

# Métodos de diagnóstico molecular en la práctica odontológica.

## *Molecular diagnostic methods in dental practice.*

Sara Medina Medina,\* Paola Orellana Bravo,\* Katherine Cuenca León,\* Carlos Andrade Tacuri\*

### RESUMEN

El diagnóstico molecular, mediante la aplicación de técnicas moleculares, ha permitido estudiar microorganismos presentes en el inicio y progresión de la caries dental, enfermedad periodontal, y en los fracasos endodónticos. Las técnicas moleculares permiten la detección y cuantificación del material genético del ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) o proteínas, lo que posibilita el estudio del genoma completo o secuencias de DNA específicas. Estas técnicas surgen como una necesidad de detectar microorganismos de difícil o lento crecimiento en cultivos; la técnica más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite la amplificación de pequeños segmentos de material genético al utilizar cebadores, por lo que es un método económico, preciso, sensible y rápido para la detección de microorganismos. El presente artículo de revisión bibliográfica servirá para informar sobre los avances de las técnicas moleculares utilizadas para el diagnóstico en la práctica odontológica.

**Palabras clave:** biología molecular, reacción en cadena de la polimerasa, caries dental, periodontitis, endodoncia.

### ABSTRACT

*Molecular diagnosis, through the application of molecular techniques, has made it possible to study microorganisms present in the onset and progression of dental caries, periodontal disease, and endodontic failures. Molecular techniques allow the detection and quantification of the genetic material of deoxyribonucleic acid (DNA), ribonucleic acid (RNA) or proteins, allowing the study of the complete genome or specific DNA sequences, they arise as a need to detect difficult or slow growing microorganisms in cultures. The most widely used technique is the polymerase chain reaction (PCR) that allows the amplification of small segments of genetic material using primers, it is an economical, precise, sensitive and fast method for the detection of microorganisms. This bibliographic review article will serve to report on the advances in molecular techniques used for diagnosis in dental practice.*

**Keywords:** molecular biology, polymerase chain reaction, dental caries, periodontitis, endodontics.

### INTRODUCCIÓN

El diagnóstico molecular está en constante crecimiento gracias al desarrollo de las técnicas moleculares, que nos han permitido profundizar en la comprensión de diferentes fenómenos biológicos, desde identificar la etiología de una enfermedad hasta conocer la magnitud de una infección, ya sea de tipo bacteriano o viral.<sup>1,2</sup>

En los últimos años las técnicas moleculares son cada vez más seguras y rápidas, han ido incorporándose paulatinamente a la rutina de diagnóstico microbiológico, se han convertido en una herramienta eficaz en la práctica

odontológica y han permitido el estudio e identificación de comunidades microbianas de la cavidad oral.<sup>2</sup>

La aplicación en el diagnóstico odontológico de técnicas moleculares nos ha permitido estudiar la composición de la microbiota oral de las bacterias periodontales, cariogénicas y bacterias presentes en el conducto radicular, y mediante la identificación de éstas podemos conocer la etiología de la enfermedad, así como establecer un diagnóstico rápido y eficaz.<sup>3</sup>

El objetivo de esta revisión bibliográfica es investigar los métodos moleculares de diagnóstico aplicados en la práctica odontológica, para informar al profesional de la

\* Universidad Católica de Cuenca. Cuenca, Ecuador.

Recibido: 25 de julio de 2022. Aceptado: 08 de septiembre de 2022.

Citar como: Medina MS, Orellana BP, Cuenca LK, Andrade TC. Métodos de diagnóstico molecular en la práctica odontológica. Rev ADM. 2022; 79 (5): 276-283. <https://dx.doi.org/10.35366/107964>



odontología o a los estudiantes en formación sobre los avances de las técnicas moleculares utilizadas para el diagnóstico en la práctica odontológica.

## DIAGNÓSTICO MOLECULAR

El diagnóstico molecular, gracias al desarrollo de las técnicas moleculares, permite la detección y cuantificación del material genético del ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) o proteínas, lo que posibilita el estudio del genoma completo o secuencias de DNA específicas.<sup>1,2</sup> Se han desarrollado diversos métodos y técnicas para el estudio y la identificación de microorganismos asociados con caries dental, enfermedad periodontal y fracasos endodónticos, estos métodos contribuyen a la detección de patógenos de forma rápida y eficaz, por ende, facilitan su diagnóstico.<sup>2</sup>

## CARIES DENTAL

La caries es considerada una enfermedad multifactorial, que incluye la desmineralización y destrucción de los tejidos duros del diente causados por los ácidos que genera el *biofilm* de la placa microbiana.<sup>4</sup> Es una de las enfermedades de origen infeccioso que se produce por el desequilibrio de la microbiota oral, lo que provoca un aumento en la proporción de bacterias acidógenas y acidúricas, con un alto índice de prevalencia, por lo que es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, que comienza en la etapa temprana de la vida y cuya frecuencia e incidencia crece con la edad.<sup>4,5</sup>

## Métodos moleculares

Estudios recientes, que han empleado métodos moleculares de identificación bacteriana, han permitido estudiar

las bacterias que intervienen en el desarrollo y progresión de la caries dental, y han revelado que las bacterias cariogénicas son complejas y variadas.<sup>3,4</sup> Diversos estudios moleculares indican que *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* son las especies con mayor prevalencia asociadas a la caries dental.<sup>6</sup> Los métodos moleculares más utilizados para la detección de bacterias cariogénicas son: reacción en cadena de la polimerasa y *next generation sequencing*.

## Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es una técnica molecular que se basa en la amplificación de pequeños segmentos del material genético utilizando cebadores (partidores o *primers*).<sup>2</sup> A partir de un fragmento de la región que se va a amplificar se obtienen millones de copias de DNA en pocas horas.<sup>1-3</sup> La reacción se lleva a cabo mediante la repetición sucesiva de un ciclo de tres pasos, en temperaturas diferentes.<sup>7</sup> La PCR se caracteriza por su sensibilidad, especificidad, facilidad de realizar y porque los resultados se obtienen con mayor rapidez; por ello se considera un método confiable para la detección de patógenos cariogénicos.<sup>3</sup> Una desventaja que podemos indicar es que no evalúa otros organismos presentes en las muestras y que no puedan ser reconocidos por los *primers* específicamente utilizados.<sup>6,7</sup>

Singla y colaboradores,<sup>8</sup> en 2016, detectaron en muestras de placa dental la presencia de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*.<sup>8</sup>

**Toma de muestra:** con un explorador dental estéril se tomaron muestras de placa supragingival del margen cervical de todos los dientes, luego cada explorador se colocó en un tubo estéril que contenía solución salina tamponada con fosfato y se transportó en una bolsa de hielo a 4 °C al laboratorio.<sup>8</sup>

**Tabla 1: Secuencias de *primers* de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizados para la detección de especies bacterianas cariogénicas.**

| Bacterias                     | <i>Primers</i> (5'-3')                                   | Tamaño del amplicón (pb) | Condición de la PCR   | Referencia          |
|-------------------------------|--|--------------------------|---|---------------------|
| <i>Streptococcus mutans</i>   | F:ACTACACTTTCGGGTGGCTTGG<br>R: CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC    | 517                      | • Desnaturalización a 95 °C por 30 s<br>• Hibridación a 59 °C por 30 s  | Singla<br>D et al   |
| <i>Streptococcus sobrinus</i> | F: GATAACTACCTGACAGAGCTGACT<br>R: AAGCTGCCTTAAGGTAATCACT | 712                      | • Extensión a 72 °C por 1 min<br>• Esta amplificación se repitió por 30 ciclos<br>• El ciclo final se ejecutó a 72 °C por 5 min | (2016) <sup>8</sup> |

**Tabla 2: Secuencias de primers de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional utilizados para la detección de microorganismos periodontopatógenos.**

| Bacterias                       | Primers (5'-3')  | Tamaño del amplicón (pb) | Condiciones de la PCR convencional     | Referencia                          |
|---------------------------------|--|--------------------------|--|-------------------------------------|
| <i>P. gingivalis</i>            | F: TGTAGATGACTGAAAACC<br>R: ACGTCATCCCCACCTTCCTC               | 197                      | • Desnaturalización a 94 °C por 10 min | Mujica T et al (2010) <sup>11</sup> |
| <i>T. forsythia</i>             | F: TACAGGGGAATAAAATGAGATACG<br>R: ACGTCATCCCCACCTTCCTC         | 745                      | 35 ciclos de:<br>• 94 °C por 30 s      |                                     |
| <i>T. denticola</i>             | F: TAATACCGAATGTGCTCATTTACAT<br>R: TACAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA | 316                      | • 55 °C por 30 s<br>• 72 °C por 30 s   |                                     |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | F: ATTGGGGTTTAGCCCTGGTG<br>R: ACGTCATCCCCACCTTCCTC             | 360                      | Extensión final a 72 °C por 10 min     |                                     |
| <i>F. nucleatum</i>             | F: GGATTTATTGGGCGTAAAGC<br>R: GGCATTCCTACAAATATCTACGAA         | 167                      |  |                                     |

**Extracción de DNA:** el DNA se extrajo de la muestra de placa supragingival, se lisaron primero con una solución de lisis que contenía lisozima + dodecilsulfato de sodio (SDS) + NaOH, seguido de la adición de acetato de potasio (solución neutralizante) que precipita las proteínas. Luego, el DNA cromosómico se precipitó con alcohol isopropílico y se almacenó en tampón Tris.<sup>8</sup>

Para la amplificación del fragmento de DNA de 517 bp del gen *gtf B* de *Streptococcus mutans*, y del fragmento de DNA de 712 pb del gen *gtfI* de *Streptococcus sobrinus* se utilizaron dos conjuntos de cebadores específicos de especie sintetizados por Sigma Aldrich, EE.UU. (Tabla 1).<sup>8</sup>

Los productos obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó con un transiluminador UV,<sup>8</sup> se puede reemplazar el bromuro de etidio (mutagénico) por SYBR Safe DNA Gel Stain.

### Next generation sequencing (NGS)

Los métodos NGS permiten analizar una gran cantidad de genes y secuenciar millones de segmentos de DNA o ARN, de forma masiva o en paralelo, de una comunidad de bacterias, las cuales han sido amplificadas previamente mediante PCR.<sup>2,9,10</sup> Al agregar secuencias de pocos nucleótidos al extremo de los fragmentos amplificados es posible distinguir entre grupos de secuencias provenientes de distintas muestras y los resultados se obtienen en un lapso corto.<sup>10</sup>

Astorga y compañeros<sup>6</sup> presentan un estudio en el que se observó que *Streptococcus mutans*, *Streptococcus*

*gordonii*, *Neisseria*, *Fusobacterium* y *Capnocytophaga* predominaban en lesiones de esmalte; *Streptococcus* y *Prevotella* predominaban en lesiones de dentina superficial; existe un incremento de lactobacilos en lesión de dentina profunda, esta especie juega un rol importante en la progresión de la lesión, pero no interviene en la iniciación de la caries.<sup>6</sup>

## ENFERMEDAD PERIODONTAL

La enfermedad periodontal es una afección multifactorial que provoca la destrucción continua de los tejidos de soporte, que implica el desgaste progresivo del hueso alveolar y, si no se trata correctamente, puede provocar el aflojamiento y la posterior pérdida de los dientes; es causada por un microorganismo o un grupo de microorganismos. Existen diferentes especies Gram negativas, anaerobias estrictas y microaerófilas que juegan un papel primordial en el inicio y progresión de la enfermedad periodontal, cuya identificación se hace necesaria para definir la etiología de la enfermedad y establecer un tratamiento adecuado.<sup>11-13</sup> Las bacterias periodontales se agrupan en diferentes complejos: amarillo, verde, naranja y rojo. En el surco gingival de pacientes sanos se encuentran especies del género *Streptococcus* y algunos bacilos Gram negativos anaerobios facultativos, que forman los complejos amarillo y verde; las bacterias que forman el complejo naranja son *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* y *Parvimonas micra*, éstas son especies asociadas con la inflamación periodontal; y las que forman parte del complejo rojo son *Porphyromonas*

*gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*, que son las especies más fuertemente asociadas con la enfermedad periodontal.<sup>11,14</sup>

### Métodos moleculares

En las últimas décadas se han desarrollado varias técnicas moleculares que nos han permitido estudiar a las bacterias periodontales.<sup>11</sup> Uno de los métodos moleculares más utilizados para la detección de bacterias periodontales es la reacción en cadena de la polimerasa con sus diferentes variantes como: PCR convencional, PCR multiplex y PCR en tiempo real.<sup>14,15</sup> Estos métodos moleculares son una alternativa cuando las bacterias son de difícil cultivo microbiológico (bacterias anaerobias).

#### PCR convencional

Es un método cualitativo que permite la amplificación de un segmento de interés del DNA, utiliza dos cebadores específicos para cada patógeno y los resultados de la amplificación son visualizados mediante geles de agarosa.<sup>1,2</sup> Como una desventaja podemos mencionar que sólo indica la presencia o ausencia de un fragmento de DNA, es decir, la presencia o ausencia de un microorganismo.<sup>2</sup>

Aguilar y colegas<sup>16</sup> realizaron un estudio de PCR con el objetivo de detectar la presencia de los microorganismos periodontopatógenos (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) en

pacientes alcohólicos y fumadores de Loja con periodontitis crónica.<sup>16</sup>

**Toma de muestra:** para la toma de muestra se introdujo un cono de papel estéril No. 30 en mesial y distal, los sitios más profundos de cada paciente, por 20 segundos; después, cada cono de papel se colocó en un tubo Eppendorf estéril y se enviaron al laboratorio de biología molecular para su posterior procesamiento.<sup>16</sup>

**Extracción de DNA:** el DNA se obtuvo de cada cono de papel, para ello se procedió a lavar cada cono con 100 µL de agua destilada estéril con el objetivo de desprender las bacterias. Cada muestra se examinó de forma individual, para ello se realizó la liberación del material genético y la suspensión bacteriana se lisó a 100 °C por 10 min. Para la identificación de cada bacteria se amplificó un fragmento del gen *16S* utilizando los *primers* específicos para cada bacteria descritos en la *Tabla 2*.<sup>17</sup> Los resultados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1 y 2%, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó con un transiluminador UV.<sup>14</sup>

#### Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

La qPCR es una metodología que se ha desarrollado para la detección y cuantificación de copias de DNA en un mismo paso. Esta técnica es económica, precisa, sensible y rápida para la identificación de bacterias.<sup>2</sup> Para la detección de los fragmentos amplificados, además de los reactivos que se utilizan en la PCR tradicional, es necesario utilizar sondas

**Tabla 3:** Secuencias de *primers* de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real utilizados para la detección de macroorganismos periodontopatógenos.

| Bacterias                       | <i>Primers</i> (5'-3')  | Tamaño del amplicón (pb) | Condiciones de la qPCR   | Referencia                              |
|---------------------------------|---|--------------------------|--|---|
| <i>P. gingivalis</i>            | F: AGGCAGCTTGCCATACTGCG<br>R: ACTGTTAGCAACTACCGATGT           | 404 pb                   | • Desnaturalización a 95 °C por 5 min  | Constantin C et al (2017) <sup>21</sup> |
| <i>T. forsythia</i>             | F: GCGTATGTAACCTGCCCGCA<br>R: TGCTTCAGTGTGAGTTATACCT          | 641 pb                   | 40 ciclos de:<br>• 95 °C por 10 s  |   |
| <i>T. denticola</i>             | F: TAATACCGAATGTGCTCATTACAT<br>R: TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA | 316 pb                   | • 55 °C por 5 s<br>• 72 °C por 25 s  |   |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | F: AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC<br>R: ATGCCAACTTGACGTTAAAT        | 557 pb                   | • Análisis de fusión de alta resolución (HRM) para controlar el punto de fusión específico de la especie |   |

**Tabla 4: Secuencias de primers de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex utilizados para la detección de microorganismos periodontopatógenos.**

| Bacterias                       | Primers (5'-3')   | Tamaño del amplicón (pb) | Condiciones de la PCR multiplex  | Referencia                            |
|---------------------------------|---|--------------------------|--|---------------------------------------|
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | F: AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC<br>R: ATGCCAACTTGACGTAAAT       | 557                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min</li> <li>36 ciclos de:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• 95 °C por 30 s</li> <li>• 60 °C por 1 min</li> <li>• 72 °C por 1 min</li> </ul> </li> <li>• Extensión final de 72 °C por 2 min</li> </ul> | Ashimoto A et al (1996) <sup>12</sup> |
| <i>P. gingivalis</i>            | F: AGGCAGCTTGCCATACTGCG<br>R: ACTGTTAGCAACTACCGATGT         | 404                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min</li> </ul>  |                                       |
| <i>T. denticola</i>             | F: TAATACCGAATGTGCTCATTACAT<br>R: TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCA | 316                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>36 ciclos de:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• 94 °C por 30 s</li> </ul> </li> </ul>  |                                       |
| <i>T. forsythia</i>             | F: GCGTATGTAACCTGCCCGCA<br>R: TGCTTCAGTGTCAGTTATACT         | 641                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 55 °C por 1 min</li> <li>• 72 °C por 2 min</li> <li>• Extensión final de 72 °C por 10 min</li> </ul>  |                                       |

con fluoróforo y éstas pueden ser de dos tipos: fluoróforos con afinidad por el DNA y sondas específicas para fragmentos del DNA, que a su vez se pueden dividir en tres tipos: sondas de hidrólisis, sondas de hibridación y sondas de horquilla.<sup>18</sup> Una desventaja es que en la cuantificación no se diferencia entre células vivas y muertas.<sup>3,19,20</sup>

Este método también se ha aplicado para medir el número de bacterias en enfermedades periodontales en muestras como saliva y el líquido del surco gingival (GCF, [líquido crevicular gingival]), las muestras pueden ser utilizadas después de estar almacenadas por mucho tiempo.<sup>2,11</sup>

Constantin y colegas<sup>21</sup> realizaron un estudio para detectar bacterias presentes en la enfermedad periodontal.<sup>21</sup>

**Toma de muestra:** las muestras se tomaron del líquido crevicular gingival utilizando cinco puntas de papel estériles, cada una insertada en una bolsa periodontal diferente y mantenida allí durante aproximadamente 10 segundos, las puntas de papel se transportaron a un solo tubo estéril a fin de enviarlas al laboratorio para la extracción de DNA y la cuantificación bacteriana.<sup>21</sup>

**Extracción de DNA:** el DNA se extrajo según las instrucciones de Constantin y colegas.<sup>21</sup> Para la identificación de cada bacteria se amplificó un fragmento del gen *rRNA* (RNA ribosomal) 16S utilizando los siguientes cebadores (Tabla 3).<sup>21</sup>

### **PCR multiplex (multiplex-polymerase chain reaction)**

Esta técnica es utilizada para la detección de varios microorganismos al mismo tiempo, mediante la amplificación de dos o más segmentos de DNA, y usando varios pares de cebadores. No se necesita efectuar un aislamiento de la bacteria ni caracterización morfológica de estos patógenos de difícil o lento crecimiento.<sup>1,22</sup>

Ashimoto y colaboradores<sup>12</sup> realizaron un estudio para determinar la prevalencia de bacterias periodontopatógenas en pacientes con periodontitis avanzada y con gingivitis leve, en este estudio utilizó un método de detección de PCR.<sup>12</sup>

**Toma de muestra:** los sitios para tomar la muestra se aislaron con torundas de algodón y se retiró la placa supragingival. A continuación, se insertaron puntas de papel a la profundidad de la periodontitis por 10 segundos en las tres bolsas periodontales más profundas de cada paciente. Las puntas de papel se transfirieron a un vial que contenía líquido de transporte VMGA III y se envió al laboratorio para su posterior procesamiento.<sup>12</sup>

**Extracción de DNA:** fue desarrollada según lo describe Ashimoto y compañeros.<sup>12</sup> La PCR fue desarrollada como lo describen Saiki y colegas.<sup>23</sup>

Los cebadores de PCR utilizados en el estudio fueron específicos para cada especie (Tabla 4).<sup>12</sup>

## ENDODONCIA

Se ha demostrado que las bacterias son los principales patógenos causantes de los fracasos endodónticos, las bacterias pueden cruzar el foramen apical a través de los tejidos apicales, ya sea por extensión del área infectada o como consecuencia de la manipulación durante la terapia del conducto radicular.<sup>24</sup> La mayoría de los fracasos endodónticos se deben a la presencia constante de las bacterias dentro de los conductos radiculares, *Enterococcus faecalis* es el principal microorganismo que se asocia con los fracasos de tratamientos endodónticos.<sup>24,25</sup>

*Enterococcus faecalis* es un patógeno oportunista, que se encuentra en los conductos radiculares donde el tratamiento endodóntico ha fallado, tiene la facilidad de colonizar e infectar los túbulos dentinarios, por lo que se considera un problema terapéutico, no pueden ser eliminados durante la limpieza mecánica y química, debido a su resistencia a las sustancias irrigadoras.<sup>25</sup>

Se ha reportado la presencia de levaduras del género *Candida*, especialmente por *Candida albicans* dentro de los conductos radiculares infectados.<sup>24</sup> Es considerado un microorganismo oportunista que penetra hasta el tejido pulpar y lo vuelve necrótico, además de favorecer a infecciones endodónticas, producción de granulomas,

abscesos periapicales, a la reabsorción dentinaria externa y también a los fracasos endodónticos.<sup>26</sup>

## MÉTODOS MOLECULARES

La aplicación de métodos moleculares en endodoncia tiene como objetivo identificar patógenos endodónticos causantes de enfermedades pulpares y fracasos endodónticos.<sup>27</sup> Los métodos moleculares, a través de la extracción de ácidos nucleicos de bacterias obtenidas del conducto radicular, han permitido evaluar la eficiencia antibacteriana de varios protocolos de preparación biomecánica y medicación intraconducto, mediante la aplicación de ensayos moleculares, al caracterizar a los patógenos no cultivables y establecer la diversidad bacteriana involucrada en infecciones endodónticas.<sup>1</sup>

Diversos estudios demuestran que *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis* son resistentes al efecto antimicrobiano de varios medicamentos, como el hidróxido de calcio, y que los métodos convencionales de desinfección no son suficientes para la eliminación de éstos.<sup>25,28</sup>

Para la identificación de *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis*, las especies más prevalentes en fracasos endodónticos, se han empleado diversas técnicas moleculares, de las cuales destaca la técnica molecular de

Tabla 5: Secuencias de *primers* de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizados para la detección de especies responsables de fracasos endodónticos.

| Bacterias               | Primers (5'-3')   | Tamaño del amplicón (pb) | Condiciones de la PCR  | Referencia                                   |
|-------------------------|---|--------------------------|--|--|
| <i>Candida albicans</i> | F: GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG<br>R: GGTCCGTGTTTCAAGACG            | 610                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Desnaturalización a 95 °C por 6 min</li> <li>• 30 ciclos de:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• 94 °C por 30 s</li> <li>• 58 °C por 30 s</li> <li>• 72 °C por 30 s</li> </ul> </li> <li>• Extensión final de 72 °C por 10 min</li> </ul>  | Romero-Salazar DB et al (2013) <sup>28</sup> |
|                         | F: TGTGCTCTCTCGGGGGCGGCCG<br>R: AAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTA/TAA | 175                      |  |  |
| <i>Enterococcus</i>     | F: TACTGACAAACCATTTCATGATG<br>R: AACTTCGTACCAACGCGAAC           | 112                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Desnaturalización a 94 °C por 5 min</li> <li>• 35 ciclos de:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• 94 °C por 1 min</li> <li>• 50 °C por 1 min</li> <li>• 72 °C por 2 min</li> </ul> </li> <li>• Extensión final a 72 °C por 5 min</li> </ul> | Pupo S et al (2014) <sup>29</sup>            |
| <i>E. faecalis</i>      | F: ATCAAGTACAGTTAGTCT<br>R: ACGATTCAAAGCTAACTG                  | 941                      |  |  |

PCR por su sensibilidad y especificidad; ésta facilita la identificación de estos microorganismos.<sup>24,25</sup>

Romero-Salazar y colegas,<sup>28</sup> así como Pupo y compañeros, con el método de PCR detectaron la presencia de *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis* en conductos radiculares con necrosis pulpar.<sup>28,29</sup>

**Toma de muestra de *Candida albicans*:** para tomar la muestra se introdujeron tres puntas de papel absorbente en el conducto radicular hasta el tercio apical por 1 minuto, cada punta debía estar empapada con el fluido del conducto, para ser colocadas en un tubo de ensayo que contenía 3 mL de medio de cultivo de Todd Hewitt, y finalmente se transportaron al laboratorio para su procesamiento.<sup>28</sup>

**Extracción de DNA:** se realizó a través de la técnica de calentamiento-congelamiento, descrita por Baumgartner y colaboradores,<sup>30</sup> y la cantidad de DNA extraído se midió por espectrofotometría.<sup>31</sup>

**Toma de muestra de *Enterococcus faecalis*:** para la toma de muestra se introdujeron puntas de papel No. 15 en el conducto radicular por 20 segundos, cada punta de papel fue colocada en tubos Eppendorf que contenían 500 µL de solución buffer TE (Tris-EDTA, pH 8.0) para ser transportadas al laboratorio.<sup>29</sup>

**Extracción de DNA:** de las colonias de cultivos (CHROMagar) de 24 horas se realizó la extracción del DNA, las colonias se suspendieron en 500 µL de buffer TE (1 mM EDTA. 10 mM Tris-HCl-pH 8.0). La suspensión bacteriana se calentó a 99 °C por 30 minutos, luego fue centrifugada a 13,000 rpm durante 15 minutos y finalmente se utilizaron 5 µL del sobrenadante para las reacciones de PCR.<sup>29</sup> Para la técnica de PCR se utilizaron dos pares de *primers* (oligonucleótidos, específicos) para cada género (Tabla 5).<sup>29</sup>

## REFERENCIAS

- Farfán M. Biología molecular aplicada al diagnóstico clínico. Rev Med Clin Condes. 2015; 26 (6): 788-793.
- Angarita M, Torres MI, Díaz Torres AK. Técnicas de biología molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. Rev Haban Cienc Méd. 2017; 16 (5): 796-807.
- Yarzabal L, Buena L, Djabayan P. Técnicas de biología molecular para la investigación en odontología y biología oral (1a parte). Revista OACTIVA UC Cuenca. 2018; 3 (1): 29-36.
- Carletto F, Vera N, González R. Caries and genetic variability of *Streptococcus mutans*. J Oral Res. 2020; 3 (1): 39-48.
- Chong Y, Solorzano K, Loo J. Caries dental, higiene bucal y necesidades de tratamientos a beneficiarios del Proyecto Sonrisas Felices. Rev San Gregorio. 2018; 12 (3): 60-69.
- Astorga, B, Barraza C, Casals JM, Cisterna MJ, Mena D, Morales F et al. Avances en el estudio de la diversidad bacteriana oral asociada a caries dental mediante el estudio genómico. Int J Odontostomat. 2015; 9 (3): 349-356.
- Díaz C, Garrote H, Amor A, Suarez Y. Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 2013; 29 (3): 298-303.
- Singla D, Sharma A, Sachdev V, Chopra R. Distribution of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in Dental Plaque of Indian Pre-School Children Using PCR and SB-20M Agar Medium. J Clin Diagn Res. 2016; 10 (11): ZC60-ZC63.
- Rubio S, Pacheco R, Gómez A, Perdomo S, García R. Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. Univ Med. 2020; 61 (2): 49-63.
- Yarzabal Rodríguez LA, Buena Salazar L, Sarmiento Ordoñez J. Técnicas de biología molecular para la investigación en odontología y biología oral (2ª parte). Revista OACTIVA UC Cuenca. 2019; 4 (3): 35-42.
- Bolerázka B, Mareková M, Markovská N. Trends in laboratory diagnostic methods in periodontology. Acta Medica (Hradec Kralove). 2016; 59 (1): 3-9.
- Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol. 1996; 11 (4): 266-273.
- Britos M, Sin C, Ortega S, Vasek O. Diseño y estandarización de la técnica de PCR para *Porphyromonas gingivalis*. Rev Odontol. 2017; 10 (1): 1668-7280.
- Rajakaruna GA, Negi M, Uchida K, Sekine M, Furukawa A, Ito T et al. Localization and density of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in gingival and subgingival granulation tissues affected by chronic or aggressive periodontitis. Sci Rep. 2018; 8 (1): 9507.
- Rojas L, Gutiérrez R. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) vs. métodos convencionales en el diagnóstico oportuno de la enfermedad periodontal. Revisión de literatura. Rev Venez Invest Odont IADR. 2020; 8 (1): 75-104.
- Aguilar A, Tello G, Zamora L, González S. Diagnóstico molecular de microorganismos periodontopatógenos en pacientes alcohólicos fumadores con periodontitis crónica de la ciudad de Loja, Ecuador. Rev Odontol. 2018; 20 (1): 33-49.
- Mujica T, Ruiz M, Daile L, Fuentevilla I, Bittner M. Co-detección de patógenos periodontales en pacientes chilenos con periodontitis crónica. Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral. 2010; 3 (3): 118-122.
- Tamay DL, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en Discapacidad. 2013; 2 (2): 70-78.
- Meisser M, Amileth C. Evaluación de dos métodos para extracción de ARN en saliva en niños. Rev Odont Mex. 2017; 21 (4): 245-252.
- Polony M, Prenninger N, Arweiler N, Haririan H, Winklehner P. Assessment of viable periodontal pathogens by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. J Periodont Res. 2013; 48 (1): 671-676.
- Constantin C, Consul I, Attila R, Lorand S. Relative quantification of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* high-risk bacterial species in Romanian patients evaluated for periodontal disease. bioRxiv. 2017; 184770.
- Papone V, Verolo C, Zaffaroni L, Battlle A, Capó C, Bueno L et al. Detección y prevalencia de patógenos periodontales de una población con periodontitis crónica en Uruguay mediante metodología convencional y metagenómica. Odontostomatología. 2015; 17 (25): 23-32.

23. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT et al. Primer mediated enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988; 239 (4839): 487-491.
24. López L, Varela P, Seoane R, Biedma M. Identificación de microorganismos por reacción en cadena de la polimerasa en necrosis pulpar y periodontitis apical. *Rev Cubana Estomatol*. 2017; 54 (3).
25. Rodríguez C, Gonzalo O. Implicancias clínicas de la contaminación microbiana por *Enterococcus faecalis* en canales radiculares de dientes desvitalizados: Revisión de la literatura. *Rev Odont Mex*. 2015; 19 (3): 181-186.
26. Endo M, Correa F, Salustiano A, Canato F, Figueiredo B. PCR identification of endodontic pathogens and ADN quantification in samples from teeth with post-treatment apical periodontitis. *Clin Lab Res Dent*. 2014; 20 (4): 197-208.
27. Hernández P, Lanzagorta M, Aguirre M, Gómez A. Análisis cualitativo y cuantitativo de RNA de tejido pulpar humano. *Endodoncia Actual*. 2019; 14 (2): 44-53.
28. Romero-Salazar DB, Hernández-Solís SE, Rueda-Gordillo F. Identificación mediante PCR de *Candida albicans* aislados de conductos radiculares necróticos. *Rev Odontol Latinoam*. 2013; 5 (2): 51-55.
29. Pupo S, Díaz A, Castellanos P, Simancas V. Eliminación de *Enterococcus faecalis* por medio del uso de hipoclorito de sodio, clorhexidina y MTAD en conductos radiculares. *Av Odontostomatol*. 2014; 30 (5): 263-270.
30. Baumgartner BJ, Rapp JC, Mullet JE. Plastid transcription activity and DNA copy number increase early in barley chloroplast development. *Plant Physiol*. 1989; 89 (3): 1011-8. doi: 10.1104/pp.89.3.1011.
31. Hartung de Capriles C, Mata-Essayag S, Abate T, de Waard J, Pérez C, Olaizola C et al. Extracción simplificada de ADN en especies de *Candida*. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2005; 25 (2): 114-116.

**Conflicto de intereses:** los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

**Aspectos éticos:** ninguno.

**Financiamiento:** ninguno.

**Correspondencia:**

**Est. Sara Medina Medina**

**E-mail:** ssmedinam65@est.ucacue.edu.ec