

MINISTERIO DE EDUCACIÓN, CIENCIA Y TECNOLOGIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO - QUÍMICAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS NATURALES

OLIMPÍADA ARGENTINA DE BIOLOGÍA

APEB

ÁREA DE ACTUALIZACIÓN Y PERFECCIONAMIENTO EN LA ENSEÑANZA DE LA BIOLOGÍA

**CONTINUIDAD Y CAMBIO DE LAS ESPECIES I:
INTRODUCCIÓN A LA BIOTECNOLOGÍA**

Módulo IV
*Amplificación Molecular *in vitro**

AUTORES

BIÓL. ELSA PINNA SENN
LIC. MARÍA ISABEL ORTIZ
PROF. GRACIELA DALMASSO

ASESOR PEDAGÓGICO - DIDÁCTICO

PROF. GRACIELA B. RAFFAINI

COORDINADOR

COMITÉ ORGANIZADOR EJECUTIVO

Estimado colega:

Esta es la cuarta etapa del curso. Le recordamos que es importante que, para continuar con esta propuesta, tome en cuenta las observaciones que pudieran haberle hecho los autores en los módulos anteriores a fin de favorecer su acercamiento a estos nuevos conceptos.

Para facilitar su tarea en este módulo hemos previsto que las actividades sean resueltas en espacios provistos bajo cada consigna. **Es decir, que en esta oportunidad prescindimos del cuadenillo de ejercicios.**

En este módulo, aprenderá los fundamentos y los pasos de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y su aplicación en distintas actividades relacionadas a ciencia, tecnología y sociedad.

Como siempre puede dirigir sus consultas a los autores a través de e-mail o telefónicamente.

Ha superado la mitad del curso, esta es la recta final... así que continúe con la tarea!!!

MINISTERIO DE EDUCACIÓN, CIENCIA Y TECNOLOGIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO - QUÍMICAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS NATURALES

OLIMPIADA ARGENTINA DE BIOLOGÍA

APEB

ÁREA DE ACTUALIZACIÓN Y PERFECCIONAMIENTO EN LA ENSEÑANZA DE LA BIOLOGÍA

CONTINUIDAD Y CAMBIO DE LAS ESPECIES I:

INTRODUCCIÓN A LA BIOTECNOLOGÍA

Módulo IV

Amplificación Molecular *in vitro*

Módulo IV: Amplificación molecular *in vitro*

Introducción

Los genomas son relativamente grandes y altamente complejos, por esto, aislar o detectar genes representa un gran desafío técnico. Una de las técnicas empleadas es la "REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)" desarrollada en la década de los '80 por Kary Mullis (premio Nobel de química en 1993). Mediante esta técnica es posible producir en unas pocas horas miles de millones de copias de una secuencia específica, aún cuando la muestra de partida contenga una única molécula de DNA. La PCR es una técnica *in vitro* fundamentalmente simple, rápida y sensible.

El primer trabajo internacional describiendo la técnica de PCR fue publicado en 1987 ⁽¹⁾ pero el método fue empleado masivamente recién en 1988, luego del descubrimiento y purificación de una DNA polimerasa termoestable. La primera de estas polimerasas, y aún la más usada, es la polimerasa *Taq* cuyo nombre proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en aguas termales.

La PCR se realiza en aparatos automáticos llamados termocicladores. El método fue patentado en 1987, y comercializado por la empresa Cetus, pero desde 1991 los derechos fueron adquiridos por Hoffman-La Roche y Perkin Elmer.

El propósito de este módulo es brindar los contenidos teóricos necesarios para lograr una aproximación a los aspectos fundamentales de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa y reconocer sus múltiples usos.

Contenidos

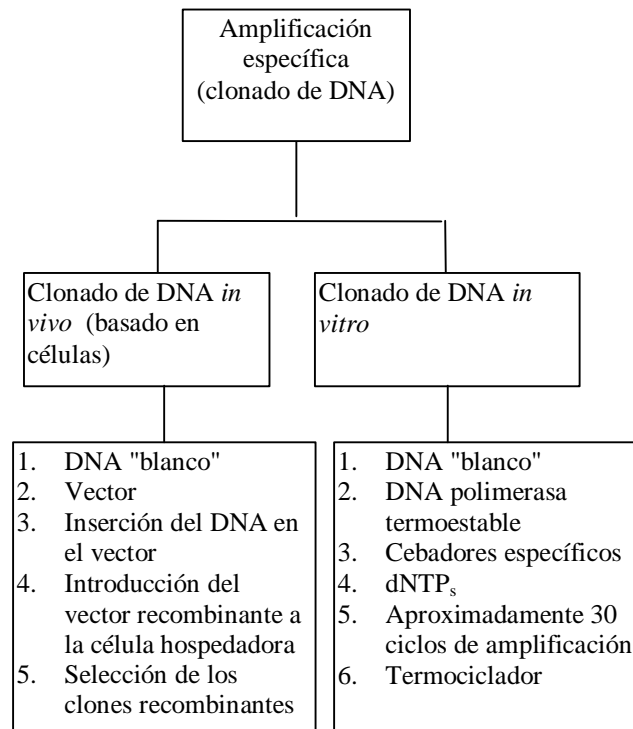
- Elementos necesarios para una reacción de PCR: DNA molde, DNA polimerasa termoestable y los 4 desoxinucleótidos trifosfato. Termociclador.
- Las tres etapas que conforman un ciclo de replicación.
- Ventajas y desventajas del uso de la PCR.
- Construcción de un modelo de amplificación de un segmento de DNA por PCR

OBJETIVOS:

- Comprender el fundamento de la PCR.
- Simular la amplificación de un segmento de DNA, basándose en un modelo.
- Analizar la importancia y las aplicaciones de dicha técnica.

⁽¹⁾ Mullis E. and Faloona F. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* a polymerase catalyzed chain reaction. Meth. Enzymol. 155:335-350

De acuerdo a lo estudiado en el módulo II, existen dos maneras de amplificar un segmento de DNA: *in vivo* e *in vitro*



Luego de leer la técnica de la PCR en el material de estudio presentado como anexo 1 en este módulo y en el módulo II, resuelva las siguientes actividades:

Actividad N°1

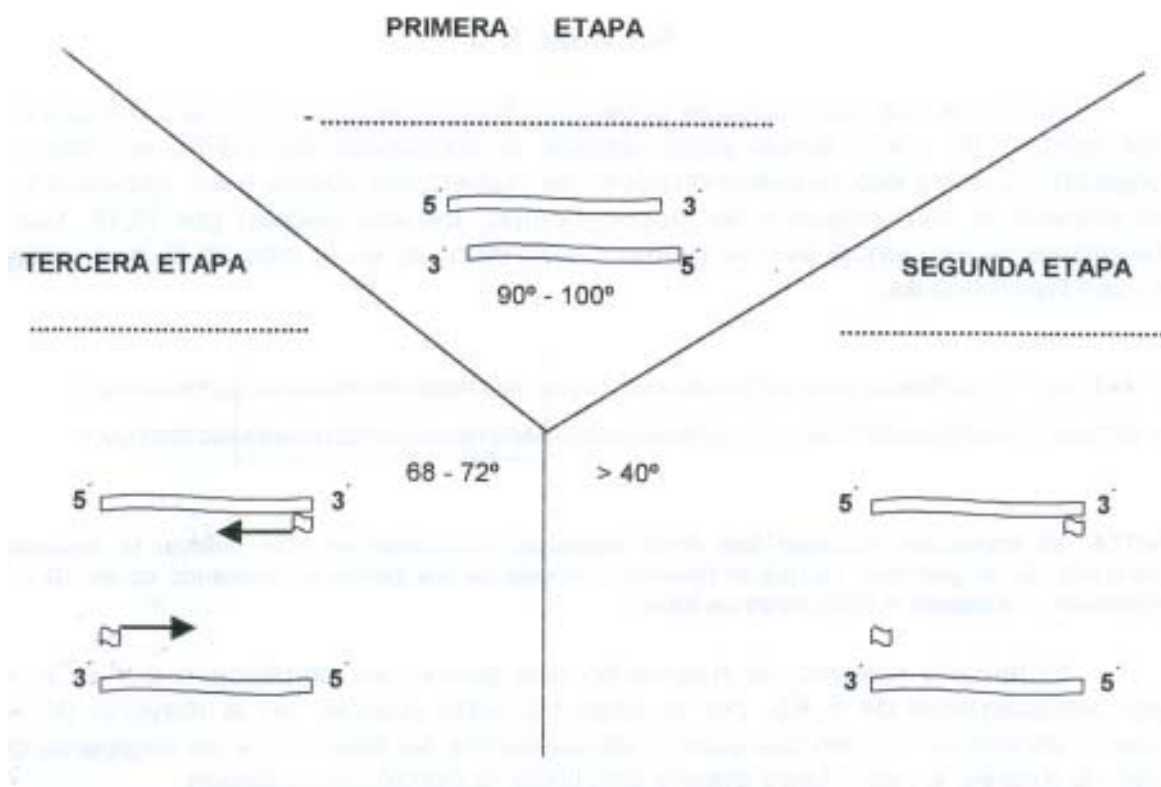
A.1 Sabemos que la PCR es una técnica relativamente sencilla que permite obtener en poco tiempo millones de copias de una secuencia de DNA, ¿cuáles son los componentes esenciales que se debe colocar dentro del tubo de reacción para que ocurra la amplificación?. Escribalos dentro del recuadro.



A.2 ¿Qué papel cumple cada uno de esos elementos en la reacción?

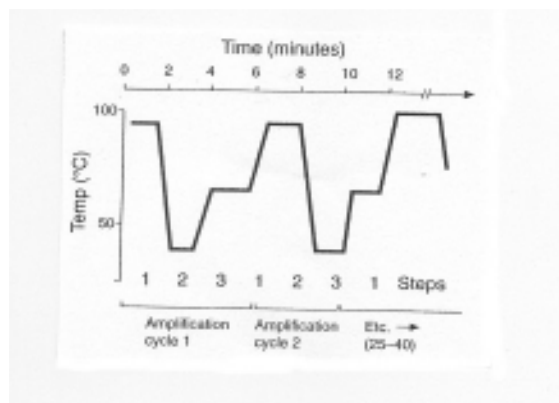
Actividad N°2

- A) La amplificación del DNA por PCR involucra aproximadamente 30 ciclos de replicación. Cada ciclo comprende tres etapas fundamentales representadas en el siguiente esquema.



- A1** Complete el esquema colocando el nombre de cada etapa en las líneas de puntos.
A2 Describa lo que ocurre en cada etapa.

- B)** Como se señaló anteriormente la principal ventaja de la PCR es la rapidez con la que se obtiene un gran número de copias de DNA. El gráfico muestra la temperatura y el tiempo requerido en cada etapa durante tres ciclos. Analícelo y responda las preguntas que se presentan a continuación.



- B1** ¿Cuál es la duración aproximada de cada etapa dentro de un ciclo?
- B2** ¿Cuál es la duración total de un ciclo?
- B3** ¿Cuánto tiempo se requiere para una reacción que comprenda 30 ciclos?

Actividad N°3

En la actividad N°4 del módulo III, aisló el gen hipotético amplificado en el módulo II (actividad N°4).

Suponga que desea utilizarlo como sonda para rastrear la presencia del mismo en organismos de diferentes especies. Para ello necesita disponer de numerosas copias pero, debido a que la amplificación *in vivo* requiere de mucho tiempo, decidió hacerlo por PCR. Como recordará, la secuencia del fragmento EcoRI, que incluye el gen hipotético es:

5' AATTCAGTT CGCCTGAGGTCCAAGCTTCCAAGGACTCC TCT AATTGGAC TCCTTAGG ACTCCTTGGAGG 3'

3' GTCAAGCGGACTCCAGGTTCTGAAGGTTCTGAGGAGATT AA CCT GAGGAATCCTGAGGAACCTCCTTAA 5'

NOTA: es importante destacar que sería imposible considerar en este modelo la secuencia completa de un gen real, ya que el tamaño promedio de los genes en humanos es de 10 - 15 kilobases (1 kilobase = 1000 pares de bases)

El tamaño máximo de fragmento que puede ser amplificado por PCR es aproximadamente de 5 kb, por lo tanto no sería posible, en la mayoría de los casos, amplificar un gen completo. Habitualmente se selecciona un segmento del gen de interés; en este caso deberá amplificar la porción subrayada.

A) DISEÑO DE LOS CEBADORES

La elección de los cebadores es crítica para el éxito de la reacción. Son los responsables de la especificidad de la PCR. Si no están correctamente diseñados, no se unirán a la secuencia de interés y no habrá amplificación o bien pueden unirse a otras secuencias dando productos no deseados.

Para el diseño de sus cebadores deberá tener en cuenta los siguientes requisitos (se recomienda leer antes el material anexo):

- Si bien el tamaño adecuado de los cebadores debe ser de 17 a 24 bases, a fines didácticos sus cebadores serán sólo de 5 bases.
- No deben autoaparearse (Debido a que los cebadores sólo tendrán 5 bases esto no debe ser considerado en esta simulación).
- No deben ser complementarios entre sí.
- Prestar atención para que los cebadores estén ubicados en la dirección correcta (flanqueando el segmento que se desea amplificar) teniendo en cuenta que las polimerasas sintetizan en dirección 5' → 3'.

a) Escriba los cebadores elegidos indicando los extremos 5' y 3' de cada uno.

Cebador 1

Cebador 2

B) PRIMER CICLO

1 Primera etapa: Desnaturalización. Se desnaturaliza el DNA molde a 90-100°C.

5' AATTCAGTTCGCCTGAGGTCCAAGCTTCCAAGGACTCC TCT AATT GGAC TCCTTAGG ACTCCTTGGAGG 3'

3' GTCAAGCGGACTCCAGGTTTCAAGGTTCTCTGAGGAGATT AA CCTGAGGAATCCTGAGGAACCTCCTTAA 5'

2 Segunda etapa: Unión de los cebadores. La temperatura desciende a 40 °C para la unión de los cebadores. Una los cebadores diseñados en 1 en el lugar que corresponda (escribalos con rojo).

5' AATTCAGTTCGCCTGAGGTCCAAGCTTCCAAGGACTCC TCTAATT GGACTCCTTAGGACTCCTTGGAGG 3'
3' 5'

5' 3'
3' GTCAAGCGGACTCCAGGTTTCAAGGTTCTCTGAGGAGATTAACCTGAGGAATCCTGAGGAACCTCCTTAA 5'

Continuidad y cambio de las especies I: Introducción a la biotecnología

3 Tercera etapa: Extensión del cebador. La temperatura asciende a los 68 -70°C para que la Taq polimerasa comience la síntesis.

3.I) Escriba:

- Los cebadores en rojo.
- En verde las nuevas cadenas que se obtendrán a partir de las cadenas originales O1 y O2.

```
O1 5' AATTCAGTTCGCCTGAGGTCCAAGCTTCC AAGGACTCCTCTAATTGGACTCCTTAGGACTCCTT GGAGG 3'
C1 3' 5'
C2 5' 3'
O2 3' GTCAAGCGGACTCCAGGTTCGAAGGTTCCTGAGGAGATTAACCTGAGGAATCCTGAGGAACCTCCTTAA 5'
```

Nota: La cadena complementaria a la original 1 que se sintetiza durante el primer ciclo se llamará Copia 1 o C1 y la cadena complementaria a la original 2, Copia 2 o C2.

3.II) ¿Qué diferencia observa entre las cadenas originales (O1 y O2) y las copia (C1,C2)?

C) SEGUNDO CICLO

Durante el segundo ciclo de la PCR se sintetiza una copia de **cada una** de las cadenas obtenidas en el primer ciclo.

1 Escriba nuevamente las cadenas obtenidas al final del primer ciclo en los renglones señalizados como O1, O2, C1 y C2 respectivamente.

2 Ubique los cebadores y sintetice las nuevas cadenas. Recordar que debe usar:

- Color rojo para los cebadores.
- Color verde para las cadenas C1 y C2.
- Color azul para las cadenas que obtendrá a partir de las copias 1 y 2 que aquí denominaremos copia de la copia 1 o CC1; y copia de la copia 2 o CC2.

O1

C1

CC1

O2

C2

CC2

- 3 ¿Cuántas cadenas de cada tipo obtuvo al final del segundo ciclo?
- 4 ¿Qué diferencia observa entre C1 y C2 y las cadenas que se sintetizaron a partir de ellas (CC1 y CC2)?

D) TERCER CICLO

- 1- Durante el tercer ciclo, se replican cada una de las cadenas producidas en el segundo ciclo. Analice el proceso y complete las siguientes afirmaciones.
- Las cadenas originales dan siempre cadenas y
 - Las cadenas copias 1 y 2 (verdes) dan siempre y, respectivamente.
 - La cadena CC1 (azul) origina una cadena
 - La cadena CC2 (azul) origina una cadena
- 2- Responda ¿Cuántas cadenas de cada tipo hay al final del tercer ciclo?
- 3- A partir de este tercer ciclo, los restantes son iguales, por lo que no se justifica continuar escribiéndolos. A modo de síntesis:
- I. Se puede calcular el número total de cadenas **simples** (tanto originales como copias) obtenidas al finalizar cada ciclo, empleando la siguiente fórmula:

$$N_{\text{Total}} = N_0 (1 + Y)^n$$

N_0 = Número inicial de cadenas moldes.

Y = Eficiencia de la *Taq* polimerasa para la replicación. Esta enzima carece de la actividad correctora 3' → 5' por lo que puede cometer errores durante la replicación. Para simplificar nuestros cálculos consideramos la máxima eficiencia, $Y = 1$.

n = Número de ciclo

A continuación se dará un ejemplo de cómo utilizar esta fórmula. Suponga que se desea saber cuántas cadenas simples habrá al finalizar el ciclo 3:

$N_0 = 2$ cadenas molde

$Y = 1$

$n = 3$

$$N_{\text{Total}} = 2 (1 + 1)^3 = 16$$

Continuidad y cambio de las especies I: Introducción a la biotecnología

Compare este resultado con el número total de copias obtenidas por Ud. en el ciclo 3.

- II. El número de cadenas molde originales no se modifica.
- III. El número de cadenas copias 1 y de cadenas copias 2 siempre coincide con el número de ciclo.
- IV. El número de cadenas copias de la copia 1 (CC1) o copias de la copia 2 (CC2) para un determinado ciclo, se puede estimar de la siguiente manera.

$$N_{cc} = \frac{N_{Total} - (N_o + N_c)}{2}$$

N_{Total} = número total de cadenas simples (tanto originales como copias) obtenidas al finalizar el ciclo.

N_o = Número de cadenas moldes iniciales

N_c = Número total de cadenas copias C1 y C2 de ese ciclo

Continuando con el ejemplo anterior, en el ciclo 3 habrá 4 cadenas CC1 y 4 cadenas CC2

$N_{Total} = 16$

$N_o = 2$ $N_{cc} = \frac{16 - (2 + 6)}{2} = 4$

$N_c = 6$ (3 de cada una)

Teniendo en cuenta estas afirmaciones, complete la tabla siguiente y luego responda:

ciclo	N_{total}	O1	O2	C1	C2	CC1	CC2
0	2	1	1	—	—	—	—
1	4	1	1	1	1	—	—
2	8	1	1	2	2	1	1
3	16	1	1	3	3	4	4
4							
5							
10							
15							
20							
25							
30							

a) ¿Por qué las cadenas CC1 y CC2 aumentan de manera exponencial?(Ver fig. 1 Anexo 1)

b) ¿Cómo puede visualizar el producto de la amplificación?

E) A modo de cierre proyecte su práctica en el aula.

¿Cómo podría adaptar este modelo utilizando materiales tales como piezas de cartón, clips, cuentas de collar, etc. para que sus alumnos comprendan el proceso de amplificación?

Actividad N°4

En el anexo 2 presentamos artículos que ejemplifican las posibles aplicaciones que tiene esta técnica.

Luego de leerlos y analizarlos resuelva las siguientes actividades:

A) El DNA amplificado por PCR puede provenir de diferentes fuentes. Mencione cuáles podrían ser.

- B)** Justifique por qué se dice que la PCR es una "técnica *in vitro* simple, rápida y sensible". Busque ejemplos en los artículos que demuestren esto.
- C)** Explique cuál es la principal desventaja de la técnica de PCR. Ejemplifique.
- D)** Realice un listado de los otros usos posibles de la PCR además de los mencionados en los artículos.

ANEXO 1

ANEXO 2

EVALUACIÓN

Esta evaluación tiene como propósito verificar si se ha comprendido correctamente el significado y la utilidad de la amplificación *in vitro*, así como también, la integración de estos contenidos con la amplificación molecular *in vivo* desarrollada en el módulo 2.

Criterios de evaluación

- Originalidad y claridad en la elaboración de las respuestas.
- Correcta obtención e interpretación de los resultados.
- Habilidad para realizar síntesis.
- Habilidad para integrar contenidos.

Suponga la siguiente situación:

El gen *Sry* se encuentra en el brazo corto del cromosoma "Y" de mamíferos y es uno de los genes responsables de la diferenciación masculina en mamíferos. Se desea amplificar un fragmento específico de aproximadamente 150 kb de este gen utilizando la PCR. Para ello se colocó dentro del tubo de reacción lo siguiente:

- DNA genómico de ratón macho.
- los cebadores adecuados.
- los cuatro desoxinucleótidos trifosfato.
- *Taq* polimerasa.

Una vez finalizados los 30 ciclos de amplificación se retiró el tubo del termociclador.

Responder **justificando**:

1. Para realizar una amplificación *in vivo* el DNA genómico debe ser previamente digerido por una endonucleasa de restricción. ¿Esto es también un requisito para la amplificación *in vitro*?

2. ¿Cual sería el producto de la PCR si se omitiera poner dentro del tubo de reacción:
 - a. uno de los cebadores.

b. los dos cebadores.

c. el DNA molde.

3. ¿Cuál sería el producto de la PCR si se reemplazara:

a. el DNA genómico de ratón macho por DNA genómico de ratón hembra?

b. el DNA molde por un RNAm de la misma secuencia?

c. la *Taq* polimerasa por la DNA polimerasa I de *E. coli*?

4. Si Ud. deseara construir una biblioteca genómica de ratón ¿cuál de los dos métodos de amplificación (*in vivo* o *in vitro*) utilizaría?

MINISTERIO DE EDUCACIÓN, CIENCIA Y TECNOLOGIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO - QUÍMICAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS NATURALES

OLIMPÍADA ARGENTINA DE BIOLOGÍA

APEB

ÁREA DE ACTUALIZACIÓN Y PERFECCIONAMIENTO EN LA ENSEÑANZA DE LA BIOLOGÍA

CONTINUIDAD Y CAMBIO DE LAS ESPECIES I: INTRODUCCIÓN A LA BIOTECNOLOGÍA

Módulo IV

Datos personales:

Nombre y apellido: _____

DNI: _____

Título: _____

Rendimiento y ponderación (Para uso exclusivo del APEB)

Fecha de Recepción

Resolución de Actividad 1

Resolución de Actividad 2

Resolución de actividad 3

Resolución de actividad 4

Evaluación

Calificación

ANEXO1

PRINCIPIOS EN LOS QUE SE BASA LA PCR

Modificado de Strachan and Read (1999)

La PCR es un método de clonación de DNA en un sistema libre de células

Reacción de PCR estándar

La PCR (acrónimo inglés de Polymerase Chain Reaction, reacción en cadena de la polimerasa) es un método rápido y versátil de amplificación in vitro de secuencias de DNA específicas dentro de una muestra. Habitualmente la reacción se diseña para permitir la amplificación selectiva de una o varias secuencias dianas de DNA presentes en una mezcla compleja de secuencias (por ejemplo, DNA genómico total o una población compleja de cDNA). Para que la amplificación selectiva sea posible es absolutamente necesario disponer de un mínimo de información sobre la secuencia de la diana. Esta información permite la construcción de dos oligonucleótidos, habitualmente de 15 a 30 nucleótidos de longitud, que actúan como cebadores (en inglés primers) en la reacción. Cuando se mezclan con DNA genómico desnaturalizado los cebadores se unen específicamente a las secuencias complementarias, que se sitúan inmediatamente adyacentes a la región genómica que se quiere amplificar. Los cebadores están diseñados para que puedan iniciar la reacción de síntesis de DNA en presencia de una DNA polimerasa termoestable adecuada y de los precursores de DNA (los cuatro desoxinucleótidos trifosfato, dATP, dCTP, dGTP y dTTP). Los cebadores inician la síntesis de nuevas hebras de DNA que son complementarias a las dos hebras del segmento de la diana (Figura 1).

La PCR es una reacción en cadena porque las hebras de DNA recién sintetizadas sirven a su vez de molde para reacciones de síntesis en ciclos posteriores. Tras unos 30 ciclos, la PCR habrá generado unas 10^5 copias de la secuencia diana, que puede ser fácilmente detectada tras electroforesis en gel como una banda discreta de un tamaño específico. Se utiliza una DNA polimerasa termoestable debido a que la reacción pasa por ciclos en los que se cambia la temperatura. Cada uno de estos ciclos consta de tres pasos:

- (i) Desnaturalización: típicamente calentando la muestra a 93-95°C.
- (ii) Unión de cebadores: a temperaturas que varían entre 40 y 70°C, dependiendo de la T_m de los híbridos cebador / DNA (la temperatura de reasociación se fija habitualmente 5°C por debajo de la T_m).
- (iii) Síntesis de DNA o extensión del cebador: típicamente a 70 – 75°C.

Algunos microorganismos cuyo hábitat natural son las fuentes hidrotermales han servido como base para la purificación de DNAs polimerasas termoestables. Por ejemplo, la *Taq* polimerasa, ampliamente utilizada, proviene de *Thermus aquaticus*. Esta enzima es estable hasta 94 °C, y su temperatura de trabajo óptima es de 80 °C.

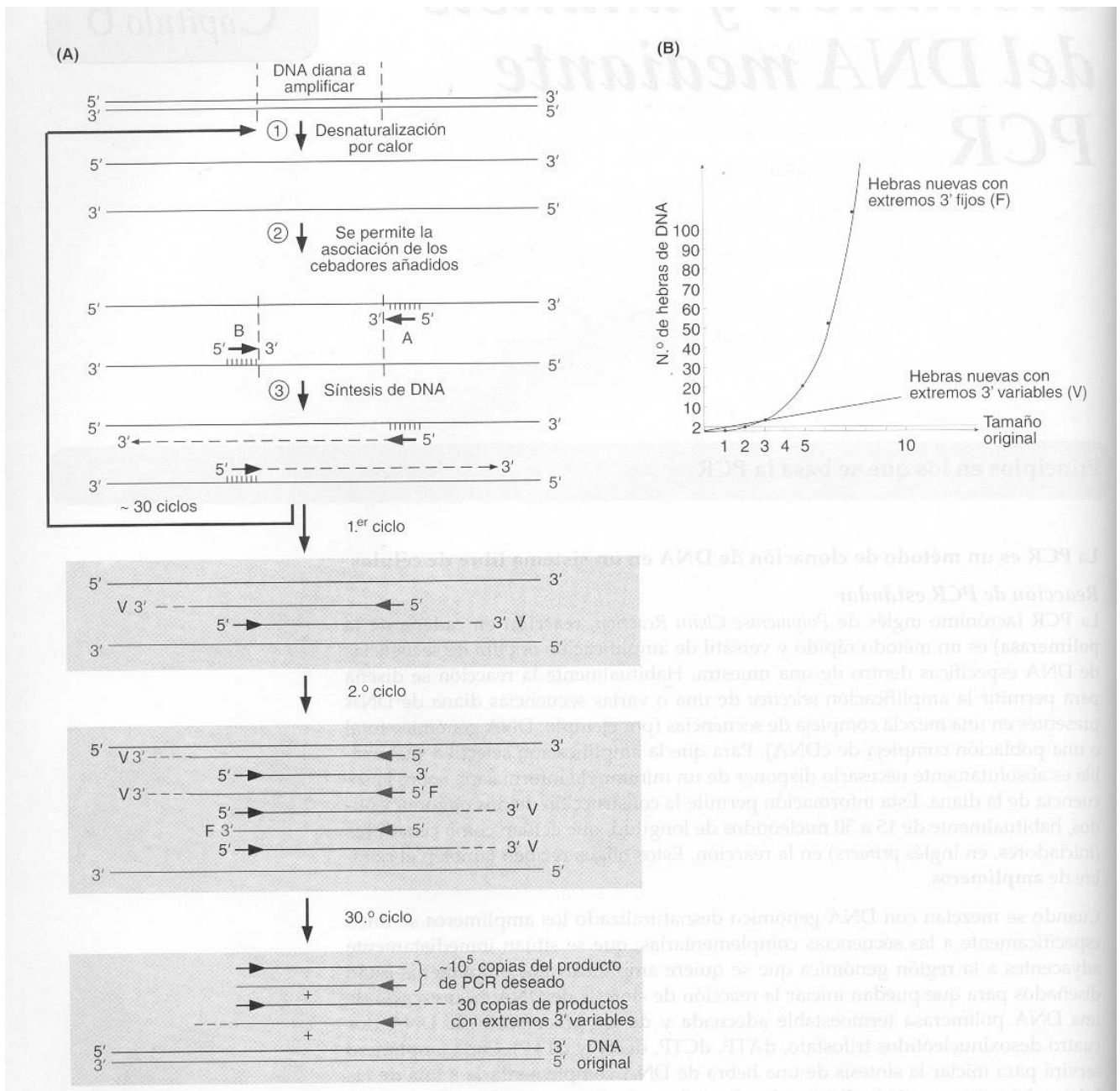


Figura 1. La PCR es un método de amplificación de secuencias de DNA *in vitro*, que utiliza como cebadores oligonucleótidos de secuencias específicas.

Los oligonucleótidos cebadores A y B son complementarios a secuencias de DNA situadas en hebras opuestas y a ambos lados de la región que se quiere amplificar. Las nuevas cadenas contienen la secuencia de los cebadores. El primer ciclo genera dos nuevas hebras de DNA, cuyos extremos 5' quedan fijados por la posición de los cebadores y sus extremos 3' son variables. En los ciclos posteriores las hebras de nueva síntesis actúan a su vez como molde para la síntesis de hebras complementarias del tamaño deseado (los extremos 5' quedan definidos por el cebador y los extremos 3' quedan fijos ya que la síntesis no puede ir más allá del extremo reconocido por el otro cebador). Tras unos pocos ciclos, el producto de tamaño deseado comienza a ser predominante.

Diseño de cebadores y especificidad de la amplificación

La especificidad de la amplificación depende necesariamente de la especificidad que tengan los oligonucleótidos cebadores de reconocer la secuencia específica respecto de otras presentes en la muestra. Para muestras complejas como el DNA genómico total de una célula de mamífero, a menudo basta con diseñar dos cebadores que tengan unos 20 nucleótidos de longitud. En estas condiciones la probabilidad de una correspondencia accidental perfecta con otras secuencias que no sean la buscada, que además estén en la orientación y a la distancia adecuada, es muy pequeña. Sin embargo, a pesar de las precauciones que se toman para que sólo sean estables los dúplex entre diana y cebador con un elevado grado de homología, a veces también ocurren amplificaciones no deseadas. Esto puede suceder si uno o ambos cebadores elegidos contienen parte de una secuencia repetitiva. Por ello, en el diseño de los cebadores se tienen en cuenta las secuencias repetitivas conocidas, y también se tiene la precaución de evitar largas tiras de un mismo nucleótido (Figura 2).

El apareamiento fortuito del extremo 3' del cebador es crítico, ya que aporta el extremo OH 3' libre para el inicio de la síntesis por parte de la DNA polimerasa. Si el extremo 3' del cebador resulta ser exactamente complementario a la secuencia de la diana se pueden obtener productos no deseados de híbridos cebador – diana que no tengan una homología importante. Una forma de minimizar el problema de la amplificación de productos no deseados es emplear cebadores encajados (*nested primers*). Los productos de la amplificación inicial se diluyen y son utilizados como DNA diana para una segunda reacción en la que se utiliza un juego de cebadores diferente, cuyas secuencias están situadas próximas a los cebadores anteriores, en una zona interna del fragmento teóricamente amplificado en primer lugar.

Tamaño	Habitualmente unos 20 nt ⁽¹⁾ para secuencias diana presentes en DNA genómico complejo, puede ser mucho menor si el DNA diana es menos complejo.
Composición de base	Evitar repeticiones en tándem de uno o mas nucleótidos. Se debe elegir un %GC global de forma que la T _m de cada oligonucleótido sea igual o casi idéntica.
Extremos 3'	Debe evitarse que las dos bases de los extremos 3' de los cebadores sean complementarias entre sí. De lo contrario podrían producir dímeros de cebadores que reducirían la eficiencia de la amplificación.

(1) nt=nucleótido

Figura 2. Diseño de cebadores para PCR.

ANEXO2

LOS PIONEROS EN LA BÚSQUEDA DE DNA ANTIGUO

El primer trabajo donde se demostró que era posible secuenciar DNA antiguo fue publicado en 1984 por los investigadores norteamericanos Russell Higuchi y Allan Wilson, de la Universidad de California. Extrajeron DNA de músculo seco y piel de un ejemplar de cuagga (*Equus quagga*), especie de équido que vivió en África del Sur y se extinguió hace aproximadamente 140 años. El material estudiado estaba guardado en el Museo de Historia Natural de Mainz, Alemania, y pertenecía a un animal –el último sobreviviente de la especie– muerto en el zoológico de Amsterdam en 1883. Los investigadores lograron extraer DNA de sus tejidos, en una proporción 100 veces menor que la que se puede obtener a partir de tejidos vivos y secuenciaron un segmento corto, de 115 pares de bases. Al comparar esta secuencia con otra perteneciente a una cebra, descubrieron que presentaban muy pocas diferencias, demostrando así la estrecha relación filogenética entre ambas especies. En su trabajo de 1984, publicado en *Nature*, Higuchi y Wilson anticiparon que la confirmación de que el DNA podía sobrevivir por largos períodos de tiempo, tendría un gran impacto en la paleontología, la biología evolutiva, la arqueología y la medicina forense, beneficiando el desarrollo de estas disciplinas.

Un año después de la publicación mencionada, Svante Pääbo, de la Universidad de Munich, logró extraer DNA a partir de células de la piel de momias egipcias de más de 2000 años de antigüedad. En

investigaciones previas, realizadas en la Universidad de Uppsala, el especialista ya había comprobado que era posible extraer DNA a partir de tejidos momificados. Para realizar el trabajo publicado en 1985, S. Pääbo revisó 110 momias depositadas en el Museo de la Universidad de Uppsala y en el Museo Estatal de Berlín, entre las cuales seleccionó las 23 que se hallaban mejor conservadas. Sólo pudo extraer DNA de dos momias, en una proporción de 20 microgramos por gramo de tejido seco.

Gracias al advenimiento de la técnica de PCR, en 1986, se produjo un espectacular avance en el estudio de muestras arqueológicas. Otros grupos de especialistas, además de aquellos liderados por Pääbo, analizaron material momificado de hasta 7500 años de antigüedad, de donde se obtuvo información sobre un tipo particular de secuencias de DNA repetidas –o *microsatélites*–, secuencias de *genes de histocompatibilidad* y principalmente de *genes mitocondriales*. Posteriormente S. Pääbo se asoció con otros grupos de investigadores, produciendo trabajos pioneros que sirvieron de modelo para los estudios de DNA antiguo en diversas especies de animales y plantas.

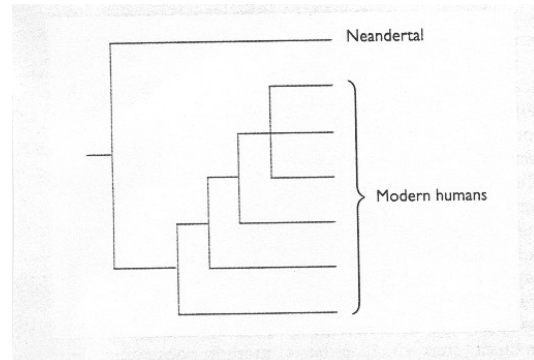
Párrafos extraídos de Lanteri A.L., Confalonieri V.A. El ADN del pasado. *Ciencia Hoy* Vol. 11 - Nº 64. Agosto/septiembre 2001.

DNA NEANDERTAL

Los Neandertales son homínidos extintos descendientes de poblaciones de *Homo erectus* que dejaron África hace aproximadamente un millón de años y, de acuerdo a la hipótesis de "Fuera de África", fueron desplazados cuando los humanos modernos llegaron a Europa hace 50.000 años. Por lo tanto una predicción de esta hipótesis es que no hay continuidad genética entre los Neandertales y los europeos actuales. Teniendo en cuenta que desaparecieron hace unos 30.000 años, ¿hay alguna forma de probar esta hipótesis? El DNA antiguo puede dar una respuesta.

Para este estudio se seleccionó un espécimen Neandertal que tendría entre 30 y 100 mil años de antigüedad. Se extrajo DNA de un fragmento de hueso de unos 400mg de peso y se usó la técnica de la PCR cuantitativa para determinar cuántas moléculas de DNA antiguo había. Los resultados indicaron que el fragmento de hueso contenía alrededor de 1.300 copias del DNA genómico del Neandertal, cantidad suficiente para realizar un análisis de su secuencia. Debido a que el DNA estaba fragmentado en trozos muy pequeños, la PCR se realizó usando nueve segmentos de DNA que se solapaban en sus extremos, cada segmento tenía aproximadamente 170 pares de bases. El producto de las nueve PCRs juntas permitió obtener un fragmento de una longitud total de 377bp.

Se construyó un árbol filogenético usando la secuencia de 377bp obtenida a partir del hueso del Neandertal y seis variantes de la misma secuencia (haplotipos) correspondientes a humanos actuales. La secuencia del Neandertal se ubicó en una rama separada, conectada al tronco del árbol pero no unida directamente a ninguna de las 6 secuencias de los humanos modernos.



Luego se comparó la secuencia Neandertal con otras 994 secuencias humanas modernas. Las diferencias fueron sorprendentes. La secuencia Neandertal difirió en 27.2 ± 2.2 nucleótidos. Esta cantidad de variación es incompatible con la hipótesis de que los europeos modernos sean descendientes de los Neandertales y apoya fuertemente la hipótesis del "Fuera de África". Este trabajo fue criticado por haber sido realizado a partir de un solo espécimen; podría ocurrir que los europeos modernos descendieran de los Neandertales, pero no de la población representada por este esqueleto en particular.

El uso de DNA antiguo en estudios evolutivos, tiene dos grandes críticas: una es que a menudo el DNA amplificado por PCR a partir de huesos u otros tejidos de especímenes arqueológicos, no es DNA antiguo sino DNA moderno, tal vez del arqueólogo que realizó la excavación o del biólogo molecular que extrajo el DNA. La otra es ¿cuánto tiempo puede durar el DNA sin degradarse? Algunos opinan que se puede obtener DNA antiguo de no más de 10.000 años y otros consideran que se puede conservar hasta 50.000 años.

Traducido y adaptado de: Krings M. *et al.* Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, 90:19-30, 1997.

INFECCIÓN POR HIV EN NIÑOS

Al momento del nacimiento y hasta los 18 meses de edad, aproximadamente, los hijos de madres HIV positivas poseen anticuerpos contra el HIV, sin que esto signifique que padecerán la enfermedad, ya que dichos anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas de origen materno que atravesaron la placenta durante el embarazo. La infección causada por el HIV puede ser una cuestión de vida o muerte y por consiguiente es muy importante determinar rápidamente si ese recién nacido desarrollará la enfermedad.

Existen dos maneras de saberlo:

1. **Prueba serológica:** detección de anticuerpos contra el virus HIV
2. **Prueba de carga viral por PCR**

Las pruebas de carga viral por PCR.

Esta técnica mide la cantidad de virus nuevos que están siendo producidos y dispersados por el torrente sanguíneo. Varios estudios han mostrado que niveles altos del virus están asociados con una progresión rápida de la enfermedad y por consiguiente un mayor riesgo de muerte. Algunos científicos argumentan que aún no se tiene una idea clara de lo que significan los distintos niveles de carga viral, por lo tanto los resultados de esta prueba no son suficientemente confiables como para recomendar su uso generalizado. En cambio, otros creen que al ser las pruebas de PCR el único medio disponible para medir el número de virus que están siendo producidos dentro del organismo permite:

- Utilizar los tratamientos apropiados en las etapas en donde son más efectivos.
- Anticipar infecciones oportunistas y los daños que puedan provocar al sistema inmunológico.
- Retardar la diseminación y reproducción del virus.

Además, las pruebas serológicas, por un lado requieren de varias semanas para obtener los resultados y por otro sólo pueden detectar anticuerpos cuando la concentración viral es de 1/100 células, mientras que la PCR detecta una partícula viral en cada 10^6 células.

Prácticamente todos los estudios clínicos para medir la efectividad de nuevas drogas sobre el virus utilizan esta técnica. Una droga que no disminuya la carga viral en sangre por lo general se considera un fracaso.

Los médicos utilizan esta prueba para tomar decisiones de cuándo comenzar una terapia, o para determinar si una droga está surtiendo efecto. Cuando los niveles del virus vuelven a aumentar mientras se está utilizando una droga, esto constituye una señal de que hay que hacer un cambio.

Aún cuando los resultados de esta prueba generen dudas para algunos investigadores, es una técnica que permite una acción preventiva ("comprar tiempo") y retrasar el progreso del HIV, mientras se esperan tratamientos mejores y en el caso de los enfermos es posible hacerles un seguimiento correcto de la enfermedad y saber si una terapia está funcionando o no. Definitivamente, un enfoque preventivo es el que parece brindar mayores esperanzas.

Material adaptado de: Lewis R. Human Genetics. McGraw-Hill eds., 3^{ra} ed., 1999.

Esta técnica es muy útil en la antropología forense, es decir, la aplicación de la antropología biológica a problemas de la medicina legal. En la práctica está referida al estudio de esqueletos humanos por indicación del Poder Judicial en aquellos casos en que no se conocen la identidad de la víctima ni la causa de su muerte. Tal tipo de investigación se torna relevante, por ejemplo, en casos de desastres masivos, accidentes o guerras.

El desarrollo de esta especialidad en Latinoamérica estuvo vinculado con la ocurrencia de ejecuciones extrajudiciales y el ocultamiento de cadáveres de desaparecidos, episodios vinculados con la represión ejercida por distintos sistemas políticos dictatoriales. En el caso de nuestro país, la antropología forense permitiría además la identificación de los restos de combatientes en la guerra de las Malvinas, cuya exhumación y traslado al continente han sido solicitados por algunas instituciones.

Para lograr los objetivos de identificación y causal de muerte, la antropología forense utiliza los recursos que le brindan otras disciplinas. Las técnicas arqueológicas le permiten preservar las evidencias en la recuperación de los restos a someter a peritaje; una vez exhumados, puede investigarse la edad de la víctima estudiando la maduración ósea. Para la determinación del sexo se emplean criterios morfológicos y estadísticos, mientras que la raza puede ser revelada por el estudio de los detalles faciales. En cuanto a la causa de la muerte, se puede arribar a dictámenes confiables para diferenciar el suicidio, la muerte natural o accidental y el homicidio. Por último, la identificación se realiza en un 80% de los casos a través del cotejo de fichas odontológicas pre y postmortem.

En nuestro país, el Equipo Argentino de Antropología Forense (EAAF) realiza peritajes en el área y a la vez investigaciones en arqueología, antropología biológica y antropología social destinadas a perfeccionar las técnicas de identificación existentes y desarrollar otras nuevas. En particular, existe la posibilidad teórica y práctica de emplear para tales fines la recuperación de material genético (DNA mitocondrial, DNA_{mt}) de restos óseos y piezas dentarias. El DNA_{mt} es heredado única y exclusivamente a través de la madre. Secuencias de esta molécula, al no experimentar recombinación con la versión paterna (en contraste con genes en el DNA nuclear), definen con especial fidelidad linajes propios de cada familia. Además, el DNA_{mt} evoluciona con tal rapidez que es muy probable que proporcione una verdadera huella digital a nivel molecular: sus características, en cada individuo, serían irrepetibles en otros no relacionados por línea materna.

Podría aventurarse, finalmente, la creación en el futuro de bancos de datos genéticos poblacionales, los que permitirían establecer identificaciones con alto grado de confiabilidad. En la Argentina existe ya, en el Hospital Durand de Buenos Aires, un banco nacional de datos genéticos para determinar la filiación de niños desaparecidos durante la dictadura militar.