

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus aplicaciones en dermatología

Polymerase Chain Reaction (PCR) and its Applications in Dermatology

Diana Emma Becerril Parra¹, Edoardo Torres Guerrero¹, Gabriela Moreno Coutiño¹, Ana Sylvia Aguilar Sarmiento², Roberto Arenas Guzmán¹ y Rigoberto Hernández Castro³

¹ Sección de Micología, Servicio de Dermatología, Hospital General Dr. Manuel Gea González, Ciudad de México

² Médico pasante de servicio social, Clínica de Melanoma, Instituto Nacional de Cancerología, Ciudad de México

³ Departamento de Ecología de Agentes Patógenos, Hospital General Dr. Manuel Gea González, Ciudad de México

RESUMEN

PCR o reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*) es la técnica más comúnmente empleada en biología molecular. La función de la misma es copiar millones de veces una secuencia específica de ADN blanco mediante una serie de pasos: desnaturalización, hibridación y extensión. En dermatología y micología, la PCR se ha utilizado para diagnosticar y confirmar la presencia de diferentes agentes infecciosos, como *Mycobacterium tuberculosis*, micobacterias atípicas, *M. leprae*, *Bartonella henselae*; espiroquetas, *Treponema pallidum* y *Borrelia burgdorferi*; virus herpes 1 y 2, virus, Epstein-Barr, citomegalovirus, herpes virus humano-8, parásitos como *Leishmania spp.*, *Aspergillus spp.*, *Blastomycosis dermatitidis*, *Candida spp.*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioidomycosis brasiliensis*, entre otros. Además la PCR se ha utilizado para analizar y buscar clonalidad de receptor en linfocitos en algunos linfomas cutáneos, la relación de los mismos con diferentes virus, como es el caso virus de Epstein-Barr, en linfomas de células T, B y NK nasal. En genodermatosis ha mostrado ser una excelente herramienta, en ictiosis ligada a X, epidermolisis bulosa de unión, entre otras. Asimismo, en melanoma primario se han detectado mutaciones del gen BRAF, así como en nevos melanocíticos.

PALABRAS CLAVE: PCR (reacción en cadena de polimerasa), ADN (ácido desoxirribonucleico), diagnóstico molecular, RT-PCR (transcripción reversa-PCR), Taq ADN polimerasa, PCR en tiempo real, SYBER Green, Taqman, infecciones, linfomas, genodermatosis, melanoma.

ABSTRACT

PCR (polymerase chain reaction) has become one of the most commonly employed techniques in molecular biology. Its function is to copy millions of specific targets in the DNA sequence through denaturation, primer annealing and extension. In dermatology and mycology PCR has been used for identification of many infectious agents such as *Mycobacterium tuberculosis*, atypical mycobacteria, *M. leprae*, *Bartonella henselae*; spirochetes *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi*; Herpes simplex-1 and 2, Varicella zoster virus, Human herpesvirus-8, Epstein-Barr virus; parasites such as *Leishmania spp.* Fungus as *Aspergillus spp.*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida spp.*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasmosis capsulatum* and *Paracoccidioidomycosis brasiliensis*, among others. Also, PCR is used to analyze and search clonality of lymphocytes in some cutaneous lymphomas, and its relationship with different viruses, such as Epstein-Barr virus in cutaneous T-Cell and B-Cell lymphomas as well as NK nasal Lymphoma. In genodermatosis it has proved to be an excellent tool, useful in showing X-linked ichthyosis, and junctional epidermolysis bullosa, among others. Also, in primary melanoma it is been used for detection of BRAF gene mutation, as well as melanocytic nevi.

KEYWORDS: PCR (polymerase chain reaction), DNA (deoxyribonucleic acid), molecular diagnosis, RT-PCR (reverse transcription-PCR), Taq ADN polymerase, real time PCR, SYBER Green, Taqman, infections, lymphoma, genodermatosis, malignant melanoma.

Antecedentes

Uno de los descubrimientos más importantes de la historia que marcó el inicio de una nueva era en el estudio y conocimiento de los ácidos nucleicos, fue el rea-

lizado por Watson y Crick en 1953, al descifrar la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN). Desde entonces existe un gran interés por desarrollar nuevos métodos sensibles, específicos y reproducibles que nos permitan

CORRESPONDENCIA

Diana Emma Becerril Parra ■ dianaemma.becerril@gmail.com

Hospital General Dr. Manuel Gea González, Calzada de Tlalpan 4800, Sección XVI, CP 14080, Tlalpan, México, D.F. Tel. (0155) 4000 3000

estandarizar protocolos experimentales para el estudio del ADN.¹ En consecuencia, han ido apareciendo diferentes tecnologías. Probablemente la más importante es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*), la cual fue desarrollada por Kary Mullis en 1985, quien en 1993 ganaría el Premio Nobel de Química por su descubrimiento.^{1,2} Actualmente sabemos que el fundamento de la PCR es copiar millones de veces una secuencia específica de ADN blanco, lo cual ha permitido estudiar y manipular mejor el ADN, facilitando el establecimiento de protocolos en biología molecular para estudiar y comprender mejor el rol de los genes, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

Introducción

En dermatología el diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas ha aumentado considerablemente en los últimos años; las técnicas de amplificación de ADN han sido de gran utilidad para detectar bacterias, virus, hongos y parásitos asociados a infecciones de transmisión sexual e infecciones intrahospitalarias, particularmente en pacientes inmunocomprometidos y para la resistencia a antibióticos.³

Para comprender el fundamento de la PCR, es importante recordar cuál es la conformación de la molécula de ADN, la cual tiene tres componentes principales: un azúcar (desoxirribosa); un grupo fosfato, el cual le da una carga negativa a la cadena de ADN, y una base nitrogenada (adenina-timina y guanina-citosina) que es complementaria con la base de otra cadena por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas¹ (figura 1). En la PCR el templado son las cadenas de ADN que se separan y sirven como moldes para que el ADN polimerasa sintetice nuevas cadenas a partir de un blanco específico.^{1,2}

¿Qué es la PCR?

La PCR es la técnica más comúnmente empleada en biología molecular para la amplificación del ADN,² en la cual se lleva a cabo una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa, la cual de manera natural sintetiza el ADN en las células.

¿Qué elementos químicos se necesitan para el procesamiento de una PCR?

Para llevar a cabo el procesamiento de la reacción es necesario un templado o molde de ADN o ADNC (ADN complementario), este último proviene del ARNm (ácido

ribonucleico mensajero) a partir de RT-PCR (reverse transcription-PCR). Esta conversión se logra mediante una enzima conocida como transcriptasa reversa, la cual es capaz de convertir ADNC a partir de ARNm.¹ Además se requiere de una enzima que sintetice el ADN, ésta es conocida como Taq ADN polimerasa, un juego de oligonucleótidos conocidos como primers o cebadores que inician la reacción de síntesis, desoxirribonucleótidos trifosfatados libres (dNTPs: adenina, timina, citosina, guanina), el ión Mg⁺ (magnesio) el cual funciona como un cofactor y generalmente es sulfato de magnesio, una solución amortiguadora o buffer y H₂O (agua). Todos interactúan para llevar a cabo la reacción a través de una serie de pasos en un termociclador.¹ Los termocicladores están diseñados para establecer los cambios y condiciones de temperatura y tiempo necesarios para cada ciclo en la reacción de PCR.¹

¿Cuáles son los pasos en la PCR?

La PCR se lleva a cabo en tres etapas o ciclos (figura 2):

1. Desnaturalización: en esta etapa las cadenas de ADN son calentadas a 95° C durante un tiempo promedio de 20 a 30 segundos, con el objetivo de separar ambas cadenas. Si la cadena de ADN contiene gran cantidad de uniones G-C será necesario mayor tiempo, ya que la

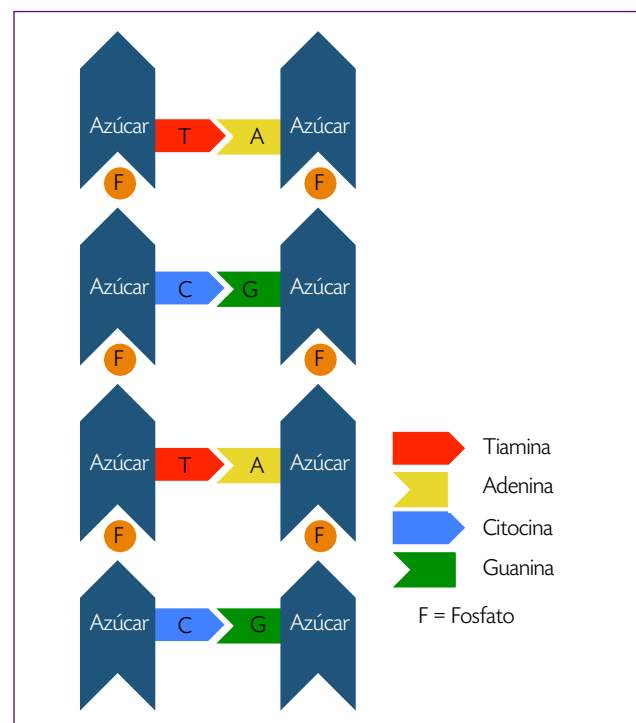


Figura 1. Molécula de ADN de doble cadena. Formada por un azúcar, grupo fosfato y una base nitrogenada que es complementaria con otra cadena (adenina-timina y guanina-citosina).

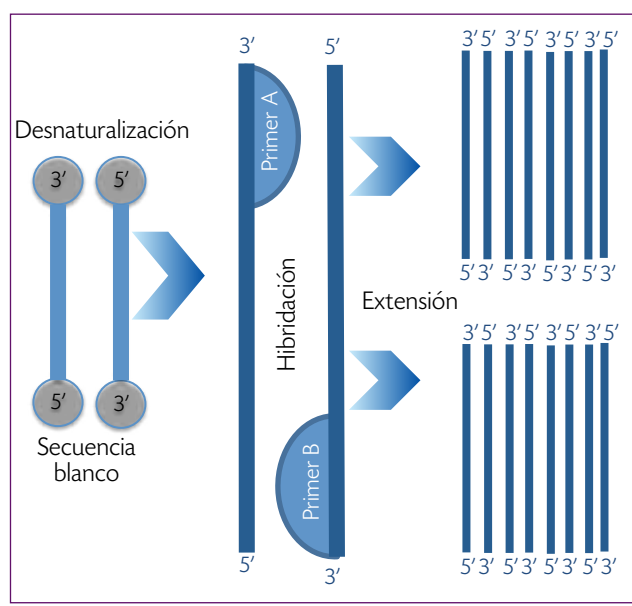


Figura 2. Pasos en el ciclo de la PCR.

unión de éstas se hace mediante tres enlaces, uno más que las bases A-T. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas, las cuales servirán como molde.¹

2. **Hibridación:** en esta etapa participan los primers, los cuales son secuencias de oligonucleótidos que delimitan la secuencia blanco que se quiere amplificar. Actualmente existen programas para diseñar primers con alta especificidad para llevar a cabo este proceso. En la etapa de hibridación los primers se alinean al extremo 3' de la cadena molde, para lo cual se necesitan dos secuencias diferentes, una denominada *forward*, o sentido, y otra *reverse*, o antisentido. Para que esto suceda es necesario que el termociclador alcance una temperatura entre 50-60° C, generalmente se necesitan 30 segundos en este ciclo.¹
3. **Extensión:** en esta etapa se necesita una enzima con la función de ADN polimerasa, la cual se encargará de la catálisis de la reacción, sintetizando nuevas cadenas de ADN a partir de una cadena molde. La enzima más usada es la Taq ADN polimerasa, con capacidad de soportar temperaturas muy altas. Proviene de una bacteria termófila llamada *Thermophilus aquaticus*. Existen otras enzimas, como la Vent, que se obtiene de la bacteria *Thermococcus litoralis*. En la etapa de extensión la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers a una temperatura óptima de 72° C, y a una velocidad muy rápida agrega los desoxirribonucleótidos libres (dNTP's) complementarios, creando así las cadenas completas de ADN. Los dNTP's son las bases nitrogenadas que normalmente se utilizan a una concentración

entre 0.2 a 1.0 mM, para obtener un producto de amplificación de 1 000 pb se requiere de un minuto.^{1,4}

Al final de cada ciclo se habrán duplicado dos cadenas de ADN a partir de una, y de esta forma la replicación de una cadena blanco por cada ciclo se realiza de manera exponencial y logarítmica.

¿Cómo se analiza el producto de amplificación?

Al final del proceso de la PCR, es necesario realizar la interpretación del producto obtenido de la replicación y copia de la cadena molde de ADN. La manera tradicional de hacerlo es usando electroforesis, con la cual es posible visualizar los amplicones o bandas en un campo electromagnético.^{1,2} La electroforesis consiste en la separación de moléculas en un campo electromagnético, en este caso de ácidos nucleicos, en los cuales el grupo fosfato les proporciona carga negativa. Se emplea una fuente de energía con un polo positivo y otro negativo, y un gel de agarosa en un búffer. Además se agrega bromuro de etidio, esta última molécula se intercala en las cadenas de ADN, y cuando éste es estimulado por la luz UV emite una señal, lo cual permite visualizarlo. Al momento de vaciar nuestra muestra sobre el gel, los ácidos nucleicos migran hacia el polo positivo, formando bandas o amplicones. Cuando nuestra muestra es corrida en el gel, éstos deben ser cargados juntos con un marcador de peso molecular que contenga un número determinado de segmentos de ADN conocidos, que funciona como control para facilitar la identificación de nuestras bandas o amplicones, así como su tamaño y peso molecular.¹ Después de todo esto, se termina el proceso con una foto digital del gel de agarosa expuesto a la luz UV y un procesador de imagen se encargará de analizar las bandas.¹⁵

PCR en tiempo real

Con la intención de mejorar la técnica de PCR, los investigadores han realizado modificaciones a la técnica original para ofrecer una tecnología más innovadora. La PCR en tiempo real ofrece una gran ventaja con respecto a la versión tradicional, pues usa un sistema cuantitativo, a diferencia de la técnica usual en la que el análisis de los datos se hace de manera cualitativa.¹ En 1992, Higuchi *et al.* fueron los primeros en realizar PCR en tiempo real. Lo que hicieron fue videogravar en tiempo real la incorporación de bromuro de etidio al ADN durante cada ciclo de PCR bajo el estímulo de la luz UV.^{1,6} En la actualidad, el objetivo de la PCR en tiempo real es detectar y cuantificar secuencias específicas de ADN mediante el uso de reporteros fluorescentes. La principal diferencia con la técnica original radica en la forma en que se detectan y analizan

los productos de la amplificación; con esto se ha logrado una mayor sensibilidad, especificidad y eficiencia.^{1,6,7} Los ingredientes químicos se venden en una solución “Master mix”, el cual contiene los mismos que la técnica usual, más un sistema reportero de fluorescencia. Estos reporteros se clasifican en específicos y no específicos. El reportero de fluorescencia no específico más usado es SYBER Green, el cual tiene afinidad por el ADN de doble cadena, por lo que se intercala en el mismo y al ser oxidado mediante una longitud de onda de 480 nm genera fluorescencia que es captada en la etapa de extensión de cada ciclo.⁸ Los métodos específicos siguen el principio conocido como “transferencia de energía de resonancia fluorescente” (FRET, por sus siglas en inglés). Este método transfiere energía a un receptor, o “quencher”, y se puede llevar a cabo por hidrólisis o hibridación. Taqman es el método más usado por hidrólisis, donde al activarse la enzima con función de ADN polimerasa rompe la unión entre FRET-quencher produciendo fluorescencia, esto lo hace un método muy específico.⁹ El método por hibridación consiste en una sonda con un reportero de fluorescencia unido a un aceptor fluorescente; en la etapa de hibridación esta sonda se une a la cadena molde de ADN y es excitada emitiendo fluorescencia al aceptor. Las más usadas son la sonda molecular tipo “Beacons”.¹⁰ El paso final es la captura de señal de emisión de fluorescencia, la cual se realiza mediante un filtro que permite el paso de una longitud de onda que llega a un fotodetector, y esta información se captura en un *software* que genera una gráfica de amplificación en la que se observa el número de ciclos y la cantidad de fluorescencia.¹

Aplicaciones en dermatología

En dermatología, la PCR se usa para detectar el ADN de diferentes agentes infecciosos, como bacterias, espiroquetas, virus, parásitos y hongos (tabla 1), incluidas las infecciones latentes. También es útil en cuanto a resistencia a antibióticos, diagnóstico de genodermatosis y mutaciones genéticas en cáncer de piel.^{3,11}

La tuberculosis cutánea muestra una gran variabilidad de presentaciones clínicas, lo que hace difícil su diagnóstico y diferenciación con otras enfermedades granulomatosas que en la histopatología presentan similitudes, como es el caso de la sarcoidosis.¹² Además, las tinciones como Ziehl-Neelsen no distinguen entre bacilos ácido-alcohol resistentes y los cultivos en medio de Löwenstein-Jensen presentan un crecimiento lento, de entre seis y ocho semanas.¹² Por tanto, la FDA ha aprobado el uso de la PCR para detección de ADN de *M. tuberculosis* presente en tracto respiratorio y no respiratorio.^{3,11}

Las micobacterias atípicas son patógenos oportunistas que pueden causar una infección cutánea a partir de una inoculación asociada a un procedimiento quirúrgico, un traumatismo o bien por vía hematógena. Del mismo modo que con la tuberculosis, el cultivo o la biopsia de tejido no proporciona información acerca del tipo de micobacteria causal, por lo que en la actualidad el diagnóstico suele realizarse por medio de esta técnica.¹²

Para la detección de *Mycobacterium leprae*, la técnica puede realizarse incluso en aquellos quienes ya han

Tabla 1. Agentes patógenos identificados con PCR en dermatología. Aprobados por la FDA*

Bacterias
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Mycobacterium tuberculosis</i>* • <i>M. leprae</i> • <i>M. ulcerans</i> • <i>Bartonella henselae</i> • <i>R. prowazekii</i> • <i>Rickettsia rickettsii</i>
Espiroquetas
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Borrelia burgdorferi</i> • <i>Treponema pallidum</i>
Virus
<ul style="list-style-type: none"> • Virus herpes simple-1 y 2 • Virus de varicela zoster • Virus Epstein-Barr • Herpes virus humano 8 • Virus de papiloma humano • VIH cuantitativo y cualitativo* • Virus de hepatitis C* • Parvovirus B19
Parásitos
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Leshmania spp.</i>
Micosis
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Candida albicans</i> • <i>C. dubliniensis</i> • <i>C. tropicalis</i> • <i>C. parapsilosis</i> • <i>Coccidioides immitis</i> • <i>Histoplasma capsulatum</i> • <i>Sporothrix complex</i> • <i>Cryptococcus neoformans</i> • <i>Aspergillus fumigatus</i> • <i>A. versicolor</i> • <i>A. flavus</i> • <i>Blastomyces dermatidis</i> • <i>Hortaea werneckii</i> • <i>Malassezia spp.</i> • Dermatofitos

recibido tratamiento. La técnica de PCR ha mostrado una sensibilidad entre 34 y 80% en pacientes con lepra paucibacilar y de 100% en enfermos con lepra multibacilar, así como una especificidad de 100%.¹² Sin embargo, estos estudios sugieren que la presencia de ADN no muestra correlación con actividad de la enfermedad.^{3,12}

La FDA también ha aprobado el uso de PCR para identificar otras bacterias, como *Bartonella henselae*, la cual causa la enfermedad por arañazo de gato. En pacientes inmunocomprometidos *Bartonella* puede ser un organismo oportunista, en estos casos el diagnóstico diferencial con otros tumores suele ser difícil, sin embargo, la PCR hace un diagnóstico preciso de esta enfermedad que se conoce como angiomatosis bacilar, pudiendo diferenciarla del sarcoma de Kaposi sin necesidad de esperar el resultado de un estudio histológico.³

El eritema crónico migrans se presenta en 50 a 83% como manifestación clínica temprana en la enfermedad de Lyme, la cual es causada por *Borrelia burgdorferi*.¹² El estudio de histopatología no suele ser específico, y las espiroquetas únicamente se pueden observar con tinciones de plata en 40% de los casos. Los cultivos para *Borrelia burgdorferi* muestran una sensibilidad entre 30 y 70% de los casos. En estas situaciones la PCR ha mostrado una sensibilidad diagnóstica de 44 a 90% en biopsias de pacientes con eritema crónico migrans.¹² Se han hecho otros estudios en los que mediante PCR se ha tratado de detectar ADN de especies de *Borrelia* en relación con diferentes condiciones inflamatorias en dermatología, como morfea y liquen escleroso y atrófico.³

El diagnóstico de la sífilis puede ser complicado. Es posible que la espiroqueta *Treponema pallidum* sea difícil de observar en biopsias, aun teñidas con técnicas especiales, y las pruebas serológicas tienen varias limitaciones. En estas circunstancias, la PCR suele ser de gran utilidad, y se emplea para identificar la espiroqueta en sífilis secundaria y terciaria.^{3,12}

El uso de PCR también se ha utilizado para identificar virus de la familia Herpesviridae, como el virus del herpes simple 1 y 2 (HSV), virus de la varicela zoster (VVZ) y citomegalovirus (CMV), en biopsias de tejido, líquido de ampollas, incluso saliva y líquido cefalorraquídeo.^{3,12} También se ha usado para confirmar asociaciones entre HSV y enfermedades dermatológicas, como eccema herpético y eritema multiforme.¹² La ventaja de utilizar PCR para el diagnóstico de HSV radica en la posibilidad de dar un tratamiento temprano a pacientes en los que existe duda diagnóstica. La detección del herpes virus 8 (HHV-8) para el diagnóstico de sarcoma de Kaposi es de gran utilidad.³

Asimismo, la PCR se ha utilizado para detectar virus del papiloma humano (HPV) en cáncer de piel no melanoma, epidermodisplasia verruciforme, carcinoma verrugoso asociado a HPV-6 y HPV-11.^{3,12} Incluso se ha detectado HPV-5 asociado a lesiones premalignas y carcinoma espinocelular en pacientes con antecedente de trasplante de riñón.³

La FDA aprobó el uso de PCR para cuantificar la carga viral en pacientes con VIH, puesto que el monitoreo de la misma servirá para validar el inicio o modificaciones en el tratamiento, así como el pronóstico.³ Además, en estos pacientes también está aprobado realizar una detección cuantitativa y cualitativa de virus de la Hepatitis C, principalmente en aquellos en los que se emplean tratamientos como interferón- α y ribavirina.³

Otros virus que se pueden detectar con PCR incluyen el parvovirus B19 en lesiones cutáneas.³

La leishmaniasis es una infección causada por un protozoo, con diferentes espectros de presentación: cutánea, mucocutánea y visceral, lo cual depende de la especie, agente causal, grado de respuesta inmune del hospedero y localización geográfica. El diagnóstico suele realizarse por medio de un frotis que es teñido con Giemsa o Wright, o con estudio de histopatología en el que se observan los amastigotes intracelulares; sin embargo, en más de 47% no suelen observarse, por lo que la PCR resulta muy útil, pues además puede identificar la especie con una especificidad de casi 100 por ciento.¹²

En micología, el uso de PCR se utiliza para confirmar y diagnosticar la especie patógena cuando los cultivos no están disponibles o se requiere rapidez en el diagnóstico. Entre los más frecuentes se encuentran *Aspergillus spp.*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*¹² tanto en enfermedades puramente cutáneas como en diseminadas.

En linfomas cutáneos la PCR se utiliza para analizar y buscar clonalidad de receptor de linfocitos T. Además se ha usado para buscar la relación de algunos linfomas cutáneos con agentes infecciosos, como HTLV-I en linfoma de células T del adulto, virus de Epstein-Barr en linfomas de células T, células B, y NK nasal; *Borrelia burgdorferi* en linfocitoma cutis y en más de 20% en linfomas de células B de zona marginal.^{12,13}

En el estudio de las genodermatosis la PCR ha mostrado ser una herramienta diagnóstica desde hace dos décadas, facilitando un diagnóstico temprano e incluso prenatal. Se ha demostrado su utilidad en ictiosis ligada a X, epidermolisis bulosa de unión, entre otras.¹³

En el campo de la oncología, los estudios por medio de PCR aplicados a los cánceres de piel han permitido iden-

tificar una mutación del gen BRAF en lesiones melanocíticas, la cual se ha encontrado hasta en 60 a 80% en nevos melanocíticos y en más de 30% en melanoma primario, con excepción del nevo de Spitz, en el cual no se ha identificado mutación de BRAF.¹³

Conclusión

La FDA ha aprobado el uso de la PCR en la identificación de *Mycobacterium tuberculosis*, virus de hepatitis C y la cuantificación de la carga viral en VIH. En dermatología, la reacción en cadena de la polimerasa muestra gran sensibilidad y especificidad para identificar numerosos agentes infecciosos. La técnica molecular se ha empleado también en nuestro campo para estudiar linfomas cutáneos, para el diagnóstico de genodermatosis y algunas mutaciones en cáncer de piel. Aun con todo esto, existen algunas limitaciones, como el costo, la necesidad de personal y equipo especializado tanto en el desarrollo de la misma como en la interpretación de los resultados. Sin embargo, es importante que el médico dermatólogo conozca los principios de la técnica de la PCR, su utilidad y aplicaciones como herramienta diagnóstica y pronóstica en nuestra área.

Glosario de términos y abreviaturas utilizadas

PCR: reacción en cadena de polimerasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNC: ácido desoxirribonucleico complementario, a partir del cual se realiza copia del segmento de ADN

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

RT-PCR: transcriptasa reversa-reacción en cadena de polimerasa

Taq ADN polimerasa: enzima con actividad de ADN polimerasa proveniente de bacteria termófila *Thermophilus aquaticus*, encargada de sintetizar ADN

dNTPs: desoxirribonucleótidos libres (adenina-timina, guanina-citosina)

Primers: oligonucleótidos que delimitan la secuencia blanco que se quiere amplificar

Amplicones: bandas determinadas por peso y tamaño molecular de ADN en la electroforesis

LUV: luz ultravioleta

SYBER Green: reportero de fluorescencia no específico más utilizado en la PCR en tiempo real

FRET: por sus siglas en inglés, transferencia de energía de resonancia fluorescente

Quencher: aceptor de energía a partir de FRET

Taqman: método específico utilizado en PCR en tiempo real, el cual funciona al activarse la enzima con función de ADN polimerasa, mediante hidrólisis se rompe la unión entre FRET-quencher produciendo fluorescencia

Sondas moleculares tipo Beacons: método específico que funciona por hibridación, produce fluorescencia en PCR en tiempo real

FDA: por sus siglas en inglés, Food and Drug Administration

HSV: Herpes virus simple

CMV: citomegalovirus

HPV: virus de papiloma humano

VIH: virus de inmunodeficiencia humana

HTLV-I: virus linfotrópico humano de células T tipo I

BIBLIOGRAFÍA

1. Tamay, D.L., Ibarra, C. y Velasquillo, C., "Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real", *Investigación en Discapacidad*, Mediagraphic, 2013, 2 (2): 70-78.
2. Mullis, K.B., "The unusual origin of the polymerase chain reaction", *Sci Am*, 1990, 262 (4): 56-61.
3. Sra, K.K., Torres, G., Rady, P., Hughes, T.K., Payne, D.A. y Tryring, S.K., "Molecular diagnosis of infectious diseases in dermatology", *J Am Acad Dermatol*, 2005, 53 (5): 749-765.
4. Cariello, N.F., Swenberg, J.A. y Skopek, T.R., "Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (Vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis", *Nucleic Acids Res*, 1991, 19 (15): 4193-4198.
5. Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.Y. y Kim, Y.H., "Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments", *J Vis Exp*, 2012, 62: 3923.
6. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. y Griffith, R., "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences", *Biotechnology*, 1992, 10 (4): 413-417.
7. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. y Watson, R., "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of ADN amplification reactions", *Biotechnology*, 1993, 11 (9): 1026-1030.
8. Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J. y Vitzthum, F., "Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications", *Nucleic Acids Res*, 2004, 32 (12): 103.
9. Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W. y Deetz, K., "Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization", *PCR Methods Appl*, 1995, 4 (6): 357-362.
10. Tyagi, S. y Kramer, F.R., "Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization", *Nat Biotechnol*, 1996, 14 (3): 303-308.
11. Lo, A.C. y Feldman, S.R., "Polymerase chain reaction: basic concepts and clinical applications in dermatology", *J Am Acad Dermatol*, 1994, 30 (2 Pt 1): 250-260.
12. Swick, B.L., "Polymerase chain reaction-based molecular diagnosis of cutaneous infections in dermatopathology", *Semin Cutan Med Surg*, 2012, 31 (4): 241-246.
13. Braun-Flaco M, Schempp W, Weyers W. "Molecular diagnosis in dermatopathology: What makes sense, and what doesn't". *Experimental Dermatology* 2009; 18: 12-23.