



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

APLICACIONES DEL PCR EN PATOLOGÍA

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N O D E N T I S T A

P R E S E N T A:

MARIO FERNANDO CASTILLO LÓPEZ

TUTORA: Esp. ROSA ISELA LUPERCIO LUNA

MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS.

A mi mamá: Gracias porque eres mi amiga, ríes conmigo, lloras conmigo y me perdonas los defectos y negligencias. Por decirme que hay que pensar antes de actuar. Por tus sinceras frases reconfortantes que me llegan justo cuando las necesito. Me animas a intentarlo de nuevo sin caer vencido ante el fracaso. Por no hacer por mí cosas que puedo hacer por mí mismo. Me haces saber que no importa lo que piensen los demás, sino lo que piense yo. Me haces saber con prudencia y amor, que no debo volver a hacer eso nunca más. Me has enseñado que la satisfacción se encuentra en mis propios progresos y no en las apreciaciones de los demás. Llevas y haces con cariño tus responsabilidades de mamá. Contigo he aprendido a apreciar todo lo que nos ofrece la vida y lo mejor de todo siempre tienes tiempo para mí.

A mi Papa: Ahora que no estas más junto a mi cada día me haces falta, me enseñaste a vencer los obstáculos por muy duros que fueran, recuerdo todos los sacrificios que hacías por mí, me dabas todo para que no me faltara nada siempre le doy gracias a dios por haberte tenido conmigo, eres mi guía me brindaste siempre tu compañía me aplaudiste cuando la victoria fue mía siempre te estaré agradecido no solo por darme la vida si no por ser mi mano amiga donde quiera que te encuentres cuidáanos mucho, siempre te llevare en mi corazón.

A mi gusanito: Por ti conocí la dicha esa primera emoción, te cuidé con devoción. Crecí de golpe comencé a soñar en convertirte en un hombre útil a la sociedad. Sufrí largas horas para verte al fin nacer, horas largas, dolorosas pero al final grité de alegría cuando al fin te pude ver ¡Fue hermoso lo que pasé! gracias por tener paciencia y brindarme un tiempo que era solo para ti, eres un tesoro que llevo dentro de mi cuidándote a cada instante te amo y te quiero mucho mi dieguito.

A mi hermana: Siempre pensé que nuestra amistad sería especial, que sería capaz de sobrepasar las barreras, que veríamos pasar días inmensos juntos, sé que en ti encontré alguien en quien confiar. Supe que ambos teníamos que enseñarnos que la vida nos tenía sorpresas preparadas para el futuro. Cosas buenas y malas; la mayoría de las veces las cosas malas nos enseñarían a no equivocarnos de nuevo. Te agradezco que hayas confiado en mí en todo momento quiero que sepas que cuentas conmigo y si algún día tienes algún problema o temor juntos busquemos la solución te quiero.

A Brenda: quiero agradecerte por todo el apoyo que me has brindado A través de nuestra vida juntos, han habido tantos logros, satisfacciones y hechos inolvidables, que han minimizado las cosas difíciles porque siempre juntos hemos recogido los pedazos de sueños rotos para crear nuevos. Te amo por tu paciencia, por tu comprensión, Quiero aprender a llamarte cuando te necesito, llorar junto a ti sin esconderme cuando me sienta abatido y compartirme mis miedos cuando no me crea capaz. Quiero hacer de la rutina una aventura distinta, un instante mágico donde poder recrear nuestros sueños. Te amo.

Gracias a todas las personas que me apoyaron en este trabajo, a mi asesora, por guiarme por la ruta correcta a todos mis profesores por haberme compartido sus conocimientos, a todos mis amigos que me brindaron su apoyo y que en las buenas y en las malas siempre estamos juntos y a todos los que me faltaron, sin olvidarme de mi maravillosa Universidad ya que soy orgullosamente UNAM, por haberme abierto sus puertas para lograr una de mis metas en la vida, pero principalmente quiero agradecerle a dios por haberme permitido seguir adelante y ayudarme a superar todos esos obstáculos que se presentaron en el camino. ¡Gracias!

INDICE.

1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. OBJETIVO.....	5
3. ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	7
4. DEFINICIÓN.....	13
5. DESCUBRIDORES.....	15
6. SISTEMATIZACIÓN DE LA PCR.....	18
7. METODOLOGÍA BÁSICA.....	23
8. COMPONENTES DE LA PCR.....	24
9. METODOLOGÍA DESARROLLADA DE LA PCR.....	30
10. OPCIONES DE PCR.....	38
11. VARIACIONES DE LA PCR BÁSICA.....	58

12. APLICACIONES Y USOS DE LA PCR.....	60
13. SINDROMES DETECTADOS POR PCR.....	96
14. CONCLUSIONES.....	97
15. BIBLIOGRAFÍA Y HEMEROGRAFÍA.....	98



1. INTRODUCCIÓN.

Muchas de las técnicas clásicas de la Ingeniería genética estaban encaminadas a resolver problemas de cómo clonar o localizar un gen o segmento de ADN. Algunas de estas técnicas requieren de mucho tiempo y suelen ser tediosas y a veces suelen no arrojar buenos resultados.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido una nueva herramienta en la ingeniería genética y biología molecular. Fue inventada por Kary Mullis a mediados de los 80's.

La PCR en un principio nos permite producir in vitro grandes cantidades de una secuencia de ADN específica sin recurrir a la clonación en un organismo huésped. Esencialmente la técnica permite la amplificación selectiva de cualquier segmento de ADN.

Ésta técnica puede ser un sistema que nos permite obtener en poco tiempo millones de copias de una secuencia blanco de ADN. La reacción se lleva a cabo dentro de un tubo de ensayo y comprende varios ciclos, que incluyen a su vez varios pasos.

La mezcla de la reacción consta de una pequeña muestra de ADN que se utiliza como molde y que se obtienen a partir de tejido fresco o aun de aquel que ha estado embebido en parafina. En adición, se necesitan oligonucleótidos que actúan como cebadores, ADN polimerasa termoestable, desoxirribonucleótidos que se utilizan como sustrato para copiar las cadenas nuevas a partir del molde y un amortiguador que se encarga de estabilizar la reacción.



Las aplicaciones de la PCR y sus grandes variantes pueden ser utilizadas en varios experimentos de ingeniería genética, nos permite realizar muchos estudios de expresión genética, así como en la detección de mutaciones.

Otras aplicaciones de la reacción en cadena de la polimerasa es el seguimiento de la efectividad de tratamiento de enfermedades, puede ser un auxiliar para diagnosticar enfermedades genéticas infecciosas.

En ciencias forenses ha sido de gran utilidad para la identificación de restos biológicos así como la determinación de paternidad y pruebas periciales en criminalística.

Como se mencionó anteriormente sus aplicaciones pueden ser ilimitadas ya que en arqueología, paleontología y agricultura también recurren a esta técnica.

2.OBJETIVO.

El objetivo de este trabajo es conocer el Método de elaboración del PCR así como los usos y aplicaciones en Patología General.



3. ANTECEDENTES HISTORICOS.

En 1971, un artículo publicado por Kleppe et al. *Journal of Molecular Biology* describió por primera vez un método que usaba enzimas para replicar una secuencia pequeña de ADN con cebadores in vitro. Sin embargo, este temprano ejemplo del principio básico de la PCR no recibió mucha atención, y la invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en 1983 es generalmente atribuida a Kary Mullis. ^{1,2}

Algo muy a tener en cuenta en la PCR es que la ADN polimerasa que se use sea capaz de soportar las altas temperaturas de $>90\text{ }^{\circ}\text{C}$ necesarias para la separación de las dos hebras de ADN de la doble hélice tras cada ciclo de replicación. Las ADN polimerasas que se utilizaron originariamente para los experimentos in vitro previos a la PCR no eran capaces de soportar estas altas temperaturas, por lo que los primeros procedimientos para replicar el ADN eran muy ineficientes, largos y requerían grandes cantidades de ADN polimerasa.²

El descubrimiento en 1976 de la polimerasa Taq, una polimerasa de ADN extraída de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* que habita medios de muy alta temperatura ($50\text{-}80\text{ }^{\circ}\text{C}$), eliminó los grandes inconvenientes del método de la PCR. Esta ADN polimerasa es estable a altas temperaturas, permaneciendo activa hasta después de la desnaturalización del ADN, eliminando la necesidad de añadir a la reacción nueva polimerasa tras cada ciclo. Este descubrimiento permitió automatizar el proceso, antes tan tedioso, acoplándolo al uso del termociclador.²

Al mismo tiempo que desarrollaba la PCR en 1983, Mullis trabajaba en Emeryville, California (EE UU), para una de las primeras empresas biotecnológicas, Cetus Corporation, donde era responsable de sintetizar cadenas cortas de ADN. Mullis afirma que concibió la idea para la PCR una noche mientras cruzaba la Autopista de la Costa Pacífica (EE UU) en su coche. Estaba imaginando una nueva forma de analizar mutaciones en el ADN cuando se percató de que, en lugar de eso,



había inventado un método para amplificar regiones específicas de ADN mediante ciclos de duplicación repetidos usando ADN polimerasas. Mullis atribuye la invención de esta técnica a los efectos de la droga psicodélica y alucinógena LSD.³

En la revista *Scientific American*, Mullis resumió el procedimiento: "Comenzando con una única molécula del material genético ADN, la PCR puede generar 100 billones de moléculas iguales en una tarde. La reacción es fácil de hacer, no requiere más que un tubo de pruebas, unos pocos reactivos simples y una fuente de calor." Fue premiado con el Premio Nobel de Química en 1993 por su invención, y siete años después, él y sus colegas del Cetus llevaron a la práctica su propuesta. Sin embargo, han aparecido controversias y diferentes versiones sobre las contribuciones intelectuales y prácticas de otros científicos al trabajo de Mullis, y sobre si él fue el inventor único del principio de la PCR.⁴

Poco después de su descubrimiento del método de PCR fue refinado de varias maneras. Una de las primeras modificaciones del protocolo inicial se refería a las polimerasas utilizadas. Al igual que todas las enzimas, las polimerasas funcionan mejor a la temperatura corporal del organismo del que son originario s (37 ° C) en el caso de la polimerasa aislada de los seres humanos.

Por debajo de esta temperatura la actividad de la enzima disminuye considerablemente, por encima de esta temperatura, es rápidamente destruido. En la PCR, sin embargo, las dos cadenas de la molécula de ADN deben ser separados con el fin de permitir que los cebadores para templar a los mismos. Esto se hace aumentando la temperatura a alrededor de 95°. A esas temperaturas las polimerasas de la mayoría de los organismos están permanentemente destruidas. Como resultado de ello, una nueva enzima tuvo que ser añadido en la primera etapa de reacción de cada ciclo, una propuesta larga y costosa. Se encontró una solución en manantiales calientes. Ciertos microorganismos prosperan en piscinas calientes en las condiciones más



inhóspitas, a temperaturas que pueden alcanzar los 100 ° C y en algunos casos en presencia de sal o ácido en extremas concentraciones. Las polimerasas de estos organismos se adaptan a las altas temperaturas y por lo tanto son ideales para su uso en PCR. Hoy las polimerasas utilizadas en casi todos los métodos de PCR del mundo se derivan de dichos microorganismos.⁵

Estas bacterias prominentes tienen el nombre de *Thermus aquaticus*, y su calor estable- polimerasa, denominada Taq polimerasa, apoyando toda una industria. El organismo fue originalmente descubierto a 70 ° C cerca de la primavera en el géiser en Yellowstone una Gran Fuente en el Parque Nacional de los Estados Unidos. Los empleados de Cetus, en los que Kary Mullis trabajaba para ellos en el momento de su descubrimiento, aislaron las primeras muestras de la fuente termal y luego las cultivaron en el laboratorio en cepas bacterianas más útiles conocidas hoy en día. *Thermus aquaticus* se ha encontrado en aguas termales similares en todo el mundo.⁶

La introducción de la Taq polimerasa sin duda no ha sido la única modificación del método del PCR. A ello contribuyó el hecho de que Mullis publicó su descubrimiento relativamente pronto. Ciencia y la naturaleza, los dos revistas científicas de prestigio, no reconocieron la importancia del PCR y rechazaron el artículo que describe el método. No obstante, a pesar de la protección de patentes a nivel mundial, el uso de la técnica de PCR sigue siendo libre y sin restricciones para los investigadores básicos, gracias a Roche, que posee los derechos del método. En 1991 Roche obtuvo una licencia exclusiva de Cetus antiguo empleador de Mullis por 300 millones de dólares. Científicos de todo el mundo han modificado el método de PCR en muchos aspectos y adaptada para la rutina, pruebas de diagnóstico y la investigación molecular. Al mismo tiempo, están surgiendo nuevas y más aplicaciones.^{6,7}



El desarrollo de la PCR a menudo ha sido comparado con el desarrollo de la Internet, y aunque esto se arriesga a exagerar el impacto de la PCR fuera de la comunidad científica, la comparación funciona bien en una serie de niveles. Ambos inventos han surgido en los últimos 20 años hasta el punto de que es difícil imaginar la vida sin ellos. Ambos han crecido mucho más allá de los confines de su sencillo diseño original y han creado oportunidades inimaginables antes de su invención. Ambos también han generado todo un nuevo vocabulario y los profesionales de leer y escribir en ese vocabulario. Es difícil de creer que la técnica que forma la piedra angular del proyecto del genoma humano y es fundamental para muchos protocolos de laboratorio de biología molecular se descubrió hace 20 años. Para muchos, la historia y algunas de las controversias duraderas son desconocidas, sin embargo, al igual que con el descubrimiento de la estructura del ADN en la década de 1950, el descubrimiento de la PCR es el tema de la demanda y la reconvención que aún no se ha resuelto por completo.⁸

El concepto original de PCR, como muchas buenas ideas, era una amalgama de varios componentes que ya existían: La síntesis de los tramos cortos de una sola cadena de ADN (oligonucleótidos) y el uso de estos para dirigir la síntesis de objetivos específicos de las nuevas copias de ADN utilizando ADN polimerasas y a las herramientas estándar en el repertorio de los biólogos moleculares de la época. La novedad en el concepto de Mullis fue con la yuxtaposición de dos oligonucleótidos, complementarios a cadenas opuestas del ADN, para amplificar específicamente la región entre ellos y para lograr esto de una manera repetitiva para que el producto de una ronda de actividad de la polimerasa se añadió a la del conjunto de la plantilla de la próxima ronda, por lo tanto, la reacción en cadena.

De hecho, aunque Mullis se le atribuye la invención original de PCR, la aplicación exitosa de la PCR como la conocemos hoy en día requiere un desarrollo considerable aún por sus colegas de Cetus Corporation, incluyendo sus colegas



en el laboratorio de Henry Erlich, y el aislamiento oportuno de una enzima polimerasa termoestable de una bacteria termófila aisladas de aguas termales. Por otra parte, la impugnación de las patentes de PCR en manos de Hoffman, La Roche han cobrado al menos una incidencia del "estado de la técnica", es decir, que la invención original de PCR fue conocido antes del trabajo de Mullis a mediados de la década de 1980. Este desafío se basa en estudios preliminares por Khorana et al. a finales de 1960 y principios de 1970.

La ADN polimerasa utilizada originalmente para la PCR fue extraída de la bacteria *Escherichia coli*. Esta enzima ha sido un instrumento valioso para una amplia gama de aplicaciones ya que ha permitido la explosión de las tecnologías de secuenciación de ADN en la década anterior, había claras desventajas en la PCR. La reacción debería ser calentada para desnaturalizar el producto de ADN de doble cadena después de cada ronda de síntesis. Por desgracia, el aumento de la temperatura también irreversiblemente inactiva al *E. Coli*. Y las proporciones de ADN polimerasa, por lo tanto, tuvo que ser añadida a mano al inicio de cada ciclo. Lo que se requería era una ADN polimerasa que se mantuviera estable durante el paso de desnaturalización del ADN en torno a 95 ° C. La solución se encontró cuando el *Aquaticus bacteria thermophilus* fue aislado de aguas termales, donde sobrevivieron y proliferaron a temperaturas extremadamente altas, y produjo una ADN polimerasa que no se inactiva rápidamente a altas temperaturas. Gelfand y sus asociados en Cetus purificaron y posteriormente clonaron esta polimerasa, lo que permite una completa amplificación por PCR, sin necesidad de abrir el tubo de reacción. Además, debido a que la enzima fue aislado de un organismo termófilo, que funcionó de manera óptima a temperaturas de alrededor de 72 ° C, lo que permite el paso de la síntesis de ADN que se realiza a temperaturas más altas que era posible con la enzima de *E. Coli*, que aseguró que la plantilla hebra de ADN se pudo copiar con mayor fidelidad, resultado de un mayor rigor de la unión de imprimación, es decir preparar la superficie para la eliminación de los productos no específicos que habían plagado a los primeros intentos de amplificación por PCR.



Sin embargo, incluso con esta mejora, la técnica de PCR fue laboriosa y lenta, ya que requiere la transferencia manual entre baños de agua a diferentes temperaturas. La máquina de ciclo térmico en primer lugar, "Ciclo señor", que replica los cambios de temperatura necesarios para la reacción de PCR sin la necesidad de transferencia manual, fue desarrollado por Cetus para facilitar la incorporación de nuevas polimerasas termolábiles. Después de la purificación de la polimerasa Taq, y Perkin Elmer Cetus a introducir el ADN cicladores térmicos cerrados que son ampliamente utilizados en la actualidad. El PCR se ha convertido en una de las herramientas más utilizadas en la biología molecular.

En 1990, la biología se enfrentó a una dominante preocupación: la desintegración del genoma. Gracias a enormes esfuerzos técnicos y de organización, primero en virus y bacterias, y luego las levaduras, plantas y animales exponiendo los secretos de su material genético. Este logro hubiera sido impensable sin la PCR, hecho que hizo posible la elaboración de grandes cantidades de ADN dentro de un corto tiempo. La clonación simple de ADN tiene por lo tanto, uno de los usos principales del método. Así, en la PCR se usa siempre la exacta secuencia de bloques de construcción del ADN, se debe determinar, por ejemplo: secuenciación del genoma, en la investigación genética, en la investigación de los cambios genómicos, en la búsqueda de objetivos, entre otros. Un tema importante en el campo de la genómica son: SNPs (pronunciado "snips" que son Polimorfismos de Nucleótido Simple), solo cambios de nucleótidos en el genoma que parecen dar cuenta de una gran proporción de las diferencias genéticas entre los individuos. Entre otras cosas, los SNPs son responsables de la susceptibilidad a enfermedades y las diferencias en la manera como los pacientes responden a los fármacos. Para detectar este tipo de variaciones hereditarias, los científicos a menudo amplían la secuencia del genoma de diferentes personas en paralelo. Los genes con SNP son también objetivos potenciales para nuevas drogas. PCR por lo tanto juega un papel clave en esta importante área de investigación de medicamentos.⁹



Los enormes progresos en nuestra comprensión del genoma humano (y de muchas otras especies), no habría sido posible, si no fuera por la notable técnica simple y adaptable, pero delicada PCR.

4. DEFINICION.

PCR, Siglas provenientes del Inglés Polymerase Chain Reaction.

Esta técnica tiene como finalidad aislar y amplificar un determinado fragmento de DNA a partir de una mezcla compleja de secuencias de DNA. Se basa en la amplificación de esas secuencias por medio de una enzima polimerasa que es estable en condiciones de temperaturas tan altas como para desnaturalizar DNA.¹⁰

Uno de los aportes fundamentales de esta metodología a la investigación básica en biología molecular consiste, precisamente en la rapidez y eficiencia mediante las cuales se realiza una tarea que antes requería largas y tediosas jornadas. El producto que se obtiene al finalizar la reacción una gran cantidad de un fragmento génico con alto grado de pureza, favoreciendo la tarea de los investigadores empeñados en ampliar nuestros conocimientos sobre la estructura y función de los genes. Por su alta sensibilidad, esta técnica permite identificar un gen a partir de un solo cabello, una célula somática o un espermatozoide.¹¹

Los genes son porciones de ácido desoxirribonucleico (ADN) que tienen la información de los ácidos ribonucleicos (ARN) y, en última instancia, a través de éstos, de las proteínas; el ARN copia el mensaje contenido en el ADN y a partir de él da lugar a la correcta formación de la cadena o secuencia de aminoácidos que constituyen las proteínas.¹¹

Todos los genes están compuestos por la misma materia prima, una sucesión de nucleótidos, Cada nucleótido está formado por un grupo fosfato, un azúcar con cinco carbonos (la desoxirribosa) y una de las siguientes bases nitrogenadas: adenina, timina, guanina o citosina. Los genes no se distinguen unos de otros por



tener una composición fisicoquímica muy diferentes, sino por el orden o secuencia en la que estas cuatro bases se disponen a lo largo de la molécula de ADN.¹¹

El hecho de que los genes no se distinguen por su composición fisicoquímica hace prácticamente imposible aislarlos mediante el empleo de métodos bioquímicos de fraccionamiento del tipo de los usados para purificar proteínas como son, por ejemplo la cromatografía, la electroforesis o la ultra centrifugación.¹¹

Por otra parte, cada gen es una unidad de información sin solución de continuidad respecto del resto del ADN en el que está inmerso. Esto significa que a todo gen lo preceden y suceden otras secuencias de ADN que, en general no tienen relación con él.¹¹

Hasta mediados de la década de los ochenta la única estrategia posible para aislar un gen y obtener grandes cantidades del mismo en estado puro era el “clonado molecular”. Este método se basa en la introducción de fragmentos de ADN uno de los cuales contendrá el gen de interés en vectores. Estos son moléculas de ADN (plásmidos o ADN de bacteriófagos) capaces tanto de transportar fragmentos ajenos a su estructura original como de multiplicarlos dentro de bacterias.^{12,13,14}

Si se conoce un pequeño tramo de la secuencia de aminoácidos de una proteína cuyo gen se desea clonar (multiplicar), se pueden diseñar métodos para identificar qué bacterias llevan el vector que transporta dicho gen. Este reconocimiento también se puede realizar si se dispone de un anticuerpo contra la proteína resultante del gen que se desea clonar. En este caso se reconoce la bacteria portadora por que fabrica la proteína codificada por el fragmento de interés, la cual se une específicamente al anticuerpo.¹⁵

Una vez aislado el gen no solo resulta posible determinar con exactitud su secuencia de bases o analizar en detalle la información de la que es portador, sino que también se puede estudiar su expresión (la manera en que dirige la síntesis



de la proteína correspondiente) en distintos organismos y tipos celulares, introducido en células en cultivo o en animales de experimentación.

Estas técnicas ya clásicas, han permitido el aislamiento y caracterización de decenas de miles de genes de microorganismos, animales y plantas, lo que provocó un cambio cualitativo en la comprensión del funcionamiento de la célula.^{16,17}

5. DESCUBRIDORES.

Hace cerca de 28 años hizo su aparición la PCR. Hacia 1983, esa inquietud llevó a Kary Mullis, en ese entonces investigador de la Cetus Corporation de Emeryville, California, a desarrollar un método simple para la obtención un número ilimitado de copias de una secuencia específica de ADN en un tubo de ensayo. Su objetivo consistía en analizar una mutación responsable de una enfermedad genética humana, para lo cual trabajaba en la síntesis de las sondas oligonucleótido que se requerían. Con base en los experimentos llevados a cabo en 1971 por Kleppe et al, quienes desarrollaron el primer sistema artificial de replicación con dos cebadores del que se tiene noticia, la idea de Mullis giraba en torno a descubrir cómo iniciar y además detener la acción de una enzima de tipo polimerasa sobre puntos específicos de una sola de las cadenas del ADN, con el objetivo de amplificar el ADN blanco en forma exponencial. Entonces, mediante la utilización de dos cebadores, Mullis consiguió que, después de aplicar en forma repetida la polimerasa, se generara una reacción de replicación en cadena que amplificó el segmento genómico de su interés.¹⁸

Sin embargo, cuando quiso mostrar los resultados de la amplificación, éstos no se pudieron visualizar en el gel de agarosa, lo que lo llevó a pensar que la reacción



en cadena no mostraba especificidad por la región amplificada. Sin embargo, más adelante, estas dudas se aclararon en forma satisfactoria, cuando los productos de la amplificación pudieron ser visualizados con la técnica Southern Blot. La visualización de la señal fue la evidencia de la efectividad de la reacción en cadena de la polimerasa, pues se comprobó que ésta era capaz de amplificar el ADN de interés en forma específica. Estos resultados sirvieron además para optimizar las condiciones experimentales de la reacción. Desde comienzos de 1980, el ensayo Southern Blot (llamado así en honor de su inventor Edwin Southern) adquirió mucha popularidad en el ámbito del diagnóstico molecular, gracias a su aplicación para descubrir secuencias génicas específicas y mutaciones responsables de enfermedades genéticas, así como de ciertos agentes infecciosos (*Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoea*).¹⁹

La ejecución de este ensayo implica seccionar el ADN en fragmentos que contengan la secuencia o la mutación de interés, para lo cual se utilizan enzimas de restricción. Mediante electroforesis en un gel de agarosa, los fragmentos se separan por tamaño y se transfieren a una membrana de nylon o de nitrocelulosa, con la finalidad de obtener una réplica del gel.

A continuación la membrana se incuba con el gen clonado o con una sonda oligonucleótido complementaria, de manera que se produce la hibridación de los fragmentos de ADN que contienen la secuencia genómica analizada.²⁰

Es así como K. Mullis en 1985, un investigador de la Corporación Cetus, inventó un método para lograr la multiplicación in vitro de fragmentos definidos de ADN sin necesidad de recurrir a los vectores y su replicación en bacterias. Este método revolucionaría en corto tiempo el conjunto de técnicas de la biología molecular. Su uso se extendió rápidamente a miles de laboratorios, no sólo de investigación básica, sino también de diagnóstico clínico.



Cuando el proceso era manual, la técnica de PCR era lenta y requería de trabajo intensivo. Por lo tanto, los científicos de Cetus comenzaron a buscar las maneras de automatizar el proceso.

La purificación de la polimerasa de Taq dio lugar a la necesidad de una máquina que realizara un ciclo más rápidamente entre diversas temperaturas. En 1985, Cetus se asoció con la corporación Perkin-Elmer e introdujo la DNA Thermal Cycle. De esta manera es posible mezclar todos los componentes de la PCR al comenzar el primer ciclo y la reacción en cadena puede llevarse a cabo mediante equipos automatizados que realizarán los ciclos térmicos programados.²¹

En 1989, Cetus anunció un acuerdo de colaborar con Hoffman-LaRoche en el desarrollo y la comercialización de productos de diagnóstico humanos in vitro y de servicios basados en tecnología de PCR.

En 1990, los científicos alcanzan la primera amplificación y detección simultánea de las secuencias específicas de DNA usando un colorante fluorescente, poniendo el fundamento para la PCR en tiempo real o PCR "cinético" (pruebas TaqMan).

En 1991 Hoffmann-La Roche Inc. adquiere los derechos y las patentes mundiales de la PCR.

El Dr. Kary Mullis gana el premio Nobel de Química en 1993 por inventar la tecnología de PCR. (Fig. 1)²²



Fig. 1 KARY MULLIS

6. SISTEMATIZACIÓN DE LA PCR.

En la actualidad todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. Un termociclador, también conocido como máquina de PCR o reciclador térmico de PCR es un aparato usado en Biología Molecular que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para una reacción en cadena de la polimerasa de amplificación de ADN o para reacciones de secuencia con el método de Sanger.

El modelo más común consiste en un bloque de resistencia eléctrica que distribuye a través de una placa una temperatura homogénea durante tiempos que pueden ser programables, normalmente con rangos de temperatura de 4 °C a 96 °C. Dado que las reacciones incubadas en el aparato son en soluciones acuosas, suelen incluir una tapa de placa calentada constantemente a 103 °C para evitar la condensación de agua en las tapas de los tubos donde ocurre la reacción, y así evitar que los solutos se concentren, lo que modificaría las condiciones óptimas para la enzima polimerizante y la termodinámica del apareamiento de los

iniciadores. También existen otras tecnologías menos populares utilizando distribución de aire caliente en tubos suspendidos, logrando el mismo objetivo de transferir calor eficientemente a la reacción para que cambien los ciclos de temperaturas.²²



Fig. 2: Termociclador: en él se efectúa la PCR convencional.²²

Desde hace algunos años varias compañías que fabrican y comercializan estos aparatos han cambiado la resistencia eléctrica por la tecnología Peltier aprovechando las propiedades de los semiconductores. Este material ofrece mejor uniformidad en la temperatura y rampas de incremento y decremento de la temperatura mucho más pronunciadas, obteniendo mejores resultados en los procesos del PCR. En la búsqueda de mejorar la precisión, exactitud y homogeneidad de la temperatura también se han introducido metales como el oro,

la plata y otras aleaciones en los bloques de los pozos, logrando estabilidad y reproducibilidad en los ensayos.

Muchos termocicladores modernos hacen uso del efecto Peltier, que permite tanto calentar como enfriar los tubos simplemente invirtiendo la corriente eléctrica. El efecto Peltier es una propiedad termoeléctrica descubierta en 1834 por Jean Peltier, trece años después del descubrimiento del mismo fenómeno, de forma independiente, por Seebeck. El efecto Peltier hace referencia a la creación de una diferencia de temperatura debida a un voltaje eléctrico. Sucede cuando una corriente se hace pasar por dos metales o semiconductores conectados por dos “junturas de Peltier”. La corriente propicia una transferencia de calor de una juntura a la otra: una se enfría en tanto que otra se calienta.

Una manera para entender cómo es que este efecto enfría una juntura es notar que cuando los electrones fluyen de una región de alta densidad a una de baja densidad, se expanden (de la manera en que lo hace un gas ideal) y se enfría la región.

Cuando una corriente I se hace pasar por el circuito, el calor se genera en la juntura superior (T_2) y es absorbido en la juntura inferior (T_1).

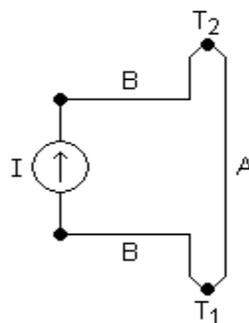


Fig. 3: Circuito que muestra el efecto Peltier.



Las características ideales u óptimas que debe tener un termociclador son las siguientes:

- Debe de Contar con un bloque térmico, cuyo calentamiento y enfriamiento se produce a gran velocidad, gracias al denominado sistema Peltier. Las rampas de subida y bajada de temperatura son importantes para trasladar los protocolos entre termocicladores, y uno de los factores de falta de reproducibilidad, lo que hace que deban ajustarse de nuevo a las condiciones de tiempos y temperaturas.
- Tres formas de analizar los fragmentos de ADN amplificados mediante la técnica PCR.
- Actualmente, están diseñados mayoritariamente para tubos de 0,2 ml aunque aún existen también para 0,5 ml. Es importante el perfecto ajuste del tubo en el bloque. Por ello, se recomienda utilizar los de la misma marca que el fabricante.
- El rango de temperaturas suele abarcar de 4°C a 110°C, aunque el rango habitual debe ser de 15°C a 95°C. No debe sobrecargarse al aparato con temperaturas extremas para prolongar su supervivencia. Los 4°C se utilizan para refrigerar muestras tras una PCR, pero 15°C también es una temperatura apta para ello. Respecto a llegar a 100°C o más, tampoco es aconsejable, al menos, de forma habitual. Es preferible emplear termo bloques para llevar a cabo esta labor.
- Existen bloques que permiten ajustar distintas temperaturas en función de las zonas del mismo. Se dice que tienen función gradiente. Son muy útiles cuando se realiza ajuste continuo de programas de PCR, especialmente de

temperaturas de hibridación, o cuando se necesitan realizar diversos protocolos de forma simultánea.

- Tapa térmica: los más antiguos no la poseen, pero es un elemento indispensable para evitar la evaporación de la muestra, al contactar totalmente con la tapa del tubo.
- Software para programación de tiempos y temperaturas: se denomina programa a cada conjunto de datos térmicos y temporales de un protocolo de PCR. Cada termociclador tiene su propio software. Puede ajustarse también la velocidad de subida y bajada de temperaturas, es decir, las rampas.

Los tubos usados para PCR tienen una pared muy fina, lo que favorece una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio térmico. Casi todos los termocicladores tienen un sistema que calienta la tapa de cierre con el fin de evitar la condensación sobre los tubos de reacción. (Fig.3)

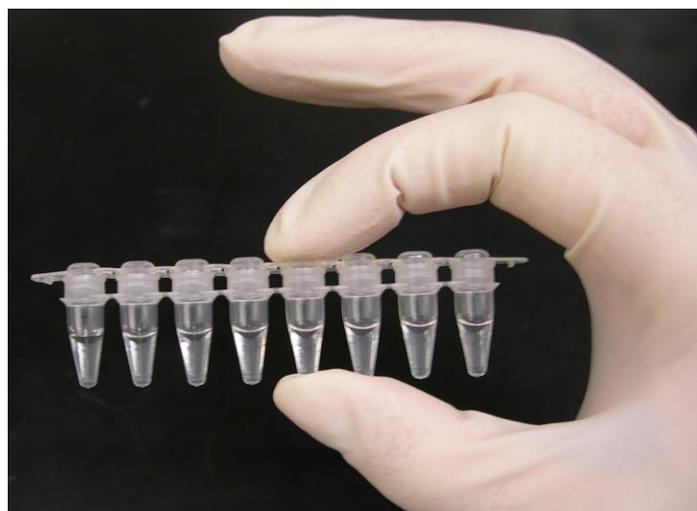
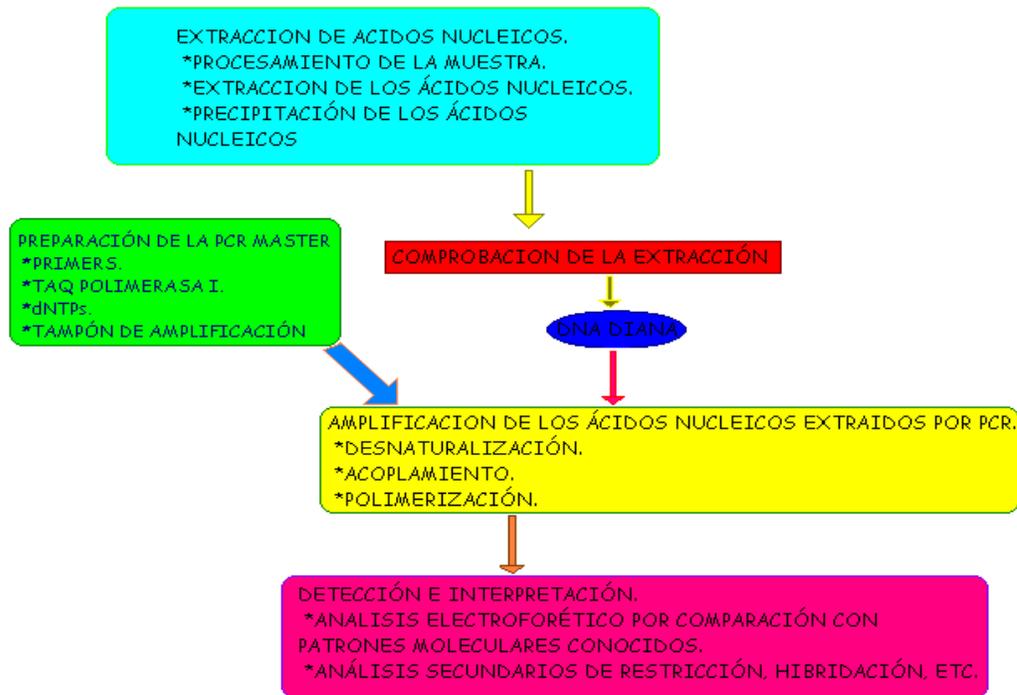


Fig. 3 Tubos que albergan mezclas de un volumen total de 100 μ l utilizados en la PCR.

7. METODOLOGÍA BÁSICA.



7.1 Reactivos a utilizar.

Para realizar la técnica se necesitan:

- Los 4 desoxirribonucleósidos-trifosfato (dNTP), sustratos para polimerizar nuevo ADN.
- Dos cebadores o iniciadores (*primers*), oligonucleótidos que son, cada uno, complementarios a una de las dos hebras del ADN. Son secuencias cortas, de entre seis y cuarenta nucleótidos, normalmente de 18 a 22, que permiten que la polimerasa inicie la reacción. Deben estar situados enfrentados y a no mucha distancia. Delimitan la zona de ADN a amplificar, es decir,



corresponden a los nucleótidos que definen los extremos de la secuencia que se desea replicar.

- Iones divalentes. Se suele usar magnesio (Mg^{2+}), agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$), o algún otro catión divalente. También se puede emplear manganeso (Mn^{2+}), para mutagenesis de ADN mediante PCR, ya que altas concentraciones de Mn^{2+} incrementan la tasa de error durante la síntesis de ADN. Actúan como cofactores de la polimerasa.
- Iones monovalentes, como el potasio.
- Una solución tampón (buffer) que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
- ADN polimerasa o mezcla de distintas polimerasas con temperatura óptima alrededor de 70 °C (la más común es la polimerasa Taq).
- ADN molde, que contiene la región de ADN que se va a amplificar.
- Termociclador, el aparato que va a mantener la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo. ²¹

8. COMPONENTES DE LA PCR.

8.1 Nucleótidos.

Los nucleótidos se diluyen en agua, la solución debe ser protegida (por ejemplo con el 10mM Tris pH 7,7-8,0, concentración final). Si no, un pH ácido promoverá la hidrólisis del dNTP en dNDP y dNMP y los hará inútiles para las reacciones de polimerización de la DNA enzimática. Los stocks son diluidos a 10 mM, alicuotados y almacenados a -20 °C.



Es recomendado usar un stock de trabajo que contenga 1mM de cada dNTP. La estabilidad de los dNTP durante ciclos repetidos de PCR es tal que aproximadamente el 50% permanece como dNTP después de 50 ciclos.

Concentraciones entre 20 y 200 μ M resultan en un balance óptimo entre rendimiento, especificidad y fidelidad. Los cuatro dNTP deben ser usados en concentraciones equivalentes para minimizar errores de incorporación de bases. Se debe decidir la más baja concentración adecuada de dNTP para la longitud y composición de la secuencia blanco. Por ejemplo, 20 μ M de cada dNTP en una reacción de 100 μ l es suficiente para sintetizar 2.6 μ g de DNA o 100 pM de una secuencia de 400 bp.

8.2 Primers.

Los oligonucleótidos iniciadores o primers son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del templado de ADN.

La selección de oligonucleótidos iniciadores es muy importante en la PCR de la polimerasa. De este paso depende el éxito en el laboratorio.

En la siguiente tabla (tabla1) se muestran los criterios principales a considerar para la selección adecuada de los primers.

TAMAÑO	Tamaño ideal: 20-25 nucleótidos de longitud generalmente: 18-30 nucleótidos de longitud.
BASE EN EL EXTREMO 3´	Debe ser una G o una C
TEMPERATURAS DE FUSIÓN (tm)	50-65 °C
CONTENIDO GC	40-60%



AUTO-COMPLEMENTARIEDAD	Debe ser evitada para minimizar la formación de estructuras secundarias y los dímeros de primer.
SIMILARIDAD	Debe tener un 100% de apareamiento con el molde.

Tabla 1. criterios adecuados de los primers.

Cuando el objetivo a amplificar es un locus, la posición de los iniciadores debe ser relativa a los codones de inicio y terminación. Es recomendable que el cebador "*forward*" se encuentre más o menos a 35 pb del inicio de la secuencia que codifica, de la misma forma el cebador "*reverse*" debe localizarse 35 pb después de la región que codifica.

Las concentraciones óptimas de los primers son generalmente entre 0.1 y 0.5 μM . Altas concentraciones de primer pueden promover "mispriming" y acumulación de producto no específico y puede incrementar la probabilidad de generar un templado independiente llamado dímero de primer. Los productos no específicos y los dímeros de primers son por si mismos sustratos para PCR y compiten con el producto deseado por la enzima, dNTPs y primers, resultando en un bajo rendimiento del producto deseado.

Los primers pueden contener extensiones en el extremo 5' o "mismatches" para incorporar sitios de enzimas de restricción, un codón de inicio ATG, o secuencias promotoras en la secuencia blanco. Pueden ser usados primers degenerados para extraer genes nuevos en base a su similitud o su secuencia de aminoácidos.

Una razón menos obvia por la que los primers fallan es la presencia de estructuras secundarias en el templado de DNA. En este caso la sustitución de dGTP por 7-deazo-2'-deoxy GTP ha sido muy usada.²¹



8.1.1 Especificidad.

La especificidad de los primers es en parte dependiente de su longitud. Los primers deben ser elegidos de modo que tengan una secuencia única dentro del DNA que será amplificado. Un primer diseñado con una secuencia altamente repetida dará lugar a productos no deseados. Sin embargo, el mismo primer puede dar una sola banda si se amplifica una sola clona de una biblioteca genómica.

8.1.2 Secuencias complementarias del primer.

Los primers necesitan ser diseñados con menos de 3 pares de bases de homología entre ellos. Si un primer tiene tal región de homología se formarán estructuras parciales de doble cadena que interferirán con el alineamiento. Si la homología ocurre en el extremo 3' de cualquier primer, ocurrirá la formación de dímeros de primer que, a menudo, prevendrá la formación del producto deseado por competición.

8.1.3 Contenido de G/C.

La composición base de los primers debe estar entre el 45% y el 55% de G/C. La secuencia de los primers debe ser elegida de tal forma que no haya regiones de poliG o de poliC que pueden promover el reconocimiento no específico. Las regiones poliA y poliT deben también ser evitados ya que interfieren con el complejo del primer-templado. Esto puede bajar la eficacia de la amplificación. El primer tendrá un contenido de G/C del 50% y ~20 bases de largo. Esto pondrá la T_m en la gama de 56°C - 62°C.



8.1.4 Secuencia de los extremos 3'

Es establecido que la posición terminal 3' en primers de PCR es esencial para el control del "mispriming". La inclusión de un residuo de G o de C en el extremo 3' de los primers ayuda a asegurar el correcto enlace en el extremo terminal 3' debido al enlace de hidrógeno más fuerte de los residuos G/C. También ayuda a mejorar la eficacia de la reacción reduciendo al mínimo la respiración que pudo ocurrir.

8.1.5 Temperatura de asociación.

La temperatura de asociación de los primers es uno de los factores más determinantes de la reacción. Se recomienda que se emplee como temperatura de asociación la temperatura de fusión -5°C , aproximadamente. Existen muchos métodos para calcular la temperatura de fusión, pero siempre, después de efectuado el cálculo es necesario ir al laboratorio y ensayar con diferentes temperaturas de asociación cercanas a la temperatura de fusión para determinar la temperatura óptima para cada reacción.

8.3 Templado.

Una de las características más atractivas de la PCR es que la cantidad y calidad de la muestra de DNA sujeta a amplificación no necesita ser alta. Una sola célula o un lisado celular crudo o especímenes con una longitud promedio de unos pocos cientos de pares de bases son usualmente adecuadas para una amplificación exitosa. El criterio esencial es que la muestra contenga al menos una cadena de DNA intacta que abarque la región que va a ser amplificada y que las impurezas sean suficientemente diluidas como para no inhibir la polimerización.

8.4 Polimerasa.

Un rango de concentración recomendado para *Taq* polimerasa (Perkin-Elmer CETUR) es entre 1 y 2.5 unidades (SA = 20 unidades/pmol) por 100 μ l de reacción.

Cuando los otros parámetros son óptimos. Sin embargo, los requerimientos de enzima pueden variar con respecto a la secuencia blanco o los primers. Cuando se optimiza un PCR, se recomienda probar rangos de concentración de enzima de 0.5 a 5 unidades/100 μ l. Si la concentración de la enzima es muy alta se acumulan productos no específicos, y si es muy baja se formara una cantidad insuficiente del producto deseado. (Fig. 4.)²¹

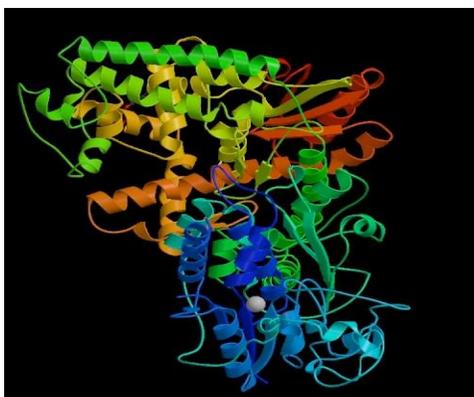


Fig.4 Estructura de la taq. polimerasa

8.5 Concentración de magnesio.

Es benéfico optimizar la concentración del ión magnesio, ya que afecta: el alineamiento de los primers, la temperatura de disociación de las cadenas, tanto del templado como del producto de PCR, la especificidad del producto, la



formación de dímeros de primer y la actividad y fidelidad de la enzima. La *Taq* polimerasa requiere magnesio libre en la unión con el templado, los primers y los dNTPs. Los PCR deben contener 0.5 a 2.5 mM de magnesio sobre el total de la concentración de dNTP. La presencia de EDTA u otros quelantes en el stock del primer o del templado puede alterar la concentración óptima aparente de magnesio.

8.6 Otros componentes

Un buffer recomendado para PCR es de 10-50 mM de Tris-HCl (pH entre 8.3 -8.8). Tris es un buffer iónico bipolar que tiene un pKa de 8.3 a 20°C y un pKa de -0.021/°C sin embargo el verdadero pH de una buffer 20mM de Tris (pH 8.3 a 20°C) varía entre 7.8 y 6.8 durante las condiciones típicas del termociclador.

Hasta 50 mM de KCl puede ser incluido en la mezcla de reacción para facilitar el alineamiento de los primers. NaCl a 50 mM o KCl arriba de 50 mM inhibe la actividad de la *Taq* polimerasa.

La gelatina o la albúmina bovina (100 µg/ml) y detergentes no iónicos como el tween 20 o laureth 12 (0.05 a 0.1%) son incluidos para ayudar a estabilizar la enzima, sin embargo muchos protocolos trabajan bien sin estos componentes.

9. METODOLOGÍA DESARROLLADA DE LA PCR.

El procedimiento de la PCR consta de tres pasos:

- 1) Desnaturalización, donde se separan las dos cadenas de ADN por medio de calor.
- 2) Alineamiento, al bajar la temperatura los iniciadores reconocen y se alinean con la secuencia complementaria de ADN, y



- 3) Extensión, la enzima Taq polimerasa realiza la síntesis de una nueva cadena de ácidos nucleicos. Estos tres pasos forman un ciclo a partir de dos cadenas de ADN se obtienen cuatro.

La cantidad de copias producidas crece exponencialmente. Cada PCR puede variar entre 20 a 40 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2-3 pasos a diferentes temperaturas. La PCR común se realiza con ciclos que tienen tres pasos de temperatura. Los pasos de ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico (llamado "hold") a alta temperatura (> 90 °C), y seguido por otro hold al final del proceso para la extensión de producto final o el breve almacenaje. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de gran variedad de parámetros. Éstos incluyen la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes y de los dNTP en la reacción, y la temperatura de unión de los cebadores, así como la longitud del ADN que se desea amplificar.²¹

9.1 Inicio.

Este paso consiste en llevar la reacción hasta una temperatura de 94-96 °C (ó 98 °C si se está usando una polimerasa termoestable extrema), que se mantiene durante 1-9 minutos. Esto sólo es necesario para ADN polimerasas que requieran activación por calor.

9.2 Desnaturalización.

En primer lugar, se desnaturaliza el ADN (se separan las dos hebras de las cuales está constituido). Este paso puede realizarse de diferentes modos, siendo el calentamiento (94-95 °C) de la muestra la forma más habitual. La temperatura a la cual se decide realizar la desnaturalización depende, por ejemplo, de la proporción de G+C que tenga la hebra, como también del largo de la misma. Otros métodos,



raramente empleados en la técnica de la PCR, serían la adición de sales o agentes químicos capaces de realizar la desnaturalización.

La primera reacción consiste en la desnaturalización del DNA, separándose las dos cadenas por ruptura de los enlaces de hidrógeno.

Las condiciones típicas de desnaturalización son 95°C por 30 segundos, o 97°C por 15 segundos; sin embargo temperaturas más altas pueden ser apropiadas especialmente para templados ricos en G + C.

La desnaturalización incompleta permite el apareamiento de las hebras de DNA y por lo tanto se reduce el rendimiento el producto. En contraste, los pasos de desnaturalización a altas temperaturas o por mucho tiempo provocan pérdida de la actividad de la enzima.

9.3 Alineamiento o unión del cebador.

La segunda reacción consiste en la hibridación de los primers. Para ello se baja la temperatura y las condiciones serán tales que se facilitará la unión de los *primers* a las cadenas.

La temperatura y el tiempo requerido para el alineamiento de los primers dependen de la composición, tamaño y concentración de los primers amplificadores. Una temperatura de alineamiento óptima es 5°C por debajo de la T_m de los primers. Debido a que las DNA polimerasas son activas en un amplio rango de temperaturas, la extensión de los primers puede ocurrir a bajas temperaturas incluyendo el paso de alineamiento.²¹



El rango de actividad de las enzimas varía en dos órdenes de magnitud entre 20 y 85°C. Las temperaturas de alineamiento en el rango de 55 a 72°C generan buenos resultados.

Los puentes de hidrógeno estables entre las cadenas de ADN (unión ADN-ADN) sólo se forman cuando la secuencia del cebador es muy similar a la secuencia del

ADN molde. La polimerasa une el híbrido de la cadena molde y el cebador, y empieza a sintetizar ADN. Los cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.

9.4 Extensión o elongación de la cadena.

Actúa la ADN polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP complementarios en dirección 3'→ 5', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTP con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente (la cual se extiende). La temperatura para este paso depende de la ADN polimerasa que usemos. Para la polimerasa Taq, la temperatura de máxima actividad está en 75-80 °C (comúnmente 72 °C).²¹ El tiempo de extensión depende tanto de la ADN polimerasa usada como de la longitud del fragmento de ADN que se va a amplificar. Hay una regla comúnmente usada: en su temperatura óptima, la polimerasa de ADN polimerizará mil bases en un minuto.

Las estimaciones para la tasa de incorporación de nucleótidos a 2°C varía de 35 a 100 nucleótidos por segundo dependiendo del buffer, pH, concentración de sales y la naturaleza del templado. Un tiempo de extensión de un minuto es considerado suficiente para productos de hasta 2 kb de longitud. Sin embargo, tiempos mayores de extensión pueden ser útiles cuando la concentración del sustrato es



muy pequeña o cuando la concentración del producto excede la concentración de la enzima.

9.5 Elongación final.

Etapla única que se lleva a cabo a una temperatura de 70-74 °C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente ampliado.

9.6 Conservación.

Este paso se lleva a cabo a 4-15 °C durante un tiempo indefinido para conservar la reacción a corto plazo. La PCR normalmente se realiza con un volumen de reacción de 15-100 µL, en pequeños tubos de 0.2-0.5 mL que se colocan en el termociclador.

9.7 Número de ciclos.

Los tres pasos anteriores constituyen un ciclo. La repetición de este ciclo unas 40 veces, por ejemplo, permite obtener, como resultado de un experimento de amplificación, millones de copias del fragmento de interés. El número óptimo de ciclos dependerá principalmente de la concentración inicial del templado cuando los otros parámetros son optimizados.

Un error común es el de ejecutar demasiados ciclos, ya que esto puede incrementar la cantidad y complejidad de productos no específicos. Pocos ciclos dan como resultado un bajo rendimiento del producto.

La cantidad de DNA dobla teóricamente con cada ciclo de PCR, según lo demostrado en la siguiente Tabla (2). Después de cada ciclo, la cantidad de DNA es dos veces la anterior, así que después de dos ciclos tenemos 2 x 2 veces,



después de 3 ciclos $2 \times 2 \times 2$ veces u 8 (23) veces la cantidad inicial, después de 4 ciclos $2 \times 2 \times 2 \times 2$ veces o 16 (24). Así, después de N ciclos tendremos 2^N .²¹

Tabla no.2 Relación entre cantidad de DNA y el número de ciclos.

NÚMERO DE CICLOS	CANTIDAD DE DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1,073,741,824
31	1,400,000,000
32	1,500,000,000
33	1,550,000,000
34	1,580,000,000

9.10 Análisis de las muestras.

El hecho de que las moléculas de ADN obtenidas al finalizar la reacción en cadena correspondan efectivamente al fragmento de interés queda asegurado por la intervención de los *primers* que definen los extremos "derecho" e "izquierdo" de ese fragmento. Así, una vez que la reacción ha finalizado, el tamaño del fragmento multiplicado puede determinarse sometiendo los productos de la reacción a una electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, es decir, a un proceso de separación por difusión

bajo la acción de un campo eléctrico. Por otra parte, la identidad del producto puede ser confirmada mediante hibridación (unión complementaria) con una sonda marcada radiactivamente, cuya secuencia de bases esté contenida en el fragmento de interés. En este caso se procede así: el ADN fraccionado por electroforesis es desnaturalizado y luego transferido a una membrana de nitrocelulosa o *nylon*, que actúa como soporte sólido (*Southern blot*), y luego es puesto en contacto con la sonda, que se unirá al fragmento buscado ya que ha sido preparada de modo tal que resulta ser complementaria del mismo. También es posible colocar el ADN directamente en la membrana en forma de pequeñas manchas (*dot blot*) para su posterior hibridación con la sonda. La localización de las sondas radiactivas se logra, en ambos casos, mediante autorradiografías.¹⁰

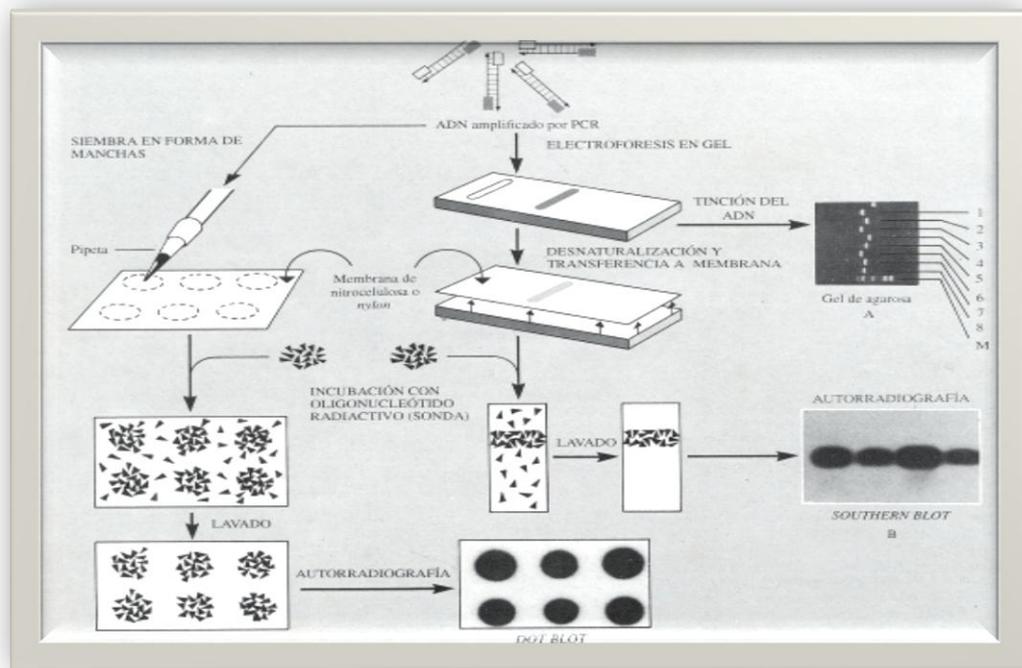


Fig.5 Tres formas de analizar los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR A: visualización directa B:Southern blot C: dot blot²³.



Tres formas de analizar los fragmentos de ADN amplificados mediante la técnica PCR.

1.-VISUALIZACIÓN DIRECTA.

Las muestras colocadas sobre un gel y sometidas a la acción de un campo eléctrico (electroforesis) migran de una manera característica que se puede visualizar por tinción (coloreado) del ADN. (Carriles 1-8: productos de distintas PCRs; carril M: marcadores de ADN de tamaño conocido.)²⁰

2.- SOUTHERN BLOT.

El ADN es desnaturalizado (separación de sus hebras constituyentes) y transferido a una membrana de nitrocelulosa o nylon para luego incubar la hibridación (unión) con una sonda radiactiva. Ésta quedará fijada donde se encuentre el tramo de ADN de interés y su presencia se revelará a través de una autorradiografía (placa fotográfica sensible a la emisión radiactiva de la sonda).

3.- DOT BLOT.

Método análogo al anterior, pero practicado sobre una siembra en forma de manchas de los fragmentos de ADN a analizar previamente desnaturalizados.

Una estrategia distinta para confirmar la identidad del fragmento replicado consiste en realizar dos reacciones de PCR consecutivas. Al finalizar la primera, una proporción de la misma es sometida nuevamente al proceso de multiplicación tras haber colocado dos *primers* internos. Mediante el empleo de esta metodología, conocida como **nested** PCR (PCR anidada), la filiación de los fragmentos obtenidos queda confirmada por el hecho de que poseen tamaños previsibles.



En algunos casos, los productos amplificados poseen secuencias que son reconocidas y clivadas por ciertas enzimas llamadas endonucleasas de restricción. La determinación del tamaño al que quedan reducidos los fragmentos al ser puestos en contacto con la enzima de restricción adecuada indica que nos encontramos ante los segmentos de interés.

Para diseñar los *primers* que hacen posible replicar un fragmento de ADN mediante la técnica PCR es necesario conocer, en la mayoría de los casos, la secuencia de bases total o parcial de dicho fragmento. Por esta razón, aunque la PCR supera en sensibilidad y rapidez a las técnicas de clonado y de secuenciación convencionales, no se puede prescindir de la información brindada por las mismas.

10. OPCIONES DE PCR.

10.1 Rt/Pcr (reverso transcripción/pcr)

Esta técnica se utiliza para realizar una PCR cuando el genoma del patógeno es ARN. Consiste en convertir el ARN EN cADN (ADN complementario) y ser utilizado para PCR. Esto se realiza utilizando la enzima reversa transcriptasa que tiene la capacidad de sintetizar el ADN a partir de ARN.

Dado que el RNA usualmente es de una sola hebra y es sensible al calor, es necesario hacer una transcripción reversa (RT) antes de iniciar la amplificación por PCR.



La transcripción reversa genera una copia de la hebra de RNA, pero esta copia es DNA complementario (cDNA) el cual es estable al calor y puede resistir la metodología PCR.²⁵

Los pasos de la RT-PCR son:

1. Transcripción reversa: Unión del primer a la secuencia de RNA objetivo.
2. Transcripción reversa: La polimerasa *rTth* cataliza la extensión del primer mediante la incorporación de nucleótidos complementarios.
3. Fin de transcripción reversa, se obtiene la hebra del cDNA complementario al RNA.
4. PCR.

El mRNA es copiado a cDNA por la transcriptasa reversa usando un primer dT (los primers al azar se pueden también utilizar). En PCR en tiempo real, se utiliza generalmente una transcriptasa reversa que tenga una actividad endo H. Esto elimina el mRNA permitiendo que la segunda hebra de DNA sea formada. Se adiciona una mezcla de PCR que incluya una polimerasa termoestable (tal como la Taq polimerasa), los primers específicos para el gen de interés, los deoxinucleótidos y un buffer conveniente.²⁵

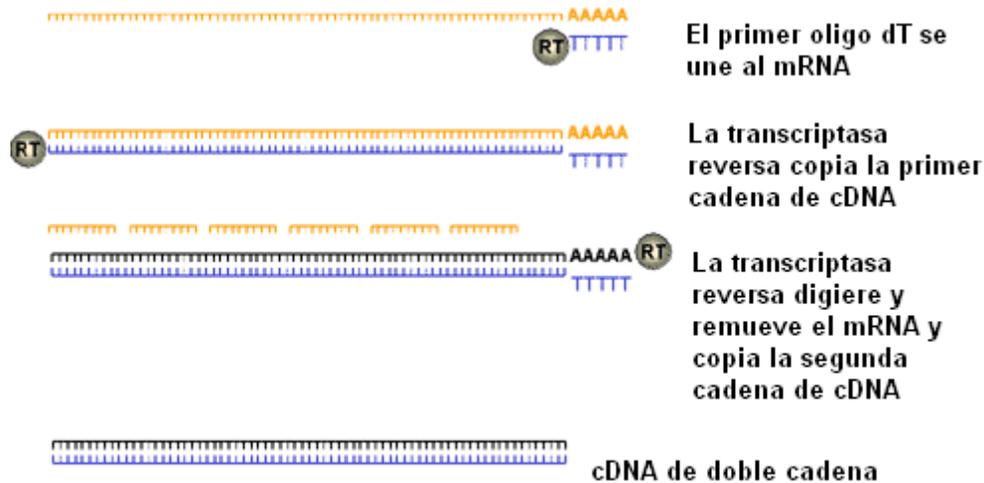


Fig.6 Conversión de mRNA a cDNA por la transcriptasa reversa.

El cDNA se desnaturaliza a más de 90° ($\sim 94^{\circ}$), las dos hebras se separan. A 50° o 60° los primers específicos se alinean con el sitio complementario en cada cadena. Los sitios de unión a los primers deben estar separados 400 bases, pero generalmente se encuentran a 100 bases de distancia especialmente cuando se usa el PCR en tiempo real. A 72° la polimerasa extiende el DNA desde los primers. Se obtienen 4 cadenas de cDNA.

Después de 30 o 40 ciclos de síntesis de cDNA, los productos de reacción son analizados usualmente por electroforesis en gel de agarosa. El gel se tiñe con bromuro de etidio. Los geles de agarosa para analizar los productos de cDNA de la RT-PCR no nos permiten la cuantificación ya que el bromuro de etidio es muy insensible y cuando una banda es perceptible sobrepasa la etapa logarítmica de amplificación.²⁵

El bromuro de etidio es un colorante que se une a la doble cadena de DNA intercalándose entre los pares de bases. Emite luz fluorescente cuando se irradia en la parte UV del espectro. Sin embargo, la fluorescencia no es muy brillante.

Otros colorantes, como el SYBR green, que son mucho más fluorescentes que el bromuro de etidio, se utilizan en el PCR en tiempo real. (fig7)

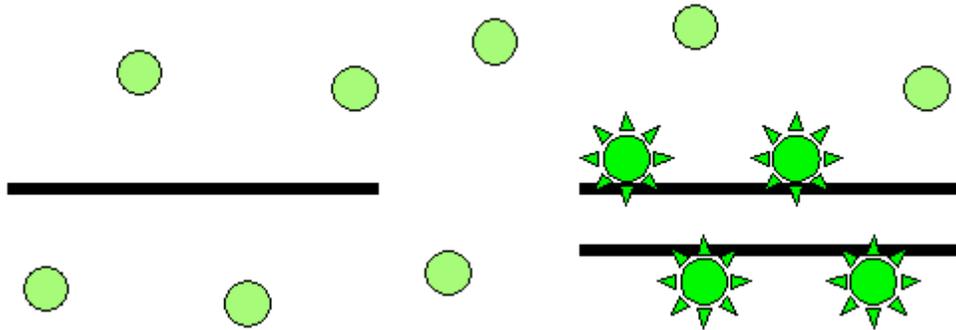


Fig.7 El SYBR verde fluorescente brillante solo cuando se une a DNA de doble cadena.

10.2 Pcr en tiempo real.

La RT-PCR es solamente semicuantitativa en el mejor de los casos, en parte por la insensibilidad del bromuro de etidio (sin embargo, hay maneras más sensibles de detectar el producto). Los protocolos de PCR competitivos se han desarrollado para hacer el método más cuantitativo pero son a menudo complicados. ²⁵

Así la PCR en tiempo real fue desarrollado debido a:

- La necesidad de cuantificar diferencias en la expresión del mRNA.
- La disponibilidad de cantidades pequeñas de mRNA en algunos procedimientos, Hay una variedad de métodos para la cuantificación del mRNA.

Esta técnica la podemos dividir en técnica basada en fluorocromos no específicos y técnica basada en sondas específicas.



Técnica basada en fluorocromos:

1. El ADN que multiplica su cantidad en cada ciclo se une al fluorocromo generalmente por la técnica SYBR Green.

2. Se produce una fluorescencia.

3. Es medida por un termociclador diseñado para PCR en tiempo real, ya que nos permite cuantificar sólo una secuencia por reacción pero tiene la ventaja de utilizar cebadores normales para su realización.

Técnica basada en sondas específicas:

1. Esta utiliza una sonda unida a dos fluorocromos.

2. Hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo llamado forward y el inverso (reverse).

3. Cuando la sonda está intacta, presenta una transferencia energética de fluorescencia por resonancia conocida como (FRET).

4. Si la sonda se dañara y los dos fluorocromos se encontraran distantes, producto de la actividad 5'-3' exonucleasa de la ADN polimerasa dicha FRET no se reproduce. Esto nos permite monitorizar el cambio del patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen.²¹

La mayoría de estos inconvenientes se han solucionado con la introducción de la PCR realizada en tiempo real (Q-PCR), que elimina cualquier proceso post-PCR puesto que monitoriza la progresión de la amplificación en el momento en que ocurre. A diferencia de la PCR convencional (en punto final), que mide la acumulación del ADN al final de un número predeterminado de ciclos, con Q-PCR esto se hace durante el proceso de amplificación usando fluorescencia, de forma que su aumento es proporcional a la cantidad de ADN formada. El proceso se puede automatizar fácilmente usando un sistema que realice la amplificación



(termociclador) y que a su vez sea capaz de leer fluorescencia. Existe una amplia oferta de aparatos en el mercado. La mayoría pueden trabajar con las diversas opciones de marcado fluorescente y son "abiertos", es decir, permiten programar las condiciones de amplificación y lectura de forma que su uso no queda limitado a unos reactivos determinados.

Técnicas de detección.

A continuación se mencionan las detecciones químicas y éstas se encuentran dadas por:

1. Agentes intercalantes fluorescentes (SYBR Green).
2. Sondas hidrolizadas.
3. Hairpin probes (Molecular Beacons, Scorpions).
4. Sondas de hibridización.

SYBR Green.

Es un agente intercalante que se une al ADN de doble cadena dando un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR. Es simple y económico, fácil de usar, sensible, versátil y no se necesitan sondas específicas. Sin embargo durante la reacción de PCR puede unirse a dímeros de primers 18 y a otros productos inespecíficos, resultando en una sobreestimación de la concentración del DNA blanco. (Fig.8)

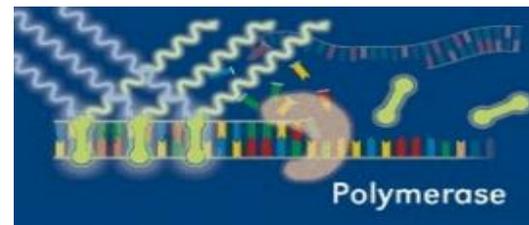
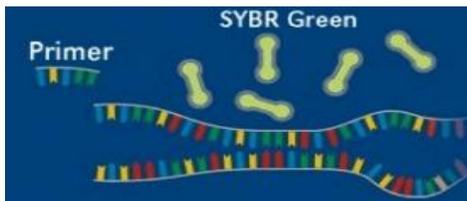
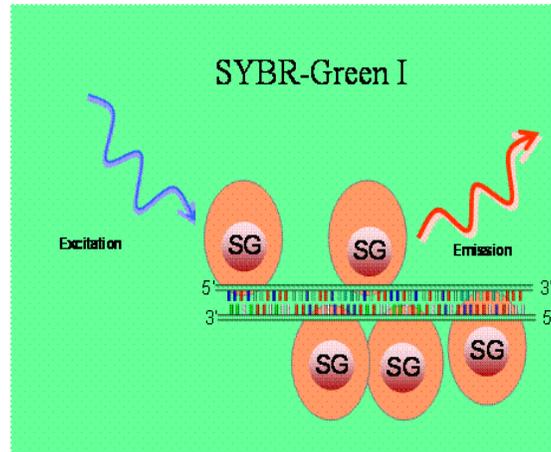


Fig. 8 SYBR Green.

Sondas hidrolizadas (Hydrolysis probes TaqMan).

Se emplea una sonda que tiene unidos un fotocromo reportero y un fotocromo quencher. Cuando ambos fotocromos están unidos a la sonda, el reportero no emite señal. Pero, cuando la sonda hibrida con la secuencia de interés durante la reacción de PCR, la actividad exonucleasa de la Taq polimerasa corta al fotocromo reportero del resto de la sonda, permitiendo la emisión una señal fluorescente. Se monitorea la señal fluorescente del reportero que se va acumulando en los sucesivos ciclos de PCR. (Fig. 9).

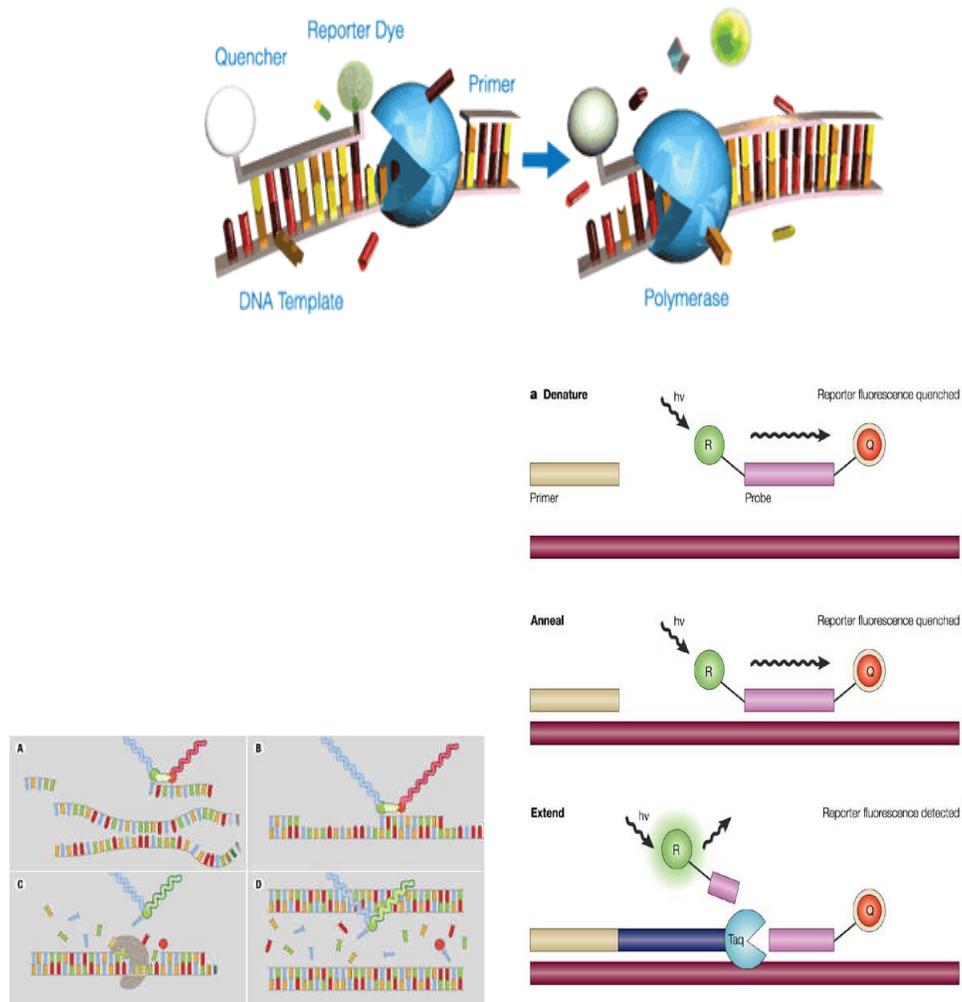


Fig.9 Hydrolysis probes.

- Cuando la sonda, hibridada o no, esta intacta el fotocromo reporter no emite por acción del quencher.
- La sonda es hidrolizada durante la reacción del PCR y el reporter fluoresce.

Hairpin probes (Molecular Beacons).

Estas sondas poseen secuencias repetidas invertidas (ITR) en sus extremos 5' y 3'. Este diseño permite que se forme una estructura de horquilla conocida como

(hairpin) por complementariedad de las dos regiones ITR, en ausencia de la secuencia blanco. La secuencia interna de la sonda es complementaria al blanco, dirigiendo así la hibridación específica, resultando en una eficiente separación del quencher y del reportero y la consecuente emisión de este último. (fig10).

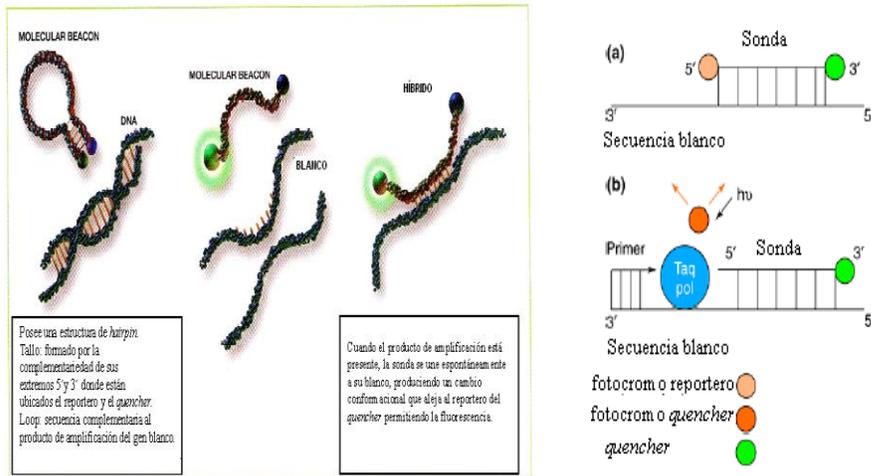


Fig. 10 Molecular Beacon.

Entre sus ventajas están el que son más específicas que las sondas TaqMan deben tener un cambio conformacional para hibridar con el blanco, permiten distinguir dos secuencias blanco muy similares entre sí y que se pueden combinar varias Molecular Beacons en una única reacción empleando diferentes compuestos fluorescentes para identificar secuencias blanco específicas distintas (Múltiple PCR). Una desventaja de esta técnica de detección es que requiere de un riguroso diseño de las regiones tallo y asa de la horquilla.²¹

Sondas de hibridación (Hybridization probes).

El diseño implica el uso de dos secuencias de oligonucleótidos específicos como sondas, cada una marcada con un fluoróforo diferente, comúnmente, el extremo 3' de la sonda donadora con fluoresceína y el extremo 5' de la sonda aceptor con LC Red 640 o LC Red 705. Las dos sondas están diseñadas para hibridar en sus blancos específicos en un arreglo cabeza-cola que permite que ambos fluoróforos

estén en estrecha proximidad entre sí. Así, la transferencia de energía de resonancia sólo ocurre cuando ambas sondas se hibridan al blanco muy próximas entre sí, siendo la distancia óptima de 1 a 5 bases entre las sondas. (Fig11).

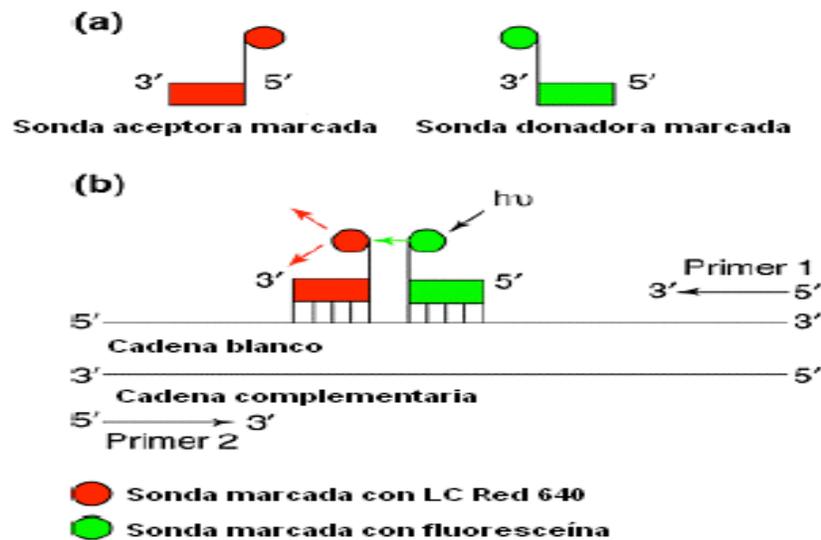
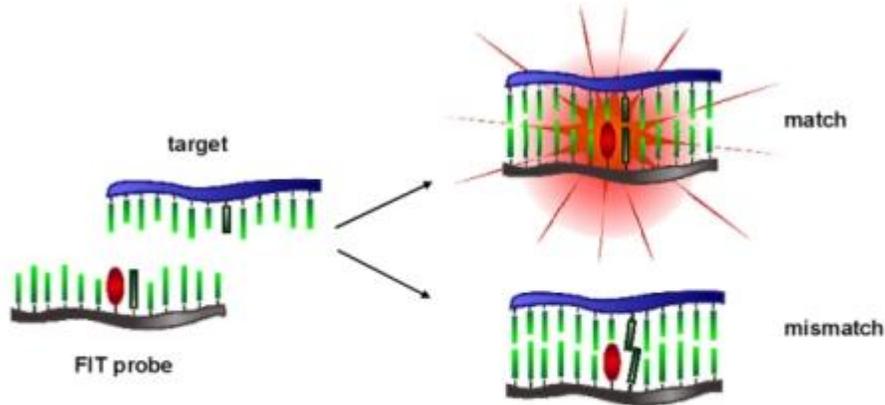


Fig. 11 sondas de hibridación.

- a) Sondas de oligonucleotidos de secuencia específica, marcadas con diferentes fluoróforos.
Las dos sondas hibridan con sus blancos específicos en un arreglo cabeza-cola permitiendo que los dos fluoróforos estén estrechamente próximos.
- b) La transferencia de la energía de resonancia de fluorescencia solo ocurre cuando ambas sondas están hibridadas y muy próximas entre sí (distancia óptima entre 1 y 5 bases entre las sondas).



Forced intercalation (FIT):

fluorescent dye serves as base surrogate
responds to perturbations

Fig. 12 proceso de las sondas de hibridación.

Scorpions.

Estos son primers de PCR con una cola tallo y asa llamados ("Stem-Loop") que contiene un fluoróforo y un quencher. La estructura de tallo y asa es separada de la secuencia de del primer de PCR por una modificación química que evita que se copie la secuencia de tallo y asa del scorpion.(fig13).

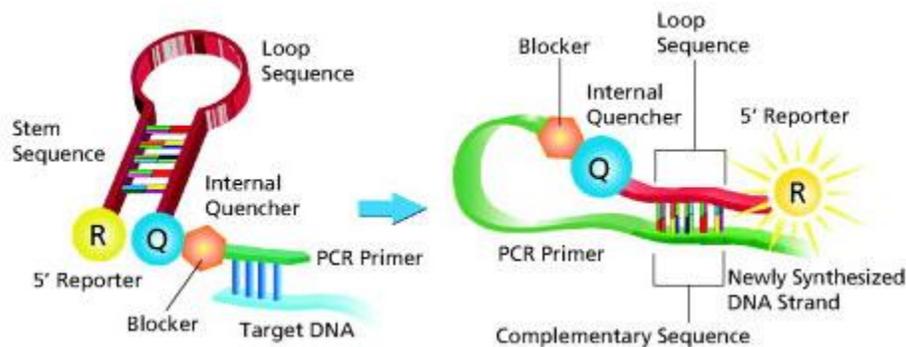


Fig. 13 a)Extinción de la fluorescencia. b) Emisión de la fluorescencia.

Durante la PCR, los primers de scorpions se amplifican para formar productos de PCR. En la etapa apropiada del ciclo de PCR (la fase de alineamiento), la secuencia de la sonda en la cola del Scorpion se enrosca para hibridarse a la

secuencia blanco en el producto de PCR. Como la cola del scorpion y del producto de PCR es ahora parte de la misma hebra de DNA, la interacción es intermolecular. La secuencia blanco se elige típicamente para estar 3 bases dentro del extremo 3' del primer scorpion. (Fig 14).

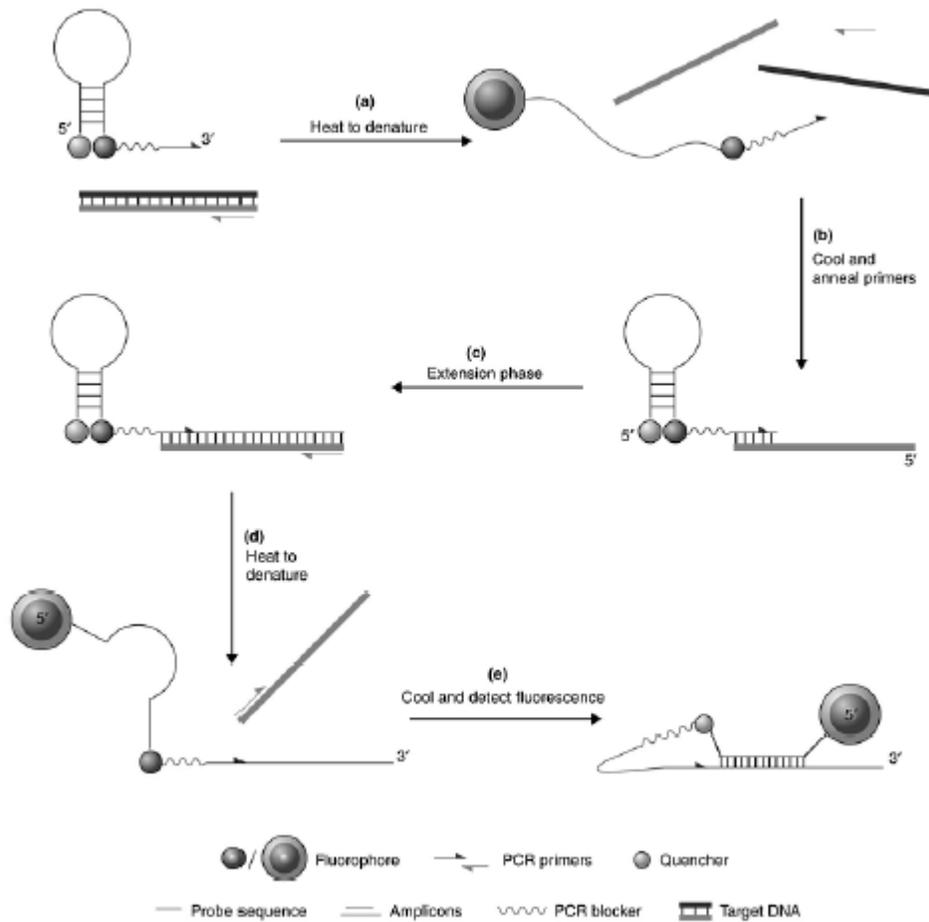
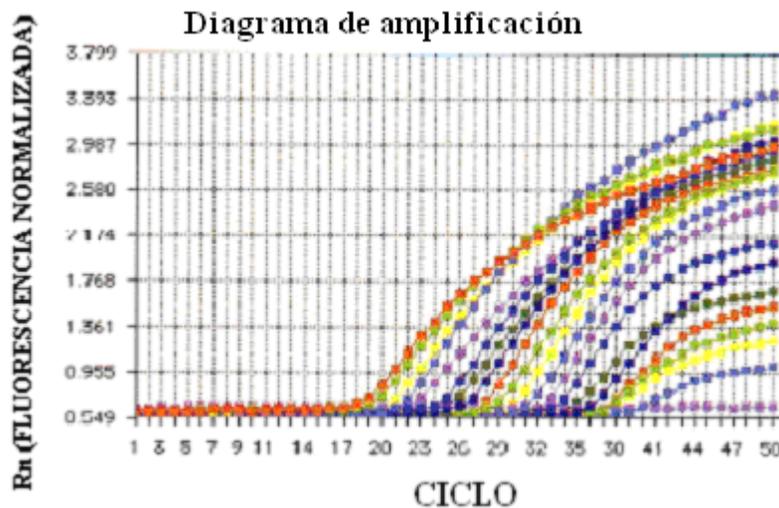


Fig 14. Esquema de procedimiento de los scorpions.

Cuantificación.

La capacidad de monitorear el progreso en tiempo real de la PCR revolucionó totalmente la manera de cuantificación basada en la PCR de DNA y de RNA. Las reacciones son caracterizadas en el momento en el que la amplificación de un producto de PCR se detecta después de un número fijo de ciclos. Cuanto más alto es el número de copias del blanco, más pronto se observa el aumento significativo en la fluorescencia.

En la siguiente grafica se muestra un diagrama representativo de la amplificación. Un diagrama de amplificación es una gráfica de la señal de la fluorescencia contra el número de ciclos. En los ciclos iniciales de PCR, hay un pequeño cambio en señal de fluorescencia. Esto define la línea de fondo para el diagrama de la amplificación. Un aumento en fluorescencia sobre la línea de fondo indica la detección del producto acumulado de PCR.²¹



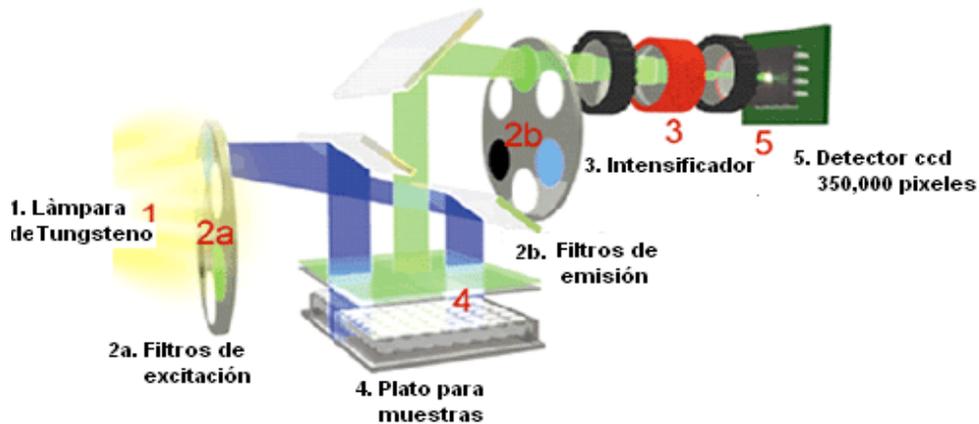
Máquinas para PCR en tiempo real.

Hay muchas máquinas para PCR en tiempo real disponibles. Podemos encontrar ICycler® de BioRad. La tapa se desliza para acomodar las muestras en una placa de formato 96-pozos (96-well). Esto significa que podemos mirar varias muestras

simultáneamente. La máquina contiene una cámara fotográfica sensible que supervisa la fluorescencia en cada pozo de la placa en intervalos frecuentes durante la reacción de PCR.(fig15).



Fig. 15 ICycler de BioRad



16 Representación de un sistema de detección óptico.

Fig.

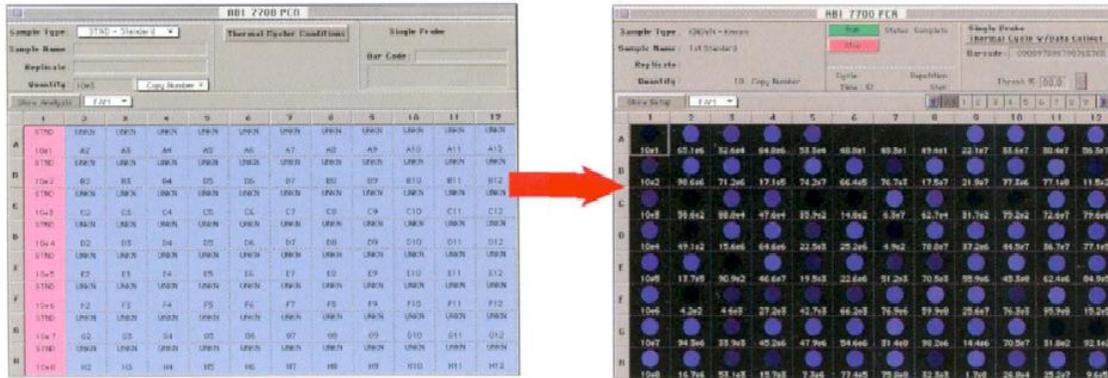


Fig 17. El software muestra una representación de una placa con 96 pozos, donde se pueden identificar fácil y rápidamente los estándares y las muestras no conocidas, después de una corrida de PCR el número inicial de copias se observa para cada una de las muestras en el pozo.

Otro sistema es el LightCycler de Roche, se basa en el empleo de capilares de vidrio para la contención de las muestras, y en un mecanismo de giro, similar a una centrífuga, denominado carrusel. El calentamiento y el enfriamiento se llevan a cabo mediante un sistema de aire. Todo ello tiene ventajas e inconvenientes. La principal ventaja es la rapidez, que permite obtener resultados, en muchos casos, en menos de 1 hora. Sin embargo, presenta un alto costo, ya que los capilares y otros materiales son específicos para este sistema, y bastante caros. Además, los protocolos de tiempos y temperaturas no son intercambiables con otros sistemas de PCR cuantitativa, lo que requiere de nuevas optimizaciones.



Fig.18 LightCycler de Roche.

Ventajas del Tiempo Real

La determinación de valores de Ct siguiendo la cinética en tiempo real de PCR elimina la necesidad de un competidor que debe de ser amplificado con el blanco. La cuantificación se puede realizar por el método más básico que es preparar una curva estándar y determinar cantidad desconocida por comparación con curva estándar. Comparado a las medidas del punto final, el uso de los valores de Ct también amplía la gama dinámica de la cuantificación porque los datos se colectan para cada ciclo de PCR.

La PCR en tiempo real permite una amplificación confiable con alta especificidad y sensibilidad. El producto de PCR se cuantifica en cada ciclo. Hay una alta correlación entre la señal (Ct) y la cantidad de blanco.

Con esta técnica se tiene alta precisión y exactitud. También hay la posibilidad de PCR múltiplex. No requiere de análisis posterior a la PCR (electroforesis, etc.). Esto reduce la posibilidad de contaminación y elimina fuentes potenciales de error. Se puede realizar un mayor número de reacciones por día. El sistema a “tubo cerrado” sirve como control de contaminación. Existe un amplio rango de aplicación. El diseño de primers y sondas tiene que ser más exigente.²⁵

10.3 long pcr.

Para llevar a cabo esta técnica de manera eficiente es necesario el uso de dos polimerasas: una polimerasa principal en la reacción que no tenga actividad de proofreading (corrección de pruebas), y una polimerasa que posea una actividad exonucleasa 3'-5', que esté presente en una concentración más baja. La eficiencia disminuye drásticamente cuando se incorporan las bases incorrectas. La actividad exonucleasa 3'-5' elimina estos errores en las bases y hace que la reacción posterior proceda. Por lo tanto, la amplificación de fragmentos largos de DNA puede llevarse a cabo. (fig 19).

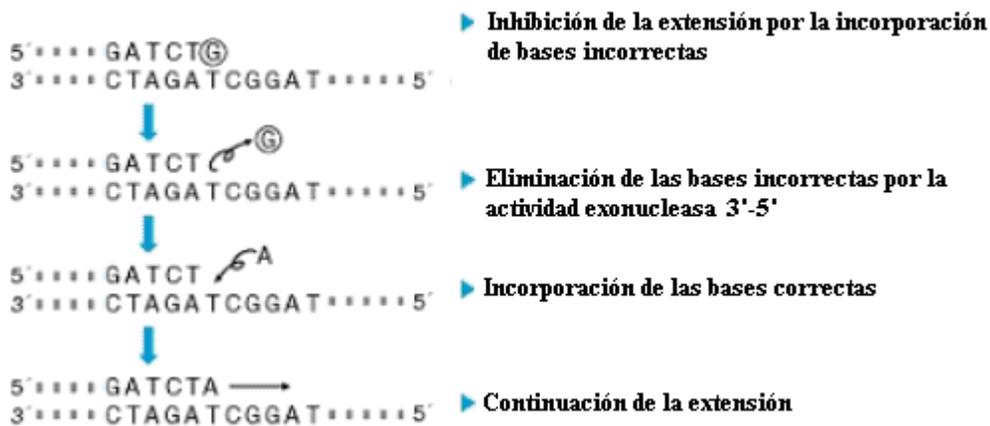


Fig.19 procedimiento de Long PCR.

10.3.1 Programa genérico para Long PCR para el Perkin Elmer 9600.

1. Inicial desnaturalizando a 94°C durante 10-15 segundos.
2. Ciclos 1-15 94°C 10 segundos, 68°C por n minutos (15 veces)
3. Ciclos 16-30 94°C, 10 segundos, 68°C por n minutos +15 segundos/ciclo (15 veces).



Fig.20 Perkin Elmer 9600

Los 15 segundos por ciclo para los ciclos 16-30 puede ser necesaria para fragmentos más largos (20 Kb).

10.3.2 Hot Start.

Se puede utilizar el método de hot start para hacer una Long PCR. La reacción se divide en dos partes:

- una fracción de templado/primer que es 3/4 o 4/5 del volumen de la reacción, - una fracción de la polimerasa que constituye el resto.
- Cada fracción contiene la misma concentración de buffer. La fracción de la polimerasa contiene solamente la polimerasa, el buffer y agua; el resto de los componentes se incluyen en la fracción de templado/primer. Se pone la fracción de templado/primer en el tubo y se calienta en la máquina de PCR a 94°C por 10 segundos, para desnaturalizar. Después se agrega la fracción de la polimerasa durante el primer paso de alineamiento y extensión.

10.4 PCR *in situ*

La hibridación *in situ* (ISH) ha demostrado ser una herramienta molecular muy importante en diagnóstico y la investigación y ha avanzado perceptiblemente el estudio de la estructura y de la expresión del gen a nivel de células individuales. Sin embargo, la utilidad de ISH es limitada por la sensibilidad de cerca de 20

copias del mRNA por la célula, un obstáculo de la detección que pueda ahora ser superado gracias a las nuevas tecnologías.

En años recientes, las estrategias para mejorar los límites de detección en estudios de ISH han incluido protocolos que amplifican la detección de la señal, o incrementando la cantidad de sondas de hibridación usando cócteles del oligonucleótido o múltiples sondas de cRNA. Una tercera estrategia que emplea la PCR es la amplificación basada en las secuencias de nucleótidos del blanco. Esta estrategia fue desarrollada independientemente por varios laboratorios en 1980.²¹

10.4.1 Principios y métodos.

Los aspectos importantes para la PCR *in situ* incluyen la fijación y la permeabilización durante la preparación de la muestra, un mecanismo para ciclación y el material celular en la solución o en laminillas de cristal. Antes de llevar a cabo la PCR *in situ*, las células o las muestras del tejido fino son fijadas y permeabilizadas para preservar la morfología y permitir el acceso de los reactivos de PCR a las secuencias intracelulares que se quieren amplificar.

La amplificación de PCR de las secuencias blanco se realiza después en las células intactas en tubos micro-Eppendorf o directamente en preparaciones cito centrifugadas o secciones del tejido fino en laminillas de cristal. (fig. 17)

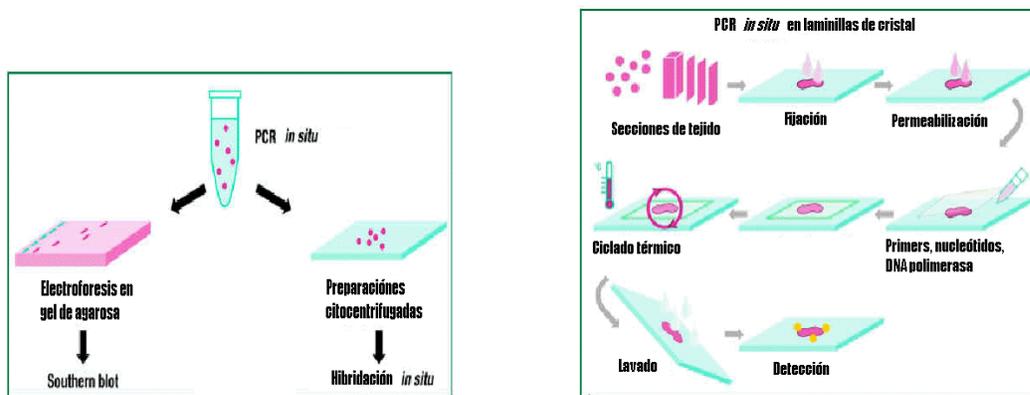


Fig. 21 fijación y permeabilización de muestras.



Las células en la mezcla de reacción de PCR son termocicladas en tubos micro-Eppendorf usando cicladores convencionales de bloque. Después de la PCR las células son cito centrifugadas sobre las laminillas de cristal con la visualización de los productos intracelulares de PCR por ISH o inmuno- histoquímica. La PCR *in situ* en las laminillas de cristal es realizada sobre -poniendo las muestras con la mezcla de PCR debajo de una tira que se sella con cera o aceite mineral para prevenir la evaporación de la mezcla de reacción. Un ciclo térmico se completa poniendo las laminillas de cristal sobre los bloques de calentamiento de un termociclador convencional o diseñado especialmente o usando hornos que completan un ciclo térmico.²¹

La detección de los productos de PCR intracelular se realiza por dos técnicas diferentes:

- 1) Indirectamente por ISH con sondas específicas para el producto de PCR (PCR *in situ* indirecto)
- 2) Sin ISH con la detección directa de los nucleótidos etiquetados (digoxigenina-11-dUTP, fluoresceína-dUTP, 3H-CTP o biotina-16-dUTP) que se han incorporado en los productos de PCR (PCR *in situ* directa)

Existen otras variantes de PCR que son usadas para diferentes fines como son:

10.5 Multiplex pcr.

Es una PCR en la cual hay múltiples pares de primers (hasta 8) lo que da una serie de productos. Éstos pueden verse como múltiples bandas en un gel de azarosa. Se usa frecuentemente en diagnóstico médico. Ahorra templado, tiempo y gastos. Requiere una cuidadosa optimización.²¹

10.6 Nested PCR.

Consiste en dos procesos de amplificación sucesivos, de forma que en la segunda PCR se utilizan unos primers contenidos en la secuencia amplificada en la primera reacción. Es decir, el producto de amplificación de la primera PCR es el molde de la segunda. Se aplica cuando se quiere mejorar la sensibilidad y especificidad de la técnica, especialmente en el caso de muestras de baja calidad o con un pequeño número de copias de la secuencia a amplificar.²¹

A veces 1 ronda de PCR no da un producto único a partir de un templado complejo, apareciendo un barrido. Se puede resolver utilizando un segundo par de primers que hibriden un poco más internamente que los primeros. Se obtiene un producto único porque solo el fragmento correcto de ADN posee los sitios correctos de hibridización para el segundo par de primers.(fig 22)

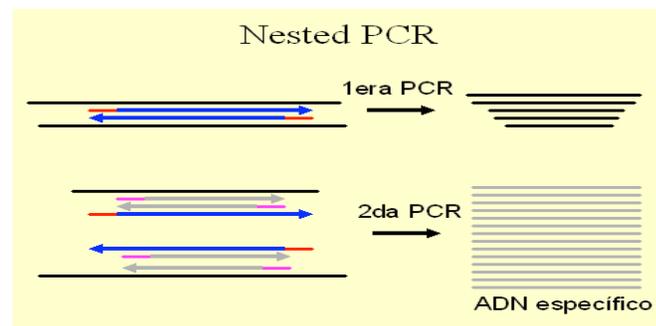


Fig. 22 nested PCR.

11. VARIACIONES DE LA PCR BÁSICA

1. PCR específica de alelo: esta técnica de diagnóstico o clonación es usada para identificar o utilizar los polimorfismos de una sola base(SNPs).



2. PCR "assembly": consiste en la síntesis artificial de largas secuencias de ADN, realizando para ello la PCR en un fondo de oligonucleótidos largos con secuencias solapantes cortas.
3. PCR asimétrica: es usada para amplificar preferentemente una cadena del ADN original con respecto a la otra.
4. PCR de colonia: mediante esta técnica, colonias de bacterias *Escherichia coli* pueden ser rápidamente examinadas para construcciones viables de vectores de ADN.
5. Amplificación dependiente de helicasa: esta técnica es muy parecida a la PCR convencional, pero en ella se emplea la enzima helicasa y una temperatura constante en lugar de la polimerasa de ADN y los ciclos repetidos de desnaturalización-extensión.
6. PCR hot-start: esta técnica reduce la amplificación inespecífica durante las etapas iniciales de la PCR.
7. PCR específica de intersecuencia (ISSR): se trata de un método de PCR para su uso en huella genética, que amplifica regiones entre repeticiones de secuencia simple para producir una huella genética única de longitudes de fragmento amplificadas.
8. PCR inversa: es un método usado para poder realizar la PCR cuando sólo es conocida una secuencia interna. Muy útil en la identificación de secuencias que flanquean insertos genómicos.
9. PCR mediada por ligación: este método usa pequeños linkers de ADN ligados al ADN de interés y múltiples cebadores hibridando estos linkers.
10. PCR específica de metilación (MSP): se usa para detectar metilaciones en islas CpG de ADN genómico.
11. Amplificación Múltiple Dependiente de Sonda (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification o MLPA): permite amplificar varias secuencias objetivo con un único par de cebadores, evitando así las limitaciones de resolución de la PCR multiplex.



12. PCR cuantitativa: se usa para medir la cantidad de un producto de PCR (preferentemente en tiempo real).
13. PCR-TAIL: la PCR termal de entrelazado asimétrico es usada para aislar una secuencia desconocida que flanquea una secuencia conocida.
14. PCR *touchdown*: se trata de una variante de la PCR que se emplea cuando se desconoce la secuencia exacta de los extremos de la secuencia a amplificar, de modo que se asume que puede existir alguna base desapareada en el alineamiento cebador-secuencia. Su finalidad es reducir el fondo no específico bajando gradualmente la temperatura de hibridación a lo largo del progreso de la PCR.
15. PAN-AC: este método usa condiciones isotermas para la amplificación, y puede ser usado en células vivas.

12. APLICACIONES Y USOS DE LA PCR.

12.1 Virus del papiloma humano.

La historia natural de esta enfermedad implica la progresión gradual por etapas intraepiteliales preinvasoras (neoplasias intraepiteliales-NIE-I, II y III) o carcinoma in situ (CIS), de acuerdo a la proporción del grosor del epitelio cervical comprometido.^{26,27} La prevalencia global de estas lesiones preinvasoras es de 10 a 15%. Las edades de máxima prevalencia son entre los 15 y 30 años para la NIE I, 30 a 34 años para NIE II, y 35 a 49 para NIE III. La tasa de progresión de la neoplasia intraepitelial cervical se encuentra entre el 6% y el 34%^{28,29,30}, explicándole la amplitud de este rango por las condiciones de diferentes países,



distintas estrategias de detección precoz en distintas poblaciones, diferentes medios socioculturales y distintos estándares de atención sanitaria.

Según distintos estudios, la NIE I regresa en cerca del 70% de los casos^{29,30,31}, mostrando en cambio la NIE III una tasa de progresión a carcinoma invasor de hasta 70% y una tasa de regresión de 32%³⁰. La NIE II muestra tasas de progresión a CIS o neoplasia más severa de 25%, siendo su riesgo relativo de progresión a CIS de 4,2 y a neoplasia más severa de 2,5³². Debido a estos diferentes comportamientos evolutivos, se considera al NIE I como NIE de bajo grado y a las NIE II y III como de alto grado.

La etiopatogenia de esta enfermedad ha podido ser investigada en forma detallada gracias a avances en biología celular, molecular e inmunología. Estos avances han permitido conocer el rol del virus papiloma humano en el desarrollo de lesiones premalignas y malignas del cuello uterino y han tenido importantes implicancias en la metodología de screening, diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad³⁴.

12.1.2 Infección por virus papiloma y cáncer cervicouterino.

Los virus papiloma son un género de virus agrupados juntos por su tumorigenicidad y homogeneidad de DNA, que afectan a vertebrados. Actualmente se conocen más de 70 tipos de virus papiloma humanos (HPV), mostrando cada tipo un tropismo particular por sitios anatómicos específicos, siendo comunes las infecciones de piel y de mucosas del tracto oral, respiratorio y anogenital³⁵. La International Agency for Research on Cancer (IARC) de la OMS los clasifica como “carcinogénicos” (tipos 16 y 18), “probablemente carcinogénicos” (tipos 31 y 33), y “posiblemente carcinogénicos” (otros excepto 6 y 11)³⁶.



Se ha encontrado una fuerte asociación entre infección anogenital por VPH y desarrollo de neoplasia cervical intraepitelial y cáncer cervicouterino invasor.

Desde el punto de vista genómico, el DNA del HPV se divide funcionalmente en 2 tipos de genes: los tempranos (E), y los tardíos (L). Los tempranos son responsables de la replicación del DNA, regulación transcripcional, y transformación del DNA de la célula infectada.

Los genes tardíos codifican las proteínas de la cápside viral. Los productos de los genes tempranos actúan como oncoproteínas. Estas, expresadas en todos los tumores, inactivan a los productos génicos celulares supresores de tumores p53 y pRb, causando proliferación celular descontrolada^{38,39}. En los cánceres cervicouterinos asociados con VPH frecuentemente se encuentra una pérdida o disminución de la expresión alélica de las críticas moléculas clase I del complejo mayor de histocompatibilidad, que están íntimamente involucradas en el reconocimiento y presentación de antígenos de superficie. Su regulación causada por el VPH podría explicar por qué algunos cánceres escapan a la vigilancia inmunológica mediada por células.⁴⁰

La infección por VPH clínica y subclínica es la enfermedad de transmisión sexual (ETS) más común actualmente. La infección asintomática del cuello uterino por VPH se detecta en el 5 a 40% de las mujeres en edad reproductiva . La infección por VPH es un fenómeno transitorio o intermitente; sólo a una pequeña proporción de mujeres positivas para un determinado tipo de VPH se encuentra el mismo, en especímenes posteriores.⁴¹

El riesgo de NIE subsecuente es proporcional al número de especímenes positivos para VPH, lo que sugiere que el desarrollo carcinogénico resulta de infecciones persistentes. Actualmente está bien establecido que el principal factor causa de cáncer cervicouterino es la infección por VPH. La mayoría de la investigación



epidemiológica de los años recientes se ha focalizado en la comprensión del rol de factores de riesgo que influirán en la adquisición de infección persistente por tipos oncogénicos de VPH, o el de factores coexistentes que mediarían la progresión en

el continuo de los grados de lesión. Entre éstos tenemos: tabaquismo, polimorfismo del HLA o del gen p53, uso de anticonceptivos orales, paridad, otras ETS, y déficit nutricionales.

El riesgo relativo de la asociación entre infección por VPH y neoplasia cervicouterina es de alta magnitud, en el rango de 20 a 70. Este rango es mayor que para la asociación entre tabaquismo y cáncer pulmonar y es comparable solamente al de la asociación entre hepatitis B crónica y cáncer hepático, relaciones causales que son indiscutibles. Evidencia reciente usando meticulosos tests con reacción de cadena de polimerasa en una gran colección de especímenes de cáncer cervicouterino ha mostrado que el DNA del VPH está presente en el 99,7% de los casos^{47,48,49}. Este hallazgo indica que la infección por VPH podría constituir una causa necesaria de neoplasia cervicouterina, evidencia con obvias implicaciones para la prevención primaria y secundaria.

12.1.3 Screening citológico.

Pese a su éxito, la citología tiene limitaciones importantes, siendo los falsos negativos la principal (cerca de la mitad de los frotis son falsos negativos); cerca de un tercio de ellos atribuibles a errores en su interpretación y dos tercios a la toma de muestra y preparación de la placa⁵⁰.

La terminología recomendada actualmente para reportar los resultados de la citología cervical el sistema de Bethesda– considera la información referente a VPH como parte de los criterios citológicos para definir los grados de lesión.



Además, se ha creado una nueva categoría de lesiones borderline: células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS). Estos cambios han resultado en un aumento proporcional de lesiones de bajo grado (LSIL), las que, combinadas con ASCUS dan cuenta de hasta el 30% de los frotis⁵¹. En el seguimiento, la mayoría de estas anomalías regresan a normal, y en algunos casos constituyen lesiones de bajo grado persistentes o lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL) oculta (20% de las de bajo grado y 10% de las ASCUS)³².

12.1.4 Investigación actual y futura.

El reconocimiento de que la infección por VPH es la causa central de neoplasia cervicouterina ha creado nuevos frentes en la prevención primaria y secundaria de la enfermedad. Mediante la prevención y control de la infección genital por VPH se podría lograr la prevención primaria del cáncer cervicouterino. La prevención de la infección genital por VPH se podría conseguir con estrategias de promoción de la salud dirigidas a un cambio en el comportamiento sexual teniendo como blanco todas las ETS de significado en salud pública⁶².

La vacunación contra VPH podría tener gran valor en países en desarrollo, en los cuales ocurre el 80% de los nuevos casos de cáncer cervicouterino mundiales anuales, y donde los programas de screening con PAP han sido inefectivos por largo tiempo. Actualmente están en desarrollo dos principales tipos de vacunas: profilácticas para prevenir la infección por VPH y consecuentemente los diversos tipos de enfermedades asociadas al virus, y terapéuticas para inducir la regresión de lesiones precancerosas o la remisión de cáncer cervical avanzado.



Se ha encontrado que partículas virus-like libres de DNA sintetizadas por auto ensamblaje de proteínas de fusión del antígeno mayor de cápside viral L1 inducen una fuerte respuesta inmune humoral con anticuerpos neutralizantes⁶³. Así, estas partículas virus-like son los mejores inmunógenos candidatos para estudios de vacunas para VPH. La protección parece ser tipo específica, lo que requeriría desarrollar partículas virus-like para varios tipos oncogénicos. Se están evaluando tales vacunas en estudios fase I y II en diferentes poblaciones. Se ha reportado también que la inyección de fragmentos peptídicos de genes tempranos en ratas inducen respuesta inmune celular protectora contra la formación de tumores. La estimulación de la respuesta inmune mediada por células es una estrategia terapéutica atractiva para inducir rechazo tumoral y regresión tumoral.

También se ha encontrado utilidad de la determinación de RNAm y DNA de HPV en pacientes con cáncer cervicouterino por su asociación con el pronóstico de la enfermedad ^{65,66,67}, y de la determinación de anticuerpos contra VPH en pacientes con cáncer cervicouterino como predictores de sobrevida⁶⁸.

Con la progresiva revelación de los mecanismos celulares y moleculares responsables de la carcinogénesis y su relación con la infección por virus papiloma humano, se harán realidad estrategias dirigidas a prevención y tratamiento de la enfermedad basadas en regulación génica o de expresión proteica o modificación de la respuesta inmune humoral o celular para conseguir prevención de la enfermedad, y rechazo de tumores³⁴.

Estudios en curso de la epidemiología de la persistencia viral podrán ayudar a establecer la utilidad del test de VPH como herramienta de screening para cáncer cervicouterino. Las prioridades en la investigación en VPH debieran relacionarse



con: refinamiento de los métodos diagnósticos; definición precisa de la incidencia de VPH en la población; estudio de los riesgos asociados con ciertos genotipos de VPH para progresión de cáncer; identificación de factores coexistentes que influirán en la transmisión de VPH y en su rol carcinogénico.

Hasta el momento se han logrado identificar más de doscientos tipos virales clasificados según la homología de sus genomas, y de acuerdo al riesgo de transformación maligna de la siguiente forma: bajo riesgo: 6, 11, 32, 42, 43, 44, 54 y 81; riesgo intermedio: 50, 51, 52, 53, 58 y 83, y alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 56, 59, 66, 68 y 70. Estos tipos virales son los más comunes en lesiones cervicales y han sido utilizados como sondas para el diagnóstico molecular.

En la actualidad no existe un ensayo serológico confiable que permita diagnosticar la infección por VPH y el desarrollo de este ensayo tiene que enfrentar graves obstáculos. En primer lugar, el poco conocimiento que se tiene sobre los mecanismos de respuesta inmune del huésped a la infección y la evasión de esta respuesta por parte del virus. En segundo lugar, el hecho de no poder disponer de una proteína viral suficientemente antigénica en cantidades abundantes para desarrollar el ensayo; y por último la incapacidad de poder cultivar el virus *in vitro*, debido a que éste sólo prolifera en células diferenciadas permisivas y éstas no pueden mantenerse en cultivo. Puesto que el VPH se considera el agente etiológico del cáncer cervical, y se ha establecido como el principal factor de riesgo en el desarrollo de esta enfermedad, surge la necesidad de disponer de ensayos que permitan el diagnóstico temprano de la infección por VPH²⁶.

Las técnicas moleculares son sumamente sensibles y específicas, sin embargo, en los programas de despistaje, estas técnicas no se aplican debido a los altos



costos de las mismas y a la carencia de un tratamiento eficaz para eliminar la infección o incluso prevenirla; la única opción es la vigilancia intensificada para la portadora de VPH de alto riesgo²⁶.

En la actualidad, dos ensayos moleculares son utilizados para el diagnóstico y la tipificación de VPH: el test de captura de híbridos (*Hybrid Capture, Digene Diagnostics*, INC. Silver Spring, Maryland, EE.UU) aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*), y la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Esta última se ha desarrollado utilizando varios oligos iniciadores consenso con sensibilidades variables, y debe acompañarse de otra técnica de análisis que permita la tipificación del virus, como por ejemplo, la hibridación con sondas tipo específicas, análisis de secuencia o análisis de restricción²⁸.

La PCR es una técnica molecular poderosa, muy específica y sensible, capaz de detectar entre 10 y 200 copias de genoma viral por muestra, aunque es muy laboriosa y relativamente costosa, comparada con la tinción PAP. La técnica PCR-RFLP fue desarrollada para el diagnóstico y la tipificación de más de treinta tipos de VPH.

El método primario para la detección de VPH es la citología PAP, y desde su inclusión, esta metodología ha ayudado a reducir la incidencia del cáncer cervical en las naciones desarrolladas³⁵. A pesar de esto, la citología PAP tiene sus limitaciones; algunos estudios tipo meta-análisis indican que tiene una sensibilidad promedio del 51 % y una especificidad del 98 %, frente a la colposcopia o el análisis histológico de biopsias; es entonces, su alta tasa de falsos negativos su limitación más importante³⁶. Un tercio de los diagnósticos falsos-negativos se pueden atribuir a errores en la interpretación de la lámina y los otros dos tercios a la calidad de la preparación de la misma.



Las técnicas moleculares más utilizadas para la detección de VPH son el test de captura de híbridos y la PCR. La PCR se ha utilizado en el campo del diagnóstico desde sus inicios. Esta técnica es capaz de detectar el ADN diana mediante la utilización de oligonucleótidos iniciadores que complementan de forma específica con las regiones flanqueantes del ADN a amplificar³⁸. Mediante ciclos sucesivos de desnaturalización, anclaje y extensión, el ADN es amplificado muchas veces hasta obtener una señal fácilmente visible en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Puesto que el anclaje de los oligos es específica, la señal se obtiene si el ADN diana está presente en la muestra.

Las técnicas moleculares poseen una alta sensibilidad y especificidad.^{27,28} En estudios recientes, se ha comprobado que la sensibilidad de la citología frente a la prueba molecular PCR fue de 68% y su especificidad de 43,9 %, se observa que estos valores son diferentes a los obtenidos cuando la citología se compara con el análisis histopatológico, la especificidad es baja, sin embargo, su sensibilidad se ve incrementada en comparación con la obtenida frente al análisis histopatológico; esto se explica cuando queda establecido que la PCR es una prueba para detectar presencia de VPH, mientras que el análisis histopatológico busca determinar la presencia de lesiones más allá de si éstas se encuentran asociadas o no al VPH.

En pruebas y experimentos de laboratorio se ha encontrado que la PCR tendría una mayor sensibilidad comparada con la captura de híbridos y aun cuando su realización y ejecución requiera de un personal especializado y un tiempo de procesamiento más largo, es capaz de identificar el tipo viral infectante, distinguiendo entre más de 30 subtipos diferentes.

La infección productiva genera numerosas partículas virales fácilmente detectables por la PCR, generalmente ocurre en lesiones de bajo grado, mientras que en estado de latencia el virus no se replica activamente permaneciendo en las



células infectadas en una copia en estado episomal o integrada a un cromosoma del genoma celular, en ambos casos no hay replicación del genoma viral, esto puede ocurrir en lesiones de alto grado. El estado de latencia afecta la sensibilidad de la PCR, sobre todo si la muestra fue tomada de una zona donde las células portadoras son escasas o están ausentes.

La técnica de PCR-RFLP tiene la característica de poder determinar más de 30 genotipos virales ano genitales con una única reacción de amplificación y ésta es su mayor ventaja frente las metodologías que emplean primers específicos, pero su mayor desventaja es justamente no poder definir en ciertos casos los genotipos asociados cuando se presentan infecciones mixtas que frecuentemente producen patrones de restricción confusos. En estos casos se puede optar por otras metodologías moleculares de identificación como son la PCR con posterior hibridación por dot blot, PCR con primers específicos, o la secuenciación.

12.2 VIH.

12.2.1 Generalidades

No existe ninguna manifestación clínica que sea característica de la infección VIH o del SIDA y, aunque la presencia de alguna de ellas pueda sugerir en un contexto determinado la presencia de la infección, no es posible establecer un diagnóstico clínico de la enfermedad por lo que éste solo se puede establecer de un modo definitivo por técnicas de laboratorio. Por medio de ellas es posible detectar al propio virus o algunos de sus componentes, como proteínas y ácidos nucleicos (métodos directos, ya sea mediante cultivo vírico, detección de antígeno viral o la amplificación de una parte del material genético del virus, por ejemplo por PCR (reacción en cadena de la polimerasa), bDNA (ADN ramificado).



Sin embargo la práctica habitual es detectar los anticuerpos específicos que el organismo produce como respuesta a la presencia del virus (métodos indirectos) y la mayoría de las técnicas empleadas se basan en el enzimoimmunoanálisis (método ELISA o EIA.) para las pruebas masivas de cribado o en los inmunoblots para las pruebas de confirmación.

Por lo tanto en la mayoría de los casos la seropositividad frente al VIH se detecta a partir de una extracción sanguínea del sujeto con la que se realiza la determinación de anticuerpos anti-VIH por alguna técnica serológica.

Después de la exposición al VIH cerca de la mitad de los pacientes que se infectan desarrollan en las primeras semanas de infección (10-30 días) un cuadro pseudogripal que se conoce como síndrome retroviral agudo y que corresponde a las manifestaciones clínicas de la primo infección. Aunque después de la infección el primer marcador serológico que se detecta en algunos pacientes es al antígeno p24, algunas semanas después aparecen los anticuerpos que se dirigen frente al VIH y se pueden detectar por las técnicas de cribado actuales en la mayoría de los pacientes infectados antes de transcurridos tres meses de la exposición al virus. Dentro de los 6 meses de la infección por VIH más del 95% de las personas infectadas presentan seroconversión (paso de seronegatividad a seropositividad) por estas técnicas. Sin embargo el tiempo que transcurre entre la infección y la detección de la seropositividad, que también se denomina 'periodo ventana', es variable de unos sujetos a otros y también dependiente de la vía de transmisión por la que se ha adquirido el VIH; así se ha visto que los sujetos que se han infectado a partir de la recepción de sangre Contaminada por medio de transfusiones pueden tener anticuerpos detectables en la mayoría de los casos en 3-6 semanas, mientras que los sujetos infectados por vía sexual el periodo de



seroconversión es algo más largo.

En general las técnicas que son más sensibles para la detección de anticuerpos dirigidos frente al core del VIH se pueden positivizar antes, al igual que las que detectan anticuerpos de la clase IgM, si bien este tipo de anticuerpos no son específicos solamente de la primo infección y pueden aparecer en etapas posteriores del desarrollo de la infección. De este modo los primeros anticuerpos que se suelen positivizar son los anti-p24 y anti-gp160, mientras que el resto de los anticuerpos van apareciendo de modo progresivo en las Semanas siguientes.

Con el desarrollo de la infección y conforme se acerca la transición a SIDA algunos anticuerpos dejan de ser detectables y en casos excepcionales se ha descrito en adultos la completa negativización (serorreversión) si bien los casos no han sido completamente documentados. También en casos de rápida evolución de la infección se ha observado que los anticuerpos se han desarrollado tardíamente.

A diferencia de otras enfermedades infecciosas, en las que la detección de anticuerpos refleja usualmente una exposición previa al agente patógeno y su erradicación en un tiempo pasado, en la infección VIH/SIDA la presencia de anticuerpos expresa un estado de portador del virus, y por consiguiente la posibilidad de transmitirlo a otros, aún en ausencia de manifestaciones clínicas de la infección.



12.2.2 El cultivo viral y las pruebas de biología molecular.

Las pruebas de diagnóstico directo de la infección VIH proporcionan mayor certeza que las pruebas indirectas.

El cultivo viral queda restringido a laboratorios especializados y se considera como la técnica más específica para el diagnóstico de la infección VIH aunque en la actualidad su utilización puede quedar relegada a estudios de variabilidad genética, sensibilidad a antirretrovirales y epidemiología molecular, además de que puede ser necesario en el diagnóstico de la infección en el recién nacido y en las infecciones silentes. La principal muestra a partir de la que es posible el aislamiento del VIH-1 la constituye la sangre periférica, específicamente las células mononucleares que se extraen de ella, linfocitos y monocitos, por centrifugación en un gradiente de Ficol. Sin embargo el VIH-1 se ha cultivado a partir de otros muchos tipos de muestras diferentes (orina, semen, lágrimas, leche materna, tejidos, etc.).

Es frecuente la realización de cocultivos que básicamente consisten en la aportación de células mononucleares de sujetos no infectados a los cultivos con las células a estudio o con líquidos acelulares que podrían contener viriones; con ello se pretende, además de ser una aportación de nuevas dianas para la infección y replicación del virus, una interacción entre estímulos antigénicos. El medio de cultivo adecuado con la línea celular seleccionada se mantiene en incubación durante un mes y el crecimiento del VIH-1 se mide indirectamente por la detección de la antigenemia p24 en el sobrenadante, la actividad de la transcriptasa inversa o mediante la detección de ARN o ADN por técnicas de amplificación genética, pero también es posible la determinación del efecto citopático del virus mediante microscopía óptica invertida (dicho efecto se caracteriza por la presencia de sincitios como resultado de la fusión de al



menos dos células y que se utiliza para la clasificación fenotípica de los VIH-1 en inductores y no inductores de sincitios) o de partículas virales por microscopía electrónica.

La detección de material genético del VIH puede hacerse a partir de moléculas de ADN o de ARN que ofrecen información diferente de acuerdo con sus características funcionales. El ADN detectado se trata de ADN proviral presente en las células infectadas (principalmente en linfocitos T) y dado que las células se infectan de un modo irreversible es traducción de la incorporación del VIH a los cromosomas de la célula, mientras que el ARN expresaría el grado de la replicación viral e indirectamente permite valorar la funcionalidad de las células infectadas en cuanto a la producción de viriones o quiescencia del virus. El material genético puede recuperarse a partir de células o tejidos y también de líquidos acelulares que contienen partículas víricas circulantes.

Las pruebas de amplificación genética permiten la multiplicación exponencial (amplificación) de una zona de ADN simulando in vitro lo que ocasiona la replicación viral in vivo. La detección de secuencias de ARN del VIH-1 requiere que previamente a la amplificación el ARN se convierta en ADN lo que se consigue por una transcripción inversa que lleva a cabo una enzima denominada retro transcriptasa.

Bajo determinadas condiciones la presencia de una cadena de ADN diana puede permitir la síntesis enzimática de una cadena de ADN complementaria. La cadena diana actúa como molde de una enzima ADN polimerasa cuando la doble hélice se desnaturaliza por calor y en presencia de secuencias complementarias de oligonucleótidos, que actúan como 'cebadores', deoxinucleótidos trifosfatos y ciertos elementos tampón, (como Mg^{++}) que ayudan a estabilizar el proceso, son capaces de producir múltiples copias de la



cadena original. Para ello es necesario producir una serie de ciclos, en número variable, que agrupan tres hechos básicos que se deben desarrollar a diferentes temperaturas: desnaturalización del ADN diana a 92-96 °C, hibridación de los oligonucleótidos a un sitio complementario a 45-72 °C y extensión o copia de los oligonucleótidos a 72 °C por adición de los dNTP. Las diferentes aportaciones de cada uno de los elementos necesarios, las temperaturas y los diferentes ciclos necesarios así como su duración y oscilación dan lugar a múltiples variantes de la metodología que pueden conducir a resultados no comparables y condicionar la sensibilidad y especificidad de la técnica.

Una vez amplificado el material genético se debe detectar y existen también diferentes procedimientos de detección como la electroforesis en gel y visualización con luz ultravioleta tras tinción con bromuro de etidio, la visualización por autorradiografía tras hibridación con una sonda marcada radioactivamente, o técnicas de hibridación con sondas marcadas con biotina o quimioluminiscentes que se ponen de manifiesto por metodología similar a los EIA .

Con la metodología de la PCR es posible también la cuantificación tanto de ADN como de ARN del VIH (carga proviral y carga viral). Así como la técnica *AMPLICOR MONITOR para VIH-1 es una prueba de amplificación in vitro de ácidos nucleicos para la cuantificación del ARN del VIH-1 en plasma humano. Esta prueba puede utilizarse, junto a los datos clínicos y otros marcadores analíticos, como un indicador del pronóstico de la enfermedad.*

La prueba NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) se fundamenta en una amplificación basada en la transcripción y una detección basada en un método de electroquimioluminiscencia. Cada muestra se procesa con tres



controles o calibradores internos presentes a concentraciones diferentes (100, 10 y 1) que se diferencian entre si y del ARN amplificado del VIH en 20 nucleótidos.

La reacción de RT se lleva a cabo sobre la muestra y los calibradores mezclados, dando lugar a ADN de doble cadena; toda la amplificación se realiza a una misma temperatura (isoterma) y uno de los iniciadores contiene una zona promotora necesaria para la actuación de la ARN-polimerasa T7 que sintetiza ARN a partir de ADNc. La detección se basa en la emisión de luz por parte de átomos de rutenio unidos al ARN amplificado, que se cuantifica y extrapola sobre una recta obtenida a partir de la emisión de los calibradores.

En el bDNA (branched DNA o ADN ramificado) el material inicial son los viriones y no el ARN plasmático total. A diferencia de las anteriores no utiliza controles internos para cada muestra sino que se emplean para todas las muestras procesadas a la vez. El ácido nucleico extraído se fija en una microplaca que contiene sondas específicas y, sobre el ARN que se une, se fijan sondas de ADN con 15 ramificaciones, a cada una de las cuales se unen 3 sondas marcadas capaces de emitir luz al añadir un sustrato. Por cada molécula de ARN se unen cerca de 1.800 moléculas emisoras de luz y los datos se interpretan en función de las lecturas de los controles, cuya concentración es conocida. Las muestras se procesan por duplicado; si sus resultados tienen un coeficiente de variación mayor del 30% se desecha el resultado.

Mientras que bDNA y RT-PCR sólo se hacen con plasma, NASBA puede realizarse con plasma, suero, sangre total, semen, orina o líquido cefalorraquídeo. Existen variantes de todas las pruebas, en versiones mejoradas, que tienen mayor sensibilidad, es decir son capaces de detectar un menor número de copias/ml.



En la tabla siguiente (tabla 3) se reflejan las causas más frecuentes de resultados discordantes entre la PCR y marcadores de anticuerpos específicos.

PCR + en sujetos seronegativos	PCR - en sujetos seropositivos
Periodo ventana de la infección	Transmisión pasiva de anticuerpos
Infección por virus defectivos	Error técnico
Infección por cepas de virus poco replicativas	Técnicas de baja sensibilidad
Secuencias de otros retrovirus	Mutaciones de zonas críticas
Hipogammaglobulinemia	Reactividad cruzada en pacientes con lupus eritematoso, fibrosis quística o vacuna de la gripe (falsos + de los EIA)
Contaminación de laboratorio	

Tabla 3. Resultados entre PCR y Marcadores de anticuerpos específicos.

12.2.3 Falsos-positivos con la PCR.

•Un estudio de capacidad para valorar el rendimiento de la PCR en la detección de ADN libre-de-célula mostró un inquietante alto índice de positividad inespecífica utilizando los comúnmente usados iniciadores (SK 38/38 para el gag o el gen p24). Índices similares de positividad fueron hallados tanto para especímenes de anticuerpos-negativo como de anticuerpos-positivo (18% versus 26%).

•De 30 niños no infectados, 6 tuvieron resultados ocasionales de PCR positiva.

•La PCR realizada en niños no infectados por debajo de un año de edad, mostró 9/113 (9 de 113), 15/145, 13/137, 7/87, y 1/63 niños con test PCR-positiva.



- De 117 niños no infectados nacidos de madres infectadas por VIH, 6 (5%), dieron PCR falsos-positivos en sangre umbilical.
- En un estudio de capacidad de la PCR, 54% de los laboratorios involucrados tuvieron problemas con resultados falso-positivos, 9,3% del total de especímenes no infectados fueron dados como positivos.
- Uno de 69 anticuerpos-negativo no convertidos, resultó PCR positivo.
- Una persona de alto riesgo fue inicialmente PCR positivo, pero dio negativo al repetir el test PCR del mismo espécimen por dos laboratorios diferentes.
- El grupo de trabajo de la OMS para la PCR demostró altos niveles de resultados falso-positivos obtenidos en estudios de PCR para el VIH.
- De 327 trabajadores de cuidados sanitarios expuesto al VIH por medio de pinchazos con agujas hipodérmicas, 4 dieron uno o más resultados PCR-positivos y 7 dieron resultados indeterminados. Muestras posteriores dieron negativo para los 11, y ninguno se convirtió o desarrolló la antigenemia p24, llegando a la conclusión que tests falso-positivos ocurren incluso bajo las condiciones más rigurosas.⁶⁹

12.3 VIRUS DE EPSTEIN-BARR

El virus Epstein-Barr (EBV) es un Herpes virus humano tipo 4, linfotrópico, en cuyas células establece su infección latente. Se ha demostrado que este virus es el principal responsable de la Mononucleosis Infecciosa (MI), enfermedad de la adolescencia y de la infancia. Además puede producir ciertas formas de cáncer,



como el Carcinoma de Nasofaringe Indiferenciado (CNI), el Linfoma de Burkitt Endémico (LBE), o linfomas de células B en pacientes con inmunodeficiencias adquiridas o congénitas y existe una gran controversia sobre el papel de este virus como causa de enfermedad crónica, en especialmente en lo que respecta al Síndrome de Fatiga Crónica (SFC).

12.3.1 Estructura.

Como todos los de la familia es un virus grande, encapsulado y con una doble cadena de DNA. Mide unos 150 nm. Su cápside es icosaédrica con 162 capsómeros y todo el virus está envuelto por una cubierta con glicoproteínas. El espacio que existe entre la cubierta y la cápside, tegumento, está lleno de proteínas y enzimas de origen viral. Es sensible a los ácidos, disolventes, detergentes y desecación. El genoma está formado por una doble cadena de DNA lineal de distinto tamaño. Tiene dos secciones, una larga (UL) y otra corta (UC), flanqueadas cada una de ellas por dos grupos de repeticiones directas de DNA (LR) por lo que, a diferencia de otros tipos de virus herpes con grupos de repeticiones indirectas, solo muestra una configuración isomérica.

12.3.3 Replicación.

Los procesos moleculares de replicación de los herpes virus están regulados por factores virales y celulares. De forma esquemática diremos que la síntesis de proteínas virales se lleva a cabo en tres fases: 1) síntesis inmediata precoz de proteínas primarias necesarias para la síntesis de ácidos nucleicos y resto de proteínas virales, 2) síntesis de proteínas específicas y genoma viral y 3) síntesis tardía de proteínas estructurales y 4) Los factores virales y celulares determinan si el virus provoca una infección lítica, persistente o latente.



12.3.4 Estructura Antigénica

Cuando se produce la infección celular comienza la producción de proteínas virales. Estas proteínas incluyen los antígenos Tempranos (EA), los de cápside (VCA) y las glicoproteínas de membrana (MA).

12.3.5 Patogenia y Persistencia Viral.

El virus es transmitido mediante saliva infectada y alcanza las células epiteliales de la orofaringe en donde se replica con producción de viriones y lisis celular. Las células B son infectadas a su paso por la orofaringe o el epitelio del espacio postnasal. El virus utiliza para contactar con la célula una de las proteínas de su envoltura, gp350, que se une al receptor celular CD21 (el mismo que tiene para el C3d del complemento). La mayoría de los anticuerpos producidos durante la infección están dirigidos contra esta proteína y han existido ya intentos para desarrollar con ella una vacuna frente a esta infección. En la fase aguda solo un reducido número de células B permite la replicación viral con expresión de todos los antígenos virales, la formación de viriones y en último caso la lisis celular. La mayoría de ellas expresan solamente un número limitado de genes y no permiten en este momento la replicación viral (Infección latente). En algún momento de esta fase latente alguna de estas células puede entrar en actividad y permitir un ciclo completo replicativo. En la fase aguda las células infectadas son controladas por las NK y los linfocitos T que proliferan en gran cantidad, este aumento celular es el responsable del aumento de tamaño de los ganglios linfáticos, bazo e hígado que pueden verse en la fase aguda de la infección. En la fase de convalecencia y latencia son estos últimos el mecanismo más importante de vigilancia y control.

Las personas inmunocompetentes mantienen el VEB en los linfocitos B como una infección crónica latente la cual le ayuda a sobrevivir y a transmitirse a nuevas células del huésped. Esta larga convivencia es posible gracias a que el virus



desarrolla diferentes mecanismos para escapar a la acción del sistema inmune. Durante la fase aguda el virus expresa los productos de unos 90 genes mientras que en la fase latente solo son expresados los antígenos EBNA y LPM2 (EBNA 1,2,3A,3B,3C y las LPM relacionadas con la transformación celular 1,2Ay 2b). EBNA1 es necesario para que se auto mantenga el DNA en los linfocitos que se activan y LPM2 permite al virus permanecer latente limitando la expresión de genes en la membrana. Esta mínima expresión del repertorio de proteínas virales permite al virus minimizar el número de blancos para el sistema inmune. Otro mecanismo de defensa consiste en la expresión del gen BCRF1 que produce una proteína, EBV IL-10, similar en un 80% a la interleucina 10 (IL-10). De esta manera el virus produce una inhibición en la producción de Interferón y la síntesis de IL-1 e IL-12 con la consiguiente alteración de la diferenciación de los linfocitos B. El tercer mecanismo que puede emplear el VEB para persistir consiste en su capacidad para disminuir la producción y expresión de HLA I así como también de "proteínas transportadoras" en las células infectadas igualmente parece que EBNA1 puede inhibir el mecanismo de procesado de los antígenos virales. De esta forma se consigue una disminución de la expresión antigénica en las membranas celulares y una protección frente al poder destructor de los linfocitos T8.

12.3.6 Epidemiología.

Es un virus de amplia distribución, estimándose que cerca del 90% de los adultos han sido infectados. Se piensa que el 70% de la población se infecta antes de los 30 años. La seroepidemiología ha demostrado que en los países poco desarrollados la infección asintomática en los primeros años de la vida es lo más frecuente mientras que, por el contrario, en los países con mejor nivel de vida muchos individuos se escapan de la infección primaria hasta la adolescencia. Cuando la primoinfección se retrasa el virus tiene tendencia a producir síntomas.



12.3.7 Síndromes Clínicos.

La Mononucleosis infecciosa es la más típica forma clínica de la infección primaria por el EBV. Como sucede con los demás HV, la infección en niños es mucho más leve que la que se produce en adolescentes o adultos. El tiempo de incubación de alrededor de un mes. Después de un período prodrómico, caracterizado por escalofríos, sudoración, fiebre y malestar, se presenta la enfermedad, que en su forma más típica incluye la tríada de odinofagia, fiebre y linfadenopatías. También aparecen con frecuencia hepatoesplenomegalia y exantema. La mayoría de los casos remite de forma espontánea a las 3 o 4 semanas, aunque el cansancio puede durar un poco más tiempo. Existen algunas complicaciones importantes con alteraciones neurológicas (meningoencefalitis y Guillain Barré), obstrucción laríngea o rotura de bazo. En la gran mayoría de casos la recuperación es total mediante tratamiento sintomático.

Dado que el virus inmortaliza o transforma los linfocitos en cultivo, siempre se ha sospechado la participación de este agente en el Linfoma de Burkitt Endémico. La respuesta serológica característica en pacientes con Carcinoma Nasofaríngeo Indiferenciado también lo ha asociado con este virus. A diferencia del LBE las células que componen este tumor, también endémico de extremo oriente, son de estirpe epitelial.

Cada vez hay más pruebas de que la inmunosupresión o la alteración de la función de los linfocitos T favorecen la aparición de Enfermedades Linfoproliferativas en pacientes infectados por VEB. La leucoplasia peluda de los pacientes VIH positivos es un ejemplo.

El Síndrome de Fatiga Crónica (SFC) con cansancio crónico, febrícula, debilidad muscular e incapacidad para concentrarse se ha intentado relacionar con este



virus. La única prueba de esta asociación la constituye en una cierta elevación de los títulos de anticuerpos frente al virus.

12.3.8 Diagnóstico de la infección.

En general, el mejor procedimiento para el diagnóstico de laboratorio de las infecciones víricas es el aislamiento del virus o de alguno de sus componentes o productos. Aunque se reconocen tipos celulares naturalmente susceptibles a la infección por el VEB, *in vitro* se reduce prácticamente a linfocitos B, que son transformados, en un proceso lento y tecnológicamente complejo, por lo que el aislamiento es un procedimiento imposible para la gran mayoría de laboratorios de diagnóstico. La identificación de antígenos del virus tampoco ha resultado una aproximación adecuada. Por último, la detección de DNA del virus por la reacción en cadena de la polimerasa ha mostrado un buen rendimiento comparativo con los estudios serológicos para el diagnóstico de la mononucleosis en la fase aguda.

12.3.9 Asociación con PCR.

Algunos métodos específicos sensibles para detectar la infección por VEB se basan en la *hibridación in situ* (ISH), Southern Blot y PCR. ARN-ISH (Rish) para la detección de EBERs (VEB transcripciones altamente expresado en células infectadas latente) es el procedimiento estándar para VEB diagnóstico que permita la identificación y distinción de tipos de células infectadas. PCR basado en métodos se utiliza para determinar la cepa (tipo-1 o 2). Sin embargo, cuando sea estrictamente normalizada, el PCR puede tener un papel importante en el diagnóstico y el VEB en gestión de alto grado linfoma no Hodgkin (NHL).



12.3.10 Detección molecular.

La baja de detección de VEB en lymphoproliferations reactiva (4%) también señala la conveniencia de la adopción de PCR como prueba de cribado de rutina, que puede ser instrumentado sobre la base única ronda de PCR, disminuyendo los riesgos potenciales de contaminación cruzada.

En algunos experimentos de PCR anidada de los ensayos con Namalwa bien conservada de ADN puso de manifiesto que VEB se detectó por PCR sólo en los casos que muestran BM infiltración de VEB-positivo en las células tumorales. La detección molecular de VEB en los linfomas no ha producido la coherencia en los resultados debido a la heterogeneidad biológica y a las diferencias metodológicas. Los criterios diagnósticos recomendados por la OMS-IARC. son adecuados para las entidades como Hepatitis D, donde la heterogeneidad clínica de subtipos y tipos de células justifican este enfoque conservador. La Detección molecular VEB también debe considerarse con cautela en el periférico de células T NHL y anaplásico de células grandes, ya que comprenden entidades heterogéneas con la condición de clonalidad incierto.⁷⁰

12.4 APLICACIONES EN LA INVESTIGACIÓN BÁSICA.

Nuestro conocimiento de la estructura y función de los genes surge en gran medida de la determinación de su secuencia de bases. La secuenciación directa y el grado de multiplicación permitidos por la técnica PCR constituyen aportes esenciales de esta metodología a la investigación básica en biología molecular, ya que facilitan la tarea haciéndola más rápida y eficiente. Aunque los fragmentos de ADN de cadena doble obtenidos por amplificación pueden ser usados como moldes para una posterior secuenciación, resulta más conveniente utilizar cadenas simples. Cabe señalar que por el solo hecho de agregar en la reacción



base un exceso de uno de los *primers* se puede lograr que una de las dos cadenas del ADN desnaturalizado se multiplique diez veces más que la otra.¹⁰

El análisis de los niveles de los distintos ARN mensajeros (ARNm) presentes en una célula ha sido realizado tradicionalmente mediante procedimientos que incluyen los *Northern* (el *Southern* para ARN) y *dot blot* o la hibridación *in situ* (sobre la función del ARNm).¹⁰

La importancia de este tipo de análisis se debe a que esos niveles de ARNm, que son principalmente el resultado del control de la transcripción de los genes, reflejan el estado de desarrollo y diferenciación de la célula. La aplicación de la PCR ha dado lugar a una nueva modalidad para analizar el ARNm. Éste es aislado, en primer lugar, de tejidos o células y entonces se lo utiliza como molde para la fabricación de un ADN complementario (cADN) por parte de la enzima transcriptasa reversa. El cADN así obtenido es usado a su vez como molde que se replicará mediante la PCR, tras la aplicación de *primers* diseñados para delimitar la región que resulta de interés.

El control adecuado de todos los pasos de estas reacciones hace posible cuantificar con precisión los niveles de ARNm originales. La alta sensibilidad que caracteriza al método, llamado en esta variante RT-PCR (por *Reverse Transcriptase-PCR*), permite su uso en la detección y cuantificación de ARN mensajeros poco abundantes.

La técnica PCR puede ser utilizada, en algunos casos, para clonar genes cuya secuencia de bases es desconocida. Cabe preguntarse cómo se diseñan, en este caso, los *primers* necesarios para realizar la amplificación.

Si se determina experimentalmente la secuencia de aminoácidos que constituyen un segmento de la proteína cuyo gen se quiere clonar, se puede deducir cuáles son las secuencias teóricas de todos los posibles ARN mensajeros que codifican



para ese segmento. Con esta información se fabrican los dos *primers*, cada uno de los cuales es, en realidad, una mezcla de todos los oligonucleótidos posibles que el código genético permite deducir para codificar el segmento de proteína elegido. Se habla de "degeneración" del código genético aludiendo precisamente al hecho de que dada una secuencia de aminoácidos no se puede deducir con certeza la secuencia de nucleótidos que la codifica, ya que varias de ellas cumplen la misma función. Dicho de otro modo: varias secuencias de nucleótidos pueden dar lugar a un mismo aminoácido. La reacción de PCR se realiza con estas dos mezclas de "*primers* degenerados". En cada mezcla, sólo uno de los oligonucleótidos será totalmente complementario del fragmento de ADN a amplificar y funcionará realmente como *primer*. Una vez amplificado el fragmento, se estudia la secuencia y se comprueba su correspondencia con la de la proteína previamente caracterizada.¹⁰

Señalemos por último que la técnica PCR puede ser utilizada para cambiar la información contenida en un segmento de ADN, pues permite alterar su secuencia de bases. Esta "mutagénesis dirigida" consiste en el reemplazo de la secuencia génica original por otra, que puede diferir, por ejemplo, en una base respecto de la original. Esto se logra usando *primers* que, a pesar de portar la mutación, son igualmente capaces de aparearse con el molde y dar lugar a productos de amplificación con la secuencia cambiada.

12.5 APLICACIONES EN EL DIAGNÓSTICO MÉDICO.

La PCR ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico en numerosos campos de la medicina. Por ejemplo, existen métodos de detección por PCR de agentes infecciosos como los virus de las hepatitis B y C, del papiloma humano, de Epstein Barr y citomegálico. En relación con el SIDA es posible detectar regiones del genoma del virus de la inmunodeficiencia humana



(HIV) amplificadas por PCR a partir de sangre extraída de pacientes seropositivos. Esta técnica puede ayudar a resolver resultados inciertos provenientes de las pruebas habituales y ha sido aplicada en el diagnóstico de la infección en recién nacidos de madres seropositivas. En tales casos, el uso de la técnica PCR evita el problema que se plantea por el hecho de que la presencia de anticuerpos recibidos de la madre impide saber, hasta que éstos desaparecen aproximadamente un año después del nacimiento, si el propio organismo del niño ha generado anticuerpos porque se encuentra infectado.¹⁰

Pueden detectarse también otros microorganismos patógenos como las clamidias, la bacteria *Escherichia coli* enterotoxigénica, el vibrión del cólera y los tripanosomas.

La técnica PCR ha facilitado enormemente el diagnóstico de enfermedades hereditarias como hemoglobinopatías (talasemias y anemia falciforme), la fenilcetonuria, las hemofilias A y B, la deficiencia de alfa 1 antitripsina, la distrofia muscular y la fibrosis quística. Esta última es la más común de las enfermedades autosómicas recesivas severas que afectan a la población blanca. El aislamiento del gen afectado ha permitido identificar las mutaciones que causarían esta patología. La anulación de tres bases que provocan la ausencia del aminoácido fenilalanina N° 508 en la proteína que es producto del gen de la fibrosis quística constituye la mutación -llamada F508- más frecuente en caucásicos (60% de los afectados en la población argentina), por lo que su análisis resulta ser el primer paso destinado tanto a la detección de portadores sanos como a la confirmación del diagnóstico en individuos afectados y al diagnóstico prenatal.¹⁰

En enfermedades oncológicas pueden detectarse, mediante la técnica PCR, mutaciones de oncogenes (literalmente "genes inductores de cáncer") como en el caso del oncogén ras en carcinomas de colon, de páncreas y en leucemias mieloides; del "antioncogén" de retinoblastoma, o del llamado cromosoma



Philadelphia. Este cromosoma aparece en pacientes con leucemia mieloide crónica y es el resultado de la translocación de una porción del gen bcr desde el cromosoma 22 al 9, donde se ubica junto al oncogén c-abl.

La consiguiente activación de este último, que codifica para una enzima denominada tirosina quinasa, parece ser el desencadenante de la enfermedad. La técnica PCR es especialmente útil, en este caso, para detectar la presencia de ARN mensajero híbrido bcr/abl. El ARN es analizado mediante la ya mencionada técnica RT-PCR, con *primers* específicos que revelan la presencia de mensajeros normales o híbridos. En pacientes sometidos a quimioterapia, la gran sensibilidad del método lo hace ideal para identificar poblaciones residuales de células cancerosas no detectables mediante técnicas convencionales, de manera tal que permite diagnosticar tempranamente un nuevo avance de la enfermedad.

Se han implementado métodos que utilizan la PCR destinados a la evaluación del riesgo de padecer trastornos autoinmunes (perturbaciones debidas a agresiones "erróneas" realizadas por las defensas inmunitarias a órganos del propio paciente), tales como diabetes de tipo I, enfermedad celíaca, pénfigo vulgaris, miastenia gravis y esclerosis múltiple. Consideremos brevemente algunas situaciones vinculadas con los genes del llamado complejo mayor de histocompatibilidad (HLA), los cuales codifican para una serie de glicoproteínas de la membrana celular que participan en la iniciación de la respuesta inmunitaria.

12.6 Paleontología, Antropología Biológica, y Ciencias Forenses.

Los campos de la paleontología, antropología biológica y la medicina y antropología forense se han visto enormemente beneficiados por esta técnica, puesto que todas ellas construyen con frecuencia el conocimiento de sus correspondientes disciplinas gracias a restos o huellas de seres vivos. Uno de los materiales biológicos que más información puede proporcionar es el ADN.



La relativa estabilidad de éste permite que, aunque fragmentado, se conserve durante largos períodos si las condiciones son propicias.⁴ En ocasiones las muestras intactas con las que se puede contar son extraordinariamente pequeñas o están deterioradas. La PCR soluciona ambos problemas y proporciona cantidades útiles para posteriores pasos de análisis. En primer lugar aumenta la cantidad de material recuperado a partir de muestras escasas, puesto que como ya se dijo anteriormente, en teoría basta una sola molécula para que el proceso pueda tener lugar. También debido a la naturaleza de la técnica y su propósito de amplificación de fragmentos pequeños, esta fragmentación no impide que este ADN pueda ser empleado como molde para una reacción de PCR.

- En paleontología y Antropología la PCR permite recuperar las escasas cantidades de ADN que aún no se han degradado. Algunos lugares en que el ADN podría preservarse son la brea las cenizas volcánicas, el ámbar, hielos históricos polares o glaciares y ambientes áridos, sedimentos, así como en los cristales de apatita de restos de esqueleto,⁶⁹ siendo posible de ese modo caracterizar cadáveres, fósiles u otros restos mediante genotipado por análisis de micro satélites o incluso genomas de taxones extintos, amplificados de este modo, como pueden ser los realizados mediante el ADN genómico del hombre de Neanderthal.⁷
- El propósito sería utilizar este ADN amplificado para posteriormente realizar estudios filogenéticos o etnográficos o de poblaciones mediante la comparación de secuencias de ADN, o el estudio de las causas de la separación evolutiva de dos especies.
- En las ciencias forenses se emplea para establecer la filiación de una persona o para obtener pruebas a partir de muestras mínimas dejadas por el autor de un crimen como saliva, semen u otros restos de tejidos.



12.7 Agronomía y diversidad.

Tal y como la PCR multiplex permite producir huellas genéticas de individuos concretos, dentro del marco de la genética forense, existen métodos basados en la PCR que permiten discernir entre grupos infraespecíficos de cultivos de interés agronómico; por ejemplo, decultivares.⁸ Para ello, se emplean oligonucleótidos de un tamaño lo suficientemente pequeño como para que ceben de forma relativamente inespecífica, aunque siempre de tal forma que produzcan un patrón de bandas discreto e interpretable. De este modo, la pauta obtenida tras la electroforesis de los fragmentos tiende a agrupar a los individuos de mayor semejanza, que poseen un comportamiento similar, de los que divergen.⁷⁰

12.8 Obtención de huellas de ADN.

Aunque las pruebas de paternidad no forman parte del diagnóstico médico, sí constituyen un excelente ejemplo del empleo de ADN como huella genética. La PCR ha enriquecido este tipo de análisis por medio de la identificación de secuencias génicas propias de un individuo y/o de su descendencia.

Debido a la lentitud y a la escasa sensibilidad de los métodos convencionales, que implican el establecimiento de cultivos celulares, así como de largos períodos de incubación y/o observación histológica, la huella de ADN es un instrumento de gran utilidad en la clínica, en especial cuando la vida del paciente depende de una rápida y exacta identificación del patógeno.

La agilidad provista por la PCR para el diagnóstico molecular de las enfermedades infecciosas facilita la toma de decisiones e incide en la disminución de la morbilidad mortalidad asociada con la patología diagnosticada¹⁹. Así por ejemplo, la identificación mediante PCR del *Mycobacterium tuberculosis* o bacilo de Koch



tarda cuatro horas, tiempo irrisorio si se compara con las seis semanas que este microorganismo tarda en ser detectado en cultivo²⁰.⁷⁰

12.9 Detección de mutaciones.

El diagnóstico de ciertas enfermedades genéticas o de susceptibilidad a las mismas se puede efectuar en muestras de sangre, mediante la identificación de mutaciones o polimorfismos en un gen. Para esto, primero se amplifica por PCR el segmento génico que se sospecha afectado, y a continuación se puede optar por aplicar alguna técnica que permita diferenciar entre los segmentos provenientes de individuos afectados y los de los sanos utilizados como control. Aunque este concepto de la variabilidad genética humana en el que se apoya la prueba es en apariencia sencillo, su aplicación ha revolucionado el campo del diagnóstico, en virtud de que hace posible establecer si la alteración estructural de un gen es hereditaria o adquirida o si se desarrolla o no con la edad.

Algunas pruebas diagnósticas de rutina que se fundamentan en la PCR, son las diseñadas para identificar distrofias musculares de tipo Duchenne o Becker. Estas pruebas examinan la presencia de mutaciones en la región promotora del gen de la distrofina, así como la detección de exones en el mismo, hechos que en cualquier caso son responsables de generar una proteína anómala²³.⁷⁰

El diagnóstico de la enfermedad de Huntington se puede efectuar mediante la evaluación del número de repeticiones CAG que se han insertado cerca del origen del gen²⁴. Con respecto al cáncer de tipo heredofamiliar, son identificables, en caso de cáncer de mama, las mutaciones en los genes supresores tumorales BRCA1 y BRCA2²⁵, así como en el cáncer gástrico lo son las mutaciones en el gen CDH1²⁶. Con base en la detección de mutaciones específicas, es posible además diagnosticar mediante PCR, leucemias, linfomas y síndromes mielo displásicos, entre otros²⁷.⁷⁰



Una ventaja del diagnóstico temprano de susceptibilidad a una enfermedad de origen genético mediante PCR consiste en que permite, no sólo introducir cambios en el estilo de vida, la alimentación o aun farmacoterapia en el paciente, con el fin de detener o retrasar la manifestación de la enfermedad, sino también efectuar un seguimiento supervisado.⁷⁰

12.10 PATOLOGIAS BUCALES RELACIONADAS CON VPH IDENTIFICADAS POR PCR.

Diversos estudios han demostrado que el cáncer bucal es una patología de etiología multifactorial. Ciertos factores como edad, género, raza, genética, nutrición, hábitos y vicios pueden influir en el desarrollo de dichas patologías. Investigaciones realizadas en las últimas décadas han delatado al Virus del Papiloma Humano (VPH) como un potencial agente presencial en lesiones precancerígenas de cavidad oral. Los papilovirus o virus del papiloma están involucrados en la etiología de varias formas de neoplasias epiteliales en humanos. Los papilovirus son considerados el grupo más prevalente de virus causantes de tumores de cabeza y cuello asociados a la infección con VPH.

Se han encontrado más de 100 genotipos del VPH de los cuales solo algunos de ellos se consideran de alto riesgo para el desarrollo de lesiones neoplásicas. Este virus se considera como epitelio trópico por su afinidad a los tejidos epiteliales y se ha asociado a lesiones epiteliales escamosas, papilomatosas, carcinomas verrugosos en piel y en diversas mucosas.

Un gran número de reportes apoyan la hipótesis de que existen tipos específicos de virus del Papiloma humano que juegan un papel central en la patogénesis de las lesiones precursoras de las vías aerodigestivas superiores (VADS), e incluso se reporta que existen variaciones del tipo de VPH a nivel inter poblacional; de manera que para la ciencia es relevante el esclarecimiento de los VPH relacionados con esta secuencia de transformación maligna a través de la



tipificación molecular. Además se contribuye a las imprecisiones de diagnóstico clínico por metodologías convencionales que dificultan la detección precoz del cáncer de VADS, no obstante, la realización de estudios multidisciplinarios entre genetistas, odontólogos y médicos en diagnóstico molecular con PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism), son tan contundentes que contribuyen a la toma de decisiones de programas de prevención y control de diferentes tipos de neoplasias Malignas

12.10.1 Tipificación con PCR-RFLP.

Cuando se sospecha de asociación de VPH con carcinoma epidermoide, el tipo de virus puede ser tipificado mediante la técnica PCRRFLP. En la actualidad se han desarrollado un gran número de técnicas adecuadas para el diagnóstico de enfermedades, entre estas la PCR-RFLP que permite el análisis de la variabilidad genética de los virus por medio de los diversos patrones moleculares de su ADN

La PCR-RFLP se utiliza para el análisis de marcadores de micro satélite, que son pequeñas secuencias repetidas de ADN pero también ha demostrado efectividad en la evaluación de agentes causales relacionados con el desarrollo del cáncer. Probablemente, el análisis molecular se convierta en una técnica esencial en el diagnóstico y manejo del cáncer oral, la cual sería útil en la realización de programas preventivos.

Uno de los marcadores moleculares que más se ha utilizado para el estudio y tipificación genética de los virus del papiloma humano son los genes E6 y E7, y los genes GP5/GP6, Á-interferón y b-Interferón.

Este enfoque molecular, ha tenido un gran impacto en el diagnóstico de los agentes causales como virus especialmente en lo que respecta al estudio del desarrollo del cáncer, para establecer criterios de diagnóstico precoz y de



efectividad de los tratamientos. El análisis de este tipo de estudio nos permite definir el tipo de VPH presente en el tejido evaluado.

12.11 Detección de *Helicobacter Pylori* en Placa Dental por PCR.

La técnica de PCR ha demostrado ser muy útil en el diagnóstico de virus, parásitos y bacterias de difícil cultivo; porque ofrece un diagnóstico confiable, más rápido y menos laborioso que los cultivos normales de este tipo de microorganismos. Leontiodys en el 2000 refiere que *Hp* es un bacilo Gram-negativo, de forma espiral y con gran motilidad conferida por sus flagelos, responsable del 90% de las gastritis crónicas, 85-90% de las úlceras duodenales, 70-75% de las úlceras gástricas; y por estar asociado con la evolución de metaplasia a cáncer gástrico. En 1994 fue clasificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como carcinógeno tipo I.

Adicionalmente, se ha asociado de manera concluyente a distintas formas de gastritis, úlcera péptica de estómago y duodeno, adenocarcinoma gástrico y linfoma gástrico de bajo grado, originado en tejido linfoide asociado a la mucosa. Por ende, dicho microorganismo está vinculado a la alta incidencia mundial de las patologías mencionadas con un promedio de *Hp* del 60%, siendo una de las infecciones humanas más diseminadas a nivel mundial; Así, dicho autor ha mencionado el posible contagio por vía oral, ya que la saliva representa una vía potencial de transmisión del microorganismo y por tanto pudiera ser encontrada también, en surco gingival o en placa dental.

La presencia del *Hp* a nivel dental ocurre inmediatamente después de una limpieza dental, restauraciones y prótesis, donde se deposita una fina capa de glucoproteínas salivales sobre la superficie dental, adhiriéndose firmemente y posteriormente es colonizada por bacterias.



En pocas horas, algunas especies de *Streptococcus* y, posteriormente, de *Actinomyces* se adhieren a la película, dando inicio así a la etapa de colonización microbiana y a la formación de la placa dental. Posteriormente, otros microorganismos se establecen sobre los que ya se encuentran, incrementando el espesor de la placa dental y del número de microorganismos, por multiplicación y por agregación bacteriana.

Al mismo tiempo, surge la formación de la matriz de la placa, que ayuda a mantener estable la comunidad de microorganismos que conforman en si la estructura de la misma entre los cuales se encuentra *Hp*.

Debido a esto se han originado diversos estudios, con el objeto de aislar esta bacteria en restauraciones, prótesis y superficies dentales, utilizando metodologías tradicionales de cultivo o bien por el método de la PCR, la cual se basa en la amplificación de una secuencia de ADN bacteriano para constatar la presencia del microorganismo.

Dicho aspecto es de suma relevancia para el desarrollo del presente estudio, cuyo objetivo es reafirmar la efectividad de dicha técnica en el diagnóstico de *Hp*, en este caso en placa dental y su relación específica con afecciones gástricas, además de difundir los beneficios y futuras aplicaciones en el área de la odontología. Por ende, se evidencia la sensibilidad y especificidad del método de PCR en la identificación de esta bacteria en placa dental.

La infección por *Hp* es tan elevada en los pacientes con gastritis como en aquellos con mucosa gástrica sana, lo cual pudiera tener relación con la colonización de dicho microorganismo en placa dental.



La detección de *Hp* en placa dental indica que la colonización de esta bacteria no se limita a la mucosa gástrica y que el nicho bucal puede servir como una posible fuente de reinfección de la mucosa gástrica.

La placa dental realmente actúa como reservorio de esta bacteria y se advierte que los ensayos con PCR demuestran ser un método muy sensible y específico.

Por lo tanto, se considera el método de elección para detectar el ADN de *Hp* en la cavidad bucal.

Debido a la gran variabilidad genética del *Hp* demostrada por estudios de genotipificación y secuenciación, la mayoría de las investigaciones basadas en PCR, se han dirigido hacia la identificación de algunos genes específicos, dentro del cual destacan *el vacA*, *el cagA* y *el ureC*; sin embargo, cabe destacar que el gen *ureC* que expresa para una fosfoglucoamin mutasa (GlmM), la cual es esencial y exclusiva en el genoma del *Hp* para su crecimiento constituye el gen más empleado para realizar el diagnóstico, reportándose buenos valores de sensibilidad y especificidad.⁷¹

13. SINDROMES DETECTADOS POR PCR.

SINDROME	GEN Y HERENCIA	CARACTERISTICAS CRANEOFACIALES	CARACTERISTICAS EXTREMIDADES	
APERT ⁷²	FGFR2 Locus: 10q25-q26 AD	Turribraquicefalia, hipoplasia del tercio medio de moderada a severa	Sindactilia simetrica (manos y pies), acortamiento rizomelico, anquilosis de codos. No hay polidactilia	
CROUZON ⁷³	FGFR2 (diferentes partes excepto exón B) Locus: 10q25-q26 AD	Craneosinostosis coronal, exoftalmos, hipertelorismo, hipoplasia del tercio medio facial, nariz "en pico", orejas de implantación baja.	Ninguna alteración.	
CARPENTER ⁷³	RAB23 Locus: 6p12.1-q12 AD	Craneosinostosis, atrofia óptica, fisuras palpebrales antimongoloides, orejas grandes y de implantación baja.	Anomalías de los dedos de manos y pies: braquidactilia, polidactilia, sindactilia, clinodactilia.	
SAETHRE-CHOTZEN ⁷³	TWIST1 (se han registrado algunos con mutación en FGFR2) Locus: 7p AD	Braquicefalia, sinostosis coronal bilateral Asimétrica, Hipertelorismo, ptosis palpebral, menos frecuentemente hendidura palatina.	Anomalías de los dedos de manos y pies: braquidactilia y sindactilia parcial.	
PFEIFER TIPO II ⁷⁶	FGFR1 Locus: 8p11.2-p11.1 FGFR2 Locus: 10q26 AD	Craneosinostosis con cráneo en forma de trébol asimétrica craneofacial, hipoplasia maxilar, hipertelorismo, ptosis palpebral, estrabismo, paladar ojival.	Pulgares fusionados y anchos, braquidactilia, anquilosis de codos y rodillas, polidactilia.	



14. CONCLUSIONES.

El desarrollo de la potencialidad de esta técnica no fue producto del azar sino de la sorprendente creatividad de investigadores que, con base en un concepto tan simple como la obtención de copias de ADN a partir de un molde, hicieron posible que los beneficios de la técnica se extendieran más allá del campo del diagnóstico, para trascender hacia otras áreas de la medicina y la Biología.

Avances en el tamaño del producto amplificado, así como en la eficiencia y refinamiento de los equipos utilizados, no son difíciles de prever.

Los termocicladores serán cada vez más pequeños y los tiempos de ciclaje más cortos.

Será factible reconocer más de una región de ADN o de ARN por experimento, y los reactivos serán más eficientes.

Es de esperar que los avances en la PCR, sumados a los conocimientos obtenidos a partir del proyecto del genoma humano y al desarrollo de nuevas técnicas como la nanotecnología, puedan facilitar, en un futuro no muy lejano, el desarrollo de nuevas y más sensibles formas de diagnóstico lo que, a su vez, se traducirá en métodos de tratamiento más eficaces y personalizados.



15. BIBLIOGRAFIA Y HEMEROGRAFIA.

1. Mullis Kary, Dancing Naked in the Mind Field. New York: Pantheon Books. ISBN, 1998; 0-679-44255-3.
2. Rainbow, Paul, Making PCR: A –story of Biotechnology. Chicago:University of Chicago Press. ISBN 0-226-70146-8.
3. Mullis Kary, Dancing Naked in the Mind Field. New York: Pantheon Books. pp.18 ISBN, 1998; 0-679-44255-3.
4. Mullis Kary, The unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. Scientific American 1990; 262,4: pp. 56-61, 64-65.
5. Mullis KB,faloona FA: Specific Synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155: 335-350, 1987.
6. Brock TD: Life at high temperatures. Bacteriology 303: Procaryotic Microbiology, 1994 <http://www.bact.wisc.edu/Bact303/b27>
7. Mullis KB: The polymerase chain reaction. Nobel Lecture, December 8, 1993 <http://www.nobel.se/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html>
Kary Mullis Website: <http://www.karymullis.com>
8. Rainbow, P. Making PCR: A Story of Biotechnology. University of Chicago Press, Chicago.
9. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Bio/Technology 10: 413–417, 1992
10. EINSTEIN, B.I, "The polymerase chain reaction. A new method for using molecular genetics for medical diagnosis", en New English Journal of Medicine, enero 1990
11. MULLIS. K. B..1990,"The unusual origin of the poly merase chain reaction en Scientific American" vol. 262, págs. 56-65.
12. HANDYSIDE,A., KONTOGIANNI,E.H.,HARDY,K. y WINSTON,R.M.L., 1990, "Pregnancies from biopsed human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification", en Nature, vol. 344, págs.768-770.
13. Weiss SB, Gladstone L. A mammalian system for the incorporation of cytidine triphosphate into ribonucleic acid. Am Chem Soc. 1959; 81: 4118-9.



14. Keding C, Gniazdowski M, Mandel JL, Gissinger F, Chambon P. α -amanitin: a specific inhibitor of one of the two DNA-dependent RNA polymerase activities from calf thymus. *Biochem Biophys Res Commun.* 1970; 38: 165-71.
15. Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1973; 70: 3240-4.7.
16. Nathans D, Smith HO. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Ann Rev Biochem.* 1975; 44: 273-93.
17. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol.* 1971; 56: 341-61.
18. Mullis KB. The unusual origins of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* 1990; 262: 56-65.
19. Tsongalis GJ, Silverman LM. Molecular diagnostics: A historical perspective. *Clín Chim Acta.* 2006; 369: 188-92.
20. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 1975; 98: 503-18.
21. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. PCR Protocols. Academic Press Inc. Estados Unidos, 1990.
22. Bartlett, Stirling; A Short History Polymerase Chain Reaction. In: *Methods Mol Biol.* 226:3-6
23. Leonardo Sats M.; R. Kornbliht A.; La Reacción En Cadena De La Polimerasa El Método y sus Aplicaciones. 1993:4: pp 1-5.
24. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Hon GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985; 230: 1350-4.
25. Bustin S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology.* 2000. 25,169-193.
26. Richart RM: Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Obstet Gynecol* 1967; 10: 748-84.
27. Richart RM: Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* 1990; 75: 131-3ç



28. Hellberg D y cols: Positive cervical smear with subsequent normal colposcopy and histology. Frequency of CIN in a long-term follow-up. *Gynecol Oncol* 1994; 53: 148-51.
29. Nasiell K y cols: Behavior of mild cervical dysplasia during long-term follow-up. *Obstet Gynecol* 1986; 67: 665-9.
30. Ostör AG: Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: A critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12: 186-92.
31. Baldauf JJ y cols: Comparison of the risk of cytologic surveillance of women with atypical cells of low-grade abnormalities on cervical smear: review of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998; 76: 193-9.
32. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T: Natural History of Displasia of the Uterine Cervix. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(3): 252-8.
33. Hines JF, Ghim SJ, Bennet Jenson A: Human Papillomavirus infection. *BMJ* 1996; 312: 522-23.
34. Jensen AB, Lancaster WD: Papillomavirus and human cancer. Boca Raton: CRC Press, 1990.
35. IARC Working Group on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. Human Papillomavirus. Vol 64 of IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans. Lyon: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 1995.
36. Lorincz AT, Reid R, Jenson AB y cols: Human Papillomavirus Infection of the cervix: relative risks association of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992; 79: 328-37.
37. Lethinen M, Dillner J, Kmek P y cols: Serologically diagnosed infection with human papillomavirus type 16 and risk for subsequent development of cervical carcinoma: a nested case-control study. *BMJ* 1996; 312: 537-9.
38. Shlegel R: Papillomaviruses and human cancer. *Seminars Virology* 1990; 297-306.
39. Franco EL, Villa LL, Richardson H y cols: Epidemiology of cervical human papillomavirus infection. En: Franco EL, Monsonégo J (eds). *New Developments in Cervical Cancer Screening Prevention*. Oxford, UK: Blackwell Science 1997; 14-22.
40. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE y cols: Persistence of type specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis* 1994; 169: 235-40.



41. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP y cols: Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999; 180: 1415-23.
42. Ho GYF, Burk RD, Klein S y cols: Persistent genital human papillomavirus infections as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1365-71.
43. Muñoz N, Bosch FX, Desanjose S y cols: The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 1992; 52: 743-9.
44. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN y cols: Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 958-64.
45. Franco EL: Cancer causes revisited: Human papillomavirus and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 779-80.
46. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N y cols: Prevalence of human papilloma virus in cervical cancer: A worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
47. Walboomers JMM, Meijer CJLM: Do HPV negative cervical carcinomas exist? *J Pathol* 1997; 181: 253-4.
48. Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM y cols: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189: 12-9.
49. McCrory DC, Matchar DB, Bastian L y cols: Evaluation of cervical cytology. Evidence report-technology assessment no 5; AHCPR publ n99-E010. Rockville, MD: Agency For Health Care Policy Res 1999.
50. Results of the National Breast and Cervical Cancer Early Detection Program. *MMWR* 1994; 43: 530-4.
51. Solomon D: Screening for cervical cancer: prospects for the future. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1018-9.
52. Franco EL: Summary and discussion: epidemiology of HPV and anogenital neoplasms. En: Muñoz N, Bosch FX, Shah KV, Meheus A (eds). *The Epidemiology of Human Papillomavirus and Cervical Cancer*. Oxford, UK: Oxford University Press 1992; 283-4.
53. Franco EL, Syrjäen K, De Wolf C y cols: Meeting Report: new developments in cervical cancer screening and prevention. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev*. 1996; 5: 853-6.
54. Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A y cols: HPV DNA testing in Cervical Cancer Screening. *JAMA* 2000; 283: 87-93.



55. Cervical Cancer: NIH Consensus Statement 1996;14(1): 1-38.
56. Bevers MW, Bodurka DC, Wolf JK: Gynecologic cancers. En: Feig BW, Berger DH, Fuhrman GM: The MD Anderson Surgical Oncology Handbook, 2nd ed. Lippincott: Williams & Wilkins 1999; 384.
57. González-Merlo J, González E, Biete A y cols: Cáncer de cérvix. En: González-Merlo J, González J y cols: Ginecología. 2^a ed. Masson 2000; 150-67.
58. Keys HM, Bundy BN, Stehman FB y cols: Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. N Engl J Med 1999; 340: 1154-61.
59. Morris M, Eifel PJ, Lu J y cols: Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. N Engl J Med 1999; 340: 1137-43.
60. Rose PG, Bundy BN, Watkins EB y cols: Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. N Engl J Med 1999; 340: 1144-53.
61. Meheus A: Prevention of sexually transmitted infections through health education and counselling: a general framework. En: Franco EL, Monsonog J (eds). New Developments in Cervical Cancer Screening and Prevention. Oxford, UK: Blackwell Science 1997; 84-90.
62. Suzich JA, Ghim S, Palmer-Hill EI y cols: Sistemic immunization with Papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. USA: Proc Natl Acad Sciences 1995; 92:11533-7.
63. Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom MP: Vaccination with citotoxic T lymphocyte epitopecontaining peptide against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. Eur J Immunol 1993; 23: 2242-9.
64. Pao CC, Hor JJ, Yang FP y cols: Detection of human papillomavirus mRNA and cervical cancer cells in peripheral blood of cervical cancer patients with metastasis. J Clin Oncol 1997; 15: 1008-12.
65. Chih-Jen Tseng, Chia C, Pao, Jen Daw Lin y cols: Detection of human Papillomavirus types 16 and 18 mRNA in peripheral blood of advanced cervical
66. cancer patients and its association with prognosis. J Clin Oncol 1999; 17(5): 1391.
67. Schwartz SM, Daling JR, Shera KA y cols: Human papillomavirus and prognosis of invasive cervical cancer: a population-based study. J Clin Oncol 2001; 19(7): 1906-15.
68. Viladu P, Bosch FX, Castellsague X y cols: Human papillomavirus DNA and antibodies to human papillomaviruses 16 E2, L2 and E7 peptides as predictors of



survival in patients with squamous cell cervical cancer. J Clin Oncol 1997; 15: 610-19.

69. Albert J, Fenyo EM. Simple, Sensitive, and Specific Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Clinical Specimens by Polymerase Chain Reaction with Nested Primers. Journal of Clinical Microbiology 1990; July:1560-1564.

70. Villegas E.V; Sanches C.M.Chuaire L.;Reacción en cadena de la Polimerasa y Diagnóstico Molecular; 2009;4:3 347-52.

71. Kabris S. Detection of Helicobacter pylori DNA in feces and saliva by polimerase chain reaction: a review. Helicobacter 2004;9:115-23.

72. Kennet L. Jones. Síndromes de Craneosinostosis en Atlas de Malformaciones Congénitas 4ª edición Capítulo 1, editorial Interamericana MC Graw Hill México 1990.

73. Gorlin RJ. Cohen MM Jr, Levin LS. *Syndromes of the head and the neck*. Oxford University Press 3º Edición 1990- USA- Cap. 14- 15.

74. Teebi AS. Kennedy S. Chun K. Ray PN. Severe and mild Phenotypes in Pfeiffer Syndrome With aplice acceptor mutations in exon ille FGFR2 Am J Med. Genet. 2002; 107:43-7.