así como de corrimiento en el marco de lectura (principalmente -1 base). Usando dNTPs en una concentración de 1mM para inhibir la relativamente débil actividad exonucleásica asociada con el fragmento Klenow de la polimerasa I de *E. coli*, esta enzima resultó con la misma fidelidad que la polimerasa AMV, siendo ambas de 2 a 4 veces más fieles que la polimerasa Taq. La enzima más fiel, tanto a altas como a bajas concentraciones de dNTPs fue la DNA polimerasa T4. ⁽¹⁸⁾

Parámetros que afectan la Fidelidad

La fidelidad de la síntesis de DNA depende de la polimerasa (y su actividad exonucleásica) que se emplea, del error específico que se considera, y de la secuencia de DNA del complejo DNA molde-cebador. Para cada una de estas variables se han reportado fluctuaciones mayores al 1000%; cuando se combinan, la variación total llega a ser enorme⁽¹⁸⁾.

Estudios realizados en varios laboratorios, han demostrado que la fidelidad de la síntesis *in vitro* del DNA se encuentra influenciada por las condiciones de la reacción. Son de importancia crítica las concentraciones relativas y absolutas de dNTPs⁽¹⁸⁾.

Desbalances relativos en las reservas de desoxinucleótidos trifosfato pueden ser causa de mutagénesis o antimutagénesis, dependiendo de la tendencia, inclinación de la reserva y de el o los errores en consideración. Esto refleja la probabilidad relativa de que la polimerasa pueda unir un nucleótido incorrecto, con respecto a uno correcto. La probabilidad de la inserción inicial errónea a su vez depende de la concentración absoluta de dNTPs, la cual también participa en la probabilidad de incorporar correctamente el siguiente nucleótido al par erróneo. Las inserciones erróneas que no han sido elongadas, deben de corregidas en forma eficiente si la polimerasa posee asociada la actividad exonucleásica correctora. En el caso de la polimerasa Taq, que carece de esta actividad correctora, los errores que no han sido elongados, se perderán en la reacción de PCR ya que no proporcionan productos de longitud completa para la subsecuente amplificación. Por lo tanto la fidelidad máxima se puede alcanzar al realizar la reacción de PCR con

concentraciones bajas pero iguales de los cuatro dNTPs⁽¹⁸⁾.

La fidelidad de la síntesis de DNA también puede ser afectada por la capacidad de polimerización. Los parámetros que alteran esto son: el pH de la reacción, el tipo y concentración del catión metálico divalente que se emplea para activar a la polimerasa, la concentración de dNTPs, y la fuerza iónica de la solución de reacción. Finalmente, la temperatura. La fidelidad de la polimerasa Taq varía menos del doble en reacciones realizadas a 55°C con respecto a reacciones a 70°C⁽¹⁸⁾.

La combinación óptima *in vitro* de las concentraciones de los dNTPs, la capacidad de polimerización y las condiciones de temperatura, pueden aumentar la fidelidad de las DNA polimerasa, generando reactivos más útiles para la técnica de PCR⁽¹⁸⁾.

MUESTRAS PARA PCR

Una de las principales ventajas que presenta esta técnica es la pequeña cantidad de muestra que requiere, así como la gran diversidad de muestras que se pueden emplear^(19,20). Para el diagnóstico, generalmente se parte de muestras sanguíneas, pero son igualmente útiles las manchas de sangre, de semen, pelo (siempre y cuando posean la raíz), tejidos, ya sea como biopsias, cultivos de tejidos o embebidos en bloques de parafina, incluyendo a los huesos y dientes^(19,20,21,22). Se han llegado a emplear exitosamente como muestra saliva, células que quedan dentro de la punta de las uñas, colillas de cigarrillos e incluso un timbre de correo. En general, cualquier sustancia que posea DNA se puede emplear como muestra^(19,20). A continuación se describen algunos de los procedimientos más sencillos que se pueden emplear para la preparación de las muestras.

PREPARACION DE MUESTRAS PARA PCR

Se han escrito un gran número de protocolos diferentes para realizar el aislamiento de ácidos nucleicos⁽¹⁹⁾. La mayoría de estos métodos se encuentran dirigidos hacia el aislamiento de muestras altamente purificadas, el DNA o RNA obtenido por la mayoría de estos procedimientos se puede emplear para la amplificación por PCR⁽¹⁹⁾. Una de las ventajas de la técnica de PCR, es que la muestra de DNA no requiere estar muy purificada, por lo que además de los protocolos de purificación complicados que existen, se pueden emplear técnicas rápidas y fáciles como las que se describen a continuación^(19,20):

Preparación de DNA a partir de muestras colectadas mediante hisopo

Este protocolo fue diseñado para obtener muestras de áreas genitales pero puede ser empleado en cualquier localización en donde se pueda coleccionar las células por medio de una suave abrasión. Este método resulta excelente para células en cultivos de tejido^(19,20).

Por medio de un hisopo, previamente humedecido en PBS (solución salina amortiguadora de fosfatos) o un citocepillo se colecciona la muestra cervical, vulvar o del pene. Se introduce el espécimen en un tubo cónico con capacidad de 10 a 15 ml que contenga 2ml de PBS y una concentración 2X de Fungi-Bact (Irving-Scientific). Si la muestra se va a procesar antes de 24 h, se puede conservar a temperatura ambiente. Se recomienda la refrigeración a 4°C para tiempos mayores de almacenamiento^(19,20).

Se remueve el hisopo, y se centrifuga el tubo a 2,000-3,000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga clínica para formar la pastilla. El sobrenadante se remueve cuidadosamente por aspiración. Si existe sangre presente (eritrocitos), se resuspende el botón en 1 ml de TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM (pH 7.5 o 8.0)⁽¹⁹⁾ o amortiguador de lisis (0.32 M sacarosa, Tris-HCl 10mM con MgCl₂ 5mM y 1% de Triton X-100)⁽²⁰⁾ y se transfiere a otro tubo, de 1.5 ml de volumen. Se centrifuga durante 10 segundos para obtener nuevamente el botón de las células intactas (o núcleos, dependiendo del tipo de célula que se trate). Se descarta el sobrenadante, el cual contiene el lisado de componentes de eritrocitos. Se repite el lavado, de ser necesario, hasta que la pastilla quede limpia^(19,20).

Se resuspende ésta en 50 a 300 µl del amortiguador K (amortiguador para PCR sin gelatina ni albúmina sérica bovina, y que contenga 1% de Laureth 12 o 0.5% de Tween 20 y 100 µg/ml de proteinasa K fresca (se disuelve a 20 mg/ml en Tris-HCl 10 mM (pH 7.5)). Se puede obtener de Boehringer-Mannheim o Bethesda

Research Labs.)), dependiendo del tamaño inicial de la pastilla (aproximadamente 4 volúmenes). La concentración final resulta de 100 a 1,000 equivalentes de las células por μl , éstas se transfieren a otro microtubo del mismo tamaño y se incuban a 55°C durante 1h, para digerir las células. Se calientan a 95°C por 10 minutos para inactivar las proteasas, y se almacenan a -20°C . Para realizar la amplificación por PCR se descongela la muestra y agita en vortex, se emplean de 5 a 10 μl para un volumen de reacción de 100 μl ^(19,20).

Preparación de muestras de DNA a partir de Leucocitos o Sangre completa.

A PARTIR DE CELULAS FRACCIONADAS:

Se aíslan las células mononucleares a partir de 1 a 2 ml de sangre por centrifugación, en un gradiente de densidad como puede ser el Ficoll-Hypaque, se lavan con 10 ml de PBS dos veces. Se cuentan las células en un hemocitómetro y se resuspende una alícuota en 100 μl de amortiguador K para alcanzar la concentración de 5,000 células por μl . Se incuban durante 45 minutos a 56°C para digerir las células, y posteriormente 10 minutos a 95°C para inactivar a las proteasas. Para una reacción de amplificación por PCR de 100 μl se emplean 10 μl ⁽¹⁹⁾.

A PARTIR DE SANGRE COMPLETA:

La sangre es inhibitoria para la reacción de PCR. Una cantidad tan pequeña como 1 μl de sangre, resulta inhibitoria para una reacción de PCR con volumen de 100 μl . El estudio de los diferentes componentes de la sangre sugiere que las sustancias más inhibitorias de la reacción son los compuestos porfirínicos, que derivan del grupo hemo. Se ha encontrado que la hematina es capaz de inhibir la reacción de PCR en niveles tan bajos como 0.8 μM ⁽²⁰⁾. Para separar de manera

rápida los compuestos porfirínicos del DNA nuclear, el siguiente protocolo se basa en la lisis osmótica de las células (se disuelve la membrana citoplasmática) y la obtención de una pastilla de los núcleos y restos celulares, por lo que se pierde el DNA citoplasmático.

Se mezclan 50 μ l de sangre total con 0.5 ml de TE en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml y se centrifuga durante 10 segundos a 13,000 rpm. Por medio del vortex se resuspende la pastilla en 0.5 ml de TE y se vuelve a centrifugar. Se repite este procedimiento dos veces más, y la pastilla final se resuspende en 100 μ l del amortiguador K y se realizan las incubaciones que se mencionaron en el protocolo anterior para digerir a las células e inactivar las proteasas. Se emplean 10 μ l para la técnica de PCR. La sangre "normal" contiene del orden de 5,000 leucocitos por μ l, por lo que los 50 μ l de sangre empleada contiene aproximadamente 250,000 leucocitos⁽¹⁹⁾.

Preparación de RNA a partir de Células Sanguíneas

Se fracciona de 1 a 2 ml de sangre por medio de cualquier método estándar como el que utiliza Ficoll-Hypaque. Se colocan las células mononucleares en un tubo de microcentrifuga de 2 ml con tapa de rosca, se diluye con PBS y se centrifuga a 500 rpm durante 5 minutos. Se lavan las células una vez con PBS y se resuspenden en 200 a 400 μ l de IHB frío (amortiguador isotónico de pH-alto con NaCl 140 mM, Tris-HCl 10mM y MgCl₂ 1.5 mM (pH 8.0)) que contenga 0.5% de NP-40 y 0.01% de DEP (dietilpirocarbonato obtenido de Sigma) recién preparado. La solución de DEP al 10% etanol, justo antes de usarse y se diluye mil veces en el amortiguador de lisis IHB. Las células se agitan en un vortex y se centrifugan 10 minutos a 13,000 rpm formándose una pastilla⁽¹⁹⁾. Se pueden separar los núcleos para posteriormente preparar el DNA que contienen, pero

deben lavarse para eliminar el DEP⁽¹⁹⁾.

Se transfiere el sobrenadante en otro tubo de microcentrífuga y se mantiene en incubación a 37°C por 20 minutos y posteriormente 10 minutos a 90°C, ambas incubaciones en condiciones humidificadas. Se recomienda mantener las tapas sueltas para permitir que salgan los gases de DEP degradado. Se forma una pastilla del precipitado, y se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo. Se emplean de 5 a 10 μ l para la reacción con la transcriptasa reversa/PCR⁽¹⁹⁾.

Si los controles positivos no funcionan por este método, puede ser porque existe DEP residual que inhibe cualquier reacción enzimática. Se sugiere recalentar la muestra a 90°C durante 5 minutos y volver a intentarlo⁽¹⁹⁾.

Este método también funciona para células en cultivo tisular, pero se recomienda emplear de cinco a diez veces menos células en cultivo que células sanguíneas ya que las primeras contienen mucho mayor cantidad de RNA por citoplasma que las células sanguíneas sin estimular^(19,20).

Preparación de muestras de DNA o RNA a partir de pastillas virales

Se centrifugan 5 ml de sangre o sobrenadantes de cultivos tisulares a 500 rpm durante 5 minutos para obtener una pastilla. Se remueve el sobrenadante y centrifuga a 10,000 rpm durante 10 minutos para eliminar las partículas grandes. Con mucho cuidado se elimina este sobrenadante y se vuelve a centrifugar durante 45 minutos a 50,000 rpm en un rotor SW 50.1, para formar la pastilla con los virus. Se elimina el sobrenadante y se disuelve la pastilla viral en 100 a 500 μ l de solución amortiguadora K o de TE que contenga 1% de NP-40 y 100 μ g/ml de proteinasa K. La solución se transfiere a un tubo de microcentrífuga y se incuba a 55°C de 30 a 60 minutos y la subsecuente incubación a 90°C por 5 minutos. Se enfría la muestra y se centrifuga.

Del sobrenadante en el cual están contenidos los virus de DNA, se usan de 5 a 10 μ l para un volumen de reacción de PCR (100 μ l), para los virus de RNA se utiliza una cantidad similar para la síntesis de cDNA en amplificaciones de RNA por PCR⁽¹⁹⁾.

Preparación de muestras de DNA a partir de Pelos

Se corta un fragmento de 0.5cm de pelo recién arrancado (a partir de la raíz). Se introduce éste en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml y se adiciona 0.4 ml de solución amortiguadora para PCR con detergentes no iónicos y proteinasa K. Se incuba a 50-60°C por 1h y posteriormente a 95°C. Se emplean 50 μ l del lisado para efectuar la amplificación por PCR⁽²⁰⁾.

Conservación de "muestras de campo"

Una de las maneras mejores y más fáciles para preservar las muestras es almacenarlas en etanol al 50%. A pesar de que el DNA o RNA puede ser aislado a partir de tejidos fijados por formalina, se obtiene una mayor cantidad de DNA y menos degradado cuando la muestra se fija con etanol⁽¹⁹⁾.

Se enjuaga la muestra de tejido en solución salina y se corta en fragmentos pequeños, menores a 1 cm de ancho. Se resuspende en un volumen similar de solución salina, y se adiciona lentamente el mismo volumen de etanol con ligera agitación. El volumen de etanol adicionado es igual al de la solución salina más el tejido muestra por lo que queda una concentración final del 50%. Las células fijadas se pueden mantener a temperatura ambiente por varios días sin que esto altere sus características estructurales, y a 4°C durante años⁽¹⁹⁾.

Si se estudia sangre de animales, se puede usar para el análisis de DNA sangre heparinizada o con citrato que haya sido almacenada a temperatura ambiente hasta

2 días. Otra manera de preservar muestras sanguíneas es mediante extensiones en portaobjetos, las cuales se pueden fijar con etanol o metanol aunque éste no es indispensable. Si la sangre contiene alrededor de 5,000 células nucleadas por μl , en una extensión de 100 μl de sangre habrán aproximadamente 500,000 células, o alrededor de 3 μg de DNA nuclear en el caso de mamíferos⁽¹⁹⁾.

Preparación de muestras a partir de tejidos embebidos en parafina

La habilidad de estudiar a nivel molecular tejidos conservados en parafina u otros sistemas de fijación, permite realizar estudios retrospectivos en un gran número de pacientes, también permite el seguimiento, durante largos períodos de tiempo, de cambios genéticos o agentes infecciosos que se asocian con enfermedades⁽²¹⁾.

El método más común para conservar tejidos humanos es por medio de la fijación en formalina, seguido por la formación de un bloque de parafina. Por medio de la técnica de "Southern blot" (hibridación tipo Southern) se puede analizar DNA extraído de estos especímenes, lo cual aporta información invaluable, pero es extremadamente laborioso y por lo tanto no funciona para el examen de un gran número de muestras. El DNA de las muestras viejas o mal fijadas, generalmente se encuentra degradado y no se puede analizar por "Southern blot"⁽²¹⁾.

El uso de la técnica de PCR para amplificar el DNA en tejidos fijados y embebidos en parafina, resulta un método simple y sensible para examinar un gran número de muestras. Además presenta la ventaja de requerir menor cantidad de tejido (secciones de 5 a 10 μm de espesor) en comparación con lo que se requiere para realizar un "Southern blot"⁽²¹⁾.

PREPARACION DEL TEJIDO:

Se preparan secciones de 5 a 10 μm de ancho a partir de los bloques o tejidos fijados (preferiblemente con formalina amortiguada). Se sugiere recortar y eliminar el exceso de parafina del bloque antes de realizar los cortes, y que no quede humedad en la muestra pues esto reduce la eficiencia de la extracción.

Cada sección de la muestra se deposita en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, y se rotula en la tapa. Se extrae dos veces con octano o xilenos para eliminar la parafina, y posteriormente se lava dos veces con etanol absoluto; las muestras se secan al vacío o se liofilizan⁽²¹⁾.

DIGESTION:

Se adiciona el amortiguador conteniendo la proteinasa K y se incuba a 55°C o 37°C para que ocurra la digestión. Posteriormente se incuba de 8 a 10 minutos a 95°C para inactivar a la proteasa. Se centrifuga para formar un botón de restos de tejido o de parafina y del sobrenadante se emplea una alcuota de 1 a 10 μl para la amplificación por PCR⁽²¹⁾.

PCR o AMPLIFICACION:

La amplificación de tejido que ha sido conservado en bloques de parafina es menos eficiente que la amplificación del DNA purificado o extraído a partir de material clínico fresco. Para compensar esta reducción en la eficiencia, se sugiere modificar los tiempos de incubación y aumentar el número de ciclos⁽²¹⁾.

En la tabla N° 3 se muestra un ejemplo en el que se comparan las condiciones de amplificación por medio de la técnica de PCR para el producto de amplificación L1 del virus del papiloma humano a partir de una muestras de DNA purificado (

material fresco) en comparación con las condiciones para una muestra de tejido embebido en parafina.

Tabla Nº 3. CONDICIONES DE AMPLIFICACION PARA EL FRAGMENTO L1 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO⁽²¹⁾

	DNA purificado	Muestra en parafina
Desnaturalización (t= 95°C)	30 segundos	1 minuto
Unión de cebadores (t= 55°C)	30 segundos	1 minuto
Elongación (t= 72°C)	1 minuto	2 minutos
Número de Ciclos	30 ciclos	40 ciclos

De 3 a 5 minutos a 72°C para la elongación final.

Preparación de muestras Antiguas

El análisis de DNA procedente de muestras antiguas incluía la clonación molecular del DNA extraído de especímenes provenientes de museos o descubrimientos arqueológicos. Sin embargo, el hecho de que gran parte del DNA se encuentre altamente modificado, dificulta la clonación al reducir dramáticamente la eficiencia e introducir el serio riesgo de que la secuencia determinada pueda contener artefactos de clonación introducidos durante la reparación y replicación del DNA viejo proveniente de bacterias⁽²²⁾.

La introducción de la técnica de PCR ha abierto la posibilidad de aislar secuencias de DNA partiendo de un número reducido de copias de DNA intacto

que se encuentre presente en extractos en donde la mayoría de las moléculas se encuentran dañadas y/o degradadas a tal grado que excluye el análisis por cualquier otra técnica molecular.

La amplificación del DNA antiguo presenta dos problemas principales⁽²²⁾:

- 1.- La gran sensibilidad del PCR permite recoger cualquier contaminante de DNA contemporáneo.
- 2.- Las modificaciones presentes en la molécula de DNA antiguo molde, al igual que otros componentes de los extractos de tejidos viejos, pueden resultar inhibitorios para la DNA polimerasa e influir en los resultados obtenidos.

Para encontrar contaminantes en los reactivos se recomienda realizar un control en el cual se efectúe una extracción a la que no se le adicione tejido y se lleva a cabo la técnica de PCR en forma normal. No debe encontrarse producto amplificado. En caso de haberlo, quiere decir que hay contaminación y habrá que buscar y eliminar la fuente de contaminación.

Es importante recordar que se necesita un tratamiento más drástico que la esterilización por calor húmedo (autoclave) para degradar de forma eficiente un fragmento de 100 pares de base de DNA para que no pueda ser amplificado.

COLECCION DE LAS MUESTRAS

En general resulta suficiente obtener de 0.1 a 0.5g de tejido blando seco. Idealmente se deben procesar en forma separada dos muestras de cada uno de los especímenes para demostrar la reproducibilidad⁽²²⁾. Invariablemente, los tejidos que

macroscópicamente se ven mejor conservados, son los que darán los mejores resultados. Se debe de minimizar el manejo de las muestras. En el caso de piezas de museo, que han sido muy manipuladas antes del muestreo, se recomienda emplear la parte menos superficial del tejido para realizar la toma de muestra, ya que es en la superficie en donde se espera la mayor contaminación por restos celulares humanos⁽²²⁾.

EXTRACCION DEL DNA:

Una técnica que se puede emplear para extraer el DNA de este tipo de muestras, se basa primeramente en la digestión de la muestra por medio de la proteínasa K en un medio amortiguado con EDTA y DTT (ditiotreitól) para lograr que la mayoría del tejido se encuentre en solución. Para muestras tales como la piel, en la cual existe gran cantidad de colágena, se sugiere una preincubación de 2 horas a 37°C en presencia de colagenasa, en un medio amortiguado y en presencia de EDTA⁽²²⁾.

A continuación se realizan primero extracciones con fenol saturado con Tris-HCl (aproximadamente pH 7.8) y posteriormente con cloroformo-alcohol isoamílico para eliminar las proteínas por precipitación. Una alícuota de la fase acuosa se concentra y purifica del cloroformo residual, sales y otras moléculas pequeñas⁽²²⁾.

El extracto concentrado generalmente es de color café, principalmente por la presencia de los productos de los azúcares reductores. Estos contaminantes imparten una fluorescencia de color azul bajo la luz ultravioleta, y pueden ser interpretados de forma errónea como ácidos nucleicos cuando el extracto se analiza en una electroforesis en gel de agarosa y se emplea la tinción del bromuro de etidio, el cual, produce una coloración rojo-rosado al intercalarse con los ácidos nucleicos. Para evitar esta fuente de error se recomienda fotografiar los resultados

antes y después de realizar la tinción para poder diferenciar la fluorescencia espontánea de los contaminantes con la inducida por la intercalación del bromuro de etidio en los ácidos nucleicos⁽²²⁾.

El análisis del DNA extraído se ve obstaculizado por la gran cantidad de modificaciones que existen en el DNA antiguo. Por ejemplo los extractos frecuentemente contienen componentes que exhiben picos de absorción máxima a 215 nm, lo cual hace imposible determinar la concentración de DNA por medio de mediciones a 260 nm. Además algunas enzimas presentan comportamientos aberrantes o actividades inusuales por las modificaciones del DNA. Por ejemplo, el DNA antiguo generalmente resulta sensible a la RNasa pancreática por la elevada frecuencia en la que se presentan sitios desprovistos de bases, en cambio, muestra una limitada sensibilidad a la DNasa. Muchas de las técnicas que se emplean en Biología Molecular, no pueden ser empleadas para analizar el DNA antiguo⁽²²⁾.

AMPLIFICACION DE LAS SECUENCIAS DE DNA

Se emplean condiciones similares a las que ya han sido anteriormente mencionadas⁽²²⁾. La albúmina resulta útil para contrarrestar la acción inhibitoria de origen desconocido que presentan muchos de los extractos de tejido viejos. Se emplean en este caso un número elevado de ciclos de amplificación, alrededor de 40, para poder detectar cantidades pequeñas de templado.

Se deben incluir los siguientes controles para cada par de cebadores:

- 1.- Una amplificación control de la extracción (sin tejido).
- 2.- Una amplificación control sin DNA matriz (sin extracto)

En ambos casos no debe de haber amplificación.

Si no se obtiene amplificación del extracto de tejido, ésto puede deberse a la presencia de contaminantes o DNA dañado que inhiben a la DNA polimerasa. Se puede intentar resolver este problema por medio de diluciones progresivas para diluir a los contaminantes, conservando una cantidad suficiente de DNA muestra. También se puede aumentar la concentración de la DNA polimerasa.

Si no se encuentran productos inespecíficos, pero se encuentran dímeros de cebador en la amplificación de DNA antiguo, es posible que el problema sea la falta de moléculas de DNA molde, en ese caso se adiciona una mayor cantidad de extracto⁽²²⁾.

Se puede recuperar el DNA de las bandas de interés extrayéndolas del gel. Estas pueden servir, a su vez, como DNA molde para amplificaciones subsecuentes⁽²²⁾.

Los protocolos discutidos para llevar a cabo la técnica de PCR son rápidos y fáciles pero también son útiles aquellos que incluyen centrifugaciones con CsCl y/o extracciones con fenol. Los métodos tratados en este capítulo involucran el uso de detergentes no iónicos y proteinasa K para solubilizar el DNA de las células en el amortiguador del PCR o en TE. El Laureth 12 (Mazer Chemicals, Gurnee, Illinois) y el Twin 20 en concentraciones de 0.5% son compatibles con la DNA polimerasa Taq. La transcriptasa reversa funciona bien en presencia de hasta 1% de NP-40. El SDS que es tan común y funciona muy bien en conjunto con la proteinasa K resulta inhibitorio para la polimerasa por lo que no se puede emplear. La proteinasa K es una excelente proteasa para digerir núcleos o células completas para liberar el DNA o RNA en una forma que sea accesible para las polimerasas; posee además la ventaja de ser relativamente termoestable en el rango de 50 a 60°C y es inactivada fácilmente al mantenerla unos minutos a 95°C.

La lisis de las células en presencia de DEP evita la degradación del DNA o RNA por parte de las nucleasas, pero es necesario ser muy cuidadoso en su uso. Niveles mayores de DEP pueden destruir fácilmente la actividad de molde del DNA o RNA.

El aislamiento del DNA mediante los protocolos de detergente/proteasa funcionan tan bien como las muestras purificadas. En general es conveniente contar con una muestra de DNA o RNA purificado para comparar resultados con los ácidos nucleicos impuros, especialmente cuando son secuencias que se amplifican por primera vez.

En relación a la preparación de secciones de tejido procedente de bloques de parafina involucran una gran manipulación, lo cual da una amplia oportunidad a que ocurra contaminación cruzada entre muestras, o contaminación por plásmidos o productos de PCR extraños, presentes en el medio.

Se deben tomar varias medidas preventivas y ser muy cuidadoso para evitar la contaminación.

La amplificación de muestras que han sido almacenadas por mucho tiempo después de haber sido extraídas y digeridas no siempre es tan exitosa como la de muestras recién digeridas. Posiblemente el almacenamiento o los procesos de congelación/descongelación pueden ser responsables de rompimiento del DNA.

La longitud máxima de una secuencia de DNA específica que se puede amplificar, depende en gran medida de su estado (integridad), éste depende a su vez del tiempo y condiciones de almacenamiento así como del fijador empleado y el

tiempo de fijación. Algunos fijadores (diferentes de la formalina amortiguada) pueden modificar al DNA y reducir la "competencia" de la amplificación. Alternativamente, algunos fijadores pueden contener reactivos que inhiban la reacción de PCR. Este efecto se puede nulificar por medio de purificaciones (extracciones con fenol-cloroformo y precipitación con etanol posterior a la digestión con la proteasa) de los extractos de tejidos⁽²¹⁾.

Ya que esta purificación implica una mayor manipulación, y por lo tanto mayor riesgo de contaminación, no se recomienda en forma rutinaria⁽²¹⁾.

Debido al aumento en el número de ciclos y a la mayor duración de los tiempos de incubación para la unión de cebadores y polimerización en el PCR, con frecuencia se encuentran productos inespecíficos. Sin embargo, al ser estos generalmente más pequeños que los productos deseados, no hibridan con las sondas que se emplean para el producto específico en un "Southern blot". La presencia de los productos inespecíficos complica la purificación del producto deseado y puede afectar procedimientos tales como la secuenciación directa⁽²¹⁾.

En la amplificación del DNA antiguo se ha encontrado una correlación inversa entre la longitud del fragmento por amplificar y la eficiencia de la amplificación⁽²²⁾. Esto se debe principalmente al estado de daño y degradación en el que se encuentra este tipo de DNA.

Se ha podido lograr la amplificación exitosa de pequeñas secuencias de DNA antiguo (hasta de 500 pares de bases), la amplificación de secuencias mayores, generalmente representan DNA contaminante.

Cuando las moléculas de DNA presentes en la muestra, no poseen la longitud requerida para servir de molde a los cebadores seleccionados, se puede lograr la amplificación deseada de la siguiente manera:

Durante los primeros ciclos se elongan los cebadores unidos a las pequeñas moléculas de DNA molde que hay en la muestra. Después de una serie de ciclos, se sobreponen los extremos 3' de los cebadores elongados y se forma de esta manera un DNA que posee toda la secuencia deseada. Estas nuevas moléculas de DNA son las que servirán de molde para que se desarrolle la amplificación exponencial⁽²²⁾.

Este proceso de PCR brincado ("jumping PCR") permite la amplificación de fragmentos de DNA mayores a los que se encuentran en el extracto muestra. Sin embargo, la DNA polimerasa al "brincar" de un DNA molde al otro, inserta frecuentemente bases erróneas. Esto no se ve en la secuenciación directa del producto amplificado, pero sí distorsiona las secuencias obtenidas del producto amplificado clonado. Por esta razón se recomienda secuenciar directamente el producto amplificado⁽²²⁾.

La secuenciación del producto amplificado clonado puede complementar los resultados obtenidos mediante la secuenciación directa al proveer de un estimado indirecto de la extensión del daño existente en el DNA⁽²²⁾.

El PCR brincado causa una recombinación *in vitro* que puede producir secuencias mosaico cuando se estudian genes nucleares en individuos heterocigotos⁽²²⁾.

METODOS PARA EVITAR LA CONTAMINACION

La posibilidad de contaminación en la reacción de amplificación por PCR es una cuestión con implicaciones amplias tanto para las aplicaciones en investigación como para el diagnóstico, puesto que puede generar resultados falsos positivos⁽²³⁾. Dada la gran capacidad de amplificación que presenta esta técnica, la contaminación de la muestra es un grave problema potencial, ya sea por productos de una reacción previa (producto remanente) o por material de una fuente exógena, principalmente en las reacciones que se inician con poca cantidad de DNA. En concentraciones de 10^{12} copias /100 μ l, 1 picolitro (10^{-6} μ l) contiene 10,000 moléculas . La transferencia de volúmenes tan pequeños a otras muestras, ya sea por aerosoles o vias mecánicas es muy difícil de evitar. Por esta razón la técnica de PCR es muy susceptible a proporcionar resultados falsos positivos⁽²⁴⁾.

Se ha reportado que la magnitud del problema de contaminación por arrastre es menor a 10^7 moléculas contaminantes por evento (típicamente de 10 a 10^4 moléculas⁽²⁴⁾). Una consideración adicional es otro tipo de falsos positivos en los cuales la contaminación por arrastre excede a los 10^7 amplicones, estas amplificaciones se detectan directamente por hibridación con una sonda. En la figura N° 6 se observa la magnitud del problema de contaminación por arrastre⁽²⁴⁾.

Por ello, la amplificación, en especial de lisados de esperma, de cabellos y de secuencias genómicas del HIV requieren mediciones rigurosas para minimizar y monitorear la contaminación potencial⁽²⁴⁾.

Figura N° 6. Magnitud del Problema de Contaminación⁽²⁴⁾

	Volumen' arrastrado (μ l)	Copias arrastradas (#)	Detección hibridación directa (cpm) ^o
	100	10^{12}	11×10^4
derrames	10	10^{10}	11×10^4
	1	10^9	11×10^4
manchas	0.1	10^8	11×10^3
	*****	10^7	11×10^2
	* *	10^6	11×10^1
	* *	10^5	
	* *	10^4	
	aerosoles	10^3	
	* *	10^2	
	* *	10	
	* *	10^{-10}	
	*****	10^{-11}	

^f Se asume un volumen de reacción de PCR de 100 μ l que contiene 1×10^{-7} M/l de producto amplificado.

^o cpm = cuentas por minuto.

La contaminación puede provenir de dos fuentes: a) ENDOGENA y b) EXOGENA. Se conoce como contaminación endógena a la contaminación que proviene de la muestra, pudiéndose tratar de microorganismos o células de otro individuo. La contaminación exógena es aquella que se adquiere en el laboratorio y generalmente se debe a los productos de amplificación resultantes de ensayos previos (amplicones) y que son arrastrados, en forma inadvertida en una reacción de PCR subsecuente. Estos amplicones arrastrados pueden contaminar reactivos o muestras, causando errores sistemáticos. Alternativamente, los tubos de reacción

pueden contaminarse durante la preparación y proporcionar resultados falsos positivos. Este tipo de contaminación es más aguda en laboratorios donde se corre la misma amplificación constantemente, por ejemplo los laboratorios de diagnóstico clínico.

Se han desarrollado una serie de medidas para prevenir la contaminación, entre las cuales se encuentran:

a) METODOS FISICOS:

- En general, un procedimiento cuidadoso de laboratorio⁽²⁵⁾, reactivos prealiquotados, pipetas automáticas (dispositivos de presión positiva), y la separación física de la preparación de reactivos con respecto al análisis de los productos de reacción, son precauciones que reducen el riesgo de contaminación^(23,25).

- Otro aspecto más es el realizar el mínimo número de ciclos necesarios, incluir un panel de reacciones " blanco" , que puede ser con agua en lugar de muestra de DNA, lo que permitirá detectar contaminación potencial.

- En tipificación genética, una muestra que ha sufrido contaminación puede ser frecuentemente detectada por la existencia de más de dos alelos.

b) METODO ENZIMATICO- Por medio de la enzima uracilo- N-glucosidasa (UNG) de *E. coli*

Fundamento

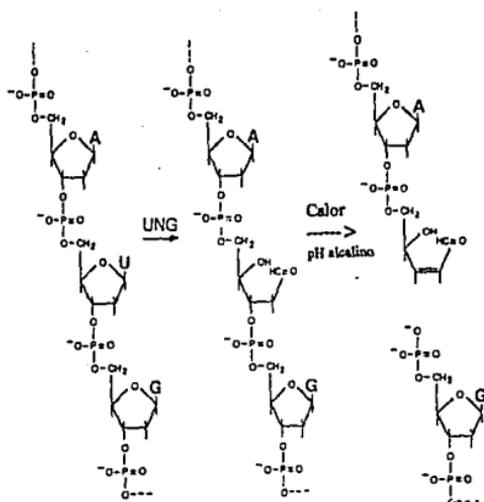
Las células bacterianas son muy eficientes para degradar el DNA proveniente de bacteriófagos, siempre y cuando éste no se encuentre metilado, y para remover por medio de la escisión enzimática, las bases modificadas que resulten de la inserción inapropiada del aparato replicativo, o que estén dañadas por la acción de

mutágenos.

Se ha visto que los fagos T4 y T5 que contienen aproximadamente un 30 % de uracilo en vez de timina, son restringidos por una cepa nativa de *E. coli*, mientras que estos mismos fagos sí son capaces de infectar una cepa de *E. coli* deficiente en la enzima UNG⁽²⁶⁾.

La característica que distingue al DNA producido por PCR del DNA nativo, es que los productos generados por la amplificación pueden contener nucleótidos modificados o diferentes a los típicos cuatro nucleótidos (dA, dG, dC y dT). Este es el principio que utiliza esta técnica para destruir selectivamente a los amplicones (moléculas contaminantes) presentes en una reacción que apenas va a ser amplificada, por medio de la enzima UNG, la cual es capaz de degradar el DNA que contenga uracilo en lugar de timina.

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente⁽²⁶⁾:



Los polinucleótidos generados en la reacción anterior son susceptibles de sufrir hidrólisis cuando se encuentran en solución alcalina, especialmente a temperaturas elevadas. El pH del amortiguador que se emplea para la amplificación, así como la elevada temperatura de la etapa inicial de desnaturalización ($<94^{\circ}\text{C}$) son condiciones suficientes para ocasionar la escisión de la hebra con polinucleótidos que ha perdido alguna de sus bases nitrogenadas⁽²⁶⁾.

La técnica consiste en la sustitución de los dTTP por dUTP y la adición de la enzima UNG a la mezcla de reacción, se inicia llevando a cabo una corta preincubación a temperatura ambiente, lo cual permite a la enzima escindir el uracilo (en caso de que éste se encuentre presente en la reacción). El DNA escindido por la enzima es refractario a la amplificación por PCR, ya que la DNA polimerasa se detiene cuando encuentra un sitio que perdió su base nitrogenada y/o sufrió un rompimiento en las hebras de DNA molde⁽²⁶⁾.

La enzima UNG es activa en la escisión de DNA de doble cadena o de cadena sencilla, por lo que el procedimiento funciona para inactivar el DNA contaminante para PCR. Otra ventaja que presenta esta técnica es que tanto los residuos de ribouracilo del RNA como los dUTP no son sustrato para la enzima⁽²⁶⁾.

Esta técnica sirve para disminuir el riesgo de contaminación cuando el fragmento a amplificar posee una secuencia que contenga desoxiadenuinas y desoxitimidinas. Los iniciadores deben de contener nucleótidos dA cercanos al extremo 3', para poder degradar los dímeros de cebador, así como al DNA contaminante. También es útil para evitar la contaminación de la amplificación de RNA por PCR, presentando como ventaja adicional que la transcripción reversa y la amplificación se pueden

realizar en un mismo tubo⁽²⁷⁾.

Algunas de las desventajas que presenta este método son que el dUTP es un reactivo caro, y en algunos casos es utilizado con menos eficiencia por la DNA polimerasa Taq ⁽²⁸⁾, lo cual lleva a niveles inferiores de amplificación.

c)METODO FOTOQUIMICO

Un segundo método involucra el uso de derivados de isopsoraleno los cuales sufren una reacción de cicloadición con los residuos de timidina de la amplificación al exponerlos a la luz ultravioleta (activación).

En el caso de ser una esterilización fotoquímica es importante que el sistema posea las siguientes características⁽²⁸⁾:

1) El reactivo que aún no ha sido activado (mediante luz ultravioleta) no interfiera en la unión de cebadores ni con la actividad de la DNA polimerasa y además, deberá ser termoestable. Esto permite que el reactivo esterilizante se pueda añadir antes de la amplificación sin inhibirla⁽²⁸⁾.

2) El reactivo ideal es aquel que se activa al recibir radiación de longitud de onda entre 300 y 400 nm., ya que los tubos de polipropileno empleados en la reacción son transmisibles a esa longitud de onda, de esta manera se pueden manejar las muestras con luz fluorescente normal o incandescente⁽²⁸⁾.

3) La modificación fotoquímica que se realice debe evitar que las amplificaciones funcionen como DNA molde⁽²⁸⁾.

Este método fotoquímico se puede diseñar para asegurar que contaminaciones por arrastres, hasta por 10^{12} moléculas no serán amplificadas por PCR ⁽²⁴⁾.

Entre los compuestos que se han probado para realizar este tipo de esterilización se encuentran las furocumarinas, las cuales son compuestos tricíclicos, planos que se intercalan entre los pares de bases de los ácidos nucleicos⁽²⁴⁾. Estos compuestos contienen dos dobles enlaces reactivos que cuando son excitados por radiación entre 320 y 400 nm. reaccionan con el doble enlace 5,6 de las pirimidinas para formar anillos de ciclobutano. En el caso de la familia de los psoralenos (furocumarinas lineales) se forman monoadductos y enlaces cruzados cuando reaccionan con el DNA.

Se sabe que los enlaces cruzados que ocasiona el psoraleno, bloquean la extensión de las polimerasas al evitar la separación de las cadenas complementarias. Se han reportado monoadductos causados por ciertos compuestos derivados del psoraleno que bloquean las reacciones de extensión de algunas polimerasas, pero no en todos los casos⁽²⁴⁾.

Los compuestos de tipo isopsoraleno (furocumarinas angulares) se comportan de forma similar al psoraleno, pero únicamente forman los monoadductos, debido a la orientación relativa de los enlaces reactivos de la moléculas. Los oligonucleótidos modificados por algunos derivados del isopsoraleno mantienen su capacidad de hibridación.

Ambos tipos de compuestos imposibilitan la amplificación de los amplicones, pero en este caso resultan más útiles los compuestos de tipo isopsoraleno ya que

permiten la detección de los amplicones por medio de técnicas de hibridación.

El uso de isopsoraleno en la esterilización fotoquímica requiere que se coordine el nivel de amplificación (# de ciclos y cantidad inicial) con la longitud y secuencia de las ampliaciones. Esto genera DNA incapaz de actuar como DNA molde para ser amplificado, pero sigue siendo detectable en los ensayos de hibridación. Además de que los reactivos están catalogados como carcinógenos⁽²⁸⁾ la eficiencia del método depende en gran medida de la secuencia y longitud del fragmento⁽³¹⁾. En vista de que el DNA muestra también se ve modificado, sólo se puede realizar posterior a la amplificación^(24,29,30,31).

d)METODO QUIMICO

El tercer método emplea cebadores que contienen una ribosa en el extremo 3'terminal. Los cebadores que finalizan con cualquiera de los cuatro residuos de ribosa, sirven igual que los dNTPs en PCR. La elongación del cebador genera una unión del ribonucleótido con el amplicón (producto de amplificación) que puede ser fragmentado. Este rompimiento se puede llevar a cabo mediante enzimas o por medio de soluciones básicas, evitando la amplificación exponencial del producto.

Al emplear este método para evitar la contaminación no se requiere modificar las condiciones o protocolos de PCR y es suficiente una sola ribosa para cada cebador.

La esterilización, antes de la amplificación, con la RNasa A requiere que la ribosa terminal del extremo 3' del cebador sea en citocina o uracilo y que las hebras sean desnaturalizadas durante la preparación de las muestras. La RNasa

A es una enzima muy estable y puede renaturalizarse rápidamente después de la desnaturalización térmica, si esto ocurre durante la amplificación el producto se irá destruyendo a medida que se va formando, este problema que también se puede presentar con el método que utiliza a la enzima UNG ya que ésta es también una enzima muy estable. Sin embargo la RNasa A en presencia de beta-mercaptoetanol o agentes reductores de grupos sulfhidrilo, se inactiva de forma irreversible al desnaturalizarse por calor, y estos agentes no afectan la actividad de la DNA polimerasa Taq⁽²⁸⁾. El tratamiento con una solución básica, posterior a la amplificación, da un control más efectivo de la contaminación por arrastre que la esterilización enzimática .

Una desventaja es que se requiere abrir los tubos de microcentrifuga para adicionar la solución básica e imposibilitar a los amplicones a ser moléculas contaminantes, al abrir el tubo se presenta la posibilidad de formación de aerosoles antes de lograr la inactivación de los amplicones. Este problema se puede evitar empleando unos tubos de reacción que permitan la adición de NaOH a la mezcla de reacción sin abrirlo⁽²⁸⁾.

La esterilización efectiva es un término operacional y significa que no se pueda detectar la contaminación empleando condiciones de detección y amplificación definidas. Para obtener resultados óptimos es necesario diseñar y evaluar el protocolo de esterilización para cada sistema de amplificación. Se sugiere que se empleen los métodos físicos en combinación con el método enzimático, químico o fotoquímico, de acuerdo al sistema de cebadores que se empleen y a la disponibilidad de reactivos⁽²⁹⁾.

APLICACIONES CLINICAS

El campo de aplicaciones clínicas, así como el de investigación es muy amplio por lo que a continuación describo brevemente algunos de los casos en donde son notables las ventajas que ha proporcionado el emplear la técnica de PCR para resolver estos problemas de la salud de una manera más fácil, rápida y específica. Cada uno de los ejemplos representa uno de las áreas en donde es más comúnmente empleada esta técnica como es la Infectología, Diagnóstico de Enfermedades Genéticas, Cáncer, y la Medicina Forense, otros campos en donde es también muy empleada es en la Inmunología, Embriología, Paleontología, y Biología en General.

IDENTIFICACION DEL HIV-1 POR PCR

El uso de la técnica de PCR para la amplificación de los ácidos nucleicos y la posterior identificación de secuencias específicas de nucleótidos, ha facilitado la detección de numerosos agentes infecciosos, entre ellos, el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1).

RETROVIRUS HUMANOS

Desde 1980⁽³²⁾, los retrovirus humanos han sido reconocidos como un problema mundial. Estos virus de RNA son capaces de infectar a los linfocitos T humanos y expresar la actividad de la transcriptasa reversa, que eventualmente resulta en la integración del DNA proviral en el DNA de la célula huésped.

El período de latencia es variable, posteriormente viene la reactivación, producción de viriones con capacidad infecciosa y dispersión a otros linfocitos T, macrófagos y posiblemente otras células⁽³²⁾.

Los primeros retrovirus descritos fueron los virus T linfotrópicos humanos tipo I y II (HTLV-I y HTLV-II) seguidos por el virus linfotrópico de células T humano tipo III al que ahora se conoce como el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 ó HIV-1⁽³²⁾. Se han encontrado otros tipos de retrovirus, relacionados a estos agentes, pero aún no se conocen sus implicaciones en las enfermedades humanas⁽³²⁾.

La transmisión de estos virus parece ser más eficiente por medio de transfusiones sanguíneas o componentes sanguíneos contaminados, adicionalmente puede ocurrir por transmisión sexual o perinatal, incluyendo a la leche materna infectada. Los virus de HTLV I y II no parecen compartir antígenos con el HIV-I.

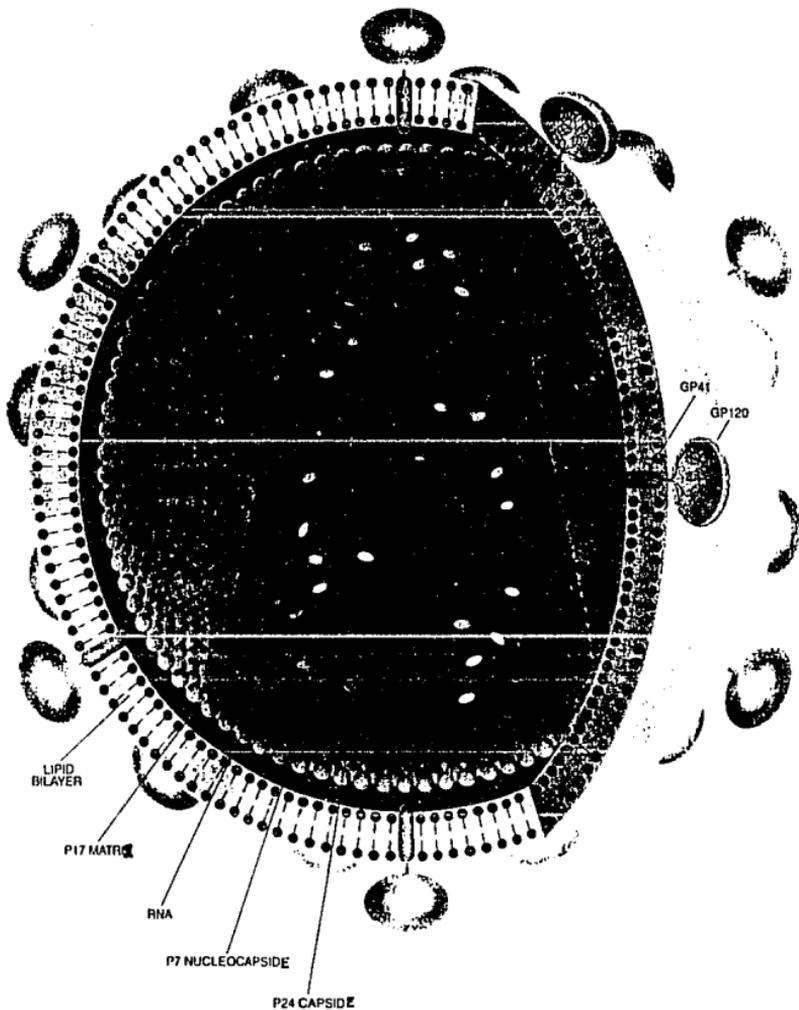
El HIV es el único virus de estos tres que se caracteriza por causar depleción de los linfocitos T-cooperadores, conduciendo a la inmunodeficiencia⁽³²⁾.

HIV

El HIV, al igual que los demás retrovirus, presenta un ciclo de vida que incluye la síntesis de un DNA proviral complementario, circular y de doble cadena que se integra de forma covalente al genoma celular del huésped⁽³²⁾. Este virus infecta preferentemente a los linfocitos CD 4+ (células T cooperadores), lo que conduce a una deficiencia inmunológica severa. En la figura N° 7 se muestra un esquema del virus.

Las manifestaciones clínicas de la infección pueden oscilar desde un síndrome agudo, similar a la mononucleosis infecciosa autolimitada que ocurre de 2 a 4

Figura N° 7. Esquema del HIV-1⁽³³⁾

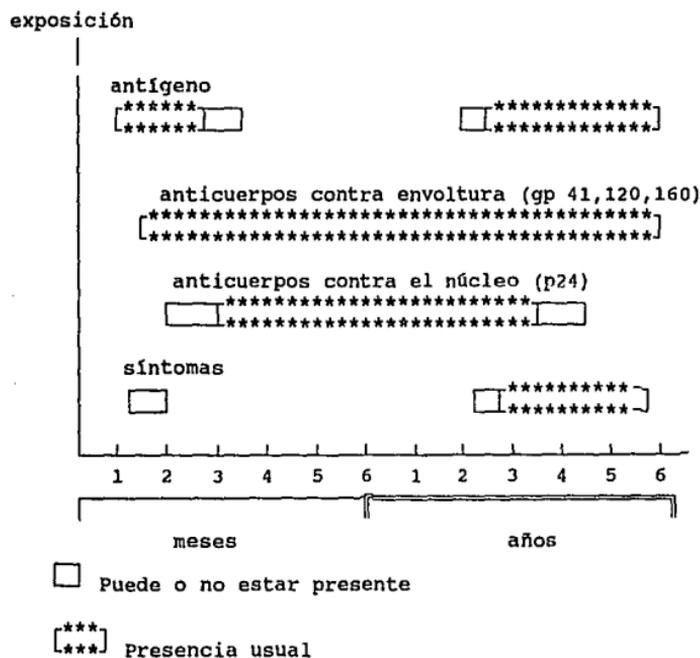


semanas después de la exposición inicial, hasta el desarrollo del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) o su frecuente precursor: el Complejo Relacionado al SIDA (CRS)⁽³⁴⁾.

El período de latencia entre la infección inicial y el inicio del SIDA o CRS puede durar desde unos cuantos meses, hasta 15 años o más.

En la figura N° 8 se resume el comportamiento usual de la enfermedad clínica en relación a la respuesta serológica⁽³⁴⁾.

Figura N° 8. Respuesta Serológica al HIV-1⁽³⁴⁾



Posteriormente a la exposición, la viremia se puede desarrollar desde los primeros días, siguiendo frecuentemente la aparición del virus en el fluido cerebroespinal. La antigenemia (p24) se puede llegar a detectar desde las primeras dos semanas, y persiste generalmente de 2 a 4 meses. Los anticuerpos dirigidos contra los antígenos de la envoltura aparecen dentro de las 6 a 8 semanas y persisten en forma permanente, en la mayoría de los casos. Los anticuerpos dirigidos contra el núcleo, por ejemplo contra p24, aparecen un par de semanas más tarde que los anticuerpos previamente descritos⁽³⁴⁾.

En las fases posteriores de la infección, reaparece la antigenemia de p24 y disminuyen los anticuerpos correspondientes (anti-p24). Se piensa que los niveles elevados de antígeno, aunado a la disminución en su anticuerpo (anti-p24) representan un signo de mal pronóstico⁽³⁴⁾.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

La identificación de las personas con exposición al HIV está indicada por la presencia de anticuerpos hacia el HIV, antígenos virales y/o virus en cualquier componente corporal (sangre, saliva, tejidos, etc.)⁽³⁴⁾.

Los principales antígenos que se emplean en las pruebas serológicas, son varios productos génicos del HIV-1. Estos incluyen a los que codifican para tres regiones⁽³⁴⁾:

- a) La envoltura (*env*), incluyendo a gp120, gp160 y gp41
- b) La polimerasa (*pol*), incluyendo a p31, p51 y p66
- c) El núcleo (*gag*), incluyendo a p17, p24 y p55

Los números en cada caso, corresponden a las masas moleculares relativas en

kilodaltones de la protefna⁽³⁴⁾.

Actualmente la infección por HIV-1 se diagnostica por la presencia de anticuerpos específicos mediante el uso de ensayos de inmunoadsorción ligada a la enzima (EIA) o un ensayo indirecto de inmunofluorescencia (IFA). Si cualquiera de las pruebas es positiva o cercana al límite, se repite. Cuando las pruebas realizadas no dan un resultado claramente negativo, se confirma el diagnóstico por medio de un "Western immunoblot" (WIB) o por aislamiento del virus mediante técnicas de cocultivo^(34,35).

A continuación se describen brevemente algunas de las técnicas:

Inmunoensayos enzimáticos (EIA)- Estas pruebas comparadas con el estándar WIB, se considera que presentan una sensibilidad de 99% o mayor, con similar especificidad. Si embargo, los valores predictivos de pruebas negativas o positivas varían de acuerdo a si se trata de poblaciones de alto o bajo riesgo. La causa más común cuando resulta un falso negativo por esta técnica, parece estar relacionada con la fase en la que se encuentra la infección⁽³⁴⁾, particularmente al principio de la fase de viremia o antigenemia donde aún no han aparecido los anticuerpos correspondientes en el umbral de la prueba de detección. Entre las causas de falsos positivos se encuentran la existencia de anticuerpos dirigidos contra los antígenos DR4 y DQw3 del HLA. Estos anticuerpos están posiblemente dirigidos contra antígenos contaminantes de los cultivos de células humanas empleados para producir el antígeno viral. Esto se da más frecuentemente en pacientes que han sido politransfundidos o en mujeres multíparas. Otras condiciones asociadas a una mayor prevalencia de falsos positivos son: la hemodiálisis crónica, padecimientos autoinmunes o linfoproliferativos, hepatitis alcohólica, etc. Se han desarrollado nuevas pruebas que emplean antígenos recombinantes, que reducen

significativamente estos problemas, tanto para EIA como para WIB⁽³⁴⁾.

Inmunofluorescencia (IFA)- Esta prueba utiliza una mezcla de líneas celulares linfoblastoides infectadas y no infectadas por el HIV-1. Este tipo de ensayo es capaz de detectar, mejor que la mayoría de los ensayos inmunoenzimáticos, anticuerpos contra gp160 y gp120 de aparición temprana por lo que es empleada en algunos laboratorios como prueba suplementaria en el escrutinio o confirmación⁽³⁴⁾.

Western immunoblot (WIB)-Su principal uso es para la confirmación de pruebas de escrutinio positivas. Se pueden detectar anticuerpos dirigidos contra por lo menos nueve epítopes del HIV-1 como bandas inmunorreactivas en una tira de nitrocelulosa. El criterio de interpretación generalmente es el siguiente:

Negativo- Cuando no aparecen bandas en los sitios correspondientes a los antígenos virales(gp 160, gp 120, p66, p55, p51, gp41, p31, p24, p17)⁽³⁴⁾.

Positivo-Se encuentran bandas correspondientes a por lo menos un producto de cada una de las tres regiones: *env* (gp160, gp120 o gp41), *pol* (p31, p51 o p66), y *gag* (p24, p55 o p17). [Otra recomendación sugiere que la aparición de dos de las tres principales bandas (p24, gp41 y gp160/120) es suficiente para confirmar la positividad]⁽³⁴⁾.

Indeterminado-Cualquier otro patrón de reactividad, se recomienda repetir la prueba pero en una nueva muestra de suero, si el resultado continúa dudoso, se repite la prueba al cabo de dos a tres meses. Entre las posibles causas de un resultado indeterminado se encuentran la infección temprana, reacción cruzada con otro virus (por ejemplo el HIV-2), idiopática, etc.⁽³⁶⁾

Otros ensayos que miden anticuerpos- Existen métodos adicionales que se encuentran disponibles o en desarrollo, muchos de los cuales utilizan porciones recombinantes de gen viral. Entre ellos se incluyen : el EIA mejorado, inmunoensayos fluorescentes, y pruebas de aglutinación en látex y hemaglutinación.

Ensayos de Captura de Antígeno- La detección y cuantificación de antígenos virales en suero, plasma o líquido cerebroespinal empleando EIA resulta útil para el diagnóstico de las etapas tempranas de la infección, aún antes de que se puedan detectar los anticuerpos. Este tipo de técnicas también se puede emplear para el diagnóstico de la infección en la infancia (en cuyo caso no funciona el diagnóstico serológico), aunque en esos casos generalmente se requiere del cultivo viral o detección de los ácidos nucleicos (esto se explica más adelante). Esta técnica, al ser cuantitativa, permite monitorear la respuesta a la terapia, así como establecer un pronóstico⁽³⁴⁾.

Cultivo Viral- Se puede demostrar la viremia plasmática o asociada a células mononucleares periféricas (PMC) al inocular la muestra del paciente a un cultivo de células mononucleares periféricas procedentes de donadores seronegativos, estimuladas con fitohemaglutinina. Las células se incuban en presencia de interleucina 2 y polibreno. La detección de la replicación viral se basa en la captura del antígeno (EIA) o en la determinación de la actividad de transcriptasa reversa (RT) en el sobrenadante de los cultivos. La captura del antígeno ha resultado ser el método más conveniente y económico, con un detección tan temprana como tres días después de la inoculación, en cambio, la determinación del HIV-1 por el ensayo de RT, tarda de 9 a 21 días después de la inoculación.,

sin embargo, este método permite la detección de otros retrovirus diferentes al HIV-1⁽³⁶⁾.

Técnicas de Hibridación-En algunas ocasiones la infección por HIV-1 puede estar presente, pero no logra ser detectada por los métodos serológicos, de captura de antígeno ni por el cultivo. Este tipo de problemas se presenta particularmente muy al inicio de la infección o en fases francamente tardías, así como en el diagnóstico de la infección en los primeros 15-18 meses de vida. Se han empleado sondas de DNA o cDNA para detectar DNA proviral o RNA viral en las células mononucleares periféricas o muestras de tejido mediante técnicas como el "Southern blot", "Northern blot" o la hibridación *in situ*. Sin embargo, la sensibilidad que se obtiene con estos métodos no es la deseada. La técnica de PCR con la cual se puede amplificar el DNA proviral así como el RNA viral, es el enfoque preferido⁽³⁶⁾.

En vista del reducido número de linfocitos infectados que existen en una persona seropositiva, las técnicas convencionales como el análisis de "Southern blot", no son suficientemente sensibles para caracterizar la información genética del retrovirus⁽³⁷⁾. La Reacción en Cadena de la Polimerasa se empleó en un principio para detectar el DNA proviral del HIV en los cocultivos, y posteriormente se extendió a detectar directamente al DNA proviral de las células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs) en las personas infectadas⁽³⁷⁾.

Problemas Relacionados con el Diagnóstico

La mayoría de los humanos infectados con un retrovirus no manifiestan síntomas evidentes en los siguientes años a la infección. Algunos, pero no todos, eventualmente desarrollan etapas prodrómicas prolongadas de la enfermedad, antes de desarrollar la enfermedad terminal⁽³⁸⁾.

En ciertas situaciones clínicas, el diagnóstico inequívoco ha sido entorpecido por las insensibilidades relativas de estos métodos que miden anticuerpos, que son los más comúnmente empleados. Este tipo de análisis identifica a las personas que han tenido contacto con el retrovirus, pero no indican específicamente que exista una infección actual⁽³⁶⁾.

La evidencia de laboratorio para diagnosticar una infección en curso requiere el cultivo del virus y/o una detección positiva de antígenos virales⁽³⁷⁾. El cultivo viral requiere de 3 a 4 semanas y pierde sensibilidad ya que los virus no siempre pueden ser aislados de los pacientes infectados. Los ensayos para la detección y cuantificación de antígenos, se basan en la captura de los antígenos virales por medio de anticuerpos mono o policlonales que se encuentran inmovilizados en un soporte sólido. La mayor desventaja de este tipo de técnicas es que los antígenos virales, en la mayor parte de las muestras clínicas no se encuentran libres, sino que se encuentran complejados con anticuerpos específicos generados por el huésped. Esto impide la detección de los antígenos. El antígeno viral p24 generalmente no se encuentra en forma libre, sino hasta haberse alcanzado un estado avanzado del síndrome de inmunodeficiencia, donde ya se presenta un exceso de antígenos en la circulación. En algunos casos, se pueden detectar los antígenos en los primeros meses de la infección, antes de la aparición de los anticuerpos. Es por esto que el valor de las pruebas que detectan anticuerpos es limitado⁽³⁷⁾.

La habilidad de la técnica de PCR para detectar directamente la presencia de DNA proviral, o RNA viral ha permitido detectar al virus antes de que se desarrollen los anticuerpos correspondientes^(35,36).

**TABLA N° 4. CARACTERISTICAS DE LOS ENSAYOS VIROLOGICOS
PARA DETECTAR HIV-1 EN MUESTRAS CLINICAS⁽³⁹⁾**

ENSAYO	% DE PACIENTES POSITIVOS	RANGO DE CD4* (cal/mm ³)	PARAMETRO VIRAL MEDIDO	COMENTARIOS
Antígeno p24	20 37-95	200-500 <200	Antígeno viral libre en plasma o suero	Quando se encuentra presente, es útil como marcador fácilmente medible. Su descenso indica actividad antiviral <i>in vivo</i> , es útil en la evaluación temprana de agentes nuevos.
ICD p24	45 - 70 75 -100	200-500 <200	Antígeno viral inmuno-complejado en suero o plasma	El tratamiento ácido del suero o plasma resulta en general, en detección aumentada del antígeno p24 como resultado de su liberación de los complejos inmunes. Útil en el diagnóstico neonatal y en aumentar la prevalencia de este marcador en estudios poblacionales potenciales.
Viremia en plasma	75-100	<200	Virus infeccioso libre	Es útil en poblaciones con enfermedad avanzada debido a la baja prevalencia de pacientes con valores de CD4* > 200/mm ³ . Cuando se encuentran presentes, es un marcador cuantitativo útil para monitorear la respuesta a terapia antiretroviral.
Cultivo de PBMC	95-100	<500	Virus infeccioso asociada a células y el amplificable.	Marcador útil para monitorear cambios en el título viral en la terapia. Es caro y la técnica laboriosa.
PCR del DNA	100	<1,000	DNA proviral asociado a células	Es útil en documentar la infección neonatal y para cuantificar la carga viral en el huésped.
PCR del RNA	100	<1,000	RNA viral libre y asociado a células	Las técnicas se encuentran en desarrollo. Prometen un marcador activo de la expresión viral <i>in vivo</i> , es aplicable a cualquier estado de la enfermedad. Se investiga la respuesta a terapia antiretroviral e inmunológica.

La infección de células de línea germinal resulta en la eventual transmisión vertical de la secuencia viral a la progenie del huésped infectado.

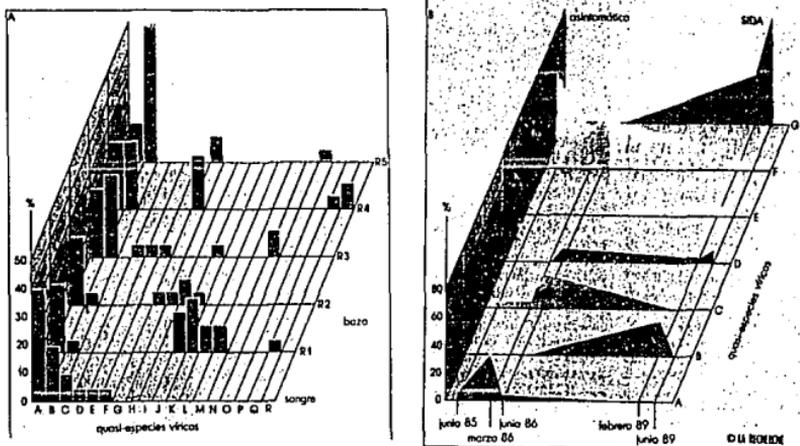
La técnica de PCR es uno de los pocos métodos capaces de detectar la infección por HIV-1 en infantes nacidos de madres infectadas por HIV-1, en esta situación particular, la presencia de los anticuerpos maternos que pueden durar hasta 15 meses no necesariamente implica que exista la infección en el niño, por lo que confunde el diagnóstico por EIA y "Western blot"^(35,36,37,40).

Son pocas las opciones terapéuticas para pacientes con enfermedades terminales inducidas por retrovirus, y ninguna hasta la fecha ha sido curativa. Por esta razón se lleva a cabo un considerable esfuerzo para identificar a los pacientes infectados que aún se encuentran asintomáticos para prevenir la diseminación de la infección a otras personas y de esta manera especificar la naturaleza exacta de su enfermedad. Estas técnicas han servido a la sociedad como pruebas de detección para proteger a los receptores de productos sanguíneos. Sin embargo, debido a la latencia que se asocia a las infecciones retrovirales, existe la posibilidad de pacientes seronegativos que se encuentren infectados⁽³⁸⁾.

Por medio de la amplificación por PCR se puede además diferenciar el tipo de virus que infecta: HIV-1 ó HIV-2⁽³⁷⁾.

La heterogeneidad del HIV-1 ha sido extensamente documentada⁽⁴⁰⁾, se puede ver un ejemplo de ella en las figuras N° 8a y 8b. Para asegurar la detección eficiente de todas las variantes del HIV-1, se dirige la amplificación únicamente a regiones altamente conservadas del genoma viral.

Figuras N° 8A y 8B. Variedades del Virus del Sida⁽⁸⁾.



La figura 8A muestra las variantes del virus del SIDA en diferentes órganos de un mismo individuo. La figura 8B ejemplifica como cambian con el tiempo las variantes del virus en un individuo infectado.

Dos pares de cebadores han sido extensamente empleados para el análisis de muestras infectadas por HIV-1. Uno de los pares se designa como SK38/SK39^(36,40), éstos comprenden 115 pares de bases que corresponden a una región del gag del retrovirus. El segundo par de cebadores, SK145/SK101^(36,40), amplifican una región de 130 pares de bases, también del gag que se conserva entre los aislados de HIV-1 y HIV-2 (aislado ROD). Las sondas para los productos de amplificación de SK38-39 y SK145-101 son SK19 y SK102 respectivamente. La tabla N° 5 contiene algunos ejemplos de estos cebadores y sondas.

TABLA N° 5. OLIGONUCLEOTIDOS MAS COMUNMENTE EMPLEADOS^(35,39)

OLIGONUCLEOTIDOS: CEBADORES Y SONDAS	REGION	SECUENCIA (5' A 3')	POSICION DE LOS NUCLEOTIDOS
GH26 (cebador)	HLA*	GTGCTGCAGGTGTAACCTGTACCAG	
GH27 (cebador)	HLA	CACGGATCCGGTAGCAGCGGAGAGTTG	
SK38 (cebador)	gag	ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAAT	1551-1578
SK39 (cebador)	gag	TTGGTCTTGTCTTATGTCCAGAAATG C	1638-1665
SK19 (sonda)	gag	ATCCTGGGATTAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTAC	1595-1635
SK101 (cebador)	gag	GCTATGTCAGTTCGCCITGGTTCTC	1482-1506
SK145 (cebador)	gag	AGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAAT	1366-1395
SK102 (sonda)	gag	GAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGATGGGAT	1403-1435
SK68 (cebador)	env	AGCAGCAGGAAGCACTATGG	7801-7820
SK69 (cebador)	env	CCAGACTGTGAGTTGCAACAG	7922-7942
SK70 (sonda)	env	ACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTC TGGTATAGT	7841-7875

* HLA, antígeno leucocitario humano.

Cualquier muestra que presenta dos regiones amplificadas y detectadas por hibridación, se considera positiva, cumpliendo con el requisito de que los controles negativos empleados sean negativos⁽⁴¹⁾.

Dada la extraordinaria sensibilidad de la técnica de PCR (permite identificar un célula infectada en 10,000 no infectadas⁽⁴²⁾) es crucial el poner especial interés en evitar la contaminación cruzada de las muestras la cual amplificadas que produce resultados falsos positivos⁽⁴⁰⁾.

El método más común para la detección del DNA proviral del HIV-1 resultante de la amplificación por PCR es la **hibridación con una suspensión de oligonucleótidos radiactivos (OSH)**. Este método demuestra alto grado de sensibilidad y especificidad, pero presenta la desventaja del manejo de compuestos radiactivos que requiere de mayor seguridad en su manejo⁽³⁵⁾.

Recientemente han sido diseñadas varias técnicas para la detección del HIV-1 basadas en PCR, que eliminan el requerimiento de radioisótopos, y que permiten el análisis de numerosas muestras en un período corto de tiempo. Entre las técnicas se encuentran⁽³⁵⁾:

- a) La Roche : Ensayo prototipo de HIV-1 por PCR
- b) Du Pont : Ensayo tipo sandwich de oligonucleótidos
ligados a enzima (ELOSA)
- c) Gen Probe: Ensayo de protección de la hibridación (HPA)

Cada uno de los métodos demostró buena especificidad y sensibilidad para la detección del DNA proviral del HIV-1⁽³⁵⁾.

Los resultados que se han obtenido al emplear la técnica de PCR para la detección del HIV-1, sugieren que el análisis mediante PCR de las secuencias del HIV-1 va a poder ser empleado para conocer la carga viral, una vez que se perfeccionen los métodos cuantitativos. Una cuantificación precisa de la carga viral será de gran utilidad como indicador del pronóstico y para la evaluación de la eficiencia de la terapia antiviral^(36,43).

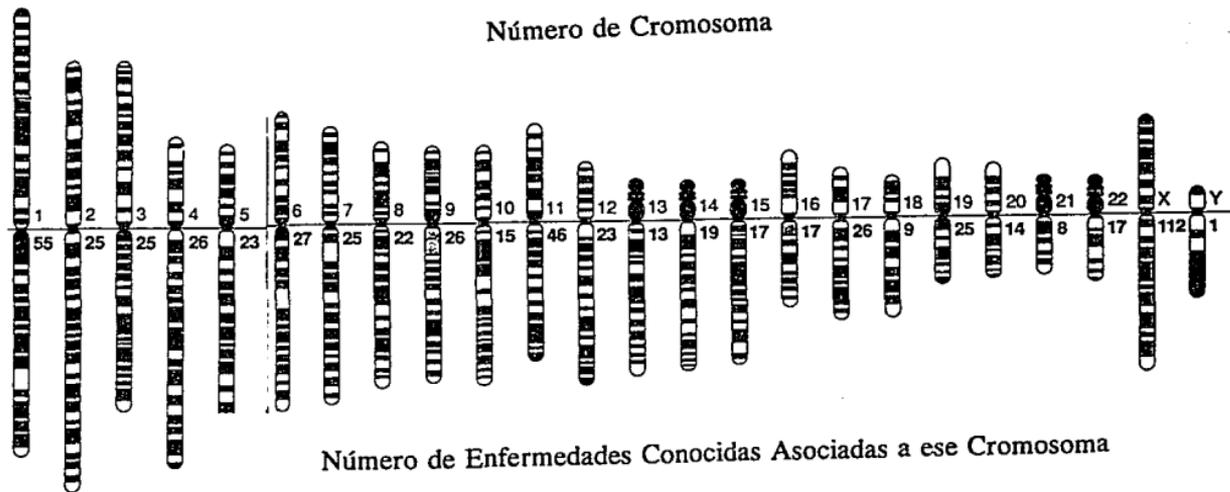
DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES GENETICAS

La aparición de PCR ha cambiado el modo de detección de las enfermedades hereditarias y la búsqueda de predisposición a ciertos padecimientos⁽⁸⁾. Las pruebas genéticas son el área del diagnóstico médico que con mayor rapidez está creciendo. Las pruebas no son únicamente para los embriones, también se emplean para diagnosticar, de una forma más rápida y precisa⁽⁴⁴⁾, enfermedades en niños y en adultos.

El año pasado se encontraron algunos genes asociados con la enfermedad de Alzheimer, Huntington y el cáncer de colon⁽⁴⁴⁾, se espera encontrar próximamente el gen asociado al cáncer de mama y muchos otros más.

En la figura N° 9 se observa la cantidad de padecimientos que, a la fecha, se han asociado a cada uno de los cromosomas humanos.

Figura N° 9. Distribución de las Enfermedades que se asocian a cada cromosoma⁽⁴⁴⁾



ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La Enfermedad de Huntington (EH) es un padecimiento neurodegenerativo y progresivo que se caracteriza por disturbios motores, pérdida cognocitiva y manifestaciones psiquiátricas como cambios de humor y de personalidad^(45,46).

Esta enfermedad sigue un patrón de herencia autosómico dominante y afecta a 1/10,000^(45,46) individuos en la mayoría de las poblaciones de origen europeo.

Se caracteriza por presentar movimientos coreicos distintivos que típicamente tienen un sutil e insidioso inicio en la cuarta y quinta década de la vida y gradualmente empeoran en un transcurso de 10 a 20 años hasta ocasionar la muerte. Uno de los peores aspectos de esta enfermedad es su aparición al final de la etapa reproductiva, los pacientes sin saberlo, heredan el gene que posee el defecto a sus hijos, y los hijos "bajo riesgo" viven su posible futuro en el sufrimiento de sus padres.

Ocasionalmente la enfermedad de Huntington se expresa en la juventud, manifestándose síntomas más severos incluyendo la rigidez y su curso transcurre más rápidamente. El inicio de la enfermedad en jóvenes se asocia preponderantemente a la transmisión paterna del alelo mutado⁽⁴⁷⁾.

La neuropatología de esta enfermedad, muestra un patrón de muerte neuronal selectiva que es más severa en el núcleo caudado y en el putamen(elementos de los ganglios basales).

Las bases bioquímicas de la muerte neuronal en la enfermedad de Huntington no han podido ser explicadas^(45,48), por lo que no hay tratamiento efectivo para retardar o prevenir el inicio y progresión de esta enfermedad devastadora. Es por esto que es tan importante establecer el diagnóstico lo antes posible.

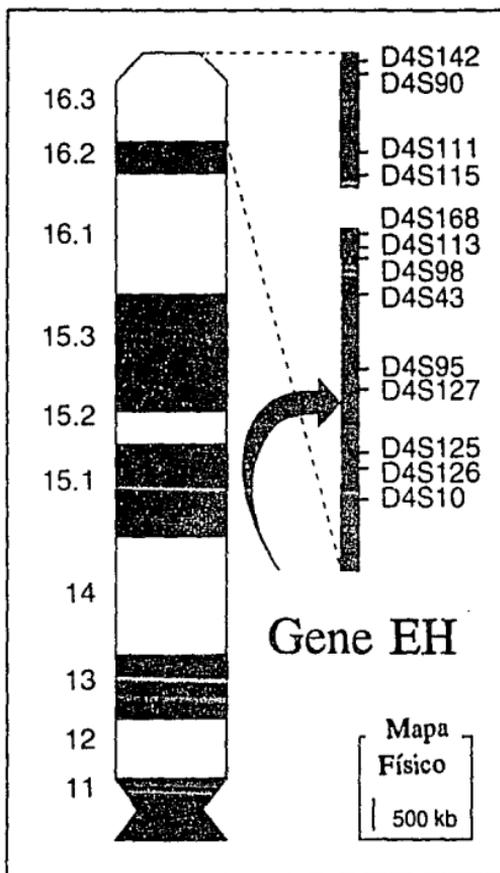
HISTORIA.

El defecto genético responsable de esta enfermedad le fue adjudicado al cromosoma 4 en 1983 mediante análisis de ligamiento genético empleando marcadores polimórficos de DNA en humanos⁽⁴⁵⁾.

Posteriormente se buscó aislar y caracterizar el gen. Se estableció un mapa genético de la región implicada. El telómero 4p de un cromosoma EH fue clonado en un cromosoma artificial de una levadura, estableciéndose así cromosomas artificiales en levaduras y cósmidos contiguos a la región candidata para poder caracterizar los genes de esa región⁽⁴⁵⁾.

El análisis de eventos de recombinación en familiares de pacientes con EH ha permitido identificar una región de 2.2 Mb entre el D4S10 y D4S98 en la región cromosómica 4p16.3 como la posición candidata más probable responsable de la enfermedad de Huntington⁽⁴⁵⁾. En la figura N° 10 se observa un mapa de la región encontrada

Figura N° 10. Mapa del cromosoma 4p^(48a)



Las investigaciones efectuadas por el análisis de ligamiento genético sugieren que han ocurrido múltiples mutaciones causando el desorden genético. Sin embargo el análisis del haplotipo, empleando marcadores multialélicos ha indicado que por lo menos una tercera parte de los cromosomas de los enfermos de

Huntington están relacionados ancestralmente. El haplotipo compartido por estos cromosomas mutados, indica que un segmento de 500 kb, entre D4S18 y D4S182 es muy posiblemente el sitio donde se presenta el defecto genético⁽⁴⁵⁾.

Estos estudios permitieron identificar inicialmente tres genes⁽⁴⁵⁾:

a) el gen de alfa-adducina (ADDA).

b) un gen transportador (IT10C3).

c) un gen que codifica para un receptor acoplado a una proteína G(IT11).

Sin embargo ninguno de estos genes correlacionaron específicamente con el padecimiento⁽⁴⁵⁾.

Posteriormente se identificó otro gen, el **IT15** que contiene aproximadamente 210 kb, que codifica para una proteína desconocida de alrededor de 348kd. El gen IT15, contiene una zona polimórfica que se caracteriza por presentar una serie de repeticiones de un trinucleótido: (CAG)*n*. El polimorfismo radica en diferentes números de repeticiones del trinucleótido, encontrándose 17 alelos en la población normal, los cuales contienen entre 11 y 37 repeticiones de este triplete⁽⁴⁵⁾.

En los cromosomas EH, la longitud de la repetición de los trinucleótidos está aumentada sustancialmente. Se ha observado una correlación inversa entre el número de repeticiones del trinucleótido y la edad de inicio de la enfermedad, presentándose segmentos mucho más largos en los pacientes donde la enfermedad se presenta desde la juventud (más de 60 repeticiones⁽⁴⁹⁾).

La inestabilidad de la longitud de las repeticiones recuerdan las repeticiones de trinucleótidos similares que aparecen en otros padecimientos como el Síndrome del X-frágil y la distrofia miotónica⁽⁴⁵⁾.

La presencia de un segmento inestable integrado por repeticiones expandibles de trinucleótidos en los cromosomas de enfermos de Huntington, sugiere que estas

alteraciones son el fundamento del fenotipo dominante de la enfermedad de Huntington y que la región IT15 codifica para un gen específico de esta enfermedad⁽⁴⁵⁾.

La elongación de secuencias de trinucleótidos repetidas ha sido implicadas con anterioridad como la causa de diversas enfermedades como se observa en la tabla N°6:

Tabla N° 6 Padecimientos Neurológicos debidos a Repeticiones de trinucleótidos ⁽⁵⁴⁾

Enfermedad	Locus y cromosoma	Trinucleótido repetido	Rango Normal	Rango en la enfermedad
Enfermedad de Huntington	4p16.3	CAG en el gen EH	9-37	37-121
Atrofia Muscular Espino-bulbar	Xq21.3	CAG en el gen del receptor androgénico	13-30	30-62
Síndrome del X-frágil	Xq27.3	CGG en el gen FMR-1	6-54	450-1500
Distrofia Miotónica	19q13.3	CTG en la proteína quinasa muscular dependiente de AMPc	5-37	44-3000
Ataxia Espinocerebelar tipo 1	6p24	CAG en un gen de función desconocida	25-36	43-81

El **Síndrome del X-frágil** comprende una gran cantidad de síntomas que incluyen el retraso mental y un sitio frágil en la posición Xq 27.3. Este síndrome se asocia a la expansión del trinucleótido (CGG)_n, que se piensa se encuentra en el extremo 5' de la región no traducible del gen FMR1⁽⁴⁵⁾.

En la **Distrofia Miotónica**, que también es un padecimiento autosómico dominante (como en el caso de la enfermedad de Huntington), se han observado manifestaciones de debilidad muscular y miotonía, las cuales se presentan típicamente en la juventud. La región inestable de trinucleótido (CTG)_n, se localiza en el extremo 3' de la región no traducida del gen que codifica para proteína quinasa muscular⁽⁴⁵⁾.

En el caso de la **Atrofia Muscular Espino-bulbar**, es una enfermedad ligada al cromosoma X, recesiva y que inicia en la edad adulta, caracterizándose por alteraciones de las neuronas motoras. Se sabe que está ocasionada por la expansión del mismo trinucleótido, que observamos en la enfermedad de Huntington (CAG)_n pero en este caso la secuencia codifica para el gen del receptor de andrógenos, en el cromosoma X⁽⁴⁵⁾.

La longitud del segmento que se repite tanto en el Síndrome del X frágil como en la Distrofia Miotónica tiende a aumentar en generaciones sucesivas, a veces lo hace en forma dramática y ocasionalmente se ha visto que disminuye⁽⁴⁵⁾.

El número de repeticiones del trinucleótido de EH también es inestable, usualmente se expande cuando se transmite a la siguiente generación, aunque en algunas ocasiones también se ha visto que se reduce⁽⁵²⁾. En este padecimiento, al igual que en los anteriormente descritos, la expansión del trinucleótido, se da en ausencia de recombinación⁽⁴⁵⁾.

VARIACION POLIMORFICA DE LA REPETICION DEL TRINUCLEOTIDO (CAG)_n.

La secuencia del gen IT15 contiene cerca de su extremo 5', una región polimórfica que contiene un número variable de copias del triplete (CAG)_n, el cual codifica para la glutamina.

En la población normal se han encontrado 17 alelos discretos que poseen de 11 a 34 unidades repetidas. El 98% de los cromosomas normales analizados en el reporte inicial elaborado por el grupo colaborativo de investigación de la Enfermedad de Huntington en 1993⁽⁴⁵⁾ contenían entre 11 y 24 repeticiones, como se observa en la tabla No. 7.

Tabla N° 7 Repeticiones del Trinucleótido (CAG)⁽⁵⁰⁾

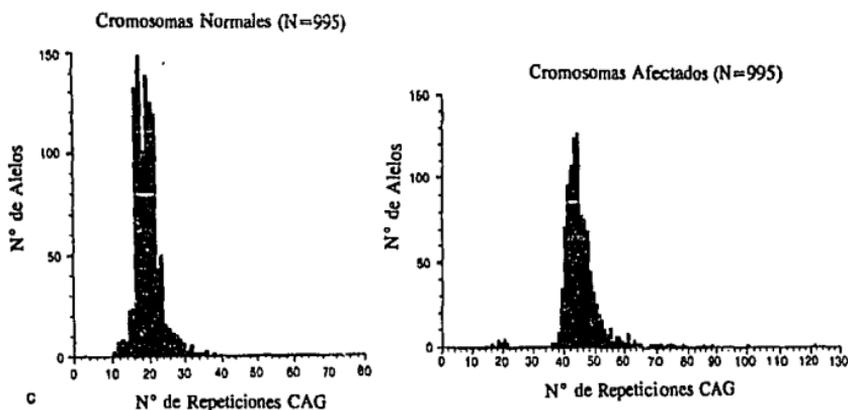
Número de Repeticiones	Cromosomas Normales		Cromosomas EH	
	Número de cromosomas analizados	Frecuencia	Número de cromosomas analizados	Frecuencia
> 48	0	0.0	44	0.59
42-47	0	0.0	30	0.41
30-41	2	0.01	0	0.00
25-30	2	0.01	0	0.00
>24	169	0.98	0	0.00
TOTAL	173	1.0	74	1.00

Se detectaron los cromosomas que contenían de 25 a 30 repeticiones, además de 2 cromosomas, supuestamente normales los cuales poseían 33 y 34 repeticiones respectivamente⁽⁵⁰⁾.

La heterocigidad encontrada en los cromosomas analizados fue del 89%. Las diferencias en los alelos se debe principalmente al número de repeticiones⁽⁴⁵⁾.

Cuando se publicó el descubrimiento del gen EH⁽⁴⁵⁾, se habían analizado 75 familias, y se encontró en todas ellas, empleando la técnica de PCR, un producto de amplificación de tamaño mayor a lo normal. El tamaño encontrado en los cromosomas EH varía entre 42 a más de 66 copias(figura N° 11).

Figuras N° 11A y 11B. Distribución del Número de Repeticiones en Cromosomas Sanos y EH⁽⁴⁸⁾.



En aquellos individuos que no presentaron producto de amplificación, ésto se debió a que éste era demasiado largo. En estos casos, el análisis se efectuó por la técnica de "Southern blot", empleándose la enzima EcoR1 y se encontró una mayor longitud del fragmento amplificado.

Al estudiar los cromosomas de personas afectadas, cuyos antecesores no habían mostrado el padecimiento, se encontró que en los progenitores sanos que compartían el cromosoma mutado, el número de repeticiones del trinucleótido estaba en el límite superior del rango normal de repeticiones, por lo que se concluyó que el haplotipo estaba predispuesto a sufrir expansión y no se debía a mutaciones nuevas. Este estudio permitió concluir que el índice de mutación en EH es muy bajo⁽⁴⁵⁾.

Se han encontrado diferentes haplotipos que se asocian con EH, pero por lo menos 1/3 de ellos están relacionados en forma ancestral⁽⁴⁵⁾. Esta información, conjuntamente con la reducida velocidad de mutación de EH, sugieren que la expansión del número de copias sólo puede ocurrir en ciertos cromosomas⁽⁴⁵⁾.

BASES BIOQUIMICAS

La expresión del Síndrome del X-frágil se asocia con la inactividad del gen FMR1. Por otro lado, el patrón recesivo de herencia de la Atrofia Muscular espino-bulbar sugiere que se genera un producto de un gen que normalmente es inactivo⁽⁴⁵⁾. Con respecto a la Distrofia Miotónica no se conocen las bases bioquímicas.

En el caso de EH existen numerosas posibilidades para explicar el mecanismo de patogénesis. Se sabe que la expansión no causa la inactividad del

gen IT15, puesto que se ha encontrado el RNAm que corresponde a ese gen, en pacientes homocigotos para EH⁽⁴⁵⁾.

En vista de que es una enfermedad dominante, se ha sugerido que la enfermedad es causada por una mutación que otorga una nueva función al RNAm, que la proteína formada tenga una nueva propiedad, o que se exprese inapropiadamente⁽⁴⁵⁾.

Si se tradujera la repetición expandida de trinucleótidos, las consecuencias del producto proteico serían dramáticas, ya que se aumentaría la longitud de la cadena de poliglutamina cerca del extremo N-terminal. Es posible sin embargo, que a pesar de la presencia de un codón de metionina río arriba, la traducción normal ocurra 3' a el inicio de las repeticiones (CAG)_n, y que no exista la cadena de poliglutaminas en el producto protéico. En este caso, las repeticiones se encontrarían en la región no traducida en el extremo 5' y se podría esperar que ejerzan su acción dominante a nivel del RNAm⁽⁴⁵⁾.

La presencia de las repeticiones expandidas puede alterar directamente la regulación, localización, estabilidad o traducción del RNA que las contiene y puede indirectamente afectar su contraparte en el alelo normal en el caso de heterocigotos para EH⁽⁴⁵⁾.

También se puede pensar en que la presencia de una región repetida puede alterar el sitio efectivo de inicio de la traducción para el transcrito EH, truncando la proteína y/o afectando el control de la expresión de RNAm. Finalmente no se puede descartar la posibilidad de que la enfermedad se deba a la expresión de un gen adyacente⁽⁴⁵⁾.

Lo más probable es que la expansión de trinucleótidos en el gen IT15 cause la enfermedad de Huntington a nivel del RNAm, o de la proteína para la que codifica, la cual han llamado "huntingtina"⁽⁴⁵⁾.

No se ha encontrado ninguna similitud importante entre el gen IT15 y alguno de los genes reportados en la base de datos GENBANK⁽⁴⁵⁾ que permitiera tener una idea sobre la función de este gen, a excepción de las regiones que codifican para unas cadenas de glutamina y prolina cerca del extremo N-terminal. Tampoco la secuencia de aminoácidos de la "huntingtina" aporta ninguna pista sobre su función⁽⁴⁵⁾.

Las regiones de poli-glutamina y poli-prolina, cerca del extremo N-terminal se encuentran presentes en un gran número de proteínas. Es difícil valorar el significado de estas similitudes, aunque es notable que muchas de ellas son proteínas que se unen al DNA y que la "huntingtina" posee una leucina en el residuo 1443⁽⁴⁵⁾.

Una observación que llama mucho la atención es que la proteína "huntingtina" se expresa ampliamente en el organismo y sin embargo la muerte celular en EH está confinada a neuronas específicas en regiones particulares del cerebro⁽⁴⁵⁾.

VENTAJAS DE EMPLEAR PCR PARA EL DIAGNOSTICO:

Antes de que se lograra la clonación del gen de la EH, los marcadores que se empleaban para diagnosticar esta enfermedad no eran 100% confiables, puesto que siempre existía la posibilidad de que hubiera recombinación (2-4%)⁽⁵³⁾ entre el marcador empleado y el sitio de mutación para la enfermedad, el cual aún no se conocía. Para llevar a cabo los análisis se requerían muestras de DNA de numerosos miembros de la familia con el objeto de determinar la fase del marcador que estaba segregando con el gen, por lo que hasta 25% de los individuos que buscaban el diagnóstico, eran excluidos de éste, puesto que no contaban con

muestras de sangre de parientes cruciales⁽⁴⁸⁾.

La capacidad de la técnica de PCR para monitorear directamente el tamaño de la repetición de trinucleótidos en individuos "en riesgo" de EH, revolucionará las pruebas predictivas para la enfermedad, eliminando la necesidad de los complicados análisis de ligamiento genético y facilitando el asesoramiento genético al extender la aplicación al diagnóstico presintomático y prenatal a individuos "en riesgo" que no posean familiares afectados vivos, además de respetar la privacidad del paciente y de sus familiares⁽⁴⁵⁾ y asegurar confidencialidad.

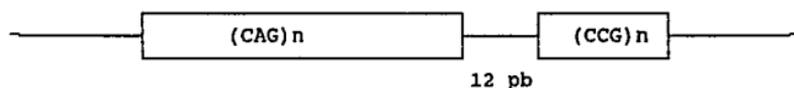
En el estudio inicial realizado en 1993 por el grupo colaborativo de investigación de la Enfermedad de Huntington se encontró una correlación aparente entre el número de repeticiones y la edad de inicio de la enfermedad que recuerda a la reportada en la distrofia miotónica. El mayor número de repeticiones de trinucleótidos se encontró en los pacientes en los cuales la enfermedad se presentó en etapa juvenil, donde además se observó una preponderante transmisión masculina, pero se requiere de más estudios para corroborar estos importantes hallazgos. Estos estudios deberán completarse antes de que se pueda emplear el número de repeticiones (CAG)_n para dar información pronóstica a individuos en riesgo⁽⁴⁵⁾.

DESCUBRIMIENTO DE UNA SEGUNDA REGION DE POLIMORFISMO

Se encontró una nueva región de polimorfismo^(54,55) en el gen IT15 (figura N°12) la cual afecta la longitud final del producto analizado, en base a este dato se calcula el número de repeticiones del trinucleótido CAG. Esta segunda región polimórfica consiste en repeticiones de otro trinucleótido, CCG, con una

heterocigosidad aparente de 71% en los cromosomas normales y 40% en los que poseen la mutación para EH⁽⁵⁴⁾.

Figura N° 12. Localización de las dos regiones polimórficas en IT15⁽⁵⁵⁾



El hecho de no tomar en cuenta el polimorfismo de la región CCG, puede ocasionar un cálculo erróneo de la longitud del segmento de repeticiones CAG hasta por 3 repeticiones⁽⁵⁴⁾.

Los cebadores que se han empleado para evitar amplificar esta segunda región polimórfica son los pares HD4F - HD3V y HD4F - HD5R⁽⁵⁴⁾.

Se realizó recientemente un extenso estudio⁽⁴⁸⁾ para evaluar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico de la enfermedad de Huntington por PCR, método que emplea el número de repeticiones del triplete CAG para identificar a los individuos con la mutación de la EH. En este estudio se encontró que la sensibilidad de este método es de 98.8%, presentando intervalos de confianza del 95% (97.7 a 99.4%) y una especificidad de 100% con intervalos de confianza del 95% (95.2 al 100%). Para llevar a cabo este estudio se extrajo el DNA de leucocitos y se realizó la amplificación por PCR utilizando y condiciones descritas inicialmente⁽⁴⁵⁾ y los siguientes cebadores:

5'ATGAAGGCCTTCGAGTCCCTCAAGTCCTTC-3'.

Y 5'AAACTCACGGTCGGTGCAGCGCTCCTCAG-3'.

En pacientes en los cuales se estimó que poseían un número de repeticiones cerca del límite normal, es decir de 36 a 42 repeticiones del codón CAG, se repetía la amplificación empleando cebadores que excluyeran la región que contiene las repeticiones del otro trinucleótido encontrado (CGG). Esto permitió obtener un número más certero del límite inferior de expansión de la secuencia CAG en los pacientes con EH⁽⁴⁸⁾.

Para llevar a cabo este estudio se incluyeron personas de diferentes nacionalidades y grupos étnicos, encontrándose en todos ellos resultados similares. La mayoría (11/12) de los pocos pacientes (1.8%) a los que se les había diagnosticado la EH y no presentaron la expansión del trinucleótido, se encontró que poseían enfermedades diferentes a EH⁽⁴⁸⁾.

La ausencia de la expansión del trinucleótido CAG en otros padecimientos neuropsiquiátricos como Alzheimer, Esquizofrenia, Depresión Mayor, Corea Senil, Corea Benigna Hereditaria, etc. significa que se puede emplear el ensayo molecular para establecer el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Huntington con respecto a otras enfermedades con las que suele confundirse clínicamente⁽⁴⁸⁾.

En Canadá el costo de esta prueba de laboratorio es de aproximadamente 300 dólares por persona, lo cual es más barato que otras pruebas especializadas para diagnosticar la enfermedad de Huntington como son la tomografía computarizada, resonancia magnética, tomografía de emisión de positrones y el examen neuropsicológico⁽⁴⁸⁾.

Es necesario continuar respetando los lineamientos internacionales y protocolos de asesoramiento . Las muestras de familiares no afectados deben analizarse únicamente con su consentimiento⁽⁴⁵⁾.

IDENTIFICACION DE INDIVIDUOS PARA MEDICINA LEGAL

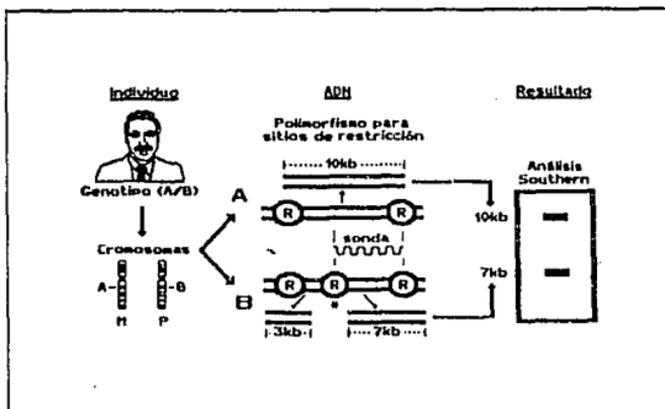
La evidencia biológica llega a los casos forenses en diferentes formas⁽⁵⁶⁾: manchas de sangre en cualquier superficie, semen mezclado con fluidos vaginales, pelos⁽⁵⁷⁾, pedacitos de huesos, dientes, colillas de cigarros⁽⁵⁸⁾, tejido encontrado en la punta de las uñas, etc.⁽⁵⁶⁾.

El principal objetivo del análisis de este tipo de evidencia es desarrollar información que permita identificar al individuo al que pertenece esa evidencia^(56,59).

Tradicionalmente se determinaban los grupos sanguíneos así como los marcadores genéticos presentes en esas muestras⁽⁵⁶⁾. El avance de la tecnología del DNA en la última década proporciona un nuevo enfoque, el análisis de la variación genética a nivel del DNA. La capacidad para evaluar una muestra biológica depende en la calidad y cantidad de DNA que se posee⁽⁵⁶⁾.

La habilidad para detectar polimorfismo, en el DNA proveniente de las muestras de evidencia, ha revolucionado la biología forense. Usando la técnica del análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos generados por enzimas de restricción (RFLP)(figura 13), se pueden obtener "huellas genéticas", siempre y cuando el DNA se encuentre en buen estado (poco o nada degradado) y en cantidad suficiente. Se requiere de aproximadamente 50 ng de DNA de alta masa molecular para realizar el análisis por RFLP usando tan solo una sonda para un *loci*, y se requiere más de 100 ng para analizar varios locus, sin embargo, en la práctica no siempre se obtienen de la evidencia biológica la cantidad de DNA no degradado que se requiere para realizar este tipo de análisis⁽⁵⁸⁾.

Figura N° 13. Fundamento de la Técnica de RFLP⁽⁶⁰⁾



Por otro lado, la técnica de RFLP consume gran cantidad del material, por lo que gran parte de las muestras no pueden ser reanalizadas^(61,62).

VENTAJAS DE EMPLEAR PCR PARA EL ANALISIS DE EVIDENCIA.

Este tipo de limitaciones se pueden sobrellevar empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar las secuencias de DNA específicas que exhiben polimorfismo.

PCR ofrece dos ventajas significativas:

1. Se puede realizar la amplificación a partir de cantidades muy pequeñas de DNA muestra. Esto permite la obtención de información genética a partir de muestras forenses que contienen muy poco material celular, para ser analizado por otras técnicas⁽⁶⁶⁾.

2. Se puede amplificar el DNA degradado^(56,57) (una proporción importante de las muestras forenses muestran material degradado).

Operativamente, PCR proporciona dos ventajas adicionales:

- a) Es relativamente fácil de realizar y**
- b) los resultados se pueden obtener rápidamente, generalmente dentro de 24 h^(56,58).**

DESARROLLO DE SISTEMAS MARCADORES PARA PCR

El fin principal del análisis forense del DNA es obtener una identificación positiva del donador de la evidencia. Para lograr este fin, el análisis debe emplear marcadores genéticos altamente informativos y debe ser desarrollado de forma fácil en un laboratorio forense típico.

Los sistemas de marcadores, para dar los mejores resultados, debe cumplir con ciertos criterios ⁽⁶¹⁾.

- a) El marcador debe ser altamente polimórfico, y tener un alto nivel de heterocigosidad genética⁽⁶³⁾.**
- b) La secuencia blanco debe poder ser amplificada de forma rápida y específica⁽⁶³⁾.**
- c) Los métodos para detectar la variación alélica, deben ser fáciles y confiables.**
- d) Se debe contar con información sobre las frecuencias genotípicas que presenta una población determinada para poder estimar el poder de discriminación del marcador^(59,63).**

e) Los sistemas del marcador se deben heredar en forma independiente, de manera que las frecuencias que se derivan de un sistema de marcador, se puedan multiplicar con los de los otros sistemas, aumentando el poder de discriminación. La herencia independiente ocurre cuando los marcadores se encuentran localizados en diferentes cromosomas⁽⁶¹⁾.

Actualmente, sólo se han caracterizado adecuadamente para uso forense pocos sistemas. Por esta razón, el poder de discriminación de estos sistemas no es tan alto como los empleados en el análisis por RFLP. Sin embargo existen muchas regiones polimórficas en el DNA humano que pueden ser explotadas por métodos de análisis con PCR⁽⁶⁴⁾, por lo que en un futuro muy cercano, va a mejorar el nivel de discriminación⁽⁶¹⁾.

Los polimorfismos del DNA se pueden dividir en dos categorías⁽⁶¹⁾:

- a) **Polimorfismos de secuencia:** tal como ocurre entre los genes del ~~complejo~~ HLA, altamente polimórfico y en el bucle-D del DNA mitocondrial.
- b) **Polimorfismo de longitud,** ejemplificado por los números variables de repeticiones en tandem (VNTR).

En ambos casos, se puede emplear PCR para acumular fragmentos de DNA que contengan regiones polimórficas y posteriormente se pueden emplear diferentes estrategias para distinguir entre los diferentes alelos⁽⁶¹⁾.

El método más directo, pero a su vez más laborioso para detectar polimorfismo de secuencias, es la secuenciación por procedimientos estándares⁽⁶¹⁾, del DNA amplificado.

En los casos en donde sólo se encuentra presente una sola secuencia variable, como por ejemplo el DNA mitocondrial, la secuenciación directa del producto de la amplificación DNA, no será dudosa, sin embargo en individuos heterocigóticos que contengan dos alelos diferentes, la secuenciación directa del producto amplificado da la mezcla de dos secuencias. En este caso es difícil identificar las dos diferentes secuencias de DNA sin clonarlas, especialmente si los dos alelos difieren en su secuencia en múltiples posiciones⁽⁶¹⁾.

El polimorfismo de secuencias se puede detectar de una manera más fácil y rápida empleando sondas de oligonucleótidos alelo-específicos (ASO). Bajo las condiciones adecuadas, este tipo de sondas solo hibridan con las secuencias con las que se emparejan perfectamente. Para diseñar las sondas ASO se tiene que determinar primero, las secuencias de todos los alelos que comúnmente ocurren. Una vez establecidos, se diseñan las sondas para detectar los alelos por hibridación diferencial⁽⁶¹⁾.

Por otro lado, la diferente longitud que se observa en los VNTR⁽⁵⁹⁾, se puede detectar por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida analítico, mediante el fraccionamiento por tamaño de los productos amplificados por PCR. Estos productos se obtienen empleando cebadores que flanquean la región de repeticiones del locus. El tamaño de los productos generados por PCR, refleja el número de repeticiones en tandem contenidos en cada alelo, siempre y cuando sea elevada la especificidad de la reacción. Si la producción y/o especificidad de la amplificación es baja, los loci de VNTR se pueden detectar por hibridización con una sonda específica para la secuencia de repeticiones en tandem ⁽⁶¹⁾.

El primer y mejor desarrollado sistema para el análisis de muestras forenses por PCR es el sistema DQ alfa. El gen DQ alfa es un gene que pertenece al HLA clase II y contiene una región polimórfica dentro del segundo exón. Usando cebadores que se unen a secuencias conservadas que flanquean esta región, se obtiene un producto de amplificación de 242 pares de bases.

Hasta ahora, se han demostrado 8 alelos de este gen, y se han diseñado sondas para los 6 alelos más comunes, 4 de ellos hibridan a la misma región de variación y distinguen los alelos A1, A2, A3, y A4. El alelo A1 se puede subtipar como A1.1, A1.2 ó A1.3; empleando otro juego de sondas que se unen a otra región de variación río arriba de la primera.

La tipificación del DNA empleando como marcador al sistema DQalfa se puede lograr fácil y rápidamente con hibridación por "dot-blot"⁽⁶⁵⁾.

Se han acumulado las frecuencias genotípicas para poblaciones caucásicas, negras y asiáticas^(61,70). Los 6 alelos generan 21 genotipos, cuyas frecuencias se encuentran entre el 0.005 al 0.15. El poder de discriminación (DP)⁽⁶¹⁾, del sistema de tipificación DQ Alfa, es decir, la probabilidad de distinguir entre 2 individuos elegidos al azar de estas poblaciones, es de 0.93⁽⁶¹⁾ y 0.94⁽⁷⁰⁾, y el poder de exclusión para determinación de paternidad es de 0.64⁽⁷⁰⁾. En cambio empleando marcadores del sistema de grupos sanguíneos, ABO se tiene un poder de discriminación menor (DP. 0.60) así como en el caso de la isoenzima PGM (fosfoglucomutasa) el DP= 0.76⁽⁶¹⁾.

CONTAMINACION

La extraordinaria sensibilidad de PCR es su principal ventaja frente al ensayo de RFLP, sin embargo es también una fuente de preocupación: la

contaminación. El DNA extraño, como ya lo había mencionado en un capítulo anterior puede provenir de diversas fuentes, puede estar incluido en la muestra desde antes de que se colectara la evidencia, durante la manipulación o el análisis de la muestra.

A pesar de que el DNA puede estar contaminado con hongos y bacterias, estos no serán amplificados si se emplean cebadores diseñados para amplificar secuencias humanas. En el caso de la identificación de personas, es mucho más grave la presencia de DNA heterólogo de origen humano (de otro individuo). En algunos casos la presencia de una mezcla de DNA es inevitable, por ejemplo, gran parte de las muestras de semen que se colectan en casos de abuso sexual contienen DNA de dos fuentes^(61,62).

- a) Las células epiteliales de la víctima y
- b) El esperma del violador.

Se pueden separar estos tipos de DNA realizando un procedimiento diferencial de lisis celular, aprovechando la ventaja de que las células espermáticas son insensible a la lisis en ausencia de un agente reductor^(61,62). Dependiendo de las situaciones del crimen, se pueden encontrar gran variedad de mezclas del DNA, como la combinación de sangre, saliva, semen, pelos u otros tejidos, algunas de estas mezclas no pueden ser separadas por lisis diferencial, sin embargo, antes del análisis del DNA, se debe examinar cuidadosamente la evidencia para poder actuar en caso de encontrar la mezcla de DNA.

Para evitar la contaminación se debe trabajar cuidadosamente e implementar alguna de las medidas que se tratan en el capítulo relativo a la contaminación .

Afortunadamente, la presencia de DNA contaminante se puede identificar fácilmente, en un ensayo de hibridación por "dot-blot" a través del cual se

detectarían más de dos alelos. En un análisis de secuencias, los contaminantes producirán ambigüedad. Para una amplificación de VNTR, se encontraría un mayor número de bandas de las esperadas. Para detectar estos inconvenientes se deben correr simultáneamente controles negativos y se sugiere que se realicen dos ensayos de cada muestra para cerciorarse del resultado obtenido, aprovechando que la técnica requiere una cantidad tan pequeña de muestra⁽⁶¹⁾.

FIDELIDAD DE LA AMPLIFICACION.

Una de las mayores preocupaciones legales de la amplificación del DNA por PCR, comprende el hecho que el DNA que se analiza es una copia y no el DNA original, por lo que se debe de estar seguro de la fidelidad de la amplificación. Se ha estimado que la fidelidad intrínseca de la DNA polimerasa es de 1×10^{-4} a 2×10^{-4} incorporaciones erróneas por nucleótido, es decir, 1 error / 10,000 nucleótidos incorporados. Este índice de incorporaciones erróneas no conducen a un importante error de tipificación⁽⁵⁶⁾.

La proporción de ampliaciones que presentan alguna incorporación errónea depende del número inicial de copias del DNA molde y del número de ciclo en el que ocurrió la primera incorporación errónea. El caso más severo, es cuando la incorporación errónea se da en el primer ciclo y se inició con una copia única de DNA molde (por ejemplo, una célula de esperma). En esta situación el 25% de los productos contendrán incorporaciones erróneas. Cuando el número inicial de copias es elevado, o cuando el error en la polimerización ocurre en los ciclos avanzados, la proporción del producto que presenta errores es muy pequeña⁽⁵⁶⁾.

Otra de las regiones que puede ser analizada es el bucle D del DNA

mitocondrial⁽⁶⁶⁾. Este tipo de ensayo demuestra si existen o no relaciones maternas entre individuos. Sin embargo, no se tiene gran cantidad de datos poblacionales para este tipo de marcadores.

Actualmente se ha dado mucha importancia a las secuencias repetitivas que aparecen en el genoma humano y que por el polimorfismo que presentan, también pueden ser empleadas para la identificación de individuos, presentando ciertas ventajas adicionales a los marcadores anteriormente descritos⁽⁶⁴⁾.

Una gran parte del genoma humano (25%) consiste en secuencias repetitivas de DNA cuya característica polimórfica inherente proporciona el más reciente banco de información molecular para el diagnóstico clínico e identificación forense. Entre estas secuencias repetidas del DNA se encuentran: el **DNA minisatélite**, el cual consiste en repeticiones polidispersas: repeticiones de cabeza o cola de un monómero de longitud intermedia (aproximadamente 15 a 70 pares de bases) que ocurren en una región que mide en total, unos miles de pares de bases (hasta 20 kb). Estos minisatélites han sido usados para desarrollar perfiles alélicos de DNA, basados en la técnica de RFLP⁽⁶⁷⁾.

No obstante que el análisis del DNA basados en RFLP ofrece un alto grado de discriminación, presenta algunas limitaciones, siendo como ya se había descrito anteriormente la más importante, la cantidad, relativamente alta (50 a 500 ng) de material genético no degradado que es requerido para hacer un perfil, así como el tiempo (los varios días o semanas) necesario para detectar las secuencias alélicas mediante hibridación secuencial con sondas marcadas radiactivamente. En consecuencia la tipificación del DNA basado en RFLP es un procedimiento tedioso

que no se presta fácilmente a la automatización.

En años recientes y a través del uso de la reacción en cadena de la polimerasa⁽⁶⁴⁾ otra clase de elementos repetitivos, se han convertido en el foco de atención para discriminar entre individuos⁽⁶⁷⁾: los **microsatélites**. Estos pequeños fragmentos de DNA, de menos de 300 pares de bases, están compuestos por monómeros de 2 a 5 pares de bases, repetidos en tandem y así como los minisatélites, se encuentran dispersos a lo largo de genoma.

Todos los VNTRs (número variable de repeticiones en tandem) de los microsatélites y algunos de los minisatélites⁽⁵⁷⁾, son fácilmente amplificados a través de condiciones típicas de PCR, se les conoce como **fragmentos amplificados de longitud polimórfica (AMP.FLPs)**^(58,61) cuando son monómeros de 15-70 pares de bases y **repeticiones cortas en tandem (STR)**⁽⁶⁸⁾ a los monómeros más cortos, de 2-5 pares de bases. Desde su descubrimiento, estas regiones han revolucionado el campo de la identificación humana y son responsables del importante progreso en el desarrollo de los mapas de ligamiento genético humano y de nuevos procedimientos para el diagnóstico clínico.

Los AMP-FLP requieren escasa muestra, son fáciles de resolver en geles discontinuos de poliacrilamida y se detectan rápidamente por medio de tinciones de plata, además estos procedimientos son susceptibles a automatización.

Entre los sistemas AMP-FLP que se han empleado exitosamente para la tipificación se encuentran el D1S80 y D17S30^(67,69).

Se han documentado gran cantidad de STR (se estima que el genoma humano contiene aproximadamente 500,000 STR) cada una caracterizada por un número limitado de alelos fáciles de identificar y que analizados en forma colectiva

ofrecen un potencial ilimitado para su ensayo altamente discriminante en la identificación de individuos. Para que posea validez su utilización se requiere conocer su distribución en la población a analizar^(64,68,70). En la tabla 8 se observan algunos ejemplos de los cebadores que se pueden emplear para la identificación de individuos.

Tabla N° 8. Características de algunos sistemas STR en estudio^(58,67)

Sistema	Localización Cromosómica.	Unidad de Repetición	Tamaño del Producto (pb)	Cebadores 5'-->3'
HumCD4	12p	AAAA G	140-170	TTACGCGTTTGGAGTCGCAAGCTGAAGCTAGCG CCAGGAAGTTGAGGCTGCAGTGAA
HumvWF	12	TCTA	102-154	CCCTAGTGGATGATAAGAATAATC GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG GGACAGATGATAAATACATAGGATGGAT
HumTH01	11p15.5	AATG	179-207	GTGGGCTGAAAAGCTCCCATTAT ATCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG
HumD21S1 1	21	TCTA/ TCTG	172-284	GTGAGTCAATTCCCAAG GTTGTATTAGTCAATGTTCTCC
HumFABP	4q31	AAT	199-223	GTAGTATCAGTTTCATAGGGTCACC CAGTTCGTTTCCATTGTCTGTCCG
HumACTBP 2	6	AAAG	231-339	ACATCTCCCCTACCGCTATA AATCTGGGCGACAAGAGTGA
HumHPRT	Xq26	AGAT	257-297	ATGCCACAGATAATACACATCCCC CTCTCCAGAATAGTTAGATGTAGG
HumARA	Xcenq13	AGC	255-315	TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC GCTGTGAAGGTTGCTGTTCTCAT

CANCER

Se considera que el cáncer se debe principalmente a alteraciones en el genoma celular que afectan la expresión o función de genes que controlan el crecimiento y diferenciación celular⁽⁷¹⁾. Actualmente se busca identificar las alteraciones responsables de la tumorigénesis, caracterizando los genes involucrados y determinando las consecuencias de las alteraciones genéticas en el control del crecimiento y diferenciación para el proceso de carcinogénesis.

Se han empleado diversos caminos para identificar a los genes que participan en la carcinogénesis⁽⁷¹⁾:

- 1) Transfección de DNA tumoral en células de ratón NIH/3T3 y selección de genes transformantes.
- 2) Aislamiento de genes alterados por inserción o secuencias virales.
- 3) Aislamiento directo de genes que presentan una alteración visible en células tumorales, tal como una translocación cromosómica.
- 4) Aislamiento de genes con secuencias similares a genes descubiertos por otros caminos⁽⁷¹⁾.

Empleando estas estrategias se han identificado gran cantidad de genes, pero sólo algunos de ellos han sido implicados en el desarrollo de tumores humanos. De éstos, la familia *ras* ha sido una de las más investigadas.

Esta familia consiste de tres genes muy parecidos. *Harvey-ras*, *Kirsten-ras* y *N-ras* los cuales se han caracterizado como genes potencialmente transformantes

por su presencia en ciertos retrovirus de transformación aguda y células NIH-3T3 transformadas, transfectadas con DNA aislado de gran variedad de tumores. Codifican para proteínas de 188-189 aminoácidos que se localizan en la superficie interna de la membrana celular y son capaces de hidrolizar GTP a GDP *in vitro* e *in vivo*, participan en la transducción de señales a través de la membrana celular⁽⁷²⁾.

Estos tres genes se activan, debido a una mutación puntual en uno de los codones críticos: 12, 13 y 61, un aminoácido del producto protéico se altera. Estas situaciones fueron originalmente detectadas por experimentos de transfección, seguidos por la clonación y secuenciación⁽⁷¹⁾.

El método más sencillo para detectar las mutaciones puntuales en los genes *ras*, es un procedimiento en dos etapas que involucra PCR⁽⁷¹⁾. En la primera etapa, se emplean cebadores que flanquean la secuencia que se desea amplificar, el DNA alrededor de los codones 12, 13 y 61 para los genes de la familia *ras*, y se amplifica *in vitro*. En vista de que el codón 61 se encuentra separado de los codones 12 y 13 por un intrón grande, es necesario amplificar el DNA alrededor de esas regiones empleando dos pares de cebadores independientes. Algunos de los cebadores que se pueden emplear se observan en la tabla N° 9. Se puede realizar la técnica de tres maneras distintas:

- 1a. Amplificando cada región en un tubo diferente.
- 2a. Amplificando la región del codón 12 de los tres genes *ras* en un tubo, y la región alrededor del codón 61 de los tres genes en un segundo tubo.
- 3a. Amplificando la región 12 y 61 de cada gen *ras* en forma individual.

Tabla N° 9. Lista de algunos cebadores para la amplificación del oncogene *ras* humano⁽⁷³⁾

Codón	Secuencia del Cebador	Hebra
N-12+13	CTTGCTGGTGTGAAATGACT ACAAAGTGGTTCTGGATTAG	S A
N 61	GTTATAGATGGTCAAACCTG AAGCCTTCGCCTGTCCTCAT	S A
Ki-12+13	TTTTTATTATAAGGCCTGCT GTCCACAAAATGATTCTGAA	S A
Ki 61	ACCTGTCTCTTGGATATTCT TGATTTACTATTATTTATGG	S A
Ha-12+13	GAGACCCTGTAGGAGGACCC CGTCCACAAAATGGTTCTGG	S A
Ha-61	CCGGAAGCAGGTGGTCATTG ACACACACAGCAAGCCCTCC	S A

En la segunda etapa se aplica una alícuota del volumen amplificado mediante PCR a filtros en forma de "dot-blot" y se detectan las secuencias correspondientes a todas las posibles sustituciones de aminoácidos que puedan generarse por mutaciones en los codones 12, 13 y 61 de cada gen *ras*, por medio de sondas radiactivas. Las reacciones positivas son aquellas que son totalmente complementarias a esa sonda⁽⁷³⁾.

N-ras se asocia frecuentemente a tumores de origen hematopoyético y *c-K-ras* a carcinomas, encontrándose alterado en un 95% de los carcinomas de páncreas^(71,74), en 40-60% de los carcinomas colorectales⁽⁷⁴⁾ y en un 30% en los pulmonares^(71,74). El oncogen *H-ras* mutado, es el que presenta la menor incidencia en tumores humanos⁽⁷²⁾.

Algunos investigadores piensan que se requiere la acumulación de mutaciones (de 6 a 10) para desarrollar un cáncer⁽⁷⁵⁾, algunas causando la activación de oncogenes y otras inactivando a los genes supresores tumorales.

Actualmente, se piensa que los oncogenes actúan directamente para conferir autonomía a la proliferación y son capaces de activar en forma constitutiva los mismos caminos de señales mitóticas que normalmente dependen de factores de crecimiento. La proliferación celular deja de depender de la estimulación exógena⁽⁷⁵⁾.

Los oncogenes logran esta función siguiendo diferentes estrategias, inicialmente algunos oncogenes inducen la liberación de factores de crecimiento mitogénicos, ya sea codificando para ellos o induciendo la activación de los genes que los producen. Se vuelven autócrinas la células (se autoestimulan) hasta dejar de requerir de los factores de crecimiento⁽⁷⁵⁾.

Otro mecanismo que pueden usar para adquirir la autonomía es por las cascadas de señales intracelulares que son activadas por receptores que se unen a factores de crecimiento. La señal llega hasta el núcleo donde se afecta la decisión de iniciar el desarrollo. Algunos componentes citoplasmáticos de estas cascadas, sufren alteración estructural que les confiere la capacidad de liberar señales de

estimulación, aún sin haber sido excitadas previamente. Ejemplo de este tipo de oncogenes son la familia *ras* que se encuentra en un 25-30% de todas las lesiones malignas⁽⁷⁵⁾ y el oncogen *abl* activo en algunas leucemias mielógenas crónicas y agudas.

En el núcleo celular, hay varios genes que regulan el crecimiento y que responden a la estimulación por factores de crecimiento generando un elevado y rápido aumento en su expresión, el mejor conocido de este tipo de genes es *myc*, que codifica para un factor de transcripción responsable de la regulación de un banco de genes respondedores⁽⁷⁵⁾. Los oncogenes nucleares como *myc* pueden expresarse en forma constitutiva, independientemente de sus controles normales. Estas desregulaciones ocurren por alteraciones estructurales o por sobreexpresión⁽⁷⁵⁾.

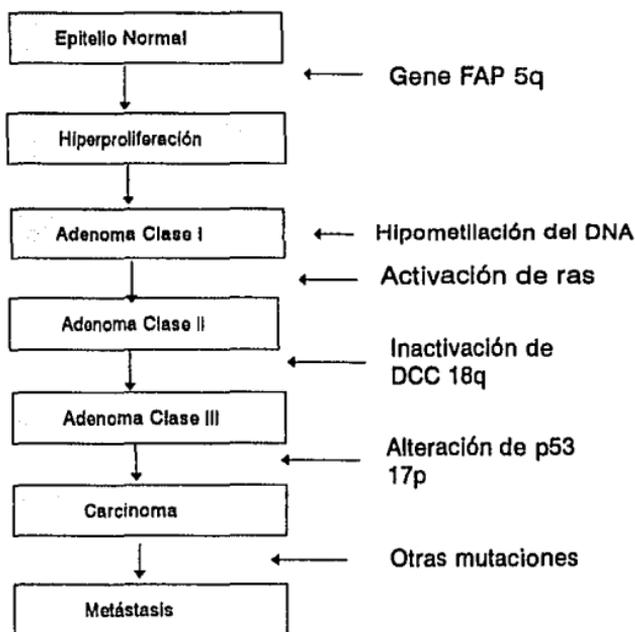
En el cáncer colorectal se observan correlaciones entre los cambios en el fenotipo celular y la presencia de mutaciones en el genoma de esas células (figura N° 14), aunque se sabe poco acerca de los eventos que desencadenan el fenotipo maligno⁽⁷⁶⁾. En este tipo de cáncer se ve la colaboración de activación de oncogenes e inactivación de genes de supresión tumoral para desarrollar el cáncer.

Desde hace mucho tiempo se sabe que el proceso de tumorigénesis abarca múltiples etapas, pero sólo recientemente se han podido identificar los eventos moleculares que conllevan a la iniciación y progresión de los tumores en humanos.

Los tumores colorectales son un excelente sistema para estudiar y analizar las alteraciones genéticas involucradas en el desarrollo de un neoplasma humano^(78,79,80). Existe abundante información clínica e histopatológica que señala

que la mayoría, si no es que todos los tumores colorectales malignos (carcinomas) provienen de un tumor benigno (adenoma) preexistente, y que se encuentran involucrados factores hereditarios y ambientales en el desarrollo de las neoplasias colorectales⁽⁷⁸⁾ (figura N° 14).

Figura N° 14. Correlación de las Alteraciones Genéticas y el Desarrollo de Cáncer Colorectal ^(70,77)

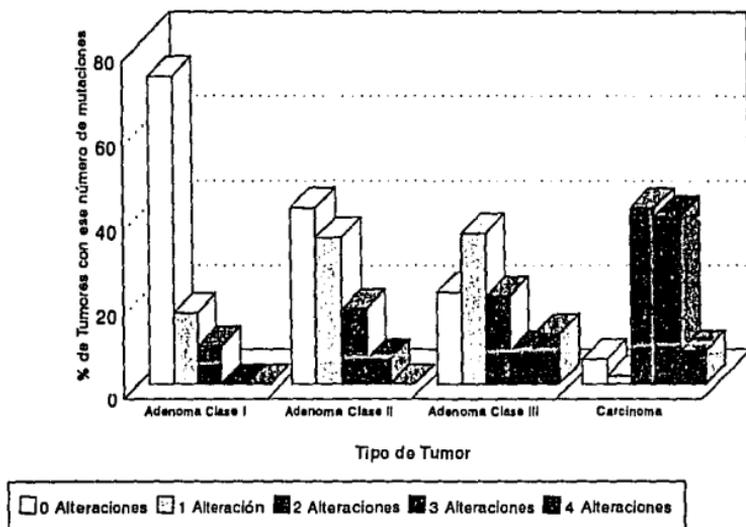


Con respecto a este tipo de cáncer se han postulado cuatro principios⁽⁷⁸⁾:

1) Los tumores colorectales son un ejemplo de la activación de oncogenes acoplados a la inactivación de genes supresores tumorales, ocurriendo ambos eventos por mutaciones.

2) Se requiere de por lo menos 4 a 5 genes mutados para la formación del carcinoma, y de un número menor para el adenoma (figura N° 15).

Figura N°15. Múltiples Alteraciones Genéticas en Tumores Colorectales

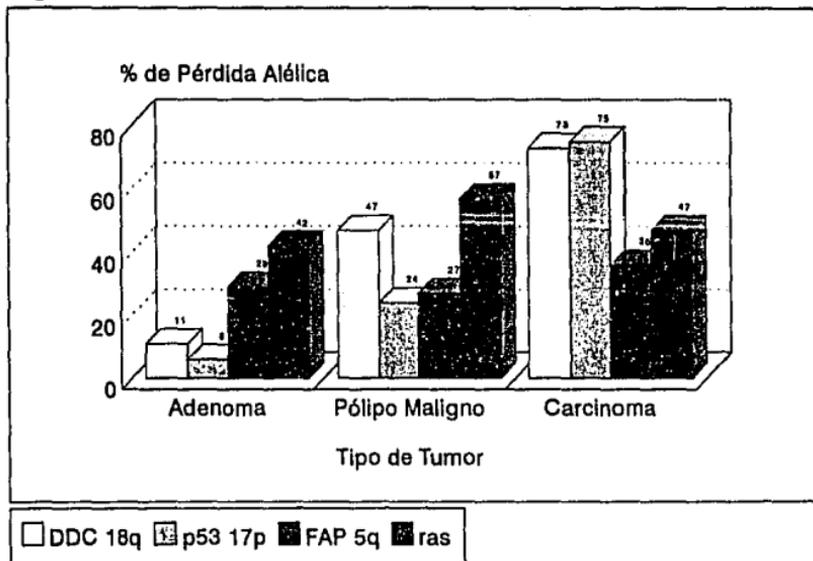


(Vogelstein B, Fearon E R, et al, 1988 (80))

3) Las propiedades biológicas del tumor están determinadas por la acumulación total de mutaciones, más que por el orden en el que ocurren, aunque generalmente siguen una secuencia preferida, como se observa en las figuras N° 14 y N° 16.

4) En algunos casos, los genes supresores tumorales pueden afectar el fenotipo aún al encontrarse en estado heterocigótico (por ejemplo p53).

Figura N°16. Alteraciones Genéticas en Tumores Colorectales



(Vogelstein B, Fearon E R, et al, 1988 (80))

Alteraciones Genéticas en Oncogenes

Como ya había mencionado anteriormente, uno de los tipos más importantes de alteraciones somáticas en los tumores colorectales se debe a mutaciones en el gen *ras*. Aproximadamente el 50% de los carcinomas colorectales y un porcentaje similar de los adenomas mayores a 1cm presentan mutaciones en este oncogen^(80,78,79).

Las mutaciones en el gen *ras* pueden ser el evento iniciador del tumor o

presentarse en células de adenomas preexistentes; conduciendo a los adenomas pequeños a adenomas de mayor tamaño y displasia⁽⁷⁸⁾ por la expansión clonal de la célula que presenta la mutación.

Pérdidas alélicas y Genes Supresores Tumorales

En las neoplasias colorectales se observan frecuentemente pérdidas de regiones cromosómicas específicas. Generalmente las pérdidas sólo involucran a uno de los dos alelos, este evento se conoce como pérdida de la heterocigocidad (LOH). Estas pérdidas alélicas se interpretan como evidencia de que las regiones afectadas contienen genes con actividad de supresión tumoral, cuyo producto normalmente regula el crecimiento y diferenciación, en forma negativa, suprimiendo indirectamente el desarrollo neoplásico.

En el Síndrome de la Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP), se ha encontrado una predisposición genética a formar tumores colorectales⁽⁸⁰⁾. Este es un padecimiento autosómico dominante que afecta a 1 de cada 8,000 personas en E.U.A, estando en riesgo 1 de cada 4,000 norteamericanos⁽⁸¹⁾, se caracteriza por el desarrollo de cientos de adenomas colorectales. El *locus* asociado a este síndrome se localiza en la región 5q.21^(78,81).

En pacientes que no presentan pólipos, se han detectado también pérdidas alélicas en el cromosoma 5q en un 20-50% de los carcinomas colorectales y en un 30% de los adenomas colorectales. Sin embargo en los adenomas de los pacientes con FAP, las pérdidas alélicas en el cromosoma 5q son raras^(78,82).

Por medio de PCR se han podido determinar los codones en donde se desarrollan

la mayoría de las mutaciones somáticas en este gen⁽⁸³⁾. Por otro lado se ha descubierto que el 75% de los carcinomas colorectales carecen de una porción considerable del cromosoma 17p^(78,79), ya sea por pérdida o recombinación mitótica, esta pérdida es poco frecuente en adenomas de cualquier etapa. En gran parte de los pacientes se detecta una asociación entre la pérdida alélica del cromosoma 17p y la progresión del adenoma a carcinoma⁽⁷⁸⁾.

En otro tipo de tumores como el de mama, pulmón, vejiga y cerebro también se encuentra frecuentemente la pérdida de un alelo en 17p. La región común de pérdida en este cromosoma es la que contiene al gen p53⁽⁷⁸⁾.

Se han encontrado en los alelos permanentes cuando se pierde el otro alelo, mutaciones en el gen p53 que conducen a la sustitución de aminoácidos en la proteína resultante⁽⁷⁸⁾.

En los tumores colorectales frecuentemente ocurren mutaciones puntuales de uno de los alelos p53, mientras que el otro alelo, el silvestre, se pierde. Se han encontrado resultados similares en tumores de pulmón, mama y cerebro, entre otros^(78,83a).

De esta manera surgió la hipótesis de que el gen p53 silvestre inhibe el crecimiento del tumor colorectal y que la remoción de este gen es la presión selectiva que conduce a la pérdida alélica del cromosoma 17p en estos tumores. La proteína p53 mutada inactiva a la proteína p53 normal, no pudiéndose continuar suprimiendo la progresión tumoral^(78, 83a).

La segunda región más común de pérdida alélica en los tumores colorectales se localiza en el cromosoma 18q. En el 70% de los carcinomas y en el 50% de los adenomas tardíos se observa pérdida en este gen al que se conoce como DCC (las

siglas significan que ese gen sufre delección en el cáncer colorectal⁽⁸⁴⁾, el cual codifica para una proteína bastante semejante a las moléculas de adhesión celular. Este gen se expresa en la mucosa normal del colon, y su expresión es reducida o se encuentra ausente en la mayoría de los carcinomas colorectales. Esta falta de expresión se ha asociado en algunos casos con mutaciones somáticas en el gen DCC. La mutación en este gen pudiera alterar las interacciones entre las células o entre las células y la matriz extracelular.

En las etapas tempranas de la tumorigénesis, se ha visto una pérdida significativa de grupos metilo en el DNA. Al examinar el DNA de adenomas muy pequeños, se ha encontrado que hasta una tercera parte de las regiones estudiadas habían perdido grupos metilo (aproximadamente 10 a 20 millones de grupos metilo por célula), esto se conoce como hipometilación e inhibe la condensación cromosómica pudiendo conducir a una no disyunción mitótica ocasionando la pérdida o ganancia de un cromosoma. A pesar de que los tumores colorectales están hipometilados, existen algunas regiones del genomaespecíficas en donde se observa hipermetilación. Esto contribuye a la inestabilidad del genoma de la célula tumoral y modifica la velocidad en la que ocurren las alteraciones genéticas⁽⁷⁸⁾.

La tumorigénesis se inicia con la hiperproliferación celular. Una, o un pequeño número de células inician el proceso de neoplasia por expansión clonal formando un pequeño adenoma tubular (pólipo). Los adenomas progresan gradualmente, aumentando su tamaño, así como su displasia y adquieren arquitectura en forma filamentosa "villous". Los adenomas se consideran como tumores benignos pero si una de estas células adquiere la capacidad de proliferar más que sus compañeras e invade la membrana basal, se vuelve por definición un carcinoma, el cual puede

progresar adquiriendo la habilidad para realizar metástasis a los nódulos linfáticos regionales y/o a sitios distantes como el hígado (figura N° 14). El proceso completo comprende décadas⁽⁷⁸⁾.

Los pacientes con FAP, heredan la mutación en el cromosoma 5p. En tumores esporádicos, esta misma región puede estar mutada o perderse. La hipometilación del DNA puede generar aneuploidia, produciendo alteraciones en los cromosomas 5, 17 y 18, lo que ocasiona la pérdida de genes supresores. Las deleciones en los cromosomas 17 y 18 ocurren generalmente en etapas tardías⁽⁷⁷⁾ (figura N° 16).

Actualmente por medio de PCR se estudia la inestabilidad de los microsatélites, particularmente en el cromosoma 2, el que también se ha asociado al cáncer colorectal^(84,85,86), especialmente la predisposición al Síndrome de Cáncer Colorectal No Polipoideo Hereditario (HNPCC)⁽⁸⁷⁾ el cual es más común que el FAP, contribuyendo en un 4 -13% de los cánceres colorectales en los países industrializados⁽⁸⁷⁾. Esta enfermedad se define por la presencia de tres o más familiares con cáncer colorectal en por lo menos dos generaciones sucesivas, habiendo sido diagnosticado antes de los 50 años de edad en alguno de los miembros afectados⁽⁸⁷⁾.

En la búsqueda de alteraciones genéticas que puedan participar en la tumorigénesis se han encontrado frecuentemente mutaciones en protooncogenes así como en genes supresores tumorales. Otras secuencias del genoma se ven afectadas como consecuencia de su unión a estos genes críticos. Se ha encontrado que aproximadamente 20% de las secuencias genómicas pierden heterocigidad (LOH) en el cáncer colorectal⁽⁸⁸⁾. En general esto se debe a la pérdida de

secuencias cromosómicas que acompañan la inactivación de los genes de supresión tumoral en células malignas.

Además de estas pérdidas de alelos, el incremento en secuencias cromosómicas en el genoma de la célula tumoral con respecto al genoma normal subyacen tal como la aneuploidia de las células cancerosas tal como se observa citogenéticamente⁽⁸⁸⁾.

Las huellas genéticas empleando secuencias altamente polimórficas de VNTR (número variable de repeticiones en tandem) también se ha aplicado a la detección maligna y a estudiar de la clonalidad de más tumores primarios y metastásicos. La técnica de PCR se ha empleado extensamente para la detección y caracterización de las mutaciones asociadas al desarrollo del tumor. Las huellas genéticas son una de las técnicas que se han beneficiado de la aparición de PCR⁽⁸⁸⁾.

Existe una variación de PCR conocida como la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Cebadores Arbitrarios (AP-PCR), la cual fue desarrollada por Welsh y Mc Clelland⁽⁸⁹⁾, es un método fácil y rápido, que puede ser empleado para cualquier especie: humanos, animales, microorganismos, etc. y permite encontrar polimorfismo. Esta técnica utiliza la amplificación con un único cebador arbitrario, los primeros ciclos de la amplificación se desarrollan con una baja temperatura de apareamiento la cual se incrementa en los ciclos subsecuentes .

En los ciclos iniciales, el cebador se hibrida a muchas secuencias del DNA genómico total. Cuando se incrementa la temperatura sólo las secuencias que presentan el apareamiento más exacto continúa amplificándose, generando un

número discreto de bandas que producen huellas genéticas del genoma celular. Este procedimiento se ha aplicado para mapear los polimorfismos del DNA en varios sistemas procariontes y eucariontes⁽⁸⁸⁾.

En uno de los estudios realizados empleando la técnica AP-PCR, se encontró que se pueden detectar alteraciones genéticas somáticas específicas del tumor al comparar las huellas genéticas generadas por AP-PCR de tejido normal y tumoral del mismo individuo. Además en contraste con la técnica clásica de huellas genéticas por medio de VNTR, el método AP-PCR, permite clonar directamente las secuencias del DNA amplificado *in vitro*, detección aislamiento y localización cromosómica de las secuencias del DNA que frecuentemente han sufrido pérdidas de alelos en tumores colorectales. También muestra que el método es útil para la detección y aislamiento de fragmentos de DNA que corresponden a regiones cromosómicas presentes en múltiples copias en el genoma de células tumorales⁽⁸⁸⁾.

Entre los cebadores que se han empleado destacan⁽⁸⁸⁾:

Kpn X 5'-CTTGCGCGCATACGCACAAC-3'.

Mcg 1 5'-AACCCCTACCCTAACCCCAA-3'.

También se han empleado : 3U, K3IS, 6U, Alu, etc⁽⁹⁰⁾.

El Método de AP-PCR⁽⁸⁹⁾ es útil para el análisis de alteraciones genéticas que tienen lugar durante el desarrollo tumoral. El gran número de secuencias de DNA amplificadas con cebadores arbitrarios genera un patrón de bandas complejo que permite detectar diferencias cualitativas y cuantitativas entre el genoma de las células normales y tumorales. Debido a la naturaleza de baja "estringsencia", dependiente de la secuencia de nucleótidos del cebador que es escogida al azar, se postula que las secuencias del DNA amplificadas *in vitro* deberían representar una muestra pequeña pero representativa del genoma y que, por lo tanto, no debería

de haber sesgo en relación a su localización cromosómica. Además, se considera que deben cumplir dos condiciones:

- 1) que las bandas deriven de secuencias únicas y
- 2) que su intensidad sea proporcional a la concentración de las secuencias diana, entonces, con estos experimentos simples, se podría obtener información sobre la composición cromosómica global de la célula. Estas predicciones se han confirmado aplicando el AP-PCR para el análisis de las alteraciones genéticas que ocurren durante el desarrollo tumoral del colon y recto⁽⁸⁸⁾.

La identificación de secuencias que han sufrido pérdidas alélicas demuestra que el AP-PCR es un método cuantitativo. Aunque la pérdida de heterocigosidad puede ser detectada fácilmente por RFLP utilizando la hibridización por el método de "Southern" o por distintas técnicas basadas en PCR, ninguno de estos métodos permite determinar formalmente si el cambio en la proporción de los alelos en el tejido tumoral con respecto al tejido normal es debido a la pérdida de uno de los alelos o a la amplificación del otro. El problema sólo se puede resolver incorporando otras secuencias no relacionadas como control interno⁽⁸⁸⁾. El método del AP-PCR conlleva estos controles internos debido a la amplificación simultánea de otras secuencias de DNA que se pueden usar como calibración interna para la(s) banda(s) de interés. Además, la naturaleza competitiva entre las amplificaciones de secuencias diferentes que tienen lugar durante la reacción es también un determinante importante de sus propiedades cuantitativas⁽⁸⁸⁾. La observación de polimorfismos de longitud por el AP-PCR facilita la detección de las pérdidas alélicas de estas secuencias y permite detectar la pérdida de un alelo en las células tumorales, también puede detectar la duplicación del alelo restante.

Los procedimientos de clonación diferencial utilizando DNA genómico se han aplicado para aislar secuencias diferentes entre dos genomas aparentemente idénticos, como es el caso de las secuencias delecionadas durante el desarrollo tumoral. Estos métodos se basan en pasos consecutivos de enriquecimiento de las secuencias de interés por medio de la sustracción por apareamiento del DNA celular⁽⁸⁸⁾.

En contraste con los métodos de análisis de huellas génicas "fingerprinting" de DNA utilizando minisatélites⁽⁸⁸⁾, el AP-PCR permite la clonación directa de secuencias que representan distintos tipos de alteraciones genéticas, incluyendo deleciones. También en contraste con los diferentes procedimientos de clonación diferencial⁽⁸⁸⁾, este método no requiere que la deleción de estas secuencias sea homocigótica para ser detectada y aislada. La ausencia de una banda es una condición necesaria pero no suficiente para concluir que la misma ha sufrido una pérdida homocigótica en el tumor, debido a la existencia de alelos que no se amplifican por tener diferencias polimórficas en la zona de hibridización con el cebador arbitrario. Sin embargo, en principio debe ser posible identificar y aislar, por AP-PCR, secuencias delecionadas homocigóticamente con un número de experimentos directamente proporcional al tamaño de la deleción⁽⁸⁸⁾. Por ejemplo, la identificación de una deleción homocigótica de secuencias que representan un 0.1% del genoma debe ser posible con el uso de 10-20 cebadores arbitrarios. Como corolario, el tamaño de la deleción puede ser estimado por el análisis comparativo del número total acumulativo de bandas amplificadas que es necesario para su detección⁽⁸⁸⁾.

El método del AP-PCR es también útil para la detección y aislamiento de

secuencias de DNA amplificadas que presentaron niveles de amplificación muy por debajo del mínimo requerido por otros métodos⁽⁸⁸⁾. Además, la identificación y aislamiento de secuencias contenidas en unidades de amplificación génica implicada en la adquisición de resistencia a fármacos quimioterapéuticos, tales como los "diminutos dobles" también debe ser posible con un número accesible de experimentos⁽⁸⁸⁾.

Debido al alto nivel de daño genético inespecífico que tiene lugar en tumores sólidos, la detección de secuencias de DNA que han sufrido deleciones heterocigóticas o niveles de amplificación moderados, no garantiza que estas secuencias estén ligadas a genes que juegan un papel activo en oncogénesis. Sin embargo, la observación por AP-PCR de la implicación de estas secuencias en el mismo tipo de alteraciones genéticas recurrentes en varios tumores independientes, disminuye la probabilidad de aislar fragmentos de DNA que corresponden a regiones cromosómicas alteradas al azar durante el desarrollo tumoral. La asignación a la región 17p de las secuencias polimórficas AP1/AP2, aisladas por AP-PCR y seleccionadas inicialmente por la detección también por AP-PCR de su pérdida en varios tumores, demuestra la confiabilidad del método para identificar y aislar secuencias de DNA que corresponden a regiones cromosómicas relevantes en el desarrollo tumoral⁽⁸⁸⁾.

En conclusión, el método del AP-PCR permite la clonación, en un solo paso, de secuencias de DNA que han sufrido las dos alteraciones más comunes en el genoma de las células cancerosas: pérdidas alélicas y amplificaciones génicas moderadas. Esto no puede lograrse por ninguno de los métodos disponibles actualmente, tanto por sí solos como en combinación. La determinación rápida

y simultánea de la localización cromosómica de estas secuencias supone una herramienta poderosa para el análisis de las regiones del genoma implicadas en el desarrollo tumoral y la base para un enfoque molecular alternativo a la citogenética de los tumores sólidos⁽⁸⁸⁾.

Otra aplicación muy importante de PCR es con respecto a la detección temprana de micrometástasis provenientes de cáncer de mama. Cuando se realiza una intervención quirúrgica como tratamiento contra el cáncer de mama en etapas primarias, rutinariamente se disectan los nódulos linfáticos axilares, ya que éstos son el primer sitio de metástasis, por lo que son el factor pronóstico más importante⁽⁹¹⁾. La supervivencia a 10 años, libre de cáncer, en pacientes con nódulos negativos (sin metástasis) es del 75%, mientras que en pacientes con 1 a 3 nódulos es del 30 al 40%, y en pacientes con más de 3 nódulos es del 15 al 20%⁽⁹²⁾.

Más del 50% de las pacientes con cáncer de mama no presentan evidencia de enfermedad residual o metastásica empleando métodos convencionales, Sin embargo, aproximadamente el 30% de estas mujeres tendrán una reincidencia con padecimiento metastásico distante dentro de los siguientes 5 años⁽⁹¹⁾. El poder identificar las micrometástasis permite un mejor cálculo del pronóstico de las mujeres con cáncer de mama, y definir a las mujeres que se beneficiarían de la administración de quimioterapia⁽⁹¹⁾.

Las micrometástasis de nódulos axilares en pacientes con cáncer de mama se han detectado por medio de diferentes técnicas: seccionamiento seriado e inmunología⁽⁹¹⁾. De un total de 2,400 pacientes, aproximadamente el 13% se

convertirá de nódulo negativo a positivo por medio de estas técnicas de diagnóstico, y un porcentaje un poco mayor usando la inmunohistología⁽⁹¹⁾.

La presencia de micrometástasis se correlaciona con algunos factores pronósticos convencionales tales como: el tamaño del tumor y la invasión vascular peritumoral⁽⁹¹⁾. La presencia de tan solo una micrometástasis en un nódulo linfático comparada contra la enfermedad sin nódulos positivos se asocia a una diferencia significativa en cuanto a recurrencia y supervivencia⁽⁹¹⁾. Adicionalmente, la quimioterapia perioperativa, proporciona una ventaja adicional en cuanto a supervivencia libre de infección en este grupo de pacientes. Sin embargo, el número de pacientes que se convierten de nódulo negativo a positivo con las técnicas inmunohistoquímicas, es mucho menor al 25-30% que va a recurrir dentro de los 5 años después de la cirugía. En vista de este hallazgo, se requiere una técnica más sensible que el seccionamiento seriado a la inmunohistoquímica⁽⁹¹⁾.

PCR se basa en la amplificación de genes únicos o sobreexpresados en las células tumorales, por ejemplo el fragmento *bcr/abl* de la traslocación cromosómica en la leucemia mieloide o el antígeno específico prostático, en el cáncer de próstata. No se ha identificado ningún marcador tumoral específico para las células de cáncer de mama. Se emplearon inicialmente como cebadores diversos genes que se expresan en las células de mama (marcadores) entre los que se encuentran los que corresponden a la proteína de choque 89, el receptor de estrógenos, D52, antígeno de la membrana epitelial y K19. El análisis de células cancerosas se enfocó al cebador K19 que corresponde a la citoqueratina 19 pues fue el único marcador discriminante, no se encontró en las células de los nódulos linfáticos no invadidos,

y aunado al análisis por "Southern blot" un 28% de los nódulos que por tinción parecían ser negativos, resultaron ser positivos indicando administrar la quimioterapia a esas pacientes⁽⁹¹⁾.

La detección de secuencias de genes específicos por medio de PCR es un método más sensible que los descritos anteriormente y hasta se puede esperar que aumente la proporción de micrometástasis detectadas⁽⁹¹⁾. Ya se ha visto que células circulantes como las de neuroblastoma pueden ser detectadas de sangre periférica a un nivel de 1 en 10^7 usando la amplificación por PCR, la cual es 100 veces más sensible que la inmunocitología, conservando la especificidad⁽⁹¹⁾.

El potencial de PCR para detectar las micrometástasis de cáncer de mama, está limitado únicamente por la especificidad del marcador tumoral⁽⁹¹⁾.

CONCLUSIONES

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un instrumento muy útil y valioso para la investigación y el diagnóstico a nivel molecular. Es una técnica rápida, fácil, muy sensible y susceptible a automatización que permite amplificar un fragmento específico de DNA a partir de una muestra muy pequeña y/o compleja.

Las condiciones generales permiten la amplificación de la mayoría de los sistemas, sin embargo es fundamental su optimización, de esta manera se obtiene un sistema más eficiente al evitarse la aparición de productos inespecíficos, incluyendo a los dímeros de cebador y retardando la llegada de la fase de meseta.

Para realizar esta reacción se puede utilizar cualquier material que posea DNA y que no posea inhibidores, siendo su preparación muy sencilla, pues se requiere únicamente de la extracción del material genético.

El cuidado más importante que todo investigador debe de tener al realizar esta técnica es evitar la contaminación, problema común debido a la elevada sensibilidad que presenta este método. Para evitarla se han desarrollado gran cantidad de procedimientos que reducen considerablemente el riesgo de presentar este problema.

En el campo de la Infectología participa en el diagnóstico de gran cantidad de infecciones, con gran rapidez, sensibilidad y sobretodo especificidad, lo cual contribuye a establecer, de forma rápida (con prontitud) el diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

Es destacada la participación de esta técnica en el campo de las enfermedades genéticas, pudiéndose establecer el diagnóstico aún antes de implantar el óvulo fecundado, evitando el sufrimiento de las personas afectadas y sus familiares.

En el terreno del cáncer, PCR ha permitido investigar diversas áreas como el diagnóstico temprano, monitoreo del tratamiento y para establecer un pronóstico. Detectar micrometástasis que por otros métodos eran indetectables, lo cual permite un tratamiento más temprano, acción que mejora el pronóstico.

También ha permitido que se desarrolle enormemente la investigación, buscando los genes y mutaciones implicados en el procedimiento de carcinogénesis.

Es de gran importancia su contribución a la identificación de individuos por su elevada sensibilidad, especificidad y rapidez, supera a las técnicas que anteriormente se aplicaban como RFLP pudiéndose establecer un dictamen con mayor rapidez y sobretodo a partir de las escasas o complejas muestras que se obtienen en la Medicina Forense. Además contribuye a una mejor elección del donador para un transplante así como para el monitoreo de éste. La identificación de individuos también permite determinar susceptibilidad a ciertas enfermedades.

PCR abre campos enormes para la investigación y el diagnóstico. Sus aplicaciones son ilimitadas, y así como la reacción, sus usos se están ampliando en forma exponencial.

APENDICE I (Abreviaturas)

Å	- Unidades Angstrom (0.1nm)
A	- Adenina
AMP.FLPs	- Fragmentos amplificados de longitud polimórfica
Amplificación	- DNA producto de una amplificación por PCR
AMV	- Virus de la mieloblastosis aviaria
AP-PCR	- PCR empleando cebadores arbitrarios
ASO	- Sondas de oligonucleótidos alelo-específicas
C	- Citosina
cDNA	- DNA complementario
cebador	- "primer" - oligonucleótido
CRS	- Complejo relacionado al SIDA
CsCl	- Cloruro de cesio
Da	- Daltones
dATP	- Desoxiadenina trifosfato
DCC	- Deleción en el cáncer colorectal
dCTP	- Desoxicitosina trifosfato
ddNTP	- Didesoxirribonucleótido trifosfato
DEP	- Dietilpirocarbonato
dGTP	- Desoxiguanina trifosfato
DP	- Poder de discriminación
DMF	- Dimetilformamida
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Acido desoxirribonucléico
dNMP	- Desoxirribonucleótido monofosfato
dNTP	- Desoxirribonucleótido trifosfato
DTT	- Ditioneitol
dTTP	- Desoxitimina trifosfato
EDTA	- Acido etilendiaminotetraacético

EH	- Enfermedad de Huntington
EIA	- Ensayo Inmunoenzimático
<i>env</i>	- Relativo a la envoltura
FAP	- Síndrome de la Poliposis Adenomatosa Familiar
G	- Guanina
<i>gag</i>	- Relativo al núcleo
<i>gp</i>	- Glucoproteína
h	- Hora
HIV	- Virus de la Inmunodeficiencia Adquirida
HLA	- Antígeno Leucocitario Humano
HNPCC	- Síndrome de Cáncer Colorectal No Polipoideo Hereditario
HTLV	- Virus T Linfotrópico Humano
ICD	- Disociación de complejos inmunes
IFA	- Ensayo Inmunofluorescente
IHB	- Amortiguador isotónico de pH alto
LOH	- Pérdida de la heterocigosidad
Mg²⁺	- Ión magnesio
MgCl₂	- Cloruro de magnesio
NAD⁺	- Dinucleótido de nicotinamida y adenina (oxidado)
NP-40	- Nonidet P-40 (detergente no iónico)
NTP	- Nucleótido trifosfato
OSH	- Hibridación con una suspensión de oligonucleótidos radiactivos
p	- Proteína
pb	- Pares de bases
PBMC	- Células mononucleares de sangre periférica
PBS	- Solución salina amortiguadora de fosfatos
PCR	- La reacción en cadena de la polimerasa
PGM	- Fosfoglucomutasa
<i>pol</i>	- Relativo a la polimerasa
PPi	- Pirofosfato inorgánico
RNA	- Acido ribonucleico

RFLP	- Polimorfismo en los fragmentos generados mediante enzimas de restricción
rpm	- Revoluciones por minuto
RT	- Transcriptasa reversa
SDS	- Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	- Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
SIDA	- Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
sonda	- Oligonucleótido marcado para identificar una secuencia específica.
STR	- Repeticiones cortas en tandem
T	- Timina
TE	- Tris-HCl 10mM + EDTA 1mM (pH 7.5 a 8.0)
templado	- hebra molde o matriz
T _m	- Temperatura de fusión
U	- Uracilo
UNG	- Uracilo-N-Glucosidasa
VNTR	- Número variable de repeticiones en tandem
WIB	- "Western Immunoblot"
μg	- Microgramos
μl	- Microlitros
μM	- Micromolar
μm	- Micrómetro
ml	- Mililitros
mM	- Milimolar
ng	- Nanogramo
nM	- Nanomolar
KCl	- Cloruro de potasio
nm	- Nanómetros
°C	- Grados Centígrados

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Mullis K B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. Scientific American (Abril): 56-65
- 2.- Stryer L.(1990). Bioquímica. Ed. Reverté. 3a ed. España Cap 4 : 71-83.
- 2a.- Stryer L.(1990). Bioquímica. Ed. Reverté. 3a ed. España, Cap 27 : 671-692.
- 2b.- Stryer L.(1990). Bioquímica. Ed. Reverté. 3a ed. España, Cap 6 : 117-141.
- 2c.- Sittman D. Recombinant DNA in Biochemistry (1994), editor: Davidson V y Sittman D. Ed. Harwald Publishing: 231-249.
- 3.- De la Vega F M (1994). Los Premios Nobel 1993 en Química .Avance y Perspectiva.INP-CINVESTAV ;13 : 26-29.
- 3a.- Sittman D. DNA Replication in Biochemistry (1994), editor: Davidson V y Sittman D. Ed. Harwald Publishing: 161-173.
- 4.- Lehninger A L. (1975). Bioquímica. Ed. Worth Publishers Inc. 2a ed. N.Y., E.U.A : 891-908.
- 5.- Darnell J, Lodish H y Baltimore D. (1990) DNA Replication, Repair and Recombination. In Molecular Cell Biology. Scientific American Books, 4a ed: 447-467.
- 6.- Watson J D, Hopkins N H, et al. (1987) Molecular Biology of the Gene. The Benjamin Cummings Publishing Co. 4a ed: 282-310.
- 7.- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J D.(1989) Molecular Biology of The Cell. Ed. Garland Publishing, Inc. 2a ed. Cap. 5 :269-270.
- 8.- Delpech M.(1993). PCR. Un Nuevo Instrumento para el Diagnóstico Médico.Mundo Científico (La Recherche); 13, N°132: 174-180.

- 9.- White T J, Arnheim N, Erlich H A.(1989) The Polymerase Chain Reaction. Trends in Genetics; 5. N°. 6 :185-188.
- 10.- Gelfand D H. Taq DNA Polymerase in PCR Technology. Principles and Application for DNA Amplification (1989), editor: Erlich H A. Ed. Stockton Press. : 17-22.
- 11.- Gelfand D H, White T J. Thermostable DNA polymerases in PCR Protocols. A Guide to Methods and Application (1990) Editores: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J. Ed. Academic Press, Inc. E.U.A : 129-141.
- 12.- Gelfand D H. *Thermus aquaticus* DNA Polymerase in Polymerase Chain Reaction (1989) Editores: Erlich H A, Gibbs R, Kazazian Jr. H.H. Current Communications in Molecular Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press. : 11-17.
- 13.- Sninsky J, Gelfand D, et al. (1993). UITma DNA Polymerase: The only proofreading enzyme guaranteed for PCR amplifications. Amplifications, A forum for PCR users. Issue 11: 12-13.
- 14.- Saiki R K. The Design and Optimization of the PCR in PCR Technology. Principles and Application for DNA Amplification (1989), editor: Erlich H A. Ed. Stockton Press. : 7-16
- 15.- Innis M A, Gelfand D H. Optimization of PCRs in PCR Protocols. A Guide to Methods and Application (1990) Editores: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J. Ed. Academic Press, Inc. E.U.A : 3-12.
- 16.- Saiki R.K. Optimization of the Polymerase Chain Reaction in Polymerase Chain Reaction (1989) Editores: Erlich H A, Gibbs R, Kazazian Jr. H H. Current Communications in Molecular Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press. : 25-30.
- 17.- Sardelli A D. (1993) Plateau Effect- Understanding PCR Limitations. Amplifications, A forum for PCR users. Issue 9: 1-7.
- 18.- Kunkel T A, Eckert K A. Fidelity of DNA Polymerase Used in Polymerase Chain Reaction in Polymerase Chain Reaction (1989) Editores: Erlich H A, Gibbs

- R, Kazazian Jr. H H. *Current Communications in Molecular Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. : 5-10.
- 19.- Kawasaki E S. *Sample Preparation from Blood, Cells and other Fluids in PCR Protocols. A Guide to Methods and Application (1990)* Editores: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J. Ed. Academic Press, Inc. E.U.A : 146-152.
- 20.- Higuchi R. *Simple and Rapid Preparation of Samples por PCR in PCR Technology. Principles and Application for DNA Amplification (1989)*, editor: Erlich H A. Ed. Stockton Press. : 31-38.
- 21.- Wright O K y Manos M M. *Sample Preparation from Paraffin-embedded Tissue in PCR Protocols. A Guide to Methods and Application (1990)* Editores: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J. Ed. Academic Press, Inc. E.U.A : 153-158.
- 22.- Pääbos S. *Amplifying Ancient DNA in PCR Protocols. A Guide to Methods and Application (1990)* Editores: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J. Ed. Academic Press, Inc. E.U.A : 159-166.
- 23.- Persing D H. (1991) *Polymerase Chain Raection: Trenches to Benches*. J. Clin. Microbiology : 29, N° 7; 1281-85.
- 24.- Cimino G D, Metchette K C, et al (1990) *Post-PCR Sterilization: a Method to Control Carryover Contamination for the Polymerase Chain Reaction*. Nucleic Acid Research; 19, N°1: 99-107.
- 25.- Kwok S y Higuchi R.(1989). *Avoiding false positives with PCR*. Nature; 339: 237-38.
- 26.- Perkin Elmer Cetus. GeneAmp^R PCR Carry-over Prevention Kit
- 27.- Udaykumar , Epstein J S, et al. (1993). *A novel method employing UNG to avoid carry-over contamination in RNA-PCR*. Nucleic Acid Research; 21, # 16: 3171-18.
- 28.- Walder R Y, Hayes J R, et al (1993) *Use of PCR primers containing a 3'*

terminal ribose residue to prevent cross-contamination of amplified sequences. *Nucleic Acid Research*; 21, N°18: 4339-43.

29.- Rys P N y Persing D H (1993). Preventing false positives: Quantitative Evaluation of Three protocols for Inactivation of Polymerase Chain Reaction Amplification Products. *J. Clin Microbiology*; 31, N°9: 2356-60.

30.- Espy M J , Smith T F, et al (1993) Dependence of Polymerase Chain Reaction product Inactivation protocols on Amplicon Length and Sequence Composition. *J Clin Microbiology*; 31, N°9: 2361-65.

31.- sin autor (1991) Biofeedback: Parameters Affecting Susceptibility of PCR Contamination to UV Inactivation. *Biotechniques*; 10, #5: 591-93.

32.- Kwok S, Mack D H, Kellogg D N, et al. Application of the Polymerase Chain Reaction to the Detection of Human Retroviruses in Polymerase Chain Reaction (1989) Editores: Erlich H A, Gibbs R, Kazazian Jr H H. *Current Communications in Molecular Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.: 151-158.

33.- Green W C.(1993) AIDS and the Immune System. *Scientific American*, Special Issue: Life, Death and the Immune System: 99-105.

34.- Ray C G y Minnich L L. *Viruses, Rickettsia and Chlamydia in Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* (1991) Editor: Henry J B. W.B. Saunders Company. 18a ed.: 1248-1250.

35.- Whetsell A J, Drew J B, Milman G, *et al.* (1992). Comparison of Three Nonradioisotopic Polymerase Chain Reaction-Based Methods for Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Clin. Microbiol.*; 30: 845-853.

36.- Luce M C, McCreedy B J, Chimera J A. (1993). Polymerase Chain Reaction Amplification for the Detection of Human Immunodeficiency Virus. *Highlights from: Infections in Medicine*; 8, N° 2: 17-22.

37.- Ou C Y y Schochetman G. *Polymerase Chain Reaction in AIDS Research in Polymerase Chain Reaction* (1989) Editores: Erlich H A, Gibbs R, Kazazian Jr H H. *Current Communications in Molecular Biology*. Cold Spring Harbor

Laboratory Press. :165-170.

38.- Poiesz B J, Ehrlich G D, Byrne B C, et al. Use of Polymerase Chain Reaction in the Detection, Quantification and Characterization of Human Retroviruses in Polymerase Chain Reaction (1989) Editores: Erlich H A, Gibbs R, Kazazian Jr H H. Current Communications in Molecular Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press. : 159-164.

39.- Hammer S, Crumpacker C, et al (1993) Use of Virologic Assays for Detection of Human Immunodeficiency Virus in Clinical Trials: Recommendations of the AIDS Clinical Trials Group Virology Commite. J. Clin. Microbiology; 31, N°10 : 2557-64.

40.- Kellogg D E y Kwok S. Detection of Human Immunodeficiency Virus in PCR Protocols. A Guide to Methods and Application (1990) Editores: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J. Ed. Academic Press, Inc. E.U.A : 337-347.

41.- Brokowsky W, Krasinski K, Pollac H. et al. (1992). Early Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Infection in Children < 6 Months of Age: Comparison of Polymerase Chain Reaction, Culture, and plasma Antigen Capture Techniques. JID ; 166: 616-619.

42.- Luce M C, Mc Greedy B J, et al. (-) Polymerase Chain Reaction Amplification for the Detection of Human Immunodeficiency Virus. Highlights from: Infections in Medicine: 17-22.

43.- Coombs R W, Henrad D R. (1993) Cell-Free Plasma Human Immunodeficiency Virus Type 1 Titer Assessed by Culture and Immunocapture Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. J of Clin. Microbiology; 31, N° 8: 1980-86.

44.- Rennie J. (1994) Grading the Gene Tests. Scientific American. Junio: 66-74.

45.- The Huntington's Disease Collaborative Research Group.(1993). A Nvel Gene Containing a Trinucleotide Repeat That is Expanded and Unstable on Huntington's Disease Chromosomes. Cell; 72:971-83.

- 46.- Harper P S.(1992) The Epidemiology of Huntington's Disease. *Human Genetics*; 89 :365-76.
- 47.- Goodfellow P N, (1993) Planting Alfalfa and Cloning the Huntington's Disease Gene. *Cell*; 72: 817-818.
- 48.- Kremer B, Goldberg P, et al. (1994). A worldwide study of the Huntington's disease mutation - the sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N. Eng J Med*; 330:1401-6.
- 48a.- Morrell V. (1993). Huntington's Gene Finally Found. *Science (Research News)*; 260: 28-30.
- 49.- Gusella J F y Mc Donald M E (1994). Huntington's Disease and Repeating Trinucleotides. *N. Eng J Med*; 330: 1450-51
- 50.- Martin J B (1993) Molecular Genetics of Neurological Diseases. *Science*; 262: 674-79.
- 51.- Morrell V.(1993) The Puzzle of the Triplet Repeats. *Science (Research News)*; 260:1422-23.
- 52.-Brook D J (1993) Retreat of the Triplet Repeat. *Nature Genetics*; 3:279-81.
- 53.- Wexler N S. (1992) The Tiresias Complex: Huntington's disease as a paradigm of testing for late-onset disorders. *FASEB*; 6: 2820-25.
- 54.- Rubinsztein D C, Leggo J, et al. (1993). Site of (CCG) polymorphism in the HD gene. *Nature Genetics*; 5: 214-15.
- 55.- Comunicación Personal de Michael Hayden (The University of British Columbia) va a aparecer próximamente en *Hum Mol Gen*.
- 56.- Sensabaugh G F, y von Beroldingen C. The Application of Polymerase Chain Reaction in Forensic Science in *Polymerase Chain Reaction (1989)* Editores: Erlich H A, Gibbs R, Kazazian Jr H H. Current Communications in Molecular Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press. : 147 -149.

- 57.- Higuchi R, von Beroldingen C H (1988) DNA Typing from Single Hairs. *Nature*; 332 : 543-46.
- 58.- Holland M M, Fisher D I, et al.(1993) Short Tandem repeat loci: Applications to Forensic and Human Remains Identification. *EXS (Suiza)*; 67: 267-274.
- 59.-Lewontin R C y Hartl D L.(1991) Population Genetics in Forensic DNA Typing. *Science*; 254; 1475-50.
- 60.- Barrera H A, González M L, et al (1991) Genética Molecular Humana en México. *Ciencia y Desarrollo*; 17, N°101: 68-80.
- 61.- von Beroldingen C H, Blake E T, et al. Applications of PCR to the Analysis of Biological Evidence in PCR Protocols. A Guide to Methods and Application (1990) Editores: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J. Ed. Academic Press, Inc. E.U.A : 209-223.
- 62.- Gill P, Jeffreys A J, et al (1985) Forensic Application of DNA "Fingerprints" *Nature*; 318: 577-79.
- 63.- Risch N J y Devlin B. (1992) On the Probability of Matching DNA Fingerprints. *Science*; 255 :717-20
- 64.- Novick G E, González T, et al. (1993) The Use of Polymorphic *Alu* Insertions in Human Fingerprinting. *EXS (Suiza)*; 67: 283-291.
- 65.- Perkin Elmer (1993) HLA DQalfa PCR-Based System Validated for Forensic Casework. Amplifications. A Forum for PCR Users. Issue 11: 14-15
- 66.- Orrego C y King M C. Determination of Familial Relationships in PCR Protocols. A Guide to Methods and Application (1990) Editores: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J. Ed. Academic Press, Inc. E.U.A : 416-24.
- 67.- Frégeau C J y Fourney R M.(1993) DNA Typing with Fluorescently Tagged Short Tandem Repeats: A Sensitive and Accurate Approach to Human Identification. *BioTechniques*; 15, N°1: 100-119.

- 68.- Syvänen A C, Sajantila A, et al. (1993) Forensic DNA Typing by the Solid-Phase Minisequencing Method. *EXS* (Suiza); 67 : 275-282.
- 69.- Perkin Elmer (1993) New AmpliFLP D1S80 DNA Typing for Forensic Analysis and Bone Marrow Typing Research. *Amplifications. A Forum for PCR Users. Issue 11*: 15.
- 70.- Jeffreys A J, Monckton D G (1993) Minisatellite variant Repeat Mapping: Application to DNA Typing and Mutation Analysis. *EXS* (Suiza); 67 :125-39.
- 70a.- Helmuth R, Fildes N, et al. (1990) HLA-DQ α Allel and Genotype Frequencies in Various Human Populations, Determined by Using Enzymatic Amplification and Oligonucleotide Probes. *Am J Hum Genet.* ; 47 : 515-23.
- 71.- Bos J L. Detection of *ras* Oncogenes Using PCR, in *PCR Technology. Principles and Application for DNA Amplification* (1989), editor: Erlich H A. Ed. Stockton Press. : 225-231.
- 72.- Forrester K, Almoguera, et al. (1990) Expression and Mutational Activation of the c-K-*ras* Oncogene in Human Colorectal Adenomas and Carcinomas. *Familiar Adenomatous Polyposis* : 337-346.
- 73.- Lyons J. Analysis of *ras* Gene Point Mutations by PCR and Oligonucleotide Hybridization, in *PCR Protocols. A Guide to Methods and Application* (1990) Editores: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J. Ed. Academic Press, Inc. E.U.A : 386-391.
- 74.- Masato Imai, Tomokazu Hoshi (1994) K-*ras* Codon 12 Mutation in Biliary Tract Tumors Detected by the Polymerase Chain Reaction Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Cancer* ; 73, N° 11: 2727-2733.
- 75.- Weinberg R A. (1992) The Integration of Molecular Genetics into Cancer Management. *Cancer Supplement* ; 70, N°6 : 1653-1658.
- 76.- Williams A C, Browne S J (1993) Molecular Events Including p53 and K-*ras* Alterations in the *in vitro* Progression of a Human Colorectal Adenoma Cell Line to an Adenocarcinoma. *Oncogene*; 8: 3063-72.

- 77.- Vogelstein B, Fearon E R, et al. Genetic Alterations Accumulate During Colorectal Tumorigenesis in Recessive Oncogenes and Tumor Suppression. (1989) Editores: Cavenee W, Hastie N, et al. Current Communications in Molecular Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press. : 73-80.
- 78.- Fearon E R, Vogelstein B. (1990) A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. Cell; 61: 759-67.
- 79.- Hackford A W. (1993) Biochemical Markers for Colorectal Cancer. Colorectal Cancer ; 73, N°1: 85-102.
- 80.- Vogelstein B, Fearon E R, et al.(1988) Genetic Alterations During Colorectal-Tumor Development. N Eng J Med ; 319: 525-32.
- 81.- Powell S M, Gloria M D, et al.(1993) Molecular Diagnosis of Familial Adenomatous Polyposis. N Engl J Med; 329: 1982-87.
- 82.- Miyaki M, Seki M, et al. (1990) Genetic Changes and Histopathological Types in Colorectal Tumors from Patients with Familial Adenomatous Polyposis. Cancer Research ; 50: 7166-7173.
- 83.- Miyaki M, Konishi M, et al.(1994) Characteristics of Somatic Mutation of the Adenomatous Polyposis Coli Gene in Colorectal Tumors. Cancer Research ; 54: 3011-3020.
- 83a.- Donehower L A y Bradley A.(1993) The Tumor Suppressor p53. Biochimica et Biophysica Acta; 1155:181-205.
- 84.- Thidodeau S N, Bren G, Schaid D.(1993) Microsatellite Instability in Cancer of the Proximal Colon. Science; 260 : 816-819.
- 85.- Peltomäki P, Lothe R A, et al (1993) Microsatellite Instability Is Associated with Tumors That Characterize the Hereditary Non-Polyposis Colorectal Carcinoma Syndrome. Cancer Research ; 53 : 5853-5855.
- 86.- Lothe R A, Peltomäki P, et al. (1993) Genomic Instability in Colorectal Cancer: Relationship to Clinicopathological Variables and Family History. Cancer Research; 53: 5849-5852.

- 87.- Peltomäki P, Aaltonen L A, et al. (1993) Genetic Mapping of a Locus Predisposing to Human Colorectal Cancer. *Science* ; 260 : 810-815.
- 88.- Peinado M A, Malkhosyan S, et al. (1992) Isolation and Characterization of Allelic Losses and Gains in Colorectal Tumor by Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction. *Proc Natl Acad Sci*; 89: 10065-69
- 89.- Welsh J y Mc Clelland M (1990). Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers. *Nucleic Acid Research*; 18, N° 24: 7213-18.
- 90.- Ionov Y, Peinado, M A, et al. (1993) Ubiquitous Somatic Mutations in Simple Repeated Sequences Reveal a new Mechanism for Colonic Carcinogenesis. *Nature*; 363 : 558-561.
- 91.- Schoenfeld A, Luqmani Y, et al (1994) Detection of Breast Cancer Micrometastases in Axillary Lymph Nodes by Using Polymerase Chain Reaction. *Cancer Research* ; 54: 2986-2990.