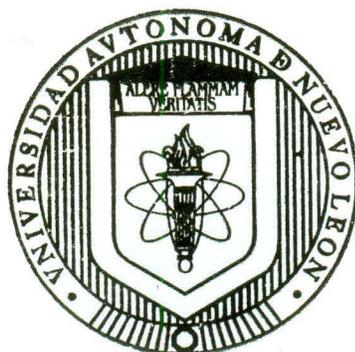


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DETECCION DE *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* Y
ANALISIS DE LA EXPRESION GENICA DE LOS
FACTORES DE VIRULENCIA DE PG0520, PG0538
Y PG0128 EN PACIENTES CON PERIODONTITIS
CRONICA

POR

M.C. MYRIAM ANGELICA DE LA GARZA RAMOS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN BIOTECNOLOGIA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. OCTUBRE DE 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Detección de *Porphyromonas gingivalis* y análisis de la expresión
génica de los factores de virulencia de PG0520, PG0538 y PG0128 en pacientes
con periodontitis crónica

POR

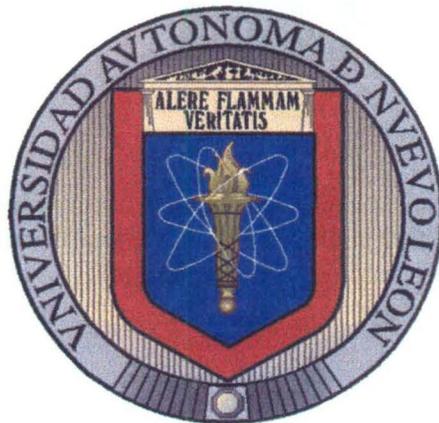
M.C. MYRIAM ANGÉLICA DE LA GARZA RAMOS

Como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

San Nicolás de los Garza, N. L.

Octubre de 2008

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. LUIS J. GALÁN WONG Y DEL DR. BENITO PEREYRA ALFÉREZ EN EL LABORATORIO 4 DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, PERTENECIENTES A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Detección de *Porphyromonas gingivalis* y análisis de la expresión génica
de los factores de virulencia PG0520, PG0538 y PG0128 en pacientes
con periodontitis crónica

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias con
especialidad en Biotecnología

Presenta

M .C. Myriam Angélica De La Garza Ramos

Dr. Luís J. Galán Wong
Director de Tesis

Dr. Benito Pereyra Alférez
Secretario

Dra. Lilia H. Morales Ramos
Vocal

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera
Vocal

Dra Myriam Elías Santos
Vocal

San Nicolás de los Garza, N.L.

Octubre 2008

DEDICATORIAS

A mi Madre por todo su apoyo INCONDICIONAL en todos los momentos de mi vida, y muy especialmente durante la realización de mi doctorado, que de no ser así, este hubiera sido imposible de realizar, por todo su afecto, cariño, fe y confianza, a ti te dedico este trabajo. Gracias por tener esos momentos importantes en mi vida y por hacerme sentir segura de mi misma... Te quiero...CP. Olivia Ramos Ruvalcaba.

A mi Padre † Dr. Héctor Edmundo De La Garza Montemayor. Que en vida me diste todas las herramientas para lograr mi desarrollo académico, profesional, moral y que viviste conmigo con verdadera pasión todo lo que hice, quien siempre me enseñó a soñar y a saber que lo único que limita al ser humano es el mismo ser humano, que todo lo que quieras alcanzar si tu te lo propones lo puedes lograr... así que estas conmigo en todas partes....cuidándome, protegiéndome, e inspirándome siempre.... Gracias, Padre.

A mis hijos Ianpaul Maroli Fematt De La Garza y Dana Michelle Fematt De La Garza, quienes desde su llegada han sido un motor en mi vida, y una fuente de inspiración.

A Mi esposo Robbin Paul Fematt Pérez, quien gracias a su apoyo y comprensión me ha dado confianza y seguridad en mi misma.

CONTENIDO

	Página
1.- INTRODUCCION	1
2.- HIPÓTESIS	3
3.- OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS	4
4.- ANTECEDENTES	6
4.1.- Gingivitis	6
4.2.- Periodontitis	7
4.3.- Clasificación de la enfermedad periodontal	8
4.4.- Principales bacterias asociadas a la enfermedad periodontal	9
4.5.- Interacción de las bacterias en la enfermedad periodontal	10
4.6.- Expresión génica de <i>P. gingivalis</i> con las células epiteliales humana	17
4.7.- Transferencia conjugativa de cromosomas	17
4.8.- Variación génica	18
4.9.- Gen <i>Lux S</i>	19
4.10.- Monitoreo de expresión de genes en cultivos mixtos	20
5.- MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1.- Cepas y condiciones del cultivo	22
5.2.- Diseño de los iniciadores	22
5.3.- Universo de trabajo y toma de la muestra	23
5.4.- PCR de cultivos puros y muestras clínicas	24
5.5.- PCR Tiempo real	27
6.- RESULTADOS	30
7.- DISCUSIÓN	36
8.- CONCLUSION	37
9.- LITERATURA CITADA	39
10.- APÉNDICE A	48
11.- APÉNDICE B	51
12.- APENDICE C	52

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
1	Paciente masculino con gingivitis	6
2	Paciente masculino que presenta un cuadro característico de periodontitis	7
3	Diagrama de evaluación clínica utilizando sonda periodontal	7
4	Diagrama de sucesos clínicos en la encía posterior a la invasión bacteriana.	9
5	Complejos microbianos	10
6	Interacción entre bacterias	10
7	Toma de la muestra.	23
8	Amplificación de ADN en especies de <i>P.gingivalis</i> y <i>S.intermedius</i> a partir de muestras	33
9	Amplificación de ADN en especies de <i>P.gingivalis</i> y <i>S.intermedius</i> y <i>P.intermedius</i>	33

CAPILLA ALFONSINA
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Clasificación de la periodontitis	8
2	Principales bacterias asociadas con la periodontitis.	9
3	Microorganismos comunes aislados del periodonto sano y enfermo	21
4	Listado de microorganismos con los que se comparó los gen del ARNr 16S.	23
5	Oligonucleotidos utilizados en PCR Multiplex	25
6	Iniciadores utilizados para realizar PCR de genes de virulencia de <i>p.gingivalis</i>	26
7	Lista de iniciadores de qPCR	27
8	Resultados de PCR multiplex en pacientes pediátricos	32
9	Frecuencia media y desviación estándar de los pacientes pediátricos que dieron señal positiva	33

Resumen

Las bacterias *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus intermedius*, son consideradas pieza clave en la periodontitis y periplantitis. Los análisis de la Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *P. gingivalis* y *S. intermedius* en la periodontitis crónica han sido de utilidad. Un total de 180 muestras, 65 de adultos sin tratamiento, 17 sanos voluntarios y 16 niños fueron tomados y procesados en un paso simple de ebullición para lisar las células como fuente de ADN para utilizarse en ensayos de PCR. Los iniciadores fueron diseñados a partir del gen que codifican para el rRNA 16S, obtenidos del Gen Bank-EMBL database, mostrando una especificidad blanco para las variedades patógenas. El sistema de PCR-múltiplex pudo detectar hasta 8.2 células de *P. gingivalis* y *S. intermedius*. Aunque la periodontitis era presente en 65 pacientes, solamente 78% (51 de 65) dieron positivo a una o ambas bacterias. La presencia de patógenos en las muestras de pacientes fue variable, 37% tenían solamente *P. gingivalis*, 17% solo *S. intermedius* y 25% ambas. Sin embargo, *P. gingivalis* fue detectado en 23.5% de los voluntarios saludables. La distribución de las bacterias fue relacionada también con la profundidad de bolsa, 95.23% tenían profundidad de 6 a 7 mm y fueron positivos para ambos, comparado con 70.45% en 4 a 5 mm de la bolsa. De los pacientes pediátricos de entre 8 a 12 años analizados en este estudio, 31.25% fueron positivos para *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythensis*, 18.75% solo para *S. intermedius*, 12.50% *P. gingivalis* y *S. intermedius*, 6.23% *Taenerella forsythensis* y *S. intermeduis*, *P. gingivalis*, en un 31%. La combinación de *P. gingivalis* y *S. intermedius* fue positiva en un 12% y *T. forsythensis* y *S. intermedius* solo en un 6%. A mayor profunda es la bolas periodontal, mayor asociación de bacterias periodontales, y quedando establecido además que dichas comunidades microbianas pueden aparecer en edades tempranas de la vida aun y que estas pueden no causar enfermedad periodontal durante la infancia. La regulación de los genes *lux S* hasta el momento, han sido medidos solo en cultivos puros en bacterias de la cavidad oral, por ello creemos que es importante, continuar con dichos experimentos en la actualidad

ABSTRACT

Porphyromonas gingivalis and *Streptococcus intermedius* are considered to be the main key piece involved in periodontitis and peri-implantitis. Analysis of Multiplex PCR for the detection of *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus intermedius* in chronic periodontitis have been useful. A total of 180 samples were taken. These were: from 65 adults with untreated periodontitis and 17 healthy volunteers plus 16 children. They were processed in a simple boiling step and cell lysates were used as DNA source for Multiplex PCR tests. Initiators were designed from 16SrRNA gene sequences from the GenBank-EMBL database showing target specificity for pathogenic varieties. Multiplex PCR system could detect 8.2 *P. gingivalis* and *S. intermedius* cells. Even though periodontitis was present in 65 patients, only 78.5% (51 out of 65) were positive for one or both bacteria. The presence of pathogenic varieties in the patients' samples was variable, 37% had only *P. gingivalis*, 17% had just *S. intermedius*, and 25% had both. However, *P. gingivalis* was detected in 23.5% of healthy volunteers. Distribution of these bacteria was also related to the periodontal probing depth, while 95.23% of pockets were 6 to 7mm deep, and resulted positive for both bacteriae, compared to 70.45% in 4 to 5mm pocket. From pediatric patients among ages 8 to 12, analyzed in this study, 31.25% were positive for *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis*, 18.75% resulted positive just to *S. Intermedius*, 12.50% to *P. gingivalis* and to *S. intermedius*, 6.23% to *Tannerella forsythensis* and *S. intermedius*, and to *P. gingivalis* a 31%. The combination of *P. gingivalis* and *S. intermedius* was positive in a 12% while *T. forsythensis* and *S. intermedius* resulted positive just in a 6%. A greater depth is a periodontal pocket, with greater association of periodontic bacteriae, establishing that such microbial communities may appear in early life years even if this may not cause periodontal compromise during childhood. Regulation of lux S genes up to now, have been measured just in pure cultures in bacteria from the oral cavity, this is why we believe that it is important to continue with such experiments and investigations actually.

1.- Introducción

Las enfermedades de la cavidad oral en humanos se encuentran ampliamente distribuidas, calculándose que el 90% de la población mundial padece o ha padecido algún tipo de enfermedad bucal y de éstas, el 80% padecen de Periodontitis (Celeste *et al.*, 1999).

Las lesiones periodontales comprometen una variedad de condiciones que afectan la salud del periodonto (tejidos de soporte del diente). Desde hace tiempo se conoce la relación entre cierto tipo de microorganismos y la enfermedad periodontal. Ésta es caracterizada por los siguientes datos clínicos: a) cambio de coloración en el contorno gingival; b) edema, sangrado al sondeo y cambio en el contorno; c) pérdida de adaptación del tejido al diente y d) aumento de flujo del líquido crevicular. El desarrollo de la gingivitis requiere de la presencia de bacterias presentes en la placa dentobacteriana, donde son altamente predominantes las Gram negativas (Lu y Goldenberg. 2000)

La enfermedad periodontal se divide en aguda y crónica. Ambos tipos inician de la misma manera y se dividen en cuatro fases: a) inicial; b) temprana; c) establecida y d) avanzada.

Entre las principales bacterias asociados a la periodontitis, se encuentran *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticula*, *Streptococcus intermeius*, *Taenerella forsythia* y *Prevotella intermedia*.

Con la técnica de microarreglos ahora es posible medir los niveles de expresión (transcripción) de cientos de genes de manera simultanea (Schen *et al.*, 2005). Chen y colaboradores compararon dos variedades de *P. gingivalis* W50 y *P. gingivalis* ATCC33277 (en adelante denominaremos solo 33277) la expresión genética de ambos tienen tan solo 7% de similitud entre la variedad virulenta (W 50) y avirulenta (33277), lo cual confirma la cualidad de la prueba con respecto a otro tipo de experimentos utilizados anteriormente. La intención de aplicar los microarreglos es mostrar e identificar con mas claridad genes de *P. gingivalis* y si estos son regulados por algún "quorum sensing" y establecer su función en la enfermedad periodontal (Chen *et al.*, 2005).

Es importante aclarar que estos resultados fueron obtenidos en condiciones controladas y cultivo puro. Sin embargo, es claro que la cavidad oral alberga a más de quinientos tipos de microorganismos, por tanto, la expresión genética podría ser distinta en cultivo puro que en compañía de algún(os) otro(s) microorganismo. En este sentido, nos preguntamos, ¿la expresión genética será la misma en estado puro que en cultivos mixtos?; ¿los niveles de expresión de los genes "quorum sensing" será tan variable que podamos identificar los niveles de expresión?

2.- Hipótesis

Existe relación directa entre la periodontitis crónica y la presencia de *P. gingivalis* en adultos, pero no en niños. Así mismo, existe variación en la expresión génica en cultivos mixtos de bacteriana asociadas con periodontitis.

BIBLIOTECA MUSEO DE LA CIENCIA
LAFILLA ALFONSINA

28

3.- Objetivo General

Demostrar la presencia de *P. gingivalis* y *Streptococcus intermedius*, en pacientes con periodontitis crónica y evaluar la expresión de genes involucrados en el *quórum sensing* en cultivos mixtos.

Objetivos Específicos:

1. Diseño de iniciadores y del programa para la amplificación génica por PCR punto final para la detección específica de *P. gingivalis* y *Streptococcus intermedius* en muestras clínicas
2. Diseño iniciadores y sistema de detección por qPCR de los genes PG0520, PG0538 y PG0128 identificados como de virulencia e involucrados en el *quórum sensing* de *P. gingivalis* W y 33277
3. Diseñar un sistema de cultivos mixtos de *P. gingivalis* y *S. intermedius*
4. Evaluar la expresión de *P. gingivalis* en los genes de virulencia PG0520, PG0538 y PG0128 de en cultivos puros y mixtos con *Streptococcus intermedius*.

IMPORTANCIA Y ORIGINALIDAD

Los primeros estudios realizados en este país en materia molecular, datan de 1995 (Chávez y Juárez 1995) en los cuales se demostró una relación entre bacterias como *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *S. intermedius* en muestras de pacientes con Periodontitis, en ese entonces llamada del adulto en muestras relativamente pequeñas (150 pacientes adultos y 16 niños). En la actualidad, solamente algunas universidades (UANL, UASLP, UAY y UNAM) han realizado estudios descriptivos en pequeñas poblaciones de nuestro país, demostrando la presencia de este grupo de microorganismos en pacientes con la enfermedad. Por tanto, estamos en la posibilidad de identificar el genotipo y analizar la expresión génica en tejidos obtenidos de pacientes tratados quirúrgicamente en la clínica de periodoncia de la Facultad de Odontología y tejidos de pacientes sanos que acuden a la clínica de cirugía de la misma facultad para poder establecer diferencias en ambos. Esto nos coloca en la posición de proporcionar el tratamiento oportuno de dicha afección, ya que esta causa pérdida de la función masticatoria y digestiva del paciente.

JUSTIFICACIÓN

Los avances científicos y tecnológicos en las herramientas moleculares tipo PCR punto final y qPCR, nos permite detectar oportunamente a agentes patógenos responsables de la enfermedad periodontal crónica. Con esto, nosotros propondríamos contestar las siguientes preguntas de investigación: ¿Las técnicas moleculares tipo PCR pueden determinar la cantidad y el tipo de microorganismos presentes en la enfermedad periodontal crónica?, ¿Podremos comparar genes de personas sanas y personas enfermas de periodontitis crónica y así, poder establecer diferencias génicas entre ellos?. Una vez encontrada esta información, ¿Será posible hacer que ciertas células en cultivo expresen estos mismos genes en presencia de dichos microorganismos presentes en la enfermedad periodontal?. De encontrar respuesta a estas preguntas, el Instituto de Biotecnología en colaboración con la Facultad de Odontología (UANL), The Forsythus Institute (Boston, EUA); University of Melbourne (Australia), podrán desarrollar en México estudios de vanguardia a nivel mundial que eleven la calidad y especificidad del tratamiento periodontal y elevar la investigación a un plano de primer nivel por la demanda urgente de esta información que beneficiará el prestigio de todas las instituciones participantes.

4.- ANTECEDENTES

Gingivitis: Es la inflamación del tejido gingival o encía y es la forma más frecuente de la enfermedad gingival, ya que la placa dentobacteriana y los factores irritantes que favorecen su acumulo producen dicha inflamación.

Existe evidencia de que la gingivitis puede progresar y desarrollar la periodontitis. Esta evidencia fue ilustrada en diferentes estudios realizados en la Universidad de Chicago, en los cuales se demuestra la susceptibilidad y el riesgo que tiene la no eliminación de la placa dentobacteriana y el tártaro, por lo tanto, la gingivitis puede desencadenar una periodontitis (Fig.1).

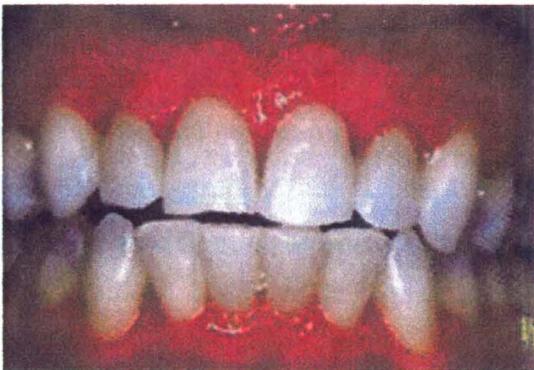


Figura 1 Paciente masculino con gingivitis, se aprecia claramente el enrojecimiento y la pérdida de textura de cáscara de naranja que caracteriza una encía sana

Periodontitis: Es causada por acumulo de bacterias en las áreas gingivales. Ésta es un complejo de flora subgingival que contiene más de 250 especies, también llamada complejo proteína-patógeno y éste ha tomado mucho interés en los últimos años. *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *S. intermedius*, entre otros, son algunos de los patógenos que han tomado una fuerte vinculación con las enfermedades periodontales (Fig. 2) (Tanner *et al.*, 2002). Diferentes reportes han recomendado considerar a muchas de estas bacterias para reforzar el diagnóstico de la enfermedad y poder seleccionar y evaluar la terapia; en tratamientos de casos difíciles para su predicción de algunas lesiones (Slots y Genco. 1984). Recientes estudios, en pacientes tratados con periodontitis avanzada y moderada, sugiere que el incremento de los depósitos en el interior de la bolsa periodontal, éstos estuvieron sujetos a un incremento de la bolsa con *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia* que pueden predisponer de un incremento en el grado de la avería periodontal (Socransky y Haffajee. 1997).



Figura 2 Paciente masculino que presenta un cuadro característico de periodontitis crónica donde se aprecia la falta de los órganos dentales y falta de textura de la encía

El objetivo de la remoción y debridación de las raíces de los dientes, es la de retirar la placa y los microorganismos contaminantes del cemento y reducir el número de patógenos en la bolsa periodontal para bajar los niveles de inductores de la enfermedad (Fig. 3). Esto fue mostrado en bolsas periodontales activas, la contiene la flora microbiana y esta cambia de proporción de "enferma" a "sana" durante el tratamiento (Slots. 1997; Socransky. 1997). Los niveles de potencial patógeno dados por *P. gingivalis* y *P. intermedia* fueron significativamente reducidos después de la terapia.



Figura 3 Diagrama de evaluación clínica utilizando sonda periodontal que mide niveles de inserción para evaluar la pérdida de estructura de soporte del diente.

Estudios recientes de cultivos donde fueron detectados *P.gingivalis* muestran que es detectable en edades antes de la pubertad. Mucha información sobre el establecimiento y acción de periodonto patógenas pueden ayudar a dilucidar la naturaleza histórica del desarrollo de las enfermedades periodontales y pueden proveer de información para la prevención y desarrollo de la periodontitis crónica (Celeste *et al.*, 1999).

La Caries dental es considerada como una enfermedad infecciosa, colonizada principalmente por patógenos antes de que ocurra la lesión. Mejores métodos microbiológicos sugiere que la colonización de bacterias patógenos relacionados con caries y enfermedad periodontal aparecen antes del desarrollo de las enfermedades (Tanner *et al.*, 2002). Aunque la enfermedad periodontal es rara en niños, el estudio de la flora es importante para comprender el proceso de desarrollo de los patógenos en la edad adulta. Estudios clínicos revelan la relación que se da entre *Porphyromonas gingivalis*, y *Streptococcus intermedius* en la enfermedad periodontal. Aunque es poca la información del proceso de estos en la enfermedad. Estudios de la detección de estas bacterias antes de la pubertad pueden ayudar a comprender e identificar cuales son los factores en el niño que favorecen en la prevalencia del desarrollo de las enfermedades para disminuir el riesgo de sufrirla. (Mager *et al.*, 2003).

Clasificación de la Enfermedad Periodontal: La enfermedad periodontal ha sido clasificada de acuerdo a su localización, edad y diferentes factores sistémicos, así podemos considerar cinco tipos que a su vez se divide en grupos, como podremos observar en el Tabla 1.

Tabla 1 Clasificación de la Periodontitis

1. Periodontitis crónica	3. Periodontitis asociada con enfermedades sistémicas
A. Incipiente	
B. Moderada	
C. Avanzada	
2. Periodontitis de aparición temprana	4. Periodontitis Ulcero Necrotizante Aguda (GUNA)
A. Periodontitis prepuberal	5. Periodontitis refractaria
Generalizada	
Localizada	
B. Periodontitis juvenil	
Generalizada	
Localizada	
C. Periodontitis progresiva rápida	

Características patológicas generales: El desarrollo de la virulencia es un proceso multifactorial, por lo tanto, para que un microorganismo produzca periodontitis debe de contar con lo siguiente (Fig. 4): 1) Alojamiento inicial y crecimiento en el medio ambiente periodontal; 2) Resistencia inmunológica y 3) Producción de tejidos dañados.

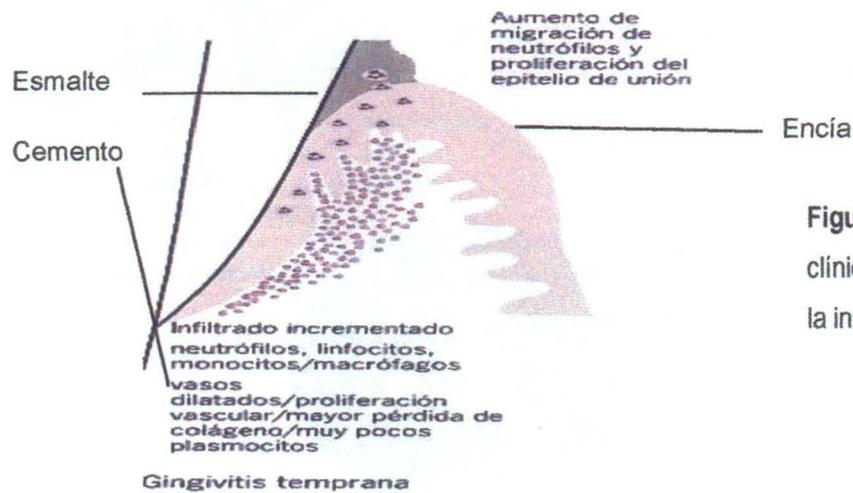


Figura 4. Diagrama de sucesos clínicos en la encía, posterior a la invasión bacteriana.

De acuerdo al tipo de enfermedad se ha logrado identificar ciertos de microorganismos asociados a cada una de estas (Tabla 2) (Socransky y Haffajee. 1997). Las cuales actúan en asociaciones o complejos, formando consorcios microbianos que desarrollan la enfermedad (Fig. 5). Estos consorcios son una comunidad interdependiente basada en aspectos bioquímicas del catabolismo (Fig. 6).

Tabla 2 Principales bacterias asociadas con la periodontitis

Tipo de periodontitis	Bacterias Asociados
Periodontitis Crónica	<i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>T. forsythensis</i> , <i>Conpilobacter rectus</i> , <i>S. intermedius</i>
Periodontitis Refractaria	<i>T. forsythensi</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>Compilobacter . rectus</i> , <i>P. Intermedia</i>
Periodontitis Juvenil	<i>Capnocytophaga</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i>
Periodontitis del diabético	<i>Capnocytophaga</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>P. gingivalis</i>
Gingivitis del embarazo	<i>P. intermedia</i>
Gingivitis Ulcero Necrotizante Aguda (GUNA)	<i>P. intermedia</i> , Espirales

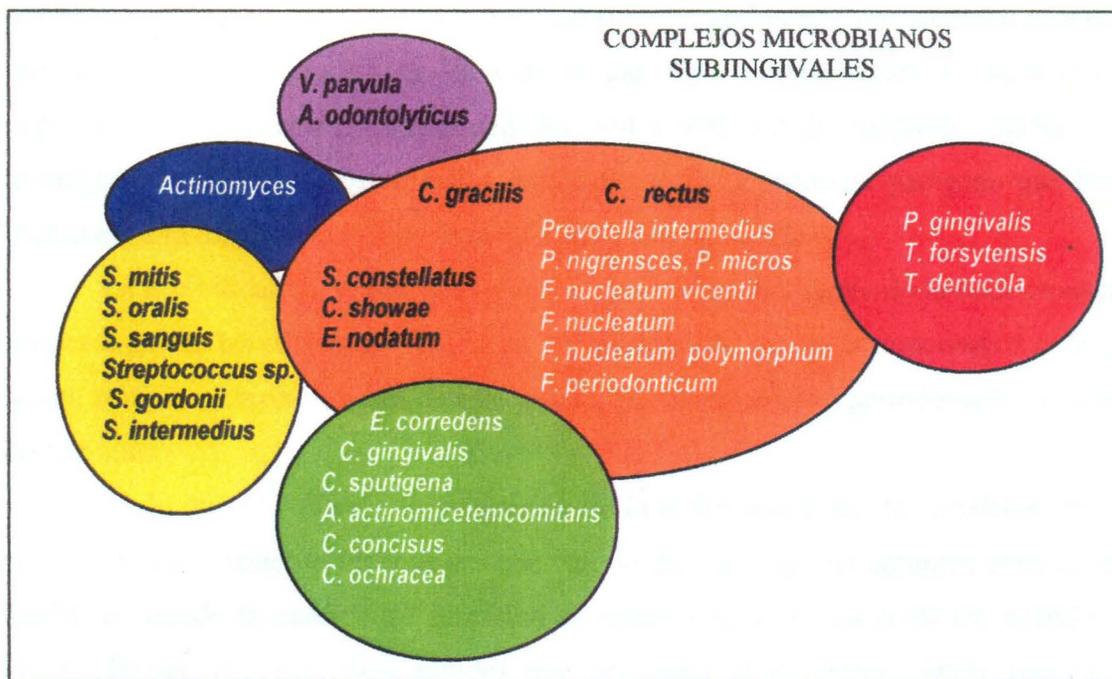


Figura 5. Complejos Microbianos. Resultado de 13,261 muestras de 185 pacientes analizados por pruebas de hibridación de DNA-DNA. Los complejos de izquierda comprenden especies que se supone colonizan la superficie dental Morado, Amarillo y Púrpura. El complejo Naranja y Rojo es más dominante. (Socransky et al., 1997).

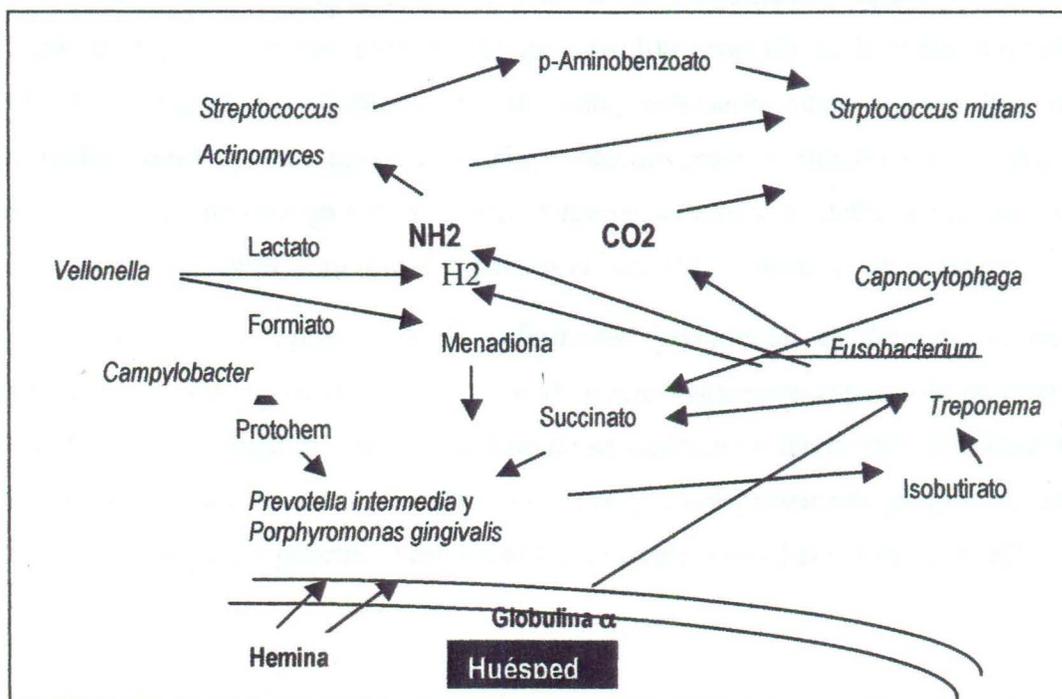


Figura 6. Interacción entre bacterias e interacción nutricional del hospedador que influyen en el desarrollo y maduración de la placa subgingival (Lindhe 2003)

Para relacionar la etiología bacteriana con la enfermedad periodontal nos hemos basado en diferentes factores como: 1) Identificación de los microorganismos asociados con los diferentes estadios de la enfermedad; 2) La eliminación o supresión de organismos destruyendo los tejidos dañados; 3) La respuesta del hospedero asociado con la enfermedad; 4) Modelos animales infectados y 5) El potencial patógeno que puede contribuir a la formación de la enfermedad en forma inmediata.

La morbilidad en el mundo, muestra que las enfermedades de la boca ocupan el primer lugar de las enfermedades (caries dental, la gingivitis, la periodontitis y el herpes labial, son un ejemplo) Dentro de este género, las enfermedades periodontales ocupan el primer sitio.

En lo que se refiere a la progresión de la enfermedad, existen modelos clínicos acerca de la actividad de las lesiones que van desde un rango de continuo avance de la lesión, en donde la pérdida de inserción se observa en una tasa lenta en periodos de tiempo largos, con episodios rápidos que presentan lo contrario, rápida pérdida de inserción (Turhan, 2000). Esto no indica que el mecanismo que influye sobre la patogénesis de la enfermedad periodontal puede darse en diferentes sitios y tiempos.

Está ampliamente aceptada la presencia de microorganismos capaces de producir este tipo de lesiones. Se han identificado más de 300 especies de bacterias presentes dentro de las bolsas periodontales; no obstante, solamente unas cuantas han sido identificadas como agentes etiológicos. Hay constituyentes o metabolitos bacterianos capaces de causar cambios en los mecanismos homeostáticos y de defensa causando una progresión de las lesiones, o su inicio según sea el caso (Miissailidis *et al.*, 2004).

Es decir, la patogénesis de la enfermedad periodontal es dependiente de la virulencia, como también de la concentración de microorganismos capaces de producirla. Hay dos bacterias patógenas que principalmente se infiltran en los tejidos periodontales, éstas son: *Actinobacillus actinomycetenscomitans* y *Porhpyromonas gingivalis*, éstos invaden tejido epitelial y penetran también al tejido conectivo (El-Bastawissi, 2000).

Un punto importante sobre estos invasores es su capacidad para evitar los mecanismos de defensa del huésped, los cuales ordinariamente evitan infecciones y previenen la aparición de estos problemas. En el periodonto, estos mecanismos están representados por neutrófilos asistidos por anticuerpos y proteínas de complemento (Von Minckwitz, 1999). Una vez que la concentración de patógenos alcanza cifras en donde el organismo no pueda mantener una respuesta efectiva contra ellos, se presenta la destrucción del periodonto, esto en presencia de la placa subgingival.

Desde hace algunos años, la microbiología oral ha ido perfeccionando la manera de prevenir o caracterizar a los agentes microbianos sospechosos de la enfermedad periodontal y la caries que se encuentran en la placa dentobacteriana. (Socransky, 1977; Van Winkelhoff, 1998; Kleinberg, 2002).

La utilización de modelos animales nos ha podido sugerir que *Actinomyces neslundii* (Socransky *et al.*, 1970) se encuentra siempre presente en enfermedades periododontal agresiva, además en estudios realizados desde 1970, demuestran que los organismos presentes en la enfermedad periodontal son principalmente especies de *Bacteroides* (Socransky, 1977).

En la década de los 80's y gracias al comienzo y empleo de las herramientas moleculares para detectar a los agentes microbianos relacionándose a la enfermedad periodontal se logra descubrir que el entonces *Bacteroides melanisingenicus* (hoy *Porphyromonas gingivalis*) como uno de los microorganismos responsables de la misma, ya que además de estar presente, éste tenía la capacidad de ser un organismo intracelular (Slot y Gibbons, 1978).

Los estudios moleculares más recientes sugieren una posible explicación molecular de la relación que existe entre bacterias negras pigmentadas y la virulencia de estos microorganismos (Genco *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2000).

Debido a que *Actynomices neslundii* fue encontrada en placa dentobacteriana de pacientes con pérdida de hueso alveolar desde los 70's (Socransky *et al.*, 1977), ésta ha sido una de las bacterias más antiguamente estudiadas a través de las herramientas genéticas, ya sus fimbrias tipo 1 (Donwrkin *et al.*, 1985) y tipo 2 (Yeung. 1992) aunque no están relacionadas con las bacterias periodontopatógenas si tienen relación con la formación de placa supragingival que condiciona el establecimiento de las otras que si tienen relación con la periodontitis.

Por otra parte, genes asociados con la síntesis de fimbrias (fimA) de *P. gingivalis* (Dickinson *et al.*, 1988) demuestran que éste puede incrementar la virulencia de mismo y así ser considerado un "periodonto patógeno". Hasta 1994, después de estudiar, aislar y caracterizar genes *P. gingivalis* es reconocida como una bacteria monoespecíficamente mutante (Malek *et al.*, 1994).

El reconocimiento de *A. actinomycetemcomitans* como otro germen asociado con diferentes enfermedades periodontales, motiva el estudio genético. Desde que se ha descubierto la habilidad que tiene para su establecimiento, su capacidad para secreción de leucotoxinas y su habilidad para producir elementos tras-reguladores, puede relacionarse con ciertos genes.

En otros estudios de actinomices, se han encontrado variedades de genes reguladores de leucotoxinas que no secretan dichos factores de virulencia, esto nos sugieren seguir profundizando en dichos estudios (Kolodrubetz *et al.*, 1995). Aunque en reportes previos, Meyer y colaboradores (1996) sugieren más bien que la virulencia de *A. actinomycetemcomitans* depende de su capacidad para invadir las células epiteliales del surco gingival, esto fue prácticamente descartado al poco tiempo, ya que la presencia de otras bacterias como *P. gingivalis* encontrado también en las células epiteliales de pacientes saludables, hacen dudoso este fenómeno (Rudney *et al.*, 2001)

Los microorganismos ahora llamados "grupo rojo", es decir, aquellos relacionados más frecuentemente con la enfermedad periodontal (Socransky *et al.*, 1998) implicando como un importante periodontopatógeno a *Bacteroides fosythus* (formalmente *Taenerella forsythensis*), considerando la fisiología y genética de estos organismos lag en comparación a otros dos organismos similares del mismo complejo como *T. denticola* y *P. gingivalis*. Sin embargo, la necesidad de desarrollar modelos animales para demostrar

la pérdida de hueso alveolar, tiene que ser bien establecida para poder utilizar diferentes especies de bacterias como *B. forsythus* mutantes que expresen por ejemplo, superficies de receptores de leucina (leucine-riche receptor) que podrían mostrar dicho fenómeno.

En la nueva era de los microarreglos, las secuencias de oligonucleótidos pueden ser marcadas en matrices de vidrio o polímeros, para el uso e identificación de ARNm molecular, los cuales pueden ser utilizados para probar diferencias entre genomas de bacterias. Estos arreglos fueron desarrollados recientemente y son utilizados para la identificación de genes, los cuales son regulados durante la formación del biofilm (Whiteley *et al.*, 2001) como sucede en otras condiciones del medio ambiente.

Los microarreglos de bacterias orales normalmente no son de fácil disponibilidad en el mercado. Sin embargo, se ha demostrado su utilidad dentro de todas las técnicas moleculares. El Instituto Nacional Dental (National Institute of Dental), El Instituto Nacional de Investigación Craneofacial (Craneofacial Research) y el Instituto Investigación Genómica (TIGR) han desarrollado una cantidad limitada de *P. gingivalis* probados en seis diferentes laboratorios de los Estados Unidos y el Reino Unido. Sin embargo, la utilización es limitada, ya que el resultado de la reproducibilidad de los arreglos depende de la combinación del análisis de transcripción directa que depende del acomodo y construcción sobre la calidad del ARN usado para el análisis.

En los últimos años, las compañías comerciales que se dedican a la industria y venta de los microarreglos, se han perfeccionado en la búsqueda de:

- Diagnóstico
- Tratamiento
- Análisis de cepas nativas

Algunas compañías dedicadas a la manufactura de los microarreglos en el área odontológica son:

- Affymetrix Gen Chip ®
- Genologic ®
- Gen Chip ®
- Perkin Elmer Norwalk ™

Esto depende de factores *in vitro* que pudieran en un momento modificarse por el estado de habitat de la bacteria, como se ha demostrado en diferentes publicaciones, en las cuales algunos genes se modifican porque ellos se encuentran bajo otras condiciones ambientales (Chen y Kuramitsu., 2006), genes de glicosilación de proteínas, genes de regulación de condiciones limitadas de hierro (iron-limiting condition) o bacterias heterólogas (Lihui *et al* 2004; Chen y Kuramitsu. 2006) y virus moduladores.

La comparación de los genes de variación de las bacterias han rebelado la homogeneidad de *luxS* que es responsable de la síntesis de moléculas de furanosa. (Bassler, 1999). Esto sugiere que a diferencia de *com-* y *LuxR* en el sistema *quorum-sensing*, *Lux S* puede jugar un rol ("sensing" o señalización) en la presencia de organismos heterólogos. Muchas bacterias tienen que mostrar por experimentos complementarios, o por comparación de base de datos que contengan *LuxS* homólogo. Sin embargo, un examen de *LuxS* mutante de *P. gingivalis* y *S. mutans* son genes no relacionados con la formación de biopelícula en experimentos *in vitro*, como en el caso de *A. actinomycetecomitans* que atenuan su virulencia en otros fenotipos en diferentes investigaciones y laboratorios (Chung *et al.*, 2001; Burgess *et al.*, 2002; Fong *et al.*, 2003). La conexión directa entre diferentes organismos son importantes en la secreción de moléculas de señal, lo cual debe ser de interés en el desarrollo de las técnicas de microarreglos de organismos individuales, con ello podremos acceder al total de los genes complementarios de todas aquellas que interactúan en la formación de la biopelícula.

Diferentes investigaciones en las que se evalúan las interacciones de las bacterias orales, particularmente periodontopatógenas y su actividad en la invasión de células epiteliales, la relación más frecuentemente investigada suele ser la que existe entre *A. actinomycetecomitans* y *P. gingivalis*, las cuales suelen ser controvertidas, ya que se han encontrado también en células epiteliales de pacientes sanos (Rudney *et al.*, 2001).

Ya que tendrán que ser utilizadas herramientas moleculares que expliquen la relación de diferentes mecanismos, tanto de fijación como de invasión a células epiteliales (Lamont *et al.*, 1995; Chung *et al.*, 2001). Particularmente en las fimbrias Fim A y la proteína cisteína en el mecanismo de adhesión, aunque los genes que están implicados en *A. actinomycetemcomitans* no han sido caracterizados, estas fimbrillas aparecen indicadas haciendo interacciones no específicas.

Por otra parte, la información de genes entre organismos presentes en la placa han sido en la actualidad motivo de interés en diferentes investigaciones, ya que desde 1978 la blanco *et al* demostró el intercambio genético entre marcadores relacionados en la resistencia a los antibióticos.

Más recientemente, el examen de la secuencia de nucleótidos de diferentes genes de *P. gingivalis* sugiere que han mostrado la posible transmisión horizontal e inserción de elementos secuencias largas (Califano *et al.*, 2000). En observaciones más recientes, se sugiere que el gen *rag* quizás tenga que ver con posibles factores de virulencia (Ingeroll *et al.*, 2002).

En los últimos años, se han relacionado fuertemente algunos padecimientos sistémicos con enfermedades en boca (Williams. 2000). Aunque ésta tiene que ser demostrada a través de técnicas moleculares que muestren la relación de diferentes mutantes, por ejemplo, de *P. gingivalis* y su inresacción con posibles trastornos cardiovasculares (arterioesclerosis) (Hujoel *et al.*, 2000; Kang y Nassar. 2002). Otras publicaciones sugieren que la potente "gingipain" proteínasa cisteína de organismos puede ser un importante factor agregado (Lamont *et al.*, 2002), además de lipoproteínas de baja densidad. La búsqueda de recientes interacciones entre diferentes trastornos sistémicos tales como arterioesclerosis, nacimientos pretérmino de recién nacidos, diabetes, osteomielitis, artritis y enfermedades neurológicas, obligan a un análisis molecular de los factores de virulencia de la microflora y su relación con otras enfermedades.

Expresión genética de *P. gingivalis* en contacto con las células epiteliales humanas: En recientes estudios efectuados en el Instituto Forsyth por el equipo de investigadores de Yumiko Hosoi y Margaret J. Duncan en 2004, el cual se expone en cultivos celulares de HEp-2 (Human Epithel Cell) bajo estrés de *P. gingivalis* cepa W83 y después de algún tiempo de experimentación, mostró que al estar en contacto con células epiteliales induce al estrés responsable promotor de supervivencia de *P. gingivalis*, que ha sido fuertemente ligado al gen *luxS* "quorum-sensing sistem" responsable del gen regulador del estrés que controla la resistencia al calor (50°C) y resistencia al peróxido de hidrógeno durante la exposición al pH 5 y 9. Por otra parte, en otros estudios con *P. gingivalis*, las cuales se aplicaron en ratones ApoE -/- (deficiencia apolipoproteína E) que acelera el deterioro aórtico, demostró que sobrerreguló a 68 genes. Estos genes regulan a Gro2 y Gro3, además de las Moléculas de Adhesión Intra Celular (ICAM-I), Moléculas de Adhesión Vascular (VCAM-I) y de Selección (ELAM-I), además de IL-8, proinflamatorias Il-6 y citoxigenasas-2 fueron las mas sobrepresadas) en *P. gingivalis* comparándolas con HAEC (Human Aortic Endothelial Cells) control (Chloe *et al.*, 2006).

Transferencia conjugativa de cromosomas: *Porphyromonas gingivalis* posee múltiples factores de virulencia, incluyendo los procesos que causan la gingivitis (gingipain), fimbrias, hemaglutinina, hemolisina, (metálicos de transporte) y genes productores de cápsula. Además, *P. gingivalis* es capaz de invadir y establecerse en el epitelio del hospedador, mismo que está protegido de un sistema inmune y puede contribuir al daño tisular asociado con la periodontitis (Lamant, *et al.*, 1995).

Este organismo ha sido el más estudiado como patógeno oral y de acuerdo a estudios de modelos animales de la enfermedad, se clasifican en virulentos (W83 y 50) y avirulento (33277). Cepas de *P. gingivalis* deberán de ser diferenciadas por análisis de fragmentos de restricción, análisis de secuencias de inserción y análisis de PCR heteroduplex de secuencias intergénicas del ribosoma (Chen *et al.*, 2004). Los mecanismos de transferencia del DNA de *P. gingivalis* no son completamente conocidos ya que carecen de plásmidos, pero éste puede ser transformado. (Duncan *et al.*, 2003). Análisis de secuencia del genoma de la variedad de W83 revela una proteína mediadora de transferencia horizontal de DNA por conjugación. (Christie *et al.*, 2005).

La región también encontrada en otras bacterias Gram negativas codifica una proteína de 12 kDa muy similar a la región codificada por el ADN de transferencia (*tra* gen) del transposon conjugativo de *Bacteroides* cTnDot cTn341 (30% a 75% de identidad) (Basic *et al.*, 2005; Bohyeo *et al.*, 2001).

Variación genética: Un total de 154 ORFs (Open Reading Frames. Marco Abierto de Lectura) fueron analizados por el TIGR de las cepas 33277 y W83, en las cuales se demostró similitud en tan solo el 7% del 100% de EPP (Estimation of the Probability of Presence) con el GACK (Genomotyping Analysis Software). Fueron seleccionados 16 genes de divergencia analizados por microarreglos, mostrando que los genes PG01644 y PG01645 (los dos ORFs de ISPg5) están ausentes en *P. gingivalis* 33277 (Chen *et al.*, 2004). Los ORFs PG0110, PG111 y PG117 forman un grupo de clusters (genes) implicados en la biosíntesis de la cápsula.

Los mecanismos de transferencia del ADN de *P. gingivalis* no han sido muy bien comprendidos ni estudiados, ya que estos no contienen plásmidos y no son naturalmente competidores, aunque son fácilmente transformados por electroporación y algunas cepas de *Escherichia coli*, han transferido por conjugación ADN o por PCR dirigida por recombinación dirigida.

La colonización de bacterias en el espacio cervical puede permitir el intercambio de material genético como ADN generando cambios químicos en la descendencia que puede sufrir un deterioro en la salud. El intercambio del ADN entre cepas, puede por tanto contribuir al desarrollo de la periodontitis, la cual es caracterizada por un incremento en los niveles de patógenos Gram negativos en el surco gingival.

La boca contiene más de 700 especies capaces de colonizar la biopelícula oral. Las respuestas inmunológicas del hospedador contribuyen también a la recombinación entre bacterias, esto puede facilitar la variación antigénica, ya que éste evade la presencia del anticuerpo. Aunque las cepas W83, W50, 49417 y 5083 poseen el gen *tra* homólogo puede ser no funcional en el plásmido transferido en algunos experimentos.

La falta de funcionalidad puede ser consecuencia de la ausencia de un gen *traP* en la cepa W83, sin embargo, el intercambio genético que existe entre ellos debe ser mejor estudiado, para saber el mecanismo de intercambio en forma más precisa (Chloe *et al.*, 2006).

El *quórum sensing* (grupo de señales entre genes) fue descrita por primera vez en una bacteria marina *Vibrio fischeri* y *Vibrio harveyi*, las cuales producen pequeñas moléculas llamadas “auto inductoras” que son secretadas al medio ambiente y que se difunde al exterior de la célula (Dennis 2002).

Gen *LuxS*: En el sistema *quórum sensing* de bacterias simbióticas marinas como *Vibrio fischeri*, AHL que es sintetizado por la proteína LuxI y la activación del gen transcripción al medio por LuxR. En bacterias Gram positivas el *quórum sensing* se logra con el paso del péptido auto inductor para la cascada moduladora de dos componentes fosforilados (Chloe *et al.*, 2006). Ambos, el AI-1 y el sistema de señales son considerados especies específicas que controlan el sistema y las actividades biológicas incluyendo bioluminiscencia, esporulación, formación de biopelículas, conjugación, motilidad, competencia y producción de antibióticos. En contraste, el sistema AI-2 originalmente identificado en *Vibrio harveyi* es considerado inespecíficos y puede funcionar como un “lenguaje” universal bacteriano (Xaver *et al.*, 2003). AI-2 promueve el paso de la acción de la enzima LuxS. El gen *luxS* se extiende entre ambos Gram positivo y Gram negativo, las cuales pueden ser bacterias patógenas.

LuxS funciona como una enzima productora de efectos Auto Inductores de AI-2 (grupo de moléculas de señal producidas por bacterias Gram positivas y Gram negativas) que producen la transformación metabólica hacia el exterior (Bodor *et al.*, 2007). Por último, SRH es transformado en homosisteína y 4,5 dihidroxil-2,3pentanedine (DPD) por la enzima LuxS; éstas sin embargo, incrementan la AI-2 de manera espontánea ciclización y reacciona con ambos (Chen *et al.*, 2002).

La homocisteína es entonces metilada para generar metionina, el cual puede ser usado por MetK para producir SAM y de esta manera reiniciar la ruta. *P. gingivalis* es una bacteria Gram negativa, anaeróbica, que es considerada como principal agente etiológico de la periodontitis y de la gingivitis, éste es un potencial agente infeccioso que ocasiona la pérdida de los dientes y es vinculado en enfermedades sistémicas y cardiovasculares, y en efectos adversos en el embarazo. Basándonos en el análisis geonómico y la inhibición inducida de una señal de la homoserina lactona en cultivos líquidos, éste no aparece como regulado por un sistema de homoserina lactosa.

Sin embargo, éste si posee un *quórum sensing* codificado por LuxS reportado previamente (Burgués *et al.*, 2002). Dos métodos son usados en nuestros estudios para ver si los genes reguladores de LuxS de W50, 83 y ATCC33277 son distintos a través de análisis de PCR tiempo real (formalmente PCR cuantitativa, qPCR). Con la posibilidad de uso de los microarreglos, ahora podremos también medir los niveles de trascrición de los genes estructurales.

LuxS mostró en estudios con *P. gingivalis* un incremento en la expresión cuando es inducido por estrés como el pH ácido o pH alcalino (Li *et al.*, 2001). LuxS puede ser implicado como promotor de la supervivencia de *P. gingivalis* ante la regulación de mecanismos dados por el hospedador, tales como los efectos como la temperatura, H₂O₂ y pH. El gen Lux S se extiende tanto en Gram positivas y Gram negativas, de las cuales pueden llegar a ser patógenos (Vendeville *et al.*, 2005). Sobrenadantes de cultivos de organismos poseedores del gen Lux S son generalmente capaces de estimular biomoléculas en una señal 1-sensor 2+ reportado en la cepa *V. havery*, a pesar de la naturaleza reactiva de las especies cruzadas de AI-2 controlado por el proceso celular por AI-2 difiere entre organismos.

Monitoreo de expresión de genes en cultivos mixtos utilizando microarreglos: Para monitorear la expresión de genes de bacterias vía microarreglos, comúnmente esto se hace con bacterias puras, ya que el método parte de secuencias que exigen un enfoque de expresión de un gen a la vez y estos permiten analizar miles de genes o proteínas en un solo experimento.

Sin embargo, la nueva tecnología genómica, permite analizar sistemas de monitoreo con cultivos mixtos (sistemas de plancton) utilizados en estudio de aguas residuales donde se analizaron con *Ralstonia eutropha*, para analizar condiciones más parecidas a las del medio ambiente (Dennos *et al.*, 2002).

En la tabla número 3 se muestran las bacterias más estudiadas y bien definidas como responsables del equilibrio entre un periodonto sano y un periodonto enfermo, notándose claramente que la flora bacteriana en pacientes sanos es predominantemente Gram negativa.

Tabla 3.- Microorganismos comunes aislados del periodonto sano y enfermo.

Sano	Enfermo	
	Gingivitis	Periodontitis
<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Actinomyces</i> spp.	<i>Eubacterium</i> spp.	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Capnocytophaga</i> spp.	<i>Eikenella</i> spp.	<i>S. intermedius</i>
<i>Vellonella</i> spp.	<i>Fusobacterium</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.
	<i>Propionibacterium</i> spp.	

El papel que juega la placa dentobacteriana en la gingivitis y periodontitis, ha sido reconocido desde hace mucho tiempo de manera que la remoción de ésta es importante en la prevención de enfermedades en la cavidad oral, y que de no realizarse, esto podría tener consecuencias graves, como la gingivitis y la periodontitis.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

I.- Cepas y condiciones de cultivo: Las cepas "tipo" de *P. gingivalis* ATCC 33277 y W83 (Instituto Forsythus), *P. intermedia* ATCC 25611 y *S. intermedius* ATCC 27335 fueron proporcionadas por el Dr. Hosogi del Instituto Forsythus y otras a través de la ATCC. Las cepas serán conservadas de dos maneras: 1) Congelación en leche desnatada suplementada con un crioprotector y congeladas a -70°C y glicerol y 2) Otras se tendrán liofilizadas para control de calidad.

II.- Diseño de los iniciadores (oligos): El diseño de los oligonucleótidos se realizó tomando como base la secuencia del gen ADNr que codifica para el ARNr 16S de *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *S. intermedius* a través del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y realizar comparación múltiple con algunos organismos relacionados, tanto filogenéticamente como en la enfermedad (Tabla 4). La comparación se realizó utilizando el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) y el Programm Primer Select de DNA Star®; las características deseadas en los iniciadores fueron: estabilidad del oligo, complementariedad con otras regiones de las secuencias del ADN blanco, formación de dímeros, formación de horquillas, temperatura de alineamiento, longitud del fragmento amplificado y las concentraciones de GC. La secuencia de los oligos se muestra en la tabla 5

Tabla 4. Listado de microorganismos con los que se comparó el gen del ADNr 16S.

<i>A. actinomycetmcomitans</i>	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	<i>P. nigrensens</i>
<i>Bacteroides</i> spp.	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Pseudomonas aeroginosa</i>
<i>B. loescheii</i>	<i>F. paraphrophilus</i>	<i>Streptococcus aureus</i>
<i>Compylobacter rectus</i>	<i>Haemophilus aphrohilus</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>Camnocytophaga</i> sp.	<i>Streptococcus sanguis</i>	<i>S. pyogens</i>
<i>Ekenella corrodens</i>	<i>Peptostreptococcus micrus</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Prevotella corporis</i>	<i>Wolinella rectus</i>
<i>S. sobrinus</i>	<i>Rotia dentocariosa</i>	<i>A. naeslundii</i>

III.- Universo de trabajo y toma de la muestra: Las muestras se dividió en dos grupos (tratamientos): 1) Personas clínicamente sanas y 2) Pacientes con periodontitis. El número de muestras se obtuvo de acuerdo a lo reportado en el Anuario de Periodontología (World Workshop) del 2000, estimándose un total de 146 muestras de cada grupo para obtener una confiabilidad del 95%. Una vez identificados a los pacientes y ya previamente bien diagnosticados por examen clínico y radiográfico con Periodontitis crónica de moderada a avanzada, se procedió a la toma de la muestra, que consistió en la introducción de una cureta estéril en las bolsas más profundas y activas de la cavidad oral (Fig. 7)

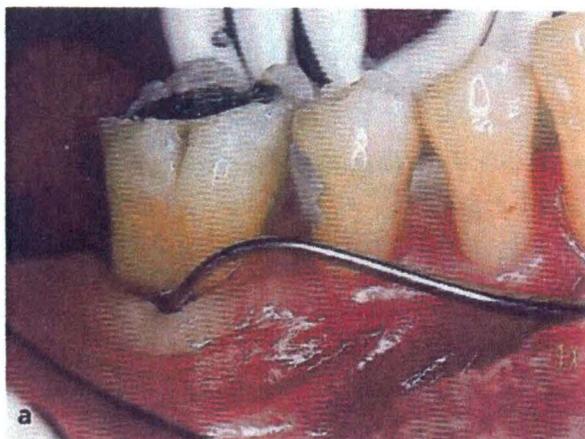


Figura 7. Toma de la muestra. Se selecciona una bolsa periodontal activa con profundidad de 6mm de un paciente que asiste a consulta por primera vez

El contenido será introducido a tubos de 1.5µl en agua de lisis para colecta de muestras de fluidos utilizando una cureta en la bolsa periodontal seleccionada de acuerdo a las siguientes condiciones:

Profundidad de bolsa	4 a 7 mm
Edad	35 a 45 años
Enfermedades sistémicas	ninguna

Para ello se deberá de limpiar muy bien la zona donde se tomará la muestra, para evitar la contaminación de placa dentobacteriana o cualquier otro artefacto que pudiera alterar a la muestra en el área supragingival con una gasa estéril y (peridex) para que posteriormente se depositará dicha muestra en un tubo de 0.5 mm.

IV.- PCR a partir de cultivos puros y muestras clínicas: De los cultivos puros se tomaron unas muestras y se resuspendió en 100µl de H₂O mili Q estéril. Las muestras fueron colocadas 10 min en baño de agua hirviendo. El tratamiento de las muestras esencialmente igual, solo que las muestras periodontales se resuspendieron y centrifugaron a 10,000 rpm durante 30 segundos y se tomarán 15µl del sobrenadante como fuente de ADN (Cerón *et al.*, 1995). Las muestras se mezclaron con los diversos componentes de reacción bajo el siguiente esquema:

H ₂ O mili Q	18.7 µl
dNTP's	4.0 µl
Buffer (10x)	5.0 µl
MaCl	4.0 µl
Primer1 (100mM)	1.0 µl
Primer2 (100mM)	1.0 µl
Primer3 (100mM)	1.0 µl
Muestra	<u>15.0 µl</u>
	49.7 µl

La mezcla se colocó en un termociclador Perkin-Elmer y se someterá al siguiente programa: un pulso de desnaturalización (5 min/95°C), adicionar 0.3µL de Taq polimerasa (5 U/µl). Posteriormente, las muestras serán sometidas a ciclos de amplificación que constará de lo siguiente: desnaturalización, 1 min/94 °C; alineamiento, 1 min/36 °C y extensión 2 min/70 °C, se darán 34 ciclos y un ciclo final de 10 min de extensión.

Los productos de PCR (10 µl) se cargaron en geles horizontales de agarosa al 1.5% en buffer TAE (Tris-Ácido Acético-EDTA pH 8.0) y se visualizaron con bromuro de etidio.

La especificidad de los oligonucleótidos fue evaluada realizando PRC's cruzadas entre las tres cepas, así como con diversas cepas aerobias y anaerobias

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en PCR Múltiplex.

Bacteria	CLAVE	POSICION EN EL GEN	SECUENCIA 5'-3'	TAMAÑO (p b)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	F	427	AAGGATTGTAAACTTCTTTTATAC	705
	R	1132	ACTGTTAGCAACTACCGATGT	
<i>Streptococcus intermedius</i>	F	343	GTAAAGGAAGAACGAGTGTGAGAA	833
	R	1176	TGCCGTCACCGGCTTGCGACTCGT	
<i>Prevotella intermedia</i>	F	449	GCATTTACCCTTCGAATAAGGACC	540
	R	989	GAGTCAACATCTCTGTATCCTGCG	
<i>Tanarella forsythia</i>	F	121	GCGTATGTAACCTGCCCGCA	347

Posterior al desarrollo de la técnica de PCR múltiplex y para confirmar la expresión genómica de genes de virulencia de *P. gingivalis* de la variedad que prevalece en la población estudiada a W83, se procedió a la siguiente metodología:

H ₂ O	11.6µl
MgCL ₂	0.4 µl
Primer 1	2 µl
Primer2	2 µl
Mix	2 µl
Muestra (cDNA)	2 µl
Final	20 µl

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 10 min a 95°C por 30 ciclos; 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 1.5 minutos a 75°C y 5 min a 75°.

Los primers para genes de virulencia para PCR punto final (tabla 6) y qPCR (tabla7) fueron sintetizados de acuerdo a lo reportado (Chen *et al.*, 2004).

Tabla 6. Iniciadores utilizados para realizar PCR de genes de virulencia de *P. gingivalis*.

ORF*	PROTEINA CODIFICADA	CLAVE	SECUENCIA (5'-3')	TAMAÑO (pb)
PG0019	<i>ISPg4, transposasa</i>	F	AGCCACAGGTAACCTCAACC	847
		R	CCACCGATATTGGCGATAC	
PG0111	Biosíntesis de polisacáridos de capsula	F	GCTATCGCCCTCCAATATGA	711
		R	TGTGTCACAACAACGACCCT	
PG0117	Proteínas de transporte de polisacáridos	F	TCAATATTCGAGGGGCGTAG	824
		R	AGGAGCGCAAATAGCAAAAA	
PG 0827	Proteína de la familia de flujo MATE	F	CATCGCAATGCTGATTATGG	1,162
		R	TCCGTTCAATCCCCAATATG	
PG0828	Proteína Rte, truncada	F	CTTTCAGATCGCTTTCCACC	294
		R	AGGGACTTCTCCTGCATTG	

*Open Reading From

Tabla 7. Lista de iniciadores de q PCR.

ORF*	CLAVE	SECUENCIA	TAMAÑO (pb)
PG0520	F	CGGAGCCGGAACAAAGAAGG	150
	R	GCAGCACCCACGTAAAGAACAG	
PG0538	F	TCTGGGAGGGCAGTACACCTATTCGC	76
	R	AGGCGTCCAGCGTTGTTGCCCTCG	
PG1280	F	TGCCGATCAGCTCACAATCATC	147
	R	GCTTGGAGGGGCGATATTCTTC	
PG16S	F	AGGAACTCCCATTGCGAAGG	108
	R	TCGTTTACTGCGTGGACTACC	

*Open Reading From

1. En los cultivos utilizados para qPCR y para los microarreglos se procedió a utilizar caldo de Tripticaceína de Soya (TSB), tres matraces, los cuales fueron inoculados de la manera siguiente: 100 ml de TSB más la cepa pura de W83.
2. 100 ml de TSB más 10 ml de la cepa pura de W83 y 10 ml de *S. intermedius* (1:1).
3. 100 ml de TSB más 10 ml de la cepa pura de W83 y 90 ml de *S. intermedius* (1:10).
4. Todas las muestras fueron colectadas por duplicado y en el día cero, 24 h, 48 h y 72 h.

Para preparar las muestras para su análisis de qPCR se tomaron 1000 μ l de cada experimento, y se depositaron en tubos de 1.5 para realizar extracción de ARN, utilizando el estuche comercial High Pure RNA Isolation Kit (Roche. EUA) para bacterias y la absorbancia fue leída a $\lambda=260$ nm en un espectro fotómetro Smart Spect™ DNA (Bio Rad). Las lecturas obtenidas fueron:

Una vez hecha la medición de el ARN se tomaron las muestras para convertir a cADN siguiendo la metodología del fabricante (Transcriptor First Strand cDNA system Kit, Roche®)

Bacteria	A : 260	Concentración
<i>P. gingivalis</i>	0.211	8.420
<i>P. gingivalis</i> y <i>S. intermedius</i> 1:1	0.187	7.460
<i>P. gingivalis</i> y <i>S. intermedius</i> 1:10	0.225	7.870

Primer	2 μ l
dNTPs	2 μ l
RNA sin	1 μ l
RT	1 μ l
Muestra	<u>X μl</u> *
V. Final	20

*X es igual a : $[] = \frac{A_{260} \times \text{Factor } 40 \times \text{dilucion (1:10)}}{1000(\mu\text{g})}$

Preparación de la qPCR

Se utilizaron las siguientes condiciones :

H ₂ O	11.6μl
MgCl ₂	0.4μl
Primer 1	2μl
Primer 2	2μl
Mix	2μl
Muestra	2μl
V. Final	20μl

Para realizar dicho experimento se utilizó el Kit Light Cycler® Fast Stara DNA Master SYBER Green I de la casa comercial de Riche®.

Las condiciones del termociclador utilizado para su análisis de qPCR Light Cycler 1.5 (Roche. EUA) fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos con rampa de 20 (°C/s); 35 ciclos de amplificación a 95 °C durante 10 segundos con rampa de 20(°C/s), 60 °C durante 5 segundos con rampa de 5 (°C/s), 72 °C por 10 segundos con rampa de 20 (°C/s) con análisis de cuantificación; 1 ciclo de Melting 95°C con rampa de 20 (°C/s), 65 °C por 15 segundos con rampa de 20 (°C/s), 95 °C con rampa de 0.1 segundos continuos y análisis de curva meeting; finalmente 1 ciclo de enfriamiento a 40°C durante 30 segundos con rampa de 20 (°C/s)

VI.- Análisis de los resultados: Los grupos fueron analizados por la presencia y ausencia de las bandas de ADN y fueron sometidas a un análisis de varianza de un factor. Si la variable a cuantificar fueron en el porcentaje, entonces se transformó por medio del arco seno, para normalizarla y aplicará un análisis de varianza de un factor (ONEWAY), considerando al factor como los grupos. Se utilizó (TUKEY y SCHEFFE) para establecer que grupos fueron diferentes. La asociación entre pares de bacterias se realizó por medio de la prueba no paramétrica Chi- cuadrada. Se realzará el ensayo de PCR cuantitativa para saber si la carga microbiana es diferente entre los diversos grupos.

RESULTADOS

Detección de *P.gingivalis* 33277, W83 y *S.intermedius* en muestras clínicas. Una imagen representativa de el PCR múltiplex se muestra en la figura 8 donde diferentes pacientes (Carriles 2-4) son positivos para ambos (carril 5). La detección de *P. gingivalis*, *S. intermedius* o ambos fueron positivos en un 51 de 65 (78.5%) de los pacientes. Se utilizaron como pacientes control positivos a 4 voluntarios que cumplieron con los criterios clínicos de salud y edad, los cuales fueron positivos para *P.gingivales*, (21.5%) y negativos para *S. intermedius* (datos no mostrados). En estas se pueden apreciar un 37% de los pacientes que fueron positivos para *P. gingivalis*, 17% para *S. intermedius* y 24,5% para ambas. Aunque el 61.5% de los pacientes (40/65) fue positivo para *P. gingivalis*, en forma individual o en combinación con *S. intermedius*, mientras que *S. intermedius* en forma individual o en combinación con *P. gingivalis* fueron presentes in 41.5% de los pacientes (27/65) . Esto es importante para el total ya que 16 pacientes tenían ambos microorganismos. De acuerdo a la edad, se clasificaron en 2 grupos, Grupo 1 (35-40 años), 31/42, fueron positivos en un 73.8%, el Grupo 2 (41-45 años) 20/23 fueron positivos en un 87% para una o ambas bacterias. Un importante hallazgo, estadísticamente significativo ($P < 0.026$) es la profundidad de la bolsa periodontal de pacientes con 4 a 5mm positivos 70.45% (31/44) para una o dos bacterias, comparado con 95.23% (20/21) de pacientes con profundidad de 6-7 mm de profundidad de bolsa. De los dieciséis pacientes pediátricos a los que se les tomo muestra de saliva y placa, los cuales tenían edad de entre 8 a 12 años, cuyas muestras fueron tomadas y procesadas de la misma manera se encontro que 31.25% fueron

positivos para *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythensis*, 18.75% solo para *S. intermedius*, 12.50% *P.gingivalis* y *S. intermedius*, 6.23% *Taenerella forsythensis* y *S. intermeduis*, *P. gingivalis*, en un 31%. La Combinacion de *P.gingivalis* y *S. intermedius* fue positiva en un 12% y *T. Forsythensis* y *S. intermedius* solo en un 6% (Tabla 9). En el orden de genero 62.5% de las muestras fueron positivas en niños y 37.5% fueron niñas (Tabla 10)

En todas las muestras que dieron señal positiva de los pacientes, para distinguir entre *P. gingivalis* ATCC 33277 (avirulento) y W83 (virulento) utilizando los iniciadores de la Tabla 6 , se confirmando la presencia de *P.gingivalis* W83 en todas las muestras. Finalmente por la tecnica de qPCR se pudo observar variaciones en la expresion genica de *P.gingivalis* en presencia de *S. intermedius* (Figura 10)

Resultados de pacientes solo con *Porphyromonas gingivalis*

Los resultados obtenidos de 150 pacientes para *P. gingivalis* son 78.5% positivos para *P.gingivalis* 33277 y W83, 17% solo para 33277 y 4.5% para W83.

Tabla 9 : Resultados representativos de las PCR Multiplex en pacientes pediaticos

Bacterias*	Percent (patients)
<i>P.g</i>	31.3% (5)
<i>T.f</i>	31.3% (5)
<i>S.in</i>	18.8% (3)

**P.g*: *Porphyromonas gingivalis*;
T.f: *Tannerella foryithensis*;
S. i: *Streptococcus intermedius*

Porphyromonas gingivalis y *Tannerella* fue encontrada en un 31.25% , en 5 muestras respectivamente; *Streptococcus intermedus* fu encontrado en un 18.75% , en 3 muestras. La deteccion de combinaciones de *P.gingivalis* y *S. intermedius* fue positiva en 2 muestras, 12.50 % y *Taenerella forsythensis* y *S. intermeduis* fue 6.25% , 1 muestra (Table)

Tabla 10: Frecuencia, media y desviación estándar de los pacientes pediátricos que dieron positivo

	Frecuencia	Media	Ds
Femenino	62.5%	2.10	.88
Masculino	37.5%	2.67	.82

En orden de genero el 62.5% de las muestras fueron positivas a pacientes de sexo masculino, 4.4% para *P.gingivalis*, 2.8% *T. forsythensis*, 3.8% *S.intermedius* y *P.intermedia* fue negativa. 37.5% fueron pacientes de sexo femenino, 2.6% para *P. gingivalis*, 3.3% *S. intermedius*, 1.0% fue para *P. intermedius*. En el orden de edad, *S. intermedius* fue positivo en 25% en lactantes, 19% niños de edad preescolar y 56% en adolescentes

Resultados de pacientes solo con *Porphyromonas gingivalis*

Los resultados obtenidos de 150 pacientes para *P. gingivalis* son 78.5% positivos para *P.gingivalis* 33277 y W83, 17% solo para 33277 y 4.5% para W83.

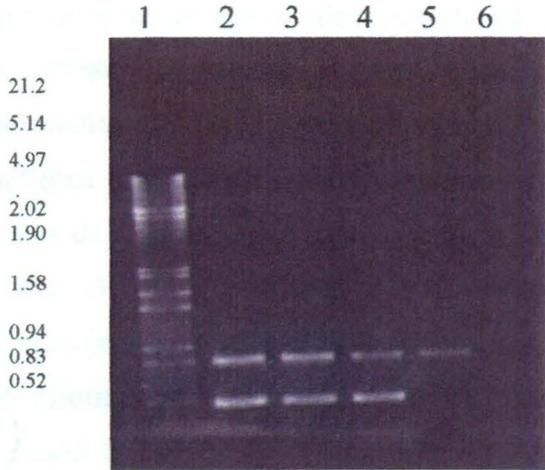


Figura 8 Amplificación de DNA en especies de *P.gingivalis* y *S. intermedius* apartir de muestras clinicas de pacientes utilizando sistema de PCR multiplex. El carril 1 contiene el marcador de talla **Lambda DNA/EcoRI+Hindi** (Kbp); carriles 2-5, muestras positivas de pacientes; *P.gingivalis* y *S. intermedius* carril 6 control negativo; a *S. intermedius*

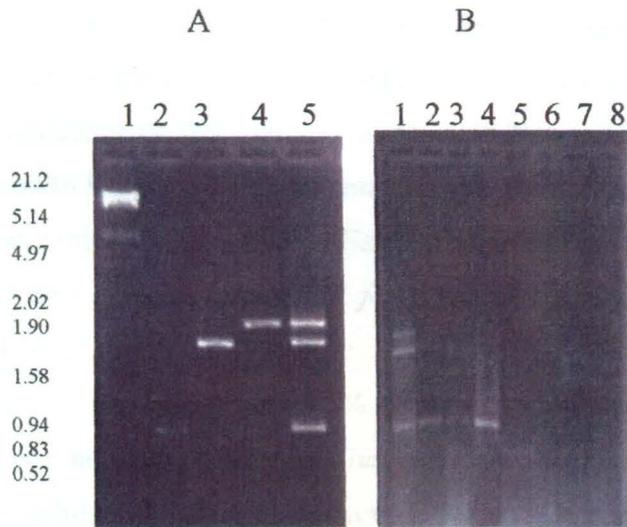


Figura 9 A. Amplificación de DNA en especies de *P.gingivalis*, *S. intermedius* y *P. intermedia* apartir de muestras clinicas de pacientes utilizando sistema de PCR multiplex. El carril 1 contiene el marcador de talla **Lambda DNA/EcoRI+Hindi** (Kbp); carriles 2 *T. forsythia* 3 muestras positivas de pacientes a *P. gingivalis*; carril 4 positivo a *S.intermedius*; carril 5, positivo a *S. intermedius*, *P. gingivalis*, *T.forsytensis*. **B** carril 1 positivo a *S. intermedius*, *P. gingivalis*, *T. forsytensis*; carril 2-4 positivos a *T. forsytensis*: 5 y 6 Negativos; 7 y 8 positivos a *P.gingivalis* y *S. intermedius*.

DISCUSIÓN

La diversidad biológica de la cavidad oral provee de muchos sitios ecológicos colonizado por muchas bacterias (Mager *et al.*, 2003). En el orden de detección de las dos especies implicadas en la enfermedad periodontal crónica 65 pacientes con periodontitis sin tratamiento y 17 voluntarios sanos, a los cuales se les busco encontrar *P.gingivalis* y *S. intermedius* a través de un experimento simple que se realiza utilizando el sistema múltiplex de PCR. El principal problema de la amplificación de DNA a través de la técnica de PCR es relacionada con el pretermino de la PCR y la obtención previa de la muestra de DNA. Esta si bien es entendido muchas muestras biológicas pueden tener diversos inhibidores de la PCR, y por tanto diferentes métodos deberán de ser sugeridos para eliminar o neutralizar la actividad (Amicosate, M., & L. Richeldi 1995, Mättö, & J., Saarla, S. 1995).

Sin embargo muchos de estos métodos son laboriosos y caros. El presente estudio consiste en un simple método de ebullición utilizando la muestra del DNA como fuente de la PCR. Aunque Conrads *et al* (Conrads *et al* 1999) sugiere que las muestras clínicas pueden ser procesadas con CHELEX 100 rein_previa a ebullición con una reducción de los inhibidores de la PCR e incrementar la sensibilidad nuestro paso de ebullición compite de manera positiva y amplifica específicamente muestras de DNA de pacientes en un 78.5%; Estos resultados son comparables con los encontrados en *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythensis*, *P. intermedia* y *P. gingivalis* (Conrads, G., T. F 1999, Tran, S.D., 1999).

Por otra parte 23.5% de las muestras clínicas fueron positivas para *P. gingivalis*, pero no para *S. intermedius*, estos resultados concuerdan con lo reportado en otros estudios (Griffen y Becker. 1998) y Lerner *et al.* (2007), quienes encontraron *P. gingivalis* en un 25% y 24% de los sujetos sanos a periodontitis.

Por otra parte en otros estudios la frecuencia de detección de bacterias en pacientes menores (niños de 18 meses) las muestras analizadas de lengua fue de *S. mutans* 70%, *S. sobrinus* 72%, *P. gingivalis* 23% *B. forsythus* (*T. forsythensis*) 11% y *A. actinomycetemcomitans* 30% utilizaron métodos similares de detección (Tanner *et al.*, 2002) en la Universidad de Washington. La especificidad de los iniciadores fueron demostrados con cultivos puros de bacterias relacionadas con la enfermedad con la cavidad oral y enfermedades periodontales, demostrando ser específicas las muestras clínicas aun y cuando estas pueden contener entre 50 y 300 diferentes especies, este hallazgo avala la especificidad de nuestro método. Aunque no podemos asegurar el número preciso de células patógenas en las muestras en muestras de placa, nuestro sistema PCR múltiple directo puede alcanzar a reconocer 8.2 células de *P. gingivalis* y *S. intermedius* (datos no mostrados) partiendo de cultivos puros.

Estos niveles de detección se comparan con otros patógenos periodontales como *A. actinomycetemcomitans* (Tran y Rudne. 1999; Jaffrey y Kaplan. 2003). En este sentido nuestra aproximación es simple, altamente sensible, eficiente y específico.

La regulación de PG 0520, PG 538 y PG1280 (genes de virulencia) fue medido a través q PCR después de haber hecho sistema de cultivo mixto de *P. gingivalis* y *S. intermedius*, los cuales mostraron diferentes niveles de expresión cuando se compararon los mismos en cultivo puro, esto, al igual que (Lihui *et al.*, 2005) sugiere que las condiciones del medio ambiente pueden influir en la regulación del los genes. Por otra parte Dennis en el 2002 utiliza un sistema de cultivos mixtos para el saneamiento de aguas residuales, condición parecida a la saliva, nos sugiere que es posible encontrar a través de cultivos mixtos, diferentes actividades de los microorganismos (Dennis *et al.*, 2002) La regulación de los genes lux S hasta el momento, han sido medidos solo en cultivos puros en bacterias de la cavidad oral, por ello creemos que es importante, continuar con dichos experimentos en la actualidad (Burgess *et al.*, 2002; Lihui *et al.*, 2005; Chloe *et al.*, 2006 para comprender mejor la naturaleza de la enfermedad y así poder mejorar su tratamiento y pronóstico.

Por otra parte en otros estudios la frecuencia de detección de bacterias en pacientes menores (niños de 18 meses) las muestras analizadas de lengua fue de *S. mutans* 70%, *S. sobrinus* 72%, *P. gingivalis* 23% *B. forsythus* (*T. forsythensis*) 11% y *A. actinomycetemcomitans* 30% utilizaron métodos similares de detección (Tanner *et al.*, 2002) en la Universidad de Washington. La especificidad de los iniciadores fueron demostrados con cultivos puros de bacterias relacionadas con la enfermedad con la cavidad oral y enfermedades periodontales, demostrando ser específicas las muestras clínicas aun y cuando estas pueden contener entre 50 y 300 diferentes especies, este hallazgo avala la especificidad de nuestro método. Aunque no podemos asegurar el número preciso de células patógenas en las muestras de placa, nuestro sistema PCR múltiplex directo puede alcanzar a reconocer 8.2 células de *P. gingivalis* y *S. intermedius* (datos no mostrados) partiendo de cultivos puros.

Estos niveles de detección se comparan con otros patógenos periodontales como *A. actinomycetemcomitans* (Tran y Rudne. 1999; Jaffrey y Kaplan. 2003). En este sentido nuestra aproximación es simple, altamente sensible, eficiente y específico.

La regulación de PG 0520, PG 538 y PG1280 (genes de virulencia) fue medido a través q PCR después de haber hecho sistema de cultivo mixto de *P. gingivalis* y *S. intermedius*, los cuales mostraron diferentes niveles de expresión cuando se compararon los mismos en cultivo puro, esto, al igual que (Lihui *et al.*, 2005) sugiere que las condiciones del medio ambiente pueden influir en la regulación de los genes. Por otra parte Dennis en el 2002 utiliza un sistema de cultivos mixtos para el saneamiento de aguas residuales, condición parecida a la saliva, nos sugiere que es posible encontrar a través de cultivos mixtos, diferentes actividades de los microorganismos (Dennis *et al.*, 2002) La regulación de los genes lux S hasta el momento, han sido medidos solo en cultivos puros en bacterias de la cavidad oral, por ello creemos que es importante, continuar con dichos experimentos en la actualidad (Burgess *et al.*, 2002; Lihui *et al.*, 2005; Chloe *et al.*, 2006 para comprender mejor la naturaleza de la enfermedad y así poder mejorar su tratamiento y pronóstico.

CONCLUSIONES

- A través de la PCR múltiplex, se pudo establecer la prevalencia de diferentes bacterias periodontopatógenas en pacientes diagnosticados con periodontitis crónica y con esto establecer la relación de microorganismos más frecuente
- Se pudo demostrar que *P.gingivalis* 33277 fue la más abundante (78.5%) en nuestra población, comparando con la misma bacteria pero de la variedad W83 (17%), la combinación de ambas fue la más baja (4.5%)
- La distribución de estas bacterias fue relacionada con la profundidad de bolsas, 55.4% con profundidad de 6-7mm fueron para ambas bacterias en comparación a 23% de los sujetos con 4 a 5 mm de profundidad, lo cual nos indica que a mayor severidad de la enfermedad periodontal (pérdida de inserción) se encuentra mayor cantidad de *P.gingivalis* (33277 y W83) sola y en combinación
- La Técnica molecular múltiplex aplicada en este estudio, demuestra ser económica, rápida y eficaz para conocer la microflora en el surco gingival. Esto nos permite sugerir nuevas aplicaciones sobre otras combinaciones de microorganismos que sería de interés en la odontología, para comenzar a realizar estudios de tipo de ecología e interacción microbiana en distintas enfermedades periodontales
- La regulación de los genes de virulencia de PG0520, *gro El*, *htrA* (PG0593), *clp* (PG1118), y *dnaK* (PG 1208), fueron sobre regulados en LY2001, lo cual indica que el gen *lux S* regula la expresión de los genes de Ester de *P. gingivalis* de W83 y *S. Intermedius*.
- La regulación de estos genes promueven el incremento en la formación de biopelículas en el surco gingival y con ello el incremento en el poder patógeno, ya que estos protegen a la bacteria de cambios de pH, y presencia de peróxidos (pH 5 a 9, y H₂O₂)

- Los microarreglos mixtos son herramientas útiles para la detección de expresión de los genes de bacterias como ya ha sido demostrado en sistemas de aguas contaminadas donde la formación de biopelículas suele ser un problema constante en los sistemas de tratamiento
- Al igual que las aguas residuales, en cavidad oral la formación de biopelículas ha demostrado ser una situación que compromete la salud ya que los microorganismos no se encuentran de manera pura y aislada
- Resulta de interés, en la salud, el estudio y optimización sistemas de microarreglos de cultivos mixtos ya que estos arrojan diferentes resultados, que los mismos efectuados con cultivos puros, permitiendo un estudio más claro y real de la información del estatus de una enfermedad

Literatura Citada

Amicosante, M., L. Richeldi, G. Trenti, G. Paone, M. Campa, A. Bisetti y C. Saltini. 1995. Inactivation of polymerase inhibitors for *Mycobacterium tuberculosis* DNA amplification in sputum by using capture resin. *J. Clin. Microbiol.* **33**:629- 630.

Athayde, N. 2005. Fetuses delivered following preterm prelabor rupture of the membranes are capable of stimulating a proinflammatory response in endothelial cells. *J. Soc. For. Gyn. Invest.* **12**:118-122

Bacic, M., A. C., Parker, J. Stagg, H. P., Whitley, W. G. Wells, L.A. Jacob, y C.J. Smith. 2005. Genetic and structural analysis of the *Bacteroides* conjugative transposons CTn341. *J. Bacteriol.* **187**:2858-2869.

Bassler, B. L., M. Wright, y M.R. Silverman. 2002. Multiple signaling systems controlling expresión of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a sensory pathway. *Mol. Microbiol.* **13**:273-286

Bodor, J., Z. Fehrvári, B. Diamond y S. Sakaguchi. 2007. Regulatory T cel-mediated supresión: potencial rol of ICER. *J. Leukoc Biol.* **8**:161-167

Burgess, N.A., Kirke, D.F., P. Williams, K. R., Hardie, Meyers, N. L. J. Aduse-Opoku, M. A., Curtis, y Camara. M. 2002. *LuxS*- dependent quórum sensing in *Porphyromonas gingivalis* modulates protease and haemagglutinin activities but is not essential for virulence. *Microbiol.* **148**: 763-772.

Califano, J.V., Kitten. T., Lewis. J.P., Macrina, F.L., Fleischmann, R.D., Fraser, C.M. 2000. Characterization of *Porphyromonas gingivalis* insertion sequence-like element ISPg5. *Infect. Immun.* **68**:5247-5253

Celeste, A., Peterson, S., Romanienko, J., Fernandez-Capetillo, O. Chen, H. 2002. Genomic Instability in Mice Lacking Histone H2AX. *Science*. 3: 296-922.

Cerón J, Ortiz, A., Quintero, R., Güereca, L., y Bravo, A. 1995. Specific PCR primers directed to identify cryI and cry III genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Env. Microbiol.* 61: 3826-3831.

Chloe, E., Hasegawa, Y., J., Park, Y., Yeung, V., Gena, D., Tribble, M.K., Donald, R. Demuth, y Lamont, R.J. 2006. LuxS Involvement in the Regulation of genes coding for hemin and iron acquisition systems in *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 74: 3834-3844

Challis, J.R., Chalis, R., Stephen G., Matthews, G., y Stephen, J.L. 2000. Endocrine and Paracrine Regulation of Birth at Term. *Endoc. Rev.* 21-524

Chen, X., S. Schauder, N., Potier, A., Van Dorsselaer, I., Pelczer, B.L. Bassler, y F. M. Hughson. 2002. Structural identification of bacterial quórum sensing signal containing boron. *Nature*. 415: 545-549.

Chen, T.Y. Hosogi, K., Nishikawa K., Abbey. 2004. Comparative Whole-genome analysis of virulent and avirulent strains of *porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* 186: 5473- 5479.

Christie , P. J., K. Atmakuri, V., Krishnmoorthy, S., Jakubowski, y Cascales. E. 2005. Biogénesis, architecture, and function of bacterial type IV secretoms. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 451-485.

Chung W.O, Park Y, Lamont RJ, McNab R, Barbieri B, Demuth DR. 2001. Signaling system in *Porphyromonas gingivalis* based upon a LuxS protein. *J. Bacteriol.* 183: 3903-3909.

Conrads, G., Flemming, T.F., Seyfarth, I., Lampert, F. y Lütticken, R. 1999. Simultaneous detection of *Bacteroides forsythus* and *Prevotella intermedia* by 16S rRNA gene-directed multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1621-1624.

Dennis P, Edwards E. A., Liss S.N. Fulthorpe R. 2002. Monitoring gen expresión in mixed microbial communities by using DNA microarrays. *App. Enviro. Microbiol.* 69: 769-778

Dickinson, DP., MA. Kubinec, F. Yoshimura y RJ. Genco. 1988. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit protein of *Bacteroides gingivalis*. *J. Bacteriol.* 170:1658-1665.

Duncan, M.J. 2003 Genomics of oral bacteria. *Crit. Rev. Oral. Med.* 14:175-187.

Donworkin, M., and D.Kaiser. 1985 Cell interactions in myxobacterial growth and development. *Science.* 230: 18-24

El-Bastawissi, A.Y. 2000. Amniotic fluid interleukin-6 and preterm delivery: a review. *Obstet. Gynecol.* 95:1056-64.

Fong, K. P., L. Gao, and D.R Demuth. 2003. *Lux S* and *arcB* control aerobic growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* under limitation . *Infect. Immun.* 71: 298-308

Gibson, FC., y CA. Genco. 2001. Prevention of *Porphyromonas gingivalis*-induced bone loss following immunization with gingipain R1. *Infect. Immun.* 69:7959-7963.

Genco, CA., W. Simpson, RY. Fong, M. Egal, y BM. Odusanya. 1995. Characterization of a Tn4351-generated hemin uptake mutant of *Porphyromonas gingivalis*: evidence for the coordinate regulation of virulence factors by hemin. *Infect. Immun.* 63:2459-2466.

Genco , R., Offenbacher, and J. Beck. 2002. Periodontal disease and cardiovascular disease: epidemiology and possible mechanisms. J. Am. Dent. Assoc. 133: 14S-22S.

Griffen, A., Becker, M. R., Lyons, S. R., Moeschberger, M. L. & Leys, E. J. 1998. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. J. Clin. Microbiol. 36: 3239-3242.

Greco, C. A., D.R. Kapeczynski, C. W. Cutler, R. J. Arko, and R. R. Arnold. 1992. Influence of immunization on *Porphyromonas gingivalis* and random distribution of putative virulence markers. Infect. Immun. 69:4479-4485

Hsu, C.D. 1998. Dual roles of amniotic fluid nitric oxide and prostaglandin E2 in preterm labor with intra-amniotic infection. Am J Perinatol. 15:683-687.

Hujoel PP, Drangsholt M, Spiekerman C, DeRouen TA. 2000. Periodontal disease and coronary heart disease risk. J. Am Med Assoc 284:1406-1410.

Ingersoll M, Groisman EA, Zychlinsky A. 2002. Pathogenicity islands of *Shigella*. Curr Top Microbiol Immunol 264:49-65.

Jeffrey, B., Makus, K., Meyenhofer, F. & Fine, D.H. 2003 Biofilm growth and detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Bacteriol 185: 1399-1404

Kamma, J. J., Nakou, M. & Baehni. P.C. 1999. Clinical and microbiological characteristics of smokers with early onset periodontitis. J. Period Res 34: 25- 33.

Keelan, J.A. 1999. Cytokine abundance in placental tissues: evidence of inflammatory activation in gestational membranes with term and preterm parturition. Am J. Obstet. Gynecol. 181:1530-1536.

Kleinberg, I. 2002. A mixed-bacterial ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specific plaque hypothesis. Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 13:108–125.

Kolodrubetz, D., J. Dailey, J. Ebersole y E. Kraig. 1989. Cloning and expression of the leukotoxin gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect. Immun. 57:1465–1469.

Kolodrubetz, D., L.H., Phillips, P.J. Ezzo y E. Kraig. 1995. Directed genomic integration in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: generation of defined leukotoxin-negative mutants. Infect. Immun. 63:2780–278

Lindhe J. Clinical periodontology and implant dentistry. 2003. Blackwell Munksgaard. 4: 403-420.

Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A 1995. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. Infect. Immun. 63:3878–3885.

Lamont, R. J. and O Yilmaz 2002. In or out: the invasiveness of oral bacteria. Periodontol. 30: 61-69

Li, Y. H., P. C. Lau, J. H. Lee, R. P. Ellen, and D. G. Cvitkovitch. 2001 Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. J. Bacteriol. 183: 897-908.

Lu, G.C. and R.L. Goldenberg. , 2000 Current concepts on the pathogenesis and markers of preterm births. Clin. Perinatol. 27(2): p. 263-83.

Lihui Y. Jeffrey D. Hillman, and Ann Progulske-Fox. 2005 Microarray Analysis of Quorum-Sensing-Regulated Genes in *Porphyromonas gingivalis*. 73: 4146 - 4154

Missailidis, C.G., J.E. Umeda, C. Ota-Tsuzuki, D. Anzai, and M.P. Mayer. 2004. Distribution of *Fim A* genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in subjects with various periodontal control conditions. *Oral. Microbiol. Immunol.* 19: 224-229

Malek R, Fisher JG, Caleca A, Stinson M, van Oss CJ, Lee JY, *et al.* 1994. Inactivation of the *Porphyromonas gingivalis fimA* gene blocks periodontal damage in gnotobiotic rats. *J. Bacteriol.* 176:1052-1059.

Nassar H, Chou HH, Khlgatian M, Gibson FC 3rd, van Dyke TE, Genco CA 2002. Role for fimbriae and lysine-specific cysteine proteinase gingipain K in expression of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein in *Porphyromonas gingivalis*-infected endothelial cells. *Infect. Immun.* 70:268-276.

Nelson, K. E., R. D. Fleischmann, R.T. DeBoy, I. T. Paulsen, D. E. Fouts, J.A. Eisen, S.C. Daugherty, R.J. Dodson, A.S. Durkin, M. Gwinn, D.H. Haft, J.F. Kolony, W.C. Nelson, T. Mason, L. Tallon, J. Gray, D. Granger, H. Tettelin, H. Dong, J.L. Galván, M.J. Duncan, F.E. Dewhirst, and C.M. Fraser. 2003. Complete genome sequence of the oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. *J. Bacteriol.* 185: 5591-5601

Njoroge T, Genco RJ, Sojar HT, Hamada N, Genco CA 1997. A role for fimbriae in invasion of oral epithelial cells. *Infect. Immun.* 65:1980-1984.

Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. 2001. Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells collected from human subjects. *Infect. Immun.* 69:2700-2707

Schauder, S., K. Shokat, M. G. Surette, and B.L. Bassler. 2000. The Lux family of bacterial autoinducer: biosíntesis of quórum- sensing signal molecule Mol. Microbiol. 41: 463-476.

Schena ,M., D Shalon, R. W. Davis and P.O.Brown. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 270: 467-470.

Socransky SS 1977. Microbiology of periodontal disease—present status and future considerations. J. Periodontol. 48:497-504

Socransky, S.S. and Haffajee, A.D. 1997 Microbiology of periodontal disease. 3th edition,, Copenhagen, Munksgaard. Lindhe, J. T., Karring, T. & Lang, N.P. Clinical periodontol and implant dent. 138-188.

Socransky SS, AD. Haffajee, MA. Cugini, C. Smith, RL. Kent Jr. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. J. Clin. Periodontol. 25:134-144

Socransky, S.S., and A.D. Haffajee. Microbiology of periodontal disease. In Lindhe J. T Karring and NP. Lang (eds) Clinical periodontology and implant dentistry, 3er edn. 1997. Copenhagen, Munksgaard. pp 138-188.

Salyers AA, Shoemaker NB, Guthrie EP. 1987. Recent advances in *Bacteroides* genetics. CRC Crit. Rev. Microbiol. 14:49-71.

Slots J, Gibbons RJ. 1978. Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *asacchaolyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and of periodontal pockets. Infect. Immun. 19:256-264.

Spaziani, E.P., *et al.*, 1999. Modulation of the prostaglandin E receptor: a possible mechanism for infection-induced preterm labor. Obstet. Gynecol. 93:84-89.

Tanner, A.C.R, Milgrom, P.M, Kent, R, Mokeem S.A., Page R.C, Riedy, C.A, Weinstein, P. 2002. The Microbiota of Young Children from Tooth and Tongue Samples J. Dent. Res. 81:53-57

Tran, S.D. & Rudney, J.D. 1999. Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomucetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, and *Porphyromonas gingivalis*. J. Clin. Microbiol. 37: 3504-3508

Turhan, N.O., A. Karabulut, and B. 2000. Adam, *Maternal serum interleukin 6 levels in preterm labor: prediction of admission-to-delivery interval*. J. Perinat. Med. 28: 133-139.

Von Minckwitz, G., et al., 2000. *Predictive value of serum interleukin-6 and -8 levels in preterm labor or rupture of the membranes*. Acta. Obstet. Gynecol. Scand. 79: 667-72.

Van Winkelhoff AJ 1998. Microbial specificity in periodontal disease. In: Oral biology at the turn of the century. Guggenheim B, Shapiro S, editors. New York: Karger, pp. 56-62.

Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, et al. 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Nature. 413:860-864.

Williams MC, O.B.W., Nelson RN, Spellacy WN, 2000. *Histologic chorioamnionitis is associated with fetal growth restriction in term and preterm infants*. Am. J. Obstet. Gynecol. 183: p. 1094-9.

Wang Y, Rotman E R, Shoemaker NB, and Salyers AA 2005. Translational Control of Tetracycline Resistance and conjugation in the *Bacteroides* conjugative transposon CTn DOT. J. Bacteriol. 187: 2673-2680.

Xavier, K.B., and B.L. Bassler . 2003. Lux S quórum sensing: more than just a numbers gene. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 191-197.

Yeung MK 1992. Conservation of *Actinomyces viscosus*T14V type I fimbrial subunit homology among divergent groups of *Actinomyces spp.* *Infect. Immun.* 60:1047-1054.

Yeung MK 1999. Molecular and genetic analyses of *Actinomyces spp.* *Crit Rev Oral. Biol. Med.* 10:120-138.

APENDICE A

Extracción de RNA

Condiciones del cultivo para la extracción del RNA

Cepas de colección W83 y *S. intermedius* ATCC 27335 fueron activadas en TBS (Trypticaseína de Soya) y después de 2 días de incubación se corrió curva de crecimiento con espectrografía y medición con hematositometro. Una vez establecido la curva de crecimiento, se tomaron las cepas de la FACE exponencial que corresponde a los dos días.

Para el experimento con las cepas, se colocó en matraz con caldo de TBS y se colocó 1ml de *P. gingivalis* y 1 ml de *S. intermedius*, se dejaron incubar a 37°C por 48hrs, y se procedió a la extracción de RNA, para su posterior preparación de Cdna

9

Extracción de RNA por medio del kit para bacterias (10) Gram positivas y Gram negativas

1. Por cada muestra :
 - Olectar 1000 ml de bacterias y por centrifugación a 2000g por 5 minutos
 - Resuspender el pellet in 200µl de Buffer HCl pH8 a un tubo de microcentrifuga esteril de 1.5 ml
2. Agregar 4 µl de la solución de lisozima (50 mg/ml in Tris-HCl, pH 8.0) para cada tubo de microcentrifuga e incubar por 30 minutos a 37°C
3. Agregamos 400 µl de Lysis/Binding Buffer en las células resuspendidas y mezclar el contenido en el tubo muy bien (Vortex)

4. Para transferir la muestra a un High pure Tube:
 - Insertar un High Pure Filter Tube dentro de un tubo colector
 - Pipetear toda la muestra dentro del filter tube
5. Insertar el tubo (colector/filtrante) dentro de una centrifuga después:
 - Centrifugar por 15s a 10,000 rpm.
 - Separar el tubo filtrante del tubo colector y desechar el liquido filtrado, y de nuevo colocarlo en el mismo tubo colector
6. En un tubo esteril por separado, mezclar 100µl de la solución DNasa (90µl de DNasa incubation buffer+ 10µl de DNasa I reconstituida por cada muestra.
 - Agregar 100µl de la solución de DNasa dentro del tubo filtrante.
 - Incubar por 15min de 15 a 25°C
7. Después de incubacion con DNasa:
 - Agregar 500µl de Wash Buffer I dentro del tubo filtrante
 - Repetir la centrifugacion (como en el paso 5)
8. Después del primer lavado:
 - Agregar 500µl de Wash Buffer II dentro del tubo filtrante
 - Repetir la centrifugacion (como en el paso 5)
9. Después del segundo lavado:
 - Agregar 200µl de Wash Buffer II dentro del tubo filtrante
 - Centrifugar el tubo (filtrante/ colector) por 2 min a la maxima velocidad, con el fin de remover cualquier residuo de Wash Buffer
10. Desechar el tubo colector e insertar el tubo filtrante en un tubo de centrifuga esteril de 1.5 ml
 - Centrifuga esteril de 1.5 ml

11. Para eluir el RNA:

- Agregar de 50- 100µl de Elution Buffer en el tubo filtrante.
- Centrifugar el tubo por 1min a 10,000 rpm
- Para concentrarlo a que quede a proximadamente 45 0 50µl, se debe utilizar el concentrador LABCONO a 30°C para que después de 1hr. Aproximadamente se tenga la cantidad deseada.

12. El tubo de microcentifuga ahora contiene RNA eluido

- Se puede usar el RNA eluido directamente en RT-PCR o almacenarlo a -80°C.

APENDICE B

Preparación de Buffer 10mMTrisHCl, pH8

- .012 Tris
- 9.5 ml H₂O

ajustar pH con HCl de 100µl en 100 µl

Esterilizar en autoclave

Preparación de la lisozima

Agarosa 1%

Agarosa 1g

Buffer TAE 1Xcbp 100ml

Buffer de Carga

Buffer Tris 1M (pH 6.8)	0.31 ml
SDS	2.0 ml
Glicerol	1.0 ml
Agua bidestilada	1.34 ml

Bufere de electroforesis

Tris base	100mM
NaCl	1.5 M

163249

APENDICE C

Alineamientos

ANEXOS

ANEXOS

