

Reacción en cadena de la polimerasa y diagnóstico molecular

VICTORIA EUGENIA VILLEGAS, MSc¹, MAGDA CAROLINA SÁNCHEZ, MSc¹, LILIAN CHUAIRE, PhD (c)²

RESUMEN

La PCR, acrónimo de la reacción en cadena de la polimerasa, revolucionó el campo del diagnóstico molecular, hasta el punto de que en la actualidad representa el segmento de mayor crecimiento en los laboratorios clínicos del mundo entero, en los que se ha convertido en herramienta de invaluable utilidad. El presente escrito describe los fundamentos de la metodología, así como algunas de sus múltiples aplicaciones en la diagnosis, desde sus albores hasta el presente.

Palabras clave: PCR; Métodos; Utilización; Historia.

Polymerase chain reaction and molecular diagnostics

SUMMARY

PCR, acronym of polymerase chain reaction, has revolutionized the field of molecular diagnostics to the point that it currently represents the fastest-growing segment in clinical laboratories worldwide, where it has become an invaluable tool. This paper describes the fundamentals of PCR and its developments in some of its many applications in the diagnosis, from its beginnings to the present.

Keywords: PCR; Methods; Utilization; History.

Hace cerca de 25 años hizo su aparición la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), metodología encaminada a obtener cantidades grandes de ADN para su utilización en el laboratorio clínico. Este evento tuvo lugar en forma más o menos reciente, si se considera que desde 1953 se habían descrito, tanto la estructura doble hélice de la molécula de ADN como las reglas de complementariedad que la rigen¹, y de haberse logrado avances importantes en comprender los procesos de transcripción de los ácidos nucleicos y traducción en proteínas de los organismos eucarióticos²⁻⁵.

Con antelación al advenimiento de la PCR y ya en los albores de la década de 1970, la tecnología del ADN recombinante era la única forma posible de estudiar la estructura y función de los genes eucarióticos. No obstante lo dispendiosa, esta tecnología tuvo la ventaja de permitir el aislamiento de cantidades relativamente grandes de ADN puro, producto de la replicación que, durante la división celular, se efectuaba en el ADN

recombinante de los plásmidos o de los vectores que antes se habían transferido en microorganismos, usualmente bacterias. En 1970 se habían descubierto las endonucleasas de restricción, enzimas bacterianas que cortan el ADN en sitios específicos^{6,7}. Estas enzimas, más conocidas como enzimas de restricción, fueron claves en el éxito de la nueva tecnología, pues gracias a ellas, el ADN de interés se podía aislar e insertar en un vector determinado, con el fin de formar moléculas recombinantes de ADN. A pesar de sus múltiples aplicaciones, entre las que se encuentran la obtención de cantidades grandes de proteína pura, la identificación de mutaciones, la identificación del estado portador de enfermedades hereditarias, la transferencia de genes de un organismo a otro y el mapeo de genes en los cromosomas, lo tedioso de la tecnología del ADN recombinante hizo que muchos investigadores pensaran en opciones diferentes, que también ofrecieran la ventaja de recuperar cantidades grandes de ADN.

1. Profesora Asistente, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad del Rosario, Bogotá DC, Colombia. e-mail: victoria.villegasga@urosario.edu.co mcsanche@urosario.edu.co

2. Profesora Principal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad del Rosario, Bogotá DC, Colombia. e-mail: lchuaire@urosario.edu.co

Recibido para publicación marzo 18, 2009 Aceptado para publicación julio 1, 2009

Mecanismo de la PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es en realidad un sistema que permite obtener - en pocas horas- varios 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 tres pasos.

La mezcla de la reacción consta de una pequeña muestra de ADN que se utiliza como molde y que se obtiene 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.

El primer ciclo de la reacción, conocido como denaturación, consiste en separar las dos cadenas de la molécula de ADN, a una temperatura entre 94 y 96°C, aplicada durante pocos minutos.

A continuación se produce el anillamiento o hibridación de los cebadores con las secuencias complementarias del ADN. Los cebadores son oligonucleótidos sintéticos que delimitan el sitio que se busca amplificar, y se anillan a temperaturas que oscilan entre 50 y 65°C.

El último ciclo, o ciclo de extensión, toma entre uno y varios minutos a 72°C, lo que permite a la ADN polimerasa sintetizar las nuevas hebras de ADN, que serán complementarias a las cadenas originales.

A medida que avanza el proceso se logra amplificar el segmento deseado unas 10^7 veces.

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.*⁸, 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 interés⁹. 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*)¹⁰.

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 incubaba 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 analizada¹¹.

Una vez validada la nueva técnica que desarrolló Mullis, el camino para utilizar la PCR en los primeros análisis moleculares y en el diagnóstico prenatal de algunas enfermedades humanas quedó despejado. Así, unos de los primeros investigadores en acogerla fueron Saiki *et al.*¹², quienes en 1985 decidieron aplicar el ensayo, con la finalidad de descubrir la mutación en el gen de la hemoglobina responsable de la anemia falciforme, en el ADN fetal de células recolectadas por amniocentesis y muestreo de las vellosidades coriónicas. Sus excelentes resultados confirmaron la bondad de la técnica, así como su viabilidad en aplicaciones diagnósticas clínicas específicas. En este orden de ideas, no resultó extraño que los laboratorios de investigación, en los que hasta ese momento predominaba el uso de tecnologías de blotting, tomaran la decisión de adoptar la reacción en cadena de la polimerasa como el método de elección para el diagnóstico molecular y se convirtieran así en laboratorios clínicos.

La simplicidad de la PCR, sumada a la facilidad que provee para controlar las condiciones de la reacción, a la factibilidad de analizar mínimos volúmenes de diferentes tipos de muestras y a sus múltiples aplicaciones en los campos de la genética, las enfermedades infecciosas y el cáncer, han hecho de la reacción en cadena de la polimerasa la herramienta más poderosa hasta ahora conocida y de uso más extendido en el área del diagnóstico molecular y en el seguimiento de las terapias utilizadas¹³.

Aplicaciones de la reacción en cadena de la polimerasa en la medicina actual. Una de las mayores ventajas de la PCR radica en la facilidad de efectuar un diagnóstico a partir de pequeñas muestras, que se pueden conseguir por medio de métodos como cepillado, aspiración, biopsia e incluso a partir de material de archivo fijado o embebido en parafina. Su elevada sensibilidad es la característica que permite demostrar las mutaciones causantes de enfermedades, además de funcionar como marcador biológico de diagnóstico temprano en cáncer y en la identificación de agentes patógenos en medios diluidos¹⁴.

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 descendencia¹⁵.

Con el objetivo de obtener huellas de ADN, se pueden utilizar mini o microsátélites, también conocidos como VNTR (del inglés *variable number tandem repeats*) o repeticiones en tándem de número variable. Los VNTR se encuentran en todos los organismos eucariotas, incluyendo al ser humano, en el que se han estudiado ampliamente.

En forma semejante, se pueden identificar otras secuencias típicas de procariotas (regiones altamente conservadas en el ARN ribosomal), que también funcionan como huella genética, lo que hace que este principio sea aplicable para descubrir agentes patógenos oportunistas en pacientes inmunosuprimidos, como los VIH positivos, o en muestras de líquido cefalorraquídeo de enfermos con meningitis¹⁶⁻¹⁸.

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 morbi-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.

Con respecto a la detección y tipificación del papilomavirus humano (VPH), la PCR sustituyó a la prueba rutinaria de Papanicolaou (PAP), que aunque útil, posee poca reproductibilidad. Propiedades como sensibilidad y especificidad son en la PAP muy variables y dependen de la experiencia de las personas que la llevan a cabo, lo que hace que más de 50% de las infecciones causadas por el VPH pase desapercibido^{21,22}. En la actualidad, un PCR múltiple se utiliza para el diagnóstico simultáneo de enfermedades de transmisión sexual causadas por el virus del herpes, el papiloma y *Chlamydia*.

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 delección de exones en el mismo, hechos que en cualquier caso son responsables de generar una proteína anómala²³. 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 hereditario, 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 mielodisplásicos, entre otros²⁷.

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.

PCR cuantitativa. Derivada de la PCR convencional, la PCR cuantitativa es una técnica que tiene como fin medir la cantidad de ácidos nucleicos presentes en una muestra de tejido. Esta característica hace real la posibilidad de medir la carga viral (cantidad de ARN viral que se halla en una muestra de sangre) en pacientes infectados con VIH²⁸ o con el virus de la hepatitis C²⁹,

de evaluar la expresión génica en diferentes tipos de tejido^{30,31}, de servir como biomarcador en la demostración temprana de enfermedades y en especial de tumores, así como seguir la respuesta a medicamentos¹⁴.

En el caso del VIH, la principal aplicación de la PCR no se orienta a determinar si la persona está o no infectada, sino a evaluar, previa medición de la carga viral, la efectividad de las medicaciones utilizadas en el tratamiento de la enfermedad. La carga viral, en conjunto con el recuento de las células CD4+, indican el estado del sistema inmunológico en estos pacientes³². En adición, muestras que contienen genomas virales para los que el huésped aún no ha formado anticuerpos se pueden analizar mediante la PCR cuantitativa, circunstancia que suministra la oportunidad de controlar la replicación viral durante los estados tempranos de infección y, por tanto, de disminuir el daño celular, como se ha demostrado en tejido hepático²⁹.

Otra aplicación muy popular de la PCR cuantitativa está en el diagnóstico prenatal no invasivo, cuyo fundamento reside en el análisis de los ácidos nucleicos presentes en las células fetales circulantes en el plasma materno³³.

Perspectivas. A un poco más de 25 años de su invención, la humanidad ha sido testigo de la versatilidad de las aplicaciones de la PCR. 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 (cada día mayor) 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, los reactivos serán más eficientes y disminuirán los costos asociados.

Sin embargo, aunque la utilización de la PCR con fines de diagnóstico y seguimiento de enfermedades continuará, de acuerdo con su creador Kary Mullis «...debemos comprender que su uso para amplificar la información genética y mejorar la secuenciación pronto quedará eclipsado: se hallará una forma de avanzar

sin necesidad de amplificar el ADN»³³. Mullis se refería a los progresos experimentados por el naciente campo de la nanotecnología, técnica que promete producir cambios significativos en los métodos de diagnóstico, así como en el empleo y la monitorización de la farmacoterapia³⁴. La base de esta nueva tecnología reside en el uso de nanopartículas encapsuladas en una matriz de alcohol polivinílico. La matriz modifica la superficie de las nanopartículas para generar cargas negativas que se acoplan con secuencias específicas de los ácidos nucleicos. La unión entre las nanopartículas y el ácido nucleico no sólo sirve para determinar la presencia de polimorfismos en un solo nucleótido, sino también para establecer posibles variaciones en la expresión del ARN.

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.

REFERENCIAS

1. Watson JD, Crick FHC. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953; 171: 737-8.
2. Weiss SB, Gladstone L. A mammalian system for the incorporation of cytidine triphosphate into ribonucleic acid. *J Am Chem Soc*. 1959; 81: 4118-9.
3. Burgess RR, Travers AA, Dunn JJ, Bautz EK. Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature*. 1969; 221: 43-6.
4. Roeder RG, Rutter WJ. Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature*. 1969; 224: 234-7.
5. 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.
6. 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. Nathans D, Smith HO. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Ann Rev Biochem*. 1975; 44: 273-93.
8. 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.
9. Mullis KB. The unusual origins of the polymerase chain reaction. *Sci Am*. 1990; 262: 56-65.
10. Tsongalis GJ, Silverman LM. Molecular diagnostics: A historical perspective. *Clín Chim Acta*. 2006; 369: 188-92.
11. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. 1975; 98: 503-18.
12. 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.
13. Yi-dong W, Li-hua C, Xiu-jing W, Shi-qiang S, Jin-tu L, Li-zhong, et al. Gram specific probes based real time PCR for detection discrimination of bacterial neonatal sepsis. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 2613-9.
14. Cruz PA, Villegas VE, Ramírez SR. Fundamento biológico y aplicación clínica de los marcadores tumorales séricos. *Rev Cienc Salud*. 2008; 2: 85-98.
15. Bellis MA, Hughes K, Hughes S, Ashton JR. Measuring paternal discrepancy and its public health consequences. *J Epidemiol Community Health*. 2005; 59: 749-54.
16. Boving MK, Pedersen LN, Moller JK. Eight-Plex PCR and liquid-array detection of bacterial and viral pathogens in cerebrospinal fluid from patients with suspected meningitis. *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 908-13.
17. Adler M, Schulz S, Fischer R, Niemyer CM. Detection of rotavirus from stool samples using a standardized immunoprecipitation (Imperacer) method with end-point and real-time detection. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 333: 1289-94.
18. Spurgiesz RS, Quitugua TN, Smith KL, Schupp J, Palmer EG, Cox RA, et al. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by using nine novel variable-number tandem repeats across the Beijing family and low-copy-number IS6110 isolates. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 4224-30.
19. Yasuda A, Kimura H, Hayakawa M, Oshiro M, Kato Y, Matsuura N, et al. Evaluation of cytomegalovirus infections transmitted via breast milk in preterm infants with a Real-Time Polymerase chain reaction assay. *Pediatrics*. 2003; 111: 1333-5.
20. Chernesky M, Jang D, Chong S, Sellors J, Mahony J. Impact of urine collection order on the ability of assays to identify *Chlamydia trachomatis* in men. *Sex Transm Dis*. 2003; 30: 345-7.
21. Estripeaut D, Moreno Y, Ahumada S, Martínez A, Racine JD, Sáez Llorens X. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in puerperal women and its impact on their newborns. *An Pediatr (Barc)* 2007; 66: 135-8.
22. Quintero M, Cruz JF, Bastidas M, Márquez L, Puig J. Detección y tipificación del virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR-RFLP. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2008; 68: 25-31.
23. Cunniff C, Andrews J, Meaney FJ, Mathews KD, Matthews D, Ciafaloni E, et al. Mutation analysis in a population-based cohort of boys with Duchenne or Becker muscular dystrophy. *J Child Neurol*. 2009; 24: 425-30.
24. Paulsen JS, Langbehn DR, Stout JC, Aylward E, Ross CA, Nance M et al. Detection of Huntington's disease decades before diagnosis: the Predict-HD study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008; 79: 874-80.
25. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer:

- A critical review. *J Clin Oncol.* 2008; 26: 2568-81.
26. Oliveira C, Senz J, Kaurah P, Pinheiro H, Sanges R, Haegert A, *et al.* Germline CDH1 deletions in hereditary diffuse gastric cancer families. *Hum Mol Genet.* 2009; 18: 1545-55.
 27. Haouas H, Haouas S, Uzan G, Hafsia A. Identification of new markers discriminating between myeloid and lymphoid acute leukemia. *Blood. (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2008; 112: 4891.
 28. Désiré N, Dehée A, Schneider V, Jacomet C, Goujon C, Girard PM, *et al.* Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan Real-Time PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 1303-10.
 29. Latin American consensus conference on hepatitis C. *Ann Hepatol.* 2006; 5(Suppl 1): 15-8.
 30. Ammosova T, Xu M, Nekhai S, Kato GJ, Gladwin MT, Castro OL, *et al.* Detection of the mRNA transcription level of several genes of the HIF and NO metabolic pathways in PBMCs of sickle cell disease patients using quantitative RT-PCR assay. *Blood. (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2007; 110: 844.
 31. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: Identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA.* 2008; 14: 844-52.
 32. Johnson A, Li JF, Wei X, Lipscomb J, Irlbeck D, Craig C, *et al.* Mynority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naive populations and associated with reduced treatment efficacy. *PLoS Med.* 2008; 5: 158.
 33. Dennis Lo YM, Chiu RWK. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis. *Clin Chem.* 2008; 54: 461-6.
 34. «Kary Mullis: La PCR está muy madura y no aportará grandes novedades». En *Diariomédico.com*. [Fecha de acceso: agosto 25 de 2009]. Disponible en: <http://www.diariomedico.com>
 35. Labhasetwar V. Nanotechnology for drug and gene therapy: the importance of understanding molecular mechanisms of delivery. *Curr Opin Biotechnol.* 2005; 16: 674-880.