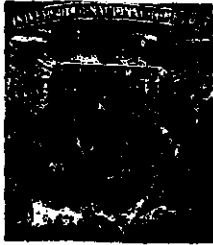


197



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

PCR EN
ODONTOLOGÍA

T E S I S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

P R E S E N T A

NALLELI REYNA CORDOBA

DIRECTOR: CD. JOSÉ LUIS TAPIA VAZQUEZ

ASESORA: C.D.M.O. BEATRIZ C. ALDAPE BARRIOS

Handwritten signatures and initials:
Vc B. [Signature]
Vob [Signature]



MÉXICO, D.F.

2000

274680



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradezco a **DIOS** por permitirme llegar hasta aquí y lograr mis metas

Gracias a **mis padres** por darme las ganas de luchar y conseguir mis propósitos, gracias por sus desvelos y por su amor infinito

Gracias a **mis hermanos** por su apoyo y gran ayuda

Gracias a **Cristina** por todo lo que nunca le he agradecido

Gracias a **Victor Hugo** por ayudarme y apoyarme durante todo este tiempo



Dedico este trabajo a:

DIOS

Por darme la oportunidad de vivir y llegar hasta este sitio

A MIS PADRES, ALICIA CORDOVA E INOCENCIO REYNA

Por el amor, apoyo, comprensión y cariño que me han brindado para lograr mis metas

A MIS HERMANOS YSMENIA, ANTONIO Y OCTAVIO

Por el apoyo y gran paciencia que han tenido conmigo

A CRISTINA CORDOVA

Porque gracias a ella he intentado mejorar como persona

A VICTOR HUGO

Por todo este tiempo y toda la ayuda que me ha brindado



INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES	2
3. ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO.....	4
- Estructura de los nucleotidos.....	7
- ARN.....	9
- Enlaces y disposición.....	11
- Enzimas de síntesis (polimerasas).....	15
4. PCR.....	18
5. COMPONENTES DE LA TECNICA.....	19
- ADN polimerasa.....	19
- "Primers".....	20
▪especificidad.....	20
▪composición.....	20
▪extremo 3'.....	21
▪extremo 5'.....	21
▪espaciamiento.....	21
▪síntesis y purificación.....	21
- Desoxirribonucleotido trifosfato.....	22
- Amortiguador.....	22
- ADN blanco.....	23
- Ciclos térmicos.....	23

6. METODO BASICO DE PCR.....	25
- Desparafinización.....	28
▪ Procedimiento de desparafinización.....	30
▪ Digestión por proteinasa K.....	30
▪ Precipitación de proteínas.....	30
▪ Precipitación del ADN.....	30
- Errores posibles en la realización de PCR.....	31
- Optimización del PCR.....	32
▪ Concentración de la enzima.....	33
▪ Trifosfato desoxirribonucleotidos.....	33
▪ Concentración de magnesio.....	34
▪ Otros componentes de la reacción.....	34
▪ "Primers".....	34
▪ Reconocimiento de los "primers".....	35
▪ Extensión de los "primers".....	35
▪ Tiempo y temperatura de desnaturalización.....	36
▪ Número de ciclos.....	36
▪ Efecto de meseta.....	37
7. PCR EN PATOLOGIA BUCAL.....	38
- Virus de epstein-barr.....	39
- Virus de hepatitis B.....	39
- Citomegalovirus.....	40
- Virus de papiloma humano.....	40
8. CONCLUSIONES.....	41
9. BIBLIOGRAFIA.....	43

INDICE DE FIGURAS

- **FIGURA 1.....6**
Estructura tridimensional de la molécula de ADN
- **FIGURA 2.....19**
Sustancias utilizadas en PCR
- **FIGURA 3.....24**
Material que se utiliza en PCR
- **FIGURA 4.....24**
Material que se utiliza en PCR
- **FIGURA 5.....26**
Procedimiento de centrifugado de las muestras
- **FIGURA 6..... 26**
Procedimiento de centrifugado de las muestras
- **FIGURA 7.....27**
Esquema de la realización del procedimiento de PCR

INDICE DE TABLAS

- **TABLA NUMERO 1.....36**
Guía de ciclos contra blanco
- **TABLA NUMERO 2.....39**
Virus de papiloma humano



INTRODUCCIÓN

Durante las últimas dos décadas han surgido una serie de procedimientos de laboratorio que facilitan en mucho el análisis del ADN; de entre ellos, la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, probablemente es el que ha tenido el mayor impacto en el avance reciente de la biología molecular. Esta técnica permite amplificar a gran escala, regiones específicas del ADN, y facilita la manipulación posterior de los fragmentos amplificados.¹

El principio del PCR se basa en el uso de oligonucleótidos sintéticos que son complementarios a secuencias que flanquean una región específica del ADN molde. Así, por medio de ciclos de amplificación repetidos, que comprenden cambios de temperatura que permiten el alineamiento de los oligonucleótidos con las secuencias complementarias y la síntesis del fragmento de interés, mediante el uso de una ADN polimerasa, es posible obtener regiones discretas del ADN. Las características del PCR se han modificado de acuerdo con las necesidades específicas del campo de estudio en el que se aplica.¹

Uno de los campos principales de aplicación del PCR en la detección de agentes patógenos es el desarrollo de métodos rápidos y sensibles para detectar el virus VIH-1, que es el agente causal del SIDA. Otro campo de aplicación es la detección del papilomavirus del humano, VPH, el cual se asocia con ciertos tipos de cáncer cervico-uterino.¹

Recientemente, estas aplicaciones clínicas del PCR se han favorecido en gran medida con el desarrollo de procedimientos que permiten llevar a cabo la amplificación de los fragmentos de interés, inclusive, a partir de muestras que se han procesado histológicamente y que se conservan como laminillas para observación. Esto resulta de mucha utilidad para el análisis retrospectivo, o para confirmar la ausencia de agentes patógenos en las muestras originales.¹

Dada la sensibilidad y la especificidad que se alcanza al diseñar adecuadamente los experimentos del tipo PCR, esta técnica resulta útil al analizar el contenido microbiológico del agua y el suelo, de donde es posible obtener cantidades suficientes de ADN. Una de las aplicaciones más impresionantes del PCR es precisamente en el campo de la evolución molecular, tanto por sus alcances como por la importancia de la información que se pueda obtener en ella.



ANTECEDENTES



La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la síntesis enzimática para amplificar secuencias específicas de ADN, simulando la replicación natural del ADN; más que una proliferación biológica es un proceso químico "*in vitro*". Esta amplificación puede producir aproximadamente 100 billones de copias de una molécula de ADN en unas cuantas horas.^{3,4}

La tecnología actual del PCR es resultado de una serie de descubrimientos, comenzando con el de la primera polimerasa de ADN en 1955 por Arthur Kornberg; la polimerasa de ADN, es la enzima responsable de la síntesis del mismo y fue purificada en 1958. Entre 1955 y 1970 se describió la termodinámica del reconocimiento y extensión de los "primers" (un par de oligonucleótidos sintéticos), que se unen a la región a ser amplificada. En 1971 Har Gobin Khorana describió la idea de la síntesis de ADN, mediante el estudio del gen que codifica el ARN de transferencia de la levadura. Inicialmente, la síntesis "*in vitro*" del ADN era conocida como "reparación de la replicación de ADN."³

Kjell Kleppe, (postdoctorado de los laboratorios Khorana), realizó el primer experimento; el cual era una reacción que involucraba dos ciclos de amplificación de un fragmento de ADN de 30 nucleótidos de largo.^{3,5}

Entre 1970 y 1972, Ian J. Molineux en el laboratorio del Dr. Khorana logró tres ciclos de amplificación de cuatro secuencias de ADN relativamente cortas, utilizando la molécula de la polimerasa I del ADN intacta con el fin de sintetizar ADN "*in vitro*". Para evitar la degradación del producto durante el proceso era necesario trabajar con un pH lejano al óptimo para la enzima, lo que provocaba reacciones demasiado lentas. Los "primers" eran extremadamente laboriosos, caros de producir y la mayoría de los utilizados en el PCR rutinariamente no podían ser sintetizados, por lo que Molineux pasaba la mayor parte del tiempo preparando y caracterizando substratos.³

Hans Klenow descubrió, en 1971, el fragmento que lleva su nombre. Este era un fragmento largo de la polimerasa I de ADN obtenido de la *Escherichia coli*, este no era estable a altas temperaturas. La amplificación a gran escala de ADN no fue continuada por los laboratorios de Khorana, principalmente porque creían que la meta de la síntesis



de ADN "in vitro" había sido alcanzada y se interesaron en nuevos descubrimientos. Además las polimerasas estables a altas temperaturas eran desconocidas.^{2,3,4,5}

El PCR consiste en varios ciclos en los cuales tres pasos (desnaturalización, reconocimiento y extensión de los "primers") se repiten en el mismo orden. Los "primers" se añaden en exceso para favorecer la unión al ADN blanco y no la reasociación de las bandas complementarias. La temperatura usada para el reconocimiento oscila entre 37 - 55°C.^{2,3,4,5,7,8,9,10}

Existen varios tipos de polimerasas, el primer experimento de PCR utilizó el fragmento Klenow para la extensión de "primers" a una temperatura de 37°C, esto produjo problemas ya que era necesario añadirlo después de cada paso de desnaturalización por su inestabilidad. También por ser inespecífica produce muchos errores.^{2,3,4,5,7,8,9,10}

El descubrimiento de la polimerasa *Taq* fue un gran avance, es termoestable y la descubrieron por primera vez en el *Thermus aquaticus*, que se encuentra en las aguas hirvientes de los geysers. Con esta polimerasa puede realizarse el paso de extensión del PCR a una temperatura de 72°C y permanece activa después de una exposición repetida a 94°C durante la desnaturalización. Esta es más específica y produce menos errores.^{2,3,4,5,7,8,9,10}

Una manera de valorar la fidelidad de una polimerasa consiste en monitorear la frecuencia con la cual la enzima mal incorpora los nucleótidos durante el proceso de replicación. Actualmente existen polimerasas termoestables de ADN adquiribles comerciales aisladas de *Thermus flavis*, *Thermococcus litbucalis* y *Thermus aquaticus*. El uso de las polimerasas termoestables permite la automatización del PCR.^{2,3,5,6}

La principal ventaja del PCR es su excepcional sensibilidad. Una secuencia de ADN de uno en 100,00 células o 130 genomas del virus de la hepatitis B en 1 ml de suero puede ser detectada. No es necesario purificar las muestras antes de ser sujetas al PCR y los especímenes pueden ser viejos o degradados, mientras la secuencia no se encuentre rota en la región de interés, la amplificación puede realizarse.¹¹



El uso del PCR en tejidos embebidos en parafina ha llegado a ser una técnica bien definida de la cual existen muchas variantes. EL establecimiento de esta técnica nos permite estudiar pequeñas cantidades degradadas de ácidos nucleicos de material de laboratorio y poder analizar especímenes de varios años de antigüedad permitiendo realizar estudios retrospectivos.^{9,12}

El PCR puede ser utilizado para aislar y analizar fragmentos de ADN, analizar interacciones entre proteínas y ADN, conocer secuencias de ADN y ARN y manipulación de terapia genética. Por lo que nos abre nuevas áreas de investigación dentro de la patología bucal, como el sondeo de tejido patógeno para obtención de secuencias específicas de bacterias, virus, mutaciones oncogénicas y enfermedades asociadas a mutaciones. Principalmente la detección del virus del Papiloma Humano, Herpes Simplex tipo I y II y patologías relacionadas con Epstein – Barr.²

ACIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

La molécula de ADN tiene la capacidad de preservar el material genético y duplicarlo para transmitirlo a la generación siguiente. La unidad básica de ADN es un polímero lineal de cuatro subunidades monoméricas diferentes y una secuencia lineal de desoxirribonucleótidos, en donde se encuentra codificada la información genética. Dos cadenas poliméricas se enrollan una sobre otra para la formación de la doble hélice de ADN en la que cada subunidad monomérica queda unida con la subunidad complementaria de la cadena opuesta. En el proceso de reparación o replicación del ADN, una de las cadenas sirve como molde para la construcción de otra cadena estructuralmente complementaria, separándose y formando otra cadena generándose dos moléculas de doble hélice idénticas.^{12,13}

El descubrimiento del ADN fue hecho en 1869 por Friedrich Miescher, médico suizo que trabajaba en el laboratorio del químico fisiólogo alemán Feliz Hoppe-Seyler en la Universidad de Tübingen. , al estudiar leucocitos obtenidos de los vendajes de pacientes en postoperatorio, utilizando ácido clorhídrico obtuvo el núcleo celular. Añadió una disolución alcalina a los núcleos y mostró que contenían carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y un alto porcentaje de fósforo, llamándole a este nuevo compuesto "nucleína" la cual al descubrir su carácter ácido se le llamó ácido nucleico. Miescher y otros investigadores sospecharon que la nucleína o ácido nucleico estaba relacionada de alguna manera con la herencia celular.¹³

Los avances más significativos se deben a la aparición de la hipótesis de un gen - enzima, hecha por G. W. Beadley y E. L. Tatum en 1941 y al trabajo de Oswald T. Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty en 1944 cuando descubrieron la primera evidencia directa de que el ADN era el responsable de la información genética. Encontraron que el ADN extraído de una cepa virulenta del *Streptococcus pneumoniae* (neumococo), era capaz de transformar genéticamente una cepa no virulenta convirtiéndola en una forma virulenta, concluyendo que el ADN extraído de la cepa transportaba el mensaje genético hereditario que provoca la virulencia.¹³

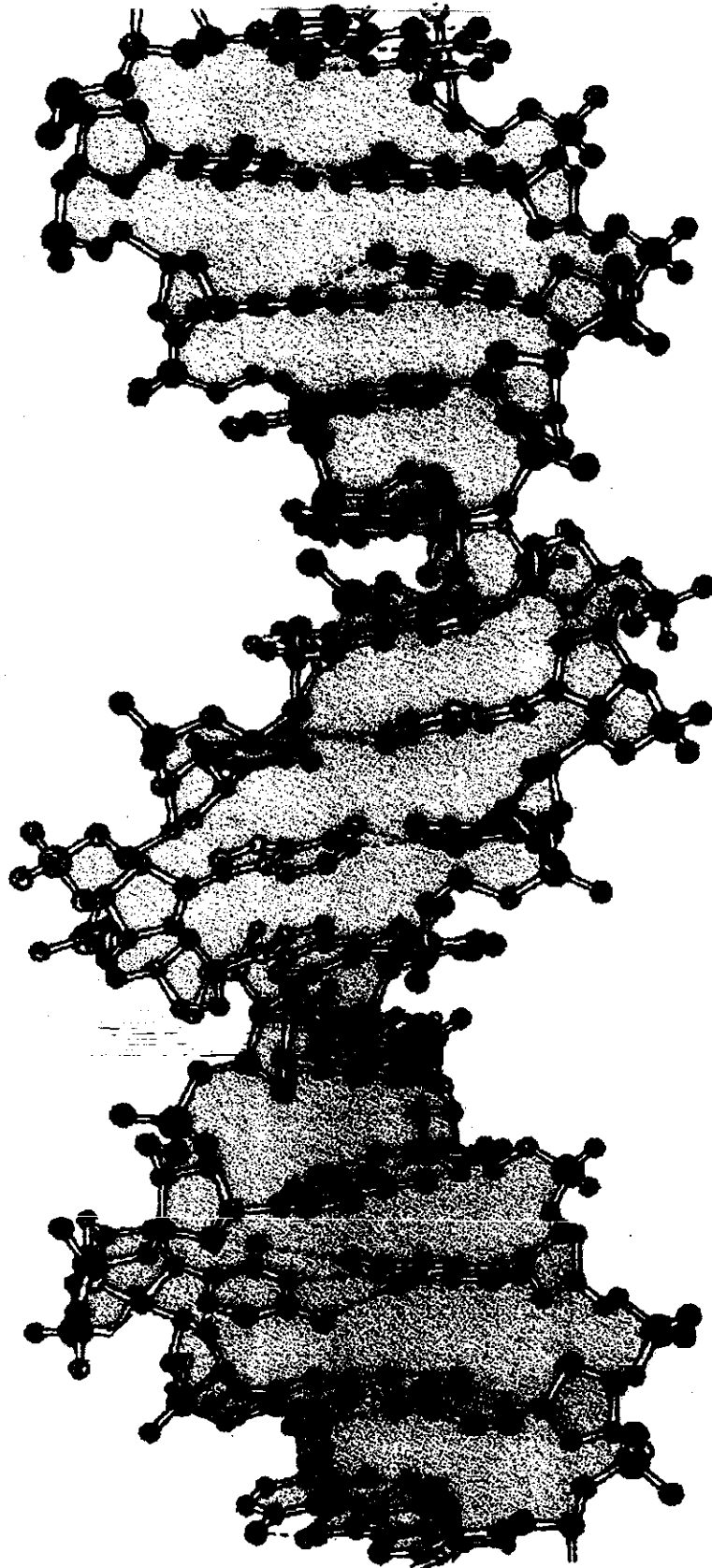


Figura. 1. - Estructura tridimensional de la molécula de ADN

ESTRUCTURA DE LOS NUCLEÓTIDOS

El ácido desoxirribonucleico (ADN) está formado por cadenas de desoxirribonucleótidos unidos covalentemente, el ácido ribonucleico (ARN) está formado por cadenas de ribonucleótidos, teniendo en común ciertas propiedades químicas y físicas, debido a que se hallan unidos de manera similar por medio de puentes fosfodiester establecidos entre el grupo 5'-hidróxilo de un nucleótido y el grupo 3'-hidróxilo del siguiente. De esta forma el esqueleto de ambas estructuras está constituido por grupos alternos de fosfato y pentosa donde los puentes fosfodiester proporcionan una continuidad covalente. Las bases de purina y pirimidina no forman parte del esqueleto, solo constituyen cadenas laterales diferenciadas.¹³

Durante la replicación se copia el cromosoma entero dando ADN duplicado idéntico al ADN parenteral; siendo la transcripción un mecanismo selectivo, en un momento determinado se transcribe sólo un gen específico o un grupo de genes, por lo que es posible regularla para obtener la información genética que necesitamos en cualquier momento.^{13,14}

Se llevaron a cabo diversos experimentos cromatográficos que condujeron al análisis de la composición en aminoácidos. E. Chargaff realizó uno referente a la equivalencia molar de ciertas bases de ADN, siendo esta un elemento importante para la deducción de la estructura tridimensional del ADN.¹³

W. Astbury y L. Pauling realizaron un análisis por difracción de rayos X sobre la conformación de las proteínas globulares, lo que proporcionó el conocimiento de la conformación específica de cada proteína.¹³

Fue hasta 1953, cuando J. D. Watson y F. H. Crick dieron a conocer la estructura de doble hélice del ADN, estableciendo una concordancia con la equivalencia molar de las bases y los diagramas de rayos X, indicando la existencia de un sencillo mecanismo por el que la información genética podía ser transferida.¹³

Esta hipótesis fue desarrollada y extendida hasta dar a conocer lo que Crick llamó "dogma central de la genética molecular", que establece que la información genética es transmitida por medio del ADN al ARN y de ahí a la proteína. Este dogma definió tres procesos principales de la preservación y transmisión de la información genética. El primero es la replicación o copia del ADN para la formación de moléculas semejantes al mismo. El segundo es la transcripción mediante el cuál el mensaje del ADN es transmitido al ARN mensajero para ser transportado a los ribosomas. El tercero es la traducción, donde el mensaje es descifrado en los ribosomas.¹³



ARN

Posteriormente se reveló la existencia de dos tipos de ácidos nucleicos el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). Levene demostró la composición del ADN, compuesta por cuatro bases nitrogenadas dos purinas (adenina y guanina) y dos pirimidinas (citosina y timina), un azúcar de cinco carbonos (desoxirribosa) y grupos fosfato, siendo ligadas por enlaces glucosídicos y éster. El nucleótido o unidad fundamental esta formada por la combinación de una base nitrogenada, una pentosa y un fosfato.^{13,14}

Posterior al descubrimiento del ADN, Felix Hoppe Seyler descubrió una sustancia similar, (ARN) siendo aislada en un principio en la levadura y posteriormente en bacterias y plantas, por lo que se pensó que estaba ausente en animales y si se encontraba era por el tipo de alimentación. Esta idea se mantuvo hasta el año de 1914 cuando Robert Feulgen descubrió un colorante que teñía al ADN y otro al ARN, descubriendo la presencia de ambas sustancias en todas las células.¹³

La estructura del ARN consiste en un polímero lineal de unidades ribonucleótidas unidas por enlaces fosfodiéster. Siendo similares en este aspecto sólo se diferencian estructuralmente en:

- El azúcar, ribosa en ARN y 2-desoxirribosa en ADN
- La base pirimidica timina presente en el ADN es sustituida por el uracilo en el ARN
- Las moléculas del ARN son monocatenarias.

Por la general el ADN se encuentra en el núcleo y la síntesis de proteínas se realiza en los ribosomas del citoplasma. Por lo se descubrió que una molécula distinta del ADN transporta el mensaje genético desde el núcleo hasta el citoplasma. Muchas moléculas de ARN participan en el proceso de expresión de la información genética. A estas moléculas se les asigna un nombre por su localización y función.¹³



1. El ARN mensajero (mARN), transporta la información genética del ADN a los ribosomas, El proceso de formación del mARN sobre un molde de ADN se conoce como transcripción.
2. El ARN ribosómico (rARN), es una parte constitutiva de los ribosomas y constituye aproximadamente el 75% del ARN total celular
3. El ARN de transferencia (tARN), transporta los residuos de aminoácidos que son adicionados a las cadenas polipeptídicas crecientes durante la síntesis de proteínas.¹³



ENLACES Y DISPOSICIÓN

Los nucleótidos del ADN y el ARN están unidos mediante puentes de grupos fosfato. El grupo hidroxilo en 5' de un nucleótido está unido al grupo hidroxilo en 3' del siguiente nucleótido por un enlace fosfodiéster. Formando unidades alternas de grupos fosfato, y residuos de pentosa, mientras que las bases son grupos laterales unidos al esqueleto a intervalos regulares, debe notarse que los esqueletos covalentes del ADN y el ARN son hidrofílicos. Todos los enlaces fosfodiéster de las cadenas de ADN y ARN tienen la misma orientación a lo largo de la secuencia, con lo que cada cadena lineal de ácido nucleico tiene una polaridad específica y extremos 5' y 3' diferenciados. Por definición, en el extremo 5' no hay ningún nucleótido en la posición 5', mientras que en extremo 3' falta un nucleótido en la posición 3'. En uno o en ambos extremos pueden haber presentes otros grupos. Por convención, la estructura de una cadena o hebra simple de ácido nucleico se escribe siempre con el extremo 5' a la izquierda y el 3' a la derecha; es decir, en la dirección 5' → 3'. Un ácido nucleico de cadena corta se denomina oligonucleótido, este término se utiliza a menudo para polímeros que contienen 50 nucleótidos o menos. Los ácidos nucleicos de mayor longitud se denominan polinucleótidos.¹³

Las fuerzas responsables de las conformaciones nativas de las estructuras complejas celulares, como los ácidos nucleicos, son lo suficientemente fuertes para mantener la integridad estructural, pero lo suficientemente débiles como para permitir una flexibilidad conformacional. Los enlaces covalentes son, muy importantes, ya que proporcionan el aglutinante que une los átomos en las moléculas; sin embargo, las fuerzas débiles (el efecto hidrofóbico, las fuerzas de Van der Waals, los enlaces de hidrógeno y los efectos electrostáticos) son las que determinan las formas plegadas de las estructuras biológicas. Pueden distinguirse cuatro factores principales que contribuyen a la estabilidad del ADN.¹³

1. Los efectos hidrofóbicos estabilizan los apareamientos de las bases. Los anillos hidrofóbicos de purina y pirimidina de las bases son empujados hacia el centro de la doble hélice en virtud de la elevada cohesión interna de las moléculas de agua.
2. Las bases apiladas forman contactos de Van der Waals. Los pares de bases se encuentran, apilados unos sobre otros, a lo largo del eje central, de la doble hélice. Las fuerzas de Van der Waals entre las bases apiladas son débiles pero aditivas, de



forma que en una molécula que contenga más de 10 4 pares de bases de las fuerzas de Van der Waals suponen una importante fuente de estabilidad.

3. Los pares de bases están unidos mediante enlaces de hidrógeno. El par de bases CG es más estable que el par AT por contener un enlace de hidrógeno más.
4. El esqueleto del ADN interacciona con cationes. El esqueleto del ADN, de tipo fosfodiéster, tiene carácter ácido, y a pH 7.0 presenta una gran carga negativa. La repulsión electrostática entre los grupos fosfodiéster negativos es una fuente potencial de inestabilidad de la doble hélice; sin embargo, los cationes celulares, y en particular el Mg^{++} , se unen fuertemente al esqueleto fosfodiéster del ADN, estabilizando la doble hélice.¹³

Es importante remarcar que las purinas y las pirimidinas son también hidrofóbicas y relativamente insolubles en agua a pH celular, cercano a la neutralidad a pH ácido o alcalino las purinas y pirimidinas adquieren carga y aumenta su solubilidad en agua. Las interacciones hidrofóbicas de apilamiento, por las que dos o más bases se sitúan de modo que los planos de sus anillos se encuentren paralelos es uno de los dos tipos principales de interacción entre bases. El apilamiento incorpora una combinación de interacciones de Van der Waals y del tipo dipolo - dipolo entre las bases.¹³

La formación de enlaces de hidrógeno en los que participan los grupos amino y carbonilo constituye el segundo tipo principal de interacción entre bases. Los enlaces de hidrógeno entre bases permiten la asociación complementaria de las cadenas de ácido nucleico, los patrones de enlaces son A se enlaza específicamente con T (o U) y G se enlaza con C. La unión específica de las bases permite la duplicación de la información genética por la síntesis de cadenas de ácido nucleico complementarias a las ya existentes.¹³

La doble hélice de ADN se desenrolla localmente durante procesos tales como la replicación del ADN, la transcripción al ARN y la recombinación genética. El desenrollamiento completo del ADN puede ocurrir *in vitro* y se denomina desnaturalización del ADN o transición hélice cadena. Este fenómeno tiene lugar al romperse los enlaces de hidrógeno entre las bases con la separación consiguiente de los pares de bases. Las disoluciones de ADN cuidadosamente aislado y en estado nativo son muy viscosas a pH 7.0 y temperatura ambiente. Cuando una disolución de este tipo se somete a valores extremos de pH o a temperaturas superiores a los 80 o 90°C, su viscosidad desciende rápidamente, indicando que el ADN ha sufrido un cambio en su estado físico. El calor y los valores extremos de pH provocan la desnaturalización o la fusión del ADN de doble hebra. Esta desnaturalización conlleva la rotura de enlaces





de hidrógeno entre las bases apareadas y la rotura de las interacciones hidrofóbicas entre las bases apiladas.^{13,14}

Por lo tanto, la doble hélice se desenrolla, ya sea totalmente, dando lugar a dos hebras simples completamente separadas una de otra en toda su extensión, o bien parcialmente, de manera que parte de la molécula todavía conserva la estructura en doble hélice. La desnaturalización no rompe ningún enlace covalente del ADN. La temperatura de fusión del ADN T_m , está determinada por la composición de bases del mismo. Ya que el AT tiene un enlace de hidrógeno menos que el par CG, los pares de la doble hélice que son ricos en pares de bases AT serán las primeras en desenrollarse, por lo tanto, al aumentar el número de pares de CG, se incrementa la T_m , y al disminuir el contenido de éstos, decrece la T_m .^{13,14}

La renaturalización del ADN es un proceso rápido de un solo paso, siempre que todavía exista un segmento en doble hélice de doce o más residuos que mantenga unidas las dos hebras. Cuando la temperatura y el pH retoman a valores situados dentro del margen biológico, los segmentos desenrollados de las dos hebras vuelven a enrollarse, es decir hibridarse para dar lugar al dúplex intacto. Si bien las dos hebras están completamente separadas, la renaturalización ocurre en dos pasos. El primero de ellos es relativamente lento, puesto que las dos hebras deben en primer lugar encontrarse mediante colisiones al azar y formar un segmento corto de doble hélice complementaria. Es segundo paso es mucho más rápido: las bases no apartadas que restan forman sucesivamente los pares de bases correctos formando finalmente la doble hélice completa. Cada especie de ADN tiene una temperatura de desnaturalización o temperatura de fusión características: cuanto más alto sea el contenido en pares de bases G-C, más elevada será la temperatura de fusión del ADN. Esto es debido a que los pares de bases G-C, con tres enlaces de hidrógeno, son más estables que los pares A-T y requieren más energía calorífica para disociarse.^{13,14}

Los procesos de replicación del ADN y los mecanismos utilizados por las enzimas que la catalizan han demostrado que son, básicamente, idénticos en todos los organismos. Esta replicación es semiconservadora, si cada cadena de ADN actúa de molde para la síntesis de una nueva cadena, se producirán dos moléculas de ADN nuevas, cada una con una cadena nueva y una vieja, este proceso se denomina replicación semiconservadora.¹³

La hipótesis de la replicación semiconservadora fue propuesta por Watson y Crick poco después de la publicación de su artículo sobre la estructura del ADN; la teoría fue



confirmada por Matthew Meselson y Franklin Stahl en 1957. Utilizando la técnica de la autorradiografía John Cairns proporcionó una primera indicación de que la replicación es un proceso altamente coordinado en el que las cadenas parenterales se desenrollan y replican simultáneamente, un extremo del lazo, o los dos, son puntos dinámicos llamados horquillas de replicación en donde se desenrolla el ADN parental y las cadenas separadas se replican rápidamente; lo cual demuestra que las dos cadenas de ADN se replican simultáneamente y que dicha replicación es bidireccional: los dos extremos del lazo son horquillas de replicación activas.¹³

Una cadena nueva de ADN siempre se sintetiza en la dirección 5'→3' debido a que las dos cadenas de ADN son antiparalelas, la cadena actúa de molde se lee desde su extremo 3' al 5'. Reiji Okazaki encontró que una de las cadenas nuevas de ADN se sintetiza en piezas cortas denominadas fragmentos de Okasaki, lo cual condujo a la conclusión de que una cadena se sintetiza continuamente y la otra discontinuamente. La cadena continua o cadena conductora es aquella en la que la síntesis 5'→3' transcurre en la misma dirección que el movimiento de horquilla de replicación. La cadena discontinua o cadena rezagada es aquella en la que la síntesis 5'→3' transcurre en la dirección opuesta a la del movimiento de la horquilla. Los fragmentos de Okasaki tienen una longitud entre unos pocos centenares y unos pocos millares de nucleótidos, según el tipo de célula.¹³



ENZIMAS DE SÍNTESIS (POLIMERASAS)

La búsqueda de una enzima que pudiese sintetizar el ADN fue iniciada en 1955 por Arthur Kornberg y colaboradores. Este trabajo llevó a la purificación y caracterización del ADN polimerasa de células de *E. coli*, que es un polipéptido sencillo denominado actualmente ADN polimerasa I, posteriormente se encontró que *E. coli* contiene al menos otras dos ADN polimerasas diferentes.^{3,4,13}

Los trabajos iniciales sobre el ADN polimerasa I llevaron a la definición de dos requisitos centrales para la polimerización del ADN. Primero, todo el ADN polimerasas requieren un molde. La reacción de polimerización es conducida por una cadena molde de ADN según las reglas de apareamiento de bases predichas por Watson y Crick: en donde hay una guanina en el molde se añade una citosina a la nueva cadena y así sucesivamente. Este fue un descubrimiento especialmente importante, no sólo porque proporcionó una base química de la replicación semiconservadora del ADN, sino porque representó el primer ejemplo del uso de un molde para guiar una reacción biosintética. Segundo, se requiere un cebador o "primer". Un cebador es un segmento de una cadena nueva con un grupo 3'-hidroxilo al que se pueden añadir nucleótidos. El extremo 3' del cebador se denomina extremo cebador. Dicho de otro modo, parte de la cadena nueva ya ha de estar en su sitio; la polimerasa sólo puede añadir nucleótidos a una cadena preexistente. Esto se ha demostrado para todo el ADN polimerasas, y este descubrimiento proporcionó una sugerencia interesante en la historia de la replicación del ADN.¹³

Ninguna enzima sintetizadora de ADN puede iniciar la síntesis de una cadena de ADN nueva. Después de la adición de un nucleótido a una cadena creciente de ADN, el ADN polimerasa se ha de disociar o bien trasladarse a lo largo del molde y añadir otro nucleótido. La disociación y reasociación de la polimerasa puede limitar la velocidad global de reacción, por lo que la velocidad aumenta en general si una polimerasa adiciona nucleótidos sin disociarse del molde. El número de nucleótidos adicionados, en promedio, antes que se disocie una polimerasa se define como su procesividad. Las ADN polimerasas muestran gran variación en su procesividad; algunas adicionan unos pocos nucleótidos mientras que otras adicionan muchos millares antes de que tenga lugar la disociación.¹³





La replicación ha de realizarse con un grado de fidelidad muy elevado. En *E. coli*, se comete un error sólo en uno de cada 10^9 a 10^{10} nucleótidos adicionados. Dado que el cromosoma de *E. coli* es de unos $4,7 \times 10^6$ pares de bases, esto significa que se comete un error cada 1,000 a 10,000 replications. Durante la polimerización, la discriminación entre nucleótidos correctos e incorrectos se basa en los puentes de hidrógeno que especifican el apareamiento correcto entre bases complementarias. Las bases incorrectas no forman los puentes de hidrógeno adecuados, por lo que se pueden desechar antes de que se forme el enlace fosfodiéster. La precisión de la propia reacción de polimerización es, no obstante, insuficiente para explicar el elevado grado de fidelidad en la replicación. En los mecanismos *in vitro* se ha observado que las ADN polimerasas insertan un nucleótido incorrecto por cada 10^4 a 10^5 correctos. Dicha tasa de error se disminuye aún más *in vivo* gracias a mecanismos enzimáticos adicionales.¹³

Un mecanismo intrínseco virtualmente a todas las ADN polimerasas es una actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ separada que sirve para realizar una doble comprobación de cada nucleótido después de ser adicionado. Esta actividad nucleasa permite que el enzima elimine un nucleótido recién incorporado siendo altamente específica para pares de bases incorrectos. Si se ha adicionado un nucleótido incorrecto, la translocación de la polimerasa a la posición en donde se ha de adicionar el siguiente nucleótido queda inhibida. La actividad $3' \rightarrow 5'$ exonucleasa elimina el nucleótido mal apareado y la polimerasa vuelve a empezar. Esta actividad, denominada corrección de pruebas, no es sencillamente el inverso de la reacción de polimerización ya que no interviene el pirofosfato. Las actividades de polimerización y de corrección de pruebas de una ADN polimerasa se puede medir separadamente. Tales medidas han mostrado que la corrección de pruebas mejora la precisión inherente de la reacción de polimerización por un factor de 10^2 a 10^3 .¹³

Una base mal apareada impide la translocación del enzima al sitio siguiente deslizando hacia atrás, la enzima corrige el error con su actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ y a continuación reemprende su actividad polimerasa en la dirección $5' \rightarrow 3'$.¹³

Además de la polimerasa I se han descubierto otras polimerasas del ADN, las cuales se ha observado tienen diferentes funciones dentro de la replicación. La polimerasa I del ADN mas que una enzima iniciadora de la replicación es la encargada de la corrección de las mal incorporaciones que suceden durante el proceso de



replicación del ADN. Esta polimerasa fue la primera en ser descubierta y sintetizada por lo cual los primeros trabajos de síntesis del ADN *in vitro* fueron realizados con dicha polimerasa. Hasta nuestros días se han encontrado otras enzimas por medio de las cuales el proceso de amplificación de ADN *in vitro* ha sido mejorado dando como resultado la posibilidad de realizarlo con una mayor facilidad y rapidez, por lo tanto este tipo de procedimientos han sido utilizados más rutinariamente. Otorgándonos la posibilidad de utilizar la biología molecular dentro de otras áreas por lo que el conocimiento de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa para un mejor desarrollo de las técnicas dentro de la patología bucal y sus posibilidades dentro de esta rama de la odontología.²



PCR

La biología molecular ha avanzado mucho recientemente lo que ha traído como consecuencia cambios profundos en la investigación médica, llevándonos a un nivel de entendimiento en las enfermedades genéticas, infecciosas y neoplásicas. Uno de los aspectos que tuvo un mayor desarrollo es la capacidad de diagnosticar las enfermedades a un nivel molecular. El diagnóstico de enfermedades de infecciones virales, incluyendo a aquellas que afectan la región orofacial, viéndose beneficiando por la detección de ADN viral con una gran sensibilidad. ^{2,3,4,5,6,7,10,11,15,16}

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una amplificación enzimática de una secuencia de ADN seleccionada; el cual es un proceso químico más que un proceso biológico de ampliación. Para realizar una detección de ADN por medio de pruebas tipo Southern se requiere normalmente, de 5 - 10 microgramos (10⁶ gramos) de ADN genómico, esta cantidad de ADN esta presente en cerca de 10⁶ - células nucleadas. El Southernblot más sensible puede revelar una secuencia anormal solo cuando está presente en un 2 - 5% de las células en una mezcla heterogénea. El PCR resuelve el problema de detectar anomalías en el ADN que ocurren en baja frecuencia en la población blanco o el problema de muy poca cantidad de ADN para, analizar, por medio de una amplificación enzimática de una secuencia blanco antes de realizar las pruebas de Southern. ^{2,3,4,5,6,7,10,11,15,16}

El proceso de PCR consta de un número de ciclos para amplificar una secuencia específica de ADN; cada ciclo tiene tres pasos sucesivos:

- **Desnaturalización:** provocada por la elevación de la temperatura a 95°C en muestras que contienen la fuente de ADN, un exceso molar de dos "primers", una polimerasa termoestable, y los cuatro deoxiribonucleótidos. Manteniendo esta temperatura durante un minuto.
- **Renaturalización:** la temperatura disminuida a 55°C. Durante este paso, los "primers" se unen a sus secuencias complementarias en la fuente de ADN.
- **Síntesis:** la temperatura es elevada a 75°C, siendo óptima para la función catalítica de la polimerasa. La síntesis de ADN es iniciada en el extremo 3' hidroxilo de cada "primer". ^{2,3,4,5,6,7,10,11,15,16}



COMPONENTES DE LA TECNICA

Los componentes más importantes para el PCR son la ADN polimerasa, los "primers" (oligonucleótido corto que hybridiza con un blanco), dNTP (trifosato deoxinuclotido), el amortiguador y el ADN blanco.



Figura. 2.- Sustancias utilizadas en PCR

ADN polimerasa

La *Taq* polimerasa de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* ha reemplazado el uso del fragmento Klenow de *E. Coli* ADN polimerasa I en el PCR. La polimerasa *Taq* resiste los 94 - 96°C requeridos para la desnaturalización del ADN y solo es necesario añadirla en el comienzo del procedimiento del PCR.

La temperatura óptima para la *Taq* polimerasa es de 72°C, aun cuando puede ser observada una actividad significativa a temperaturas tan bajas como 55°C. La actividad enzimática de esta requiere iones Mg^{++} y es potencializada por bajas concentraciones de KCl; esta es fácilmente inhibida por componentes hemáticos presentes en la sangre lisada y por enzimas celulares presentes en extractos de tejidos. Una unidad de esta polimerasa corresponde a aproximadamente 5×10^{-8} M, es normalmente requerida en el PCR.^{15,16}



"Primers"

Podemos mencionar varios principios fundamentales para el diseño de los "primers" lo que nos ayudará a disminuir problemas de especificidad y sensibilidad.^{2,3,4,5,7,15,16,17}

Especificidad

Esta relacionada con la longitud del "primer". Si un "primer" es demasiado corto podría ser complementario a múltiples genes y puede unirse específicamente a una región inapropiada del ADN. Un oligonucleótido debe de ser de cuando menos de 17 bases de longitud para evitar que se una a una región no deseada. Para una mayor estabilidad para el PCR generalmente son de 20 nucleótidos de longitud. El incremento en la longitud puede afectar la movilidad y el tiempo para unirse al ADN blanco.^{2,3,4,5,7,15,16,17}

Composición

Una fuerte unión entre el "primer" y el ADN blanco es importante para la estabilidad, especialmente a las altas temperaturas utilizadas para la extensión con la *Taq* polimerasa. La estabilidad esta directamente relacionada con ambas, la longitud del "primer" y el contenido de nucleótidos G:C contra A:T. Una fórmula útil para calcular la influencia de la longitud y contenido de G:C en la temperatura de disociación es: T_m [temperatura de fusión] (expresada en °C) = $4(G + C) + 2(A + T)$ para oligomeros de 11 - 20 nucleótidos de longitud. El T_m es también influenciado por la concentración de sales y por varios agentes orgánicos. Ya que la temperatura óptima para la enzima *Taq* es de 72°C, es deseable seleccionar "primers" con relativamente alto contenido de G:C. Ocasionalmente, son necesarios "primers" que puedan tolerar variabilidad en la secuencia en posiciones específicas dentro del ADN blanco. Las mal incorporaciones sencillas puede reducir el T_m en aproximadamente 5°C. Una solución útil a este problema es la utilización del nucleótido inosina. Esta base actúa como neutral y se puede insertar por medio de puentes de hidrógeno con cada uno de los 4 desoxinucleótidos posibles en el ADN. La inosina es leída como una guanina durante la replicación del ADN. Y esta no contribuye a la estabilidad del híbrido y no debe ser incluida cuando se calcula el T_d para un "primer".¹⁵



Extremo 3'

Es importante que la terminación 3' de los dos "primers" no sean complementarios el uno con el otro, ya que si estos se unen actuarían como un sustrato para la polimerasa del ADN y siendo el producto predominante en el PCR. Esta complicación, llamada formación de "primer-dimer" puede ocurrir algunas veces aún cuando los extremos 3' no son complementarios, lo cual presumiblemente refleja una disyunción enzimática. Es más importante que la base 3' de él "primer" sea complementaria al ADN blanco para permitir una interacción eficiente con la Taq polimerasa. La naturaleza degenerativa del código genético se refleja con mayor frecuencia en la tercera base de la secuencia del codon. Por lo tanto es preferible tener la base terminal del "primer" complementaria a la primera o segunda base de un codon.^{3,4,6,7,11,15,16}

Extremo 5'

Los "primers" pueden tolerar mayores adiciones en su terminación 5' sin una pérdida significativa en la actividad del PCR. Esto ha permitido la síntesis de productos de PCR con regiones terminales funcionales para facilitar la detección, clonaje y secuenciamento.^{3,4,6,7,11,15,16}

Espaciamiento

El tamaño del producto del PCR es determinado por la distancia de separación en el extremo 5' de los dos sitios de unión de los "primers" en la doble banda de ADN. Dando como resultado que el ADN blanco no es degradado, las extensiones largas de ADN pueden ser amplificadas (6 - 10 kb). Para la mayoría de los usos, de cualquier modo, extensiones de 100 - 200 bases son más eficientemente replicadas. Las extensiones largas de ADN blanco pueden producir "primers" parcialmente extendidos que tienden a incorporarse erróneamente en los ciclos subsecuentemente.^{15,16}

Síntesis y purificación

Los "primers" pueden ser sintetizados utilizando equipo automatizado. Alternativamente, estos pueden ser adquiridos comercialmente. Para resultados óptimos, los "primers" deben ser homogéneos en tamaño. Los "primer" son utilizados en concentraciones de 0.2-10µM.^{15,16}



DESOXIRRIBONUCLEOTIDO TRIFOSFATO

La mezcla de PCR recomendada contiene 20 μ M de cada uno de los cuatro dNTP. Esto es suficiente material para sintetizar mas de 10 μ g de ADN. El PCR generalmente Produce menos de 1 μ g de producto, y menores concentraciones de DNTF pueden ser empleadas. El pH de la solución de nucleótidos debe ser ajustada a 7.0.^{3,4,5,5,8,12,15,17}

AMORTIGUADOR

Los ingredientes restantes en el PCR son 10 mM Tris-Cl para mantener el pH a 8.3, 2.5 mM MgCl₂, gelatina (0.01 mg/ml) para ayudar a estabilizar la *Taq* polimerasa, 50 mM KCl (el cual aumenta la actividad de la *Taq* polimerasa). Aunque estas cantidades son óptimas para la mayoría de las combinaciones "primer" - ADN blanco, pequeñas modificaciones pueden incrementar significativamente la cantidad y/o especificidad de los productos obtenidos del PCR con diferentes "primers". Datos útiles pueden ser obtenidos por simple valoración del pH , Mg⁺⁺, dNTP, el efecto de reducir las concentraciones de DNTF, y la concentración de los "primers". Ya que el Mg⁺⁺ esta por encima de la relación equimolar por DNTF, el efecto de reducir la concentración de DNTF incremento efectivamente las concentraciones de Mg⁺⁺. En algunas ocasiones es ventajoso incluir componentes adicionales en el PCR, especialmente cuando son utilizados múltiples juegos de "primers". Estos componentes, incluyen bajas concentraciones de sulfato de amonio mercaptoetanol, dimetil sulfoxido, que parecen proveer una respuesta más uniforme por diferentes "primers" cuando son utilizados en una sola reacción. Una delgada capa de aceite mineral o parafina se coloca para prevenir la evaporación. El volumen total de la reacción se debe de mantener bajo, de cualquier modo, para facilitar el cambio de temperatura. Todos los reactivos requeridos para el PCR, con excepción del aceite mineral y el ADN blanco, pueden ser premezclados y almacenados a -20°C por cuando menos 2 semanas. La congelación y deshielo, de cualquier modo, resultara en una pérdida de la actividad de la enzima y la hidrólisis de los dNTP.^{3,4,5,8,8,12,15,17}



ADN BLANCO

La purificación extensa del ADN no es requerida para que este actúe como blanco en el PCR. La capacidad de utilizar rebanadas sencillas de tejido embebido en parafina, fijado en formalina en el PCR es muy significativo para los patólogos. Los tejidos fijados en paraformaldehído y glutaraldehído también han sido utilizados. Una rebanada de 6 - 10 micrones de tejido, que contiene aproximadamente 1 cm cuadrado de tejido, es colocado directamente en un tubo de Eppendorf de 1.5 ml. El tejido es desparafinado con un lavado en xileno. Esto seguido por dos lavados con, etanol puro. El espécimen es disecado por 1 - 2 horas. La pequeña píldora blanca es resuspendida en 50 μ M de amortiguador y colocado en agua hirviendo por 10 minutos. Un mayor volumen de amortiguador es utilizado si la sección original excede 1 cm cuadrado. También para nódulos linfáticos, hígado y otros tejidos celulares, un aumento en la sensibilidad puede ser obtenida añadiendo 50- 100 μ g (en 5-10 μ l) de *Proteinasa K* e incubar por 1 - 4 horas a 60°C. Este paso se realiza para inactivar las proteasas del tejido y para liberar el ADN del tejido. La *proteínasa K* es inactivada colocando los tubos en agua hirviendo por 10 minutos. Todos los tubos son centrifugados y de 5 - 25 μ l de la muestra es añadida a la mezcla del PCR. Uno debe evitar utilizar demasiada muestra en el PCR, ya que puede inhibir inespecíficamente la enzima *Taq* y conducimos a resultados falsos negativos. Para la mayoría de las aplicaciones se estima que 103 células es satisfactorio.^{15,16,17}

CICLOS TÉRMICOS

Los ciclos térmicos generalmente involucran tres pasos:

Desnaturalización del ADN esta es de 94 - 96°C. La temperatura más elevada es necesaria cuando los híbridos están siendo formados, especialmente cuando estos son ricos en secuencias G:C. Treinta segundos son adecuados para la desnaturalización de la mayoría de las muestras. Periodos mayores o temperaturas que excedan los 96°C puede resultar en una pérdida significativa de la actividad enzimática.

La temperatura de reconocimiento varía según la longitud, contenido de G:C, y fidelidad de los "primers". En cuanto mayor sea la temperatura de reconocimiento, es menor la probabilidad de que ocurran mal incorporaciones. Para muchos "primers", un rango de 50-55°C es satisfactorio.



La extensión es mejor lograda a 72°C. Aunque es recomendado un minuto para el reconocimiento y la extensión de los "primers", usualmente periodos más cortos han probado ser igualmente satisfactorios. El número de ciclos puede variar de 20 a 40, dependiendo de la sensibilidad requerida. Como se vea aumentado el número de ciclos, la producción del producto puede comenzar a caer en un efecto de meseta, mientras que los productos resultantes de la mala incorporación comienzan a aumentar. El beneficio de exceder los 40 ciclos es nulo o mínimo. Para facilitar la extensión completa de los "primers" durante los últimos ciclos de un PCR, los tiempos de extensión pueden ser progresivamente aumentados de 30 a 90 segundos. Un tiempo de extensión de 3 minutos es algunas veces recomendado en el ciclo final para asegurar que todos los productos del PCR sean ADN de doble cadena.^{3,4,5,6,8,12,15,16}

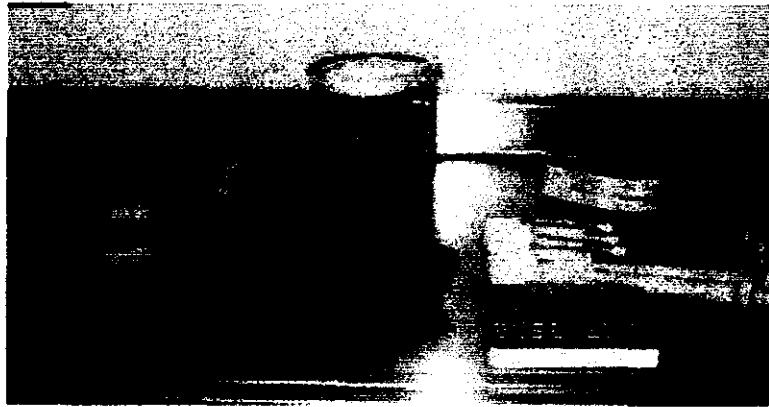


Figura. 3.- Material que se utiliza en PCR



Figura. 4.- Material que se utiliza en PCR



METODO BÁSICO DE PCR

La reacción debe contener:

El ADN blanco

20 pmol de cada "primer"

20 mM Tris-HCl (pH 8.3) (20°C)

1 -5 mM KCl

1 00 µg/ml de gelatina autoclavada o soro albúmina bovina libre de nucleasa

50 µM de cada dNTP

2 unidades de *Taq* ADN polimerasa

10 µl de 10X PCR amortiguador

1. 5 µl de cada "primer" (1 00-µM)

2 µl de dNTP

0.5µl de *Taq* polimerasa (2.5 unidades)

75.5 µl de H₂O

90µl total

Añadir 80 a 1 00 de aceite mineral a cada tubo

Se colocan 90µl de la reacción en cada tubo.

Se añaden 10 µl de la muestra de ADN a cada tubo y se cierra cuidadosamente



Se giran los tubos por 10 segundos en una microcentrifuga para juntar todos los componentes de la reacción bajo la capa de aceite.

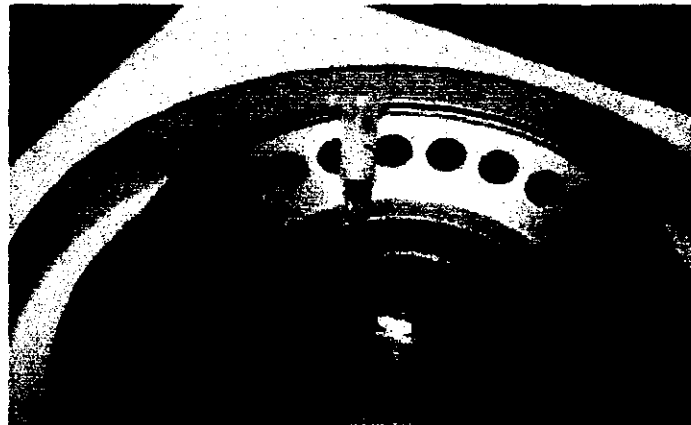


Figura. 5.- Procedimiento de centrifugado de las muestras

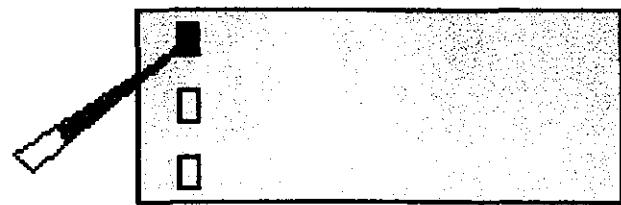
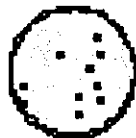
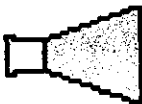
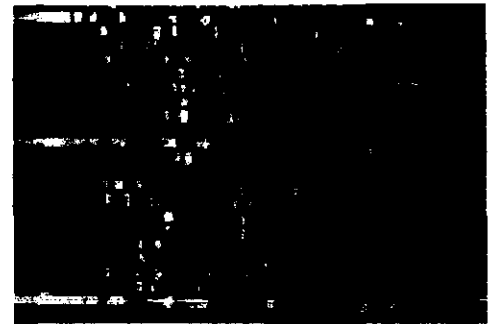
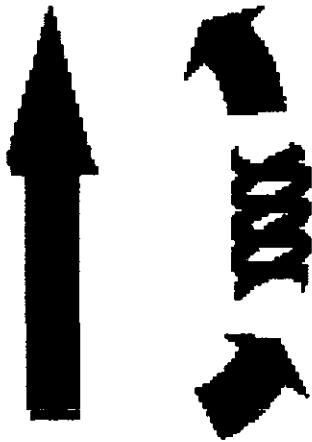
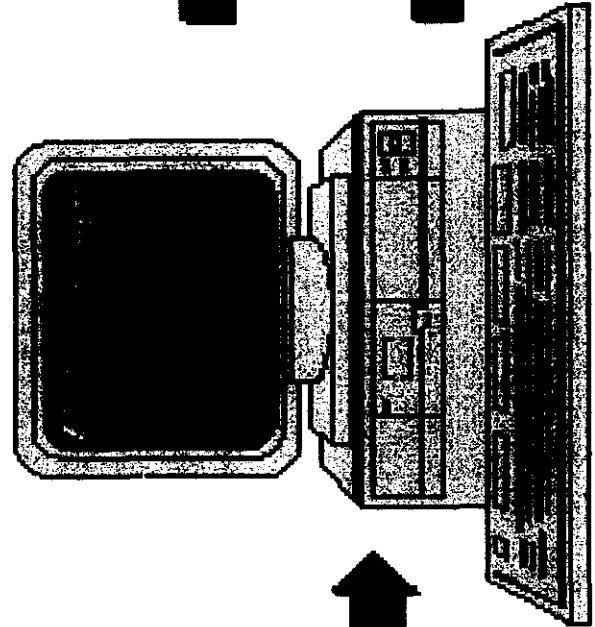
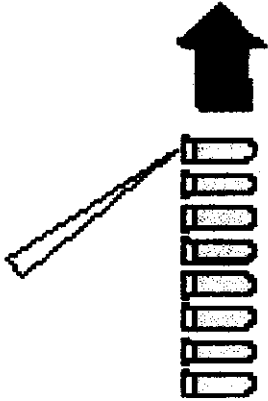
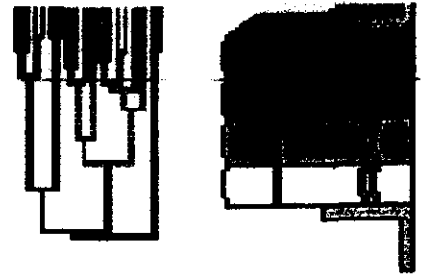
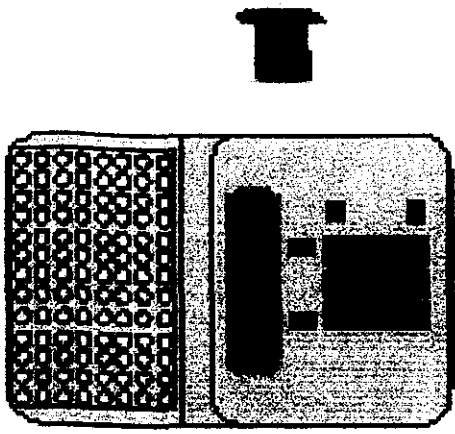


Figura. 6.- Procedimiento de centrifugado de las muestras

Las condiciones de los ciclos térmicos son las siguientes:

Desnaturalización	95°C, 1 minuto
Reconocimiento	55°C, 1 minuto
Extensión	72°C, 2 minutos
Numero de ciclos	40

Los ciclos deben concluir con una extensión final a 72°C de 3 a 5 minutos. Y las reacciones se detienen enfriando a 4°C y/o añadiendo EDTA a 10 mM.²





DESPARAFINIZACIÓN

La amplificación exitosa de PCR para especímenes fijados en formalina, y embebidos en parafina ha sido reportada utilizando procedimientos de extracción de ADN que van desde simplemente hervir las secciones de tejidos, hervir con resina Chelex-100, irradiación por microondas, a procedimientos mas complicados que utilizan la digestión por proteinasa K y extracción por fenol cloroformo. La mayoría de estos procedimientos recomiendan la remoción de la parafina por lavados sucesivos con xileno y etanol. Esto es generalmente seguido por la digestión con la proteinasa K para remover las proteínas las cuales pueden llevar a una degradación del ADN o interferir con la amplificación del PCR, luego la inactivación de esta enzima por el calor. La mayoría de estos procedimientos involucran la utilización de solventes orgánicos, emplean muchas centrifugaciones y transferencia de tubos lo cual incrementa el potencial de contaminación, y la cantidad de ADN puede verse disminuida.¹⁸

Uno de los primeros procesos de desparafinización fue el descrito por Shibata en 1988 en el cual las secciones se desparafinizan añadiendo 400 μ l de xileno, y se centrifuga por 5 minutos. El xileno se decanta y sus residuos son removidos con 400 μ l de etanol al 95%, se centrifuga y una vez mas se decanta. Las películas de tejido se disecan y se añade directamente los 100 μ l de la mezcla para PCR. Los tubos se calientan a 100°C por 10 minutos y luego son sujetos a los ciclos de amplificación.¹⁹

El protocolo básico utilizado por la mayoría de los autores para obtener ADN amplificable para la realización de PCR es el siguiente:

✓ El tejido se prepara en secciones de 5 a 10 μ m; de ser posible se retira el exceso de parafina del bloque antes de cortarlo. El corte se trata con palillos y se coloca en un tubo de 1.5 ml. Para evitar la contaminación el microtomo debe ser limpiado con xileno entre cada bloque.

✓ Cada sección es extraída dos veces con octano para remover la parafina, también pueden ser utilizados xilenos para esta extracción. Esta extracción orgánica es seguida de dos lavados con etanol al 100% para remover el solvente. El etanol es removido secando las muestras al vacío o enjuagando la muestra con acetona.



1. Añadir a cada tubo aproximadamente 1 ml de octano. Cerrar los tubos y mezclar a temperatura ambiente aproximadamente por 30 minutos.
2. Se junta el tejido y cualquier residuo de parafina por centrifugación (de 3 a 5 minutos a máxima velocidad).
3. Se remueve el octano de cada muestra con una pipeta Pasteur.
4. Se repiten los pasos 1,2 y 3.
5. Añadir 0.5 ml de etanol al 100% a cada tubo, y se mezcla.
6. Se repite el paso 2
7. Se remueve el etanol como se hizo con el octano en el paso 3
8. Se repiten los pasos. 5, 6 y 7.
9. Se secan las muestras al vacío hasta que el etanol se evapore completamente o se añaden de 2 a 3 gotas de acetona a cada tubo manteniendo los tubos abiertos y calentándolos cuidadosamente en agua a 37 a 50°C para promover la evaporación de la acetona.

✓Para la digestión de la proteinasa se realizan los siguientes pasos:

1. Se añaden 100 μ l de amortiguador de digestión que contenga 200 μ g Proteinasa K a las muestras extraídas y secas. Las muestras que contengan grandes cantidades de tejido deben ser resuspendidas en 200 μ l de amortiguador de digestión.
2. Se incuba por 3 hrs. A 55°C (alternativamente, 37°C toda la noche)
3. Se giran los tubos brevemente para remover cualquier líquido del tapón
4. Se incuba a 95°C por 8 a 10 minutos para inactivar la proteinasa. Se debe evitar calentar mas de 10 minutos.
5. Para ser usada para PCR, se junta cualquier residuo de parafina o tejido centrifugando por 30 segundos. Y se utiliza la supernata para la amplificación típicamente de 1 a 10 μ l.
6. Guardar las muestras preparadas a -20°C.

La amplificación en tejidos embebidos en parafina es menos eficiente que la realizada en material fresco por lo que debemos modificar parámetros del ciclo térmico incrementando el número y aumentando el tiempo a la temperatura en cada ciclo. ^{16,18}



Procedimiento de desparafinización

Otro método es utilizando microsecciones de tejidos almacenadas en tubos a 4°C por 4 - 7 semanas. Posteriormente se añade un mililitro (ml) de xileno, y las muestras se mezclan por 5 minutos a temperatura ambiente. Esto se centrifuga a 14000 rpm por 5 minutos, y la supernata es removida. Se repite este paso. Después, 1 ml de etanol al 100% a temperatura ambiente es añadido y las muestras se mezclan por 2 - 3 minutos, y son centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos. El etanol residual es removido pipeteando y se realiza otra centrifugación en un contenedor al vacío por 10 minutos. ¹⁸

Digestión por proteinasa K

Se añaden a cada tubo doscientos µl de amortiguador (proteinasa K) realizando movimiento para resuspender las partículas de tejido, que se vuelven algo viscosas. Se coloca proteinasa K hasta conseguir una concentración final de 400 µl/ml. Incubando a 50°C por 4-6 horas, y calentando a 94°C por 10 minutos para inactivar la proteinasa K. ¹⁸

Precipitación de las proteínas

Colocamos cincuenta µl de una solución de NaCl saturada (aproximadamente 6M) en cada tubo, y mezclamos por 5 minutos. Centrifugamos las muestras a 4000 rpm a temperatura ambiente por 15 minutos, y removemos las supernatas a un tubo nuevo. Observando en el fondo del tubo una película blanca de proteínas posterior a la centrifugación. ¹⁸

Precipitación del ADN

Añadimos una décima de volumen de 3M de acetato de sodio en las supernatas, seguida de 2.5 volúmenes de etanol al 100%; adicionamos 5 µl de glicogeno (2 mg/ml) para mejorar la recuperación del ADN. Colocamos las muestras a -20°C durante toda la noche, y posteriormente las centrifugamos a 4°C por 30 minutos a 14000 rpm. Removemos la supernata y las películas se lavan con 1 ml de etanol al 70%, y se centrifugan a 4°C y 14000 rpm por 15 minutos. Removemos una vez más la supernata, y las películas al vacío. Al término las muestras se resuspenden en 50 µl de agua estéril. ¹⁸



ERRORES POSIBLES EN LA REALIZACION DEL PCR

Por su gran sensibilidad, la posible contaminación con ADN es de extrema importancia. Cuidados escrupulosos son necesarios para evitar contacto entre los productos de un PCR y algunas soluciones utilizadas en este. Pruebas de control de calidad de los reactivos en las que se deben incluir pruebas por una posible inclusión de ADN humano y productos de ensayos de PCR anteriores. Para realizar el PCR es permisible utilizar cuartos separados para procesar los especímenes iniciales, montar los ensayos, correr las amplificaciones y analizar los productos del PCR. Cada cuarto debe de tener su propio equipo incluyendo, refrigeradores, centrifugas y pipeta. Cuando se procesan bloques de parafina, es importante limpiar el microtomo entre cada bloque. Controles negativos de todas las muestras con excepción de la muestra del paciente deben ser corridas en cada ensayo. Un control positivo consistente de una cantidad conocida de un ADN blanco debe ser incluido para probar los "primers", la enzima *Taq*, y el método de detección. Productos diluidos apropiadamente de un PCR positivo previo pueden ser utilizados como control positivo. Esto tiene como ventaja que si se da alguna contaminación, se puede cambiar a un juego de "primers" que no amplifique el contaminante. Todos los artículos del equipo utilizados en el PCR necesitan ser sujetos a pruebas de calidad. Las temperaturas actualmente alcanzadas por los tubos dentro de bloques deben de ser revisadas por medio de una sonda de tal manera que se asegure que la temperatura es uniforme dentro de los bloques.²

Aún con estas precauciones, dos problemas mayores surgen en el desarrollo de un PCR útil clínicamente. El problema inicial es la falta de sensibilidad, aun con ADN positivo conocido. Esto refleja la inestabilidad de la unión del "primer" y del blanco; las altas temperaturas requeridas para una actividad óptima para la enzima *Taq*. Para evitar el problema, puede ser posible disminuir la temperatura de reconocimiento a 37°C y prolongar la duración de la temperatura que se eleve a 72°C. Esta modificación puede permitir una extensión parcial, con un correspondiente incremento en la fuerza de la unión al blanco. Una extensión del "primer" a temperaturas menores que 72°C también puede ser utilizada. La actividad inhibitora en las muestras puede ser evitada por medio de la predigestión con proteinasa K o simplemente utilizando muestras diluidas. La falta de sensibilidad en el PCR también puede ser debido a una desnaturalización incompleta de las moléculas blanco. Este problema se soluciona incrementando la temperatura de desnaturalización de 94 a 96°C. El pH de la mezcla debe de ser revisado. El pH puede ser afectado por el amortiguador utilizado para disolver los dNTP.²



Condiciones de almacenamiento no adecuadas pueden conducir a la hidrólisis de los dNTP, pérdida de la actividad de la enzima, y precipitación de los "primers". Las concentraciones de MgCl₂ así como el pH deben de ser valorados para obtener una amplificación óptima. Si la sensibilidad aún es un problema, puede realizarse un PCR de dos pasos. En la primera reacción, un juego de "primers" es seleccionado para que amplifique un segmento largo de ADN. Y posteriormente son añadidos "primers" internos para un segmento específico del ADN de interés.

El segundo problema que se puede encontrar al realizar el PCR es el de una extensa incorporación errónea. Esto conduce a la producción de productos no específicos. Un acercamiento para evitar estos problemas es incrementar la temperatura de reconocimiento. La homogeneidad en el tamaño de los "primers" debe ser revisada. Algunas veces es útil reducir las concentraciones del blanco, primers", enzima y dNTP y utilizar menos ciclos y una desnaturalización más corta.

Una vez comprendidos la mayoría de los posibles errores durante la realización del PCR, es necesario comprender que todo PCR no se puede llevar a cabo bajo las mismas condiciones, es cierto que debe de seguirse un protocolo básico pero este debe ser optimizado.^{3,6,8,12,15,17}



OPTIMIZACIÓN DEL PCR

Se debe considerar la posibilidad de variaciones en los elementos del PCR, ya que pueden presentarse ciertos errores. Algunos de ellos son: productos no detectables, campo bajo del producto deseado, presencia de incorporaciones erróneas o mal extensión de los "primers".

Concentración de la enzima

La concentración puede variar con respecto a cada blanco individual o al "primer". Si la concentración es muy elevada, puede haber acumulación de productos no específicos y si es demasiado baja, la cantidad de producto deseado producida es insuficiente. Por lo que se puede manejar como una concentración óptima cantidades entre 1 y 2.5 unidades por 100 μ l por reacción en condiciones adecuadas.^{3,4,5,6,8,12,15,16}

Trifosfato desoxiribonucleotidos

Las soluciones de dNTP deben ser neutralizadas a un pH de 7.0, y las concentraciones deben de ser determinadas. Una solución que contenga 1 mM de cada dNTP es recomendada. La estabilidad de los dNTPs durante la repetición de ciclos del PCR es de aproximadamente un 50% de los dNTP permanecen después de 50 ciclos. Concentraciones entre 20 y 200 μ M de cada uno resulta en un balance óptimo entre el campo, la especificidad y la fidelidad. Los cuatro dNTPs deben de ser utilizados en concentraciones equivalentes para minimizar errores de mala incorporación. La especificidad y la fidelidad del PCR son incrementadas con una reducción en las concentraciones de dNTP a las originalmente recomendadas para el fragmento Klenow. Bajas concentraciones de dNTP minimizan la incorporación errónea de los "primers" en lugares no blanco y reduce las probabilidades de una extensión mal incorporada de nucleótidos. Uno debe de decidirse por la menor concentración apropiada para la longitud y composición de la secuencia blanco ej. ; 20 μ M de cada dNTP en una reacción de 100 μ l es suficiente teóricamente para sintetizar 2.6 μ g de ADN o 10 pmol de una secuencia de 400 bases.^{3,4,5,6,8,12,15,16}



Concentracion de magnesio

El reconocimiento de los "primers", disociación de las bandas del blanco y del producto del PCR, especificidad del producto y actividad y fidelidad de la enzima pueden ser afectados por la concentración de magnesio. La cantidad que debe de contener la mezcla debe ser de 0.5 a 2.5 μM de magnesio sobre la concentración total de dNTP. La presencia de EDTA y otros quelántes en "primers" o ADN blanco puede afectar el magnesio aparentemente óptimo.²

Otros componentes de la reaccion

El amortiguador recomendado para el PCR es de 10 a 50 mM Tris - HCl (con un pH entre 8.3 y 8.8) cuando se mide a 20°C. Esto debido a que el verdadero pH de 20 mM Tris (pH 8.3) a 20°C varia entre 7.8 y 6.8 durante las condiciones típicas de los ciclos térmicos. Hasta 50 mM KCl pueden ser incluidos en la mezcla de reacción para facilitar el reconocimiento de los "primers". NaCl a 50 mM, o KCL por encima de los 50 mM, inhiben la actividad de la *Taq* ADN polimerasa. Gelatina o sero albúmina bovina (100 $\mu\text{g}/\text{mi}$) son incluidas para ayudar a estabilizar la enzima, aunque muchos protocolos trabajan bien sin la adición de proteínas.²

"Primers"

La concentración ideal del "primer" se encuentra entre 0.1 y 0.5 μM , por lo que concentraciones altas pueden provocar incorporaciones erróneas, acumulación de producto no específico e incrementar la probabilidad de generar una unión independiente al blanco llamada "primer" -"dimer", estos substratos compiten con el producto deseado, por la enzima, dNTPs y "primers", resultando con una baja producción.²

Los "primers" son de 18 a 28 nucleótidos de longitud conteniendo un 50 a 60% G + C. Debemos evitar la complementaridad en el extremo 3' de los pares de "primers" ya que promueve la formación de "primer" - "dimer" y reduce la obtención del producto deseado. Así también se debe evitar la presencia de tres o más C's o G's en el extremo 3' del "primer" ya que puede producir mal incorporación en las secuencias.²



Reconocimiento de los "primers"

La temperatura y el tiempo requerido para el reconocimiento de los "primers" depende de la composición de las bases, longitud y concentración de los "primers". Una temperatura de reconocimiento aplicable es de 5°C por debajo de la verdadera temperatura de fusión de los "primers". Ya que la *Taq* polimerasa esta activa sobre un rango de temperaturas, la extensión de los "primers" debe ocurrir a menores temperaturas, incluyendo el paso de reconocimiento. La temperatura de reconocimiento en el rango de los 55 a 72°C generalmente da mejores resultados. En concentraciones normales de los "primers" 0.2 μM , el reconocimiento solo toma algunos segundos. El incremento en la temperatura de reconocimiento eleva la probabilidad de incorporaciones erróneas de los "primers" y reduce la mala incorporación de nucleótidos en el extremo 3' de los "primers". Como consecuencia, temperaturas exactas deben ser utilizadas en el reconocimiento, especialmente durante los primeros ciclos, lo cual ayuda al incremento de la especificidad. Con el fin de obtener una especificidad máxima en el ciclo inicial, la ADN *Taq* polimerasa puede ser añadida después del "primer" paso de desnaturalización. Una temperatura de extensión baja junto con concentraciones elevadas de dNTP favorecen la incorporación errónea de los "primers" y una mala incorporación de nucleótidos.²

Extensión de los "primers"

El tiempo de extensión depende de la longitud y concentración del blanco. La extensión de los "primers" es generalmente realizada a 72°C. El rango estimado de incorporación de nucleótidos a 72°C varia de 35 a 100 nucleótidos por segundo dependiendo del amortiguador, el pH, concentración salina, y la naturaleza del ADN blanco. Un tiempo de extensión de un minuto a 72°C es considerado suficiente para los productos hasta de 2 kb de longitud. De cualquier modo tiempos de extensión mayores pueden ser útiles en los ciclos iniciales si la concentración del sustrato es muy baja y en los últimos ciclos cuando la concentración del producto excede a la concentración de la enzima.²



Tiempo y temperatura de desnaturalización

Una desnaturalización incompleta de ADN blanco y/o los productos del PCR es la causa más común de error en PCR. Las condiciones óptimas de desnaturalización son: 95°C por 30 segundos o 97°C por 15 segundos. Temperaturas elevadas pueden ser apropiadas, especialmente para blancos con alto contenido de G + C. Una desnaturalización incompleta provoca que las bandas de ADN sean renaturalizadas y reduce el campo del producto. Pasos demasiado altos y/o demasiado largos conllevan a una pérdida innecesaria de la actividad enzimática. La vida promedio de la ADN Taq polimerasa es de >2 horas, 40 minutos y 5 minutos a 92.5, 95 y 97.5°C respectivamente.

2

Número de ciclos

El número de ciclos depende de la concentración inicial de ADN blanco. Un error común es la ejecución de demasiados ciclos. Lo que puede incrementar la cantidad de productos no específicos. La realización de pocos ciclos nos da como resultado la obtención de muy poco producto.²

TABLA NÚMERO UNO
GUÍA DE CICLOS CONTRA
BLANCO

NUMERO DE MOLECULAS BLANCO	NUMERO DE CICLOS
3×10^5	25 a 30
1.5×10^4	30 a 35
1×10^3	35 a 40
50	40 a 45



Efecto de meseta

Describe la reducción en la acumulación del rango exponencial que ocurre durante los últimos ciclos del PCR. Dependiendo de las condiciones y ciclos termales, uno o más de estos puntos pueden influenciar a la meseta:

- 1) utilización de sustratos (dNTP o "primers")
- 2) estabilidad de reactivos (dNTP o de la enzima)
- 3) inhibición del producto
- 4) competición de reactivos por productos no específicos o "primer" – "dimer"
- 5) desnaturalización del producto en concentraciones elevadas del mismo.

Para alcanzar el efecto de meseta una baja concentración de productos no específicos resultado de mal incorporaciones puede continuar amplificándose. La optimización en el número de ciclos es lo mejor para evitar productos no deseados.²



PCR EN PATOLOGÍA BUCAL

Las aplicaciones dentro de la odontología no han sido ampliamente desarrolladas; ya que debe conocerse la secuencia de bases por amplificar o parte de esta.²

La importancia del diagnóstico adecuado es importante para implementar un tratamiento adecuado debido a la facultad de diversos virus para permanecer latentes dentro del organismo.²

En 1992 Ficara y Eversole mencionan la posibilidad de utilizar esta herramienta dentro de la patología bucal, ya que puede ser utilizada en tejidos embebidos en parafina y/o frescos fijados en formalina, refiriendo que sus aplicaciones dentro de la medicina y la patología son infinitas.²

El PCR ha sido utilizado para confirmar la presencia de agentes infecciosos en tejidos humanos tales como el virus de papiloma humano (VPH), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de hepatitis B, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr y virus de herpes simple (VHS).²

Debido a que existen más de 70 tipos del virus de papiloma humano¹⁹, los estudios se han centrado en su detección ya que se presenta en una gran variedad de sitios del organismo (tracto anogenital, uretra, piel, laringe, mucosa traqueobraquial, cavidad nasal/senos paranasales, cavidad bucal, esófago y conjuntiva). Por lo que se ha descubierto su presencia en: papiloma de células escamosas/condiloma, verruga vulgar, hiperplasia epitelial focal, hiperplasia papilar, hiperplasia fibrosa, liquen plano y leucoplasia.²

TABLA NUMERO DOS
VPH

TIPO	LESION
11, 16, 18	PRECANCEROSAS, CARCINOMA DE CELULAS ESCAMOSAS
13, 32	HIPERPLASIA EPITELIAL FOCAL
11, 6	PAPILOMA ESCAMOSO
6, 2	CONDILOMA ACUMINADO, VERRUGA VULGAR
2	CARCINOMA VERRUCOSO

Virus de epstein – barr (VEB)

Es un virus que fue aislado por primera vez del linfoma de Burkitt^{30,31} y ha sido asociado con el granuloma letal de la línea media³⁰, carcinoma nasofaríngeo^{30,31} y es causa de la mononucleosis infecciosa^{30,32}, se sugiere su presencia en la leucoplasia pilosa^{30,31}, síndrome de Sjögren³⁰, enfermedad de Hodgkin³⁰ y carcinoma de timo³⁰. Después del periodo de infección primaria permanece latente dentro de las células epiteliales de las glándulas salivales normales o de los estratos superficiales del epitelio lingual.²

Virus de hepatitis B

La utilización del PCR ha aumentado considerablemente el descubrimiento del virus de la hepatitis B. Varios laboratorios han informado el descubrimiento de tres genomas de VHB (o aproximadamente 300 partículas del virus por el mililitro de suero) qué representa un aumento en sensibilidad encima de los procedimientos normales. En otros estudios, se ha descubierto VHB ADN en el suero de 7 de 382 (1.8%) HBsAg donadores saludables China. Además, se ha usado para identificar y caracterizar VHB ADN en pacientes negativos para otros marcadores serológicos de VHB.³⁴

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Citomegalovirus

EL citomegalovirus (CMV) es un patógeno importante en pacientes inmunocomprometidos y recién nacidos. La infección viral congénita puede llevar al retraso mental, sordera y deficiencia sensorial no hereditaria. La administración de quimioterapia para infecciones por CMV en etapas tempranas es una ayuda particularmente importante. Las investigaciones han demostrado la utilidad clínica del PCR para descubrir CMV en muestras de orina de infantes infectados y en pacientes del SIDA con mayor sensibilidad que otros estudios.³⁴

Virus de papiloma humano

El virus papiloma humano genital (HPVg) es un grupo de diversos tipos del virus asociado con varias enfermedades y cáncer. Se han descrito diversas entidades de VPH genital distintos en manifestaciones clínicas diferentes. Por ejemplo, el tipo 16 y 18 se encuentran en displasia cervical y carcinoma; tipo 6 y 11 son asociados con condilomas benignos. La detección y clasificación del virus en tejido normal y enfermo juegan un papel importante en la detección y desarrollo de la infección por VPH. Los ensayos del PCR sugieren que este procedimiento es muy valioso en el diagnóstico de infección por este virus debido a la sensibilidad y especificidad demostrada.³⁴



CONCLUSIONES

En la actualidad el ser humano cuenta con herramientas experimentales muy poderosas que han permitido generar un cúmulo de conocimientos durante las últimas décadas. El PCR ha catalizado de manera importante el estudio y la facilidad para manipular el material genético; así, hoy en día tenemos acceso al análisis de fragmentos genéticos, lo que hace algunos años resultaba sumamente complicado debido, principalmente, a dificultades de índole experimental. Además, el PCR ha abierto las puertas para llevar el estudio básico del ADN a los aspectos aplicados que redundan en mejorar la calidad de vida del género humano, así como contribuir al entendimiento cabal del mundo orgánico que nos rodea. Seguramente será dentro de unos cuantos años cuando conoceremos el impacto que habrá tenido esta técnica en la generación de conocimientos, lo cual le dará su lugar real en el panorama de la ciencia.

Sin embargo, aún cuando lo expuesto resulta estimulante, no es la intención mostrar esta técnica como una panacea, ya que como la mayor parte de los procedimientos de laboratorio, el PCR presenta una serie de inconvenientes. Uno de los problemas principales de esta técnica resulta de la característica que la hace una herramienta poderosa que permite la obtención de fragmentos específicos del ADN, es decir, la capacidad de amplificar a partir de cantidades extraordinariamente pequeñas de una muestra, por lo que la contaminación con otro ADN exógeno es un riesgo constante que puede llevar a la generación de falsos positivos. En este sentido, se han desarrollado diversos procedimientos que permiten evitar la contaminación, tanto del material como de los reactivos, que van desde la separación del espacio físico en donde se preparan las diferentes muestras y se llevan a cabo las amplificaciones, o el uso de material desechable, hasta el desarrollo de procedimientos químicos que permiten destruir el ADN contaminante. Entre estos últimos destaca el uso del nucleótido dUTP durante la amplificación, en substitución del dTTP, de tal manera que los fragmentos que resulten de dicha amplificación contendrán dUTP; así, el adicionar la enzima uracilo *N*-glucosilasa, UNG, que degrada al dUTP, a la mezcla de amplificación previamente al desarrollo del PCR, permitirá destruir cualquier fragmento contaminante que provenga de la amplificación anterior en donde se incorporó el dUTP. Posteriormente, la enzima UNG se inactiva al incubar la solución en altas temperaturas, lo que permite iniciar con el proceso de amplificación después de añadir nuevamente el dUTP.



Sin embargo, y además del uso de estos procedimientos para evitar la contaminación, siempre es necesario incluir la amplificación de un control negativo, que generalmente carece del ADN molde, el que mostrará la existencia de amplificaciones inespecíficas en el caso de que haya contaminación.

Con toda seguridad el PCR evolucionará aún más dentro de los próximos años, y los problemas que se presenten se resolverán tarde o temprano; así, seremos testigo del cúmulo de información que se generará como resultado de la aplicación de este procedimiento, además de la información con la que contamos hoy en día. Pero lo que resulta aún más excitante es pensar en la nueva generación de técnicas, y sus posibilidades, que seguramente tendremos en el futuro, y de la cual el PCR pudiera ser tan sólo el inicio.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Arredondo-Peter, Raúl. *La reacción en cadena de la polimerasa, PCR: un impacto reciente en la biología molecular*. Boletín de Educación Bioquímica Vol. 12 No.1 Marzo 1993
2. Pérez-Gasque Builla Rafael. *Reacción en cadena de la polimerasa y su uso en patología bucal*. Tesis de licenciatura. UNAM, FO, 1999.
3. Smyth Templetom Nancy. *The polymerase chain reaction history, methods and applications*. Diagn. Mol. Pathol (1); 58-72, 1992.
4. Eisenstein Barry I. *The polymerase chain reaction a new method of using molecular genetics for medical diagnosis*. The New England of Med. Vol 322 No.3; 178-183, Jan 18,1990
5. Bloch Will. *A biochemical perspective of the polymerase chain reaction*. Biochemistry, Vol 30, No.II; 2735-2747, March 19 1990
6. Erlich Henry A. *Polymerase chain reaction*. Journal of Clinical Immunology, Vol 9, No.6; 437-447, 1989
7. Erlich A. Henry, Gelfand David, Sninsky J. John. *Recent advances in the polymerase chain reaction*. Science, Vol 252; 1643-1651, Jun 1991
8. Eversole Ficara G., L.R.Minerva. *Polymerase chain reaction: relevance for bucal pathology*. Stomatol 41: 425-429; 1992
9. Innis A. Michel, Gelfand H. David. *Pcr protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press E.U. 3-20, 153-158; 1990
10. Rodu B. *New aproaches to the diagnosis of bucal soft-tissue disease of viral origin*. Adv Dent Res 7(2); 207-212; Aug 1993
11. Carman WF. *The polymerase chain reaction*. Quarterly Journal of Medicine New Series, 78 No. 287; 195-203, March 1991
12. Innis A. Michaci, Geifand H. David, Sninsky J. John. *Pcr strategies*. Academic Press E.U. pp. 32-37; 1995
13. Lehninger, Albert L. *Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y función celular*. Barcelona Ed. Omega, 1978
14. García Mariana. *Hibridización de los ácidos nucleicos: fundamentos y aplicaciones*. Bol of Sanit Panam 109 (3); 244-257; 1990
15. *Molecular diagnosis in pathology*. Chapter 2 Polymerase Chain Reaction: A tool for the modern pathologist pp.21-46
16. *Pcr protocols current methods and applications*. Human press Totowa New Jersey. Pp. 1-40, 81-87



17. Sanbrook J., Fristch, E.F., Maniatis T. *Molecular cloning a laboratory manual*. Chapter 14 In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction, 14.1-14.35; 2nd. Edition Cold Springs Harbor laboratory press 1989
18. Howe JR. D.S: Klimstra and C.Cordon-Cardo. *DNA extraction from paraffin-embedded tissues using a salting-out procedure: a reliable method for pcr amplification of archival material*. *Histol Histopathol* 12; 595-601; 1997
19. Shibata Darryl K., Arnheim Norman. *Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction*. *Jhon Martin Vol* 167; 225-230, January 1988
20. Mao Er-Ji. *Prevalence of human papillomavirus 16 and nucleolar organizer region counts in oral exfoliated cell from normal and malignant epithelia*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 80:320-329
21. Chang F, Syrjäen S, Kellokoski J, Syrjäen K. *Human papillomavirus (hvp) infections and their with oral disease*. *J Oral Pathol Med* 1991; 20:305-317
22. Lawton GM, Thomas SJ, Schonrock J, Monsour FN, Frazer IH. *Human papillomaviruses in normal oral mucosa: a comparision of methods for sample collection*. *J Oral Pathol Med* 1992; 21:265-269
23. Shroyer Kenneth R, Greer Robert O. *Detection of human papillomavirus dna by in situ dna hibridization and polymerasa chain reaction in premalignant and malignant oral lesions*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 71: 708-713
24. Kellokoski JK, Syrjäen SM, Chang F, Yliskoski M, Syrjäen KJ. *Southern blot hybridization and pcr in detection of oral human papillomavirus (hvp) infections in women with genital hvp infections*. *Journal Pathol Med* 1992; 21: 459-464
25. Jalal H, Sanders CM, Prime SS, Scully C. *Detection of human papilloma virus type 16 dna in oral squames from normal young adults*. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 465-470
26. Ostwald C, Müller P, Barten M, Rutsatz K, Sonnenburg M. *Human papillomavirus dna in oral squamos cell carcinomas and normal mucosa*. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 220-225
27. Miller Craig S., Zeuss María S., White Dean K. *Detection of hvp dna in oral carcinoma using polymerase chain reaction together with in situ hibridization*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 77: 480-486
28. Palefsky JM, Silverman Jr. S, Abdel-Salaam M, Daniels T.E, Greenspan JS: *Association between proliferative verrucous leukoplakia and infection with human papillomavirus type 16*. *J Oral Pathol Med* 1995; 24: 193-197



29. Ward Kathleen A., Napier Seamus S., Winter Paul C. Maw Raymond D., Dinsmore Wallace W. *Detection of human papilloma virus dna sequences in oral squamous cell papillomas by the polymerase chain reaction.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1995; 24: 329-334
30. Padayachee A, Sanders CM, Maitland NJ. *A polymerase chain reaction (pcr) investigation of oral verrucae which contain hov types 2 and 57 by in situ hibridization.* J Oral Pathol Med 1995; 24: 329-334
31. Marbuk MJEMF, Flint SR, Toner M, Balluz I, Coleman D, Sullivan D, Atkins GJ. *In situ hibridization and the polymerase chain reaction (pcr) in the analysis of biopsies and exfoliative cytology specimens for definitive diagnosis of oral hairy leukoplakia (ohl).* J Oral Pathol Med 1994; 23: 302-308
32. Mao E-J, Smith CJ. *Detection of epstein-barr virus (ebv) dna by the polymerase chain reaction (pcr) in oral smears from healthy individuals and patients with squamous cell carcinoma.* J Oral Pathol Med 1993; 22: 12-1738.
33. Saito I, Nishimura S, Kudo I, Fox R.I., Moro I. *Detection of epstein-barr virus and human herpes virus type 6 in saliva from patients with lymphoproliferative diseases by the polymerase chain reaction.* Archs oral Biol Vol. 36, No. 11, pp. 779-784, 1991
34. Erlich Henry A. *Pcr technology. principles and applications for dna amplification.* Oxford University Press 1992: pp 235-244