



UNIVERSIDAD  
CATÓLICA  
DE CUENCA

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR**

**CARRERA DE ODONTOLOGÍA**

**APLICACIONES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN  
ODONTOLOGÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE  
MICROORGANISMOS. CAPITULO DEL LIBRO**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE ODONTÓLOGO**

**AUTOR: MARIA PAZ GUERRERO PELAEZ**

**DIRECTOR: DRA. JÉSSICA MARÍA SARMIENTO ORDÓÑEZ**

**CUENCA - ECUADOR**

**2023**

**DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO**



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA**

*Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo*

**UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR**

**CARRERA DE ODONTOLOGÍA**

APLICACIONES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN  
ODONTOLOGÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE  
MICROORGANISMOS. CAPITULO DEL LIBRO

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE ODONTÓLOGO**

**AUTOR: MARIA PAZ GUERRERO PELAEZ**

**DIRECTOR: DRA. JÉSSICA MARÍA SARMIENTO ORDÓÑEZ**

**CUENCA-ECUADOR**

**2023**

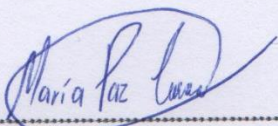
**DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO**



**Declaratoria de Autoría y Responsabilidad**

**María Paz Guerrero Peláez** portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0105774517**. Declaro ser el autor de la obra: **APLICACIONES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN ODONTOLOGÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS. CAPITULO DEL LIBRO**, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

**Cuenca, 3 de julio de 2023**

F: 

**María Paz Guerrero Peláez**

**C.I. 0105774517**

# CAPÍTULO VII

## APLICACIONES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN ODONTOLOGÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Jéssica María Sarmiento Ordóñez<sup>1</sup>  
jsarmiento@ucacue.edu.ec 1  
María Paz Guerrero Pelaez<sup>2</sup>  
maria.guerrero.00@est.ucacue.edu.ec

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

2. Estudiante de la Universidad Católica de Cuenca - Carrera de Odontología

## Contenido

1.-Microorganismos patógenos de la cavidad oral.....	4
1.1.- Bacterias .....	4
1.1.1.- Estructura de las bacterias Gram positivas y Gram negativas .....	4
1.1.2.- Estructura de las bacterias alcohol-resistentes (Generalidades) .....	6
1.1.3.- Principales bacterias patógenas de cavidad oral .....	7
1.2.- Virus: Estructura y funciones .....	7
1.2.1.- Virus envueltos o con envoltura .....	8
1.2.2.- Virus no envueltos o sin envoltura .....	9
1.2.3.- Principales virus patógenos de cavidad oral .....	9
1.3.- Hongos: Estructura y funciones .....	10
1.3.1.- Estructuras .....	10
1.3.1.a. - Hongos microscópicos levaduriformes .....	11
1.3.1.b.- Hongos microscópicos filamentosos .....	11
1.3.2.- Principales hongos patógenos de cavidad oral .....	11
2.-Genes y genoma.....	12
2.1.- Conceptos teóricos .....	12
2.2.- Genómica .....	12
2.3.- Metagenómica.....	13
3.-Técnicas de biología molecular para la identificación de microorganismos bucales .....	14
3.1.- Utilización del PCR clásico y PCR en tiempo real para la identificación microbiana .....	15
3.2.- Secuenciación masiva .....	17
3.3.- Hibridación in situ fluorescente (FISH) .....	18
4.-Referencias bibliográficas .....	20

## Tabla de ilustraciones

Ilustración 1. Estructuras generales de las bacterias. Elaboración propia .....	4
Ilustración 2. Estructura pared bacteriana y membrana de bacteria Gram positiva. Elaboración propia .....	5
Ilustración 3. Estructura pared bacteriana y membrana de bacteria Gram negativa. Elaboración propia .....	6
Ilustración 4. Estructuras de virus envuelto. Elaboración propia .....	8
Ilustración 5. Estructuras de Virus no envuelto. Elaboración propia.....	9
Ilustración 6. A) Hongo levaduriforme B) Hongo filamentoso. Elaboración propia .....	11
Ilustración 7. ADN y genes que se encuentran en las bacterias. Elaboración propia .....	12
Ilustración 8. Bacteria con plásmidos. Elaboración propia .....	13
Ilustración 9. Proceso a seguir al realizar el PCR. Elaboración propia .....	15
Ilustración 10. Proceso del PCR en el termociclador. Elaboración propia.....	15
Ilustración 11. Lectura y colocación en gel de agarosa. Elaboración propia .....	16
Ilustración 12. Equipo PCR Real-time y lectura. Elaboración propia .....	17
Ilustración 13. Realización de FISH en placa subgingival, se observan en verde los Streptococcus y en morado Corynebacterium. Elaboración propia.....	19

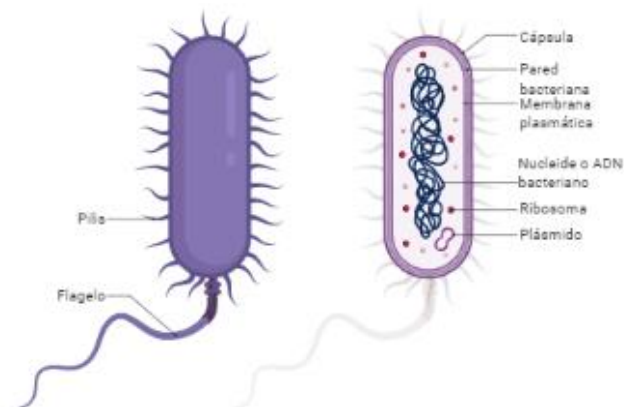
# 1.-Microorganismos patógenos de la cavidad oral

## 1.1.- Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares microscópicos que pertenecen al grupo de procariontes, debido a que carecen de núcleo celular definido, ni tampoco poseen organelas.<sup>1,2</sup> Sin embargo, poseen estructuras que les permite vivir en diversos ambientes; sus estructuras las vamos a denominar estructuras habituales y estructuras facultativas.<sup>1-3</sup>

Las estructuras habituales también se les llama obligadas debido a que sin estas estructuras las bacterias no podrían sobrevivir en su medio ambiente; y las estructuras facultativas o no obligadas son aquellas de las cuales las bacterias pueden poseer o no dependiendo de las condiciones y necesidades que tengan.<sup>2</sup> Dentro de las estructuras habituales tenemos a la pared bacteriana, membrana citoplasmática, ribosomas, ADN o nucleoide y citoplasma. *Ilustración 1*; cuando existe un daño o carecen de alguna de estas estructuras podría conllevar a la muerte de ellas.<sup>1,2</sup>

La reproducción de las bacterias es asexual, por fisión binaria; además que siguen una escala logarítmica, es decir de 1 salen 2, luego 4, después 16, siguiendo a 32, etc.<sup>4,5</sup> Para que ellas puedan reproducirse favorablemente deben tener a su disposición nutrientes, es decir, sustancias químicas orgánicas e inorgánicas, para que éstas a su vez, después de ser metabolizadas sean utilizadas como componentes de las estructuras de las nuevas bacterias.<sup>1,2,5</sup> Un factor que influye notablemente en su reproducción y metabolismo es la disponibilidad del oxígeno, es decir si las bacterias pueden utilizar a esta molécula dentro de su metabolismo o no, y esto se utiliza para designar a las bacterias como anaerobias estrictas o anaerobias facultativas, incluso hay la designación de aerobias estrictas; el prefijo ANA significa “sin”, y AEROBIA quiere decir “aire”, entonces lo podemos entender como estrictamente sin aire; al decir FACULTATIVAS significa que pueden utilizar el oxígeno o pueden carecer de él sin influir en su metabolismo.<sup>1,2,4</sup>



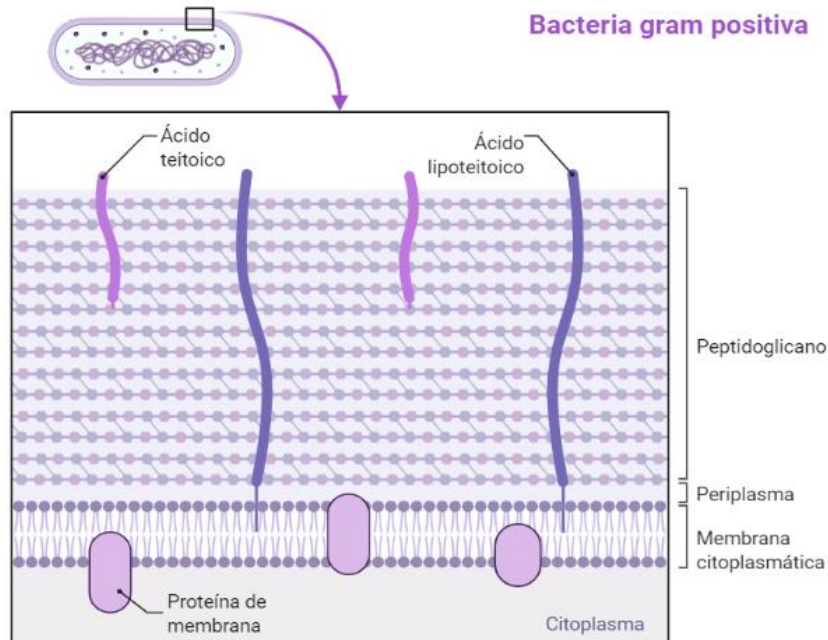
*Ilustración 1. Estructuras generales de las bacterias. Elaboración propia*

### 1.1.1.- Estructura de las bacterias Gram positivas y Gram negativas

Si bien las bacterias poseen estructuras habituales y facultativas, éstas varían entre los diferentes tipos de bacterias, lo que permite clasificarlas de acuerdo a su estructura.<sup>1,2</sup>

Desde la parte externa las bacterias conocidas como **Gram positivas** poseen dentro de las estructuras habituales, una pared bacteriana gruesa, químicamente está compuesta por peptidoglicano, ácido teicoico y ácido lipoteicoico.<sup>6</sup> Seguido a la pared, tienen una membrana citoplasmática que contiene al citoplasma y a las estructuras intracitoplasmáticas. *Ilustración 2.*<sup>1,2</sup>

En el citoplasma poseen el nucleóide o ADN, es una estructura habitual, no pueden carecer de ella, además, que contiene toda la información genética.<sup>7</sup> También se encuentran los ribosomas imprescindibles para la síntesis de proteínas.<sup>1,2</sup>



*Ilustración 2. Estructura pared bacteriana y membrana de bacteria Gram positiva. Elaboración propia*

Mientras que las bacterias **Gram negativas**, igualmente revisando desde la parte externa hacia la interna, poseen una membrana externa con lipopolisacáridos (LPS) más conocidos como endotoxinas, luego se encuentra una pared, también compuesta de peptidoglicano, pero de un pequeño espesor.<sup>1,2</sup> Debajo de esta pared se encuentra la membrana interna o membrana citoplasmática conteniendo al citoplasma y a las estructuras citoplasmáticas, todas las estructuras nombradas son habituales. En el citoplasma como estructuras habituales poseen las mismas que las Gram positivas.

*Ilustración 3.*<sup>1,2,4</sup>

Las estructuras facultativas son aquellas que pueden poseer las bacterias para desempeñar ciertas funciones necesarias, pero no son imprescindibles, es por esta razón que no todas las tienen.<sup>1,2,7</sup> Además, estas estructuras pueden tener tanto las bacterias Gram positivas como las Gram negativas. Nombramos las más comunes: flagelos, pilis, plásmidos, cápsula, entre otras.<sup>1,2,8</sup>

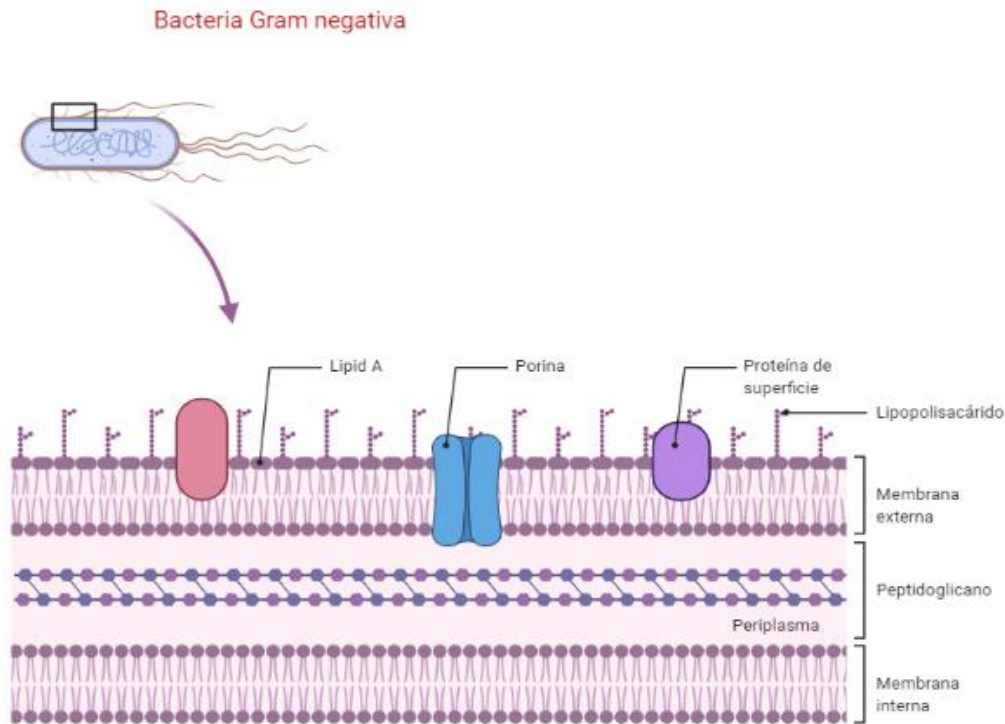


Ilustración 3. Estructura pared bacteriana y membrana de bacteria Gram negativa. Elaboración propia

La diferencia que poseen en la pared bacteriana permite que luego del proceso de tinción de Gram, las bacterias Gram positivas se tiñan de color morado y las bacterias Gram negativas se tiñan de color rosado. Esto se da debido a que los colorantes quedan retenidos en la pared, como la pared de las Gram positivas es más grande, se retiene más cantidad del colorante.<sup>1,2</sup>

### 1.1.2.- Estructura de las bacterias alcohol-resistentes (Generalidades)

Las *Mycobacterias* poseen una serie de estructuras conocidas como citoplasma, membrana celular y un espacio periplásmico que lo separa de una gruesa y compleja pared celular.<sup>9,10</sup> Cabe recalcar, que estas bacterias se denominan alcohol-resistentes porque poseen un alto contenido de lípidos en su pared celular.<sup>11</sup>

A continuación, se describirán las particularidades de estas estructuras en *Mycobacterium tuberculosis*, las cuales son útiles para diferenciarlo de otras bacterias y comprender su interacción, estas son:

- a) Envoltura bacteriana: Es aquella que provee protección y soporte a las bacterias, también posee mecanismos que permiten el intercambio de sustancias entre la bacteria y el medio ambiente, la envoltura consta de dos partes principales, la membrana plasmática y alrededor de ella la pared celular, la primera le otorga a la célula protección osmótica, transporte de iones y moléculas, en tanto que la segunda le brinda soporte mecánico y protección.<sup>11,12</sup>
- b) Pared celular: Es aquella que está constituida por tres capas las cuales se mencionan a continuación:

-Capa interna: Compuesta por peptidoglicano.

-Capa media: Más ancha que la capa anterior, compuesta por polisacáridos (arabinogalactano), ácidos micólicos.

-Capa externa: Estructura glucolipídica de grosor variable.<sup>11,12</sup>

c) Membrana citoplasmática: Aparece en cortes ultrafinos como una membrana biológica trilaminar clásica, es decir, bicapa fosfolipídica; sin embargo, tiene como característica la presencia de moléculas de lipopolisacáridos, lipoarabinomananos (LAM), lipomananos y fosfatidil-inositol-manósidos.<sup>11,12</sup>

### 1.1.3.- Principales bacterias patógenas de cavidad oral

Las bacterias existentes en la cavidad bucal, varían entre 500 y 700 especies, de las cuales el género *Streptococcus* es el más frecuente.<sup>4,13-15</sup> Dentro de este contexto, las especies cariogénicas más comunes son *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, estos son los principales colonizadores de la biopelícula dental, la patogenicidad de los mismos está relacionada con el desarrollo de caries dental, por la capacidad que tienen estas bacterias de generar ácidos ante la presencia de sacarosa.<sup>16</sup> Estas especies bacterianas se encuentran generalmente en tejidos blandos, saliva, lengua y superficies dentales.<sup>4,15,17</sup>

Otro grupo de bacterias que se pueden encontrar en la cavidad oral son las especies del grupo *Actinomyces* que se localizan sobre la encía y bajo la encía, así como en la superficie de la lengua.<sup>16</sup>

Por otro lado, los periodontopatógenos más comunes son principalmente las bacterias que forman parte del complejo rojo: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia*; sin embargo, una bacteria exógena que también se adjunta perfectamente al complejo rojo es *Aggregatibacter actinomycetemcomytans*.<sup>4</sup> Hay que tener en consideración que las bacterias del complejo rojo son anaerobias estrictas, esto dificulta el crecimiento bacteriano, por lo que hay que tener cuidado al transportarlas desde el sitio de la toma de muestra hasta el laboratorio.<sup>17</sup>

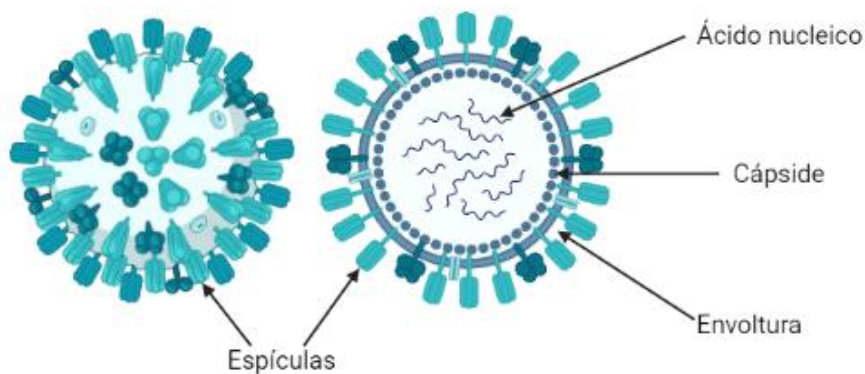
### 1.2.- Virus: Estructura y funciones

Los virus son entidades no celulares infecciosas de un tamaño entre 20 y 300 nanómetros (nm) y su genoma es ADN o ARN, estos virus se multiplican en el interior de células vivas (eucariotas y procariotas), utilizan sus enzimas para producir partículas especializadas (viriones), que contienen en su interior el genoma vírico para infectar nuevamente otra célula.<sup>18,19</sup> En cuanto a la estructura básica de un virus, este tiene un genoma que se halla dentro de una cubierta proteica denominada cápside, al conjunto de cápside y genoma se le denomina nucleocápside e incluso algunos virus pueden estar rodeados por una envoltura o carecer de ella.<sup>19</sup> Todos los virus poseen genoma ya sea de ADN o ARN y cápside, las otras estructuras son habituales. A continuación, se describe cada una de las estructuras básicas de un virus:

1. Genoma: Formado por ARN o ADN, monocatenario o bicatenario. Su función es contener la información genética necesaria para la síntesis de proteínas virales y para la replicación viral.<sup>19</sup>
2. Cápside: Está conformada por diversas subunidades proteicas denominadas capsómeros, de una o varias clases diferentes, que resultan de la asociación de moléculas proteicas de bajo peso molecular (monómeros o protómeros), cuya función es proteger al genoma.<sup>19</sup>
3. Envoltura: De naturaleza lipoproteica, rodea a la cápside, sus componentes lipídicos proceden de restos de la célula infectada que se adhieren a la partícula vírica cuando esta sale de la célula (p. ej., de la membrana citoplasmática o nuclear); a ellos se unen proteínas de origen vírico que terminan por configurar la envoltura. Los virus que no poseen esta envoltura se denominan desnudos. Su función principal es ayudar al virus a entrar en la célula huésped.<sup>19</sup>

### 1.2.1.- Virus envueltos o con envoltura

Los virus envueltos a más de poseer el genoma viral y la cápside, tienen la envoltura, que justamente envuelve al virus, la obtienen de las células que infectan por brotación.<sup>18</sup> Algunas proteínas víricas se disponen por debajo de las membranas citoplásmicas y otras se enclavan en ellas (espículas), el virión sale de la célula por gemación, llevándose parte de la membrana citoplásmica y sus propias proteínas.<sup>18</sup> En estos casos, el efecto que la liberación del virión provoca sobre las células varía considerablemente, encontrándose virus que las destruyen llamados citolíticos y los virus que no destruyen las células se denominan no citolíticos. *Ilustración 4.*<sup>16</sup>

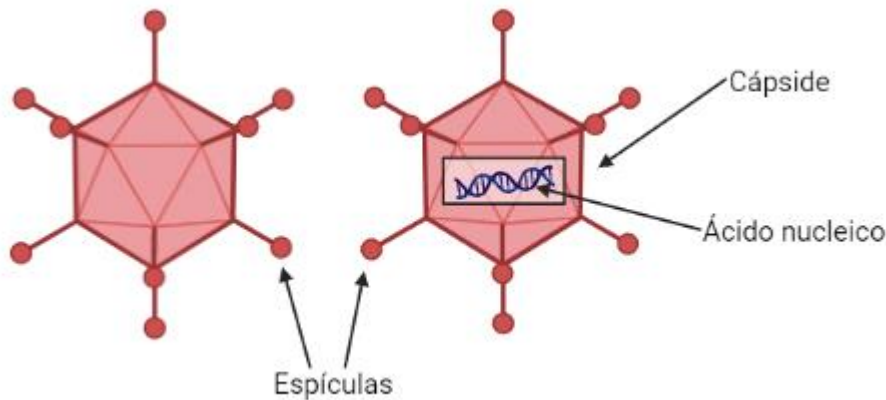


*Ilustración 4. Estructuras de virus envuelto. Elaboración propia*

Los herpes virus más comunes que causan patología en la mucosa oral, son de la familia *Alfaherpesviridae*, es decir los herpes simple tipo 1 y varicela zóster.<sup>19</sup> El hombre es el único reservorio del herpes simple tipo 1 y se transmite por medio de la saliva ya sea por contacto directo o indirecto; varicela-zóster en cambio, la infección se da por vía inhalatoria. En ambos casos hay una primo infección, y al replicarse puede guardarse la información genética para poder reactivarse de manera recurrente.<sup>18</sup>

### 1.2.2.- Virus no envueltos o sin envoltura

También se les conoce como virus desnudos, se les da este nombre porque carecen de la envoltura, es decir no toman parte de la membrana citoplasmática de la célula que infectan debido a que en el momento de salir de ésta lo hacen por lisis celular (rompimiento de la membrana). Están conformados de la cápside y del ácido nucleico, ocasionalmente poseen espículas. *Ilustración 5.*<sup>18</sup>



*Ilustración 5. Estructuras de Virus no envuelto. Elaboración propia*

### 1.2.3.- Principales virus patógenos de cavidad oral

Entre los principales virus patógenos que pueden estar alojados en la cavidad bucal son los Virus del Herpes Humano (VHH), los cuales son virus ADN bicatenarios, que se replican en la célula huésped y provocan en ella daños celulares, entre ellos están el Virus del Herpes simple tipo 1 (VHH 1) y tipo 2 (VHH 2), que pueden causar una serie de enfermedades a nivel oral.<sup>21</sup>

Por ejemplo, el VHH 1 y VHH 2 pueden provocar una gingivostomatitis herpética a nivel labial; un dato importante sobre este tipo de virus es que causa lesiones dentro de la boca sobre todo en pacientes inmunodeprimidos, es decir aquellos pacientes con un sistema inmunológico débil, estas lesiones suelen ubicarse principalmente a nivel de las encías y del paladar duro, las lesiones son similares a unas vesículas que se convierten en erosiones extensas y úlceras superficiales relacionadas a un dolor intenso al hablar y al comer.<sup>18,21</sup> Por otro lado, el Virus de la Varicela Zóster (VVZ), es otro de los virus patógenos que pueden habitar en nuestra cavidad oral, estos poseen ADN bicatenario y es conocida como una enfermedad que se puede transmitir por estar en contacto con vesículas o por transmisión aérea de micropartículas.<sup>22</sup> En la cavidad oral el VVZ puede presentarse en el paladar, la faringe, la lengua y con menor frecuencia también en las encías, además en el borde bermellón del labio aparecen vesículas de color amarillo, dolorosas, del tamaño de un grano de arroz que se rompen rápidamente, se ulceran y quedan rodeadas de un halo de color rojo. Se considera al VVZ una reactivación del virus de la varicela, además estas lesiones tienen la característica de ser unilaterales.<sup>22</sup>

Por otra parte, el virus de Epstein Barr (VEB) tiene un ADN bicatenario y causa varias enfermedades a nivel bucal como la mononucleosis infecciosa que es conocida como la enfermedad del beso, ya que se transmite por la saliva.<sup>23</sup> Además, cuando hay la presencia de este virus también se pueden presentar petequias palatinas que son pequeñas

manchas rojas en la zona de transición entre el paladar blando y el paladar duro.<sup>23</sup> El VEB puede provocar también una leucoplasia pilosa oral que es aquella que presenta alteraciones estriadas verticales blanquecinas en los bordes laterales de la lengua. En la cavidad bucal se suele encontrar también el Citomegalovirus (CMV) que posee un ADN bicatenario y generalmente está presente en pacientes con un sistema inmune disminuido lo que conlleva a la presencia de úlceras orofaríngeas.<sup>23,24</sup>

De igual forma, el Virus del Herpes tipo 6 (VHH 6) posee un ADN bicatenario semejante a los demás tipos de virus antes mencionados, con la diferencia que este virus provoca manchas de color rojizas en el paladar blando.<sup>18</sup> Otro tipo de virus existente en la cavidad bucal es el virus del Sarcoma de Kaposi que tiene el mismo tipo de ADN que el anterior, con la diferencia que este tipo de virus suele manifestarse también como manchas rojizas a violetas azuladas presentes a nivel del paladar, encías y lengua, cabe recalcar que este tipo de lesiones se pueden transformar en placas, nódulos y tumores a medida que avanza la enfermedad.<sup>18</sup> Es muy frecuente que se observe el Sarcoma de Kaposi en paciente con síndrome de inmunodeficiencia.<sup>24</sup>

A su vez, el Virus del Papiloma Humano (VPH), forma parte de un grupo de virus ADN bicatenarios sin cubierta, es decir virus desnudos, que infectan las células epiteliales de la piel y de las mucosas y puede causar un crecimiento tumoral descontrolado en las células infectadas.<sup>18</sup> En la mucosa oral el VPH puede causar verrugas que pueden estar ubicadas en las encías, en los labios y en el paladar, este tipo de virus también puede provocar a nivel oral un condiloma acuminado.<sup>18</sup> Después, tenemos al virus Coxsackie-A16 o el enterovirus 71 que genera vesículas de erosión en la cavidad bucal, ubicadas en la faringe, paladar, lengua y encías.<sup>18,22</sup> Por otro lado, el virus del VIH puede provocar alteraciones características en la mucosa oral como un eritema gingival que se presenta como una línea roja marcada de 1-3 mm de ancho en la zona marginal, también es común que pacientes con VIH presenten una gingivitis o periodontitis ulcerosa necrosante conocida con el nombre de (GUN/PUN) que genera úlceras especialmente en el sector anterior, que conlleva a una pérdida de papilas acompañado con un mal aliento.<sup>22</sup>

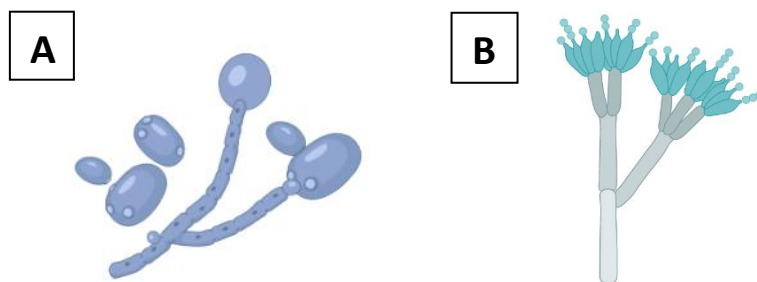
### **1.3.- Hongos: Estructura y funciones**

Los hongos son un grupo de organismos que pertenecen al reino Fungi, estos son organismos heterotróficos, es decir son aquellos que no pueden producir su propio alimento y osmotróficos que obtienen los nutrientes por absorción osmótica de sustancias disueltas, con quitina o quitosano en la pared celular, estos constituyen uno de los mayores grupos de seres vivos, se han descrito 80.000 especies.<sup>25</sup>

#### **1.3.1.- Estructuras**

Los hongos se presentan bajo dos formas principales: hongos filamentosos y hongos levaduriformes, el hongo filamentoso posee un cuerpo con dos porciones una que es reproductiva y otra vegetativa, la parte vegetativa es haploide y usualmente no presenta coloración, además está conformada por filamentos llamados hifas que suelen ser microscópicos y a su vez el conjunto de hifas conforma el micelio que es el aparato vegetativo de los hongos que les sirve para nutrirse, frecuentemente las hifas están divididas por tabiques llamados septos.<sup>19,20,25</sup> Por otro lado, los hongos levaduriformes son siempre unicelulares de forma casi esférica, ellos no presentan una distinción entre

cuerpo vegetativo y reproductivo, cabe recalcar que la función de los hongos en nuestro cuerpo es la de descomponer y nuestro sistema inmune los mantiene bajo control de manera que no generan ninguna enfermedad. *Ilustración 6.*<sup>25</sup>



*Ilustración 6. A) Hongo levaduriforme B) Hongo filamentoso. Elaboración propia*

### **1.3.1.a. - Hongos microscópicos levaduriformes**

Los hongos levaduriformes son organismos unicelulares de forma casi esférica u ovalada, que no presentan una distinción entre cuerpo vegetativo y reproductivo.<sup>25</sup> También se les conoce como levaduras, éstas debido a su gran diversidad fisiológica pueden crecer en un amplio rango de hábitats, al ser organismos heterotróficos requieren para su crecimiento nutrientes, minerales y una gran cantidad de carbono orgánico, estos organismos además necesitan de ciertas condiciones óptimas para sobrevivir, entre ellas cantidades de agua suficientes, nivel de pH ideal  $<4$  y una temperatura adecuada  $<30^{\circ}\text{C}$ . Cabe mencionar que las levaduras no presentan ningún tipo de estructura de locomoción por lo tanto no poseen movimiento, además se reproducen vegetativamente por gemación o fisión binaria y sexualmente por producción de esporas.<sup>4,25</sup>

### **1.3.1.b.- Hongos microscópicos filamentosos**

El hongo filamentoso posee un cuerpo con dos porciones, una que es reproductiva y otra vegetativa, la parte vegetativa es haploide y usualmente no presenta coloración, además está conformada por filamentos llamados hifas que suelen ser microscópicos y a su vez el conjunto de hifas conforma el micelio que es el aparato vegetativo de los hongos que les sirve para nutrirse, frecuentemente las hifas están divididas por tabiques llamados septos.<sup>19,26</sup> Para observar al microscopio este tipo de hongo se necesita la presencia de una sustancia llamada azul de lactofenol que va a servir como una técnica rápida para visualizar las estructuras fúngicas, este tipo de organismo puede realizar tanto la reproducción asexual como la sexual y en ambas participan las esporas, pero en un medio estable predomina la reproducción asexual.<sup>27</sup>

### **1.3.2.- Principales hongos patógenos de cavidad oral**

Entre los principales hongos patógenos que se encuentran en la cavidad oral podemos encontrar a *Candida albicans* (*C. albicans*), que en muchos de los casos no produce daños en personas sanas, pero varios factores pueden llevar a un crecimiento exagerado de este hongo provocando una variedad de complicaciones en el huésped, en este caso la cavidad oral que van desde infecciones superficiales en una sola región de la boca hasta casos más graves como una Candidiasis diseminada sistémica que puede complicar el cuadro clínico de una persona.<sup>19</sup> Por ejemplo, un factor que puede llevar a

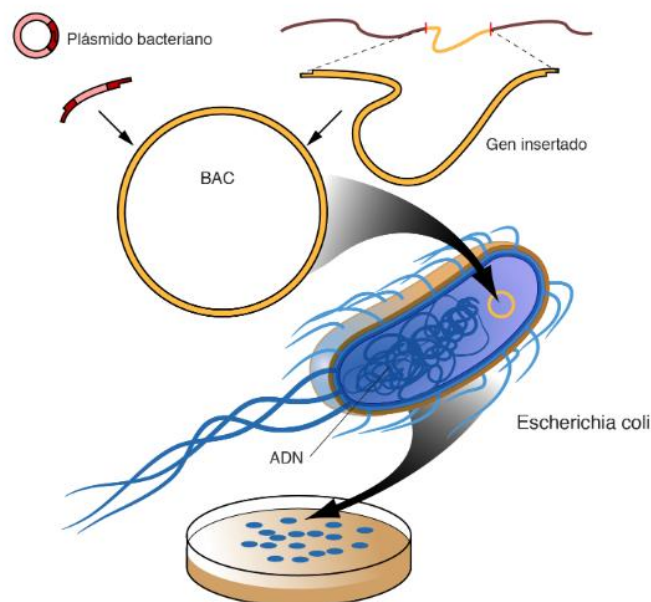
un crecimiento exagerado de la *C. albicans*, es la capacidad de este hongo de formar biopelículas, es decir una comunidad de células se empacan y aumentan de tamaño en presencia de sustratos abióticos, bióticos y en superficies mucosas, siendo así estas biopelículas difíciles de eliminar, incluso llegando a ser resistentes al tratamiento antimicótico, aumentando el porcentaje de mortalidad y morbilidad.<sup>25</sup>

Por otro lado, estudios epidemiológicos han demostrado que *C. albicans* está relacionada con la malignidad oral como la carcinogénesis epitelial oral.<sup>19</sup> Cabe recalcar, que el principal reservorio de esta levadura en el cuerpo se encuentra en el tracto gastrointestinal, por tanto, se da el desarrollo de infecciones cuando existe una disbiosis de la microbiota residencial, provocando una de las patologías orales más comunes, la Candidiasis oral, que se presencia a manera de lesiones blanquecinas en la lengua o en la parte interna de las mejillas.<sup>25</sup>

## 2.-Genes y genoma

### 2.1.- Conceptos teóricos

Los genes bacterianos siguen los conceptos de biología molecular, es decir, son segmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN), que contienen el código para sintetizar proteínas, el genoma bacteriano es el conjunto de genes de una bacteria que están distribuidos en un cromosoma único y circular en la mayoría de las bacterias, puede variar de tamaño, dependiendo de la información genética que necesite; es aproximadamente de 5.7 Megabases (Mb) y también presentan plásmidos. *Ilustración 7*<sup>28,29</sup>



*Ilustración 7. ADN y genes que se encuentran en las bacterias. Elaboración propia*

### 2.2.- Genómica

La genómica surge con el desarrollo de técnicas de biología molecular que permiten la secuenciación de genomas completos, lo que significa el análisis del contenido de genes de un microorganismo.<sup>28,30</sup> De esta manera se ha podido realizar el análisis de los genomas bacterianos que nos indica que un gran número de genes se han

adquirido por transferencia horizontal, es decir, por el movimiento de material genético entre organismos unicelulares.<sup>28</sup> Por lo tanto, a partir del análisis de la secuencia de genomas bacterianos, se pueden identificar genes y proteínas esenciales para la supervivencia de la bacteria y a partir de esta información desarrollar nuevos antibióticos que impidan el crecimiento bacteriano.<sup>28,30</sup>

Es decir, nosotros podemos identificar genes de resistencia que tiene una determinada bacteria para crear un cierto antibiótico que acabe con ellas, para lo cual es importante conocer que los genes de resistencia a los diferentes antimicrobianos se relacionan con elementos genéticos móviles como plásmidos (pequeñas moléculas de ADN circular que son separados del cromosoma bacteriano y se replican independiente de ella), transposones o genes saltarines (secuencias de ADN que solo llevan información genética para poder moverse dentro de los genomas) e integrones (sistemas de recombinación específicos, responsables del reconocimiento, captura y expresión de casetes).<sup>28-30</sup>



Ilustración 8. Bacteria con plásmidos. Elaboración propia

Por otro lado, es necesario identificar también mediante los métodos de estudio de genes antes mencionados el gen de virulencia, que menciona que un gen es clasificado como un factor de virulencia cuando su ausencia atenué la virulencia del microorganismo en un modelo in vivo y su complementación le devuelva su virulencia.<sup>28</sup>

### 2.3.- Metagenómica

La metagenómica es el análisis del conjunto completo de ADN de todos los organismos de una comunidad de bacterias, el mismo que genera un progreso en el conocimiento de cómo funciona la naturaleza.<sup>29,31</sup> Es decir, la metagenómica evidencia un acercamiento totalmente nuevo en la investigación de las comunidades microbianas, caracterizada por el análisis funcional y de secuencias de los genomas microbianos presentes en una muestra ambiental, apoyándose en términos de expresión o secuenciación.<sup>31-33</sup>

Actualmente, el desarrollo de tecnologías de secuenciación han generado la posibilidad de análisis metagenómicos extensos, uno de ellos es el *Shotgun* que divide el

ADN total en fragmentos y los clasifica por tamaños.<sup>31,33</sup> Los fragmentos pequeños son introducidos en cromosomas bacterianos artificiales y los fragmentos de mayor tamaño en plásmidos, que son vectores de ADN que utilizan el origen del plásmido F de replicación y mecanismos de partición para permitir la clonación de grandes fragmentos de ADN, luego los fragmentos son extraídos y purificados para ser secuenciados.<sup>32,33</sup>

Otro método utilizado es la *Pirosecuenciación* que nebuliza el ADN en fragmentos de 900 pb.<sup>31,33</sup> Ocupa una sola hebra de ADN de cada fragmento y adjunta adaptadores a cada lado de la secuencia, es decir, un *primer*, estos adaptadores adhieren la secuencia a una superficie sólida donde duplica cada fragmento a partir del primer adaptador o *primer*, finalmente un lector óptico lee los fotones generados por la hidrólisis de cada uno de los nucleótidos agregados, creando la secuencia de ADN.<sup>32</sup>

Cabe recalcar que, independientemente de la metodología de secuenciación usada, el paso siguiente es el ensamble de las secuencias obtenidas.<sup>29,31</sup> El ensamble se enfoca en la identificación de distintos fragmentos de ADN que permitirán alinear los extremos similares y así reconstruir secuencias lineales completas denominadas regiones genómicas o *contigs* y de esta manera obtener una secuencia lineal completa del genoma.<sup>32</sup>

El inconveniente está en que la gran mayoría de veces los fragmentos secuenciados no cubren la totalidad del genoma (existen regiones genómicas que no pueden ensamblarse con ningún otro fragmento porque las regiones que los unirían no fueron secuenciadas) o hay la presencia de regiones muy similares repetidas algunas veces a lo largo del genoma, lo que hace imposible saber cuál región genómica se ensambla con cualquier otro.<sup>32,33</sup>

Cabe destacar que, si los fragmentos generados por la secuenciación son de mayor tamaño, estos son más fáciles de ensamblar a comparación de fragmentos de menor tamaño.<sup>31,33</sup> No obstante, para determinar con exactitud si una secuencia es la verdadera secuencia del gen y no un error de la secuenciación, es importante que cada base en cada sitio a lo largo de la secuencia lineal esté repetida algunas veces, esto quiere decir, que cada base en cada fragmento haya sido secuenciado algunas veces y al alinear todos los distintos fragmentos secuenciados de una misma región sean coherentes entre sí.<sup>32</sup>

### **3.-Técnicas de biología molecular para la identificación de microorganismos bucales**

Las técnicas de biología molecular hoy en día son de gran utilidad para el estudio de bacterias que intervienen en el desarrollo y progresión de diversas enfermedades bucales tales como la caries dental, permitiéndonos de esta manera conocer las bacterias con mayor prevalencia asociadas a una enfermedad bucal en específico.<sup>34-36</sup>

Una de las técnicas más utilizadas en la identificación microbiana es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ya que permite la amplificación de pequeños segmentos de material genético utilizando cebadores conocidos como partidores o *primers*, además es uno de los métodos más utilizados por ser económico, preciso, sensible y rápido para la detección de microorganismos.<sup>34-36</sup>

A continuación, se detallarán cada uno de los métodos de identificación de microorganismos orales más utilizados en la actualidad.

### 3.1.- Utilización del PCR clásico y PCR en tiempo real para la identificación microbiana

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR clásico se basa en un proceso de amplificación selectiva de un segmento de ADN a partir de una sola copia de la especie diana original.<sup>36</sup> Es decir, solo se necesita 0,1 µL de muestra para obtener millones de copias y lograr una identificación certera de linajes, serotipos y mutaciones. Los resultados de esta prueba se realizan en gel de agarosa o poliacrilamida y actualmente es aplicada en diferentes especialidades odontológicas por su versatilidad, sensibilidad y precisión.<sup>36,37</sup>

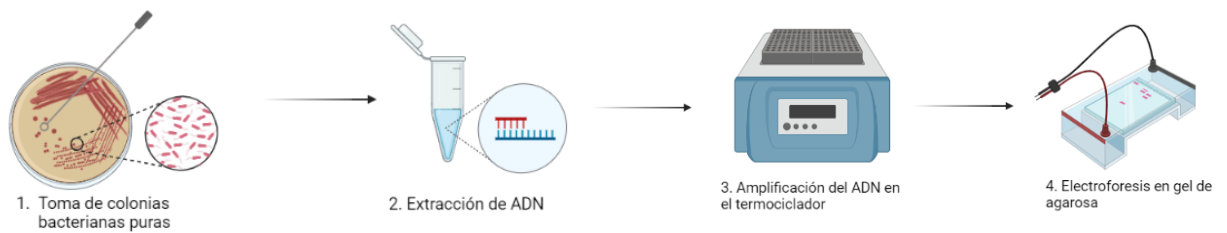


Ilustración 9. Proceso a seguir al realizar el PCR. Elaboración propia

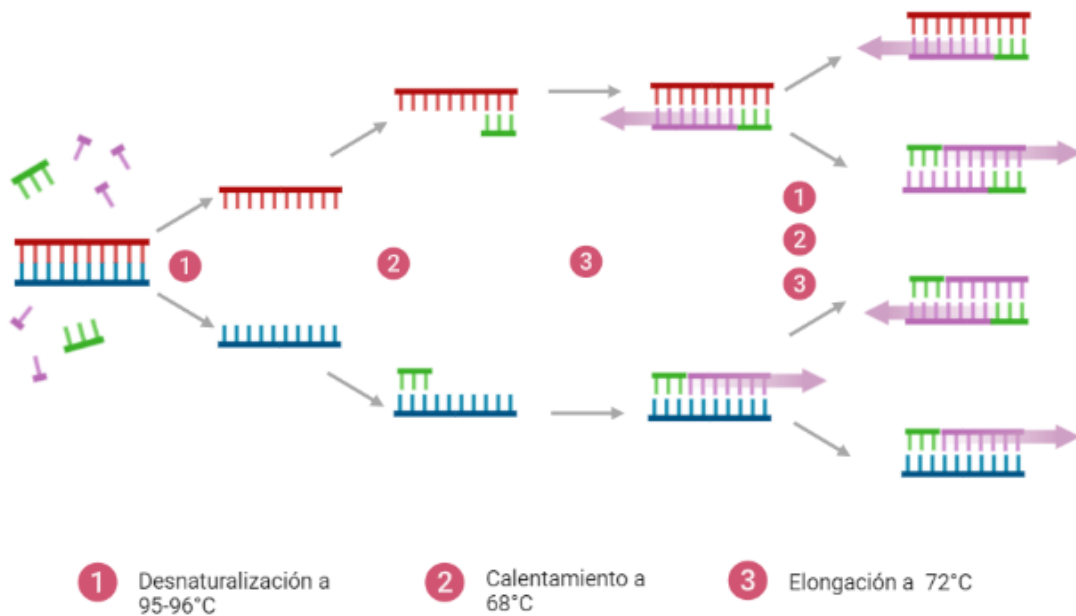


Ilustración 10. Proceso del PCR en el termociclador. Elaboración propia

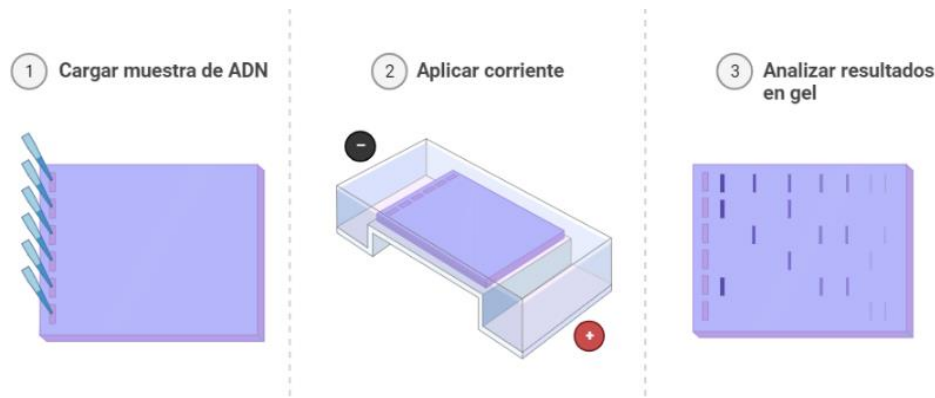


Ilustración 11. Lectura y colocación en gel de agarosa. Elaboración propia

En cuanto a la sensibilidad del PCR clásico, este es evidenciado claramente durante la amplificación, en la cual se utiliza una porción de material genético (ADN) y luego de 20 a 40 ciclos se evidencia la presencia o no de la secuencia buscada. En diferentes investigaciones se ha identificado la efectividad de esta técnica para la identificación de patógenos orales como *Tannerella forsythia* en un 80%, *Parvimonas micra* en un 77.5% y *Treponema denticola* en un 77.5%.<sup>36,37</sup>

Por otro lado, la especificidad es la capacidad que tiene el PCR clásico para determinar microorganismos con alta precisión, pues los *primers* bien diseñados se unirán solamente a la secuencia de ADN buscada. En el caso de *S. mutans* se comprobó la especificidad del 88.2%.<sup>36,37</sup>

En cuanto a las ventajas de utilizar el PCR clásico, existe mayor sensibilidad a comparación de los procedimientos convencionales, análisis rápido y versátil, costo relativamente bajo.<sup>36</sup> En cuanto a las desventajas, esta técnica es propensa a errores por contaminación de reactivos.<sup>36,37</sup>

Por otro lado, el PCR en Tiempo Real o Real Time PCR, es una técnica que presenta el mismo fundamento que la técnica de PCR convencional, que es la amplificación de una región determinada de un genoma mediada por una ADN polimerasa termorresistente, con la diferencia de que con esta técnica hay la posibilidad de identificar el número de copias que se generan en cada ciclo de amplificación, es decir determinar la cinética de amplificación en tiempo real, lo cual ha generado una serie de avances adicionales en la identificación de microorganismos orales.<sup>37</sup>

Por ejemplo, a partir del análisis de estas cinéticas de amplificación puede calcularse el número de copias que existía en un principio en la muestra de interés, lo cual permite determinar con bastante precisión los niveles de infección de la misma. Al tratarse de un patógeno de naturaleza viral, la estimación de la carga viral, es importante para poder identificar la efectividad de la terapia que se aplicó. *Ilustración 10-12*<sup>36,37</sup>

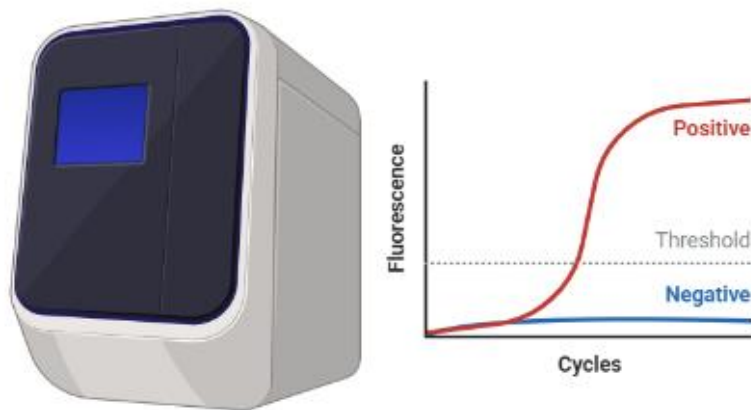


Ilustración 12. Equipo PCR Real-time y lectura. Elaboración propia

Además, la PCR real time se ha empleado últimamente en la detección y cuantificación de la carga de *Porphyromonas gingivalis* en placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica.<sup>36,37</sup>

### 3.2.- Secuenciación masiva

La secuenciación masiva aplicada a la microbiología se puede realizar secuenciando pequeños fragmentos del ácido desoxirribonucleico (ADN) o amplicones previamente amplificados (targeted sequencing) o bien secuenciando todo el ADN previamente fragmentado de forma aleatoria (shot-gun sequencing).<sup>30</sup>

La aproximación del targeted sequencing permite obtener la secuencia del mismo gen en muchas muestras; por ejemplo, en el caso de genes considerados relojes moleculares como los genes ARNr 16S y 18S, este análisis revela la composición microbiana de cada muestra bacteriana y fúngica.<sup>30</sup>

Mediante, el shot gun sequencing puede obtenerse el genoma completo de una bacteria. El conocimiento del genoma facilita la detección de diferencias como mutaciones entre genomas, lo que es de gran utilidad en la identificación de los mecanismos de resistencia a antibióticos y en estudios de epidemiología molecular, así como de filogenética.<sup>30</sup>

Por otra parte, un experimento de secuenciación masiva consta de cuatro etapas principales las cuales son: la extracción del ADN de la muestra o aislado, la preparación de las bibliotecas o librerías, la secuenciación propiamente dicha y el análisis bioinformático e interpretación de resultados.<sup>30</sup>

Es importante tomar en cuenta que antes de introducir una muestra en el secuenciador, es necesario la preparación de bibliotecas o librerías de un tamaño determinado, es decir hay que preparar los fragmentos que van a ser secuenciados. Ello implica fragmentar el ADN por métodos bioquímicos (enzimáticos) o físicos (nebulización o ultrasonido), o bien amplificar fragmentos del ADN (por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)).<sup>30</sup>

Posteriormente, se realiza el marcado de dichos fragmentos con índices para poder secuenciar a la vez múltiples muestras.<sup>30</sup>

### **3.3.- Hibridación in situ fluorescente (FISH)**

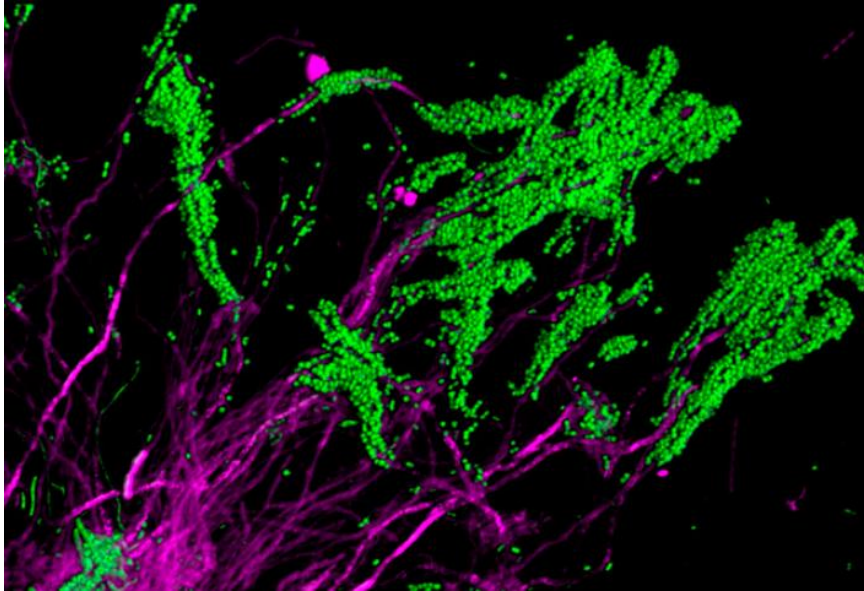
Antes de comenzar a hablar sobre el CLASI-FISH, es necesario tomar en cuenta que el FISH es conocido como la hibridación in situ con fluorescencia que utiliza sondas de oligonucleótidos dirigidas al ARN ribosómico, el cual ha demostrado ser una herramienta eficaz para la identificación, cuantificación y análisis espacial de microbios in situ.<sup>38,39</sup>

Es por eso que actualmente, el CLASI-FISH es el nuevo método de análisis de imágenes de fluorescencia y etiquetado biológico que es aplicado a la identificación simultánea de decenas a potencialmente cientos de taxones microbianos en una sola imagen de microscopio por FISH.<sup>38,39</sup>

Esta técnica de CLASI-FISH implica el marcaje de un determinado tipo de microorganismo con dos o más fluoróforos que son moléculas que emiten fluorescencia después de ser excitadas con luz. Con este enfoque de etiquetado combinatorio ampliamos en gran medida el número de diferentes tipos de microbios distinguibles en un campo de visión.<sup>38,39</sup>

Por otra parte, los protocolos específicos a seguir para la técnica del CLASI-FISH se dividen en cuatro pasos. El primero es la recolección y fijación de muestras, por lo general los organismos Gram negativos se fijan en paraformaldehído y los organismos Gram positivos se fijan en alcohol etílico o metílico.<sup>38,39</sup>

El segundo paso a seguir es la hibridización, la cual se puede realizar mediante dos estrategias. La primera es mediante la síntesis de dos o más versiones de la misma sonda de oligonucleótidos, cada versión conjugada con un fluoróforo diferente. Mientras que la segunda opción es mediante la síntesis de dos o más secuencias de oligonucleótidos diferentes, para marcar un organismo en particular en el contexto de su comunidad, cada secuencia de sonda se dirige a una parte diferente del ARNr 16S.<sup>38,39</sup>



*Ilustración 13. Realización de FISH en placa subgingival, se observan en verde los Streptococcus y en morado Corynebacterium. Elaboración propia*

El tercer paso a seguir es la adquisición de imágenes espectrales que consiste en coleccionar y procesar información en frecuencias específicas del campo electromagnético con el objetivo de obtener el espectro para cada píxel en la imagen de una escena.<sup>38,39</sup>

Finalmente, el cuarto paso a seguir es el análisis de la imagen, en donde una vez que se registra la imagen espectral, se identifica en cada píxel de la imagen, la composición de fluoróforos de la señal registrada. *Ilustración 13.*<sup>38,39</sup>

## 4.-Referencias bibliográficas

1. Negroni M, Aceto C, Alpuche Aranda C, Bernat MI, Bonvehí P, Carnovale S, et al. Bacteriología. In: Aceto C, Alpuche C, Bernat M, Bonvehí P, Carnovale S, Domenech M, et al., editors. Microbiología Estomatológica Fundamentos y guía práctica . 2nd ed. Argentina : Editorial médica panamericana ; 2009. p. 11–77.
2. Berlanga M, Guerrero R. La complejidad de lo simple: la célula bacteriana. Redalyc. 2017 ;16(2):1–10. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/863/86352507003.pdf>
3. Cruz S, Días P, Arias D, Mazón G. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad oral. Rev Cubana Estomatol.2017;54(1):1–10. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/316062532\\_Microbiota\\_de\\_los\\_ecosistemas\\_de\\_la\\_cavidad\\_oral](https://www.researchgate.net/publication/316062532_Microbiota_de_los_ecosistemas_de_la_cavidad_oral)
4. Wang J, Li D, Wang J, Zhang Z. Human oral microbiome characterization and its association with environmental microbiome revealed by the Earth Microbiome Project. Microbiome Project. 2019 ;12;1–14. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/732123v1>
5. Hammond LR, White ML, Eswara PJ. ¡vIVA la DivIVA! Journal of Bacteriology. 2019;201(21):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1128/JB.00245-19>.
6. Megrian D, Taib N, Witwinowski J, Beloin C, Gribaldo S. One or two membranes? Diderm Firmicutes challenge the Gram-positive/Gram-negative divide. Mol Microbiol. 2020 ;113(3):659–71. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mmi.14469>
7. Becerra SC, Roy DC, Sanchez CJ, Christy RJ, Burmeister DM. An optimized staining technique for the detection of Gram positive and Gram negative bacteria within tissue. BMC Res Notes .2016;9(1):1–10. Available from: <https://bmresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-016-1902-0>
8. MELLA M S. Avances terapéuticos contra infecciones producidas por especies Gram positivas resistentes. Revista chilena de infectología. 2002;19:237–46. Available from: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182002019300015&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182002019300015&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
9. Samper S, González-Martin J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones causadas por el género Mycobacterium. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2018; 36(2):104–11. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-diagnostico-microbiologico-infecciones-causadas-por-S0213005X17303695>
10. González-Martin J. Microbiología de la tuberculosis. Seminarios de la Fundación Española de Reumatología. 2014;15(1):25–33. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-seminarios-fundacion-espanola-reumatologia-274-articulo-microbiologia-tuberculosis-S1577356614000025>
11. Picazo JJ. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias. In: Picazo J, Casal M, Guerrero A, editors. Available from: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia9.pdf>

12. Dorronsoro I, Torroba L. Microbiología de la tuberculosis. *Revista Scielo*. 2007;30(2):67–84. Available from: [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272007000400006](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272007000400006)
13. Welch JLM, Dewhirst FE. Biogeography of the Oral Microbiome: The Site-Specialist Hypothesis HHS Public Access. *HHS Public Access*. 2019; 73:1–27. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7153577/pdf/nihms-1562137.pdf>
14. He J, Li Y, Cao Y, Xue J, Zhou X. The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. *Folia Microbiol (Praha)*. 2015;60(1):69–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25147055/>
15. Yamashita Y, Takeshita T. The oral microbiome and human health. *J Oral Sci*. 2017 [cited 2022 Dec 9];59(2):201–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28637979/>
16. Xiao J, Fiscella KA, Gill SR. Oral microbiome: possible harbinger for children’s health. *International Journal of Oral Science* 2020 12:1. 2020 ;12(1):1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41368-020-0082-x>
17. Quintana S, Sjostrom P, Socarrás D, Baldeón G. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. *Scielo*. 2017. Available from: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75072017000100008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072017000100008)
18. Hitz I, Lambrecht T, Fistarol S. Enfermedades víricas y bacterianas de la mucosa oral. *Quintessence*. 2010;23(9):439–46. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-quintessence-9-articulo-enfermedades-viricas-bacterianas-mucosa-oral-X0214098510884339>
19. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microorganismos en cavidad bucal. In: Murray P, Rosenthal K, Pfaller M, editors. *Microbiología médica* [Internet]. Novena Edición. Elsevier ; 2010. p. 1–26. Available from: [https://www.berri.es/pdf/MICROBIOLOG%C3%8DA%20M%C3%89DICA%20\(Libro%20+%20eBook\)/9788491138082](https://www.berri.es/pdf/MICROBIOLOG%C3%8DA%20M%C3%89DICA%20(Libro%20+%20eBook)/9788491138082)
20. Murray PR 1948, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiología médica* . Elsevier; 2021. Available from: [https://www.berri.es/pdf/MICROBIOLOG%C3%8DA%20M%C3%89DICA%20\(Libro%20+%20eBook\)/9788491138082](https://www.berri.es/pdf/MICROBIOLOG%C3%8DA%20M%C3%89DICA%20(Libro%20+%20eBook)/9788491138082)
21. Zhu S, Viejo-Borbolla A. Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence*. 2021 [cited 2023 May 3]; 12:1–33. Available from: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1982373>
22. Levin MJ, Weinberg A, Schmid DS. Herpes Simplex Virus and Varicella-Zoster Virus. *Microbiol Spectr*. 2016;4(3). Available from: <https://journals.asm.org/journal/spectrum>
23. Chatterjee K, Das P, Chattopadhyay NR, Mal S, Choudhuri T. The interplay between Epstein-Bar virus (EBV) with the p53 and its homologs during EBV associated malignancies. *Heliyon*. 2019 ;5(11):e02624. Available from: [/pmc/articles/PMC6893087/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6893087/)
24. Hitz Lindenmüller I, dent med, Thomas Lambrecht J, med dent med, Fistarol SK. Enfermedades víricas y bacterianas de la mucosa oral. Available from:

- <https://www.elsevier.es/es-revista-quintessence-9-articulo-enfermedades-viricas-bacterianas-mucosa-oral-X0214098510884339>
25. D'Enfert C, Kaune AK, Alaban LR, Chakraborty S, Cole N, Delavy M, et al. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. *FEMS Microbiol Rev*. 2021;45(3):1–55. Available from: [/pmc/articles/PMC8100220/](https://pmc/articles/PMC8100220/)
  26. Mark Welch JL, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of the Oral Microbiome: The Site-Specialist Hypothesis. *73*:335–58. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-micro-090817-062503>
  27. Ponde NO, Lortal L, Ramage G, Naglik JR, Richardson JP. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. *Crit Rev Microbiol*. 2021;47(1):91–111. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33482069/>
  28. Garza U, Silva J, Romero E. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *51*(3):439-46. Available from: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342009000900009](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342009000900009)
  29. Lappalainen T, Scott AJ, Brandt M, Hall IM. Genomic Analysis in the Age of Human Genome Sequencing. *Cell*. 2019;177(1):70–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30901550/>
  30. Hernández M, Quijada NM, Rodríguez-Lázaro D, Eiros JM. Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis. *Rev Argent Microbiol*. 2020;52(2):150–61. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754119300811>
  31. Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annu Rev Pathol*. 2019;14:319–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30355154/>
  32. Bonilla G, Souza V, Eguarte L. Metagenómica, Genómica y Ecología molecular: La nueva ecología en el Bicentenario de Darwin. *Químico-Biológicas. Tip Revista Especializada en Ciencias*. 2008;11(1):41–51. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43211943005>
  33. Schlaberg R, Chiu CY, Miller S, Procop GW, Weinstock G. Validation of Metagenomic Next-Generation Sequencing Tests for Universal Pathogen Detection. *Arch Pathol Lab Med*. 2017 ;141(6):776–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28169558/>
  34. Medina Medina SS. Métodos de diagnóstico molecular en la práctica odontológica: Revisión de literatura. Universidad Católica de Cuenca. 2021; Available from: <https://dspace.ucacue.edu.ec/handle/ucacue/11365>
  35. Pinos P, Cuenca K, Orellana P, Andrade C. Métodos de diagnóstico microbiológico desde el punto de vista odontológico microbiological diagnostic methods from a dental point of view .Available from: [https://www.researchgate.net/publication/359545897\\_METODOS\\_DE\\_DIAGNOSTICO\\_MICROBIOLOGICO\\_DESDE\\_EL\\_PUNTO\\_DE\\_VISTA\\_ODONTOLOGICO\\_MICROBIOLOGICAL\\_DIAGNOSTIC\\_METHODS\\_FROM\\_A\\_DENTAL\\_POINT\\_OF\\_VIEW](https://www.researchgate.net/publication/359545897_METODOS_DE_DIAGNOSTICO_MICROBIOLOGICO_DESDE_EL_PUNTO_DE_VISTA_ODONTOLOGICO_MICROBIOLOGICAL_DIAGNOSTIC_METHODS_FROM_A_DENTAL_POINT_OF_VIEW)

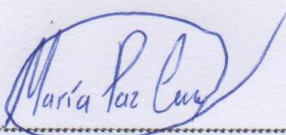
36. Feijóo DS, Tacuri CA, León KC, Bravo PO. Sensibilidad y especificidad de pruebas moleculares en odontología. *Revista de la Asociación Dental Mexicana*. 2021;78(2):90–4. Available from: [www.medigraphic.com/admwww.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.com/admwww.medigraphic.org.mx)
37. Rodríguez Luis Y, Salazar Lenys B, Djibeyan Pablo D. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA INVESTIGACIÓN EN ODONTOLOGÍA Y BIOLOGÍA ORAL (1a PARTE). *Odontología Activa Revista Científica*. 2018;3(1):29–36. Available from: <https://oactiva.ucacue.edu.ec/index.php/oactiva/article/view/146/187>
38. Valm AM, Mark Welch JL, Borisy GG. CLASI-FISH: Principles of Combinatorial Labeling and Spectral Imaging. *Syst Appl Microbiol*. 2012 ;35(8):496. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3407316/>
39. Welch JLM, Rossetti BJ, Rieken CW, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Feb 9;113(6):E791–800. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26811460/>



**Autorización de publicación en el repositorio institucional**

**María Paz Guerrero Peláez** portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0105774517**. En calidad de autor/a y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación **APLICACIONES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN ODONTOLOGÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS. CAPITULO DEL LIBRO** de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 3 de julio de 2023

F: 

**María Paz Guerrero Peláez**

**C.I. 0105774517**