

CÓMO VER LA PCR EN DIRECTO: LA RT-PCR

Sara Díaz Moreno

Becaria de investigación, Dpto Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga

La reacción en cadena de la polimerasa en directo («en tiempo real») (RT-PCR) es un método que permite la cuantificación de ácidos nucleicos con gran exactitud y fiabilidad. Está basada en la monitorización de la PCR usando técnicas de fluorescencia. Esto permite la visualización en directo del perfil completo de amplificación de la diana dentro de un amplio rango de magnitud. El análisis de la curva de fusión del producto, posibilita además la caracterización del fragmento amplificado por su temperatura de fusión (T_m).

Esta técnica ofrece una gran cantidad de aplicaciones al ser capaz de cuantificar de manera absoluta o relativa moléculas molde de DNA o RNA. De este modo, la RT-PCR cuantitativa se usa para determinar la carga vírica, el título de gérmenes y contaminantes en la comida, sangre u otro tipo de muestras, la expresión génica en distintos tejidos, tratamientos o estadios del desarrollo, la discriminación alélica, y la delección o el grado de amplificación de los genes. Además, la RT-PCR tiene aplicaciones clínicas muy importantes, como el diagnóstico de tumores, la respuesta a medicamentos en cánceres humanos y el perfil de citocinas en la respuesta inmune. También el genotipado de muestras se puede realizar a través de la cuantificación y diferenciación de alelos y la detección de polimorfismos, llegando incluso a detectar los SNP (polimorfismos mononucleotídicos, del inglés *single nucleotide polymorphism*). Por último, la validación de los resultados de experimentos con microordenamientos (*microarray*) de DNA se suele realizar mediante RT-PCR.

Para llevar a cabo estas aplicaciones se necesita un termociclador con capacidad para detectar y medir la fluorescencia. La exactitud y la precisión de los aparatos de RT-PCR se ven afectadas, en gran medida, por la razón señal:ruido, la cual depende del formato de detección (fluoróforos) y de la calidad del sistema óptico. Otro parámetro a tener en cuenta es la homogeneidad de la temperatura dentro del instrumento, ya que la menor desviación de la temperatura llevaría a una cuantificación errónea.

Existen además gran variedad de formatos de detección (figura 1). La señal fluorescente es proporcional a la cantidad de producto de la PCR y la generan los fluoróforos específicos de DNA bicatenario o las sondas fluorescente específicas de la secuencia.

El SYBR-Green I (figura 1a) es el fluoróforo específico de DNA bicatenario más usado en la RT-PCR. Este fluoróforo se une con gran afinidad al surco menor del DNA bicatenario, aumentando su fluorescencia unas 1000 veces. La detección con SYBR-Green I es tan sensible que llega a identificar la producción de una única molécula. Este formato de detección necesita una puesta a punto previa para que la PCR no amplifique productos inespecíficos

que luego el fluoróforo detectaría, introduciendo errores en el posterior análisis de los resultados.

Para detectar específicamente una secuencia se utilizan sondas de oligonucleotidos etiquetadas con fluoróforos. La intensidad de la señal se relaciona con la cantidad de producto de PCR de dos formas: a) una disminución del amortiguamiento de la fluorescencia dependiente de producto, en la que el fluoróforo (la molécula deladora) y el amortiguador (*quencher*) se separan al unirse la sonda a la diana (figura 1c, d, e, f); b) un incremento de la transferencia de energía resonante fluorescente (FRET) del donador al fluoróforo aceptor al quedar cercanos cuando se une la sonda a la diana (figura 1b).

El SYBR-Green I produce resultados muy precisos en la cuantificación del producto. Por otra parte, las sondas específicas de secuencia facilitan la identificación de mutaciones y permiten realizar múltiples experimentos simultáneamente al poder utilizar varias sondas con fluoróforos distintos a la vez.

Para el análisis cuantitativo del producto, se analiza la curva de amplificación, la cual está constituida por al menos tres fases distintas: 1) fase de latencia (*lag*) donde la acumulación de producto no se puede detectar, 2) fase exponencial y 3) fase de saturación.

El número de copias de la diana al inicio de la reacción se puede cuantificar con gran precisión a través del ciclo umbral (C_t). El C_t es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base, y es inversamente

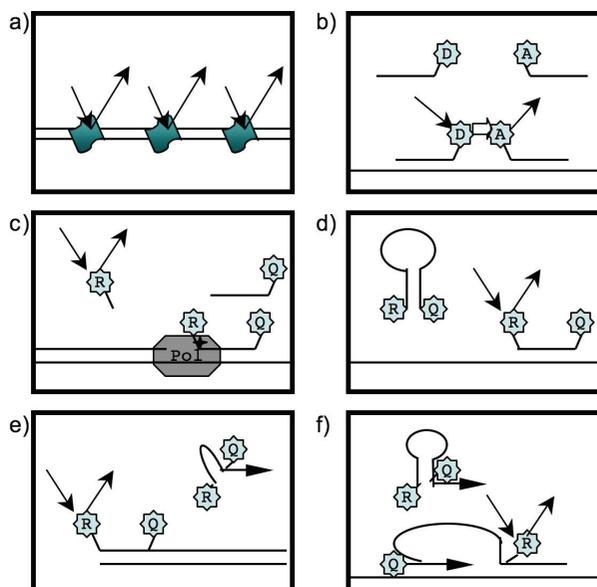


FIGURA 1: Formatos de detección. D, donador; A, aceptor; R, delador (fluoróforo); Q, amortiguador. a) SYBR-Green I; b) sondas de hibridación; c) sondas «taqman»; d) balizas moleculares; e) sondas «Sunrise»; f) sondas escorpión

proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde. De esta manera, utilizando muestras patrones que contienen diluciones seriadas de concentraciones conocidas de la diana, se construye una recta de calibración que relaciona los Ct con el logaritmo de la cantidad inicial de molde (N_0). Extrapolando en esta recta los Ct obtenidos para las muestras problema, se puede estimar el valor de sus N_0 .

La eficiencia de la reacción también se puede calcular a partir de los Ct de los patrones. Para lograr una cuantificación correcta, la eficiencia de patrones y muestras problema deben ser iguales, lo que implica una puesta a punto previa de la PCR.

En caso de conocer la concentración absoluta de moléculas de molde en los patrones, los resultados serán absolutos. Pero la cuantificación absoluta no siempre es necesaria. Para analizar cambios relativos en la cantidad de transcritos se elige como patrón un transcrito de referencia que no varíe su expresión en los tratamientos a analizar, normalmente un gen de mantenimiento (*housekeeping*). Comparando los Ct del gen de referencia con el gen problema en muestras tratadas y sin tratar, se pueden determinar cambios relativos en la expresión del gen problema.

Otro resultado a analizar es la curva de fusión del producto. Ésta se obtiene tras la amplificación y se produce como consecuencia del decaimiento de la señal fluorescente debido a la fusión dependiente de

temperatura del producto.

La curva de fusión se puede obtener con los fluoróforos con afinidad por el DNA bicatenario como el SYBR-Green I, y con sondas específicas de secuencia que no se hidrolizan durante la reacción ni queden integradas en el producto, como las balizas moleculares (*molecular beacons*) y las sondas de hibridación.

La derivada de la curva de fusión nos revela un pico máximo correspondiente a la temperatura de fusión del producto (T_m). El área bajo la curva de este pico es proporcional a la cantidad de producto. Cuando se utiliza el SYBR-Green I se puede confirmar la amplificación de la diana específica a través de este análisis, ya que cuando se obtienen varios productos se detectan varios picos con T_m y ABC diferentes. De este modo también, la utilización de este fluoróforo sirve para caracterizar el producto. Por otra parte, el uso de sondas específicas de secuencia nos revela una curva de fusión que sirve, principalmente, para genotipar y buscar los SNP, y para detectar mutaciones.

Por todo ello, la RT-PCR tiene aplicaciones en numerosos campos (medicina forense, diagnóstico clínico, control alimentario, análisis de organismos modificados genéticamente...) que continúan ampliándose. Esto, unido a la baja probabilidad de contaminación a la exactitud de los resultados y a la sencillez y rapidez del método, hace de la RT-PCR una técnica cada vez más utilizada en todos los laboratorios del mundo.

FACTORES QUE REGULAN EL DESARROLLO FOLICULAR II: FOLÍCULOS ANTRALES

José Antonio Velázquez Domínguez y Enrique Mendieta Márquez

Departamento de Ciencias de la Salud, Laboratorio de Biología Molecular y Fisiología Gonadal, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Iztapalapa.

Las etapas finales del desarrollo folicular se encuentran reguladas por factores de diversa naturaleza y origen los cuales, a través de la participación de múltiples sistemas de señalización autocrina, paracrina y endocrina, que involucran a todas las estirpes celulares que se encuentran en el folículo, son capaces de llevarlo a través de las etapas de maduración que culminan en la ovulación y su posterior luteinización.

I. Transición folículo secundario a terciario

Apartir de esta etapa, el folículo requerirá forzosamente del estímulo de la hormona estimulante del folículo (FSH) para proseguir la proliferación de las células de la granulosa (CG) y establecer, en éstas, una producción creciente de estrógenos. La acción inductiva de la FSH permitirá, posteriormente, facilitar la respuesta del folículo a la hormona luteinizante (LH) y a otros factores extracelulares [Hillier. *Mol. Cell. Endocrinol.* **179**: 39-46 (2001)].

Algunos productos génicos que aparecen en las CG presentes en los folículos secundarios como resultado de su estimulación por la FSH son, entre otros, el complejo

de la aromatasa, los receptores para FSH (FSHR), LH (LHR) y estrógenos (ER), productos polipeptídicos de la familia del factor de crecimiento y transformación- β , tales como el *GDF9*, las *inhibinas* y las *activinas*, así como la *folistatina*, una proteína que une a estas últimas con una elevada afinidad [Knight & Glistler. *Reproduction* **121**: 503-512 (2001)], además de los *factores de crecimiento semejantes a insulina (IGF)-I y -II* y las proteínas que lo unen (las *IGFBP*).

A través de mecanismos aún no comprendidos, que podrían involucrar diferencias en cuanto a la sensibilidad de cada folículo a la estimulación gonadotrópica así como su capacidad de producción temprana de estrógenos, se seleccionará uno o a lo sumo un pequeño número de folículos (dominancia folicular) y podrá continuar su desarrollo hasta alcanzar la fase ovulatoria, mientras que los demás folículos (folículos subordinados) detendrán su crecimiento y estarán destinados a sufrir atresia.

Una vez que las CG hayan expresado los FSHR, su proliferación y diferenciación estarán reguladas principalmente por esta gonadotropina, pero dependerán