

PCR tecnología al servicio de la investigación y la clínica

- Dra. Marlid Cruz Ramos¹
- Dr. Alberto López Reyes²
- Dr. Jesús Santos Guzmán³

La biología molecular es una de las ramas más progresistas de la ciencia, ya que en los últimos 20 años se ha observado una revolución en el campo de la genética humana. El conocimiento aportado por esta rama de la ciencia ha dejado de ser exclusiva de los biólogos o químicos y se ha convertido en fundamento de muchas ramas de la medicina (oncología, citología, bioquímica, genética, inmunología, entre otras), lo cual ha permitido integrar el conocimiento y llevarlo a la aplicación clínica.

Esta nueva tecnología ha renovado, en gran medida, no sólo el concepto de diagnóstico, sino el de terapéutica de un número cada vez mayor de enfermedades, cuyos mecanismos etiopatogénicos y bioquímicos se descubren día a día en las secuencias del DNA de genes específicos.

La aplicación de esta tecnología no sólo descubre la base de enfermedades hereditarias sino también permite la localización del agente causal químico, mecánico, bacteriano, fúngico o viral, y más aun permite identificar asociaciones multifactoriales que producen patrones de enfermedad, tales como el cáncer, la diabetes, la esclerosis múltiple, la cirrosis hepática, entre otras.

Conocer la secuencia genética específica del agente patógeno, así como el defecto genético específico, permite obtener un diagnóstico definitivo y rápido de un proceso. El proceso científico del nuevo conocimiento se ha basado desde hace muchos años en modelos *in vitro* o modelos animales de las enfermedades, sobre los cuales se puedan generar experimentos y establecer la pauta de una terapéutica más precisa, y de esta manera extrapolar la información a los modelos humanos. En la actualidad, el diagnóstico por biología molecular permite avanzar en el co-

nocimiento de la enfermedad o práctica terapéutica de forma más rápida, precisa y sencilla.

Se considera como otro logro moderno, la secuenciación completa del genoma humano¹ (se conoce la secuencia de ácidos nucleicos de cada gen de cada cromosoma humano), que ha supuesto un cambio trascendental en la manera de entender, investigar y abordar el tratamiento de múltiples enfermedades, entre las que destacan las enfermedades crónico degenerativas, en las que se pueden incluir al cáncer, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares que son las principales causas de muerte a nivel mundial; por lo que un diagnóstico temprano y oportuno son de suma importancia para disminuir la morbilidad y la mortalidad de estas enfermedades que causan millones de muertes al año.

Desde el descubrimiento de la estructura del DNA, en 1953 por Watson y Crick² a la fecha, han surgido una gran variedad de técnicas para estudiar las variaciones del DNA (polimorfismos), así como la manera en que se expresan mediante el estudio del RNA.¹ La gran mayoría de estas tecnologías tienen su base en la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) descrita por Kerry Mullis en 1980,³ y que curiosamente tuvo su inspiración en una escena de la película "Fantasía" donde mágicamente se duplican las escobas.

La magia de la duplicación del DNA no era tan sencilla, se requería de mayor ingenio para poder duplicar el DNA, por lo cual recurrió a buscar en hábitat de ambientes extremos una DNA polimerasa que resistiera las altas temperaturas necesarias para la desnaturalización inicial del DNA. Nuevamente, la majestuosidad de un escenario mágico lo llevó al Parque Yellowstone, en donde aisló la DNA polimerasa del microorganismo *thermus acuaticus*, que resistía las altas temperaturas necesarias para completar la PCR.⁴

1, 2, 3 Escuela de Medicina del Tecnológico de Monterrey, Maestría en Ciencias Médicas y Biotecnología del Tecnológico de Monterrey. Cátedra de Terapia Celular y Medicina Regenerativa.

En la técnica de Reacción de Cadenas con Polimerasa (PCR)⁵ se introduce una enzima de restricción que seccione el ADN en sitios particulares o que introduzca una mutación base en particular (*quick time PCR*), y luego se producen millones de copias de esos segmentos, lo que los hace detectables con los instrumentos actuales.

Así pues, la PCR permite amplificar fragmentos de DNA a partir de muestras muy pequeñas para poder utilizarlas en el diagnóstico de enfermedades, en el estudio de poblaciones, no sólo humano sino también de las diferentes especies. Al principio este avance era limitado, ya que los equipos necesarios eran lentos y la visualización era complicada. En la actualidad, la PCR tomó un giro, y a través de marcajes fluorescentes se puede visualizar en tiempo real la duplicación del ácido nucleico, lo cual ha dado un giro de carácter cualitativo a cuantitativo, de esta manera se puede saber el número de copias de un virus infectante, el nivel de expresión de oncogén, el nivel de expresión de las citocromo p450 y su asociación como metabolizador rápido o lento a fármacos, entre otros.

Pero la tecnología en su carácter insaciable no sólo ha llegado ahí, en la actualidad la Nano-PCR termina de completar el circo mágico del que iniciara el Dr. Mullis hace más de 25 años, ya que permite amplificar fragmentos de DNA a partir de una sola célula. Así pues, acoplado a esta tecnología, la secuenciación juega un papel clave en las identificaciones de genes asociados o responsables a ciertas enfermedades, lo que permite detectar cambios en la secuencia del DNA –mejor conocidos como mutaciones–, que pueden representar un polimorfismo o si el cambio es de un solo nucleótido.

Los cambios genéticos que se presentan en las células tumorales son una base ideal para el empleo de la biología molecular, ya que permite la identificación y caracterización de la enfermedad.

Así, el cáncer comprende una gran cantidad de padecimientos, todos relacionados entre sí porque en su origen subyace la alteración de un conjunto de genes particulares cuyos productos cumplen con funciones vitales, entre las que destacan la proliferación, la diferenciación celular y la apoptosis. Los principales genes que se encuentran en el origen de la mayoría de los tumores son los oncogenes y los genes supresores de tumores. Los cambios genéticos que se presentan en las células tumorales son una base ideal para el

empleo de la biología molecular, ya que permite la identificación y caracterización de la enfermedad mediante el empleo de la PCR.

Otras técnicas permiten la manipulación del ADN, su secuenciación,⁶ clonación,⁷ construcción de bibliotecas (de fragmentos de ADN), síntesis de cADN por el método de PCR usando transcriptasa reversa (Real Time-PCR),⁸ micro-arreglos.⁹

Reacción en Cadena de la Polimerasa

A más de dos décadas de su invención, la PCR sigue siendo la base de las herramientas de diagnóstico, ya que permite la amplificación de ADN y RNA. Para poder lograr dicha amplificación hay que tomar en cuenta la repetición de tres pasos importantes que son repetidos entre 30 y 50 veces (ciclos) en termocicladores, equipos diseñados para subir la temperatura a muy altas velocidades.

Desnaturalización: En este paso inicial el termociclador alcanza los 90°C que permiten que se separen las dos cadenas de nucleótidos que conforman el DNA. Una vez separadas, los iniciadores (primers o cebadores) podrán unirse. El tiempo de exposición para la desnaturalización es crítico, ya que dependerá del contenido de guanina-citocina (G-C), a mayor contenido de G-C el tiempo será mayor, pero no se debe exceder, pues la actividad de la polimerasa encargada de la amplificación puede disminuir.

Alineamiento: Toda polimerasa requiere de una doble cadena para su actividad, por lo que se requiere el acoplamiento de los primers al DNA molde, así mismo la exposición de un grupo OH libre en la región 3' del primer para que se pueda elongar el fragmento. Existe un primer en dirección 5' o sentido que es complementario a la secuencia 5' de la región del DNA molde a amplificar y un primer 3' o antisentido en la cadena opuesta. La temperatura específica para el alineamiento de los primers está determinado por la composición de las bases, y generalmente oscila entre los 50 y 60°C, y el tiempo varía dependiendo el fragmento del iniciador.

Extensión: Este es el paso donde la polimerasa selecciona sólo los fragmentos donde se encuentran apareados los primers con el DNA molde, su direccionamiento siempre será en dirección 5' a 3'. La temperatura que se utiliza es alta, aproximadamente 72°C, necesaria para evitar la amplificación de fragmentos inespecíficos; entre más alta es la temperatura, la asringencia de la reacción es mayor, la velocidad pro-

medio es de 1000 nucleótidos cad. Para evidenciar los productos de la amplificación es bueno cerciorarse que todos los productos estén bien apareados, por lo cual se requiere de una extensión final de 5 min a 72°C. El proceso completo de la PCR tiene un tiempo aproximado de 3 horas.

Esta amplificación *in vitro* requiere de todos los sustratos que se podrían necesitar para una duplicación de DNA, los desoxinucleótidos, la taq-polimerasa, el buffer con pH óptimo para el desempeño de la enzima, así como una concentración específica de magnesio son cruciales para poder desarrollar una PCR de manera adecuada.

Para poder visualizar los fragmentos amplificados es importante mencionar la técnica de separación de una electroforesis en la que la fase sólida está comprendida por un gel de agarosa, el cual tendrá una concentración dependiendo del fragmento amplificado, y para que éste pueda ser visualizado se emplea un agente revelador intercalante, que puede ser bromuro de etilo, naranja de acridina, y uno menos tóxico: el Syber Green.

Con el descubrimiento de los retro-virus se rompe el dogma de la biología molecular que dirigía de manera unidireccional la síntesis de RNA a partir de DNA, ahora unos seres diminutos podían generar DNA a partir del RNA, y este complejo proceso pudo ser aplicado a la PCR para poder cuantificar el nivel de expresión de ciertos genes. El DNA generado a partir de RNA se le conoce como copia de cDNA. De esta manera, sería posible relacionar incrementos o decrementos de la expresión de ciertos genes con ciertas patologías. Para poder lograr esto se requerían de sistemas de detección más sensibles y específicos que sólo fueron posibles de acoplar en lo que se conoce como PCR tiempo real.

PCR-tiempo real

Esta tecnología tiene su principio en la PCR convencional, pero ahora ya no se requiere de la electroforesis para visualizar los fragmentos, ya que se utiliza una marca fluorescente que puede ser detectada por los modernos termocicladores, los cuales cuentan con un sistema de fluorimetría integrado que permite detectar marcas fluorescentes, así como sondas marcadas unidas a los primers serán detectadas en cada ciclo de la amplificación y se verá en tiempo real el incremento en la fluorescencia, la cual se relacionará con el incremento del segmento amplificado. Esta

tecnología, ahora tan sensible y específica, permite ya no sólo hacer un estudio cualitativo sino un estudio cuantitativo, y así poder entregar un resultado en cuestión de minutos.

Aplicaciones

La PCR es una técnica sumamente versátil que abarca desde el estudio de la evolución hasta la clínica aplicada en una infinidad de áreas. Tienen su base en el estudio de enfermedades genéticas, así como su empleo en el área forense, porque se puede utilizar la huella genética de un sospechoso para incriminarlo o exonerarlo de algún delito.

En la microbiología, la PCR permite identificar a un agente infeccioso independientemente de su respuesta serológica, se puede detectar el genotipo del patógeno y su susceptibilidad a antibióticos, y con ello reducir el diagnóstico de 48 hrs a 8 hrs. La detección e identificación de la variante génica del VPH responsable de las neoplasias cervicales, el VHC responsable de la cirrosis hepática y el genotipo del virus del dengue hemorrágico pueden ser detectados mediante la PCR.¹⁰

En el diagnóstico de enfermedades oncológicas permite identificar alteraciones en los oncogenes y en los genes supresores de tumores involucrados en las neoplasias, mediante esta técnica es posible detectar una sola célula mutada en 1×10^6 células, ésta es la mayor sensibilidad alcanzada. Mediante la PCR pueden ser detectadas mutaciones de P53, gen supresor involucrado en el mantenimiento de la homeostasis de la célula. Los genes Her2 en cáncer de mama son marcadores diagnósticos de la enfermedad, los genes Ras involucrados en los tumores sólidos. El incremento del Antígeno de Proliferación Nuclear de la Célula (PCNA) y la proliferación celular incontrolada de células neoplásicas pueden ser identificados, entre otros genes asociados a tumores.¹¹

Esta tecnología da la posibilidad de conocer e identificar genes relacionados con enfermedades o con el metabolismo de fármacos. Brinda la capacidad de tener selectividad y alta precisión clínica e incluso detectar sustancias a nivel de nanogramos o picogramos, cuando las tecnologías analíticas anteriores median en el plano de miligramos o microgramos. El PCR y otras técnicas de la biología molecular marcan hoy en día un parteaguas en la práctica médica y científica, tal como lo hicieron los rayos X o los antibióticos unas cuantas décadas atrás.

Referencias bibliográficas:

1. Robert Olby; (2003) "Quiet debut for the double helix" *Nature* 421 (January 23): 402-405.
2. Watson, J. D. & Crick, F. H. C. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738 (1953).
3. Saiki, RK; Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-91.
4. Chien, A; Edgar DB, and Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bact.* 127 (3): 1550-1557.
5. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*. 1992;24:17-27.
6. Lander, Eric S.; HGP consortium (2001-02-15). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409 (6822): 860-921.
7. Copeland NG, Jenkins NA, Court DL. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet.* 2001 Oct;2(10):769-79.
8. Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* 1: 1559-1582.
9. Churchill GA (2002). Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nature genetics supplement* 32: 490.
10. Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis.* 2004 Jun; 4(6):337-48. Links.
11. Ochman H, Gerber AS, Hartl DL (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120: 621-623.

Correspondencia:
Dr. Jesús Santos Guzmán
Email: jsg@itesm.mx