

Técnicas de amplificación. Fundamento teórico. PCR

Julián Sanz Ortega, hospital Clínico San Carlos, Madrid

1.- Concepto

El genoma humano consta de 3.1×10^9 pb y 22,000 genes que representan el 5% del genoma. De estos genes el 30% contiene instrucciones para hacer proteínas y el 70% instrucciones para regular la translación a proteínas de otros genes: Ribosomal (rRNA), transfer RNA (tRNA), small nucleolar RNA (snoRNA), micro RNA (miRNA). Con las técnicas de amplificación conseguimos hacer billones de copias de una secuencia corta de un gen concreto, con lo que deja de ser una fracción insignificante de pares bases en nuestro tubo de ensayo y va a resultar mucho más sencilla de analizar. Pero estas técnicas no sólo sirven para analizar el genoma sino también alteraciones epigenéticas, como la cantidad de ARNm o incluso la metilación de las regiones promotoras que regulan la expresión del gen.

2.- Técnica

La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) reproduce in Vitro el proceso fisiológico de la duplicación del ADN en las células. La PCR multiplica («amplifica») exponencialmente una secuencia específica de ADN bicatenario, sintetizando grandes cantidades de un segmento específico de ADN a partir cantidades inferiores a 1 µg del ADN de muestra (y en teoría a partir de una sola molécula de ADN). Comprende varios ciclos divididos en tres etapas (desnaturalización, hibridación o anillamiento y extensión del cebador) que se resumen de la siguiente manera: primero se *desnaturaliza* el ADN por calor (90-94 °C), y luego se deja bajar la temperatura de modo que los extremos 3' de las hebras ahora separadas se puedan aparear con oligodesoxinucleótidos perfectamente complementarios (cebadores o primers), cuya longitud sea

suficiente (20-30 nucleótidos) para *formar híbridos* estables con la molécula que sirve de plantilla. Una polimerasa resistente a la desnaturalización por calor, la polimerasa Taq —llamada así por la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, de la que se había aislado—, extiende los extremos 3' de ambos oligonucleótidos utilizando las hebras del ADN bicatenario como plantilla, proceso que se conoce como «*extensión del cebador*» (*primer extension*). Una última desnaturalización pone fin a un ciclo y da comienzo al siguiente. Al cabo del primer ciclo se obtienen dos moléculas bicatenarias del ácido nucleico original. El ciclo anterior se repite muchas veces (el número óptimo es de 20 a 50 veces en una PCR típica), sin añadir más enzima y usando las moléculas obtenidas en el ciclo anterior como plantilla. De esta forma se produce un aumento exponencial del número de copias de la secuencia específica igual a 2^n , donde n es el número de ciclos.

Debemos este invento a Kary Mullis, quien, como él mismo relata en su autobiografía, tuvo la genial idea cuando conducía de regreso a casa con un amigo en abril de 1983, época en que buscaba una modificación del procedimiento de secuenciación de Sanger-Coulson («didesoxi» o enzimático). Mullis dio a conocer la PCR en una reunión científica en 1984, y en 1993 recibió el Premio Nobel de Química por este descubrimiento

Existe una variante, la PCR a “tiempo real”, que es “semicuantitativa” y permite mediante el empleo de técnicas de fluorescencia la cuantificación del producto amplificado al final de cada ciclo. De esta manera podemos tener una idea más aproximada de la cantidad de ADN molde de la que partimos o de ARNm si empleamos ADNc.

Es crítico en la PCR el diseño oligonucleótidos (cebadores o primers). Estos tienen una longitud de 18-24 nucleótidos. Es importante que ambos tengan “Melting temperatures” (T_m)(fórmula rápida de cálculo: sumar $G+C \times 4$ y $A+T \times 2$) y “Annealing temperatures” (T_a) similares ($T_a = T_m - 2-4^\circ$), que sean no complementarios (evitar “primer dimer”), no secuencias palindrómicas y con una distancia óptima entre oligos: 150-500 bp (parafina preferiblemente menos de 300 si usamos material parafinado).

Una vez realizada la PCR debemos confirmar la amplificación. El método

más habitual es la electroforesis en la que comprobamos si el tamaño del producto es adecuado. Esto no es suficiente si queremos por primera vez establecer una PCR como prueba clínica. Hay que confirmar la especificidad del producto mediante *enzimas de restricción (al menos 2)*, PCR “nested”, secuenciación o hibridación.

3.- Puesta a punto, problemas. Optimización de PCR

Varios factores son críticos para la PCR: la concentración de nucleótidos, la especificidad y la longitud de los cebadores (entre 18 y 30 bases) y la concentración del ión magnesio. Es recomendable SIEMPRE ajustar las condiciones de la PCR a nuestro laboratorio y nuestras muestras. Para ello lo mejor es probar varias condiciones sobre todo de Tª y concentración de MgCl₂.

Por sus características intrínsecas, el método es extremadamente sensible a la presencia de moléculas de ADN contaminante, que puede dar lugar a amplificaciones inespecíficas (aparición de «falsos positivos»). Para ello es importante incluir siempre controles:

- Control calidad de ADN
- Control positivo
- Control negativo: No ADN.
- *¿Control normal del mismo paciente?*

También es importante SIEMPRE un examen histopatológico previo a la extracción de ADN.

4.-Aplicaciones

La PCR es una de las técnicas más utilizadas de la ingeniería genética en la actualidad. Se puede emplear en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de diversas enfermedades sobre todo oncológicas. De manera muy resumida, las principales aplicaciones serían:

Diagnóstico:

- Traslocaciones específicas que pueden facilitar el diagnóstico diferencial y la clasificación de un gran número de linfomas y sarcomas.
- Mutaciones específicas: Tumores del estroma gastrointestinal (GIST), y dentro de los tumores sólidos esporádicos sobre todo en carcinomas renales y de tiroides.
- Cáncer familiar: Diagnóstico , tipificación y análisis de familiares afectados. Un 2-10% de los carcinomas de Colon, mama, riñon..
- Reordenamientos de inmunoglobulinas y receptor T para tipificar linfomas y diagnóstico diferencial con lesiones benignas.
- Errores filiación, metástasis de laboratorio
- Infeccioso

Pronóstico:

- Mutaciones específicas en GIST, carcinomas renales y de tiroides.
- Inestabilidad de microsatélites en carcinoma colo-rectal.
- Pérdidas 1p/19q en oligodendroglioma.
- Diferentes genes de fusión (traslocaciones) en sarcomas?
- Amplificaciones de N-myc en neuroblastomas.

Tratamiento

- Enfermedad mínima residual, micrometástasis.
- Respuesta a inhibidores de EGFR (Gefitinib) en Cáncer de pulmón.
- Respuesta a Imatinib en GIST.

REFERENCIAS:

LIBROS:

- Molecular Pathology in clinical practice. Leonard DGB, ed. Springer 2007.
- Thompson & Thompson genetics in medicine, 7th ed. Nussbaum RL. Elsevier 2007.
- Molecular genetic testing in surgical Pathology, Pfeiffer JD, Lippincott, Williams and Wilkins, 2005.
- The genetic basic of human cancer. Vogelstain B and Kinzler KW, McGraw Hill, 2002, 2nd,ed.

PAGINAS WEB:

- [Primer3: WWW primer tool](#) (*University of Massachusetts Medical School, U.S.A.*)
- [GeneFisher - Interactive PCR Primer Design](#) (*Universitat Bielefeld, Germany*)
- [PCR Now](#) (*Computational Biology Group, PathoGene, Southwestern Medical Center, U.S.A.*)
- www.genetests.org

REVISTAS