

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA INVESTIGACIÓN EN ODONTOLOGÍA Y BIOLOGÍA ORAL (1ª PARTE)

MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES FOR RESEARCH IN DENTISTRY AND ORAL BIOLOGY (1ST PART)

Yarzabal Rodríguez Luis.^{1*} Buela Salazar Lenys.² Djabayan Djibeyan Pablo.³

¹ Docente de la Carrera de Odontología de la Universidad Católica de Cuenca.Ecuador.

² Docente de la Carrera de Biofarmacia de la Universidad Católica de Cuenca.Ecuador.

³ Docente de la Escuela de Medicina de la Universidad Nacional del Chimborazo.Ecuador.

*lyarzabalr@ucacue.edu.ec

Resumen

La Biología Molecular es una rama de la Biología que indaga sobre las bases moleculares de la actividad biológica, a través del estudio de la estructura de dos importantes biomoléculas –proteínas y ácidos nucleicos- y de las interacciones que se establecen entre ellas. A lo largo de la última década, el desarrollo de diferentes técnicas moleculares y su aplicación en el campo odontológico ha permitido realizar significativos aportes al cúmulo de evidencias experimentales que en la actualidad respaldan el principio de odontología basada en la evidencia. Pese a su enorme importancia, muchas de estas técnicas no son del conocimiento de los odontólogos, en general, o se conocen muy poco. Este desconocimiento se explica, en parte, por la dificultad de acceso a información que presente en forma breve y clara los fundamentos de estas técnicas y sus posibles aplicaciones en esta disciplina. En esta serie de artículos abordaremos estos temas, con la intención de permitir un primer contacto a nuestros colegas y estudiantes con las técnicas de biología molecular que pueden ser incorporadas a los estudios experimentales en el campo de la biología oral.

Palabras clave: Biología molecular, ADN, ARN, biología oral, diagnóstico.

Abstract

Molecular biology is the branch of biology which deals with the molecular bases of the biological activity, through the study of two of the most important biomolecules –proteins and nucleic acids- and the interactions established between them. During the last ten years, the development and application of different molecular biology techniques in the fields of oral biology and dentistry permitted to contribute substantial amounts of information and knowledge to both fields, and to strengthen the approach known as evidence based dentistry. In spite of their importance, many of these techniques remain still barely known, or even unknown, to many odontologists. This is due, in part, to the difficulty in accessing to the proper information, presented in a clear and understandable way, of the basic concepts behind these techniques and their potential applications. In this series of papers, we will address these subjects with the aim of permitting our students and colleagues a first contact with some of the most frequently used molecular techniques in the field of oral biology.

Key words: Molecular biology, DNA, RNA, oral biology, diagnosis .

1 INTRODUCCIÓN

La práctica odontológica ha sido objeto de un cambio sustantivo en los últimos años. Los odontólogos disponen en la actualidad de abundantes recursos bibliográficos y de fuentes de información –fácilmente accesibles y gratuitas, o de muy bajo costo-, que les permiten estar al día con los avances más recientes relacionados con el desarrollo de nuevos materiales, terapias innovadoras y recomendaciones clínicas.

En todos estos campos, el practicante dispone –además- de numerosos estudios de muy buena calidad, que fundamentan sus conclusiones y recomendaciones en la evidencia experimental. La mayoría de estos trabajos son publicados en revistas periódicas (*journals*), cuyo prestigio se eleva en la misma medida en que el rigor con el que se evalúan los resultados sometidos a publicación se hace cada vez mayor. De forma tal que la práctica clínica en odontología tiene hoy

un poderoso aliado en la evidencia experimental disponible, publicada y avalada por la comunidad académica y científica a nivel global.

El concepto de medicina basada en la evidencia data del siglo XIX y se refiere al uso consciente, explícito y prudente de la mejor evidencia experimental disponible con el fin de orientar las decisiones terapéuticas en el manejo de los pacientes.¹ Un principio similar, odontología basada en la evidencia, ha sido introducido en el campo odontológico a nivel mundial; la adopción de tal principio por prestigiosas organizaciones como la American Dental Association (ADA) o la American Academy of Pediatric Dentistry respaldan la validez de tal decisión. Este concepto ha sido definido como una aproximación al cuidado de la salud bucal que requiere de la integración prudente de evaluaciones sistemáticas de evidencia científica clínicamente relevante, y que toma en cuenta las necesidades y preferencias del paciente, así como la experiencia clínica del odontólogo.²

Entre las disciplinas científicas que han hecho aportes sustanciales al cúmulo de evidencias experimentales con el que hoy en día cuenta la odontología, destaca la biología molecular. Se trata de una ciencia que se concentra en el estudio de las bases moleculares de la actividad biológica, así como de las interacciones que ocurren entre dos de las biomoléculas más importantes: los ácidos nucleicos y las proteínas. La biología molecular no solo se concentra en dilucidar los aspectos estructurales de las mencionadas macromoléculas sino, sobre todo, en determinar sus funciones biológicas. Para lograrlo, la biología molecular emplea técnicas de estudio - muchas de ellas provenientes de la bioquímica, la biología celular y la genética-, que han dado origen a una gran variedad de estrategias experimentales capaces de ofrecer respuestas a problemas científicos claramente definidos. Recientemente, la biología molecular ha recibido el influjo de la ciencia de la computación y de esta interacción han surgido la bioinformática y la biología computacional, campos interdisciplinarios que analizan e interpretan datos biológicos, gigantescos paquetes de datos, particularmente relacionados con las secuencias de proteínas y ácidos nucleicos. No obstante, para el odontólogo practicante o el investigador en ciernes puede resultar extremadamente laborioso y complejo -cuando no sumamente tedioso- extraer la información relevante contenida en revisiones sistemáticas que, pese a haber sido elaboradas con el mayor cuidado y seriedad, representan un reto en términos de tiempo de lectura y análisis. Es por ello que se torna cada vez más necesario organizar toda esta información y presentarla bajo la forma de recomendaciones, actualizaciones, guías clínicas e incluso resúmenes críticos que sean útiles para la gran mayoría.³

La presente serie de artículos tiene como objetivo fundamental, orientar al profesional de la odontología o a los estudiantes en proceso de formación, en el fascinante mundo de la biología molecular y su estrecha interacción con la ciencia odontológica. A través de los mismos Odontología

Activa aspira a i) facilitar a sus lectores la lectura y análisis de la evidencia disponible, y ii) actualizarlos en relación con los conceptos y las técnicas más relevantes implementadas en el campo de la biología molecular.

2 ESTADO DEL ARTE

2.1 Estructura y función del material genético

Como primer paso hacia la comprensión de las técnicas de biología molecular, es absolutamente necesario comentar brevemente sobre la estructura y la función del ácido desoxirribonucleico (ADN). Desde mediados de los años 60' del siglo pasado, sabemos que el ADN es la molécula biológica que contiene -en forma codificada- la información genética de un individuo o de toda una especie. Fue a raíz de la dilucidación de la estructura molecular del ADN en 1953⁴ (y de los trabajos posteriores que demostraron el tipo de "código genético" bajo el cual la información se almacenaba), que se pudo conocer la relación existente entre una secuencia de nucleótidos (ADN o ARN) y una secuencia de aminoácidos (proteínas).^{5,6} La dilucidación de dicho código permitió comprender casi a cabalidad el proceso de flujo de información genética desde el ADN hacia las proteínas (el llamado Dogma Central de la Biología Molecular).⁷

La base fundamental de este código es la secuencia de nucleótidos en la molécula de ADN. Esta secuencia se basa en la distribución, a lo largo de esta larga molécula lineal (denominada químicamente como un polinucleótido), de sus 4 componentes fundamentales: los cuatro nucleótidos que contienen cada una de las cuatro bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y timina) (Figura 1).

Algunas marcas o señales en la molécula de ADN (también codificadas bajo la forma de secuencias nucleotídicas) determinan los sitios de inicio del proceso de replicación (duplicación de la molécula de ADN), del proceso de transcripción (síntesis de una molécula de ARN mensajero a partir de una secuencia de ADN) y, posteriormente, del proceso de traducción o síntesis de proteínas. De igual forma están presentes en la secuencia de ADN las señales que indican el punto final de estos mensajes codificados: es así como se encuentran regiones de fin de la replicación, el fin de la transcripción, o el fin de la traducción. Otro tipo de señales indican los sitios en los que algunos de estos complejos deben establecer una pausa, los sitios en los que se pueden unir otros factores proteicos, e incluso señales que determinan el corte o hidrólisis del ARNm por parte de distintas enzimas ARNasas.

De forma tal que gran parte de la información que contiene el genoma son señales codificadas bajo la forma de secuencias. De hecho, los genes en sí mismos son secuencias delimitadas claramente por estas y otras señales. Hay, sin embargo, muchas otras secuencias en los genomas de los seres vivos que, a pesar de no representar "genes" propiamente dichos, son importantísimos para el correcto funcionamiento del genoma. Algunas de estas secuencias,

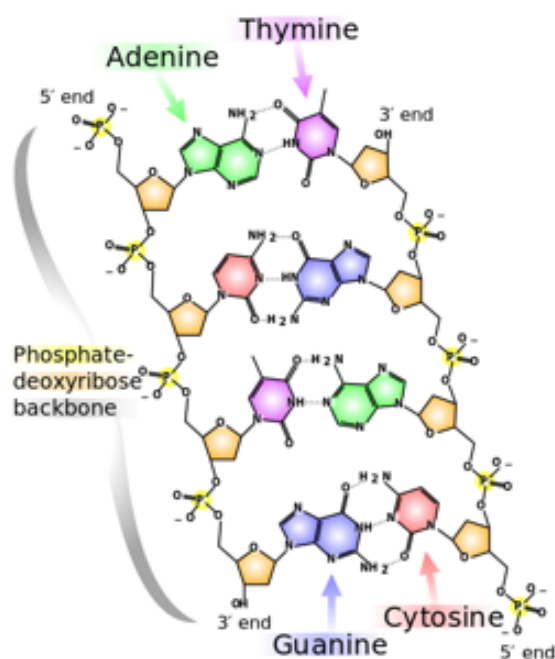


Fig. 1. Estructura química del ADN. Las cuatro bases nitrogenadas se muestran con colores diferentes. En la parte externa de la molécula se observa claramente la presencia del azúcar –desoxirribosa– y el grupo fosfato (©Madeleine Price Ball, reproducida bajo licencia de Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported)

pueden ser muy útiles y convenientes para otros fines; por ejemplo como veremos más adelante, pueden servir para distinguir entre especies muy íntimamente relacionadas, e incluso, entre cepas de una misma especie permitiendo así una correcta identificación de las mismas.

2.2 Aplicación de técnicas de biología molecular en el estudio de la biología oral.

La importancia que han adquirido las técnicas de biología molecular para el estudio de la salud oral queda de manifiesto mediante una simple constatación: en los últimos 10 años, el número de publicaciones que están archivadas en PubMed (el repositorio de información bibliográfica del National Center for Biotechnology Information –NCBI–, mantenido en la U.S. National Library of Medicine –NLM–, con sede en el National Institutes of Health, NIH) y que se obtienen al combinar los términos “oral health” y “molecular biology” ha aumentado de 24, en 2005, a más de 316, en 2016 (Figura 2).

Lo que en principio puede parecer sorprendente, no lo es tanto al profundizar en el análisis de la información. En efecto, como hemos dicho al inicio de este artículo, los avances tecnológicos en el campo de la biología molecular

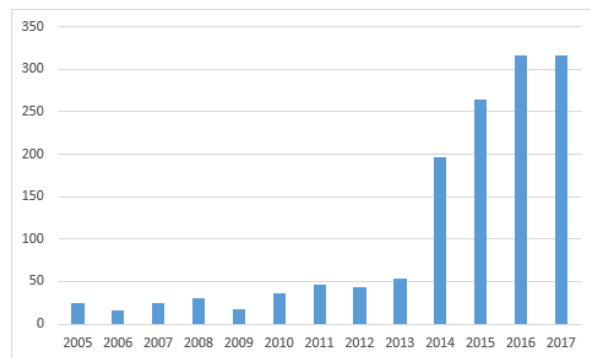


Fig. 2. Evolución del número de publicaciones indexadas en las que se emplearon métodos y técnicas de biología molecular para estudios de salud oral, registradas en el repositorio PubMed (Fuente: datos PubMed; gráfico: elaboración propia).

han permitido desarrollar nuevas técnicas que son, hoy en día, herramientas de uso generalizado en todas las áreas de la biomedicina. La biología oral, una de las tantas ramas de la biomedicina, se ha venido desarrollando como un área que pretende interconectar las ciencias básicas biomédicas con la odontología, ofreciendo explicaciones de los diferentes procesos relacionados con la salud y la manifestación de la enfermedad. En tal sentido, destacan los aportes de esta nueva rama al otorgar bases biológicas a la práctica odontológica. De esta forma se persigue potenciar el conocimiento científico sobre la tecnificación de la odontología, dando un particular énfasis al conocimiento –en su calidad de competencia esencial– como sustento de la decisión terapéutica. Una vez más, el paradigma de “odontología basada en la evidencia” vuelve a ponerse de manifiesto. Veamos a continuación algunas de esas herramientas y su aplicación en diferentes campos de la biología oral y la odontología.

2.2.1 PCR y diagnóstico molecular.

La confirmación de la etiología de una determinada enfermedad requiere a menudo de la correcta identificación del agente patógeno (en el caso de una enfermedad infecciosa), o de la causa genética (con frecuencia una mutación) que origina el mal funcionamiento de los mecanismos fisiológicos normales (en el caso de enfermedades de origen metabólico o hereditario). En el caso de las infecciones causadas por microorganismos patógenos, la estrategia clásica de identificación establece que los mismos deben ser aislados a partir de los tejidos del paciente enfermo, y cultivados en el laboratorio, para posteriormente proceder a su identificación a través del empleo de diversos métodos. Esta estrategia tiene varios inconvenientes: es extremadamente laboriosa; dependiendo del patógeno, puede ser muy costosa; requiere de infraestructura, equipos y reactivos que no siempre están disponibles; el tiempo de obtención de los resultados puede

ser muy largo; y, finalmente, en ocasiones, los resultados pueden prestarse a una interpretación muy subjetiva por parte del operador.

Frente a esta estrategia clásica, han surgido múltiples opciones moleculares. En su mayoría, estas técnicas se basan en el aislamiento del material genético (ADN) a partir de cultivos puros del microorganismo patógeno o de los tejidos afectados del paciente, sin necesidad de proceder a un aislamiento previo del organismo infeccioso. La técnica más empleada para realizar este diagnóstico se denomina PCR (por *Polymerase Chain Reaction*). Se trata de una técnica que se basa en la replicación de una pequeña región (o secuencia) del material genético del patógeno, realizada en múltiples ciclos, por una ADN-polimerasa que es resistente al calor y que permite incrementar en varios órdenes de magnitud la cantidad original de ADN presente en la muestra (Figura 3).

Son muchas las ventajas de la técnica de PCR. En primer lugar, su elevada especificidad: en efecto, debido a que la ADN-polimerasa necesita ser cebada para poder comenzar a sintetizar (polimerizar) la molécula de ADN, se diseñan iniciadores (también llamados *primers*) que, en teoría, solo se unirán a una región muy específica del genoma del organismo patógeno, pues han sido previamente diseñados para que así sea. Los dos iniciadores diseñados flanquean la región o secuencia de interés y limitan la amplificación a dicha región. En segundo lugar, su elevada sensibilidad: debido al enorme poder de amplificación de esta técnica (amplificación exponencial del número de copias presentes inicialmente), teóricamente bastaría al menos una única copia (incluso fragmentada) del genoma que se pretende identificar para poder detectar su presencia en la muestra estudiada. Si partimos de una sola copia, al cabo de 35 ciclos de polimerización tendríamos $1 \cdot 2 \exp.35 = 35.000.000.000$ de copias idénticas (asumiendo un 100 % de eficiencia de amplificación, lo cual no es necesariamente cierto). En tercer lugar, su rapidez: en pocas horas (de 2 a 4 dependiendo del patógeno y de sus características genéticas) se puede obtener un resultado. Finalmente, una ventaja que no debe ser descuidada; el relativo bajo costo de los equipos y de los insumos necesarios para llevar a cabo la amplificación. El método original, desarrollado a finales de los años 80', exigía que los resultados fuesen evaluados en un gel de agarosa (Figura 4), lo cual representaba un tiempo adicional de trabajo de parte del técnico o del investigador (alrededor de una hora). Hoy en día, sin embargo, gracias a la automatización de los equipos, es posible pasar por alto esta etapa, lo cual permite acelerar aún más la obtención de resultados.

La técnica de PCR se convirtió prácticamente en un estándar en odontología, a principios del siglo XXI, favoreciendo el trabajo tanto de clínicos como de investigadores.^{8,9} Gracias a su uso, esta técnica ha mejorado la capacidad diagnóstica, pero también la prognosis y la terapia de muchas enfermedades. Por ejemplo, su aplicación en el estudio de la enfermedad periodontal ha permitido detectar patógenos,

tales como *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema socranskii* o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, en muestras subgingivales. La PCR también ha permitido discriminar entre diferentes linajes y serotipos de *Streptococcus mutans* y *S. sobrinus*, agentes causantes de la caries dental: se trata de un método de genotipificación. En este último caso, la posibilidad de aplicar esta técnica para estudios de epidemiología molecular ha quedado de manifiesto.¹⁰ De igual manera, su uso para estudiar patógenos endodónticos también se ha comprobado.¹¹ Finalmente, la posibilidad de detectar mutaciones en genes humanos (o marcadores moleculares) relacionados con la manifestación de cáncer bucal es otra posibilidad que, ha quedado firmemente establecida (Figura 5).¹²

2.2.2 PCR y epidemiología molecular.

La posibilidad de poder identificar de manera rápida, precisa y a bajo costo la presencia de secuencias nucleotídicas específicas (genes o marcadores) presentes en una determinada muestra, ha facilitado la ejecución de estudios de epidemiología molecular. En efecto, dado el elevado nivel de sensibilidad y especificidad de la PCR, así como la posibilidad de aplicarla a poblaciones enteras o muestras poblacionales cuidadosamente seleccionadas, podemos hoy en día tener acceso a información relevante que incluye: i) niveles de dispersión de un determinado agente patógeno y estructura de sus distintas poblaciones naturales; ii) frecuencia de aparición de una población genotípicamente diferente de un microorganismo patógeno; iii) presencia y frecuencia de genes, en los genomas de distintas cepas del patógeno en cuestión, relacionados con la resistencia a agentes desinfectantes y antibióticos; iv) frecuencia de alelos, en la población humana o animal susceptible, que podrían incrementar el riesgo de sufrir de una determinada enfermedad, ya sea de origen microbiano o hereditario.¹³

Obviamente, estos estudios pueden llevarse a cabo con un enfoque geográfico o temporal. En este último caso, se puede incluso seguir los cambios genotípicos (evolución) de ciertos patógenos, como los virus, a lo largo de su proceso de diseminación a nivel global. Ejemplos concretos de la aplicación de la técnica de PCR en estudios de epidemiología molecular pueden encontrarse en la literatura reciente. Tal es el caso de un estudio realizado por Komiyama y col.¹⁴ en el cual aislados de enterococos orales –incorrectamente identificados mediante el empleo de un conocido y ampliamente utilizado test fenotípico (API 20 Strep, Biomérieux, Marcy l'Etoile, France)-, fueron correctamente identificados en base al análisis de la secuencia del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S (16S ARNr).

La detección de microorganismos potencialmente patógenos en ambientes clínicos es otra aplicación de la técnica de PCR. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo en un el área de odontología de un hospital japonés se pudo demostrar la presencia de contaminación bacteriana (*Legionella spp.*) y de genes de resistencia a antibióticos en el agua que circulaba

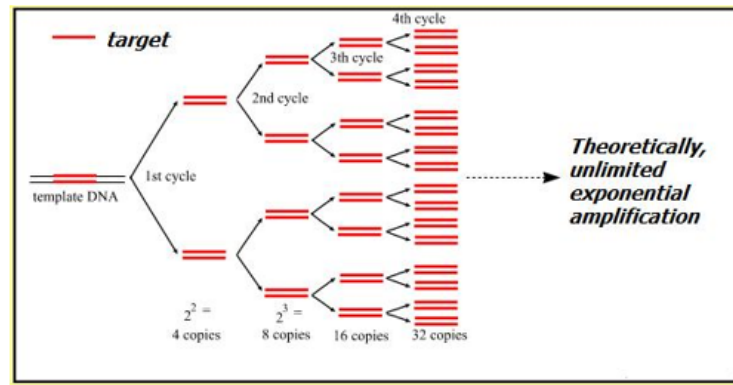


Fig. 3. Representación esquemática del proceso de amplificación de un fragmento de ADN mediante la técnica de PCR. En cada ciclo, el número de moléculas se duplica, en un aumento exponencial (© Andy Viestraete, <http://users.ugent.be/~avierstr/index.html>; reproducido con autorización del autor).

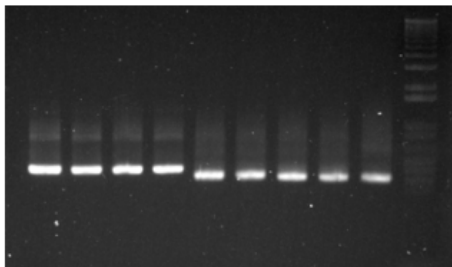


Fig. 4. Gel de agarosa al 1% en el que se evidencia la presencia de fragmentos de ADN amplificados por la técnica de PCR. La presencia de una banda fluorescente en cada uno de los canales (9 en total) confirma la amplificación a partir de diferentes muestras. En el canal de la extrema derecha vemos un patrón de bandas de longitud conocida. (Luis Andrés Yarzabal; reproducido con autorización)

por las tuberías de los equipos dentales.¹⁵ La detección de determinantes (genes) de resistencia a antibióticos es otro ejemplo emblemático de las ventajas de emplear la técnica de PCR para estudios epidemiológicos.¹⁶ En algunos casos, estos genes se presentan como parte de una región genómica más extensa (por ejemplo, un integrón) o de un elemento genético independiente del cromosoma (por ejemplo, un plásmido), que pueden transferirse de una bacteria a otra a través de un mecanismo horizontal.¹⁷ Otra clara demostración del poder de esta técnica, es la detección de elementos genéticos móviles (= transposones) -capaces de diseminarse en comunidades microbianas naturales y portadores de genes de resistencia a antibióticos-, en muestras de metagenomas orales obtenidos a partir de saliva de individuos aparentemente sanos, en una clínica universitaria londinense.¹⁸ La reciente detección de nuevos integrones, otro tipo de elementos genéticos igualmente implicados en la diseminación de genes

de resistencia a antibióticos entre patógenos humanos de relevancia clínica, en la saliva humana de pacientes sanos,¹⁹ es otro ejemplo evidente del poder de la técnica de PCR para estudios de epidemiología molecular.

Queda claro entonces que, si disponemos de cebadores o *primers* capaces de permitir la amplificación, de manera muy específica, de estos genes o regiones genómicas, podemos teóricamente seguir el curso de una epidemia o la diseminación de estos elementos genéticos a nivel de los distintos patógenos que circulan en un determinado espacio geográfico. A partir de la información recabada se pueden orientar o re-orientar las políticas de salud pública puestas en marcha por los estados, con el fin de controlar (e incluso erradicar) el agente etiológico en cuestión.

2.2.3 PCR en Tiempo real (Real Time PCR)

Una de las variantes de la técnica de PCR es la denominada PCR en Tiempo Real (o Real Time PCR). Aunque el fundamento de la técnica es el mismo (amplificación de una región específica de un genoma mediada por una ADN polimerasa termoresistente), la posibilidad de detectar el número de copias que se producen en cada ciclo de amplificación (es decir, de conocer la cinética de amplificación en tiempo real) ha permitido una serie de avances adicionales. Por ejemplo, a partir del análisis de estas cinéticas de amplificación puede estimarse la cantidad de copias que había originalmente en la muestra de interés, lo cual permite determinar con bastante exactitud los niveles de infección de la misma. Cuando se trata, por ejemplo, de un patógeno de naturaleza viral, la estimación de la carga (*viral load*) es fundamental para poder determinar la efectividad de la terapia aplicada y, si fuese el caso, ajustarla.²⁰ La RT-PCR ha sido empleada recientemente para detectar y cuantificar la carga de *Porphyromonas gingivalis* en placa sub-gingival de pacientes con periodontitis crónica.²¹ También se ha utilizado para estimar el efecto

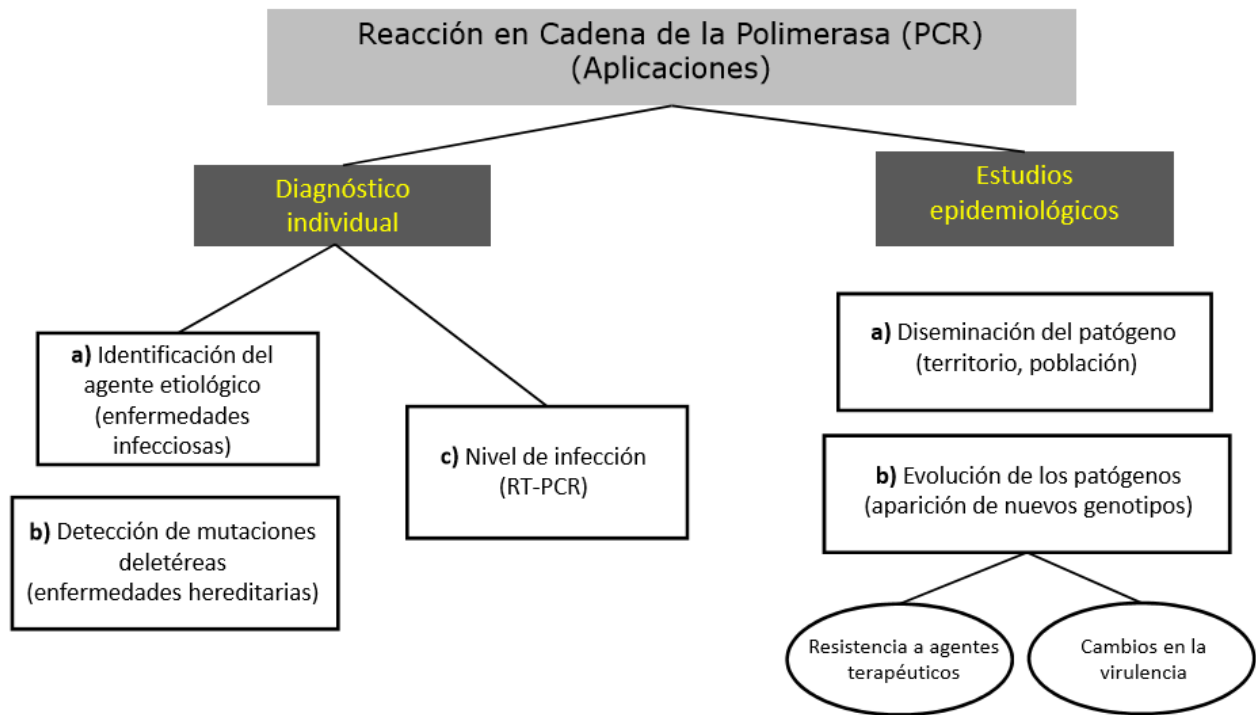


Fig. 5. Posibles usos de la técnica de PCR para investigaciones en Odontología.

antimicrobiano de una nueva resina dental para la fabricación de prótesis dentales,²² entre otras muchas aplicaciones.

3 CONCLUSIONES

La incorporación de técnicas de biología molecular ha revolucionado el campo de la biología oral y la ciencia odontológica, particularmente en los últimos diez años. Las evidencias que se han obtenido a través del empleo de estas técnicas permiten actualmente comprender procesos –normales o patológicos– que hasta hace pocos años no podían ser estudiados adecuadamente a través de las técnicas tradicionales. El correcto empleo de las mismas permite también llevar a cabo estudios epidemiológicos, a escala masiva, que pueden ser fundamentales en el diseño de programas de control de enfermedades, por parte de las agencias de salud pública de los países afectados. Por otra parte, la posibilidad de poner en evidencia la existencia de microorganismos completamente desconocidos para la ciencia, a través del estudio de sus genes y sus genomas, ha permitido comprender, no solamente las causas de muchas enfermedades bucales, sino además el potencial rol que cumplen muchos de estos microorganismos como promotores de nuestra salud. Los avances se suceden a una rapidez impresionante y cada día se incorporan nuevos odontólogos a grupos de investigación multidisciplinarios, que profundizan en las causas y consecuencias de estas

enfermedades bucales. En los próximos números de *Odontología Activa* continuaremos presentando otras técnicas moleculares que, junto con las que hemos visto en el presente trabajo, han permitido estos espectaculares avances.

Conflicto de intereses y financiamiento Los autores declaran no tener conflicto de intereses, haber cumplido con los requisitos de autoría y haber autofinanciado este artículo.

Referencias

- 1 Sackett, D.L., Rosenberg, W.M., Gray, J.A., Haynes, R.B., Richardson, W.S. Evidence based medicine: What it is and what it isn't. *British Medical Journal*, V. 312, p. 71-2. 1996.
- 2 American Dental Association. Policy on Evidence-Based Dentistry. Disponible en: <http://www.ada.org/en/about-the-ada/ada-positions-policies-and-statements/policy-on-evidence-based-dentistry>. [Localizado el 11 Nov 2017]
- 3 Bader, J.D., Hawley, F. American Dental Association resources supporting evidence-based dentistry. *Semin Orthod*. V. 19, p. 158–61. 2013.
- 4 Watson, J.D., Crick F.H.C. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, V. 171, p. 737–738. 1953.
- 5 Watson, J.D., Crick, F.H.C. Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid. *Nature*, V. 171, p. 964–967. 1953.

- 6 Crick, F.H.C. On Protein Synthesis. En: F.K. Sanders (ed). Symposia of the Society for Experimental Biology, Number XII: The Biological Replication of Macromolecules. Cambridge University Press. pp. 138–163. 1958.
- 7 Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature*, V. 227, N. 5258, p. 561–563. PMID 4913914. doi:10.1038/227561a0
- 8 Shafee, T., Lowe, R. Eukaryotic and prokaryotic gene structure. *WikiJournal of Medicine*, V. 4, N. 1. DOI:10.15347/wjm/2017.002. 2017.
- 9 Santos, C.F., Sakai, V.T., Machado, M.A., Schippers, D.N., Greene, A.S. Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. *J Appl Oral Sci. Mar*, V. 12, N. 1, p.1-11. 2004.
- 10 Valones, M.A.A., Guimarães, R.L., Brandão, L.A.C., de Souza, P.R.E., de Albuquerque Tavares Carvalho, A., Crovela, S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, V. 40, N. 1, p. 1–11. 2009. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100001>.
- 11 Endo, M.S., Correa Signoretti, F.G, Salustiano Marinho, C, Marinho, C, Figueiredo de Almeida Gomes PCR identification of endodontic pathogens and ADN quantification in samples from teeth with post-treatment apical periodontitis. *Clin Lab Res Dentistry* 2014; 20 (4): 197-208. ISSN 2357-8041. Endo, M, Correa Signoretti, F, Salustiano Marinho A, Marinho G.
- 12 Awan, M.S., Irfan, B., Zahid, I., Mirza, Y., Ali, S.A. Comparison of polymerase chain reaction and immunohistochemistry assays for analysing human Papillomavirus infection in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 11(6), XC10–XC13. 2017. <http://doi.org/10.7860/JCDR/2017/24742.10119>.
- 13 Bricker, B.J. Past, present and future of molecular technology applications for the epidemiology of bacterial diseases. *J Anal Bioanal Tech* S10:001. 2011. doi: 10.4172/2155-9872.S10-001.
- 14 Komiyama, E.Y., Lepesqueur, L.S.S., Yassuda, C.G., Samaranayake, L.P., Parahitayawa, N.B., Balducci, I., et al. Enterococcus species in the oral cavity: prevalence, virulence factors and antimicrobial susceptibility. *PLoS ONE*11(9): e0163001. 2016. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163001>.
- 15 Watanabe, A., Tamaki, N., Matsuyama, M., Kokeyuchi, S. Molecular analysis for bacterial contamination in dental unit water lines. *New Microbiol*, V. 39, N. 2, p.143-145. 2016.
- 16 Hawkey, P.M. Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. *British Journal of Pharmacology*. V. 153, Supl. 1, p. S406-S413. 2008. doi: 10.1038/sj.bjp.0707632.
- 17 Von Wintersdorff, C.J.H., Penders, J., van Niekerk, J.M., Mills, N.D., Majumder, S., van Alphen, L.B., Wolffs, P.F.G. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology*, V. 7, 173. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>.
- 18 Tansirichaiya, S., Mullany, P., Roberts, A.P. PCR-based detection of composite transposons and translocatable units from oral metagenomic DNA. *FEMS Microbiology Letters*, V. 363, N. 18. 2016. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw195>.
- 19 Tansirichaiya, S., Rahman, M.A., Antepowicz, A., Mullany, P., Roberts, A.P. Detection of novel integrons in the metagenome of human saliva. *PLOS ONE*, V. 11, N. 6, p. e0157605. 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157605>.
- 20 Mackay, I. M., Arden, K. E., Nitsche, A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, V. 30, N. 6, p. 1292–1305. 2002.
- 21 Padmalatha, G.V., Bavle, R.M., Satyakiran, G.V., Paremala, K., Sudhakara, M., Makarla, S. Quantification of Porphyromonas gingivalis in chronic periodontitis patients associated with diabetes mellitus using real-time polymerase chain reaction. *Journal of Oral Maxillofacial Pathology*. V. 20, N. 3, p. 413-418. 2016.
- 22 Zhang, K., Ren, B., Zhou, X., Xu, H.H., Chen, Y., Han, Q., Li, B., Weir, M.D., Li, M., Feng, M., Cheng, L. Effect of Antimicrobial Denture Base Resin on Multi-Species Biofilm Formation. *Int J Mol Sci*. V. 17, N.7. pii: E1033. 2016. doi: 10.3390/ijms17071033.

Recibido: 07 de Noviembre de 2017.

Aceptado: 27 de Diciembre de 2017.

