

# Biología molecular en estomatología - La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Dr. en C. Jorge Antonio Yañez Santos <sup>1</sup>  
Mtra. María Lilia Cedillo Ramírez <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Director  
del laboratorio  
de Investigación  
« Dr. Willoughby  
Dayton Miller  
Facultad  
de Estomatología  
de la Benemérita  
Universidad  
Autónoma de Puebla

<sup>2</sup> Investigadora  
del laboratorio  
de Micoplasmas  
Departamento  
de Investigaciones  
Microbiológicas,  
Instituto de Ciencias  
de la Benemérita  
Universidad  
Autónoma de Puebla

Yañez, A.S., Cedillo, M. R. E. Biología Molecular en estomatología-  
La reacción en cadena de la polimerasa.  
Oral Vol. 3 y 4 Invierno 2000 56:57

Key Word: Biología molecular, polimerasa, PCR

## Resumen

El desarrollo de conocimientos científicos y tecnológicos avanza de manera impresionante y las aplicaciones de la biología molecular en medicina no son la excepción.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es introducir al lector en las bases de una de las técnicas de biología molecular más usadas en la actualidad, la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus siglas en inglés (polymerase chain reaction)

## Introducción

En la actualidad, el desarrollo de conocimientos científicos y tecnológicos han sido tan impresionante que muchas veces es difícil estar actualizado en todas las áreas, sin embargo, muchos de estos conocimientos pueden tener aplicación directa en nuestras actividades cotidianas. El campo del médico estomatólogo no es la excepción, por eso presentamos a ustedes esta breve descripción de una de las técnicas más importantes de la biología molecular, nos referimos a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus siglas en inglés (polymerase chain reaction), la cual ha sido considerada por algunos autores como la contribución biotecnológica más importante de fin de milenio.<sup>1</sup>

Pero usted amable lector se podrá preguntar, de qué manera la biología molecular se relaciona con mi práctica profesional. El médico estomatólogo sabe perfectamente que la periodontitis es una enfermedad inflamatoria que lleva a la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes, y en su forma más severa afecta alrededor del 10% de la población menor de 35 años.<sup>2</sup> Estos individuos pueden perder sus dientes por esta enfermedad y requiere tratamiento de por vida. entre las bacterias que han sido asociadas con la progresión de este padecimiento se encuentra *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, y *Bacteroides Forsythus*.<sup>3</sup> Se ha estimado que alrededor del 50% de la flora oral de los humanos no ha sido posible cultivarse en el laboratorio.<sup>4</sup> Es por lo tanto, muy probable, sobre una base

## Abstract

*Scientific and technological knowledge advances very fast and applications of the molecular biology in medicine are not the exception. Therefore, the objective of the present work is to introduce the reader into the theoretical bases of one of the most used molecular biology techniques, the technique of polymerase chain reaction (PCR).*

numérica exclusivamente, que en la actualidad muchas especies bacterianas no bien caracterizadas tengan un papel en la etiología de la periodontitis.<sup>5</sup>

Avances recientes en la biología molecular han hecho posible el estudio de las comunidades microbianas, incluyendo a especies que no son susceptibles de ser cultivadas en el laboratorio mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.<sup>4</sup>

Otra aplicación en el campo del diagnóstico en estomatología es la diferenciación por especies de algunos bacilos Gram positivos anaerobios facultativos del género *Actinomyces*, de los cuales son aislados frecuentemente de la flora oral <sup>6</sup> y la detección molecular de microorganismos asociados a abscesos dentoalveolares.<sup>7</sup> Así como el diagnóstico temprano y específico de infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), en el caso de pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), aún antes de la aparición de anticuerpos.<sup>8</sup> Otra aplicación práctica es la detección de *Mycobacterium Tuberculosis* en muestras en las que la cantidad de microorganismos es muy escasa. Se considera que la técnica de PCR puede detectar en una muestra clínica el equivalente al genoma de una sola microbacteria.<sup>9</sup>

La reacción en cadena de la polimerasa es un método enzimático capaz de copiar de forma exponencial (amplificación) un fragmento de ADN específico de un determinado microorganismo, o cualquier otro ser vivo. El resultado final de la acción de la enzima ADN polimerasa es la obtención de millones de copias del fragmento genómico problema.<sup>1,10</sup>

Este método, se desarrolla a partir de 1985 por el equipo de Kary B. Mullis y por el que ha recibido el premio Nobel de Química en 1993, se ha convertido en poco tiempo en una herramienta de indudable utilidad para el diagnóstico microbiológico, con un sin número de aplicaciones entre las que se encuentran el diagnóstico de enfermedades genéticas y algunas aplicaciones de carácter forense.<sup>11,14</sup> El método tiene tres etapas.<sup>15</sup>

- Extracción del ácido nucleico a investigar por diferentes métodos.
- Amplificación de la secuencia genómica específica.
- Detección del fragmento amplificado.

A su vez la amplificación de la secuencia genómica específica tiene tres pasos:

- Desnaturalización del ADN por calor (entre 93°C a 95° C).
- Unión de los iniciadores (primers). Los cuales son dos oligonucleótidos, de secuencia de bases conocida, que se unen a cada hebra complementaria de ADN. Por lo tanto, enmarcan la secuencia a copiar y se requieren debido a que la enzima que polimeriza necesita zonas de doble hebra de ADN para iniciar el proceso. Se realiza este paso a temperaturas de 45°C a 65°C.
- Polimerización. La Taq polimerasa (enzima extraída de la bacteria *Thermus aquaticus*, que es capaz de vivir a altas temperaturas) produce la replicación del molde de ADN a partir del extremo 3' de cada iniciador en las dos hebras simultáneamente. Se realiza a temperatura de 70°C a 74°C.

Después de *n* ciclos sucesivos se obtienen 2<sup>*n*</sup> copias de la secuencia genómica específica, aunque por arriba de un determinado número de ciclos no hay aumento del rendimiento.

La detección del fragmento amplificado se realiza por electroforesis en gel de agarosa o por sondas de hibridación. La visualización de bandas se efectúa mediante la incorporación de bromuro de etidio, un compuesto que se fija al ADN y que en presencia de luz ultravioleta produce una coloración naranja brillante (fluorescencia). El único inconveniente de esta técnica es precisamente su mayor ventaja, es decir, debido a su capacidad tan grande de amplificar un genoma, se deben tener ciertas condiciones básicas para evitar que se contamine una muestra y se obtengan falsos positivos.<sup>16</sup>

## Bibliografía

- 1.- Erlich, H. A., D. Gelfand, and J. J. Sninsky. 1991. *recent advances in the polymerase chain reaction*. *Science*, 252: 1643-1651.
- 2.- Page, R. C., L. C. Altman, J. L. Ebersole, G. E. Vandesteen, W. H. Dahlberg, B. L. Williams, and S.K. Osterberg. 1983. *Rapidly progressive periodontitis. A distinct clinical condition*. *J. Periodontol.* 54: 197-209.
- 3.- Dzik, J. L., A. D. Haffajee, and S. S. Socransky. 1988. *The predominant cultivable microbiota of active and inactive periodontal lesions*. *J. Clin. Periodontol.* 15: 316-323.
- 4.- Wilson, M. J., A. J. Weightman, and W. G. Wade 1997. *Applications of molecular ecology in the characterisation of uncultured microorganisms associated with human disease*. *Rev. Med. Microbiol.* 8: 91-101.
- 5.- Harper-Owen R., D. Dymock, V. Booth, A. J. Weightman, and W. D. Wade. 1999. *Detection of unculturable bacteria in periodontal health and disease by PCR*. *J. Clin Microbiol.* 37: 1469-1473.
- 6.- Sato T, J. Matsuyama, N. Takahashi, M. Sato, J. Johnson, C. Schachtele, and E. Hoshino. 1998. *Differentiation of oral Actinomyces species by 16S ribosomal DNA polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*. *Arch. Oral Biol.* 43: 247-252.
- 7.- Dymock, D., A. J. Weightman, C. Scully, and W. D. Wade. 1996. *Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscess*. *J. Clin. Microbiol.* 34: 537-542.
- 8.- Laure, F., C. Rouzioux, F. Veber, C. Jacomet, V. Courgnard, S. Blanche, M. Burgard, C. Griscelli, and C. Brechot. 1988. *Detection of HIV-1 in infants, and children by means of the polymerase chain reaction*. *lancet*. ii: 538-541.
- 9.- Brisson-Noel, A., D. Lecossier, X. Nassif, B. Gicquel, V. Levy-Frebault, and A. J. Hance. 1989. *Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples*. *Lancet* ii: 1069-1071.
- 10.- Mullis, K. B. 1990. *The unusual origin of the polymerase chain reaction*. *Sci. Am.* 262: 56-65.
- 11.- Glick BR & Pasternak JJ. 1994. *Molecular Biotechnology. Principles & Applications of Recombinant DNA* American Society for Microbiology Press, Washington, D.C. p. 55-82.
- 12.- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharaf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase*. *Science*, 239: 487-491.
- 13.- Saiki, R. K., S. J. Sharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. 1985 *Enzymatic amplification of beta-globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. *Science*, 230: 1350-1354.
- 14.- Mullis, K., and F. Faloona. 1987. *Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction*. *Method. Enzymol.* 55: 335-350.
- 15.- M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, N.Y.
- 16.- Kwok, S., and R. Higuchi. 1989. *Avoiding false positives with PCR*. *nature*, 339:237-238.