

Reacción en cadena de la polimerasa *in situ*. Nuevo método para el diagnóstico genético

Horacio Astudillo-de la Vega*, Angela Monarres-Alvarado,** Luis Benítez-Bribiesca***

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método por el cual se logra una detección rápida y específica de fragmentos genómicos en muestras de tejido de interés clínico especialmente en casos en los que el ADN blanco es de cantidad y calidad insuficiente para determinarlo por otras técnicas (p.e. Southern blot, dot blot, slot blot, hibridación *in situ*). Dicha técnica permite la amplificación de material genético extraído de biopsias quirúrgicas, aspirados, raspados, fluidos (sangre, linfa, saliva, semen, etc.), tejidos congelados o incluidos en parafina y es una técnica simple y altamente sensible para el diagnóstico molecular. La amplificación a partir de una copia sencilla de interés por medio de un termociclado de 40 ciclos amplifica 1×10^5 veces la secuencia blanco de ADN.¹

Sin embargo, aunque es una técnica extremadamente sensible es también una de las más susceptibles de resultados falsos positivos debido a la contaminación de las muestras por un mal manejo de las mismas, además de no permitir una correlación directa del análisis molecular con la histopatología del espécimen.

La hibridación *in situ*, una técnica alternativa para la detección de secuencias génicas, si permite esta correlación, pero no deja de ser una técnica de baja sensibilidad especialmente cuando las secuencias blanco son de bajo número de copias. Actualmente existe una adaptación novedosa para

la aplicación de la técnica de PCR directamente al corte histológico en la laminilla, con lo que se facilita la detección de ácidos nucleicos en células individuales con un alto grado de sensibilidad por lo que se le ha llamado: PCR *in situ*. Dicha metodología fue por primera vez reportada por Haase y cols (1990),² en células infectadas *in situ* con un lentivirus. La técnica ha sido ampliamente desarrollada por Nuovo y cols. (1991a y 1991b),³ para localizar genomas de papilomavirus humanos (HPVs) en cortes histológicos de tejidos incluidos en parafina. Komminoth y cols (1992)⁴ usaron la técnica de PCR *in situ* para detectar ADN viral, copias sencillas de genes y rearrreglos génicos en suspensiones celulares. Bagasray y cols (1992)⁵ detectaron virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) en muestras sanguíneas de pacientes con SIDA. Gosden y Hanratty (1993)⁶ detectaron secuencias con bajo número de copias en cromosomas en división. Lo anterior demuestra que esta técnica es de particular utilidad en la detección de secuencias génicas y virales que pueden estar presentes en un bajo número de copias o cuando sólo unas cuantas células presentan la secuencia blanco, permitiendo la detección en células individuales y en subpoblaciones celulares para así establecer una correlación con la morfología del tejido y de la célula. La técnica de PCR *in situ*, consiste en la adaptación de la reacción clásica de amplificación al corte histológico,

Bechario Residente en Investigación de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Hospital de Oncología, CMN, SXXI IMSS

* * Departamento de Genética y Biología Molecular. CINVESTAV-IPN

** * Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Hospital de Oncología, CMN, SXXI IMSS

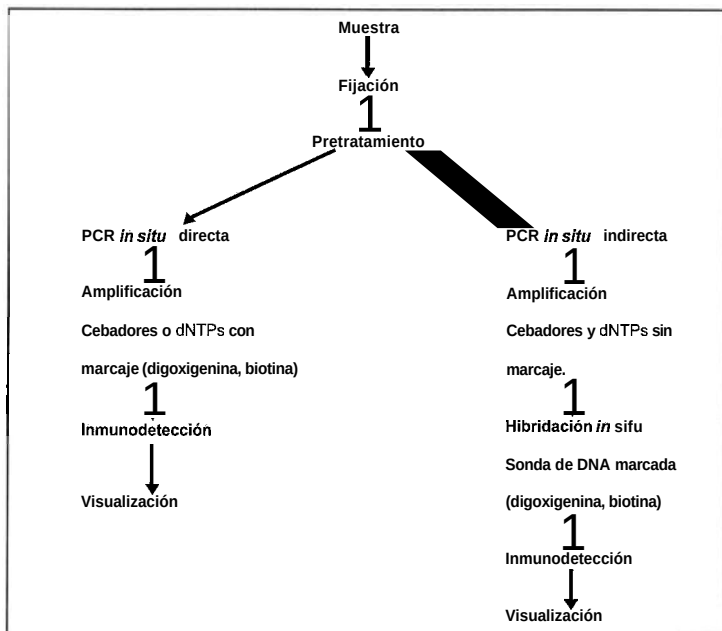


Figura 1. Esquema de los dos procedimientos usados para PCR *in situ*

por medio de modificaciones sencillas de la técnica original. Es necesario preservar la pureza de los ácidos nucleicos para la amplificación, la concentración de la enzima ADN polimerasa se incrementa, así como la concentración de magnesio (cofactor necesario para la enzima). En la mezcla nucleotídica es posible incorporar nucleótidos marcados y el número de ciclos debe reducirse. El éxito de la PCR *in situ* radica en el pretratamiento de la muestra de estudio, en la propiedad de los reactivos usados en la amplificación y en el proceso final de detección. La novedosa técnica ha generado dos variantes metodológicas en su aplicación *in situ*: la PCR *in situ* indirecta y PCR *in situ* directa (Figura 1). Dichas variantes difieren entre sí en la preparación de la mezcla de reacción y del producto que inmunodetectan, de tal manera que en el método indirecto se necesita un paso posterior a la amplificación de hibridación *in situ* con sondas marcadas y comple-

mentarias al producto de amplificación, no así para el método directo donde la incorporación en la reacción de los cebadores o de un dNTP marcados, evita la necesidad de usar la hibridación *in situ*. El conocimiento y aplicación de esta tecnología para el estudio de enfermedades tan complejas como el cáncer, infecciones virales o enfermedades genéticas, permite disponer de una fina tecnología diagnóstica con aplicación directa a la clínica. Es de preverse que en el futuro se dispondrá de nuevas variantes que modifiquen e incrementen la especificidad y sensibilidad de esta técnica para hacerla más accesible y costo-efectiva. Así se podrá usar como método de rutina en frotis, raspados o cepillados de mucosas, fluidos, células en cultivos, biopsias transoperatorias o tejidos incluidos en paraafina, para servir de apoyo al diagnóstico clínico y a la terapéutica médica, fin último de la investigación biomédica.

Referencias

1. **Mullis KB, Faloona FA.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;35:335-350.
2. **Haase AT, Retzel EF, Staskus KA.** Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1990;87:4971-4975.
3. **Nuovo GJ, MacConnell P, Forde A, Delvenne P.** Detection of human papillomavirus DNA in formalin fixed tissues by in situ hybridization after PCR amplification by PCR. *Am J Pathol*, 1991;139:847-854.
4. **Komminoth P, Long AA, Ray R, Wolfe HJ.** In situ polymerase chain reaction detection of viral DNA in single copy genes, and gene rearrangements in cell suspensions and cytopins. *Diagn Mol Pathol* 1992;1(2): 85-87.
5. **Bagasra O, Hauptman SP, Lischer HW, Sachs M, Pomerantz RJ.** Detection of human immunodeficiency virus type 1 provirus in mononuclear cells by in situ polymerase chain reaction. *N Engl J Med*, 1992;328:1385-1391.
6. **Gosden G, Hanratty D.** PCR in situ: A rapid alternative to in situ hybridization for mapping short, low copy number sequences without isotopes. *BioTechniques*, 1993;15:78-80.