

LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A DOS DÉCADAS DE SU INVENCION

IRAM PABLO RODRÍGUEZ SÁNCHEZ*, HUGO A. BARRERA SALDAÑA*

Pocos descubrimientos del complejo mundo científico actual pueden ser considerados realmente revolucionarios. Sin embargo, cuando ocurren se transforma el modo en que se piensa y trabaja en el laboratorio.

Aunque el progreso en las diferentes ramas de la ciencia parece ser lento y su evolución resulta una letanía de «paso a paso», en el caso de la biología molecular ha sucedido lo contrario. Esta disciplina ha sido afortunada con grandes cambios en tiempos relativamente cortos.

Una época nutrida de dichos cambios fue la década de 1970, en la que se produjo un gran número de descubrimientos, como el de las enzimas de restricción, la clonación de genes en plásmidos y fagos, y las técnicas de hibridación en filtro para ADN y ARN, conocidas como “Southern” y “Northern blot”, respectivamente; así como las invenciones de las técnicas de secuenciación química y enzimática para el ADN.¹

Otro salto tecnológico ocurrió en 1983, cuando Kary Mullis (figura 1) desarrolló una nueva técnica que hizo posible la síntesis de grandes cantidades de un fragmento de ADN sin tener que clonarlo: la reacción en cadena de la polimerasa (conocida como PCR por sus siglas en inglés). Esta técnica es considerada la más revolucionaria del último cuarto del siglo XX.² Con ésta se consigue copiar millones de veces, en un par de horas, una secuencia predeterminada, dentro de una mezcla de ADN tan compleja como el propio genoma humano, donde la secuencia de interés representa tan sólo una diezmilésima parte.³

Pero la PCR no es sólo una técnica exquisitamente específica, sino también muy sensible, pues en principio para practicarla bastaría una sola molécula, por ejemplo, del genoma humano (~6 picogramos), aunque habitualmente se emplean cantidades excesivas de éste (en el orden de hasta microgramos).

Además, por si estos atributos fueran pocos, la técnica es tan robusta que puede usar como sustrato para la reacción al ADN, sin tener que purificarlo de su fuente natural, y es común emplear productos biológicos diversos como tejidos embebidos en parafina, semen recuperado de escenas de violación, lavados bronquiales, exudados de mucosas, raíces de cabellos o cejas, sangre, extendidos citológicos, etc.; muchas veces basta una simple ebullición de la muestra para lisar, liberar y de paso desnaturar el ADN, dejándolo listo para la reacción.



Fig. 1. Kary B. Mullis. Este singular empleado de la compañía Cetus Corporation, en Emeryville, California, se hizo acreedor del Premio Nobel en 1993 por la invención de la PCR, técnica utilizada para multiplicar millonariamente *in vitro* fragmentos específicos de cualquier ADN. Fuente: Archivos de la ULIEG.

*Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

¿Qué es la reacción en cadena de la polimerasa?

La PCR es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN.^{3,4}

La PCR es una técnica de biología molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades ínfimas de un cierto ADN específico, posibilitando su fácil identificación y prescindiendo del uso de radioisótopos, indispensables antes de su invención.

Al principio, su inventor enfrentó dos problemas fundamentales: uno era que en cada ciclo había que añadir la enzima ADN polimerasa, ya que ésta se inactivaba con las temperaturas tan altas demandadas para desnaturar el ADN y exponer las bases nitrogenadas de sus nucleótidos. Otro inconveniente era que había que hacerlo manualmente en tres baños mantenidos a las diferentes temperaturas requeridas, pasando rápidamente la muestra de un baño al otro y luego al último, repitiendo esto varias decenas de veces.⁵

El descubrimiento de una bacteria (*Thermus aquaticus*) que vive en aguas termales junto a geisers a 75°C, la cual tiene una ADN polimerasa que funcionaba bien a altas temperaturas (72°C) e incluso es estable a 94°C, supuso un gran avance, ya que sólo tenía que ser añadida al principio y se mante-



Fig. 2. Termociclador (Mastercycler® gradient thermal cycler).⁹ A estos aparatos se les atribuye junto con las ADN polimerasas termoestables el permitir automatizar por completo la PCR.

nía activa durante todo el proceso.⁶ Esto, junto con el diseño de los termocicladores o aparatos que consisten en un bloque que puede ser programado para calentarse y enfriarse rápidamente en determinados tiempos, condujo a la automatización total del proceso (figura 2).^{7,8}

¿Cómo funciona la PCR?

La reacción consta, por lo regular, de una treintena de ciclos repetitivos conformados cada uno de tres pasos: el primero consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN para desnaturarlo, para lo que se incuba a una temperatura de alrededor de 95°C, por un minuto. Este paso expone las bases nitrogenadas del ADN blanco. En el segundo ocurre la hibridación de las cadenas desnaturadas del ADN blanco con los denominados cebadores o iniciadores (ADN sintético de hebra sencilla), a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADNs. Esta temperatura depende de la temperatura de fusión (T_m) de los iniciadores, la cual puede calcularse mediante una fórmula (ver más adelante), pero generalmente oscila entre 50 y 60°C. El tercer paso se efectúa a 72°C, temperatura a la que la polimerasa extiende la longitud de los cebadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde¹⁰ (figura 3).

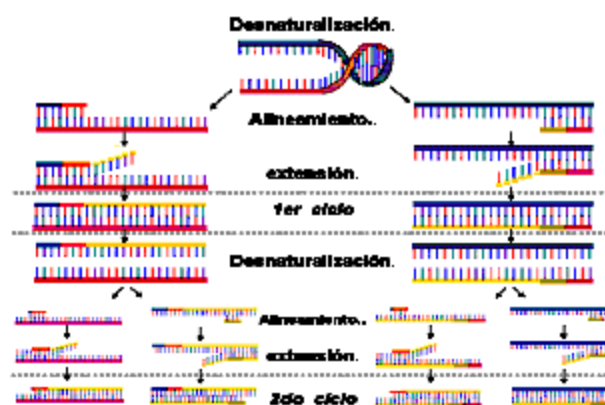


Fig. 3. Ciclos de la PCR. La PCR se integra por ciclos de tres diferentes periodos de incubación y temperaturas.

¿Con qué ingredientes se practica la reacción?

Para realizar una PCR se necesita mezclar en un tubo el ADN que contiene la secuencia a amplificar, ambos cebadores que se alinearán a las cadenas simples del ADN, la mezcla de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfatados (dNTPs) en cantidades suficientes, el tampón de reacción para la polimerasa, agua ultrapura para completar el volumen final de reacción (que normalmente oscila entre 20 y 100 μ l), y como ingrediente final crucial para la reacción, la enzima ADN polimerasa termoestable.²

Solución amortiguadora

La solución amortiguadora para la reacción se emplea, comúnmente, concentrada diez veces, y por lo general incluye Tris-HCl (pH=8.4 a temperatura ambiente), KCl, gelatina y $MgCl_2$.

Algunos autores recomiendan el uso de adyuvantes, los cuales en la práctica aumentan la especificidad y fidelidad de la reacción, tales como el dimetilsulfóxido (DMSO) añadido para disminuir la estructura secundaria del ADN,¹¹ detergentes como el tween 20 o el Tritón X-100, que ayudan a estabilizar la enzima, y, finalmente, el polietilenglicol (PEG), el glicerol, la formamida, o la seroalbúmina bovina, entre otros; aunque en ningún caso estos últimos son imprescindibles.

Magnesio

Tanto el ión magnesio como el manganeso tienen una función crítica en la reacción, requiriéndose a una concentración que oscila regularmente entre 0.5 y 2.5 mM. La concentración de $MgCl_2$ debe optimizarse para cada ensayo en particular, ya que puede tener efecto tanto en la especificidad como en el rendimiento de la reacción. En general, concentraciones insuficientes de Mg^{+2} dan lugar a bajo rendimiento, mientras que en exceso se obtienen ampliaciones inespecíficas.²

Desoxirribonucleósidos trifosfatados (dNTPs)

Los cuatro dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP; distinguibles por sus bases nitrogenadas) son los ladrillos con los que se construyen las nuevas cadenas de ADN (figura 4).

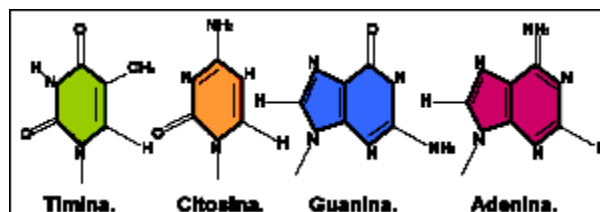


Fig. 4. Bases nitrogenadas. Estos componentes de los nucleótidos son la clave de la especificidad del apareo de las cadenas del ADN, apareándose siempre una purina con una pirimidina

La variación en su concentración afecta la especificidad y fidelidad de la reacción. Concentraciones altas de los mismos hacen disminuir la fidelidad con la que la polimerasa efectúa su trabajo, e incluso pueden llegar a inhibir su actividad. También afecta a la fidelidad de la reacción el uso de concentraciones desbalanceadas de estos cuatro ingredientes, siendo las concentraciones usuales, en la mayoría de los casos, entre 0.2 a 1 mM.

Los dNTPs pueden captar iones de magnesio por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación, aconsejándose que la concentración de Mg^{+2} sea 0.5 a 1 mM superior a la concentración de los dNTPs.

Cebadores o iniciadores

Éstos son el componente más sensible que determina el éxito de un ensayo de PCR. Su longitud suele estar entre 18 y 30 nucleótidos, y su contenido en G+C entre 40-75%. La concentración a la que suelen emplearse en una PCR está en el intervalo de 0.1-0.5 μ M. Los iniciadores normalmente se diseñan para ser exactamente complementarios al molde de ADN.²

Los cebadores ideales deben carecer lo más posible de estructuras secundarias, así como de complementariedad entre sí. La complementariedad en el extremo 3' induce a que ambos iniciadores se traslapen en dicho extremo y sirvan de templados y a su vez de iniciadores entre sí, para que la polimerasa los extienda y genere así pequeños amplicones referidos como dímeros de cebadores. Estos dímeros son productos cortos que se amplifican muy eficientemente, reduciendo la cantidad de cebadores disponibles en la reacción, y provocando un menor rendimiento del amplicón de interés.¹²

Los iniciadores utilizados para la amplificación de un grupo de secuencias génicas relacionadas

suelen usarse degenerados, y en realidad son una mezcla de cebadores de la misma longitud con ciertas diferencias de secuencia en posiciones específicas, de tal forma que se abarque un intervalo amplio de posibles secuencias blanco.¹³

En estos casos se debe procurar que la degeneración sea mínima en el extremo 3', puesto que en éste, las bases desapareadas se extienden con poca eficiencia. Ambos iniciadores deben tener una temperatura de fusión o T_m similar y, por ende, un contenido semejante en G+C. La fórmula más utilizada para calcular la T_m de un iniciador es: $T_m = (2^\circ\text{C}) (\# \text{ de A+T}) + (4^\circ\text{C}) (\# \text{ de G+C})$.²

La distancia que separa los sitios donde se aparean los cebadores dentro del ADN molde determina el tamaño del producto de amplificación. El tamaño ideal depende de la aplicación: los productos largos se amplifican con menor eficiencia, mientras que los productos muy cortos pueden confundirse con dímeros de los iniciadores y limitan mucho la posibilidad de caracterizarlos posteriormente.

Existen diferentes programas computacionales que ayudan en el diseño de cebadores y calculan sus T_m s, estructuras secundarias y posibles interacciones entre ellos.¹⁴

Los cebadores se sintetizan en el laboratorio mediante un proceso escalonado en el que se van añadiendo nucleótidos libres al extremo de la cadena en crecimiento. El extremo 3' del nucleótido iniciador de la futura cadena se fija a un soporte sólido como una partícula de gel de sílice. Un sintetizador de ADN o «máquina de genes» realiza la síntesis en fase sólida, añadiendo paso a paso cada nucleótido en una serie de etapas (figura 5). Al final de cada ciclo de adición, la cadena en crecimiento



Fig.5. "Máquina de genes". Actualmente existen máquinas capaces de construir cadenas nucleotídicas de tamaños que hasta hace poco serían inimaginables. Máquinas como la aquí mostrada (Oligo 1000M DNA Synthesizer)¹⁶ son las encargadas de fabricar los oligonucleótidos utilizados durante la PCR.

se separa de la mezcla de reacción mediante filtración o centrifugación. A continuación se repite el procedimiento para unir otro nucleótido. Se invierten aproximadamente 40 minutos en añadir un nucleótido a la cadena y es posible sintetizar cadenas con una longitud de hasta 100 nucleótidos.¹⁵

Como ya se dijo, estos iniciadores no deben ser complementarios entre sí, para que no se hibriden entre ellos. Y deben flanquear los extremos de la porción de ADN que se desea amplificar, debiendo de formar puentes de hidrógeno con dicho ADN a ambos lados de la región de interés.

Diseño de los cebadores

Para la elección de los iniciadores existe una serie de normas que pueden ayudar, aunque hay que indicar también que existen programas de cómputo que facilitan esta tarea (ADNsis, Primer3, Oligo, etc.).

Deben evitarse tramos largos de una sola base y que el extremo 3' tenga una estructura secundaria importante. También se debe procurar en lo posible que las últimas bases del extremo sean G o C, para que le brinden mayor estabilidad al punto de inicio de la etapa de extensión.¹⁷

Como ya se dijo, se debe evitar la complementariedad entre la pareja de iniciadores para minimizar la posibilidad de que se creen dímeros de cebadores.

Normalmente deben tener un tamaño de 18-30 nucleótidos, y que éste sea similar para ambos cebadores. La temperatura de hibridación de los cebadores al molde se ajusta para que sea, cuando mucho, 5°C menor que la temperatura calculada según la fórmula arriba citada.

Enzima

Sólo pueden utilizarse polimerasas que sean capaces de actuar a las altas temperaturas empleadas en la reacción. En la actualidad la mayoría de las polimerasas que se suministran comercialmente son versiones recombinantes e incluso mejoradas por ingeniería genética.¹⁸

Dos enzimas de uso muy extendido son la ADN polimerasa *Taq*, proveniente de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*⁶ y la *Vent* de la bacteria *Thermococcus litoralis*.¹⁹ Sus temperaturas óptimas de catálisis oscilan alrededor de los 72°C, temperatura a la cual incorporan aproximadamente 100 nucleótidos por segundo, siendo estables a altas tem-

peraturas, incluso por encima de 92°C.

De las dos enzimas señaladas, la popularidad alcanzada por la *Taq* rebasa por mucho y en diferentes aspectos a otras polimerasas. Esta enzima es una proteína que consta de una sola cadena polipeptídica con un peso molecular de aproximadamente 95 kDa, cuenta con actividad de exonucleasa 5'→3'.²⁰ Y su fidelidad de replicación depende de la concentración del ión Mg⁺² y de los dNTPs, así como del que exista o no balance en la concentración de estos últimos.

Existen otras enzimas que se usan también aparte de la *Taq* y la *Vent*, en donde se requiere actividad correctora para mayor fidelidad de copiado, como la *Pfu*, extraída originalmente de *Pyrococcus furiosus*²¹ o *UITma*, proveniente de *Thermotoga maritima*,²² o bien, que tienen también en determinadas condiciones actividad de reverso transcriptasa, lo que les permite catalizar tanto una transcripción reversa (conversión de ARN a ADN), como la propia PCR, como es el caso de la enzima de *Thermus thermophilus*, ya fabricada por ingeniería genética y simplemente conocida como *rTh*.^{23,24}

ADN

La cantidad de ADN molde puede ser de tan sólo 1 ng en el caso de material genético clonado (en virus o plásmidos), o de un mínimo de 20 ng, cuando se utiliza ADN genómico proveniente de células eucariotas. De hecho, como se ha mencionado arriba, el molde puede ser también ARN que sea previamente transformado en ADNc mediante transcripción reversa. Hay muchas formas posibles de preparar el molde para PCR.

En general, no es necesario purificar el molde, porque la reacción puede tolerar la presencia de impurezas, pero hay que tener mucho cuidado de eliminar, lo más posible, la presencia de inhibidores de la polimerasa, sobre todo en las muestras clínicas. Si el material son suspensiones celulares, puede ser suficiente con romper las células por calor.

Pero para la mayoría de las muestras clínicas es necesario realizar un procedimiento de extracción con fenol-cloroformo y posteriormente precipitación de ácidos nucleicos con isopropanol o etanol.

Agua

El agua se usa como solvente del resto de los ingredientes y se requiere al menos destilada.

Las etapas de un ciclo de reacción

Tres son los pasos a seguir y a repetir por cada ciclo de la PCR. A éstos comúnmente se les refiere como desnaturalización, alineamiento y extensión. Si de trabajar con ADN genómico se trata, regularmente se agrega una etapa previa de desnaturalización a 94°C, para relajar las posibles estructuras secundarias y de otros tipos. Después de concluida ésta, se repiten los diferentes ciclos en los que tanto la temperatura como el tiempo serán específicos del producto a amplificar y del origen del ácido nucleico que servirá, como ya se mencionó, de plantilla o molde a copiar por la polimerasa utilizada.²⁵

Desnaturalización

El sustrato de la enzima de la PCR es el ADN de simple cadena que actúa como molde para la síntesis de su nueva cadena complementaria. Mediante un calentamiento a 94°C, el ADN de doble cadena logra que sus cadenas se separen o desnaturalicen (figura 6).

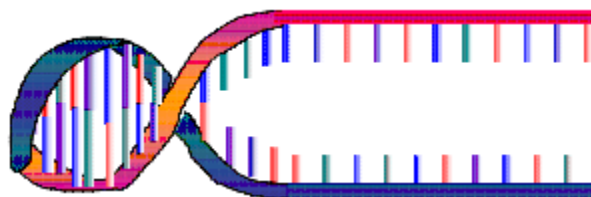


Fig. 6. Desnaturalización del ADN. Los puentes se rompen dejando al ADN en forma de cadena sencilla, permitiendo así exponer las diferentes bases nitrogenadas para la hibridación con los oligonucleótidos cebadores.

Ésta es una etapa crítica, ya que es muy importante que el ADN molde se desnaturalice completamente, lo que se consigue a temperaturas de 94°C, durante por lo menos un minuto. Si la muestra tiene alto contenido de G+C, se recomienda aumentar de preferencia el tiempo.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la actividad de la enzima decrece de manera muy rápida a partir de los 95°C (vida media a 92.5°C = 2h, a 95°C = 40 min. y a 97.5°C = 5 min.), por lo que a estas temperaturas o superiores es aconsejable disminuir el tiempo de incubación. En la práctica se suele empezar con un período de desnaturalización prolongado (cinco minutos a 94°C), para asegurarse que la desnaturalización se lleve a cabo a lo largo de toda la molécula del ADN.²

Alineamiento

La enzima, como todas las ADN polimerasas, necesita del grupo OH⁻ libre en el extremo 3' del iniciador ya apareado al sitio blanco de la amplificación, a partir de donde iniciar la síntesis. Este punto constituye el sitio de crecimiento de la cadena complementaria al molde.

Mientras que un cebador (referido como el 5' o sentido) es complementario a la secuencia del extremo 5' de la región del ADN molde a amplificar, el otro es al extremo 3' de la misma, pero en la cadena opuesta (figura 7).

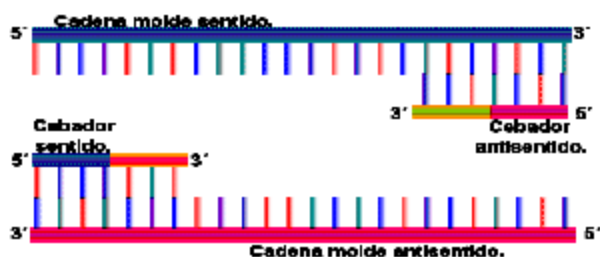


Fig. 7. Inicio de la reacción de la PCR. Los cebadores complementarios que flanquean el sitio a amplificar se enlazan formando puentes de hidrógeno. De esta manera la polimerasa puede comenzar a extenderlos para copiar ambas hebras molde.

El alineamiento específico de ambos cebadores se produce a una temperatura determinada por composición de bases y oscila entre 40 y 72°C. Ambas cadenas originales del ADN sirven simultáneamente como moldes para sintetizar sus respectivas cadenas complementarias nuevas.

Un aumento de temperatura favorece la especificidad, ya que disminuye las uniones incorrectas de los cebadores con sitios apócrifos del ADN molde.²

Extensión

Con el ADN molde de cadena sencilla, excepto en los sitios donde los iniciadores se aparean, la polimerasa empieza a copiar la hebra, incorporando desoxirribonucleósidos monofosfatos en dirección 5'→3' (figura 8). Esta etapa debe realizarse a una temperatura alta, que es la que coincide con la máxima actividad de la polimerasa (72°C) para evitar alineamientos inespecíficos de los iniciadores.

El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación, debiendo estimar 1 min. para alargar 1000 nucleótidos. Es común que al finalizar to-

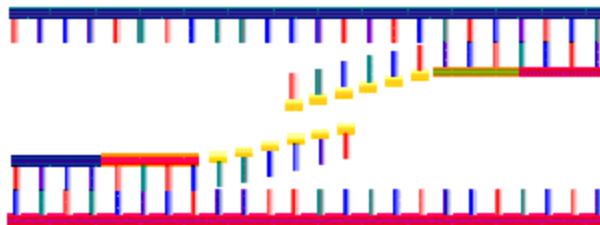


Fig. 8. Progreso de la reacción de la PCR. A la temperatura óptima de la ADN Polimerasa Taq (72°C), la enzima agrega los dNTPs a partir del 5' hacia el extremo 3'.

dos los ciclos se realice un último alargamiento por 5 min. a 72°C, para asegurarse que todos los productos de amplificación estén completamente terminados y tengan, por ende, exactamente la misma longitud.²

Naturaleza exponencial de los ciclos

Al final del primer ciclo, ambas hebras de una molécula bicatenaria de ADN a las que se les hayan apareado los iniciadores han sido copiadas para generar dos nuevas cadenas bicatenarias (figura 9).

Cuando se repite por segunda ocasión el ciclo de tres pasos, las dos moléculas del primer ciclo se copian para producir ahora cuatro moléculas. El tercer ciclo genera ocho moléculas.

En teoría, 20 ciclos producirán aproximadamente un millón de copias de la molécula molde de ADN, y 30 ciclos generarán alrededor de mil millones de copias de ésta.

Pero en la práctica, el proceso no es tan eficiente. El número de ciclos que se utiliza adquiere gran relevancia a la hora de optimizar una PCR. Este número depende de la cantidad de ADN que existe en

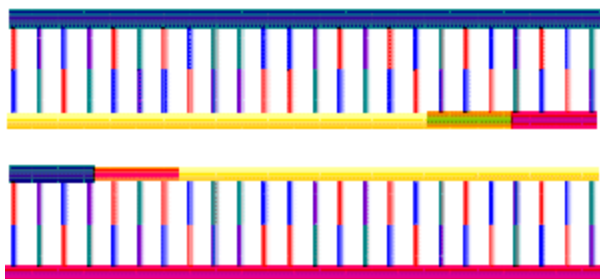


Fig. 9. Conclusión de la PCR. Teóricamente entre más ciclos de reacción integren el programa de amplificación, más productos idénticos se generarán. Pero al aumentar los ciclos también se aumenta proporcionalmente la posibilidad de agregar errores en las nuevas secuencias.

la muestra una vez que el resto de factores han sido optimizados (normalmente de manera empírica).

Es importante evitar un número alto de ciclos, ya que pueden dar lugar a la amplificación de productos no deseados originados por hibridaciones inespecíficas.

Hay que tener en cuenta que la enzima sufre el efecto meseta que describe la atenuación en la tasa de la acumulación del producto, reflejándose esto en que después de un número determinado de ciclos la amplificación deja de comportarse de manera exponencial, volviéndose aritmética, y finalmente llega a una fase estacionaria. Afortunadamente, cuando el efecto meseta se presenta, la cantidad de ADN sintetizado es suficiente para su posterior utilización.^{26,27}

Evolución de la técnica

La tecnología de la PCR está experimentando continuas mejoras.^{28,29} Por ejemplo, y como ya se hizo referencia arriba, ahora es posible utilizar eficientemente el ARN como sustrato, ya que la ADN polimerasa rTth también posee actividad de retrotranscriptasa, y, por ende, convierte el ARN a ADNc, y acto seguido lo amplifica.²³

Como se ha mencionado anteriormente, el ADN blanco que se va a amplificar suele tener una longitud máxima a las 3000 bases. Pues bien, ya es común emplear la técnica de «PCR larga», capaz de amplificar secuencias de hasta 40,000 bases de longitud, lo cual facilita el desarrollo de proyectos genómicos.^{30,31}

Otro claro ejemplo de la sofisticación de esta reacción es su versión en «tiempo real», que permite cuantificar con una alta confiabilidad la concentración de hasta múltiples sustratos presentes de una reacción, en virtud de que cada cadena copiada genera una señal fluorescente de longitud de onda distinta que es medida al instante por el mismo termociclador de tiempo real.³²

Aplicaciones

Las aplicaciones de la PCR son múltiples, abarcando desde la evolución hasta la clínica, pasando por la genética, la biología molecular y la biotecnología; amén de aplicaciones en la agricultura y la ganadería.

La PCR es especialmente útil en la detección de enfermedades genéticas tales como la fibrosis quística,³³ la hemofilia clásica³⁴ y las distrofias mus-

culares Duchenne/Becker.³⁵

Esta técnica ha tenido un impacto mayúsculo en la medicina forense, campo en el que se está utilizando en investigación criminal como parte de la tecnología de la «huella digital» del ADN. Gracias a su aplicación, es posible excluir o incriminar a sospechosos utilizando muestras extremadamente pequeñas de material biológico encontrado en la escena del crimen.³⁶

En microbiología, la PCR permite identificar al agente infeccioso independientemente de su respuesta serológica, lo que representa una gran ventaja en casos donde los anticuerpos aparecen luego de un largo período de infección y a veces en forma impredecible. También en aquellos numerosos casos donde se quiere distinguir si la presencia de anticuerpos es señal de infección antigua o activa, como ocurre ante el hallazgo de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C, y la necesidad de precisar si el virus está presente o no.³⁷

También es de gran utilidad en el diagnóstico de enfermedades virales neonatales, donde el diagnóstico serológico de la infección es generalmente enmascarado por la presencia de anticuerpos maternos circulantes.³⁸

Otra de sus aplicaciones es en el estudio del complejo mayor de histocompatibilidad que determina los antígenos conocidos como moléculas HLA de clase II, que son las que establecen la compatibilidad en trasplante de órganos.³⁹

La PCR permite estudiar no sólo organismos vivos, sino también sus restos fósiles, congelados o momificados. Incluso se puede partir de ADN de especies diferentes, y mediante el empleo de iniciadores consenso lograr la amplificación de secuencias génicas de una especie cuya secuencia del gen de interés es aún desconocida.⁴⁰

También puede servir para medir la expresión de un determinado gen. Para ello se extrae ARN mensajero, se le practica una retrotranscripción con la que se obtiene un ADNc, y éste se utiliza como material de partida para la amplificación. Al partir de ARNm en vez de ADN genómico, se está estimando la expresión de un determinado gen que incluso puede llegar a realizarse de una manera semicuantitativa.⁴¹

Diagnóstico de enfermedades hereditarias

Un fragmento obtenido por PCR puede ser utilizado directamente para clonación, para ser secuenciado,

o para ser utilizado como sonda en hibridaciones en filtro tipos "Southern" o "Northern".

También mediante una simple electroforesis en gel se puede estudiar, a nivel de ADN genómico, la existencia de deleciones e inserciones en un gen determinado.⁴²

Enfermedades cuya base es una mutación puntual pueden ser diagnosticadas por PCR, si luego se trata con una enzima de restricción cuyo sitio se ve afectado por dicho cambio puntual en la secuencia nucleotídica.⁴³ Incluso, puede estudiarse a los descendientes del paciente en cuestión que aún no han desarrollado la enfermedad, para ver si han heredado la mutación responsable (portadores) de la enfermedad.

Aunque controversial por no disponer de cura, ya es posible estudiar también si un determinado gen causante de una enfermedad de la madurez está latente desde la niñez, como en el caso de la corea de Huntington,⁴⁴ la enfermedad de Alzheimer,⁴⁵ etc.

Diagnóstico de enfermedades oncológicas

La PCR permite estudiar alteraciones genéticas en proto-oncogenes y en genes supresores de tumores que están involucrados en el origen de las neoplasias.⁴⁶ El seguimiento de los resultados obtenidos con un tratamiento puede ser monitoreado mediante la detección por PCR de células malignas; es posible llegar a detectar hasta una célula cancerígena en 10^6 células normales, siendo la sensibilidad alcanzada más que la de cualquier otra técnica.⁴⁷ Esto es ampliamente aplicado en malignidades hematopoyéticas para la detección de enfermedad mínima residual.⁴⁸

Diagnóstico prenatal

De una pequeña cantidad de sangre extraída al feto o de una biopsia de tejido placentario (vellosidades coriónicas) es posible obtener ADN sobre el cual se pueden practicar estudios como los arriba descritos.

En efecto, desde hace más de una década se ha venido analizando el ADN de embriones incipientes (productos de fertilización *in vitro*), regularmente en la etapa de mórula, para el sexado de éstos y la selección de aquellos que no porten mutaciones de enfermedades que se sabe frecuentemente en la pareja en cuestión (figura 10).⁴⁹

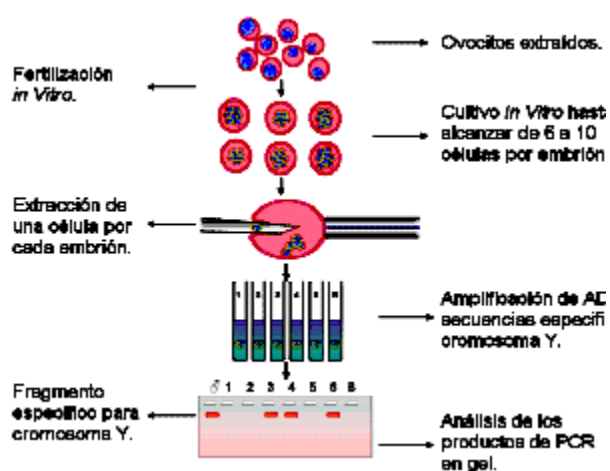


Fig. 10. Mecanismos para el sexado y selección de embriones. Mediante PCR se puede determinar el sexo de un feto e incluso de un embrión incipiente. Modificada de la imagen 6-11 de Watson JD y cols.⁵⁰

Este análisis puede ser de gran valía para el caso de trastornos heredados ligados al cromosoma X, donde en los embriones o fetos del sexo femenino se descarta la enfermedad o en el peor de los casos se confirma la condición de portadora; mientras que en los del sexo masculino se precisa si serán sanos o afectados.⁵¹

Actualmente, este tipo de estudios se puede realizar también buscando células o ADN del feto en la sangre periférica de la madre, sin la necesidad de intervenir al feto.^{52,53}

Sin embargo, estas aplicaciones prenatales han resultado polémicas por los posibles riesgos éticos y de discriminación.

Detección de enfermedades infecciosas

Mediante PCR es posible monitorear infecciones bacterianas⁵⁴ y virales.⁵⁵ Los procedimientos convencionales de detección se basan en la posibilidad de crecer los microorganismos en cultivo o en detectar su presencia en el paciente mediante anticuerpos. La desventaja de estos métodos es que pueden tardar semanas. La PCR detecta directamente los patógenos tradicionalmente difíciles de cultivar, tales como *Chlamidia trachomatis*,⁵⁶ *Legionella pneumophila*⁵⁷ y *Mycoplasma pneumoniae*.⁵⁸ Así como a aquellos que requieren de largos períodos para su cultivo y que se encuentran en muy baja concentración en los líquidos biológicos, como el caso del *Mycobacterium tuberculosis*,⁵⁹ enfermedad

en la que muchas veces el tratamiento empírico tiene que iniciarse antes del diagnóstico definitivo, apoyándose hasta hace poco únicamente en el cuadro clínico.⁶⁰

Mediante el PCR es posible amplificar secuencias correspondientes al virus o a la bacteria de una manera específica y muy sensible, pudiendo llegar a detectar un microbio entre 10^6 células infectadas con agentes infecciosos como el del SIDA,⁶¹ hepatitis B,⁶² tuberculosis,⁶¹ herpes,⁶³ brucelosis,⁶⁴ malaria,⁶⁵ etc. Dentro del campo del SIDA se está utilizando para el diagnóstico prenatal, y para cuantificar la carga y la actividad viral mediante la obtención de ADNc y amplificación de secuencias específicas del virus. Esto último se utiliza para dar seguimiento del éxito de los tratamientos.

Estudios de evolución molecular

La PCR ha sido utilizada para generar secuencias de genes a lo largo de la evolución y establecer el grado de relación entre especies y poder construir así árboles filogenéticos.^{66,67} La homología se mide comparando cambios nucleotídicos en el mismo gen entre diferentes especies o por comparación de genes mitocondriales que no se recombinan durante la meiosis y tienen un alto porcentaje de puntos de mutación. Incluso se pueden estudiar especies extintas o fósiles (se ha logrado amplificar ADN de

hasta millones de años de antigüedad), extrayendo el ADN de piezas que se encuentren en los museos (figura 11).⁶⁸

También se han realizado estudios de evolución entre poblaciones humanas, llegando a la conclusión del origen africano de nuestra especie, gracias al estudio del ADN mitocondrial.⁶⁹

Biología y ciencias agropecuarias

La PCR también ha facilitado la obtención y, de paso, la modificación (vía oligonucleótidos mutagénicos) de secuencias génicas para su integración en vectores de expresión, dándole mayor versatilidad a las técnicas de ingeniería genética que han hecho posible la biología moderna.⁷¹ Igualmente, es la base de métodos para diferenciar variedades vegetales, así como para identificar si un organismo, ya sea animal o vegetal, corresponde a uno genéticamente modificado.⁷²

Pero quizá el mayor impacto en las ciencias agropecuarias se ha dado en el campo diagnóstico, donde la PCR es la base de innumerables métodos de detección de plagas⁷³ y parásitos.⁷⁴

Finalmente, también se ha visto cómo en años recientes, métodos de PCR para determinar la "huella genética" en humanos, son ahora aplicados con éxito en el ganado.⁷⁵

Recomendaciones

Hasta aquí todo parece un camino sin obstáculo alguno, en el que la PCR ha podido sustituir a muchas técnicas dando mayor especificidad y sensibilidad. Pero precisamente esto último es su principal problema. Su gran sensibilidad se ha vuelto en su contra, pues, por pequeña que sea la menor contaminación de la muestra inicial, puede tener serias consecuencias. Si el ADN de partida se contamina, se amplificarán también estas contaminaciones. Una fuente de contaminación importante puede ser el ADN del propio operario o el disperso en el ambiente. Así, se han dado casos en ensayos de análisis de sexo en que el propio operario varón ha contaminado la muestra o en análisis de fósiles donde ha aparecido ADN humano; lo mismo en análisis forenses donde la muestra se ha contaminado. Pero la principal fuente de contaminación son los propios productos de reacciones anteriores: cualquier fragmento amplificado puede contaminar nuevas muestras y ser de nuevo amplificado. Para intentar



Fig. 11. Estudios de evolución. Los fósiles encontrados se convierten en fuentes de material genético confiables para realizar estudios evolutivos a manera molecular.⁷⁰

evitar estos falsos positivos, siempre deben tenerse en cuenta las siguientes normas: deben separarse en el espacio y en el tiempo las etapas de preamplificación y amplificación; siempre deben utilizarse testigos negativos, donde en lugar de poner ADN se substituya su volumen por agua. Además, las muestras deben ser analizadas -por lo menos- por duplicado. Jamás deben almacenarse productos de PCRs con muestras biológicas que servirán de substratos o de reactivos. Igualmente, se recomienda no usar un alto número de ciclos, ya que la tasa de error es proporcional al número de éstos.⁷⁶

Los anteriores riesgos y limitaciones son el verdadero problema que ha impedido que la PCR se haya popularizado aún más, después de todos estos años, como la técnica única para muchas pruebas de diagnóstico. Hoy por hoy existe la alta posibilidad de falsos positivos.

Como se puede apreciar, las aplicaciones de esta novedosa técnica parecen no tener límites, pues en esencia el proceso permite, como se ha dicho, encontrar una aguja en un pajar, al generar un segundo pajar lleno de copias de dicha aguja.

Resumen

La PCR, técnica inventada por Kary B. Mullis en 1983, emplea un par de oligonucleótidos para delimitar una región de interés y una polimerasa para extenderlos, utilizando ambas hebras del gen en cuestión como plantilla. Al repetir este ciclo decenas de veces, se duplica cada vez el fragmento de ADN en cuestión. Así se logra copiar millones de veces la secuencia de interés, aunque se encuentre entre millones de otras secuencias de ADN.

A 20 años de su invención, la PCR se cataloga como la estrella de las herramientas de la biología molecular. En la actualidad son innumerables las aplicaciones de su utilización en múltiples campos de las ciencias biológicas, agropecuarias y de la salud.

Palabras clave: Taq ADN polimerasa, Oligonucleótidos cebadores, PCR, Amplicones.

Abstract

The PCR, a technique invented by Kary B. Mullis in 1983, uses a pair of oligonucleotides to flank a gene region of interest and a polymerase to extend them, using both strands of the gene as the template. By repeating this cycle dozens of times, the DNA frag-

ment of interest is duplicated even more. Thus, it results in millions of copies of the specific DNA sequence, even if it is part of a complex DNA mix. 20 years after its invention, the PCR is catalogued as the star tool of molecular biology. In the present time, its application in biological, farming, and health sciences are innumerable.

Keywords: Taq DNA polymerase, Oligonucleotide primers, PCR, Amplicons.

Agradecimientos

La presente revisión se modeló tomando en cuenta un sinnúmero de acertadas opiniones provenientes de amigos y colegas de la ULIEG, así como de los revisores de la misma, con quienes estamos agradecidos.

Dedicatoria

Los autores desean dedicar este trabajo al profesor Robert M. Chandler Burns, como un homenaje póstumo por sus dos décadas de innumerables e invaluable revisiones a los manuscritos de la ULIEG para revistas internacionales.

Referencias

1. Barrera Saldaña HA. Información genética: estructura, función y manipulación. Conacyt, Colección Ciencia Básica. México. 1992.
2. Barrera Saldaña HA, Ortiz López R, Rojas Martínez A, Reséndez Pérez D. Reacción en cadena de la polimerasa: Una nueva época dorada en la biología molecular. Ciencia y Desarrollo, (Conacyt) 1993; 18 (108): 50-60.
3. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci Am. 1990; 262 (4): 56-61, 64-5.
4. Templeton NS. The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. Diagn Mol Pathol. 1992; 1 (1): 58-72.
5. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986; 51 (1): 263-73.
6. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988; 239 (4839): 487-91.

7. Bertrand O, Delfau MH, Garbarz M, Picat C, Devaux I, Dhemy D, Boivin P, Grandchamp B. An efficient laboratory made apparatus for DNA amplification. *J Biochem Biophys Methods*. 1989; 18 (3): 227-35.
8. Wittbrodt J, Erhardt W. An inexpensive and versatile computer-controlled PCR machine using a Peltier Element as a thermoelectric heat pump. *Trends Genet*. 1989; 5 (7): 202-3.
9. http://www.brinkmann.com/pdf/bs-manuals/mastercycler_gradient.pdf
10. Baumforth KR, Nelson PN, Digby JE, O'Neil JD, Murray PG. Demystified ... the polymerase chain reaction. *Mol Pathol*. 1999; 52 (1): 1-10.
11. Pomp D, Medrano JF. Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. *Biotechniques*. 1991; 10 (1): 58-9.
12. Brownie J, Shawcross S, Theaker J, Whitcombe D, Ferrie R, Newton C, Little S. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25 (16): 3235-41.
13. Rose TM, Schultz ER, Henikoff JG, Pietrokovski S, McCallum CM, Henikoff S. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res*. 1998; 26 (7): 1628-35.
14. Gorelenkov V, Antipov A, Lejnine S, Daraselia N, Yuryev A. Set of novel tools for PCR primer design. *Biotechniques*. 2001; 31 (6): 1326-30.
15. Smith M. Applications of synthetic oligodeoxyribonucleotides to problems in molecular biology. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1980; (7): 387-95.
16. [http://www.beckmancoulter.com/Literature/BioResearch/1793A\(T\).pdf](http://www.beckmancoulter.com/Literature/BioResearch/1793A(T).pdf)
17. Henke W, Herdel K, Jung K, Schnorr D, Loening SA. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25 (19): 3957-8.
18. Jin C, Liu H, Yang S, Zhang S. Cloning and overexpression of thermostable DNA polymerase gene in *Escherichia coli*. *Chin J Biotechnol*. 1995; 11 (3): 185-91.
19. Cariello NF, Swenberg JA, Skopek TR. Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (Vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19 (15): 4193-8.
20. Longley MJ, Bennett SE, Mosbaugh DW. Characterization of the 5' to 3' exonuclease associated with *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res*. 1990; 18 (24): 7317-22.
21. Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*. 1991; 108 (1): 1-6.
22. Diaz RS, Sabino EC. Accuracy of replication in the polymerase chain reaction. Comparison between *Thermotoga maritima* DNA polymerase and *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Braz J Med Biol Res*. 1998; 31 (10): 1239-42.
23. Myers TW, Gelfand DH. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry*. 1991; 30 (31): 7661-6.
24. Juhasz A, Ravi S, O'Connell CD. Sensitivity of tyrosinase mRNA detection by RT-PCR: rTth DNA polymerase vs. MMLV-RT and AmpliTaq polymerase. *Biotechniques*. 1996; 20 (4): 592-600.
25. Vosberg HP. The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids. *Hum Genet*. 1989; 83 (1): 1-15.
26. Kainz P. The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1494 (1-2): 23-7.
27. Morrison C, Gannon F. The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1219 (2): 493-8.
28. Sariola H. Polymerase chain reaction—from fiction to fact and from fact to fiction. *Duodecim*. 1993; 109 (23-24): 2195-6.
29. Stolovitzky G, Cecchi G. Efficiency of DNA replication in the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93 (23): 12947-52.
30. Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91 (12): 5695-9.
31. Barnes WM. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91 (6): 2216-20.
32. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*. 1993; 11 (9): 1026-30.
33. Rojas Martínez A, Vázquez Alemán RM, Gustincich S, Cantu JM, Barrera Saldaña HA. Genética molecular de la fibrosis quística: El alelo •f508 en familias mexicanas. *Bol Med Hosp Infant Mx*. 1992; 49 (6): 335-341.
34. Rojas Martínez A, Villalobos Torres MC, Ortiz de Luna RI, Pompa Garza MT, Barrera Saldana HA.

- Molecular detection of carriers of hemophilia A in Mexican families. *Rev Invest Clin.* 1996; 48 (2): 125-7.
35. Delgado Luengo W, Pineda Del Villar L, Borjas L, Pons H, Morales A, Martínez Basalo MC, Barrera Saldana HA. Molecular diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy in Venezuelan patients with the polymerase chain reaction *Invest Clin.* 1994; 35 (4): 195-207.
 36. Barrera Saldaña HA, Villalobos Torres MC, Cerda Flores R. Tras el rastro de la huella genética. *CiENCIA UANL.* 1999; 11; (2): 110-115.
 37. Garson JA, Tedder RS, Briggs M, Tuke P, Glazebrook JA, Trute A, Parker D, Barbara JA, Contreras M, Aloysius S. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by «nested» polymerase chain reaction and prediction of infectivity. *Lancet.* 1990; 335 (8703): 1419-22.
 38. Guatelli JC, Gingeras TR, Richman DD. Nucleic acid amplification in vitro: detection of sequences with low copy numbers and application to diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Microbiol Rev.* 1989; 2 (2): 217-26.
 39. Hao GQ, Xiao LL. The application of molecular biology techniques in HLA-typing. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2002; 10 (3): 268-72.
 40. Ascacio Martínez JA, Barrera Saldaña HA. A dog growth hormone cDNA codes for a mature protein identical to pig growth hormone. *Gene.* 1994; 143 (2): 277-80.
 41. Schneeberger C, Eder S, Speiser P, Zeillinger R. Competitive reverse transcriptase-PCR: an improved method for determination of c-erbB-2 gene expression. *Anticancer Res.* 1996; 16 (2): 849-52.
 42. Calleja Macias IE, Martínez Garza SG, Gallegos Rivas MC, Ortiz Lopez R, Gomez Guerra L, Barrera Saldana HA, Gutierrez Gutierrez AM. Y chromosome micro-deletion identification in infertile males. *Ginecol Obstet Mex.* 2003, 71 (1): 25-31.
 43. Delgado Enciso I, Martínez Garza SG, Rojas Martínez A, Ortiz Lopez R, Bosques Padilla F, Calderón Garcidueñas AL, Zárate Gómez M., Barrera Saldaña HA. (2001). 677T mutation of the MTHFR gene in adenomas and colorectal cancer in a population sample from the Northeastern Mexico. Preliminary results. *Rev Gastroenterol Mex;* 66 (1): 32-7.
 44. González-González MC, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, García-Hoyos M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C. Huntington disease-affected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn.* 2003; 23 (3): 232-4.
 45. Nishiwaki Y, Kamino K, Yoshiiwa A, Nagano K, Takeda M, Tanabe H, Nishimura T, Kobayashi T, Yamamoto H, Nonomura Y, Yoneda H, Sakai T, Imagawa M, Miki T, Ogihara T. Mutational screening of APP gene in patients with early-onset Alzheimer disease utilizing mismatched PCR-RFLP. *Clin Genet.* 1996; 49 (3): 119-23.
 46. Barrera Saldaña H, Martínez Garza S, Ortiz Lopez R. The molecular diagnosis of cancer. *Rev Invest Clin.* 2003; 55 (2): 128-37.
 47. Lyons J. The polymerase chain reaction and cancer diagnostics. *Cancer.* 1992; 69 (6): 1527-31.
 48. Mar Aguilar F, Gómez Almaguer D, Carrizales Villareal JA, Viader Salvadó JM, Barrera Saldaña HA. Detecting residual bcr-abl transcripts in chronic myeloid leukaemia patients using coupled reverse transcriptase-polymerase chain reaction with rTth DNA polymerase. *Clin Lab Haematol.* 1998; 20 (4): 221-4.
 49. Coutelle C, Williams C, Handyside A, Hardy K, Winston R, Williamson R. Genetic analysis of DNA from single human oocytes: a model for preimplantation diagnosis of cystic fibrosis. *BMJ.* 1989; 299 (6690): 22-4.
 50. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Recombinant DNA. Scientific American Books, W.H. Freeman y Co. New York, 1992, 2° Ed.
 51. Lo YM, Patel P, Wainscoat JS, Sampietro M, Gillmer MD, Fleming KA. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet.* 1989; 2 (8676): 1363-5.
 52. Rijnders RJ, Christiaens GC, de Haas M, van der Schoot CE. Fetal DNA in maternal blood. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2004; 148 (4): 170-4.
 53. Morales Machin A, Borjas Fajardo L, Pineda del Villar L, Prieto Carrasquero M, González S, Gutiérrez M, Delgado Luengo W, Alvarez F, Barrera-Saldaña H. Prenatal molecular diagnosis of cystic fibrosis. Report of 3 cases. *Invest Clin.* 1997; 38(3):145-53.
 54. Skwark M, Nawrotek P, Czyzewska I. The detection and determination of potential virulence of *Salmonella spp.* using PCR method. *Pol J Vet Sci.* 2004; 7 (1): 33-7.
 55. Telenti A, Imboden P, Germann D. Competitive polymerase chain reaction using an internal standard: application to the quantitation of viral DNA. *J Virol Methods.* 1992; 39 (3): 259-68.
 56. Marushko IuV, Desiatnyk DH, Bychkova NH,

- Marushko TV, Iehipko HV. Characteristics of modern diagnosis of diseases caused by *Chlamydia* bacteria. *Lik Sprava*. 2002; (7): 3-6.
57. Alexiou-Daniel S, Stylianakis A, Papoutsis A, Zorbas I, Papa A, Lambropoulos AF, Antoniadis A. Application of polymerase chain reaction for detection of *Legionella pneumophila* in serum samples. *Clin Microbiol Infect*. 1998; 4 (3): 144-148.
 58. Bernet C, Garret M, de Barbeyrac B, Bebear C, Bonnet J. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1989; 27 (11): 2492-6.
 59. Sritharan V, Barker RH Jr. A simple method for diagnosing *M. tuberculosis* infection in clinical samples using PCR. *Mol Cell Probes*. 1991; 5 (5): 385-95.
 60. Matsumoto T, Yamaguchi K. Rapid diagnosis of infectious diseases at the site of outpatient clinics *Rinsho Byori*. 2002; 50 (5): 468-73.
 61. Laure F, Courgnaud V, Rouzioux C, Blanche S, Veber F, Burgard M, Jacomet C, Griscelli C, Brechot C. Detection of HIV1 DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. *Lancet*. 1988; 2 (8610): 538-41.
 62. Kaneko S, Miller RH, Di Bisceglie AM, Feinstone SM, Hoofnagle JH, Purcell RH. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction. Application for clinical diagnosis. *Gastroenterology*. 1990; 99 (3): 799-804.
 63. Frías C, Matas L, Ferre X, Millán M, Martí S, Hernández A, Ausina V. Usefulness of adding multiplex nested-polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid samples to routine diagnostic testing for herpesvirus encephalitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001; 20 (9): 670-2.
 64. Sifuentes Rincón AM, Revol A, Barrera Saldaña HA. Detection and differentiation of the six *Brucella* species by polymerase chain reaction. *Mol Med*. 1997; 3 (11): 734-9.
 65. Craig MH, Bredenkamp BL, Williams CH, Rossouw EJ, Kelly VJ, Kleinschmidt I, Martineau A, Henry GF. Field and laboratory comparative evaluation of ten rapid malaria diagnostic tests. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002; 96 (3): 258-65.
 66. Revol de Mendoza A., Esquivel Escobedo D., Martínez Dávila I., Barrera Saldaña HA. Expansion and divergence of the GH locus between spider monkey and chimpanzee. *Gene. En prensa*
 67. Revol de Mendoza A, Esquivel Escobedo D, Santiago Alarcón D, Barrera Saldaña H. Independent duplication of the growth hormone gene in three anthropoid lineages. *JEG*. 2001; 2: 151-159.
 68. Handt O, Richards M, Trommsdorff M, Kilger C, Simanainen J, Georgiev O, Bauer K, Stone A, Hedges R, Schaffner W, et al. Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science*. 1994; 264 (5166): 1775-8.
 69. De Benedetto G, Nasidze IS, Stenico M, Nigro L, Krings M, Lanzinger M, Vigilant L, Stoneking M, Paabo S, Barbujani G. Mitochondrial DNA sequences in prehistoric human remains from the Alps. *Eur J Hum Genet*. 2000; 8 (9): 669-77.
 70. http://amberforsale.com/Fossil_Amber_Gallery/Insects.htm
 71. Escamilla Treviño LL, Viader Salvadó JM, Barrera Saldaña HA, Guerrero Olazarán M. Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*. *Biotechnology letters*. 2000; 22 (2): 109-114.
 72. Mendoza A, Fernández S, Cruz MA, Reséndez Pérez D, Barrera Saldaña HA. Detection of genetically modified maize food products by the polymerase chain reaction. *Journal of Food and drugs Analysis. Enviado*.
 73. Mendoza A, Salazar C, Alvarado O, Cruz MA, Barrera HA. Molecular differentiation of weak and severe citrus tristeza virus isolates in México. *Rev. Fitotec. Méx*. 2003; 26 (4): 223-230
 74. Rodríguez-Pérez MA, Lilley BG, Domínguez-Vázquez A, Segura-Arenas R, Lizarazo-Ortega C, Mendoza-Herrera A, Reyes-Villanueva F, Unnasch TR. Polymerase chain reaction monitoring of transmission of *Onchocerca volvulus* in two endemic states in México. *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 70 (1): 38-45.
 75. Cunningham EP, Meghen CM. Biological identification systems: genetic markers. *Rev Sci Tech*. 2001; 20 (2): 491-9.
 76. Dunning AM, Talmud P, Humphries SE. Errors in the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16 (21): 10393.