

Patología molecular

Técnicas moleculares para la obtención de DNA y reacción en cadena de la polimerasa

Ll. Catasús y X. Matías-Guiu

Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

MÉTODOS DE OBTENCIÓN DEL DNA

En los últimos años los avances realizados en el campo de la genética molecular han mejorado de forma notable el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos y el diagnóstico de distintas enfermedades. En el DNA se encuentra toda la información genética del individuo; por tanto, el primer paso para llevar a cabo un estudio de genética molecular implica la obtención de muestras de ácidos nucleicos, especialmente DNA.

Las técnicas de extracción de ácidos nucleicos son sencillas, pero es importante mantener una serie de precauciones para evitar la degradación por nucleasas durante la manipulación. El objetivo es obtener la máxima cantidad y la mayor calidad posible de DNA. Se han desarrollado diversos procedimientos o protocolos de extracción teniendo en cuenta el origen o fuente del DNA. En los últimos años las casas comerciales han desarrollado diversos *kits* de obtención del DNA a partir de sangre, todo tipo de tejidos y cultivos celulares que pretenden optimizar los procedimientos para obtener un máximo de DNA de buena calidad y en el menor tiempo posible.

A partir de sangre: Las células nucleadas de sangre periférica son una de las fuentes más asequibles y utiliza-

das en medicina para la obtención de DNA genómico. Con el procedimiento habitual, entre 10 y 30 ml de sangre recogidos sobre ácido etilendiaminotetracético (EDTA), que actúa como anticoagulante, son suficientes para obtener varios cientos de microgramos de DNA en forma de fragmentos de una talla de hasta 20 kb. En la extracción se separan los leucocitos y se lisan con una solución que contiene el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS) y la proteínaasa K. La proteínaasa K es una proteasa muy activa del tipo de la subtilisina que se obtiene a partir de *Tritirachium album*; esta proteasa libera el DNA nuclear al medio y digiere las proteínas. Posteriormente, se desproteíniza la muestra mediante una deshidratación y precipitación de las proteínas celulares provocada con una solución saturada de NaCl, y finalmente se obtiene el DNA por precipitación con alcohol etílico absoluto (1). Actualmente se pueden encontrar en el mercado *kits* y aparatos que automatizan la extracción de DNA de varias muestras a la vez en unas pocas horas.

A partir de tejidos conservados en congelación: Se requiere un primer paso de homogeneización que rompa el tejido y facilite la posterior lisis de las células que forman el tejido. Después, el tejido homogeneizado se incuba durante 12 horas con SDS y proteínaasa K para desnaturali-

zar y digerir las proteínas. Posteriormente, el DNA se somete a una serie de extracciones con fenol y cloroformo que tienen como objeto acabar de digerir las proteínas y separarlas del DNA.

A partir de tejidos parafinados: El DNA de estas muestras es estable durante muchos años. Se obtienen secciones, se desparafinan y se incuban durante 72 horas con SDS y proteinasa K. A partir de aquí el procedimiento es idéntico al descrito para el caso de tejidos conservados por congelación: extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol absoluto. Para futuros análisis se ha de tener en cuenta que a veces el DNA genómico de tejidos incluidos en bloques de parafina se encuentra muy fragmentado, y que, por ejemplo, es desaconsejable montar reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) para buscar y amplificar fragmentos de DNA superiores a 300 a 400 pares de bases. También es importante saber que algunos fijadores (líquido de Bouin) degradan el DNA de forma más intensa que otros.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y PATOLOGÍA

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica extraordinariamente útil, de gran sensibilidad, especificidad, versatilidad y sencillez que ha revolucionado el estudio de las alteraciones moleculares. *In vitro* es capaz de generar de forma selectiva y rápida grandes cantidades de un determinado fragmento de DNA a partir de mínimas cantidades del mismo.

La primera PCR fue descrita inicialmente por Kleppe y cols. en una publicación de 1971 (2) que pasó desapercibida al no representar un gran avance tecnológico, pues utilizaba una DNA polimerasa no termoestable que provocaba un proceso largo y engorroso. La descripción de la técnica tal como la conocemos hoy ocurrió en 1985 gracias a los trabajos de K.B. Mullis, investigador del equipo de H. Erlich de la Sociedad Perkin-Elmer Cetus Inc., que utilizó una DNA polimerasa termoestable (3-5). El rápido desarrollo y amplia utilización de esta técnica propició que en 1989 la revista *Science* eligiera como "molécula del año" a la DNA polimerasa utilizada en esta reacción (6).

Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa

La PCR se basa en la replicación del DNA y está diseñada para producir una amplificación selectiva de una determi-

nada secuencia de DNA (DNA objetivo). Se requiere el uso de dos cebadores oligonucleotídicos (*primers*) complementarios a las secuencias situadas en los extremos del fragmento de DNA que se desea amplificar. La reacción se basa en la sucesión de varios ciclos de tres etapas (desnaturalización, hibridación y extensión) que comprenden la desnaturalización de la doble hebra de DNA por calor, la hibridación de los dos cebadores a sus secuencias complementarias y la síntesis de DNA mediante la acción de una DNA polimerasa termoestable (Fig. 1). Las tres etapas constituyen un ciclo

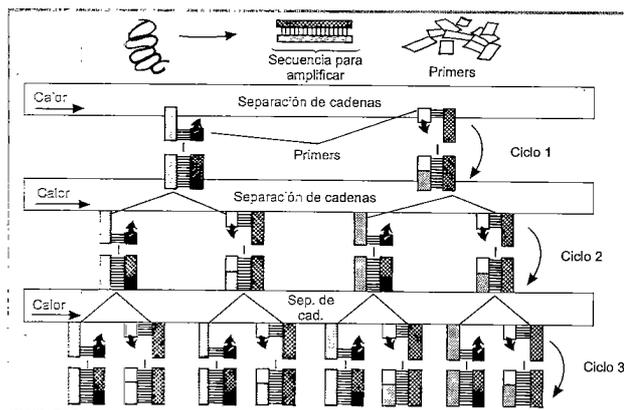


Figura 1. Amplificación de DNA por técnica de PCR. Se añaden secuencias de nucleótidos complementarias a los extremos de la cadena de DNA que se quiere amplificar (*primers* o cebadores). De manera cíclica se separan las cadenas de DNA mediante calor, se acoplan los cebadores, y luego se produce la síntesis de DNA. Como muestra el esquema, al menos en teoría, se produce un aumento exponencial de moléculas de DNA ($2^1, 2^2, 2^3, 2^4...$).

durante el transcurso del cual la cantidad de DNA objetivo se ha duplicado. En general en un experimento de PCR el número de ciclos varía entre 25 y 40, y una molécula de DNA podrá ser amplificada de 10^7 a 10^{11} veces. No es aconsejable aumentar el número de ciclos más allá de 40, puesto que la amplificación sigue un proceso exponencial hasta el ciclo 20 para alcanzar después poco a poco un plató donde ya no hay más incremento de producción de DNA. La temperatura de hibridación (*annealing*), el tiempo de cada etapa, el número de ciclos y las condiciones de la reacción son muy variables y se han de adaptar según la naturaleza del DNA objetivo y de los cebadores, la calidad de la DNA polimerasa termoestable, el tipo de aparato termociclador, etc.

Con esta técnica en la práctica se pueden obtener productos amplificados correctos con un tamaño inferior a 4000 pares de bases, aunque actualmente se comercializan DNA polimerasas especiales que, en teoría, pueden amplificar fragmentos de DNA de hasta 40.000 pares de bases. Los productos amplificados pueden analizarse mediante un amplio abanico de métodos.

Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa

Debido a la sensibilidad de la técnica, uno de los principales problemas es el riesgo de contaminación por DNA extraño, y la subsiguiente aparición de amplificaciones no deseadas. Para minimizar este problema es necesario tomar estas precauciones:

- 1) Efectuar las extracciones de DNA, las reacciones de la PCR y el análisis de los productos de amplificación en áreas geográficas separadas.
- 2) Utilizar material de laboratorio exclusivo para PCR.
- 3) Alicuotar todos los reactivos de la PCR en volúmenes pequeños.
- 4) Añadir como último reactivo el DNA objetivo al tubo de reacción.
- 5) Centrifugar los tubos antes de abrirlos.
- 6) Utilizar micropipetas con desplazamiento positivo y puntas con filtro.

En el caso de utilizar DNA extraído de tejidos parafinados, cada bloque debe ser cortado con una cuchilla de micrótopo que se reemplaza o se limpia con xileno. En ningún caso se ha de limpiar con etanol, pues podría provocar la precipitación del DNA y ser fuente de contaminaciones.

La PCR requiere variar rápidamente y de forma exacta y precisa la temperatura correspondiente a cada una de las tres etapas (desnaturalización, hibridación y extensión). Para ello se utilizan termocicladores, que están compuestos por uno o más bloques térmicos en los que se colocan los tubos eppendorf de 0,5 ml con la mezcla de reacción. Con tal de evitar la evaporación y conservar estable y uniforme la temperatura, se suele añadir a cada muestra una capa de aceite de parafina, aunque muchos modelos actuales incluyen en la tapa del termociclador dispositivos para que ésta se mantenga caliente, evitando así, al estar la tapa en contacto con la porción superior de los tubos, la condensación y la evaporación de su contenido. El sistema de calentamiento de los termocicladores es habitualmente una resistencia, mientras que el sistema de refrigeración puede ser desde un ventilador a un sistema de refrigeración por agua o freón. Todos los aparatos llevan un microprocesador para programar las diversas etapas de cada ciclo con sus temperaturas y duración. Algunos equipos disponen de una sonda de temperatura integrada en un tubo de reacción que logra medir la temperatura exacta con más precisión.

El ajuste de las condiciones químicas de la reacción permite optimizar la PCR para obtener una buena amplifi-

cación del fragmento de DNA deseado, evitando la aparición de amplificaciones inespecíficas de secuencias extrañas. Para conseguir una buena amplificación es importante partir de DNA bien purificado. Cuando se pretende amplificar una secuencia que está representada una sola vez en la muestra de partida, la cantidad de DNA inicial debe estar entre 100 y 500 ng, pero si hay diversas copias la cantidad inicial puede reducirse a 10 ng.

Los cebadores (*primers*) son secuencias de entre 15 a 30 nucleótidos que se han de hibridar a cada extremo 3' y 5' de la secuencia de DNA a amplificar. La cantidad de cebadores puede variar, pero se utilizan generalmente entre 30 y 150 ng. Un exceso de ellos se puede traducir en amplificaciones no específicas o en la aparición de la amplificación de dímeros de cebadores. Al diseñar las secuencias cebadoras se han de evitar aquellas que puedan facilitar hibridaciones entre ellas; las que contengan poli dATP, dCTP, dGTP y dTTP para evitar la formación de estructuras secundarias. La composición en bases de cada cebador permite calcular matemática y teóricamente la temperatura de hibridación con el DNA objetivo, pero en general la temperatura de hibridación se establece de forma empírica y se sitúa entre los 40 °C y los 65 °C. En algunos casos se utilizan cebadores degenerados, es decir, mezclas de cebadores muy parecidos que se diferencian en alguna base. Éstos se emplean en la identificación de algunos grupos de virus, como los papilomavirus humanos. En este caso, se utiliza un cóctel de cebadores que permite amplificar varios DNA análogos, correspondientes a distintos genotipos de virus (7).

La DNA polimerasa termoestable más utilizada es la Taq polimerasa, aislada de *Thermus aquaticus* (8), una bacteria termofílica que habita en las fuentes termales a una temperatura comprendida entre 70 °C y 80 °C. Actualmente se obtiene en forma de proteína recombinante expresada en *E. coli*. Presenta una actividad máxima entre 72 °C y 80 °C que corresponde a la temperatura de la fase de extensión o síntesis de DNA, que es de 72 °C. No tiene actividad exonucleasa y, por tanto, no puede corregir posibles errores en la incorporación de nucleótidos durante la síntesis de DNA. Sin embargo, el riesgo de error es poco importante y ha sido evaluado como 1 entre 75.000 nucleótidos. Las cantidades óptimas de la enzima están comprendidas entre 1 y 2,5 unidades para un volumen final de incubación de 50 U/l. Una cantidad excesiva puede conducir a la amplificación de productos no específicos.

El tampón de hibridación ha de asegurar una fuerza iónica correcta y un pH adecuado para la reacción de la enzima. Normalmente, se utiliza Tris entre 10 y 50 mM de

concentración final con un pH de 8,3 a 25 °C (el pH varía entre 6,8 y 7,8 durante la amplificación ya que depende de la temperatura). Normalmente lleva también **KCl** a 50 mM, que facilita la hibridación de los cebadores, y gelatina (0,01% en concentración final), que favorece la acción de la Taq polimerasa. En algunos casos se añade dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración máxima final del 10%, que tiene como función impedir la formación de estructuras secundarias; este producto tiene el inconveniente de inhibir parcialmente a la enzima.

El $MgCl_2$ es un factor crítico indispensable en la PCR. Influye sobre la hibridación de los cebadores, sobre la especificidad del producto de amplificación y sobre la actividad y la fidelidad de la Taq polimerasa. La concentración final de $MgCl_2$ se determina empíricamente y suele situarse entre 1 y 4 mM. La PCR no funciona sin suficientes iones magnesio, pero una cantidad excesiva puede ser el origen de productos amplificados inespecíficos.

La concentración de nucleótidos (dNTP) utilizada en la PCR varía entre 20 y 200 μM y deben estar equilibrados entre ellos. Hay estrategias que utilizan dNTP marcados radioactivamente que serán incorporados en el transcurso de la PCR y que favorecerán la detección del producto final.

Variantes de la reacción en cadena de la polimerasa

PCR a partir de RNA (RT-PCR)

Se utiliza para estudiar la expresión de ciertos genes. En primer lugar, se extrae el RNA total de las células o tejido en estudio y se separa la fracción correspondiente al mensajero (RNAm). Una vez purificado, el RNAm se transcribe en DNAc mediante la transcriptasa inversa (enzima codificada por retrovirus). Una copia de DNAc es sintetizada a partir de cada molécula de RNAm presente. Luego, las moléculas de DNAc monocatenarias son convertidas en DNAc bicatenarias por acción de la DNA polimerasa (Fig. 2). La PCR permitirá entonces la detección de RNAm de baja expresión poco representados y obtener resultados más sensibles que con técnicas de *Northern blot* y de hibridación *in situ*. Actualmente, existe una nueva enzima termoestable recombinante, la rTth DNA polimerasa de *Thermus thermophilus*, que funciona como una transcriptasa inversa y una DNA polimerasa.

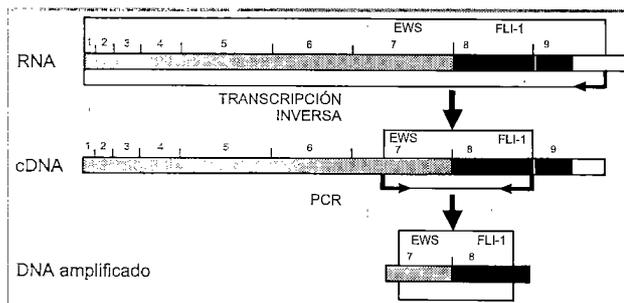


Figura 2. PCR con transcripción inversa. El RNAm se transcribe a DNAc mediante la transcriptasa inversa. Se sintetiza una copia de DNAc a partir de cada molécula de RNAm presente. Posteriormente, las moléculas de DNAc monocatenarias se convierten en DNAc bicatenarias por acción de la DNA polimerasa y se amplifican como en una PCR convencional. El ejemplo corresponde a la amplificación del transcrito quimérico EWS-FLI1 en un sarcoma de Ewing.

PCR asimétrica

Produce fragmentos de DNA de cadena simple al utilizar cebadores a concentraciones molares distintas en una relación ente 50/1 y 100/1. De esta forma, se producirá de forma exponencial DNA de doble cadena hasta que se agote el cebador minoritario. Luego, sólo la cadena de DNA que hibrida con el cebador que queda en exceso será producido de forma lineal en los ciclos siguientes; de esta forma el producto amplificado final contendrá de 10 a 20 veces más de DNA monocadena que de DNA de doble cadena. El DNA de cadena simple es recuperado y puede servir para una secuenciación directa según la técnica de Sanger (9).

PCR anidada (nested PCR)

Aumenta la sensibilidad y la especificidad de la PCR. Es necesario realizar dos PCR consecutivas de 25 a 30 ciclos cada una (Fig. 3). La primera PCR se lleva a cabo con un par de cebadores llamados externos, mientras que la segunda utiliza unos cebadores llamados internos que flanquean una región interna a la secuencia de DNA amplificada en la primera reacción. Este sistema aumenta la sensibilidad de la reacción y se emplea cuando se parte de una cantidad muy baja de DNA problema.

Multiplex PCR

Consiste en hacer diversas amplificaciones en el mismo tubo de reacción (por ejemplo, para amplificar varios exones de un mismo gen colocando diversas parejas de cebadores que estuviesen lo suficientemente alejados para que

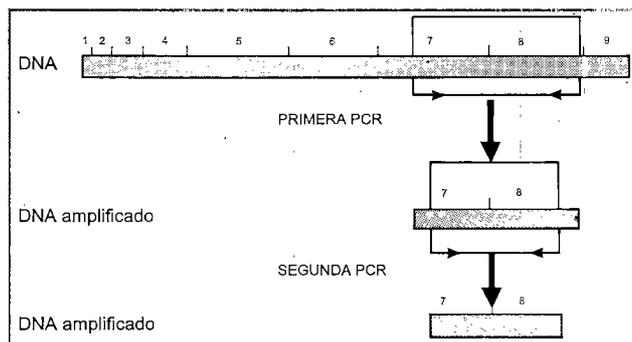


Figura 3. PCR anidada (*nested*). Se trata de dos PCR convencionales realizadas de manera secuencial. La primera se lleva a cabo con un par de cebadores externos, mientras que la segunda utiliza unos cebadores situados internamente a los primeros, que flanquean una región interna a la secuencia de DNA amplificada en la primera reacción.

no se pudieran interferir entre ellas). Se puede utilizar hasta nueve parejas de cebadores en el mismo tubo de reacción (10).

Touchdown PCR

Reacción de PCR en dos partes. En la primera, de 20 ciclos, se empieza con una temperatura de hibridación elevada (65 °C) que va decreciendo en cada ciclo hasta la temperatura de hibridación óptima. Para evitar la formación de dímeros de cebadores es conveniente trabajar a una temperatura elevada; pero, a medida que se forma el producto, nos interesa mejorar la hibridación con el DNA objetivo. En la segunda parte nos interesa la producción masiva del producto deseado, y continuamos 20 ciclos más a la temperatura de hibridación óptima (11). Si trabajamos con cebadores degenerados es difícil calcular la temperatura óptima y se acostumbra a utilizar esta estrategia.

Hot start PCR

Consiste en empezar a una temperatura elevada. Antes de calentar la muestra, a temperatura ambiente ya se pueden formar dímeros y uniones inespecíficas. Para evitarlo se calientan a 95 °C todos los componentes de la reacción y se añade en el último momento la Taq polimerasa atravesando la capa de aceite. Actualmente existen en el mercado Taq polimerasas modificadas que son inactivas a temperatura ambiente y que no requieren el procedimiento *hot start* (12).

PCR cuantitativa y semicuantitativa (PCR diferencial)

Por PCR es posible, aunque difícil, el análisis cuantitativo de un DNA. Este método utiliza un segundo objetivo dentro de la muestra que sirve de control interno de la síntesis de DNA y de la amplificación y para estandarizar los resultados (13). La PCR cuantitativa se ha utilizado en estudios de expresión del gen N-MYC en neuroblastomas y *c-erb B2* en cánceres de mama y ovario.

PCR in situ

Se practica sobre secciones tisulares en contacto directo con el medio de amplificación (14). Para esta variante lo ideal es utilizar un termociclador adaptado a las láminas de preparación histológica. Normalmente, se amplifica directamente con cebadores marcados y después se revela el marcado. Si se efectúa con nucleótidos marcados, existe el riesgo de detectar amplificaciones no específicas.

Aplicaciones de la reacción en cadena de la polimerasa en patología

En anatomía patológica el estudio citológico y/o histológico de las lesiones puede ser confirmado y completado mediante la técnica de PCR. Se puede utilizar en la detección de microorganismos (citomegalovirus, herpes virus, virus de la hepatitis B, micobacterias, papilomavirus, virus de la inmunodeficiencia humana, etc.), en la identificación de alteraciones de protooncogenes en tumores (amplificaciones, mutaciones puntuales, etc.) y en el diagnóstico de enfermedades hereditarias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Miller, S., Dykes, D., Polesky, H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
2. Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., Khorana, H.G. Study on polynucleotides: Repair replication of short synthetic DNA as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol* 1971; 56: 341-361.
3. Mullis, K.B., Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350.
4. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and the restriction site analysis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354.

5. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. NY Academic 1990.
6. Guyer, R.L., Koshland, D.E. *The molecule of the year*. Science 1989; 246: 1543-1546.
7. Manos, M.M., Ting, Y., Wright, D.K., Lewis, A.J., Broker, T.R., Wolinsky, S.M. *The use of polymerase chain reaction for the detection of human papillomaviruses*. Molecular Diagnostics of Human Cancer: Cancer cells, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1989; 7: 209-214.
8. Chien, A., Edgar, D.B., Trela, J.M. *Desoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile Thermus aquaticus*. J Bacteriol 1976; 127: 1550-1557.
9. Gyllenstein, V.B., Erlich, H.A. *Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus*. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 7652-7656.
10. Edwards Multiplex PCR. *Advantages development and applications*. PCR Methods and Applications 1994; 3: S65-S71.
11. Kusser Sensitive two-stage PCR of p53 genomic DNA exons 5-9. PCR Methods and Applications 1993; 2: 250-252.
12. Birch, D.E., Kolmodin, L., Laird, W.J., McKinney, N., Wong, J., Young, K.K.Y., Zangenberg, G.A., Zoccoli, M.A. *Simplified hot start PCR*. Nature 1996; 381: 445-446.
13. Dallman, M.J., Porter, A.C.G. *Semi-quantitative PCR for the analysis of gene expression*. PCR. A practical approach IRL Press 1991; 215-224.
14. Nuovo, G.J., Gallery, F., Mac Connell, P., Becker, J., Bloch, W. *An improved technique for the detection of DNA by in situ hybridization after PCR-amplification*. Am J Pathol 1991; 139: 1239-1244.