

111
2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

**REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA Y SU USO EN PATOLOGÍA
BUCAL**

PATOLOGÍA BUCAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA
P R E S E N T A:
RAFAEL PÉREZ-GASQUE BUILLA



DIRECTOR: C.D. JOSE LUIS TAPIA VAZQUEZ
ASESORA: C.D.M.O. BEATRIZ ALDAPE BARRIOS

U. B.
[Firma]

MÉXICO D F.

1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 mis padres, hermana, a mi hija y a toda la familia por todo el amor y el apoyo. A los maestros que me brindaron la oportunidad y me dieron su confianza C.D.M.O Beatriz Aldape y C.D. José Luis Tapia. Muy especialmente a todos los incondicionales (amigos ustedes saben quienes son).
Y a la UNAM por haberme permitido ser parte de ella.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	<i>i</i>
RESÚMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	5
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVO ESPECÍFICO	9
I. GENERALIDADES DEL ADN	10
1.0 ESTRUCTURA DE LOS NUCLEÓTIDOS	11
1.1 ARN	17
1.2 ENLACES Y DISPOSICIÓN	21
1.3 ENZIMAS DE SÍNTESIS (POLIMERASAS)	28
II. PCR	33
2.0 ADN POLIMERASA	36
2.1 "PRIMERS" O CEBADORES	36
2.2 AMORTIGUADOR	39
2.3 ADN BLANCO	40
2.4 CICLOS TÉRMICOS	41
2.5 DESPARAFINIZACIÓN	45
2.6 OTRA ALTERNATIVA DE DESPARAFINIZACIÓN	47
2.7 POSIBLES ERRORES EN LA REALIZACIÓN DEL PCR	48
2.8 OPTIMIZACIÓN DEL PCR	50
2.8.1 CONCENTRACION DE LA ENZIMA	51
2.8.2 TRIFOSFATO DESOXIRRIBONUCLEOTIDOS	51
2.8.3 CONCENTRACION DE MAGNESIO	52
2.8.4 OTROS COMPONENTES DE LA REACCION	52
2.8.5 RECONOCIMIENTO DE LOS "PRIMERS"	52
2.8.6 EXTENSION DE LOS "PRIMERS"	53
2.8.7 TIEMPO Y TEMPERATURA DE DESNATURALIZACION	53
2.8.8 NÚMERO DE CICLOS	54
2.8.9 "PRIMERS"	54
2.8.10 EFECTO DE MESETA	55

III. PCR PATOLOGIA BUCAL -----	56
3.0 VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH) -----	58
3.1 VIRUS DE EPSTEIN-BARR (VEB) -----	75
3.2 OTROS -----	81
IV. DISCUSIÓN -----	83
V. CONCLUSIONES -----	86
VI. BIBLIOGRAFÍA -----	87

RESÚMEN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un procedimiento químico *in vitro* para la amplificación de ADN. Este procedimiento es la repetición sucesiva de 3 pasos que conforman un ciclo: Desnaturalización, reconocimiento y síntesis.

Al termino de los tres pasos de cada ciclo se obtiene de la cadena de ADN blanco dos cadenas idénticas de las secuencias que se encuentran entre los sitios de reconocimiento de los “primers”, por lo que al repetir el procedimiento por 35 ciclos la amplificación de la cadena de ADN blanco es exponencial.

Una de las grandes ventajas de dicha técnica es su elevada sensibilidad lo cual nos permite detectar una copia del ADN blanco en una muestra homogénea, dándonos la posibilidad de utilizar material fijado en formalina y/o embebido en parafina, así como la utilización de material fresco, mientras la muestra de ADN a amplificar no se encuentre rota. Lo que nos abre una puerta a la realización de estudios posteriores dentro de la patología bucal; debido a la gran cantidad de enfermedades virales que se encuentran en la cavidad bucal, de las cuales muchas permanecen latentes y se pueden relacionar con otras entidades patológicas.

En las investigaciones realizadas hasta la fecha por diferentes investigadores los resultados no han sido consistentes, debido a que dicha sensibilidad puede dar pie a errores por contaminación como también podría suceder por el método de recolección y tratamiento de la muestra. Por lo que para realizar una investigación de este tipo es necesario se establezcan ciertas normas con el fin de obtener mejores resultados.

INTRODUCCIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la síntesis enzimática para amplificar las secuencias de ADN específicas, este proceso simula la replicación natural del ADN; pero más que una proliferación biológica este es un proceso químico “*in vitro*”. Esta amplificación por medio del PCR puede producir aproximadamente 100 billones de copias de una molécula de ADN en unas cuantas horas, normalmente las reacciones de PCR comienzan utilizando picogramos del ADN (target) blanco que pasa a través de 30 - 40 ciclos de amplificación.^{1, 2}

El PCR es un proceso que comienza con una molécula de ADN blanco para ser amplificada al cual se unirán los dos “primers” (secuencia o fragmento de oligonucleotidos sintetizados artificialmente, complementarios a cada una de las bandas del ADN blanco); y se extenderán. Después de un ciclo dos moléculas idénticas del ADN blanco serán producidas. De ahí, que el número de moléculas de ADN se incrementan geométricamente después de cada ciclo. Muchas metas han sido logradas con el PCR, una sola molécula de ADN puede ser amplificada a un campo de 10^7 - 10^{11} . Aproximadamente 2-3 μ g de ADN pueden ser producidos por una mezcla de reacción de 100 μ l de PCR. Blancos de hasta 10 kilobases (kb) han sido amplificados, e investigaciones y protocolos han sido diseñados para amplificar ADN con mayor longitud, aunque los investigadores han sugerido que el ADN blanco debe ser de cerca de 4 kb o menor para tener una amplificación óptima, es difícil amplificar un ADN mayor a 4 kb de longitud. El PCR también puede detectar una copia de ADN en 10 genomas. Más específicamente, si un gen está representado una vez en el genoma, la detección puede ser lograda por el PCR. Debido a su gran sensibilidad este método puede ser una herramienta de diagnóstico muy útil para detectar pequeñas cantidades de ADN lo que le da múltiples aplicaciones en medicina y odontología.^{1, 2, 3, 6, 7, 8, 9}

El PCR consiste en varios ciclos en los cuales tres pasos son repetidos en el mismo orden para cada ciclo y, estos pasos son desnaturalización, reconocimiento de los “primers” y extensión de los “primers”. El primer paso es calentar una doble hélice de ADN a 94°C con el fin de desnaturalizar el ADN en dos bandas sencillas, el ADN permanecerá separado hasta que la temperatura sea disminuida para el siguiente paso de reconocimiento de los “primers”. El ADN blanco en bandas sencillas puede ser reconocido por los “primers” del ADN en banda sencilla.

Dos “primers”, generalmente de 15 a 30 bases de longitud, son hechos para que sean complementarios a cada banda del ADN blanco. Usualmente esto requiere que la secuencia de los extremos del ADN blanco sean conocidas, estos “primers” típicamente no deben ser complementarios entre si. Los “primers” se unen a las bandas opuestas del ADN en el extremo 3' del ADN complementario en la orientación 5' → 3'. Por lo tanto la extensión por la polimerasa de ADN se produce en la dirección 5' → 3', y la banda de ADN es sintetizada por la adición de los trifosfatos. Los “primers” son añadidos a la reacción del PCR en exceso con el fin de favorecer la unión de estos al ADN blanco y no la reasociación de las bandas del ADN complementarias.

La temperatura utilizada para el reconocimiento fluctúa entre 37 - 55°C. La temperatura más baja de reconocimiento es utilizada para amplificaciones en las cuales no es necesaria mucha especificidad o severidad, y una mayor temperatura es utilizada cuando se requiere especificidad o severidad. Una valoración y juicio deben de llevarse a cabo para encontrar la temperatura mas apropiada en un experimento dado para tener el menor rango de error.^{1, 2, 3, 6, 7, 8, 9}

La principal ventaja del PCR sobre otras técnicas es su excepcional sensibilidad. Una secuencia de ADN en 100,000 células o 130 genomas del virus de

la hepatitis B en 1 ml de suero puede ser detectado. No es rigurosamente 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 ser llevada a cabo. Especímenes preservados en formalina contienen ADN amplificable, como también las secciones de parafina esto ha abierto la oportunidad a material histopatológico para investigaciones posteriores.¹⁰

El uso del PCR para analizar ácidos nucleicos extraídos de tejidos embebidos en parafina ha llegado a ser una técnica bien definida de la cual existen muchas variantes con el fin de obtener un blanco lo más adecuado posible. El establecimiento de esta técnica en secciones de parafina nos permite estudiar pequeñas cantidades o cantidades degradadas de ácidos nucleicos en material de laboratorio; y así analizar especímenes de varios años de antigüedad permitiéndonos de esta manera realizar estudios retrospectivos, inclusive muestras de más de 40 años han sido amplificadas por este método.^{8, 11}

El PCR puede ser utilizado para aislar y analizar fragmentos de ADN, analizar las interacciones entre proteínas y ADN, para conocer secuencias de ADN y ARN, y la manipulación de terapia genética. Por lo que el PCR nos abre nuevas áreas de investigación dentro de la patología bucal, como el sondeo de tejido patógeno para obtener las secuencias específicas de especies bacterianas y virales, mutaciones oncogénicas y enfermedades asociadas a mutaciones, por mencionar algunas. Dentro de las principales y primeras aplicaciones que se le ha dado dentro de la Patología Bucal es la detección del virus del Papiloma Humano, detección de los virus de Herpes Simplex tipo I y II, así como en patologías relacionadas con el virus de Epstein - Barr, debido a la gran susceptibilidad y variantes que pueden darse al PCR estas solo son unas pocas de las muchas aplicaciones que puede tener dentro de la patología bucal.

ANTECEDENTES

La tecnología actual del PCR es el resultado de una serie de descubrimientos en las ciencias básicas, comenzando con el descubrimiento de la primera polimerasa de ADN por Arthur Kornberg en 1955, la polimerasa de ADN; es la enzima responsable de la síntesis del ADN, y fue purificada en 1958. Durante los años 1955 - 1970 los científicos describieron la termodinámica del reconocimiento y extensión de los “primers”; definidos como un par de oligonucleótidos sintéticos que se unen a la región a ser amplificada. La idea de la síntesis de ADN fue descrita en 1971 basándose en los trabajos de Har Gobin Khorana y su grupo de trabajo, el cual estudiaba el gen que codifica el ARN de transferencia de la levadura, en ese entonces, la síntesis “*in vitro*” del ADN era conocida como “reparación de la replicación del ADN”.¹

El primer experimento fue realizado por Kjell Kleppe,¹ un postdoctorado de los laboratorios del Dr. Khorana. Este experimento era una reacción que involucraba dos ciclos de amplificación de un ADN de 30 nucleótidos de largo, utilizando “primers” de nueve y diez nucleótidos de longitud. El periodo de ebullición era de dos minutos a 100°C, y entonces la mezcla era enfriada y se añadían la polimerasa del ADN y los trifosfatos; este procedimiento se repetía otra vez, por lo cual se dieron cuenta de que este procedimiento de amplificación era posible y era necesario un mayor trabajo para perfeccionar el método.^{1, 3}

Entre 1970 y 1972, tres ciclos de amplificación de cuatro secuencias de ADN relativamente cortos fueron alcanzados por Ian J. Molineux en el laboratorio del Dr. Khorana. Ya que en esas fechas el fragmento Klenow no era comercialmente adquirible, estos experimentos fueron llevados a cabo 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 la síntesis era necesario realizar el trabajo con un

pH lejano al óptimo para la enzima, esto hacía las reacciones demasiado lentas, y las incubaciones requeridas generalmente eran de 1 - 2 horas a 15°C, grandes cantidades de la enzima eran necesarias para lograr rangos aceptables de síntesis. En suma, era técnicamente imposible realizar muchos ciclos de amplificación. Los “primers” eran extremadamente caros y laboriosos de producir, y la gran cantidad de estos utilizados rutinariamente en el PCR moderno no podían ser sintetizados.¹

Ya que la polimerasa de ADN no era comercialmente adquirible, esta era purificada, el fragmento Klenow que es el fragmento largo de la polimerasa I de ADN obtenida de la *Escherichia coli*, acababa de ser descubierto; en 1971, y era caracterizado por el mismo Hans Klenow, Por todo lo anterior el Dr. I. Molineux pasaba la mayor parte de su tiempo preparando y caracterizando sustratos y reactivos, mas que realizando PCR o analizando sus productos. El análisis de productos también era muy laborioso, la tecnología del gel de electroforesis de las moléculas de ADN no había sido desarrollada.^{1, 2, 3, 4}

La amplificación a gran escala del ADN no fue seguida por los laboratorios de Khorana por muchas razones. Principalmente, creían que la meta de la síntesis de ADN “*in vitro*” había sido alcanzada y por lo tanto se interesaron en producir nuevos descubrimientos en otras áreas. Además, las polimerasas de ADN estables a altas temperaturas, lo cual transformó al método del PCR, eran desconocidas, y el método de la clonación comenzaba y se convirtió en el método preferido para producir grandes cantidades de ADN. Finalmente ya que era tan difícil sintetizar grandes cantidades de “primers”, nadie penso que una amplificación específica de ADN genómico fuera posible.^{1, 3}

La tecnología del PCR moderno fue inicialmente desarrollada por Kary B. Mullis un científico investigador de la corporación Perkin - Elmer Cetus en Abril de 1983, a quien fue otorgado el premio Nobel en el año de 1993. El no estaba familiarizado con el trabajo de Khorana, Kleppe, y Molineux. En 1985 Kary B.

Mullis describió la técnica del PCR y en ese mismo año apareció la primera publicación utilizando el PCR. En 1989 la polimerasa del ADN fue denominada la molécula del año por su aplicación en el PCR el cual fue proclamado como el mayor desarrollo científico del año.^{1, 5}

Existen muchos tipos de polimerasas de ADN, el primer experimento de PCR realizado en Perkin-Elmer Cetus utilizó el fragmento Klenow para la extensión de los “primers” a 37°C. Esto produjo muchos problemas ya que el fragmento Klenow no era estable a altas temperaturas; por lo tanto, era necesario que se añadiera después de cada paso de desnaturalización de cada ciclo. Esta enzima también es menos específica y produce muchos errores, además de que el fragmento Klenow no puede amplificar ADN’s blanco mayor a un pocos de cientos de bases de longitud.

Un gran avance fue logrado con el descubrimiento de la polimerasa *Taq* de ADN que pudo ser utilizada en el PCR, esta polimerasa es termoestable; y fue descubierta por primera vez en el *Thermus aquaticus*, el cual se encuentra en las aguas hirvientes de los geysers. Esta polimerasa fue aislada y purificada por muchos laboratorios, por lo que el paso de extensión del PCR puede llevarse a cabo a 72°C con la polimerasa *Taq* de ADN, y esta enzima permanece activa a 72°C después de una exposición repetida a 94°C durante el paso de desnaturalización. Esta polimerasa es más específica por lo que produce menos errores en el PCR y puede amplificar blancos hasta de 10 kb.^{1, 2, 3, 6, 7, 8, 9}

Una manera sencilla de valorar la fidelidad de una polimerasa de ADN consiste en monitorear la frecuencia con la cual la enzima incorpora mal los nucleótidos durante el proceso de replicación. Actualmente existen cuando menos nueve polimerasas de ADN termoestables comercialmente adquiribles que han sido aisladas de *Thermus flavis*, *Thermococcus litbucalis*, y *Thermus aquaticus*. El uso de

las polimerasas de ADN termoestables ha permitido la automatización del PCR, lo cual lo hace una técnica muy aceptable.^{1, 3, 6}

Para algunos científicos el rango de error estimado para la polimerasa *Taq* es de menos de uno en 75,000 nucleótidos polimerizados, lo cual no es un problema para la mayoría de las amplificaciones. Mientras hay quien compara la *Taq* polimerasa y la polimerasa de ADN del fragmento Klenow con respecto al rango de mala incorporación. Para el fragmento Klenow, el número estimado es aproximadamente 1 en 10,000; y para la polimerasa *Taq* el rango de incorporaciones erróneas es de aproximadamente de 1 en 5,000. En términos más prácticos, esto significa que después de una amplificación a través de 25 ciclos, para cualquier posición dada en la secuencia del producto amplificado, una molécula en 400 presentara una sustitución del producto original. Usualmente, esta frecuencia de sustitución no es detectable bajo condiciones normales en la secuencia de análisis. De cualquier modo, si la muestra a ser amplificada inicialmente contiene muy pocas moléculas blanco, y si la enzima incorpora erróneamente alguna base en uno de los primeros ciclos del proceso, algunas sustituciones se convierten en detectables durante el análisis de secuencia del producto amplificado. Por la alta temperatura de reconocimiento y extensión con la polimerasa *Taq*, la formación de híbridos perfectos entre los “primers” de extensión se verán favorecidos.^{1, 3, 6}

OBJETIVO GENERAL

El conocimiento de las nuevas técnicas de diagnóstico; así como la gran gama de utilidades que estas nos dan dentro del área de la odontología para un mayor conocimiento y promover una mayor investigación con respecto a los agentes etiológicos guiándonos a un mejor tratamiento y como consecuencia a la prevención.

OBJETIVO ESPECÍFICO

La introducción de el conocimiento de la nueva tecnología de diagnóstico con el fin de establecer su posible aplicación al área de patología bucal.

I. GENERALIDADES DEL ADN

El conocimiento de la base molecular de la genética surgió como consecuencia de los avances teóricos y experimentales realizados en tres distintos campos científicos: la genética clásica, la bioquímica y la estructura molecular. Dentro del campo de la genética, el avance experimental se vio fuertemente acelerado por la utilización de los rayos X y otros agente mutagénicos, y organismos de corto ciclo vital. Pero los avances más significativos se deben a la aparición de la hipótesis de un gen-un enzima, debido al trabajo de G. W. Beadle y E. L. Tatum comenzando en 1941, y al descubrimiento de O. T. Avery y colaboradores en 1944, de que la información genética está contenida en el ADN y es transmitida por él.¹²

La capacidad de las células vivas de preservar su material genético y duplicarlo para su transmisión a la siguiente generación es el resultado de la complementariedad estructural entre las dos mitades de la molécula de ADN. La unidad básica del ADN es un polímero lineal de cuatro subunidades monoméricas diferentes, los desoxirribonucleótidos ordenados en una secuencia lineal precisa. En esta secuencia lineal se encuentra codificada la información genética. Dos de estas cadenas poliméricas se enrollan una sobre la otra para formar la doble hélice de ADN, en la que cada subunidad monomérica de una cadena queda específicamente aparejada con la subunidad complementaria de la cadena opuesta. En la reparación o replicación enzimática del ADN, una de las dos cadenas sirve de molde para la construcción de otra cadena de ADN estructuralmente complementaria, dichas cadenas de ADN se separan y actúan de molde para la síntesis de otra cadena complementaria, con lo que se generan dos moléculas de doble hélice idénticas.^{12, 13}

El descubrimiento de la sustancia ahora llamada ADN fue realizado hace más de un siglo por Friedrich Miescher, médico suizo que se encontraba trabajando en el laboratorio del químico fisiólogo alemán Feliz Hoppe-Seyler en la Universidad de

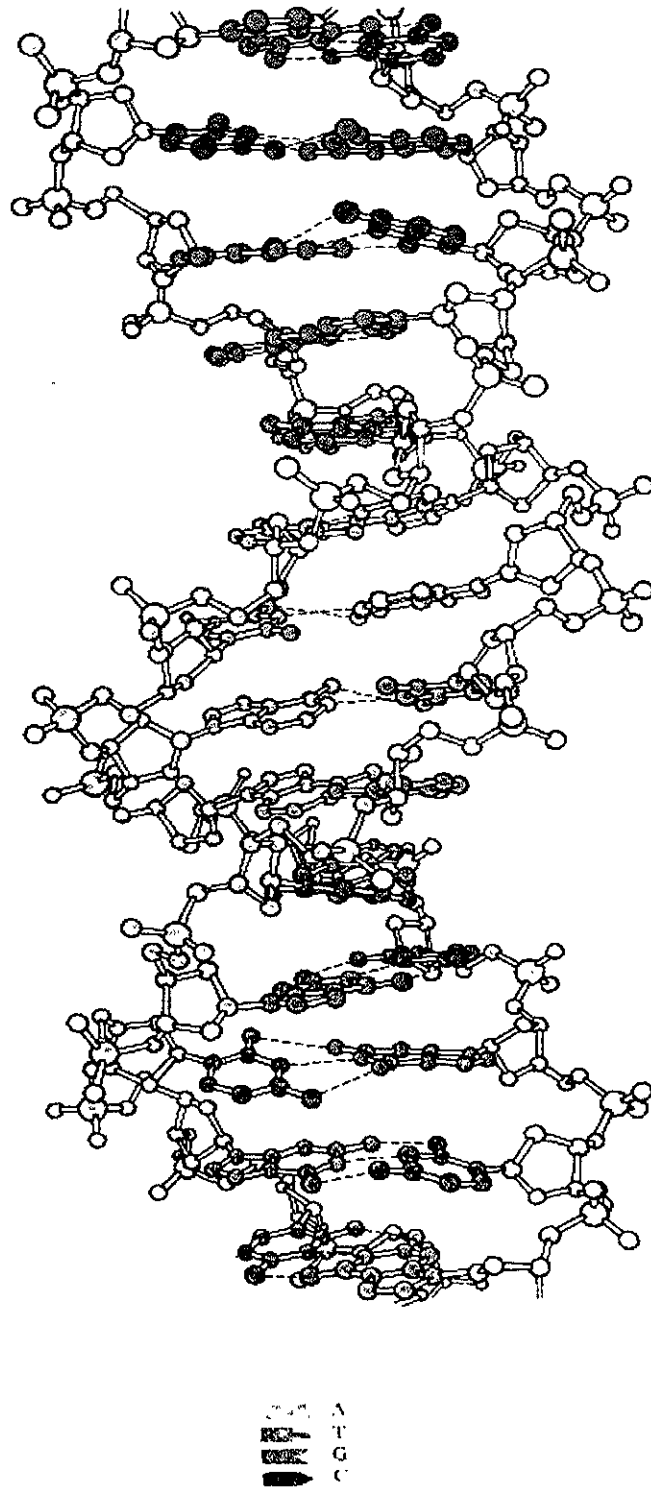


FIGURA 1
*REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE UNA CADENA DE ADN.*¹³

La replicación y la transcripción difieren en un aspecto importante. Durante la replicación se copia el cromosoma entero dando un ADN hijo que es idéntico al ADN parental, mientras que la transcripción es selectiva: en un momento determinado se transcribe sólo un gen determinado o un grupo de genes. Se puede regular por tanto la transcripción del ADN de modo que sólo se transcriba la información genética necesitada por la célula en un momento cualquiera. Secuencias reguladoras específicas indican el principio y el fin de los segmentos de ADN que se han de transcribir, así como qué cadena se ha de utilizar como molde (FIG. 2).^{12, 13, 14, 15, 16, 17}

La transcripción es muy similar a la replicación en términos de mecanismo químico, polaridad y utilización de un molde. Los dos procesos difieren, sin embargo, en que la transcripción no requiere de un cebador, sólo afecta generalmente a cortos segmentos de una molécula de ADN y, dentro de esto segmentos, sólo una de las dos cadenas de ADN actúa como molde.^{12, 13, 14, 15, 16, 17}

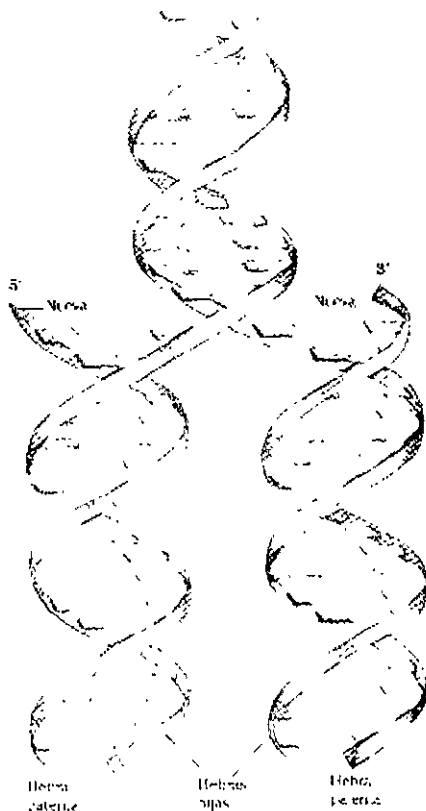


FIGURA 2

La teoría semiconservadora propuesta por Watson y Crick, en la cual la cadena de ADN parental se separa dando origen a dos hebras y cada una de ellas sirve como molde para la biosíntesis de una hebra complementaria hija. Dando como resultado dos cadenas de ADN, cada una con una hebra paterna y una hebra hija.¹²

Se realizaron importantes experimentos cromatográficos, los cuales condujeron al análisis cuantitativo de la composición en aminoácido y a la exposición de la secuencia aminoácida de muchas proteínas, revelando que las proteínas de distintas especies, o distintas funciones, poseen secuencias aminoácidas diferentes. Uno de los descubrimientos más singulares fue el de E. Chargaff, referente a la equivalencia molar de ciertas bases en el ADN, esta equivalencia fue más adelante un elemento importante para la deducción de la estructura tridimensional del ADN.^{12, 15, 16}

El análisis por difracción de rayos X sobre la conformación de las moléculas de las proteínas fibrosas realizado por W. Astbury y por L. Pauling, así como el de las proteínas globulares llevado a cabo por J. C. Kendrew y M. F. Perutz, proporcionaron el conocimiento de que cada tipo de molécula proteica posee una conformación específica de dimensiones precisas que determina sus funciones biológicas. En 1953, J. D. Watson y F. H. Crick postularon la estructura en doble hélice del ADN, la cual no sólo estaba de acuerdo con la equivalencia molar de bases y con los diagramas de rayos X característicos del ADN, sino que también indicaba la existencia de un mecanismo sencillo por medio del cual la información genética podía ser transferida.^{12, 13, 14}

La hipótesis de Watson y Crick pronto fue desarrollada y extendida hasta desembocar en lo que Crick denominó el dogma central de la genética molecular, que establece que la información genética fluye del ADN al ARN y de éste a la proteína. Este dogma definió tres procesos principales de la preservación y transmisión de la información genética. El primero de ellos, es la replicación o copia del ADN para formar moléculas hijas idénticas. El segundo es la transcripción, proceso mediante el cual, el mensaje genético del ADN es transcrito en forma del ARN mensajero para ser llevado a los ribosomas. El tercero es la traducción, proceso por el cual el mensaje genético es “descifrado” en los ribosomas, donde el ARN se utiliza como matriz dirigiendo la secuencia aminoácida específica durante la biosíntesis proteica. Este

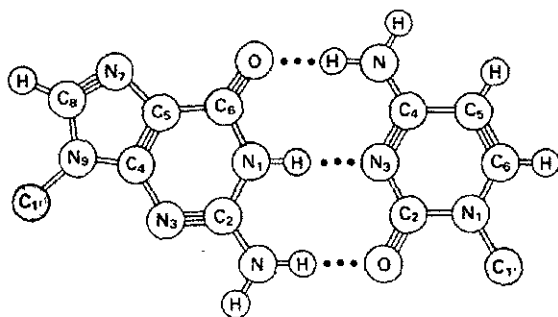
dogma central resultó apoyado no sólo por el descubrimiento del ARN mensajero, sino también por la demostración de que la secuencia de nucleótidos de un gen guarda una correspondencia lineal con la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por dicho gen.^{12, 15, 16}

El trabajo de Erwin Chargaff fue de gran importancia para la elucidación de la estructura del ADN a finales de la década de los 40. Encontraron que las cuatro bases de los nucleótidos del ADN estaban presentes en relaciones distintas en los ADN de organismos diferentes, y que había una estrecha relación entre las cantidades relativas de ciertas bases. Estos datos, recogidos a partir de los ADN de un gran número de especies diferentes, permitieron el enunciado de las siguientes conclusiones por parte de Chargaff:

1. La composición de bases del ADN varía de una especie a otra.
2. Las muestras de ADN aisladas a partir de tejidos diferentes de la misma especie tienen la misma composición de bases.
3. La composición de bases del ADN de una especie dada no varía con la edad del organismo, ni con su estado nutricional, ni con las variaciones ambientales.
4. En todos los ADN, independientemente de la especie, el número de residuos de adenina es igual al de residuos de timina (es decir, $A = T$), y el número de residuos de guanina es igual al número de residuos de citosina ($G = C$). A partir de estas relaciones se deduce que el número de residuos de purina es igual al de residuos de pirimidina: es decir, $A + G = C + T$. Aun cuando posteriormente se descartó que el contenido de AT y CT; fueran los mismos, descubriéndose que estos podían variar hasta una relación de 30 al 70% dentro de las diferentes especies.^{12, 13}

GUANINA

CITOSINA



TIMINA

ADENINA

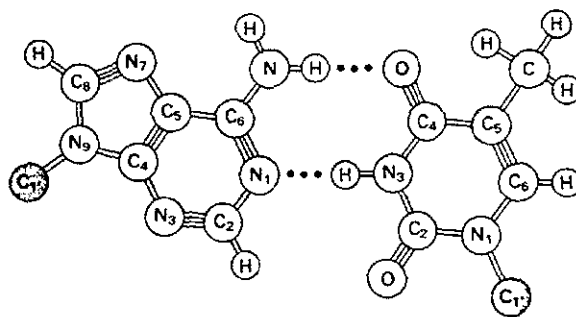


FIGURA 3

Representación de los enlaces de hidrógeno en los pares de bases definidos por el modelo de Watson y Crick.¹⁴

Rosalind Franklin y Maurice Wilkins utilizaron el poderoso método analítico de difracción de rayos X para analizar cristales de ADN. A principio de la década de 1950 su modelo indicaba que la molécula está formada por dos hebras. En 1953, Watson y Crick postularon un modelo tridimensional para la estructura del ADN que estaba de acuerdo con todos los datos disponibles, que consiste en dos cadenas helicoidales de ADN enrolladas alrededor del mismo eje, que forman una doble hélice dextrógira. Los esqueletos hidrofílicos formados por unidades alternas de desoxirribosas y grupos fosfato cargados negativamente se hallan en el exterior de la doble hélice, en contacto con el agua circundante. Los enlaces fosfodiéster de las dos hebras entrelazadas avanzan en dirección opuesta, es decir, las dos cadenas son

antiparalelas. Las bases purínicas y pirimidínicas de ambas cadenas están apiladas en el interior de la doble hélice, con sus estructuras en anillo hidrofóbicas y prácticamente planas situadas a muy corta distancia las unas de las otras y en posición perpendicular con relación al eje longitudinal de la hélice (*FIG. 3*).^{12, 15, 16}

1.1 ARN

Posteriormente fue revelado que existen dos tipos de ácidos nucleicos: ácido desoxirribonucleico o ADN y el ácido ribonucleico ARN. Levene demostró que el ADN se compone de cuatro bases nitrogenadas dos purinas (adenina y guanina) y dos pirimidinas (citosina y timina) un azúcar de cinco carbonos, desoxirribosa, y grupos fosfato, demostró que la base purina o pirimidina está ligada al azúcar (en el caso del ADN el azúcar es 2' desoxi-d-ribosa) por un enlace glucosídico y el azúcar está ligado al fosfato por un enlace éster. La combinación de base – azúcar – fosfato constituye la unidad básica, llamada nucleótido. Es decir que los nucleótidos están formados por tres componentes característicos 1) una base nitrogenada, 2) una pentosa, y 3) un fosfato (*FIG. 4*). Las bases nitrogenadas derivan de los compuestos originales pirimidina y purina. Los átomos de carbono y de nitrógeno de estas estructuras se numeran de modo convencional con el fin de facilitar la denominación la salvedad a esto es que en las pentosas de los nucleótidos a los números correspondientes se les añade un signo de prima (') con el fin de distinguirlos de los átomos numerados de las bases nitrogenadas.

La base está unida covalentemente (en el N-1 en las pirimidinas y en el N-9 en las purinas) a través de un enlace *N*-glucosídico con el carbono 1' de la pentosa, y el fosfato está esterificado con el carbono 5'. El enlace *N*-glucosídico se forma por eliminación de los componentes del agua (un grupo hidroxilo de la pentosa y un hidrógeno de la base). Cuando la molécula no contiene el grupo fosfato es denominada nucleósido (*FIG. 5*).^{12, 13, 14, 15, 17}

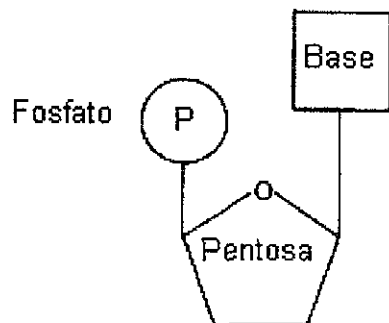


FIGURA 4

Diagrama esquemático de la composición de un nucleótido.¹⁴

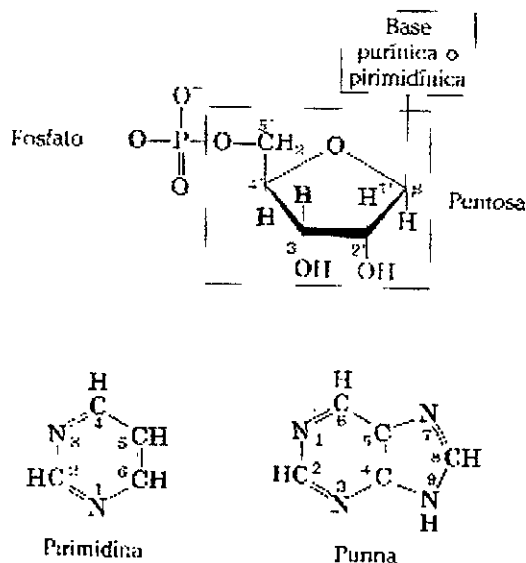


FIGURA 5

Estructura de los nucleótidos en la que se presenta la numeración convencional de la pentosa, se muestra la estructura de un ribonucleótido. En los desoxirribonucleótidos el grupo OH del carbono 2' Es reemplazado por un (H). La numeración principal es dada a las bases purínicas o pirimidínicas, de manera convencional son numerados los carbonos y nitrógenos de dichas estructuras; en tanto que a las pentosas se les añade es signo de(') con el objeto de distinguirlos.¹²

No fue mucho después de que Meischer descubriese aquella sustancia que luego resulto ser el ADN, Felix Hoppe Seyler, un científico del mismo laboratorio descubrió otra sustancia muy similar al ADN. Esta última sustancia, ahora conocida como ARN, fue aislada en primer lugar a partir de la levadura y más tarde de bacterias y plantas. Durante mucho tiempo se pensó que el ARN estaba ausente en los animales; cuando se descubrió su presencia en animales se creyó debida al alimento vegetal. Este punto de vista prevaleció hasta 1914, cuando Robert Feulgen descubrió un colorante que teñía el ADN, pero no el ARN, y otro que solo teñía el ARN; al teñir las células con ambos colorantes descubrió la presencia conjunta de ADN y ARN en todas las células.^{12, 13, 14, 15}

El esqueleto covalente del ARN consiste en un polímero lineal de unidades ribonucleotídicas unidas mediante enlaces fosfodiéster 5'→ 3'. En este aspecto el ADN y el ARN son idénticos pero estos se diferencian estructuralmente en tres puntos importantes.

1. El grupo azúcar del ARN es la ribosa, y no la 2'-desoxirribosa.
2. Tanto el ADN como el ARN contienen dos bases purínicas principales, la adenina (A) y la guanina (G). El ADN y el ARN contienen también dos bases pirimidínicas principales; una de ellas es la citosina (C) en ambos tipos de ácido nucleico. La segunda base pirimidíca es la única diferencia importante entre las bases del ADN y las del ARN: timina (T) en el ADN y uracilo (U) en el ARN.
3. Las moléculas de ARN son generalmente monocatenarias.

1.2 ENLACES Y DISPOSICIÓN

Los nucleótidos sucesivos del ADN y el ARN están unidos covalentemente 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. De tal modo que los ácidos nucleicos consisten en 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 puede 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' \longrightarrow 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.^{12, 13}

Las fuerzas responsables de las conformaciones nativas de las estructuras complejas celulares, como los ácidos nucleicos, son lo suficientemente fuertes como 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 (*FIG .6*).^{12, 15, 16}

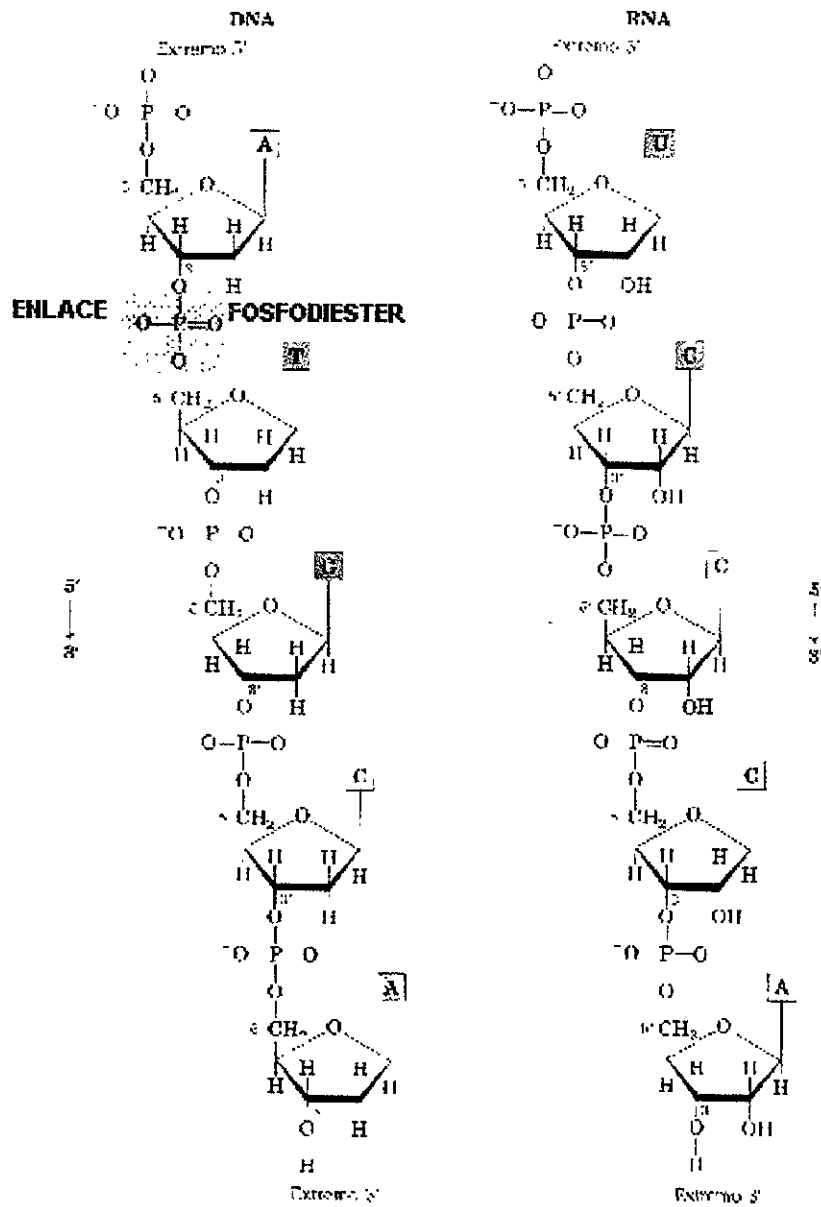


FIGURA 6

Representación esquemática de los enlaces fosfodiéster que dan su disposición a la cadena de ADN.¹²

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.¹²

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. ^{12, 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.^{12, 15, 16}

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. 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 (*FIG. 7*). 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 los primeros 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 .^{12, 13, 14, 15, 17}

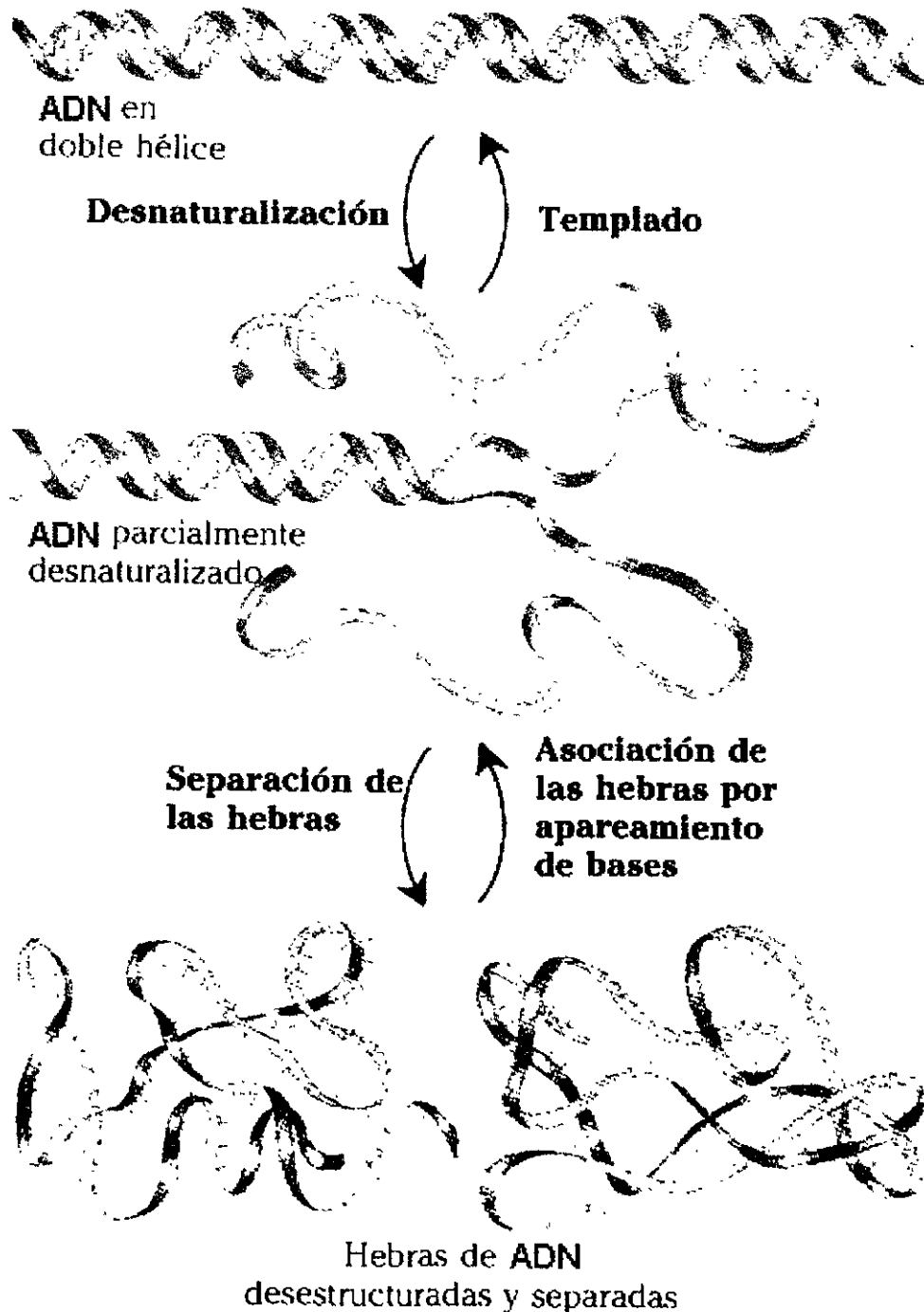


FIGURA 7

*Desnaturalización de una cadena de ADN al elevarse la temperatura y su retorno a su estado natural al disminuir la temperatura a rangos biológicamente aceptados.*¹²

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 retornan 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. El segundo paso es mucho más rápido: las bases no apareadas 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.^{12, 13, 14, 15, 16, 17}

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.^{12, 13, 14, 15}

La hipótesis de la replicación semiconservadora fue propuesta 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.^{12, 13}

Una cadena nueva de ADN siempre se sintetiza en la dirección $5' \longrightarrow 3'$ 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 $5' \longrightarrow 3'$ 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 $5' \longrightarrow 3'$ 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 (*FIG. 8*).^{12, 13}

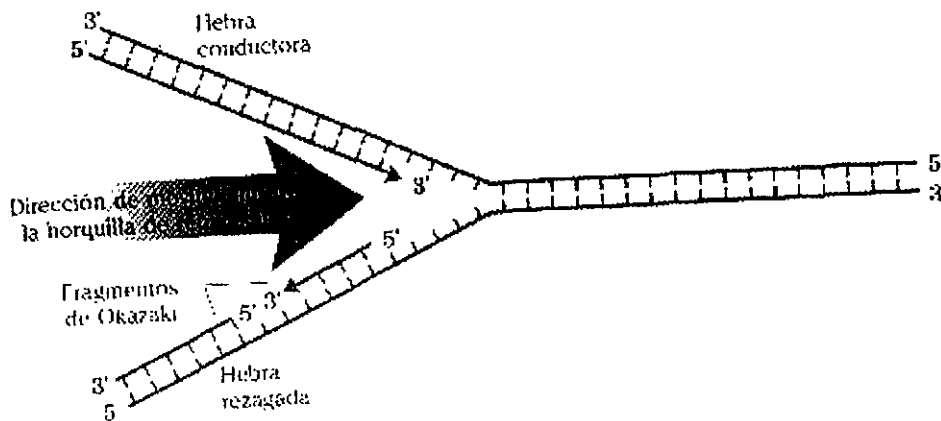


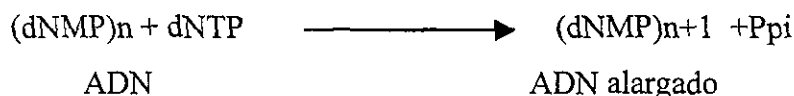
FIGURA 8

La dirección de la replicación de la cadena de ADN siempre se da en sentido $5' \longrightarrow 3'$ ¹²

1.3 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 de la 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.^{1, 2, 12}

Los estudios sobre la ADN polimerasa I revelaron características del proceso de síntesis de ADN que se ha visto eran comunes a todas las ADN polimerasas. La reacción fundamental es un ataque nucleofílico por el grupo hidroxilo en 3' del nucleótido en el extremo 3' de la cadena en crecimiento sobre el fósforo α en 5' del desoxinucleósido 5'-trifosfato entrante. En la reacción se libera pirofosfato inorgánico. La ecuación general de la reacción es:



En donde dNMP y dNTP son desoxinucleósido 5'-monofosfato y 5'-trifosfato, respectivamente.

Los trabajos iniciales sobre la ADN polimerasa I llevaron a la definición de dos requisitos centrales para la polimerización del ADN. Primero, todas las 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 todas las ADN polimerasas, y este descubrimiento proporcionó una sugerencia interesante en la historia de la replicación del ADN.^{12, 13}

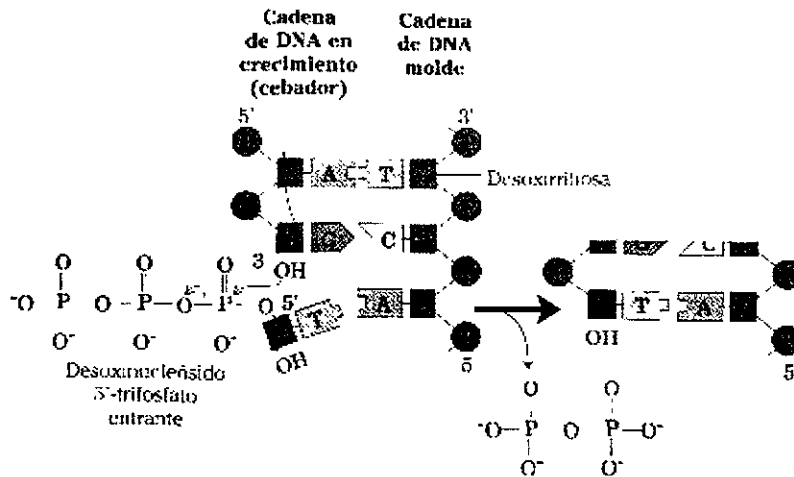


FIGURA 9

Una vez desapareada una hebra actúa de molde y una cadena cebadora que parte del extremo 3' libre al cual se pueden añadir nuevas unidades de nucleótidos. Cada nucleótido es seleccionado en virtud del apareamiento de bases adecuado según el nucleótido que hay en la hebra molde.¹²

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, la ADN polimerasa se ha de dissociar 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 dissociarse del molde. El número de nucleótidos adicionados, en promedio, antes que se disocie una polimerasa se define como su procesividad (*FIG 9*). 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.^{12, 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.¹²

Un mecanismo intrínseco virtualmente a todas las ADN polimerasas es una actividad exonucleasa 3' \longrightarrow 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' \longrightarrow 5' exonucleasa elimina el nucleótido mal apareado y la polimerasa vuelve a empezar (*FIG. 10*). 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 pueden 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 .¹²

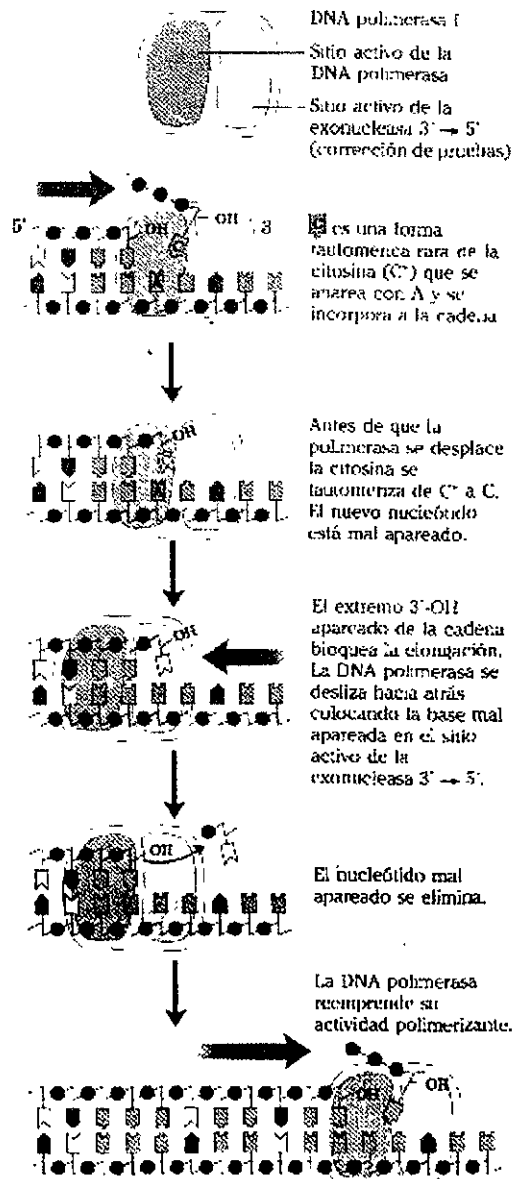


FIGURA 10

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

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 más 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* han sido mejorados 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.¹²

II. 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 tiene un mayor desarrollo es la capacidad de diagnosticar las enfermedades a un nivel molecular. El diagnóstico de enfermedades de causadas por virus, incluyendo a aquellas que afectan la región orofacial, viéndose beneficiado por la detección de ADN viral con una gran sensibilidad.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual es una amplificación enzimática de una secuencia de ADN seleccionada; el cual es un proceso químico más que un proceso biológico de amplificación. La sensibilidad de este proceso es mayor que la de otros procedimientos. Para realizar una detección de ADN por medio de pruebas tipo Southern se requiere normalmente, de 5 – 10 microgramos (10^6 gramos) de ADN genómico, esta cantidad de ADN esta presente en cerca de 10^6 células nucleadas. El Southernblot más sensible puede revelar una secuencia anormal solo cuando esta 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.

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

Desnaturalización. El primer paso en el sistema de amplificación del PCR es la desnaturalización térmica de la muestra de ADN elevando la temperatura dentro

de un tubo de ensayo a 95°C. Además de la fuente de ADN este tubo contiene un exceso molar de dos “primers”, una polimerasa termoestable, y los cuatro deoxiribonucleótidos. La temperatura es mantenida por un minuto.

Renaturalización. Para el segundo paso, la temperatura de la mezcla es lentamente enfriada a 55°C. Durante este paso, los “primers” se unen a sus secuencias complementarias en la fuente de ADN.

Síntesis. En el tercer paso, la temperatura es elevada a 75°C, la cual es óptima para la función catalítica de la polimerasa. La síntesis de ADN es iniciada en el extremo 3' hidroxil de cada “primer” (FIG. 11).

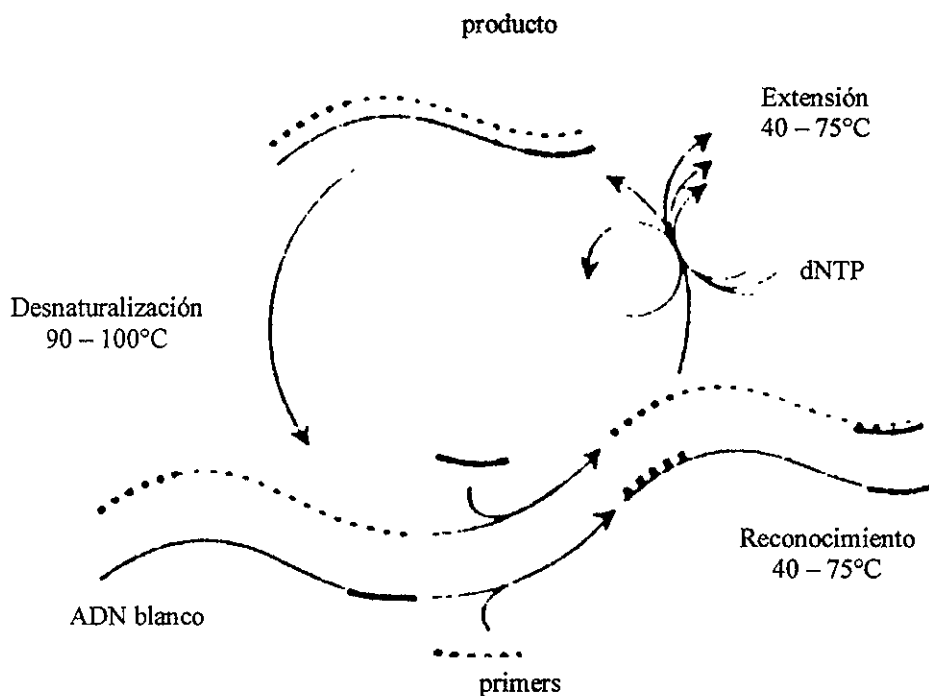


FIGURA 11
*Esquema de los 3 pasos básicos del PCR que en conjunto representa cada ciclo del procedimiento.*¹³

Para lograr un mayor entendimiento se deben de conocer los componentes utilizados en el PCR así como resaltar su papel dentro del procedimiento para así evitar la mayor cantidad de errores. Los componentes mas importantes son la ADN polimerasa, los “primers” (oligonucleótido corto que hibridiza con un blanco), dNTP (trifosfato deoxinucleótido), el amortiguador y el ADN blanco.^{1, 2, 3, 4, 6, 9, 10, 18, 19, 20}

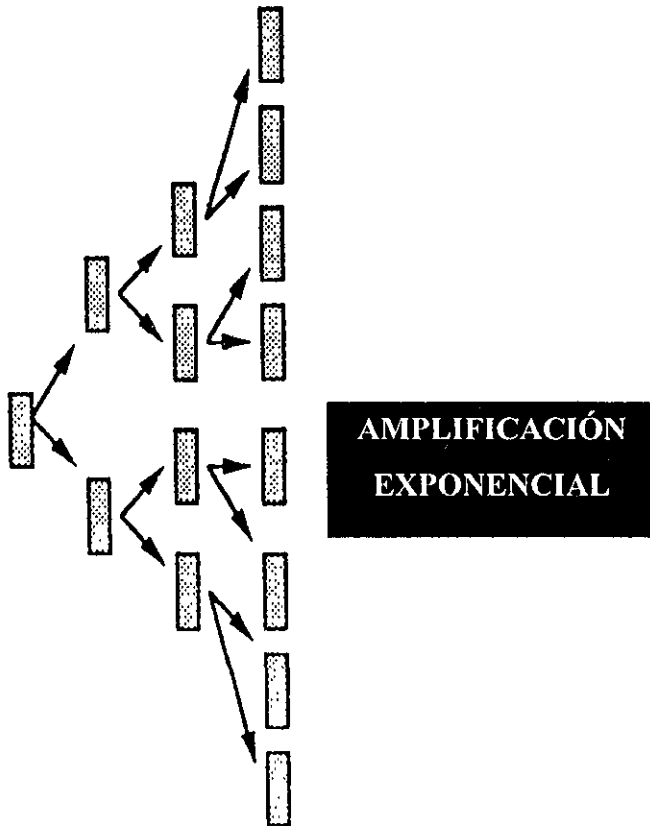


FIGURA 12

Después de un ciclo completo se obtienen dos cadenas idénticas de cada cadena de ADN que sirve como blanco lo que explica su amplificación exponencial. 7

2.0 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 *Taq* polimerasa resiste los 94 – 96°C requeridos para la desnaturalización del ADN y solo es necesario añadirla en el comienzo del procedimiento del PCR.^{1, 2, 3, 4, 6} 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. Desafortunadamente, 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, que es normalmente requerida en el PCR.^{18, 20}

2.1 “PRIMERS” O CEBADORES

La relativa eficiencia del PCR aplicado a la medicina clínica depende de una larga extensión en la selección de un juego de “primers” apropiados para el problema clínico a estudiar. Varios principios importantes fundamentales para diseñar el par de “primers” lo cual ayuda a disminuir problemas potenciales de sensibilidad y especificidad.

Especificidad.

La cualidad con mayor importancia para un “primer” es su especificidad para la secuencia blanco. La especificidad esta relacionada con la longitud del “primer”. Varias combinaciones de nucleótidos puede ocurrir casualmente en el genoma humano con una frecuencia de 4^n , donde n es la longitud de la secuencia. Si un “primer” es demasiado corto podría ser complementario a múltiples genes y puede unirse específicamente a una región inapropiada del ADN. Estadísticamente, un oligonucleótido debe de ser de cuando menos de 17 bases de longitud par evitar que

se una a una región que no se desea. Para una mayor estabilidad y debido a que ciertas secuencias pueden ocurrir mas seguido que otras, los “primers” para el PCR generalmente son de 20 nucleótidos de longitud. Incrementar la longitud de los “primers” a mas de 25 nucleótidos es contraproducente, ya que afecta la movilidad y requiere un mayor tiempo para unirse al ADN blanco. “Primers” largos pueden, de cualquier modo, ser requeridos si es posible que suceda una incorporación errónea entre el “primer” y el ADN blanco.^{1, 2, 4, 6, 18, 19, 20}

Composición.

Una fuerte unión ente 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 de posiciones específicas dentro del ADN blanco. Las incorporaciones erróneas sencillas pueden 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 deoxinucleótidos 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_m para un “primer”.¹⁸

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 disfunción enzimática. Es más importante que la base 3' de el "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 codón. Por lo tanto es preferible tener la base terminal del "primer" complementaria a la primera o segunda base de un codón.^{1, 2, 3, 4, 6, 10, 18, 19,}

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 secuenciamiento.^{1, 2, 3, 4, 6, 10, 18, 19}

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 puede producir "primers" parcialmente extendidos que tienden a incorporarse erróneamente en los ciclos subsecuentes.^{18, 19}

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 “primers” son utilizados en concentraciones de 0.2 – 1.0 μ M.^{18, 19}

TRIFOSFATO DESOXIRRIBONUCLEOTIDO

La mezcla de PCR recomendada contiene 200 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 dNTP pueden ser empleadas. El pH de la solución de nucleótidos debe ser ajustada a 7.0.^{1, 2, 3, 4, 6, 10, 18, 20}

2.2 AMORTIGUADOR

Los ingredientes restantes en el PCR son 10mM 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 la simple valoración del pH, Mg⁺⁺, dNTP, el efecto de reducir las concentraciones de dNTP, y la concentración de los “primers”. Ya que el Mg⁺⁺ esta por encima de la relación equimolar por dNTP, el efecto de reducir la concentración de dNTP incrementa 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.^{1, 2, 3, 4, 6, 10, 18, 19, 20}

2.3 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 fijado en formalina y embebido en parafina 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 ensayo 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 $50\mu\text{M}$ 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 μg (en 5 – 10 μl) 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 proteinasa K es inactivada colocando los tubos en agua hirviendo por 10 minutos. Todos los tubos son centrifugados y de 5 – 25 μl 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 conducirnos a resultados falsos negativos. Para la mayoría de las aplicaciones se estima que 10^3 células es satisfactorio.^{18, 19, 20}

2.4 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 mas 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 las incorporaciones erróneas 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.^{1, 2,3, 4, 6, 10, 18, 19}

Las condiciones de los ciclos térmicos son las siguientes:

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

Los ciclos debe 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 10mM.

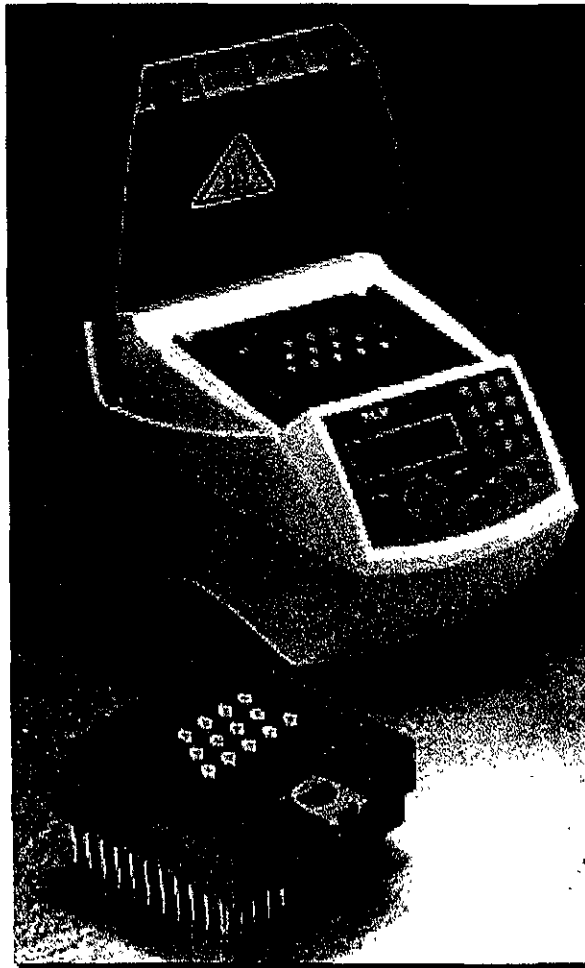


FIGURA 14

Máquina de PCR personal programable para la realización de todos los ciclos continuos.

2.5 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, existen procedimientos más 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.²¹

Uno de los primeros procesos de desparafinización fue el descrito por Shibata en 1988 en el cual las secciones se desparafinizan añadiendo 400 µl de xileno, y se centrifuga por 5 minutos. El xileno se decanta y sus residuos son removidos con 400 µl de etanol al 95%, se centrifuga y una vez mas se decanta. Las películas de tejido se disecan y se añade directamente los 100 µl de la mezcla para PCR. Los tubos se calientan a 100°C por 10 minutos y luego son sujetos a los ciclos de amplificación.²²

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 10µm; 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 aproximadamente 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 100µl de amortiguador de digestión que contenga 200µg/ml de Proteinasa K a las muestras extraídas y secas. Las muestras que contengan grandes cantidades de tejido deben ser resuspendidas en 200µl 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.

Ya que la amplificación para tejidos embebidos en parafina es menos eficiente que la amplificación para otro tipo de blancos como ADN purificado o extractos de material clínico fresco. Para compensar esta eficiencia reducida, se modifican los parámetros del ciclo térmico para incrementar el número de ciclos y alargando el tiempo a cada temperatura dentro del ciclo.^{19, 21}

El método descrito a continuación es un método alternativo por medio del cual se puede obtener ADN amplificable, evitando los cambios continuos de tubo y los lavados continuos con etanol.

2.6 OTRA ALTERNATIVA DE DESPARAFINIZACIÓN

Otro método para obtener ADN amplificable comenzando con el procedimiento de desparafinización 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 son mezcladas gentilmente 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 gentilmente por 2 – 3 minutos, y posteriormente centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos. El etanol residual es removido pipeteando y se continua con una centrifugación en un contenedor al vacío por 10 minutos.

Digestión por proteinasa K

Doscientos μl de amortiguador (buffer) proteinasa K se añaden a cada tubo; un esfuerzo mínimo es necesario para resuspender las películas de tejido, las cuales se vuelven un poco viscosas. Se añade proteinasa K para llegar a una concentración final de $400\mu\text{g/ml}$. Subsecuentemente las muestras son incubadas a 50°C por 4-6 horas, y calentadas a 94°C por 10 minutos para inactivar la proteinasa K.

Precipitación de las proteínas

Cincuenta μl de una solución de NaCl saturada (aproximadamente 6M) son añadidas a cada tubo, y las muestras son gentilmente mezcladas por 5 minutos. Los tubos son centrifugados a 4000 rpm a temperatura ambiente por 15 minutos, y las supernatas son removidas a un tubo nuevo. En el fondo del tubo es visible una película blanca de proteínas después de la centrifugación.

Precipitación del ADN

Una décima de volumen de 3M de acetato de sodio se añade a las supernatas, seguido de 2.5 volúmenes de etanol al 100%; $5\mu\text{l}$ de glicogeno (2 mg/ml) se añade como para mejorar la recuperación del ADN. Las muestras se colocan a -20°C toda la noche, y luego se centrifugan a 4°C por 30 minutos a 14000 rpm. La supernata es removida, las películas se lavan con 1 ml de etanol al 70%, y luego se centrifugan a 4°C y 14000 rpm por 15 minutos. Una vez más es removida la supernata, y las películas se secan en un contenedor al vacío. Estas se resuspenden en $50\mu\text{l}$ de agua estéril.²¹

2.7 POSIBLES ERRORES EN LA REALIZACIÓN 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 pipetas. 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 de que la temperatura es uniforme dentro de los bloques.

Aún con estas precauciones, dos problemas mayores surgen en el desarrollo de un PCR útil clínicamente. El problema inicial es la falta de sensibilidad, aún 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 inhibidora 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. Condiciones de almacenamiento no adecuadas puede 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.^{1, 4, 6, 10, 18, 20}

2.8 OPTIMIZACIÓN DEL PCR

Indudablemente, un solo protocolo no es apropiado para todas las situaciones. Consecuentemente, una aplicación nueva para el PCR requiere una optimización. Algunos de los problemas encontrados son: un producto no detectable o un campo bajo del producto deseado; la presencia de incorporaciones erróneas o una mala extensión de los “primers”. Por lo cual deben ser consideradas posibles variaciones en cada uno de los elementos del PCR.

2.8.1 CONCENTRACION DE LA ENZIMA

Un rango recomendado de concentración para la ADN *Taq* polimerasa es entre 1 y 2.5 unidades por 100µl de reacción cuando otros parámetros son óptimos. De cualquier modo, los requerimientos de la enzima pueden variar con respecto a cada blanco individual o con respecto a los “primers”. Cuando se optimiza el PCR, recomendamos probar las concentraciones de la enzima variándolas de 0.5 a 5 unidades /100µl y analizar los resultados por gel electroforesis. Si la concentración de la enzima es muy elevada, productos de fondo no específicos se pueden acumular, y si es demasiado baja, una cantidad insuficiente del producto deseado es producida.^{1, 2, 3, 4, 6, 10, 18, 20}

2.8.2 TRIFOSFATO DESOXIRRIBONUCLEOTIDOS

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 µM 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 errónea de nucleótidos. Uno debe de decidirse por la menor concentración apropiada para la longitud y composición de la secuencia blanco, ej; 20µM de cada

dNTP en una reacción de 100µl es suficiente teóricamente para sintetizar 2.6 µg de ADN o 10 pmol de una secuencia de 400 bases.^{1, 2, 3, 4, 6, 10, 18, 20}

2.8.3 CONCENTRACION DE MAGNESIO

La concentración de magnesio puede afectar lo siguiente: el reconocimiento de los “primers”, disociación de las bandas del blanco y del producto del PCR, especificidad del producto, actividad y fidelidad de la enzima. Por lo que la mezcla del PCR debe de contener 0.5 a 2.5 mM de magnesio sobre la concentración total de dNTP. Es importante notar que la presencia de EDTA y otros quelántes en los “primers” o el ADN blanco puede afectar el magnesio aparentemente óptimo.^{18, 20}

2.8.4 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 20mM Tris (pH 8.3) a 20°C varia entre 7.8 y 6.8 durante las condiciones típicas de los ciclos térmicos. Hasta 50mM KCl pueden ser incluidos en el 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 albumina bovina (100 µg/ml) son incluidas para ayudar a estabilizar la enzima, aunque muchos protocolos trabajan bien sin la adición de proteínas.^{18, 20}

2.8.5 RECONOCIMIENTO DE LOS “PRIMERS”

La temperatura y el tiempo requerido para el reconocimiento de los “primers” depende en 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 amplio 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 incorporación errónea 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 incorporación errónea de nucleótidos.

2.8.6 EXTENSION 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 varía de 35 a 100 nucleótidos por segundo dependiendo de el 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.^{1, 2, 3, 4, 6, 9, 10, 18, 20}

2.8.7 TIEMPO Y TEMPERATURA DE DESNATURALIZACION

La causa más común en fallas del PCR es una desnaturalización incompleta de el blanco y/o de los productos del PCR. Las condiciones de desnaturalización generalmente son a 95°C por 30 segundos, o 97°C por 15 segundos; de cualquier

modo, temperaturas más elevadas pueden ser apropiadas, especialmente para blancos con alto contenido de G - C. Una desnaturalización incompleta permite a las bandas del ADN renaturalizarse y esto, reduce el campo del producto. En contraste, los pasos de desnaturalización que son 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.^{1, 2, 3, 4, 6, 9, 10, 18, 20}

2.8.8 NÚMERO DE CICLOS

El número de ciclos depende principalmente en la concentración inicial de ADN blanco cuando los otros parámetros han sido optimizados. Un error común es la ejecución de demasiados ciclos. Demasiados ciclos pueden incrementar la cantidad de los productos no específicos. Obviamente muy pocos ciclos dan como resultado muy poco producto.^{1, 2, 3, 4, 6, 9, 10, 18, 20}

GUIA DE CICLOS CONTRA BLANCO

Número de moléculas blanco	Número 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

2.8.9 "PRIMERS"

Concentraciones de "primers" entre 0.1 y 0.5 μM son generalmente óptimas. Altas concentraciones de "primers" puede promover incorporaciones erróneas y acumulación de producto no específico y puede 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 del producto deseado.

Algunas reglas simples nos ayudan al diseño de “primers” eficientes. Generalmente los “primers” son de 18 a 28 nucleótidos de longitud conteniendo de un 50 a 60% G - C. Uno debe evitar la complementaridad en el extremo 3' de los pares de “primers” ya que esto promueve la formación de “primer – dimer” y reduce la obtención del producto deseado. 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 ricas en G - C y deben ser evitadas en medida de lo posible.^{1, 2, 3, 4, 6, 9, 10, 18, 20}

2.8.10 EFECTO DE MESETA

Este término es utilizado para describir la reducción de la acumulación del rango exponencial del producto que ocurre durante los últimos ciclos del PCR. Dependiendo de las condiciones y ciclos termales, uno o más de estos puntos puede influenciar a la meseta: 1) utilización de sustratos (dNTP o “primers”); 2) estabilidad de los reactivos (dNTP o de la enzima); 3) inhibición del producto 4) competición de los reactivos por productos no específicos o “primer – dimer”; 5) una desnaturalización del producto cuando existen concentraciones elevadas de este.

Una consecuencia importante para alcanzar el efecto de meseta es que una baja concentración de productos no específicos resultado de incorporaciones erróneas puede continuar amplificándose. Optimizar el número de ciclos del PCR es la mejor manera de evitar productos no deseados.^{18, 20}

III. PCR PATOLOGIA BUCAL

Ya que la reacción en cadena de la polimerasa es un avance relativamente nuevo en la biotecnología para la amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos, sus aplicaciones dentro de la odontología no han sido ampliamente desarrolladas; debido a que se debe de conocer la secuencia de bases por amplificar o parte de esta.

La importancia de realizar un diagnóstico adecuado es importante debido a que muchos virus permanecen latentes en la cavidad bucal lo que puede ser útil para dar un tratamiento adecuado.

VIRUS	SITIO DE LATENCIA
HERPES SIMPLE	GANGLIO DEL TRIGEMINO
VARICELLA-ZOSTER	GANGLIO SENSITIVO
EPSTEIN-BARR	CELULAS EPITELIALES Y LINFOCITOS B
CITOMEGALOVIRUS	CELULAS DE LAS GLANDULAS SALIVALES
PAPILOMAVIRUS	CELULAS EPITELIALES
VIH	LINFOCITOS T Y OTRAS CELULAS CD4 POSITIVAS

*Tabla de virus que permanecen latentes dentro de la cavidad oral.*²³

En el año de 1992 Ficara y Eversole publican un artículo en el cual hacen mención de las posibilidades de esta herramienta en la patología bucal, destacando que esta puede ser utilizada en tejidos embebidos en parafina y/o en tejidos frescos fijados en formalina, ya que la reacción en cadena de la polimerasa puede amplificar secuencias de fragmentos de ADN, secuencias de ARN pueden ser utilizadas con el fin de obtener ADN amplificable, y ya que pueden ser analizadas las interacciones ADN – proteínas mencionan que sus aplicaciones dentro de la medicina y la patología son infinitas.⁷

Se han realizado reportes en los cuales se utilizó para tipificar el virus de papiloma humano en tejidos y en la mucosa, El PCR también ha sido utilizado para confirmar la presencia de otros agentes infecciosos en los tejidos humanos tales como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de hepatitis B, el citomegalovirus y el virus de Epstein-Barr principalmente. Aunque también puede ser utilizado para detectar el virus de herpes simple (VHS) en herpes labiales recurrentes agudos o en pacientes con estomatitis aftosa recurrente.⁷

Debido a la presencia de ciertos factores patológicos entre las lesiones premalignas comenta la importancia de monitorear dichas condiciones con el fin de conocer si estas pueden ser desencadenantes de una malignización debido a su presencia en la cavidad bucal en el tejido adyacente o en saliva. Para tener un mejor entendimiento de las probables causas de malignización y por lo tanto tener un mejor conocimiento con el fin de dar un mejor tratamiento para evitar la posible malignización de dichas lesiones.

La mayoría de los estudios han sido realizados para tipificar el virus de papiloma humano debido a que se han sido identificado más de 70 diferentes tipos de este virus a la fecha²⁴ estos se han reportado en un sinúmero de sitios del cuerpo,

incluyendo el tracto anogenital, uretra, piel, laringe, mucosa traqueobraquial, cavidad nasal/senos paranasales, cavidad bucal, esófago y conjuntiva. Este virus se ha encontrado involucrado en una gran variedad de lesiones bucales dentro de las que se incluyen papiloma de células escamosas/condiloma, verruga vulgar, hiperplasia epitelial focal, hiperplasia papilar, hiperplasia fibrosa, liquen plano y leucoplasia por medio de estudios histopatológicos, ultraestructurales, inmunohistoquímica e hibridización de ADN. Recientemente, se ha sugerido un posible papel en la etiología de la patogénia de las lesiones bucales precancerosas y cancerosas debido a su presencia en especímenes de cáncer bucal^{24, 25} por medio de estudios de hibridización del ADN siendo los hallados con mayor frecuencia en las lesiones precancerosas y en cáncer de células escamosas los tipos 11, 16 y 18. Dentro de los tipos de VPH conocidos los que han sido encontrados en diferentes lesiones bucales son VPH 1, 2, 4, 6, 7, 11, 13, 16, 18, 32, 57²⁵. De estos al parecer los tipos de VPH 13 y 32 están confinados exclusivamente a una lesión, la hiperplasia epitelial focal^{25, 26}. Mientras algunos otros autores mencionan la presencia del VPH 6 y VPH 11 en el papiloma escamoso²⁶ y Scully relaciona el VPH con el las verrugas bucales (papiloma), verrugas genitales (condioma acuminatum), relacionado al igual que el VPH 6 con esta patología²⁶ el VPH 11 con papilomas bucales y verrugas genitales²³. El VPH 6 también ha sido relacionado con la verruga vulgar así como el VPH 2²⁶ y este es relacionado por Scully en el carcinoma verrucoso bucal²³. Aún cuando se ha reportado que también ha sido identificado el VPH 30 en algunas lesiones bucales^{24, 25} y la presencia de alguno de estos tipos de virus a la queratosis, queratoquiste odontogénico, ameloblastoma y displasia epitelial bucal.

3.0 VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH)

Lawton GM, Thomas SJ, *et al.* Realizan un estudio comparativo de métodos de colección de muestras del virus de papiloma humano en la mucosa bucal normal en el año de 1992. En el cual compararon los enjuagues, la citología exfoliativa y las

biopsias como métodos de colección de muestras, dichas muestras fueron estudiadas con el objetivo de confirmar la presencia del VPH en la mucosa bucal; dichas muestras fueron estudiadas por medio de hibridización Dot/Blot y PCR.

De los 60 sujetos que presentaban una mucosa bucal normal, 36 (60%) fueron positivos para cuando menos un tipo de VPH en cuando menos una de las muestras obtenidas, ya sea por medio de citología, biopsia o enjuague. De las 70 muestras con resultados positivos para el VPH 26 de estas fueron positivas para mas de un genotipo de VPH, de los 36 sujetos infectados, 16 se encontraban infectados con un solo tipo de VPH, 8 con dos genotipos, 8 con tres genotipos y cuatro con cuatro diferentes genotipos.

En este estudio se encontró que el VPH genital comúnmente es encontrado en la mucosa bucal normal, donde fueron identificados los tipos de VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33 ya sea solos o combinados. El tipo de VPH encontrado con una mayor prevalencia fue el 16. Mencionan que la técnica del PCR, la cual permite la amplificación de una región del ADN para la detección del VPH tiene dos principales ventajas sobre la hibridización dot/blot primero, solo son requeridas pequeñas cantidades de tejido para su evaluación, y segundo la especificidad de la amplificación del ADN es tal que el material no relacionado en una biopsia y un enjuague no afecta el resultado, lo cual ha incrementado el rango de genotipos de VPH detectados. Generalmente los genotipos de VPH identificados en las lesiones bucales son similares a los de la mucosa de la laringe y de la piel genital con solo dos excepciones VPH 13 y 32 que solo han sido encontrados en la mucosa bucal. Los genotipos 6, 11, 16 y 18, los cuales son encontrados frecuentemente en el área genital, también han sido encontrados en lesiones displásicas bucales y en carcinoma de células escamosas (CCE)²⁷.

Syrjänen *et al.* Demostró que la presencia del VPH en el epitelio incrementa progresivamente de la capa celular basal más profunda (5.8%) a las capas mas superficiales (100%) en 102 biopsias cervicales que se sabía contenían ADN de VPH. Aún cuando en este estudio el enjuague bucal y la citología fueron las que con mayor frecuencia dieron resultados positivos para la presencia de VPH, esto puede ser debido a que la cantidad de tejido por medio de una biopsia puede no contener ADN de VPH; mientras que la citología y el enjuague proveen una cantidad suficiente de ADN genómico amplificable en donde la muestra es más representativa de toda la cavidad bucal²⁷.

Shroyer K y Greer R realizaron un estudio para la detección de ADN del virus de papiloma humano por medio de hibridización *in situ* y la reacción en cadena de la polimerasa en lesiones bucales malignas y premalignas. Estudiaron biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina de 61 lesiones de la mucosa bucal de los archivos de Western States Regional Bucal Pathology Laboratory y Division of Bucal Pathology an Oncology, University of Colorado School Dentistry. Estas lesiones incluían 10 casos de queratosis no asociada al tabaco, 24 casos de displasia epitelial, 14 casos de hiperplasia verrucosa, 10 casos de carcinoma de células escamosas, y 3 muestras de carcinoma verrucoso, dichas muestras fueron desparafinizadas para las pruebas de PCR.

Los 10 casos de queratosis no asociada al tabaco no mostraron evidencia de ADN de VPH. La tinción específica fue detectada en el núcleo del epitelio escamoso en 4 de los 24 casos de displasia epitelial, en 3 de los 24 casos de hiperplasia verrucosa, y en 1 de los 10 casos de carcinoma de células escamosas. Los tres casos de carcinoma verrucoso fueron negativos en la hibridización *in situ* (HIS). En siete de los ocho casos positivos en esta serie, la tinción fue mas intensa con la sonda que reconoce los tipos 16/18 de VPH. En solo un caso, la tinción más intensa fue observada con la sonda para los tipos 31/33/35 de VPH

Cada una de las 61 lesiones fueron subsecuentemente evaluadas para la presencia de ADN de VPH 16 por medio del PCR. De los siete casos que fueron positivos para VPH 16/18 por HIS fueron positivos para VPH-16 por medio del PCR. En suma, un caso que fue negativo por medio de HIS y el que fue positivo para los tipos 31/33/35 de VPH también fueron positivos para el VPH-16 en el estudio por PCR.

Finalmente mencionan que la HIS frecuentemente falla en detectar fragmentos subgenómicos de ADN viral incorporados al genoma huésped y la infección es no productiva de partículas virales intactas. Debido a que sólo fue utilizada la amplificación del VPH-16 por su posible papel en la transformación celular y la alta frecuencia de incorporación de huésped en lesiones neoplásicas, por lo cual no fue probada la presencia de otros genomas de VPH. En este estudio la amplificación por medio del PCR fue más sensitiva que la HIS para la detección de ADN de VPH-16 en lesiones bucales aún cuando el PCR sólo fue realizado para el VPH-16 lo cual nos limita a la detección de doble o triple infección con diferentes tipos de VPH₂₈.

Kellokoski JK, Syrjäen SM *et al.* Realizaron un estudio en el cual utilizaron la hibridización southern blot y el PCR para la detección de virus de papiloma humano en mujeres con infecciones genitales de VPH. Fueron obtenidas 212 muestras de pacientes voluntarios en University Dental Clinic, Kuopio Finland y cada espécimen fue seccionado en dos partes uno fue procesado para la histología rutinaria y la otra parte fue congelada en nitrógeno líquido. Un total de 272 muestras fueron obtenidas para el análisis de Southern blot. Mientras que un total de 100 biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina fueron estudiadas por medio del PCR.

Los resultados obtenidos por medio de hibridización Southern blot fueron 42 de las 272 biopsias (15.4%) positivas por medio de la hibridización. De las lesiones

tomadas de lesiones como papilomas, queratosis, lesiones liquenoides, áreas blanquecinas, e hiperplasias 9 de 60 (15%) contenían ADN de VPH, una proporción igual 33 de 212 (15.6%) de las muestras de epitelio clínicamente sano contenían ADN de VPH. De los 4 papilomas y 5 condilomas planos diagnosticados histológicamente solo 1 papiloma y 1 condiloma contenían ADN de VPH.

Los resultados obtenidos en el PCR fueron basados en 85 de las 100 muestras ya que en estas la amplificación para la β -globulina, la cual se utiliza como prueba de control de que la amplificación por medio del PCR se esta llevando a cabo, fue detectada, mientras que en las otras 15 no lo fue, por lo tanto; para el VPH 6/11 y VPH 16/18 fueron observados en 9.4% 8 de 85 y 8.2% 7 de 85 de los especímenes respectivamente. En una muestra fueron encontrados ambos tipos de VPH el 6 y el 16, y tres especímenes contenían VPH 18. Por lo que un total de 16.5% de las biopsias fueron positivas para algún tipo de VPH. El resto de los productos del PCR fueron utilizados para una hibridización dot/blot para un posterior análisis para contenido de VPH con sondas VPH 6/11 y 16/18, con este método se obtuvieron 11 resultados positivos adicionales con VPH 6/11 y la misma cantidad de muestras positivas de VPH 16/18 fueron detectadas que por medio de la electroforesis en gel. Entonces un total de 29.4% de positividad al VPH fue obtenida, el VPH 6/11 fueron los tipos mas frecuentes. Siete de las biopsias positivas fueron obtenidas de lesiones clínicas, resultando una positividad de un 23.1% de las biopsias de epitelio clínicamente normal.

En conjunto 65% de los pacientes con una infección bucal por VPH tenían una infección genital concomitante por VPH demostrada por métodos de hibridización de ADN. Los tipos de VPH bucales y genitales fueron correlacionados en los pacientes en los cuales el tipo de VPH fue revelado por medio del PCR. En once de los pacientes con una infección bucal por VPH demostrada por PCR no fue detectado ADN de VPH en la mucosa genital. Para las 14 mujeres restantes, con

infección genital, dos tenían VPH 11, siete tenían VPH 16, uno tenía VPH 18, y cuatro tenían VPH 31. En los casos apropiados el ADN de VPH fue tipificado para distinguir si el tipos de VPH bucal y genital eran los mismos. De acuerdo a esto dos pacientes tenían el mismo tipo de VPH (VPH 11 y VPH 16 respectivamente) en la mucosa bucal y genital . El estado de las parejas masculinas fue obtenido en 33 casos. De estos, 27.3% (9/33) tenían infección anogenital, pero los tipos de VPH difirieron en los tipos de VPH de su pareja femenina. Sólo una pareja tenían el mismo tipo de VPH en la mucosa genital.

La demostración de la alta proporción de ADN de VPH en la mucosa bucal y genital indica que el VPH es un ocupante común en el epitelio humano. Ya que la presencia de VPH puede ser demostrado por medio de hibridización southern blot (HSB) y PCR, en su opinión el número de copias virales en el epitelio bucal es baja comparada con la mucosa genital, lo cual es apoyado por estudios previos.

Sus resultados indican que en la mayoría de los casos son diferentes el tipo de VPH en la mucosa bucal y en la genital. De cualquier modo, todas las infecciones bucales fueron no productivas lo que propone que la inmunidad específica puede tener un papel en contra del VPH. Por otra parte, sus resultados dan evidencia clara del tipo de inmunidad específico en la mucosa. Esto puede ser pertinente sólo en sujetos con una función inmune normal porque algunos tipos de VPH en dos mucosas diferentes han sido demostrados en pacientes inmunodeprimidos.

Ya que el fumar es generalmente considerado como un cofactor en un amplio rango de malignizaciones, éste actúa como un cofactor con los tipos de VPH 16 y 18 en el desarrollo de displasias cervicales, y se ha observado que altera el epitelio bucal, es razonable sugerir que el fumar por medio de un mecanismo desconocido tiene influencia en la expresión de VPH.

En base a su estudio enfatizan el hecho de que la evaluación histológica es pobre con respecto al análisis de ADN del VPH, sin demeritar los valores de la histología para determinar la morfología pero no es útil para detectar las infecciones latentes o subclínicas de VPH, esto tiene un valor especial en el caso de la mucosa bucal la cual se encuentra constantemente sujeta a traumas y dichas variaciones microscópicas y macroscópicas ocurren con frecuencia lo cual puede simular cambios inducidos por el VPH.

Aún cuando encontraron ADN de VPH en 23.1% de las biopsias tomadas de epitelio bucal normal por medio del PCR, esto podría ser una estimación baja de la prevalencia real de VPH. Esto debido al patrón fluctuante de infección de VPH, los pocos tipos de VPH detectados, y el posible error en la toma de biopsias, por lo que debe ser colectada saliva y suero para ser analizados. Por lo que debería ser considerado en un futuro que el ADN de VPH en la mucosa bucal esta en su mayoría en una forma latente y que por ello no produce ADN viral adicional²⁹.

En el año de 1992 Jalal H, Sanders CM, Prime SS, Scully C y Maitland NJ hicieron un estudio para detectar el virus de papiloma humano tipo 16 en adultos jóvenes sanos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, por medio de citología bucal y células mononucleares; para lo que se realizó una citología en el paladar duro y dorso de la lengua de 62 individuos sanos. El análisis por PCR fue realizado en dos partes, el primer grupo; los raspados de la mucosa bucal del paladar duro y dorso de la lengua del mismo individuo fueron codificados separadamente y fueron tratados como especímenes separados. El PCR fue llevado a cabo en 90 muestras de 30 diferentes individuos. Ya que este fue realizado, a las células mononucleares de los mismos individuos. El segundo grupo los raspados de la mucosa del paladar duro y dorso de la lengua fueron tratadas como una sola muestra.

En el primer grupo de las 90 muestras de los 30 individuos, 17 fueron positivas para el VPH 16, estos resultados positivos fueron derivados de 11 individuos. Las 30 muestras analizadas para las células mononucleares dieron resultados negativos. En el segundo grupo de las 18 muestras bucales analizadas, 8 fueron positivas, mientras que 2 de las 32 muestras de células mononucleares obtuvieron resultados positivos.

En el “primer” grupo, los resultados indicaron que no hay un sitio de preferencia para infección en la cavidad bucal. La incidencia total de infección por VPH 16 en el epitelio es alta (13/30 o 43%) de los de este grupo. Ya que las muestras fueron obtenidas por citología asumimos que al ser de la superficie del epitelio representa en nivel de infección activa de la cavidad bucal. En contraste la infección de las capas basales y supra-basales del epitelio bucal no pueden ser detectadas por citología exfoliativa. Por lo que reportan que la incidencia actual de VPH 16 puede ser mayor de un 43%, no es sorprendente detectar el VPH 16 con dicha frecuencia ya que este virus es asumido como de tipo genital. El resultado de un 43% de positividad en el tejido bucal es aún significativamente más bajo que en la presencia de VPH 16 en el carcinoma cervical por medio del PCR la cual es probablemente mayor a un 80%. Aún cuando la incidencia de VPH 16 en el epitelio cervical normal aun es controversial³⁰.

En 1994 Oswald C, Müller P. *et al.* Llevaron a cabo un estudio para identificar el ADN del virus de papiloma humano de los tipos 6, 11, 16 y 18 en carcinomas de células escamosas y en la mucosa bucal, utilizando el PCR y una subsecuente hibridización Southern blot. Las muestras de tejido fueron obtenidas de 26 pacientes, las partes removidas quirúrgicamente fueron divididas en dos. Una parte fue congelada a -80°C hasta ser utilizada para el análisis de ADN, la otra fue fijada en formalina y embebida en parafina para su examinación histológica.

En los pacientes con carcinoma de células escamosas (CCE), se estudiaron especímenes de diferentes orígenes: tejido tumoral, mucosa sana adyacente al tejido, y un raspado de la mucosa distante al tumor. En el grupo de control, raspados de la mucosa bucal de 97 voluntarios sanos fueron tomadas. Mientras que muestras de carcinoma de células escamosas con VPH del cervix uterino se utilizaron como controles positivos.

En conjunto, 16/26 CCE contenían ADN de VPH en el tejido tumoral (61.5%). VPH 16 fue encontrado en siete, VPH 18 en seis, y VPH 6/11 en dos casos. En dos tumores el ADN de VPH no fue definido. Mientras que una infección doble con VPH 16 y 18 fue descubierta en un CCE pobremente diferenciado. Después de la amplificación por medio del PCR y la hibridización, siete CCE fueron positivos y diez tumores fueron negativos. El rango de detección de VPH en diferentes muestras bucales de los pacientes con carcinoma disminuyó marcadamente con el incremento de la distancia del tumor. En 7/26 casos (26.9%), la mucosa peribucal contenía el mismo tipo de VPH que el del tumor, mientras que solo 1/26 de las muestras de la mucosa bucal distante fue positiva (3.8%). La mitad de los pacientes con metástasis de nódulos linfáticos (8 casos) fueron positivos para VPH. Los tumores libres de nódulos linfáticos fueron documentados en nueve pacientes, ocho de estos pacientes fueron positivos para VPH, y solo uno fue negativo. En el grupo de control solo un caso dio resultados positivos después de la amplificación y la hibridización. También encontraron que el rango de detección era mayor en el tejido congelado (58%), y solo un poco menor en los raspados de la superficie del tumor (50%). En las muestras embebidas en parafina el rango disminuyó hasta un (17%).

La detección de ADN de VPH en un 61.5% de los CCE demuestra una alta prevalencia de infección por VPH en los paciente con el tumor. La alta frecuencia con la que se encuentran los tipos 16 y 18 es sugestiva de un posible papel causal. Mientras que el PCR descubre el VPH en la mucosa bucal otros métodos menos

sensitivos (Southern, dot blot, hibridización *in situ*) generalmente fallan en revelar infecciones por es VPH. Una probable diferencia entre las infecciones genitales y las infecciones por VPH bucales más comunes es que estas son probablemente infecciones latentes o de baja productividad. En los carcinomas de células escamosas bucales una alta frecuencia de ADN de VPH fue encontrada. Mientras que predomina la presencia de VPH en los carcinomas queratinizados/diferenciados la presencia generalmente es de los tipos 16 y 18, y la tendencia del VPH 18 a estar presente en los carcinomas no queratinizados/indiferenciados es de relevancia biológica aun cuando esta debe ser estudiada posteriormente³¹.

En 1994 Craig S. Miller, Maria S. Zeus, *et al.* Llevaron a cabo un estudio para determinar la prevalencia de VPH 16/18 en laminillas desparafinizadas de especímenes de carcinoma bucal con diferentes técnicas como la hibridización *in situ* y una técnica que combina la reacción en cadena de la polimerasa y la hibridización *in situ*. Debido a que el PCR y el Southern blot no permiten la visualización de los descubrimientos morfológicos asociados con las señas positivas de VPH.

Treinta especímenes de carcinoma bucal procesados entre 1975 y 1992 del laboratorio de patología bucal, de la Universidad de Kentucky y de la universidad de Carabobo, Venezuela fueron estudiados. Las edades de los pacientes variaban de los 41 a 92 años. Utilizando la técnica de PCR-hibridización *in situ*, 20 de los 30 especímenes (66.7%) contenían ADN de VPH. El VPH tipo 16 fue detectado en 18 de 26 especímenes (69.2%), y 7 de 25 carcinomas (28%) contenían VPH 18. Infecciones combinadas fueron encontradas en 5 de 21 (23.8%) especímenes. Esta técnica es mas sensible que el uso de la hibridización *in situ* sola.

El VPH se encontró con una mayor frecuencia en hombres (75%) que en mujeres (57.1%). Además los hombres tenían los tipos 16 y 18 de VPH (11 de 26,

42%; 6 de 25, 24%) con mayor frecuencia que las mujeres (7 de 26, 27%; 1 de 25, 4%) respectivamente. Las infecciones combinadas solo se dieron en los hombres. Los sitios con resultados positivos mas frecuentes fueron el labio (5 de 5, 100%), el piso de la boca (5 de 6, 83%), y el vestíbulo (3 de 4, 75%).

La técnica de hibridización *in situ* falló en detectar VPH 16 y 18 en los 30 especímenes analizados lo que corrobora estudios previos que reportaron una nula o baja prevalencia de VPH en carcinoma bucal por medio de la hibridización *in situ*. Lo que apoya el concepto que el VPH esta presente en una baja cantidad en número de copias en el carcinoma bucal. El porcentaje detectado por medio de la combinación de la hibridización *in situ* y el PCR (67%) es mayor que el encontrado con las técnicas de Southern blot y dot blot y la prevalencia promedio calculada de estudios previos con PCR. La técnica de PCR e hibridización *in situ* nos permite la correlación directa de la localización del VPH con la histomorfología de la lesión carcinomatosa.

El hecho de que el VPH 16 se haya encontrado con mayor frecuencia que el VPH 18 es consistente con los estudios previos en los cuales se reporta que el VPH 16 se encuentra con mayor frecuencia en los carcinomas bucales y provee información acerca de que los VPH 16 y 18 son virus principalmente carcinogénicos involucrados en neoplasias malignas bucales. Se encontró una infección combinada en un 24% y en dichos casos el carcinoma fue diagnosticado cuando menos 8 años antes que en los pacientes con solo un VPH de alto riesgo, y que estos pueden proveer un medio para un estado neoplásico más agresivo. Encontrar VPH 16 en carcinoma verrucoso es relativamente sorprendente. Este tipo ha sido reportado con poca frecuencia en carcinoma verrucoso y sólo en tejido laríngeo. Otros han detectado VPH 2 en carcinoma verrucoso o no han reportado la detección de ningún VPH en el carcinoma verrucoso.

Los carcinomas bien diferenciados parecen tener un mejor pronóstico que las neoplasias pobremente diferenciadas, ellos encontraron que el VPH esta asociado a la mayoría de los carcinomas bien o moderadamente diferenciados. Encontraron que el VPH 16 se encontró en el único caso recurrente de carcinoma de células escamosas, mientras que reportes previos indican que el epitelio bucal infectado por VPH tiene el potencial de recurrencia debido a su diferenciación histopatológica. Por lo que este estudio sugiere que los tipos de VPH 16 y 18 tienen un papel importante en el génesis tumoral maligno bucal³².

Un estudio para identificar la prevalencia de VPH 16 en células bucales exfoliadas de 26 pacientes con cáncer bucal y voluntarios sanos por medio del uso de la reacción en cadena de la polimerasa fue realizado por Er-Jia Mao en 1995. Debido a que la citología exfoliativa ha sido utilizada exitosamente para identificar displasia o cambios malignos en las lesiones anogenitales, pero algunos patólogos bucales aun dudan de su valor para diagnosticar malignidades bucales. Especímenes de 26 pacientes con cáncer bucal fueron analizados. Ninguno de estos pacientes había sido tratado previamente. Diecisiete hombres y nueve mujeres con edades entre los 44 y 84 años. Además de los especímenes obtenidos de las lesiones cáncerosas de los pacientes, se colectaron especímenes de sitios no afectados como muestras de control internas. Un grupo de control fue seleccionado de voluntarios que fueron similares en edad sexo y sitio de la lesión a cada paciente con cáncer. Todos fueron no fumadores y no tenían lesiones en su mucosa bucal. Cuatro muestras citológicas fueron tomadas de cada paciente sano. Para cada paciente con carcinoma de células escamosas, una muestra fue tomada de la lesión además de las muestras de los mismos sitios de la mucosa a aquellos de los sujetos sanos.

Todas las pruebas de los pacientes con cáncer bucal y de los individuos sanos fueron analizadas para la presencia de VPH 16 por medio de PCR. De las 26 muestras de lesiones de cáncer bucal, ocho (30.8%) fueron positivas, mientras que los

sitios no afectados y los sitios de control sanos fueron positivos en siete (26.9%) y cuatro (15.4%) respectivamente. La comparación de los rangos de infección entre estos tres grupos no difieren significativamente, aunque el rango de infección en las lesiones cancerosas fue mas alto que el de los otros dos grupos. Es de suma importancia determinar la prevalencia de infección VPH en la población normal para establecer un vínculo entre la infección de VPH 16 y las lesiones cancerosas. Estudios previos han reportado la presencia de VPH 16 no solo en neoplasias malignas sino que también en tejidos histológicamente normales.

Este estudio halló un rango de infección de VPH 26 en un 30.8% entre los pacientes con cáncer bucal. Mientras que un 26.9% de los sitios no afectados del mismo grupo de pacientes fueron positivos y el grupo de control de individuos sanos con un 15.4%. Por lo que concluyeron que si el VPH 16 esta involucrado en la carcinogénesis bucal, el virus solo; puede no tener un papel significativo en la causa del cáncer bucal²⁴.

Un estudio para determinar si existe una asociación entre la leucoplasia verrucosa proliferativa y el virus de papiloma humano 16 fue realizado por Palefsky JM, Silverman S. *et al.*, en el año de 1995, El diagnóstico de la leucoplasia verrucosa proliferativa LVP es esencialmente clínico ya que las características histopatológicas no son disitinguibles de cualquier lesión no asociada con LVP del mismo tipo: una asociación entre la LVP y VPH se sospecha, en base a las características histopatológicas verrucosas vistas en muchas de las lesiones asociadas a LVP como comparación estudiaron especímenes de cáncer bucal de células escamosas (CBCE) y displasia epitelial bucal de pacientes que no concordaban con el criterio de LVP, así como lesiones que se consideran con poco o nulo potencial de malignización como la queratosis focal y la hiperplasias fibrosas. Los especímenes incluían 26 CBCE, 13 displasias epiteliales, 8 queratosis focales, 13 hiperplasias fibrosas y 4 papilomas escamosos. Nueve especímenes de 7 pacientes que concordaban con los criterios de

LVP fueron estudiados. Fueron utilizados “primers” para identificar los tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 y 45 de VPH.

Ocho de los nueve tejidos de LVP estudiados (89%) fueron positivos para algún tipo de VPH, y de estos 7 (77%) fueron positivos para el VPH 16. Dos cánceres de pacientes diagnosticados con LVP fueron obtenidos, ambos fueron positivos, uno para el VPH 16 y otro fue clasificado como un VPH desconocido (por no corresponder a ninguno de los tipos que correspondieran a los que pudieran ser identificados por medio de estos “primers”). De dos pacientes con LVP, biopsias tomadas en diferentes años fueron estudiadas. En un paciente fue diagnosticada una displasia epitelial media a los 74 años, y posteriormente a los 79 años fue diagnosticado un CBCE. Mientras que la displasia fue positiva para el VPH 16, el tejido canceroso fue positivo para un tipo desconocido de VPH. En otro paciente una displasia media fue diagnosticada a los 78 años, y un CBCE fue diagnóstico posteriormente a los 88 años, ambos tejidos fueron positivos para VPH 16.

Solo ocho de los 24 casos de CBCE no asociados con LVP (33%) y cuatro de las displasias bucales no asociadas con LVP (50%) fueron positivas para VPH. El VPH 16 fue el detectado más comúnmente entre estos tejidos, constituyendo un 50% de los VPH detectados en los tejidos cancerosos y un 100% de los tipos de VPH detectado en los tejidos displásicos. Muchos de los especímenes que generalmente se cree no son premalignos contenían altos rangos de infección de VPH, incluyendo 3 de 13 hiperplasias fibrosas (23%), 6 de 8 queratosis focales (75%) y 3 de 4 papilomas (75%). De cualquier modo, solo 3 de estos especímenes contenían VPH 16.

A excepción de una de las lesiones asociadas a las características de LVP arrojaron resultados positivos a algún tipo de VPH, y la mayoría de estos fueron positivos para el VPH 16. Los resultados de este estudio confirman la presencia de

VPH 16 en lesiones CBCE no asociadas a LVP, así como a una alta proporción de displasias bucales como podría esperarse si estas lesiones fueran premalignas. De cualquier manera, 40% de los CBCE positivos para VPH contenían un tipo no identificado, indicando que posiblemente algún otro tipo no genital también puede ser importante. Ya que el VPH fue detectado en una gran proporción de las lesiones que se piensa no son precursoras cancerosas, la mayoría de los tipos de VPH no fueron aquellos asociados con un riesgo alto de progresión a malignidad.

Mencionan que la infección de VPH 16 sola no es suficiente para el desarrollo de CBCE. Muchos estudios han mostrado que la infección por VPH 16 puede ser detectable en células epiteliales bucales de individuos sin enfermedad, incluyendo una alta proporción de niños. El mecanismo por el cual la infección por VPH contribuye al desarrollo de CBCE aún no es conocido pero recientemente ha sido demostrado que el VPH puede jugar un papel importante en la acumulación de mutaciones cromosómicas. Interesantemente el factor de riesgo epidemiológico para e CBCE, el uso de tabaco, tiene capacidad mutagénica y puede potencializar el desarrollo de CBCE solo o en conjunto con VPH contribuyendo a la inestabilidad cromosómica. En base a estos datos realizaron la hipótesis de que la infección por VPH 16 puede jugar un papel en el desarrollo de CBCE por inestabilidad cromosómica y puede cooperar con otros agentes mutágenos. En este estudio la prevalencia de VPH 16 en los tejidos displásicos fue mayor a la observada en CBCE, pero la mayoría fue en pacientes diagnosticados con LVP. Cuando las displasias no asociadas a LVP fueron analizadas separadamente la prevalencia de infección por VPH 16 fue de 50%, mayor a la reportada previamente por hibridación *in situ*. La mayoría de los casos de CBCE no fueron asociados con VPH, pero los que tuvieron resultados positivos en su mayoría fueron asociados con el VPH 16. Semejantemente, no todas las displasias bucales fueron positivas, pero aquellas que lo fueron, el tipo principal encontrado fue el VPH 16³³.

En el año de 1995 un estudio para la detección de secuencias de ADN del virus de papiloma humano en papilomas bucales de células escamosas por la reacción en cadena de la polimerasa fue realizado por Kathleen A., Ward MD., Seamus S., *et al.* Por medio de la utilización del PCR con los “primers” L1 que pueden detectar ADN de VPH de muchos genotipos de VPH los cuales incluyen VPH 6, 11, 16, y 18. Diecinueve casos de papiloma bucal de células escamosas, diagnosticado clínica e histológicamente fueron analizados. El ADN fue extraído de especímenes fijados en formalina y embebidos en parafina.

Los diecinueve casos de papilomas de células escamosas de 19 pacientes fueron analizados. Un total de 13 de los 19 casos (68%) fueron positivos para los tipos de VPH 6, 11 o ambos. Debido a que para la detección por medio de hibridización *in situ* se necesita aproximadamente de 20 a 50 copias virales por célula es posible que estudios previos en los que se reporta una menor incidencia de VPH en papilomas bucales de células escamosas sea debido a que las secuencias de ADN de VPH se encuentren un nivel muy bajo para la detección por medio de hibridización *in situ*. Aún cuando se encontró VPH en la mayoría de los casos de papilomas bucales de células escamosas por medio de este estudio no es posible confirmar un papel etiológico del VPH. Si el ADN de VPH detectado en los papilomas de células escamosas simplemente representa que este se encuentre en la mucosa bucal uno debería esperar una mezcla más heterogénea en los tipos de VPH predominantemente el VPH 16 en estas lesiones bucales más que la demostración de los tipos de VPH 6 u 11. Con respecto al 32% de los resultados negativos es posible que los papilomas bucales de células escamosas pudieran contener otro genotipo de VPH diferente y que por lo tanto no fue identificado por la sondas o por que las copias de ADN viral podrían estar presentes en un bajo número y pudieron no ser detectadas por la eficacia reducida del PCR. Los autores y reportes previos refieren una eficacia reducida del PCR cuando es aplicada a muestras de ADN extraídas de tejidos embebidos en parafina, esto podría ser resultado de la degradación del ADN

durante el proceso de fijación y de la inhibición de las enzimas por impurezas en la preparación de la extracción del ADN.

Mencionan que los papilomas bucales de células escamosas negativos en este estudio pueden ser realmente negativos. Explican esta situación señalando que el virus pudo haber estado presente inicialmente en el papiloma y después perderse con el tiempo; o estos papilomas pueden representar una subdivisión de papilomas de células escamosas sin asociación a las secuencias de ADN de VPH. También ha sido sugerido por otros autores que solo la minoría de los papilomas bucales de células escamosas contienen secuencias de ADN de VPH cuando estas lesiones son estrictamente diferenciadas de condiloma acuminatum por medios clínicos e histológicos. Sus resultados elevan la probabilidad de que estas lesiones en su mayoría tengan una causa viral³⁴

En el mismo año Padayachee A. Sanders CM y Maitland NJ. realizaron una investigación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa de verrugas bucales las cuales contuvieran VPH tipos 2 y 57 por hibridización *in situ*. Diecinueve casos fijados en formalina y embebidos en parafina diagnosticados como verrugas bucales fueron analizados por medio de PCR. Quince de las 19 muestras fueron juzgados como positivos por VPH 2/57 por hibridización *in situ*. De las quince muestras previamente positivas para VPH 2/57 por medio de hibridización *in situ*, todos fueron negativos para VPH 2a donde una verruga de la piel de control fue fuertemente positiva con los “primers” específicos VPH 2a. De cualquier modo, ocho especímenes (42%) demostraron la presencia de VPH 2/57 o un subtipo nuevo muy relacionados. De estos, un caso previamente demostró solo VPH 2 por hibridización *in situ*, un caso fue negativo para ambos VPH 2 y 57 y los seis casos remanentes mostraron fuertes señales para ambos VPH 2 y 57.

Los resultados indicaron que existe una homología cercana entre los tipos VPH 2 y 57 o un tipo VPH aun no identificado. Todas las 19 muestras (100%) dieron resultados negativos para VPH 2a por medio de PCR. Solo un caso que demostró contener solo VPH 2 por hibridización *in situ* demostró el VPH tipo2/57c por PCR.

De los once casos negativos por PCR, seis mostraron previamente la presencia de ambos tipos de VPH 2 y 57, y en solo un caso VPH 2, por hibridización *in situ*. Ya que la sensibilidad de la hibridización *in situ* es menor que la del PCR para las muestras embebidas en parafina, los resultados negativos a PCR en este estudio no puede ser debido al tipo de ADN de VPH, a menos de que este no se haya extraído por el método utilizado. Se ha demostrado que el VPH 2a esta asociado con lesiones mucosas en raras ocasiones, pero ha sido identificado en solo unos pocos estudios en la cavidad bucal, mientras que en su estudio ellos sugieren que el VPH 57 se encuentra en mayor relación que el VPH 2a en la verruga bucal³⁵

3.1 VIRUS DE EPSTEIN-BARR (VEB)

Este es un herpesvirus aislado por primera vez del linfoma de Burkitt^{23, 36, 37} ha sido asociado con el granuloma letal de línea media³⁶ con el carcinoma nasofaríngeo^{36, 37} es causa de la mononucleosis infecciosa^{23, 37} y ha sido aislado en la mononucleosis infecciosa aguda^{23, 36, 38}. Algunos otros autores han sugerido su presencia en la leucoplasia pilosa^{36, 37, 39, 40} así como en el síndrome de Sjögren³⁷. Posterior a la infección primaria el VEB permanece latente en las células epiteliales de la glándula salival normal lo que pudiera ser su ruta principal de transmisión^{36, 38} o en las células epiteliales de los estratos superficiales del epitelio lingual³⁶ y periódicamente se reactiva, esta reactivación es elevada en pacientes con enfermedades linfoproliferativas y con pacientes inmunodeprimidos, ya sea por alguna enfermedad como el VIH, por medicación o por recibir algún trasplante^{36, 37}.

38. También se ha sospechado que pudiera ser un agente etiológico en la enfermedad de Hodgkin y carcinoma de timo³⁷.

Un estudio para la prevalencia del virus de Epstein Barr y el virus del papiloma humano en mucosa bucal de pacientes infectados por VIH fue realizado por Alder Storhz K, Ficara G, Woods KV, *et al.* en 1992. Ya que el virus de Epstein Barr ha sido implicado en el génesis de la leucoplasia pilosa bucal, y que resultados de otros estudios han demostrados la presencia de antígenos de VPH en la leucoplasia pilosa bucal por medio de hibridización.

Los tejidos de leucoplasia pilosa bucal fueron obtenidos de 47 paciente, 39 hombres, y 8 mujeres, con anticuerpos contra el VIH-1, todas las lesiones se localizaban en la región ventrolateral de la lengua. Fueron obtenidas biopsias de 10 de los pacientes de mucosa bucal normal. Todos los especímenes fueron fijados en formalina, embebidos en parafina y procesados para diagnóstico histopatológico, todos los especímenes mostraron características histopatológicas de leucoplasia pilosa. Los “primers” utilizados hibridizaban cuando menos con 28 tipos de VPH, incluyendo los tipos 6, 11, 16, y 18 generalmente mucosos.

ADN de VEB fue detectado por hibridización *in situ* en todos los 47 casos (100%) de leucoplasia pilosa. Fueron probados también 10 especímenes de mucosa bucal normal y 1 (10%) contenía ADN de VEB. Tinciones positivas por antígenos estructurales comunes para la presencia de VPH fue observada en 25 (71%) de los 35 especímenes de luoplasia pilosa. Utilizando PCR con una subsecuente hibridización dot blot 10 (56%) de los 18 especímenes de leucoplasia bucal mostraron contener ADN de VPH. En seis de los 10 pacientes donde la mucosa bucal normal y la leucoplasia bucal fueron probadas, el ADN de VPH también fue detectado en la mucosa bucal normal. En uno de los seis pacientes VPH fue detectado en la mucosa

normal pero no en el espécimen de leucoplasia bucal, seis de los productos hibridizaron para VPH 16 y solo uno para VPH 16 y 18 por medio de las sondas, por lo que todos los resultados positivos hibridizaron con la sonda 16. De los 18 especímenes utilizados para PCR 11 (61%) se tiñeron positivamente para el antígeno del papiloma virus, de estos 11 solo tres fueron positivos para algún ADN de VPH. Dos especímenes de leucoplasia pilosa fueron positivos para ADN de VPH y negativos al antígeno de papiloma virus. Por lo que pensaron que el tipo de VPH es diferente a los tipos comunes de VPH comúnmente encontrados.

Siete de los 18 especímenes de leucoplasia pilosa estudiados por medio de PCR fueron positivos a ADN de VPH y negativos al antígeno de VPH, ya que la detección de antígenos estructurales de VPH solo se correlaciona con una infección viral vegetativa, es posible que el VPH en los antígenos negativos, y el ADN de VPH positivo en los tejidos se encontrara en estado latente. Aún cuando ADN de VPH fue encontrado en 10 de los 18 tejidos de leucoplasia su relevancia en la etiología de esta enfermedad es dudosa por el hecho de que dicho ADN de VPH también fue encontrado en seis de los diez tejidos de la mucosa bucal normal de los mismos pacientes. Posiblemente la presencia de VPH en los individuos infectados por VIH puede ser un reflejo de su estado inmunológico³⁸.

Un estudio para detectar el virus de Epstein Barr y el virus de herpes humano (VHH) tipo 6 en saliva de pacientes con enfermedades linfoproliferativas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa fue realizado en 1991 por Saito I, NHI Simura S, *et al.* con el objetivo de conocer el papel de dichos virus en la patogénesis de las enfermedades linfoproliferativas. Virtualmente todos los adultos portan los virus de Epstein Barr y el virus de herpes humano tipo 6 en bajos niveles y sólo niveles altos son asociados con alguna enfermedad. Otros métodos menos sensibles como la hibridización pueden ser utilizados para detectar virus en saliva, pero la

cantidad presente de dichos virus es probablemente menor a los límites de detección de dichas técnicas.

Ellos estiman que la saliva normal contiene menos de 10 copias de VEB y VHH-6 por 100µl equivalentes, mientras que en el síndrome de Sjögren y en la mononucleosis infecciosa se contienen 20 o mas copias equivalentes. Sus descubrimientos apoyan la hipótesis de que estas enfermedades virales pueden jugar un papel en la transición de una linfoproliferación autoinmune que involucre las glándulas salivales a una neoplasia franca. La presencia de ADN de VEB en pacientes con linfomas, inmunodeprimidos, con deficiencias inmunes congénitas, que recibieron algún trasplante y pacientes con SIDA es una propiedad compartida. Encontraron que el VHH-6 en los pacientes con enfermedades linfoproliferativas sugieren que este agente puede tener un espectro de enfermedad similar al VEB, es evidente que ambos el VEB y el VHH-6 son liberados activamente en la saliva como células libres, fuentes posibles del VHH-6 pueden ser células epiteliales de la orofaringe, así como de las glándulas salivales. Existe también la posibilidad de que el VEB pueda transactivar el VHH-6 al sitio de latencia, produciendo un exceso de copias del virus en saliva. El VHH-6 puede ser un de los cofactores que agravan los desordenes linfoproliferativos, ya que este virus también ha sido observado en el SIDA. Por lo que la detección de estos virus puede servir como predictores de la activación de la enfermedad³⁹.

Una demostración de la presencia del VEB para un diagnostico adecuado de leucoplasia pilosa bucal y una posible asociación con VPH 16 por medio de hibridización *in situ* y PCR fue realizada en 1993 por Felix DH, Jalal H, *et al.* Obtuvieron biopsias de 18 pacientes VIH seropositivos del borde lateral de la lengua con evidencia de leucoplasia pilosa. ADN de VEB fue detectado en 15 de los 18 casos por medio de hibridización *in situ*. Doce muestras dieron resultados positivos por medio de PCR, por ninguno de los dos métodos se detectó VEB en tres casos. Así

mismo los doce casos positivos para PCR fueron positivos para la hibridización *in situ*, mientras que en los especímenes de control no fue detectado ADN de VEB por ninguna de las dos técnicas. Con respecto al VPH 16 no fue detectado en ninguno de las muestras de leucoplasia pilosa así como en las de control, pudiendo ser otro tipo de VPH el que se encontrase asociado.

La detección de VEB por medio de PCR en los especímenes de biopsia puede indicar infección del tejido bucal examinado, aunque no debe descartarse la posibilidad de que sea un reflejo superficial por VEB de la saliva, aunque los resultados por hibridización *in situ* confirmen que el VEB se encontraba en replicación en los estratos espinosos superiores y puede no representar una contaminación superficial. El hecho de no detectar VPH 16 por ninguno de los dos métodos sugiere que este genotipo en particular no esta regularmente involucrado en la patogénesis de la leucoplasia pilosa (LP), puede ser debido a que la diferenciación epitelial maraca que se observa en la leucoplasia pilosa puede no proveer un ambiente adecuado para la replicación del VPH 16; sin descartar la posibilidad de que algún genotipo diferente se pueda encontrar en dichas lesiones⁴⁰.

Mabruk MJEMF, Flint SR, Toner M, *et al.* en 1994 realizaron una investigación de diagnóstico definitivo para la leucoplasia pilosa analizando biopsias y citologías exfoliativas por medio de hibridización *in situ* y la reacción en cadena de la polimerasa. Muestras de la lengua fueron obtenidas del borde lateral de la lengua para el análisis por PCR de 22 voluntarios sanos, 10 de los cuales también dieron muestras de saliva, muestras similares fueron obtenidas de 11 VIH seropositivos voluntarios, de los cuales 10 fueron diagnosticados clínicamente como leucoplasia pilosa antes de la biopsia. Las biopsias fueron fijadas en formalina y embebidas en parafina y las muestras fueron cortadas en secciones para utilizarlas en hibridización *in situ*, para tinción por hematoxilina y eosina y para el PCR.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Por medio de PCR se detecto ADN de VEB en 8 de los 22 (36.3%) de las muestras obtenidas de los voluntarios. Mientras que no hubo evidencia de ADN de VEB por PCR en las secciones embebidas en parafina de los bordes laterales de la lengua obtenidas de los 10 controles sin leucoplasia. VEB fue detectado en todos los tejidos lesionales de leucoplasia pilosa y todos los raspados de la lengua de los pacientes con leucoplasia. Los resultados positivos en los 8 de los 22 sujetos normales de control, puede deberse a que es el sitio normal de persistencia del virus o que el virus se liberó al momento del muestreo. La incapacidad de detectar VEB en el componente fluido puede indicar una verdadera ausencia de virus libres, o puede ser debido a la presencia de inhibidores del PCR₃₆.

Para valorar la presencia del VEB en la mucosa bucal normal así como su relación con la edad, sexo, y diferentes sitios en la cavidad bucal Mao E-J y Smith CJ, investigaron adultos sanos y pacientes con carcinoma de células escamosas por medio de PCR. Para lo cual fueron seleccionados sesenta voluntarios sanos, 30 hombres y 30 mujeres y fueron divididos en tres grupos de edades; 20-39, 40-59, y mas de 60 años. Se tomaron cuatro muestras citológicas de cada uno de los voluntarios. Veinte pacientes con carcinoma bucal de células escamosas fueron incluidos en el estudio, de estos, cuatro mujeres y 16 hombres con una edad promedio de 65.7 años siendo 14 (70%) mayores de 60 años. Se obtuvo de cada uno de ellos además de la muestra de la lesión, muestras de los mismos sitios que nos sujetos normales. Todos estos pacientes no habían sido tratados contra el cáncer previamente.

Después de la amplificación por PCR se encontrón en 15 de los 60 individuos sanos (25%); de los cuales 7 fueron hombres y 8 mujeres. De estos, 7 (11.7%) se encontró que contenían VEB en su mucosa bucal, 7 en su mucosa alveolar y 7 en la mucosa lateral de la lengua, algunos de los individuos tenían más de un sitio infectado, cinco individuos contenían VEB en la mucosa del piso de boca. Se identifico el VEB en 5 individuos de 20-39 años, en dos ocasiones en el grupo de 40-

59 años y en 8 individuos del grupo de mas de 60 años. La reactividad de los pacientes con cáncer bucal fue del 50% es decir en 10 de 20 casos, de estos 10 casos el VEB fue identificado solo en los sitios no afectados, en los otros 7 pacientes ADN de VEB se encontró en la lesión y cuando menos en dos de los sitios no afectados.

Lo que muestra que el grupo de mayor edad (60 años o mas) tuvo los mayores rangos de infección por VEB comparado con los otros dos grupos. La comparación entre los sitios no mostró una diferencia significativa siendo el sitio menos afectado fue el piso de boca. Una diferencia significativa tampoco fue encontrada entre hombres (23.3%) y mujeres (26.7%). En el grupo con cáncer bucal 10 pacientes (50%) arrojaron resultados positivos de los cuales 3 pacientes solo dieron resultados positivos en sitios no afectados. Los otros 7 pacientes (35%), hubo cuando menos dos sitios no afectados con infección por VEB además del sitio de la lesión. La comparación entre los diferentes sitios de infección por VEB mostró que el borde lateral de la lengua tiene le mas alto promedio de infección (45%). Los rangos de infección de este pequeño número de pacientes con cáncer bucal no provee una evidencia que sugiera que el VEB puede estar asociado con el génesis del carcinoma bucal de células escamosas³⁷.

3.2 OTROS

En 1997 Ghodratnama F, Riggio MP; Wray D. Llevaron a cabo una investigación con el fin de buscar herpes virus humano tipo 6, citomegalovirus humano y el virus de varicela zoster en tejidos con estomatitis aftosa reccurrente (EAR) con el objetivo de investigar la etiología de esta enfermedad utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. Biopsias de 21 pacientes con lesiones menores de EAR fueron obtenidas, 20 biopsias de liquen plano bucal y 13 muestras de mucosa bucal normal fueron obtenidas como controles.

En ese estudio ADN de VHH-6 estuvo presente en seis muestras de pacientes con EAR lo que no es significativamente mayor estadísticamente que en las muestras normales y en cuatro muestras de pacientes con LPB. El HMCV se detectó en dos LPB y un muestra fue positiva para ambos VHH-6 y CMVH. De cualquier modo, VVZ no fue detectado en ninguna muestra. Ninguna de las muestras normales fueron positivas para ninguno de los tipos de virus analizados.

Por medio de PCR se detectó CMVH en tres de nueve (33%) biopsias de EAR, utilizando hibridización *in situ* CMVH se encontró en 3 de 29 (10%) de las úlceras mucosas bucales pero en ninguna de las biopsias de EAR. El CMVH estuvo presente en dos LPB, lo que sugiere que puede ser encontrado una pequeña proporción de las úlceras, y por lo tanto no puede ser eliminado totalmente como un agente etiológico den algunos casos de EAR. A su vez se detectó VHH-6 en 6 de 21 (29%) de las biopsias de EAR, existe cierta controversia acerca de su presencia en la saliva de personas sanas, por lo que sugirieron que el HMCV y VVZ no son agentes etiológicos de EAR y esta puede ser una característica de reactivación de VHH-6₄₁.

IV. DISCUSIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa que se da como un avance en las ciencias básicas por su aplicación en la tecnología molecular para la práctica de la patología. Esta es una amplificación enzimática *in vitro* este es un proceso químico más que biológico, este ha demostrado ser una buena opción en diferentes áreas de la medicina y la odontología como herramienta de diagnóstico.

El PCR ha demostrado ser mas sensible que la mayoría de los métodos diagnósticos ya que esta puede detectar una secuencia de ADN en 100,000 células, mientras que otras técnicas como las pruebas Southern generalmente necesitan de 5 – 10 microgramos (10^{-6} gramos) de ADN genómico para la detección. Esta cantidad de ADN esta presenten en cerca de 10^6 células nucleadas, por lo que la prueba mas sensible puede revelar una secuencia anormal sólo cuando esta presente en 2 – 5% de las células en la mezcla heterogénea estudiada. Esta sensibilidad le da tanto ventajas como desventajas en comparación con otras técnicas. Esta puede ser considerada una desventaja, debido a que es muy fácil que se de alguna contaminación dentro de la reacción por material contaminado que se utilice en el laboratorio o mezcla de muestras, lo que puede arrojar resultados positivos falsos o falsos negativos.

Para poder utilizar del PCR es necesario conocer la secuencia de bases del ADN viral o parte de esta, para que puedan ser sintetizados los “primers” o adquiridos comercialmente para la entidad patológica que se desea detectar.

Debido a que ésta es una técnica relativamente nueva sus posibles aplicaciones no han sido completamente desarrollados. Dentro de la medicina ha sido utilizada con aceptación para la detección de HIV y de hepatitis C que son

condiciones patológicas de difícil detección debido a la baja cantidad de copias virales que se presentan al comienzo de la enfermedad, ya que cuando estas son detectables por otras técnicas estas enfermedades se encuentran muy avanzadas.

Dentro de la odontología ha sido utilizada en la periodoncia y la patología bucal principalmente. Aun cuando los resultados de la gran mayoría de los estudios son contrastantes, esto puede deberse a que la mayoría de estos estudios han sido realizados para la detección de el VPH del cual existen 70 tipos diferentes por lo cual es difícil detectar la presencia de alguno en la entidad patológica a estudiar, aun cuando muchos tipos de HPV han sido relacionados con ciertas condiciones patológicas así como con malignizaciones de algunas otras.

Otro factor que puede afectar los resultados es que muchos de estos estudios han sido realizados en muestras fijadas en formalina y embebidas en parafina, ya sean recientes o material antiguo. Caso en el cual se debe de tener mucha precaución para evitar la pérdida del ADN amplificable o que se de alguna posible contaminación por el manejo de tanto material de laboratorio para la extracción del ADN.

Finalmente en el caso de la citología exfoliativa y de los raspados, así como de muestras de saliva, mucho se ha discutido que la reproducción viral se da en las capas basales de los tejidos por lo que difícilmente podría obtenerse ADN amplificable en las células descamadas, o por alguno de estos medios de recolección. Aun cuando es posible que es posible que ciertas cantidades de virus se encuentren normalmente en la cavidad bucal, y no se presente alguna condición patológica. También es cierto que ciertos virus permanecen latentes en algunas partes de la cavidad bucal sin ser necesariamente productivas en todo momento.

Es necesario llegar a desarrollar una técnica adecuada o específica para cada procedimiento o patología, así como se debe de tener un manejo adecuado de las muestras y de los materiales de laboratorio para evitar resultados falsos positivos o falsos negativos.

V. CONCLUSIONES

Este avance tecnológico puede llegar a ser una herramienta muy útil en la detección de ciertas patologías, pero se tiene la desventaja que se debe de saber específicamente la secuencia de ADN viral que se desea encontrar para poder obtener el resultado adecuado, ya que el objetivo es dar un mejor tratamiento a ciertas condiciones patológicas y evitar futuras complicaciones o malignizaciones por el posible papel que juegan ciertas patologías para una posible malignización.

El PCR debe aún ser estudiado y los protocolos adecuados deben de ser obtenidos para la detección de las patologías de la cavidad bucal, ya que estos deben de estar relacionados con directamente con el origen de la muestra a estudiar para evitar obtener resultados erróneos.

Esta técnica que dentro de otras áreas ha llegado a ser empleada con gran éxito en la patología bucal no ha llegado a ser una herramienta cotidiana debido a que la utilización de este método tiene un costo muy elevado en comparación con otros estudios de diagnóstico como podría ser un estudio histopatológico, mas si tomamos en cuenta que básicamente se utiliza en lesiones de origen viral las cuales en el caso de la patología bucal sólo podrían representar un riesgo grave como posibles factores predisponentes a la malignización de otras condiciones patológicas.

Es necesario conocer técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa debido a que aún cuando hoy parecen estar distantes de nuestra cotidianidad en un mañana técnicas como esta pueden marcar la diferencia para obtener un mejor futuro en la patología con el objetivo de entender, tratar y evitar algunas patologías.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Smyth Templeton Nancy. The polymerase chain reaction history, methods and applications. *Diagn Mol Pathol* (1); 58-72,1992
2. 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
3. Bloch Will. A biochemical perspective of the polymerase chain reaction. *Biochemistry*, Vol 30, No II; 2735-2747 March 19, 19
4. Henry A. Erlich. Polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Immunology* Vol 9 No. 6; 437-447, 1989
5. Nash J Madeleine. Ultimate gene machine. *Time*; 54-56 August 12, 1991
6. Erlich A. Henry, Gelfand David, Sninsky J. John. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* Vol 252; 1643-1651 Jun 1991
7. Ficara G. Eversole L.R. Polymerase chain reaction: relevance for bucal pathology. *Minerva Stomatol* 41:425-429; 1992
8. Innis A. Michael, Gelfand H. David. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press E.U. 3-20, 153-158; 1990

9. Rodu B. New approaches to the diagnosis of bucal soft-tissue disease of viral origin. *Adv Dent Res* 7(2); 207-212; Aug 1993
10. Carman WF. The polymerase chain reaction. *Quarterly Journal of Medicine New Series*, 78 No. 287; 195-203, March 1991
11. Innis A. Michael, Gelfand H. David, Sninsky J. John. *PCR Strategies*. Academic Press E.U. pp. 32-37; 1995
12. Lehninger Albert L. Nelson David L. Cox Michael M. *Principios de Bioquímica Ediciones Omega 2da. Edición. España 1993*
13. Rawn D. *Bioquímica. Editorial Interamericana, Vol. II, España 1989*
14. David Freifelder. *Essentials of Molecular Biology*. Ed. Jones and Bartlett Publishers, San Diego 1993
15. Frederick M. Ausbel. *Short Protocols in Molecular Biology*. Ed. Currents Protocols, E.U. 1992
16. Brown T.A. *Essential Molecular Biology*. Ed The Practical Approach series, New York 1991

17. Mariana García. Hibridización de los ácidos nucleicos: fundamentos y aplicaciones. Bol of Sanit Panam 109 (3); 244-257; 1990
18. Martin W. John. Molecular Diagnostics in Pathology. Chapter 2 Polymerase Chain Reaction: A tool for the modern pathologist. U. S. 1990
19. White Bruce A. PCR Protocols Current methods and applications. Human press Totowa New Jersey 1993
20. J. Sanbrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. 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
21. JR. Howe, 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
22. Darryl K. Shibata, Norman Arnheim, John Martin Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. Vol 167; 225-230, January 1988
23. Scully Crispian, Samaranyake Lakshman. Clinical Virology in oral and dentistry. Cambridge University Press. New York 1992

24. . Er-Ji Mao. Prevalence of human papillomavirus 16 and nucleolar organizer region counts in oral exfoliated cells from normal and malignant epithelia Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1995;80:320-329
25. Chang F, Syrjäen S, Kellokoski J, Syrjäen K. Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with oral disease. J Oral Pathol Med 1991; 20:305-317
26. Sapp Philip J., Eversole Lewir R., Vyssocki George P. Contemporary oral and maxillofacial pathology. Ed. Mosby U.S. 1997
27. Lawton GM, Thomas SJ, Schonrock J, Monsour FN, Frazer IH. Human papillomaviruses in normal oral mucosa: a comparison of methods for sample collection. J Oral Pathol Med 1992; 21: 265-269
28. Kenneth R. Shroyer, Robert O. Greer. Detection of human papillomavirus DNA by in situ Dna hibridization and polymerase chain reaction in premalignant and malignant oral lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1991;71:708-713
29. Kellokoski JK, Syrjäen SM, Chang F, Yliskoski M. Syrjäen KJ. Southern blot hybridization and PCR in detection of oral human papillomavirus (HPV) infections in women with genital HPV infections. J Oral Pathol Med 1992; 21: 459-464

30. 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
31. Ostwald C, Müller P, Barten M, Rutsatz K, Sonnenburg M. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal mucosa. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 220-225
32. Craig S. Miller, Maria S. Zeuss, Dean K White. Detection of HPV DNA in oral carcinoma using polymerase chain reaction together with in situ hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 77:480-486
33. Palefsky JM, Silverman Jr. S, Abdel-Salaam M, Daniels TE, Greenspan JS. Association between proliferative verrucous leukoplakia and infection with human papillomavirus type 16. *J Oral Pathol Med* 1995; 24:193-197
34. Kathleen A. Ward, Seamus S. Napier, Paul C. Winter, Raymond D. Maw, Wallace W Dinsmore. 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; 80:63-66
35. Padayachee A, Sanders CM, Maitland NJ. A polymerase chain reaction (PCR) investigation of oral verrucae which contain HPV types 2 and 57 by in situ hybridization. *J Oral Pathol Med* 1995; 24: 329-334

36. 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
37. 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: 12-17
38. 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
39. Alder-Storthz K, Ficarra G, Woods KV, Gaglioti D, KiPietro M, Shillitoe EJ. Prevalence of Epstein-Barr virus and human papillomavirus in oral mucosa of HIV-infected patints. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 164-170
40. Felix DH, Jalal H Cubie HA, Southam JC, Wray D, Maitland NJ. Detection of Epstein-Barr virus and human papillomavirus type 16 DNA in hairy leukoplakia by in situ hibridization and the polymerase chain reaction. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 277-281
41. Godratnama F, Riggio MP, Wray D. Search for human herpes virus 6, human cytomegalovirus and varicella zoster virus DNA in recurrent aphthous stomatitis tissue. *J Oral Pathol Med* 1997; 26: 192-197