

Cuantificación de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por PCR en tiempo real en pacientes sanos, con gingivitis y periodontitis crónica.

Mayra Lucia Martínez Hernández

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Bacterióloga

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

Facultad de Ciencias

Carrera de Bacteriología

2014

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los Conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de Tesis.

Solo velara por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de julio de 1946.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por darme la fortaleza en mis momentos de debilidad, por haberme acompañado y guiado durante este proceso de aprendizaje y experiencias, que me enseñaron a aceptar cada una de las dificultades con sabiduría y llenaron mi vida de felicidad.

A mis padres que fueron el motor constante en la lucha por ser profesional, por todos y cada uno de los valores que me inculcaron y el apoyo constante e inalcanzable durante todo mi proceso de formación.

A mi hermana, mi cuñado Agustín y Carlos que con su paciencia y apoyo incondicional, supieron comprender cada uno de los momentos y seguir de mi mano. Alejandro, mi primo por el tiempo dedicado y su confianza en mí.

A la Doctora Adriana por creer en mí y darme la oportunidad de desarrollar la tesis en su compañía, por el apoyo y facilidades para el desarrollo del proyecto.

Al Doctor Fredy que sin dudarlo me acepto y confió en mí para delegarme un proyecto. Le agradezco por todo el apoyo y los conocimientos que me transmitió durante la carrera.

A todos y cada uno de los que hicieron parte de este proceso que me brindaron su apoyo, que se tomaron un tiempo para despejar alguna duda que tuviera, por comprenderme y por cada uno de los momentos que compartimos para lograr esta meta.

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN.....	8
2.	FORMULACIÓN Y JUSTIFICACIÓN.	10
3.	MARCO TEORICO.....	12
3.1	ENFERMEDAD PERIODONTAL	12
3.1.1	GINGIVITITS.....	13
3.1.2	PERIODONTITIS.....	14
3.1.2.1	PERIODONTITIS CRONICA.....	14
3.1.2.2	PERIODONTITIS AGRESIVA.....	14
3.2	BACTERIAS ASOCIADAS A PERIODONTITIS CRONICA	15
3.2.1	<i>Porphyromona. gingivalis</i>	15
3.2.2	<i>Prevotella intermedia</i>	16
3.2.3	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	16
3.3	ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.....	17
3.3.1	PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qPCR).....	18
4	OBJETIVOS	20
5	METODOLOGÍA	21
5.1	Tipo de estudio.....	21
5.2	Muestras.....	21
5.3	Extracción de ADN	21
5.4	Cuantificación y evaluación de pureza del ADN.....	22
5.5	Cuantificación por PCR en tiempo real	22
5.6	Análisis estadístico	23
6	RESULTADOS.....	25
6.1	Selección del método de extracción.....	25
6.2	Cuantificación por PCR en tiempo real	27
7	DISCUSIÓN.....	31
8	CONCLUSIÓN	34
9	BIBLIOGRAFÍA.....	35

RESUMEN

Introducción: La enfermedad periodontal es un proceso infeccioso relacionado con la acumulación de placa bacteriana ocasionada por un gran número de bacterias que en su mayoría son anaerobias, las cuales pueden actuar individual o de manera combinada. La enfermedad periodontal hace referencia a los procesos patológicos en los que se ven afectadas las estructuras del periodonto, la cual podemos dividir en dos categorías gingivitis y periodontitis. La etiología de la enfermedad periodontal involucra microorganismos Gram negativos, anaerobios que están aumentados significativamente en la placa bacteriana de pacientes con enfermedad periodontal. El acumulo de altas concentraciones de placa dental en el periodonto pueden ocasionar afección de las estructuras de periodonto, además de los factores genéticos, ambientales y el consumo de tabaco; entre otros. En Colombia, la enfermedad periodontal evaluada mediante la pérdida de inserción clínica afecta al 50% de la población; en su forma generalizada los individuos menores de 35 años muestran pérdida de inserción, la que aumenta después de los 60 años. Los avances de la ciencia hoy en día permiten la identificación de esta patología y de los agentes causales y así tratar al paciente de una manera más específica. El diagnóstico molecular ha demostrado ser seguro, rápido, reproducible y discriminatorio en patologías de origen infeccioso como la enfermedad periodontal.

Metodología: Este es un estudio de tipo descriptivo, que se llevó a cabo en el centro de Investigaciones Odontológicas (CIO) de la Pontificia Universidad Javeriana. Se recolectaron 134 muestras de pacientes que asistieron a consulta en la facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana, las cuales 90 correspondían a periodontitis, 36 a gingivitis y 8 a sanos. Se realizó un estudio piloto con 21 muestras para determinar el mejor método de extracción de ADN, los 3 métodos fueron: método A: calentamiento a 95°C, método B: DNAzol y método C: hervido + proteína K+ lisozima, se tomaron alícuotas de 150 µl de cada una de las 21 muestras que fueron tomadas aleatoriamente, se evaluó la cuantificación y pureza de ADN.

Resultados: En el análisis de la cuantificación de las 21 muestras extraídas por los tres métodos, se observó que de los tres el mejor es el método B ya que con este se obtuvieron las mejores concentraciones y calidad de ADN. Con este método, se realizó la extracción de las 134 muestras y se llevó a cabo la cuantificación. En los sanos se encontró *P. gingivalis* en un 87,5% (7/8) de los pacientes y ninguno amplificó para *P. intermedia* y *A. actinomycetemcomitans*. En los diagnosticados con periodontitis se encontró *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* en un 86,7% (78/90), 57,7% (52/90) y 20% (18/90), respectivamente. En pacientes con gingivitis, se encontró *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* en un

69,4% (25/36), 11,1% (4/36) y 19,4% (7/36), respectivamente. En los resultados obtenidos en la cuantificación de ADN de las 134 muestras, se obtuvieron resultados significativamente importantes para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *P. intermedia* que osciló entre (10^1 a 10^7); (10^1 a 10^{10}) y (10^1 a 10^7) número de copias, respectivamente, siendo concentraciones de ADN óptimas para las muestras. Conclusión: *P. gingivalis* fue la bacteria más prevalente en todos los pacientes estudiados; mientras que *A. actinomycetemcomitans* se identificó en un menor proporción. Con los resultados obtenidos se puede concluir que *P. gingivalis* y *P. intermedia* hacen parte del perfil microbiano de pacientes con periodontitis.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal es un proceso infeccioso relacionado con la acumulación de placa bacteriana ocasionada por un gran número de bacterias anaerobias, las cuales pueden actuar individual o de manera combinada (Rodrigues, et al., 2012). Enfermedad periodontal hace referencia a los procesos patológicos en los que se ven afectadas las estructuras del periodonto, la cual podemos dividir en dos categorías gingivitis y periodontitis. La gingivitis es la inflamación gingival sin pérdida del tejido conectivo y no todas las gingivitis progresan a periodontitis, ya que al hacer un control de la placa bacteriana se puede tener corrección. La periodontitis es la inflamación gingival con pérdida del tejido conectivo y el hueso alveolar, siendo una de las causas principales en la pérdida de dientes prematura (Piovano, 2009). En 1999 el taller internacional de la Academia Americana de Periodoncia, reconocen tres tipos de periodontitis: Periodontitis Crónica, Periodontitis Agresiva y Periodontitis asociadas a enfermedades sistémicas; debido a diferentes criterios de clasificación, como los son: profundidad de la bolsa, nivel de inserción y piezas dentales afectadas (Wiebe y Putnis, 2000).

La etiología de la enfermedad periodontal involucra microorganismos Gram negativos, anaerobios que aumentan significativamente en la placa bacteriana de pacientes con enfermedad periodontal entre los que encontramos a *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia* y *Fusobacterium spp* los cuales se relacionan con la progresión de la enfermedad periodontal y la periodontitis crónica, los cuales se consideran como patógenos (Rodrigues, et al., 2012. Boutaga, et al., 2006).

En el análisis del estado de pacientes con enfermedad periodontal se incluye pruebas diagnósticas, basadas en parámetros clínicos como: la evaluación de la inflamación, el nivel de inserción y la profundidad del sondaje, parámetros radiológicos y parámetros de estudios microbiológicos como: el cultivo bacteriano (Escudero et al., 2008). Sin embargo estos parámetros presentan limitación en la identificación de los microorganismos presentes en el área gingival de pacientes con enfermedad periodontal (Boutaga, et al., 2006). Es por este motivo que ha sido útil el desarrollo de la amplificación de ADN bacteriano mediante la reacción en cadena de la polimerasa del ADN ribosomal del gen 16S (Sakamoto, et al., 2005, Hernández, 2012).

En la necesidad de optimizar el nivel de especificidad, sensibilidad y rapidez en los métodos de identificación de microorganismos involucrados en la enfermedad periodontal, que buscan ayudar en la ejecución de programas adecuados en la prevención, control y tratamiento de la enfermedad periodontal. Entre las alternativas

diagnósticas propuestas a estos retos, se señalan las técnicas basadas en los principios de la biología molecular cuya introducción en los laboratorios asistenciales, con la cual se pretende brindar apoyo en la obtención de resultados altamente confiables, acortando además los tiempos de entrega de los mismos. Pero es importante comprender que a pesar de estas ventajas, dichos métodos no sustituyen, sino que complementan los métodos de diagnóstico tradicional (Bolívar, *et al.*, 2014).

La técnica PCR (Polymerase Chain Reaction) representa la prueba más sensible, específica y rápida que permite la detección de bacterias periodontales, en un menor tiempo y con mayor precisión en comparación con el método de cultivo tradicional. El cultivo bacteriano presenta limitaciones como la necesidad de mantener la viabilidad de las bacterias y la incapacidad de detectar niveles bajos de estas, es por esto, que ha sido muy útil el desarrollo de la amplificación e identificación de ADN bacteriano mediante PCR (Sakamoto, *et al.*, 2005, Atieh, 2008). La detección de estos microorganismos en la enfermedad periodontal depende en gran medida de las técnicas utilizadas (Sakamoto, *et al.*, 2005).

2. FORMULACIÓN Y JUSTIFICACIÓN.

El conocimiento de las enfermedades periodontales ha evolucionado a partir de hallazgos epidemiológicos, encontrándose mejores evidencias en cuanto a su etiología microbiana y la participación de enfermedades sistémicas que contribuyen en su progresión. Hoy se sabe que la falta de diagnóstico y tratamiento oportuno pueden influir en la evolución de la enfermedad periodontal hasta los estadios severos y en el peor de los casos en enfermedades cardíacas o accidentes cerebrovasculares, bebés con bajo peso al nacer y problemas en la salud en general (Piovano, 2009, García, 2011), afectando en un 90% de la población en todo el mundo (Pihlstrom, *et al.*, 2005). En Colombia, la enfermedad periodontal evaluada mediante la pérdida de inserción clínica afecta al 50% de la población; en su forma generalizada los individuos menores de 35 años muestran pérdida de inserción, la que aumenta después de los 60 años (Pulido, *et al.*, 2011, Mayorga, *et al.*, 2007).

En la enfermedad periodontal la presencia de microorganismos patógenos en el área subgingival, se presentan con mayor frecuencia bacterias anaerobias estrictas. Se sabe que la periodontitis resulta de una ruptura del equilibrio dinámico entre las bacterias de la placa dental y el sistema de defensa del hospedero y que requiere una evaluación cuantitativa de las bacterias patógenas presentes en la enfermedad periodontal (Escribano, *et al.*, 2005). En 1994 según Haffajee y Socransky, las bacterias más frecuentes en las afecciones periodontales son: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus intermedius* y *Treponema denticola* (Haffajee y Socransky, 2000). Bacterias que aumentan en frecuencia y concentración en la biopelícula de individuos con periodontitis en comparación con la población sana. La presencia en altas concentraciones de *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* se asocian con la progresión de las lesiones periodontales en pacientes tratados y no tratados (Boutaga, *et al.*, 2006, Mayorga, *et al.*, 2007, Haffajee y Socransky, 2000). Los microorganismos involucrados en la enfermedad periodontal varían dependiendo de diferentes factores tales como raza, dieta, nivel de desarrollo y condiciones de vida, dependiendo el área geográfica. Es por esto que se hace necesario establecer el perfil microbiológico con el fin de proponer esquemas adecuados de prevención y tratamiento a la enfermedad (Mayorga, *et al.*, 2007).

Para evaluar la presencia de los microorganismos involucrados en la enfermedad periodontal se han implementado diferentes pruebas de identificación como: microscópicas, cultivos bacterianos, inmunológicas, enzimáticas y genéticas; las cuales aunque son de gran ayuda en la identificación y cuantificación, presentan una

baja sensibilidad y especificidad y son limitadas en su capacidad para evaluar la susceptibilidad bacteriana (Atieh, 2008, Carnovale, 2009). El cultivo bacteriano considerado el “gold standard” ha sido de gran ayuda, ya que puede determinar la presencia de diferentes bacterias, valorar la susceptibilidad a distintos antibióticos y estimar el número de bacterias aisladas (Atieh, 2008). Sin embargo, éste presenta limitantes en la detección de los microorganismos involucrados por el requerimiento de microorganismos viables presentes en la muestra y largos periodos de crecimiento (días), que puede tardar la emisión del resultado (Pihlstrom, *et al.*, 2005), en comparación con otras técnicas como las moleculares. Es por esto que se hace necesario implementar nuevas técnicas o herramientas que faciliten la identificación y cuantificación de periodontopatógenos presentes en la enfermedad periodontal (Piovano, 2009). Las técnicas de biología molecular se basan en la aplicación de métodos de análisis de ADN o RNA en la detección e identificación de microorganismos involucrados. El diagnóstico molecular ha demostrado ser seguro, rápido, reproducible y discriminatorio, siempre que las técnicas hayan sido cuidadosamente estandarizadas y controladas (Escribano, *et al.*, 2005, Medina, *et al.*, 2010). La PCR en tiempo real es de gran ayuda en la identificación y cuantificación de microorganismos involucrados y en el seguimiento del plan de tratamiento en pacientes con enfermedad periodontal; además de ser útil para estudios epidemiológicos más exactos sobre la progresión de la periodontitis (Nonnenmacher, *et a.*, 2004).

No obstante, debido a que en la literatura se han reportado muy pocos estudios en la identificación de patógenos involucrados en la enfermedad periodontal por PCR multiplex, por ende se justifica realizar este proyecto en determinar cuantitativamente la presencia de *Porphyromona gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetecomitans* por PCR multiplex en tiempo real en pacientes con gingivitis y periodontitis crónica.

3. MARCO TEORICO

3.1 ENFERMEDAD PERIODONTAL

La enfermedad periodontal se conoce como el proceso patológico que altera las estructuras del periodonto, como se muestra en la Figura 1, que se encuentra formado por la encía, el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar, que hacen parte del tejido de protección y de soporte del diente (Piovano, 2009). Esta patología puede estar ocasionada por un gran número de bacterias anaerobias Gram negativas que se encuentran presentes en la placa bacteriana, que pueden afectar de forma individual o en combinación, entre las cuales se encuentran: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* y *Treponema denticola* (Rodrigues, et al., 2012, Braga, et al., 2010). El acumulo de altas concentraciones de placa dental en el periodonto pueden ocasionar afección de las estructuras de soporte del diente, además otra de las causas de esta afección pueden ser los factores genéticos, ambientales y el consumo de tabaco (Boutaga, et al., 2006); además de trastornos neoplásicos, inmunológicos y hematológicos. La enfermedad periodontal se asocia con los resultados adversos en el embarazo, enfermedad cardiovascular, accidente cerebrovascular, enfermedad pulmonar y la diabetes (Loesche, Grossman, 2001, Perea, 2004), aunque las relaciones causales no han sido establecidas (Pulido, et al., 2011, Perea, 2004). A esta enfermedad se le clasifica en gingivitis que incluye procesos que afectan la encía presentándose como inflamación de los tejidos blandos sin afectar al ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar. La periodontitis es el segundo grupo que incluye los procesos que comprometen todas las estructuras del tejido de soporte (Piovano, 2009).

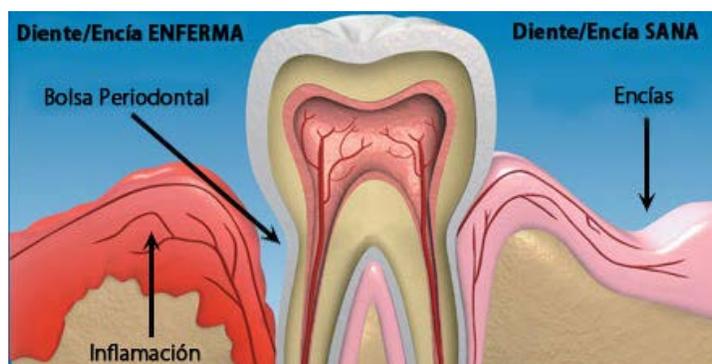


Figura 1. Enfermedad Periodontal. Comparación de las características de la inflamación de la área gingival (derecha) en comparación con las características de la encía sana (izquierda)

<http://lorenzanadds.com/bloges/la-enfermedad-periodontal/>

3.1.1 GINGIVITIS

Es la inflamación de la encía caracterizada por edema, eritema, cambio en la morfología normal, exudado acuoso y hemorragia (ver Figura 2). La gingivitis se descubre con mayor frecuencia durante la adolescencia y el embarazo. Una de las causas es deficiencia de higiene oral, que se caracteriza por la presencia de placa bacteriana y algunos factores locales como maloclusión, calculo dentario conocido como placa calcificada o sarro y restauraciones defectuosas, que juegan un papel secundario importante en la progresión de gingivitis a periodontitis (López, 1994).

La gingivitis se caracteriza por (Burgos, 2007):

- Enrojecimiento.
- Engrosamiento del área gingival y de espacios interdenciales.
- Variación del área gingival.
- Aspecto liso y brillante.
- Hemorragia espontánea o después del sondaje periodontal.
- Ausencia de sintomatología

Es importante el control o la corrección de los factores locales y de la placa bacteriana para evitar la acumulación de esta en los bordes gingivales (López, 1994). Las condiciones que se presentan en el proceso inflamatorio durante la gingivitis propician un ambiente anaerobio que favorecen la colonización de bacilos móviles y espiroquetas. Los cultivos de placa bacteriana evidencian el crecimiento de *Aggregatibacter*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Fusobacterium* y *Treponemas*, *Prevotella intermedia* y especies de *Campylobacter* (Piovano, 2009).



Figura 2. Gingivitis.

<http://www.zipheal.com/gingivitis/periodontal-disease-stages/3663/>

3.1.2 PERIODONTITIS

La periodontitis es una enfermedad crónica inflamatoria del periodonto, con base inmunológica, iniciada por la acumulación de una biopelícula bacteriana que se adhiere a los dientes y la cual causa daño en los tejidos de soporte como se representa en la Figura 3 (Piovano, 2009). Esta placa dental es la fuente patogénica de caries dental y periodontitis, la cual se presenta con extensión hacia las superficies más profundas del periodonto. Hay formación de bolsa, pérdida de hueso de soporte y movilidad; puede ser localizada o generalizada y se clasifica dependiendo del sitio clínico específico, de los microorganismos participantes y de los factores del huésped que están presentes al momento del diagnóstico (Nonnemacher, *et al.*, 2005).

3.1.2.1 PERIODONTITIS CRONICA

Los signos clínicos característicos de la periodontitis crónica incluyen pérdida de inserción clínica, pérdida de hueso alveolar, formación de bolsas periodontales e inflamación gingival. A esto se puede asociar un sobrecrecimiento del área gingival, sangrado al sondaje, movilidad dentaria aumentada, supuración, pudiendo llegar a la pérdida dentaria. La periodontitis crónica progresa de forma continua y según su extensión se puede clasificar en: Localizada si es menos de un 30% del sitio afectado y generalizada si es más del 30% del sitio afectado (Bascones y Figuero, 2005).y a su severidad en: leve: Cuando la pérdida de inserción es de 1 a 2 milímetros, moderada: Cuando la pérdida de inserción es de 3 a 4 mm, severa o avanzada: Cuando la pérdida de inserción es superior a 5 mm (Escudero *et al.*, 2008).

3.1.2.2 PERIODONTITIS AGRESIVA

La periodontitis agresiva se caracteriza por: rápida pérdida de inserción y destrucción ósea y antecedentes familiares. Otros rasgos que también se presentan de forma general pero no universal son: cantidad de depósitos microbianos inconsistentes con la severidad de la destrucción tisular presente, proporciones elevadas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* o *Porphyromonas gingivalis*. Se pueden definir dos tipos de periodontitis agresiva: localizada se caracteriza por la pérdida de inserción interproximal en primeros molares e incisivos o al menos en dos dientes permanentes, uno de los cuales es un primer molar y no incluye más de dos dientes que no sean primeros molares e incisivos y la generalizada que se presenta

en pacientes menores de 30 años, pero puede aparecer en edades superiores, con pérdida de inserción dental, que afecta a tres dientes permanentes diferentes de primeros molares e incisivos (Bascones y Figuero, 2005).



Figura 3. Periodontitis

<http://odontored.wordpress.com/2011/08/12/la-periodontitis/>

3.2 BACTERIAS ASOCIADAS A PERIODONTITIS CRÓNICA

Se han identificado diferentes microorganismos responsables de las infecciones periodontales por su presencia en el biofilm dental como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, y *Treponema denticola*, considerándolas responsables del daño causado, siendo importante su identificación temprana. Aunque con mayor frecuencia, alcanzando en un 46% (Diaz, *et al.*, 2010) podemos encontrar *P. gingivalis*, *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* (Nonnemacher, *et al.*, 2005).

3.2.1 *Porphyromona. gingivalis*

Es un bacilo corto, que mide de 0.5 - 0.8 μm x 1 - 3.5, Gram negativo, anaerobio, de pigmentación negra, no esporulado, inmóvil, que requiere de vitamina K y hemina para su crecimiento en cultivo. Como factores de virulencia importantes para este microorganismo se encuentran las fimbrias, Proteinasas y lipopolisacáridos (Diaz, *et*

al., 2010), que permiten la adhesión a la superficie y llevar a cabo un proceso de quimiotaxis, alterando los mecanismos de defensa. Es considerado un comensal en la cavidad oral. Por ser un microorganismo anaeróbico estricto, se encuentra predominantemente en las bolsas periodontales, específicamente en el biofilm subgingival (Hojo, *et al.*, 2008). *P. gingivalis* es el microorganismo más prevalente en Periodontitis crónica y en Periodontitis agresiva generalizada (Burgos, 2007).

3.2.2 *Prevotella intermedia*

P. intermedia es un bacilo, que miden 0.4 x 0.6-1 µm., Gram negativo, capaz de producir pigmento, anaerobio estricto, inmóvil, no esporulado. Para crecimiento en cultivo requiere de vitamina K y hemina. Este microorganismo tiene la capacidad de destruir el tejido del periodonto, debido a sus factores de virulencia como las proteasas y las fimbrias, las cuales dificultan su reconocimiento por la destrucción de los elementos que intervienen en la inflamación y la destrucción tisular. Habita en el surco gingival y en la bolsa periodontal de la cavidad bucal; así mismo, esta ha sido aislada en jóvenes con Periodontitis crónica (Guilarte, 2001).

3.2.3 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Es un cocobacilo, Inmóvil, que mide aproximadamente 0,5 x 1,5 µm, Gram negativo, este microorganismo requiere de un medio en presencia de CO₂ enriquecido como el agar-sangre o el agar-suero, las colonias llegan a un tamaño máximo de 1mm después de 2 a 3 días a 37° C, tienen un aspecto de estrella. La leucotoxina, la adhesina y la colagenasa hacen parte de los factores de virulencia de este microorganismo que permiten e inhiben el reconocimiento del sistema inmune (García, 2011). *A. actinomycetemcomitans* hace parte de la microbiota de la cavidad oral en individuos sanos. Es el principal agente etiológico de formas agresivas de periodontitis y como patógeno oportunista ha sido aislado principalmente en muestras de sangre (Mayorga, *et al.*, 2007, Flores, 2011).

Tabla 1 Comparación de características microbiológicas de los patógenos asociados a las periodontitis, incluidos en este estudio.

	COLORACIÓN y MORFOLOGIA	FACTORES DE VIRULENCIA	PRUEBAS BIOQUIMICAS
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Gram (-) Bacilo que mide de 0,5- 0,8 x 1,0 – 3,5 µm. No esporulado, inmóvil, anaerobio estricto	Fimbrias, Proteinasas, Colagenasas	Catalasa (-) Indol (+) Nitratos (-)
<i>Prevotella intermedia</i>	Gram (-) Bacilo que miden 0, 4 x 0.6-1 µm. No esporulado, inmóvil, anaerobio estricto, con pigmento	Proteasas, Fimbrias	Catalasa (-) Indol (+) Nitratos (-)
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Gram (-) Cocobacilo que mide 0,4- 0,5 X 1,0-1,5 µm. Inmóvil, esporulado, anaerobio estricto.	Leucotoxinas, Adesinas Colagenasas	Catalasa (+) Oxidasa (-) Indol (-) Nitratos (-) Ureasa (-) Glucosa (+) Lactosa (-)

3.3 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

Debido a la naturaleza infecciosa de la periodontitis se ha introducido la identificación microbiológica tanto en la fase inicial, como en la evaluación de respuesta a diferentes tratamientos. Entre las pruebas de identificación (Atieh,2008) para evaluar la presencia de microorganismos patógenos en la enfermedad periodontal encontramos: pruebas microscópicas como microscopia de contraste de fase y de fase oscura las cuales permiten relacionar la destrucción periodontal con la proporción relativa de espiroquetas y microorganismos móviles, pero la cual no permite diferenciar en géneros y especies microbianas (Carnovale,2009); las pruebas inmunológicas como: inmunofluorescencia directa, la cual se usa para identificar un microorganismo en una muestra clínica y la inmunofluorescencia indirecta que detecta la presencia de un anticuerpo específico en el suero después de una exposición a un microorganismo (Tortora, *et al.*2007); citometría de flujo, aglutinación por látex y el test de ELISA, que detecta bacterias de forma indirecta, presentan una especificidad y sensibilidad ligeramente superior al cultivo, pero

muestran inconvenientes en la evaluación de la susceptibilidad bacteriana a los antibióticos, la reacción cruzada anticuerpos y la detección de microorganismos con antígenos accesibles; las pruebas enzimáticas no detectan bacterias de forma directa, si no que determinan la presencia por las enzimas que ellas producen como la colagenasas, peptidasas, enzimas análogas a la tripsina, proteinasas neutras y elastasas, las cuales tienen un potencial destructivo de los tejidos periodontales, esta prueba es de baja especificidad y sensibilidad, la necesidad de altas concentraciones de enzimas y detección de grupos bacterianos; el cultivo bacteriano determina la presencia de diferentes especie bacterianas, valora la susceptibilidad de estas a diferentes antibióticos y estima el número total de bacterias aisladas, sin embargo tiene inconvenientes para la detección de bacterias que se encuentran relacionadas con la periodontitis al no ser cultivables y por último tenemos las técnicas de biología molecular como la PCR que se basa en el análisis de material genético en la detección e identificación de microorganismos presentes en la biopelícula, esta técnica se usa en la detección de patógenos periodontales, sin embargo presenta limitaciones en la cuantificación de cada una de ellas, por lo cual se ha implementado la técnica específica de PCR cuantitativa en tiempo real, la cual permite cuantificar cada uno de los microorganismos y gracias a su sensibilidad y especificidad, es de utilidad en estudios epidemiológicos (Piovano,2009;Carnovale,2009).

3.3.1 PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qPCR)

Esta técnica se basa en sintetizar grandes cantidades de ADN *in vitro* de manera similar a como la célula lo realiza *in vivo*. Una reacción típica incluye como reactivos: la molécula de ADN de doble cadena, una polimerasa termoestable (Taq), dos oligonucleótidos iniciadores o primers, una mezcla de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP), buffer de reacción, y magnesio. La reacción se efectúa en un termociclador, el cual permite cambios de temperatura en tiempos distintos. Esta técnica consta de las siguientes etapas: Desnaturalización o separación de las cadenas de doble hélice, del ácido nucleico por calentamiento a 90-95°C, en la fase de Hibridación se enfría la mezcla disminuyendo la temperatura a 40-60°C y las cadenas sencillas se hibridan con los cebadores y para la fase de extensión se eleva de nuevo la temperatura a 70- 75°C y la polimerasa se comienza a extender a partir de los cebadores, usando como molde la cadena sencilla de ADN original, obteniéndose al final una cadena complementaria inicial, los productos de cada ciclo se utilizan como moldes para el siguiente, por lo que el número de copias de ADN es duplica cada vez (Bolvar,2014;Medina, *et al.*, 2010)

La PCR en tiempo real es una variante de la PCR convencional que se emplea para la cuantificación de ácidos nucleicos, tanto de ADN como de RNA en una muestra; con ella se puede monitorizar el progreso de la PCR mientras ésta sucede. La PCR en tiempo real lleva los mismos reactivos que la PCR convencional, más una sonda marcada con un fluorocromo específico para el microorganismo de interés, que en un termociclador equipado con sensores para detectar la fluorescencia emitida tras excitar el fluorocromo a la longitud de onda apropiada, permite ver la dinámica de las curvas de amplificación mediante un programa informático del propio termociclador de QPCR. En la PCR en tiempo real se emplean dos tipos de sistemas de detección por fluorescencia: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos diseñadas de manera especial. Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a una molécula de ADN de doble hélice, siendo el más usado el SYBR Green I. La fluorescencia emitida se incrementa de modo proporcional al ADN que se forma en cada ciclo de PCR (Piovano2009; Medina, *et al.*, 2010). La PCR en tiempo real multiplex permite la amplificación de varias secuencias de interés a través del uso de varios primers que se combinan en un mismo tubo con el resto de los reactivos de la reacción incluyendo el respectivo fluorocromo de identificación. Estas técnicas de PCR se utilizan en la detección de las principales bacterias asociadas con la enfermedad periodontal, de forma única o combinada; siendo técnicas rápidas, sensibles y útiles en la cuantificación de bacterias como *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *A. actinomycetemcomitans*, entre otras (Carnovale, 2009).

Usualmente se usan dos estrategias en la cuantificación de la presencia del gen requerido para el estudio, como lo son la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa.

La cuantificación relativa no requiere estándares con concentraciones determinadas. Se usa para obtener la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de determinación de un gen en estudio en comparación con uno o más genes de referencia. Hay que tomar en cuenta que los genes de referencia deben ser constantes en las células estudiadas. Por esto, las secuencias utilizadas para cuantificación relativa son generalmente genes “housekeeping” (Vinueza, 2009). La cuantificación absoluta es la relación de la señal obtenida con la PCR en tiempo real al número de copias fijas de una secuencia estándar utilizando una curva de calibración; las cuales son altamente reproducibles y permiten la generación de datos específicos y sensibles. Sin embargo, el modelo de curvas de calibración externo debe ser rigurosamente validado con buena exactitud (Vinueza, 2009).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Determinar cuantitativamente la presencia de *Porphyromona gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por PCR multiplex en tiempo real en pacientes con periodontitis crónica.

4.2 Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones óptimas de extracción de ADN para la técnica PCR en tiempo real, en la detección y cuantificación de patógenos presentes en periodontitis crónica como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
2. Cuantificar de manera absoluta *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por PCR en tiempo real en muestras de pacientes con periodontitis crónica.

5 METODOLOGÍA

5.1 Tipo de estudio

Este es un estudio es de tipo descriptivo, que se llevó a cabo en el centro de Investigaciones Odontológicas (CIO) de la Pontificia Universidad Javeriana. Se recolectaron 134 muestras de pacientes que asistieron a consulta en la facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana, los cuales fueron informados sobre el proyecto y su finalidad. Los pacientes en su totalidad firmaron el consentimiento (Anexo 1).

5.2 Muestras

Los criterios de inclusión de los pacientes para la toma de las muestras fueron: pacientes mayores de 18 años, diagnóstico de periodontitis crónica, con mínimo dos dientes afectados, que no tuvieran compromiso sistémico y que no tuvieran tratamiento periodontal durante seis meses previo a la toma de la muestra. Dentro de los criterios de exclusión se tuvieron en cuenta pacientes embarazadas o en lactancia y pacientes que estuvieran consumiendo corticoides, antibióticos o analgésicos tres meses previos a la toma de la muestra (Anexo 2).

Se recolectaron 134 muestras del surco gingival de las cuales 90 correspondían a periodontitis, 36 a gingivitis y 8 a sanos, las muestras se tomaron con conos de papel, se conservaron en un Eppendorf que contenía tioglicolato (Anexo 3) y fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis respectivamente a 37°C durante 3 horas.

5.3 Extracción de ADN

Para establecer el método óptimo de extracción de ADN de las muestras recolectadas en el centro de Investigaciones Odontológicas, se establecieron tres métodos de extracción por los cuales se evaluaron tomando 21 muestras aleatorias de las 134 recolectadas previamente, para cada uno de los métodos se tomaron alícuotas de 150 µl. Los métodos de elección fueron:

Método A: Calentamiento a 95°C

Se toman 150 µl de la muestra y se depositan en un tubo de Eppendorf, sometidos a calor en un baño seco o bloque de calor (Barnstead Lab-Line) a una temperatura de 95°C y resuspendidos con 50 µl de agua DEPC.

Método B: DNAzol

A 150µl de muestra se le adicionan 500 µl de DNAzol, se homogenizó la mezcla y se centrifugo a 10000 rpm por 10 minutos a 25°C, el sobrenadante se transfirió a un tubo de 1.5 ml limpio y se agregaron 500 µl de etanol al 100% se mezcló por inversión de 5 a 8 veces e incubo a 20°C durante una hora, luego se centrifugo

nuevamente a 10000 rpm por 10 minutos a 25°C, se eliminó el sobrenadante y se agregó 500 µl de etanol al 70% se volvió a centrifugar y se eliminó el sobrenadante dejando en el tubo el sedimento para secado a temperatura ambiente, con el fin de eliminar el etanol restante, después de secado se resuspendió con 50 µl de agua DEPC.

Método C: Hervido + Proteína K + Lisozima

Se tomó 150µl de muestra en un tubo de 1.5 ml, se ponen en un baño seco o bloque de calor (Barnstead Lab-Line) a 95°C por 15 minutos, se adicionan 5µl de proteinasa K y se incubo a 55°C durante 1 hora, luego se adiciono 20µl de lisozima y se incubo a 37°C por 1 hora, esta mezcla se calentó nuevamente a 95°C durante 5 minutos.

5.4 Cuantificación y evaluación de pureza del ADN

Después de haber sido extraídas las muestras por el método de elección se evaluó la concentración de cada una de las muestras mediante el espectrofotómetro NanoDrop 1000® (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware USA). El ND – 1000 es un espectrofotómetro de espectro total (220nm-750nm), la cual se basa en una tecnología que emplea la tensión superficial para mantener la muestra adherida y de esta manera medir la concentración de ADN, tiene la capacidad de medir muestras altamente concentras sin necesidad de realizar diluciones, obteniendo la concentración de un 1µl. Para evaluar la pureza y concentración de ADN presente en la muestra, se valida con una absorbancia de 260 y 280 nm. Una proporción de 1.8 es generalmente aceptada como "puro" para el ADN.

5.5 Cuantificación por PCR en tiempo real

Para obtener la cuantificación de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, después de haber obtenido la extracción del ADN y validado la pureza de las 134 muestras que correspondían 90 a periodontitis, 36 a gingivitis y 8 a sanos, se llevó a cabo la PCR en tiempo real con las concentraciones y protocolo previamente estandarizados (García ,2013). Los genes seleccionados para los microorganismos de interés se buscaron en las base de datos del GenBank como se muestra en la Tabla 2 y se usaron los siguientes iniciadores para cada uno de los patógenos ver Tabla 3. Los reactivos se ajustaron para un volumen final de 10uL, que contenía 1µl de ADN molde, 0.3 µl de iniciadores Forward y Reverse, 0.8µl de agua y Master mix. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador (CFX 96 Real Time System BioRad), con el siguiente protocolo: fase de desnaturalización a 95°C por 10 minutos, (95°C por 1 minuto, 60°C por 2 minutos, 72 °C por 1 minuto (30 ciclos)) 72°C por 4 minutos y 4°C ∞ (32). Se usó

como control negativo de la reacción la mezcla de los reactivos sin ADN molde (García, 2013).

Para la obtención de los resultados de número de copias de la PCR universal del gen 16S se utilizó la curva estandarizada en la detección del gen 16S en la cual se obtuvo un rango de sensibilidad entre 10^4 y 10^7 número de copias de DNA (Anexo 3) (García,2013)

Tabla 2: Microorganismos de interés y número de acceso al GenBank

Microorganismo	Gen de elección	Numero de acceso
<i>P. gingivalis</i>	3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase	AP012203.1
<i>P. intermedia</i>	3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase"	CP003503.1
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	"3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase "	CP003496.1
UNIVERSAL	16S ribosomal RNA	KM287567.1

5.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue descriptivo, se utilizaron frecuencias relativas y absolutas, medidas de tendencia central y de desviación estándar. Para la evaluación de diferencias de las medias entre los grupos incluidos entre el estudio, se realizó una prueba hipótesis de análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, teniendo como valor de significancia $p < 0.05$.

Los análisis descriptivos fueron realizados en EXCEL 2010 y las pruebas de hipótesis en el programa Graph Pad Prisma 6, atreves de las gráficas Box Plot.

Tabla 3: Primers y sondas de la PCR en tiempo real usados para las bacterias de interés.

<i>Porphyromonas gingivalis</i>	
Primers Forward	ATACGACGGCCTTTCATACG
Primers Reverse	GCCTCGGGTGTATTGTGAAT
Quasar 705	TCCTCCATTTATCGCTACGG –BHQ2
<i>Prevotella intermedia</i>	
Primers Forward	GACCCGAACGCAAATACAT
Primers Reverse	AGGGCGAAAAGAACGTTAGG
FLUOR RED 610	AAAGAAGGAACACCCCGACT – BHQ2
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	
Primers Forward	GCGAACGTTACGCGTTTTAC
Primers Reverse	GGCAAATAAACGTGGGTGAC
FLUOR GOLD 540	AATTGTCCACACCGAAACCC– BHQ1
Universal (16S)	
Primers Forward	TCCTACGGGAGGCAGCAGT
Primers Reverse	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT
FAM	CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC– BHQ1

6 RESULTADOS

6.1 Selección del método de extracción

Se realizó la extracción por los 3 métodos: método A: calentamiento a 95°C, método B DNazol y método C: hervido + proteína K+ lisozima, a cada una de las 21 muestras que fueron tomadas aleatoriamente, se evalúa la cuantificación y pureza de ADN como se muestran los resultados en la Tabla 4.

Tabla 4: cuantificación de 21 muestras por los tres métodos de extracción

MUESTRAS	METODOS DE EXTRACCION					
	METODO A		METODO B		METODO C	
	ng/μl	260/280	ng/μl	260/280	ng/μl	260/280
1	1276.7	1.64	196.6	1.86	1868.4	1.5
2	1936.5	1.54	142.1	2	1919.8	1.48
3	1026.7	1.49	130.7	1.77	2370.1	1.38
4	1628.7	1.41	166.7	1.83	-4561	2.62
5	1450.2	1.34	120.3	2.18	3320.2	1.18
6	263.8	1.34	124.2	1.51	1444.4	1.25
7	1902	1.39	213	2.01	1575.1	1.43
8	1453	1.09	70.9	2.02	2111.7	0.97
9	1755.7	1.46	112.4	3.25	1691.6	1.42
10	1358.8	1.53	253.3	2.13	1276.3	1.27
11	-1116.5	-9.94	366.4	1.49	-8298	1.6
12	1306.3	1.55	239.2	1.86	3674.4	1.34
13	1515.3	1.27	18.8	2.07	111.9	0.96
14	946.1	1.37	136.5	1.86	1975	1.29
15	1418.0	1.34	149.9	1.94	-2360	1.16
16	1466	1.53	232.1	2.68	3595.6	1.27
17	1410.2	1.56	162	2.08	2151.3	1.23
18	1795.6	1.3	181.4	1.94	4369.9	1.36
19	2516.6	1.44	262.5	2.19	-4591	1.42
20	426.3	1.35	250.8	1.9	-2039	0.69
21	1447	1.55	287.1	2.29	2750.6	1.35
Promedio	1555.74	0.63	181.76	2.04	683.68	1.34

En el análisis de la cuantificación de las 21 muestras extraídas por los tres métodos de extracción se observó que de los tres métodos el mejor es el método B ya que su valor es más óptimo para una cuantificación de buena calidad y pureza.

Se realizó una PCR convencional y una PCR en tiempo real para las 21 muestras por los diferentes métodos de extracción y evaluar cual presenta ser el mejor método de extracción de ADN Tabla 5.

Tabla 5: Métodos de extracción de ADN por PCR convencional y en tiempo real

MUESTRA	CODIGO	DIAGNOSTICO	PCR CONVENCIONAL			PCR EN TIEMPO REAL		
			Método A	Método B	Método C	Método A	Método B	Método C
64	1	Gingivitis	+	+	-	+	-	-
26	2	Gingivitis	-	+	-	+	+	+
33	3	Gingivitis	-	+	-	+	+	+
35	4	Gingivitis	-	+	-	+	+	+
53	5	Gingivitis	-	+	-	+	+	+
50	6	Gingivitis	-	+	-	+	-	-
63	7	Gingivitis	-	+	-	+	-	+
1	8	Periodontitis	+	+	-	-	+	-
87	9	Periodontitis	-	+	-	+	+	+
88	10	Periodontitis	-	+	-	+	+	+
18	11	Periodontitis	-	+	-	+	+	+
27	12	Periodontitis	-	+	-	-	+	+
48	13	Periodontitis	+	+	-	-	+	+
30	14	Periodontitis	+	+	-	+	+	-
89	15	Sanos	-	+	-	+	+	+
90	16	Sanos	-	+	-	+	+	-
91	17	Sanos	-	+	-	+	-	+
92	18	Sanos	-	+	-	-	-	+
93	19	Sanos	-	+	-	+	+	-
94	20	Sanos	-	+	-	+	-	+
95	21	Sanos	-	-	-	+	+	+

PCR convencional

Método A				Método B				Método C			
Positivos		Negativos		Positivos		Negativos		Positivos		Negativos	
n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
4	19%	17	81%	20	95%	1	5%	0	0%	21	100%

PCR en tiempo real

Método A				Método B				Método C			
Positivos		Negativos		Positivos		Negativos		Positivos		Negativos	
n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
17	81%	4	19%	15	71%	6	29%	15	71%	6	29%

Se analizaron las 21 muestras extraídas por los métodos: calentamiento a 95°C, DNAzol y hervido + proteína K+ lisozima, en la cuantificación de ADN por PCR convencional y PCR en tiempo real, dando como resultado el método DNAzol, el método de elección para muestras de pacientes con periodontitis.

Teniendo en cuenta los resultados evaluados mediante la técnica de cuantificación de ADN y los resultados de las de las PCR convencional y en tiempo real se elige el método B, como método de extracción para realizar la Cuantificación de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por PCR en tiempo real.

6.2 Cuantificación por PCR en tiempo real

Después de haber seleccionado el mejor método de extracción de ADN y de haber realizado la extracción de las 134 muestras, se llevó a cabo la cuantificación de la concentración y pureza de ADN de cada una de las muestras. (Anexo 5)

Cuantificación de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por PCR en tiempo real de las 134 muestras extraídas por el Método B (Anexo 6).

Porphyromonas gingivalis.

	Positivos		Negativos	
	n	%	n	%
Sanos	7	87.5 %	1	12.5%
Periodontitis	78	86.7%	12	13.3%
Gingivitis	25	69.4%	11	30.6%

Prevotella intermedia

	Positivos		Negativos	
	n	%	n	%
Sanos	0	0%	8	100%
Periodontitis	52	57.7%	38	42.2%
Gingivitis	4	11.1%	32	88.8%

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

	Positivos		Negativos	
	n	%	n	%
Sanos	1	12,5%	7	87,5%
Periodontitis	18	20%	72	80%
Gingivitis	7	19,4%	29	80,5%

De acuerdo a los resultados para pacientes sanos se identificó 87.5% de *P. gingivalis* y 12,5% de *A. actinomycetemcomitans*. En pacientes con periodontitis encontramos 86.7% de *P. gingivalis*, 57.7% de *P. intermedia*. y 20% de *A. actinomycetemcomitans*. Para pacientes con gingivitis 69.4% de *P. gingivalis*, 11.1% de *P. intermedia* y 19.4% *A. actinomycetemcomitans*.

Encontrando mayor prevalencia de *P. gingivalis* en pacientes sanos, con periodontitis y gingivitis, seguido de *P. intermedia*.

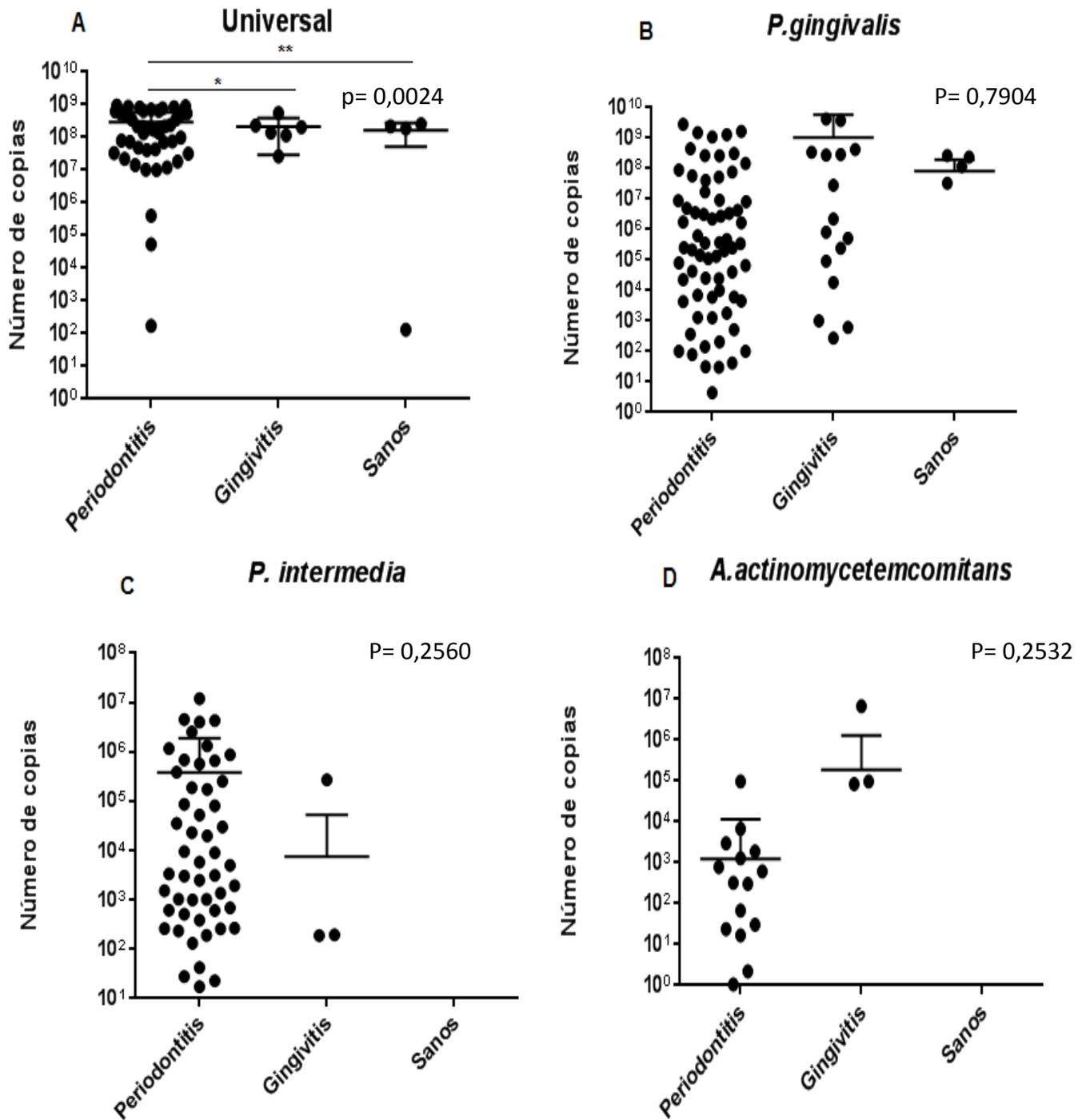


Figura 4 Cuantificación de periodontopatógenos en placa gingival de pacientes con periodontitis, gingivitis y sanos. Total de bacteria (A), *P. gingivalis* (B), *P. intermedia* (C) y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (D). * $p=0.0024$

De acuerdo a la curva de calibración estandarizada previamente con concentraciones de estándares de 10^1 a 10^{10} número de copias de la muestra. En los resultados obtenidos en la cuantificación de ADN de las 134 muestras, se obtuvieron resultados significativamente importante con un $p=0.0024$ en el total de bacterias mediante la amplificación del gen16S entre los grupos de pacientes con periodontitis y gingivitis y entre el grupo de periodontitis y sanos; mientras que para la cuantificación de ADN de *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* que no mostraron diferencias significativas entre los grupos (Ver figura4).

La cuantificación de *P. gingivalis* osciló entre (10^1 a 10^{10}) (Fig4B), para *P. intermedia* (10^1 a 10^7) (Fig4C) y para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, (10^1 a 10^7) (Fig4D); número de copias, siendo concentraciones de ADN óptimas para las muestras.

7 DISCUSIÓN

En la comparación de métodos de extracción de ADN enzimáticos, con detergentes y a calentamiento de las muestras le permitió a (Buck en 1992) reportar en sus resultados que el método enzimáticos, son métodos que permiten la extracción y cuantificación de ADN.

En este estudio la extracción de ADN por el método DNAzol demuestra ser el método de elección, en comparación con el método de calentamiento y el método hervido+ proteína K+ lizosima, ya que permite obtener un valor óptimo del 95 % en la cuantificación de ADN de buena calidad y pureza.

Los diferentes cuadros clínicos que se presentan en la enfermedad periodontal, dejan en evidencia el papel que juegan las bacterias en el inicio y progresión de la enfermedad, por esto cuando van a ser tratadas, sabiendo que el raspado radicular no eliminan por completo los patógenos periodontales, se hace necesario el uso de antimicrobianos y que mejor si el uso es de acuerdo a los criterios microbiológicos identificados para cada patología como menciona (Bascones en 2005).

(Haffajee en el 2000) concluye que debido a la variedad, ubicación y los diferentes factores de virulencia de cada microorganismo presentes en la encía afectada y sana, no se puede determinar su etiología a partir de una sola bacteria como la responsable de la causa de la enfermedad periodontal, lo que puede llevarse a cabo por solo una o la asociación de dos o más.

En lo reportado por (Nonnenmacher, 2004; Mayorga en 2007) describe la relación de algunas bacterias subgingivales con la enfermedad periodontal como *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Treponema denticola*, entre otras especies. Las cuales aumentan en frecuencia y concentración en la biopelícula de individuos con periodontitis en comparación con la población sana.

(Bascones en 2005) menciona que estas bacterias como *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *A. actinomycetemcomitans*, tienen un papel importante en el comienzo y posterior desarrollo de la periodontitis participando en la formación de la bolsa periodontal, destrucción del tejido conectivo y reabsorción del hueso alveolar a través de un mecanismo inmunopatogénico.

En la aplicación de la biología molecular (Perea en el 2004) considero algunas bacterias como patógenas en los diferentes estadios de la enfermedad periodontal como: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*,

Bacteroides forsythus, *Prevotella intermedia* y *Treponema denticola*, las cuales se encuentran implicadas.

Sin embargo, como lo menciona (Atieh, 2008) sólo unas bacterias específicas se han asociado con la enfermedad periodontal como: *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* que contribuyen en la iniciación y/o progresión de formas destructivas de periodontitis.

La prevalencia de *P. gingivalis* en pacientes con periodontitis es de 45.5%, de *P. intermedia* 83.3% y *A. actinomycetemcomitans* es de 27.4% siendo esta la menos frecuente en el estudio reportado por (Boutaga en 2006).

El 86.7% es el resultado de *P. gingivalis* en pacientes con periodontitis lo que coincide con (Braga en 2010) donde sugiere que *P. gingivalis* se puede tomar como un factor de riesgo para la enfermedad y de hecho que la sola presencia de este microorganismo es considerado como un factor de riesgo para la periodontitis crónica.

A. actinomycetemcomitans se presentó con 20% en pacientes con periodontitis y 19.4% en pacientes con gingivitis, lo que también se muestra en estudios de (Mayorga 2007) lo cuales evidenciaron 18.8% de *A. actinomycetemcomitans* en los resultados obtenidos para la técnica PCR en tiempo real. En lo reportado por (Tan en el 2001) identifican la leucotoxina como factor de virulencia, al poseer una variación en el promotor regulador de producción de leucotoxina y la capacidad de producir más leucotoxina en pacientes jóvenes.

El estudio realizado por (Kamma *et al* en 2004) demostró que *P. gingivalis* es la bacteria más frecuentemente aislada de pacientes con periodontitis y *A. actinomycetemcomitans* demostró una prevalencia relativamente baja. Siendo un resultado similar a nuestro estudio ya que se encontró una mayor frecuencia de *P. gingivalis* que de *A. actinomy-cetemcomitans* en pacientes con periodontitis.

(López en 1996) encontró en pacientes con periodontitis mayor prevalencia de *P. gingivalis* y *P. intermedia* que *A. actinomycetemcomitans*, como se demuestra en el estudio de los 134 pacientes mostrando 86.7% *P. gingivalis* y 57.7% de *P. intermedia* en pacientes con periodontitis.

En la revisión que hace (Walter en el 2001) presenta que la mayoría, si no todas, las formas de la enfermedad periodontal son específicas, aunque si el hospedero está genéticamente predispuesto a la enfermedad periodontal, como en el síndrome de Papillon-Lefèvre, síndrome de Down, o si el hospedero está comprometido por defectos de leucocitos, diabetes, es un fumador, tiene mala higiene oral o simplemente la edad, los síntomas clínicos están casi siempre asociados

significativamente con el crecimiento excesivo de un número finito de especies anaerobias, tales como *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *Prevotella intermedia* y *T. denticola* en la placa subgingival.

Las bacterias que desempeñan un papel importante en la etiología y patogenia de la periodontitis y participan en la formación de la bolsa periodontal, destrucción del tejido conectivo y reabsorción del hueso alveolar a través de mecanismos directos e indirectos. Sin embargo, la respuesta que se establece es en gran modo responsable del grado de destrucción periodontal así como del balance que se establece entre los diferentes componentes de la misma respuesta inmune del huésped como lo menciona (Díaz en el 2010).

Los resultados encontrados en el estudio realizado por (Nonnenmacher, 2005) le permitió postular que la cantidad de microorganismos en los sitios periodontales podría ser un determinante importante en el desarrollo de la enfermedad periodontal y la principal diferencia entre un diagnóstico de enfermedad periodontal y una persona sana puede ser la prevalencia de la cantidad de patógeno presente en la muestra positiva, como lo podemos ver en los resultados obtenidos en el estudio donde se demuestra la baja frecuencia de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *P. intermedia* presentes en individuos sanos.

Los avances en la investigación que se basan en la biología molecular como la PCR en tiempo real que permiten realizar investigaciones y ampliar el conocimiento de los fenómenos biológicos, y la posibilidad de obtener datos confiables de los microorganismos estudiados, sin embargo es necesario hacer la prueba y resultados accesibles al público como lo menciona (Vinueza en 2009 y Perea en 2004).

(Nonnenmacher, 2004) menciona que la PCR ha demostrado ser muy útil en el diagnóstico y manejo de las enfermedades infecciosas, al permitir la amplificación de cantidades mínimas de ácido nucleico bacteriano. Un reciente avance en la tecnología de la PCR ha sido el desarrollo de la PCR en tiempo real. Estos ensayos estandarizados permiten la rápida detección y proporcionar mediciones cuantitativas de los ácidos nucleicos bacterianos en las muestras de diagnóstico.

En el estudio realizado por (Atieh en el 2008) menciona que la PCR en tiempo real se considera un complemento esencial en la ayuda diagnóstica en pacientes con periodontitis refractaria o agresiva para detectar y cuantificar patógenos periodontales como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *F. nucleatum*, y *T. denticola*.

A pesar de que la periodontitis crónica se asocian a un patrón microbiológico variable, autores como (Mombelli *et al* en 2002) han tratado de detectar, a través de un trabajo de revisión, la diferencia bacteriana entre periodontitis crónicas y

agresivas a través del estudio de la presencia de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Bacteroides forsythus* y *Campylobacter rectus*.

Como menciona (Mayorga en el 2007) el empleo de técnicas moleculares, en especial la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es la metodología más empleada en el diagnóstico de los microorganismos periodontopatógenos por su alta sensibilidad y especificidad, pero a lo cual no se puede ignorar la importancia del cultivo, el cual, aunque con menor sensibilidad y especificidad, es considerado el “gold estándar” por algunos investigadores y constituye la metodología convencional en el estudio de estas patologías, pues permite la detección simultánea de los microorganismos cultivables presentes en la muestra y la realización de pruebas de sensibilidad antibiótica

8 CONCLUSIÓN

En el análisis de la cuantificación de las 21 muestras extraídas por los tres métodos, se observó que de los tres el mejor es el método B ya que con este se obtuvieron las mejores concentraciones y calidad de ADN.

En los resultados obtenidos en la cuantificación de ADN de las 134 muestras, se obtuvieron resultados significativamente importantes para La cuantificación de *P. gingivalis* (10^1 a 10^{10}), *P. intermedia* (10^1 a 10^7) y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, (10^1 a 10^7); número de copias, siendo concentraciones de ADN óptimas para las muestras.

Además se puede concluir con los resultados que *P. gingivalis* fue la bacteria más prevalente en todos los pacientes estudiados; mientras que *A. actinomycetemcomitans* se identificó en un menor proporción.

9 BIBLIOGRAFÍA

Atieh M. Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: a meta-analysis. *J Periodontol*. 2008;79(9):1620-1629.

Bascones A, Figuero E. Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. *Av Periodon Implantol*.2005; 17 (3): 147-156.

Bolívar A, Rojas A, García P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*. 2014; 3 (1): 25-33.

Boutaga K, Winkelhoff A, Vandembroucke C, Savelkoul P. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol*. 2006; 33: 427–433

Braga R, Carvalho M, Bruña O, Teixeira R, Costa J, Mendes E, et al. Quantification of five putative periodontal pathogens in female patients with and without chronic periodontitis by real-time polymerase chain reaction. *Anaerobe* 2010 6; 16(3):234-239.

Buck G, O'Hara L, Summersgill L. Rapid, Simple Method for Treating Clinical Specimens Containing *Mycobacterium tuberculosis* To Remove DNA for Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol*. 1992, 30(5):1331-1333

Burgos A. Células T y sus receptores $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ en biopsias de pacientes con enfermedad periodontal; 2007[citado 09 sep. 2014] disponible en: http://tesis.luz.edu.ve/tde_arquivos/170/tde-2012-03-01t09:33:14z-2514/publico/burgos_angelica_maria.pdf

Carnovale S. Diagnóstico molecular. En: Negroni M, editor. *Microbiología Estomatológica fundamentos y guía práctica*. 2ª ed. Buenos aires: Medica Panamericana; 2009.p.493-500.

Díaz A, Vivas R, Puerta L, Monterrosa M; Salgado R, et al. Periodontitis, *Porphyromonas gingivalis* y su relación con la expresión de quorum sensing. *Rev Cubana Med Trop*.2010; 47(4)404-416.

Escribano M, Matesanz P, Bascones A. Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis. *Av Periodoncia*. 2005; 17(2): 79-87.

Escudero N, Perea M, Bascones A. Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación clínica. *Av Periodon Implantol*. 2008; 20 (1): 27-37.

Flores R. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Rev. chil Infectol.2011; 28 (6).

García Rodríguez L. 2013. Estandarización por PCR multiplex en tiempo real de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Tesis pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Departamento de Microbiología. Bogotá, Colombia. 37p.

Guilarte C. Patógenos Periodontales: Revisión de literatura. Acta Odontológica Venezolana 2001; 39(3):91-93.

Haffajee, A, Socransky S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontology 2000. (1994); 5: 78-111.

Hernández D. Bacteriemias secundarias al cepillado dental: comparación de cuatro métodos de estudio; 2012[citado 21Ago 2014] Disponible en: http://eprints.ucm.es/18084/1/DENISSE_HERNANDEZ_FORTU%C3%91O.pdf

Hojo K, Tamura A, Mizoguchi C, Kato D, Ohshima T, Maeda N. Predominant bacteria recovered from a periodontitis site in a hamster model raised by silk-ligature with *Porphyromonas gingivalis* infection. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.2008, 72:1348-1351.

Kamma J, Nakou M, Gmür R, Baehni P. Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients. Oral Microbiol Immunol.2004;19:314-321.

Loesche W, Grossman N. Periodontal Disease as a Specific, albeit Chronic, Infection: Diagnosis and Treatment. Clin. Microbiol. Rev. 2001; 14(4)727–752.

López F. El manual de Merck de Diagnóstico y Terapéutica. Barcelona-España. Océano Grupo Editorial; 1994.

López N, Mellado J, Leighton G. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in juvenile periodontitis. J Clin Periodontol 1996.23:101-5.

Mayorga I, Lafaurie G, Contreras A, Castillo D, Barón A, Aya MR. Microflora subgingival en periodontitis crónica y agresiva en Bogotá, Colombia: un acercamiento epidemiológico. Biomédica 2007; 27(1).

Medina M, Medina M, Merino L, Identificación de bacterias periodontopatógenas mediante métodos diagnósticos moleculares. INFECTOLINE. [Internet] 2010 [citado el 30 de julio de 2014]; volumen 12(1): 4-13. Disponible en: http://munduway.com/infectoline/revista/infectoline12_2010/index.html#/1

Mombelli A, Casagni F, Madianos P. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis?. *Journal of clinical periodontology*.2002;29:10-21.

Nonnenmacher A, Dalpke A, Mutters R, Heeg K. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*. 2004; 59: 117–125.

Nonnenmacher C, Dalpke A, Rochon J, Flores-de-Jacoby L, Mutters R, Heeg K. Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detection and Quantification of Bacteria in Periodontal Patients. *J Periodontol*. 2005; 76 (9):1542-1549.

Perea E. La flora de la boca en la era de la biología molecular. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2004; 9:1-10.

Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NJ. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005; 366: 1809–1820.

Piovano S. Microbiología de las enfermedades gingivoperiodontales, de las periimplantitis de los conductos radiculares y de los procesos periradiculares. En: Negroni M, editor. *Microbiología Estomatológica fundamentos y guía práctica*. 2ª ed. Buenos aires: Medica Panamericana; 2009.p. 257-297.

Pulido M, González F, Rivas F. Enfermedad periodontal e indicadores de higiene bucal en estudiantes de secundaria Cartagena, Colombia. *Rev. salud pública*. 2011; 13(5).

Rodrigues A, Lourenção D, Lima L, Pannuti C, Crespo R, Hirata M, et al. Clinical and Microbiologic Evaluation, by Real-Time Polymerase Chain Reaction, of Non-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis Associated With Amoxicillin and Metronidazole. *J Periodontol*. 2012; 83(6):744-752.

Rodriguez A. Elaboración de biopelículas a base de quitosan y pululano adicionadas con extractos de cinco diferentes plantas y su evaluación en cultivos de microorganismos periodontopatógenos; 2011[citado 18 Ago 2014] Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/2566>

Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. Molecular analysis of human oral microbiota. *J Periodontal Res* 2005; 40(3):277-285.

Tortora GJ, Funke BR, Case LC. Aplicaciones prácticas de la inmunología. En: Tortora GJ, Funke BR, Case LC. *Introducción a la microbiología*.9ª edición. Buenos Aires. Médica Panamericana; 2007. p 527-549.

Vinueza C. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. REDVET.2009 [citado 27 Ags 2014]; 10 (2): 1-13. Dponible en : <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020209/020910.pdf>

Wiebe C, Putnins E.The Periodontal Disease Classification System of the American Academy of Periodontology - An Update. J Can Dent Assoc. 2000; 66:594-7.



CONSENTIMIENTO INFORMADO ADULTOS

TÍTULO DEL PROYECTO: Detección por PCR Multiplex en tiempo real de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en pacientes con periodontitis crónica: comparación con el método de cultivo.

INVESTIGADORES: Fredy Gamboa, Adriana García y Adriana Acosta

FECHA:

Es importante que usted lea cuidadosamente este documento. El documento dice lo que usted necesita saber sobre el estudio. Si usted decide participar en este estudio, debe firmar este consentimiento informado. Su firma quiere decir que se le ha explicado y ha entendido en que consiste su participación en el estudio y sus posibles riesgos, incomodidades y/o molestias.

Este estudio es una investigación (descriptiva) que se realizará en la Universidad Javeriana (Facultad de Odontología), con la aprobación del Centro de Investigaciones Odontológicas y el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana.

En términos muy sencillos, este estudio se hace con el fin de detectar por dos técnicas tres microorganismos muy importantes en enfermedad periodontal, que es aquella que le puede llevar a la pérdida de los dientes y del soporte dental. La detección de los tres microorganismos puede llevar a mejorar o reconducir las medidas de control implementadas por el odontólogo.

El estudio en el que está siendo invitado a participar consiste en permitir tomar cuatro muestras en zonas afectadas de su boca con periodontitis, mediante conos de papel durante 1 minuto, en un solo momento y por única vez. El procedimiento de la toma de muestra es sencillo e indoloro y realizado por personal entrenado para tal fin. Las muestras serán procesadas inmediatamente en el Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana.

La toma de la muestra no implica ningún riesgo en su salud (resolución 008430 de 1993).

La muestra tomada será utilizada para hacer el aislamiento por cultivo de la bacterias *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y la detección

y cuantificación de las mismas tres bacterias mediante la técnica de PCR Multiplex en tiempo real. Con el fin de conformar un cepario de bacterias y una genoteca en el Centro de Investigaciones Odontológicas la muestra tomada, el excedente de DNA y los microorganismos serán almacenados de forma adecuada.

Autorizo SI___, NO___ el uso de las muestras y bacterias aisladas para otras investigaciones:

Firma _____.

Usted puede decidir no participar en la investigación si no lo desea o retirarse en cualquier momento y esta decisión no perjudicará la relación con el (odontólogo o médico tratante), quien continuará con el tratamiento pertinente. No habrá ningún costo adicional para usted por participar en el estudio. Muy posiblemente usted obtenga un beneficio adicional en el tratamiento y seguimiento clínico al saber el tipo de bacteria aislada.

Los datos de este estudio serán publicados. La información publicada no incluirá su nombre o cualquier otra forma de identificación. De requerirse no serán utilizados sin su expresa autorización. Su historia clínica podrá ser consultada por el investigador para el estudio.

Usted puede hablar con los investigadores en cualquier momento y hacer cualquier pregunta que tenga en relación con el estudio.

Los investigadores:

Fredy Gamboa: Telefono 3208320, e-mail: gamboa@javeriana.edu.co

Adriana García: Telefono 3208320, e-mail: adrigaro@hotmail.com

Adriana Acosta: Telefono 3208320, e-mail: Adriana.acosta@javeriana.edu.co

Secretaría técnica del Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana (Dra. Maddy Ruiz, tel: 3004004387, maddy.ruiz@javeriana.edu.co).

Yo: _____ identificado con C.C, pasaporte o cédula de
extranjería: _____ Número: _____ declaro que:

Me han dado una copia de este consentimiento informado.

Me ha sido dada la oportunidad de hacer todas las preguntas y éstas han sido respondidas. He entendido perfectamente cuáles son los procedimientos que me van a ser practicados durante la investigación y estoy de acuerdo con someterme a ellos. Estoy de acuerdo con participar en el estudio. Autorizo que los resultados obtenidos del presente estudio sean publicados.

Estoy de acuerdo con participar en el presente proyecto de investigación.

Nombre del participante: _____ C.C. No. : _____
Teléfono: _____ Firma: _____
Fecha: _____

Datos de los investigadores:

Nombre: _____ C.C. No. : _____
Teléfono: _____ Firma: _____
Fecha: _____

Nombre: _____ C.C. No. : _____
Teléfono: _____ Firma: _____
Fecha: _____

Datos de los testigos

Nombre: _____ C.C. No. : _____
Teléfono: _____ Firma: _____
Fecha: _____

Nombre: _____ C.C. No. : _____
Teléfono: _____ Firma: _____
Fecha: _____

Anexo 2

Nº.	EDAD	SEXO	DIENTE 1	DIENTE 2	SUPERFICIE DEL DIENTE 2	PROFUNDIDAD MAXIMA	DIAGNOSTICO
1	31	M	25	26	PALATINA MESIAL	5mm	PERIODONTITIS
2	35	F	17	17	VESTIBULAR MEDIAL	7mm	PERIODONTITIS
3	29	M	27	28	PALATINA	5mm	PERIODONTITIS
4	45	F	32	42	VESTIBULAR	6mm	PERIODONTITIS
5	75	M	43	43	VESTIBULAR	5mm	PERIODONTITIS
6	63	F	32	36	VESTIBULAR	6mm	PERIODONTITIS
7	51	F	42				GINGIVITIS
8	22	F	13				GINGIVITIS
9	27	M	17	18	PALATINA	4mm	PERIODONTITIS
10	19	M	41				GINGIVITIS
11	21	F	31	41	LINGUAL		GINGIVITIS
12	20	F	27	17	VESTIBULAR		GINGIVITIS
13	22	M	27				GINGIVITIS
14	53	M	31				PERIODONTITIS
15	30	F	32	33	VESTIBULAR		GINGIVITIS
16	25	M	32	33	LINGUAL		GINGIVITIS
17	64	F	34	36	LINGUAL		GINGIVITIS
18	25	M	12				PERIODONTITIS
19	65	M	21	22	VESTIBULAR		PERIODONTITIS
20	52	M	24	25	PALATINA	4mm	PERIODONTITIS
21	60	M	31	41	VESTIBULAR	6mm	PERIODONTITIS
22	33	M	26	26	VESTIBULAR	8mm	PERIODONTITIS
23	64	M	27				PERIODONTITIS
24	48	M	31				PERIODONTITIS
25	49	F	11	18	PALATINO	7mm	PERIODONTITIS
26	52	M	12	13	VESTIBULAR		GINGIVITIS

27	58	F	26	27	PALATINO	10mm	PERIODONTITIS
28	26	F	41	42	VESTIBULAR		GINGIVITIS
29	43	M	28	28	VESTIBULAR	5mm	PERIODONTITIS
30	63	F	26	27	VESTIBULAR	6mm	PERIODONTITIS
31	28	F	22	21	VESTIBULAR	5mm	PERIODONTITIS
32	50	F	11	21	PALATINA	4mm	PERIODONTITIS
33	56	F	31	41	VESTIBULAR		GINGIVITIS
34	46	F	24				PERIODONTITIS
35	25	M	13	14	VESTIBULAR		GINGIVITIS
36	70	F	41	31	LINGUAL	4mm	PERIODONTITIS
37	27	M	26				GINGIVITIS
38	28	F	45				GINGIVITIS
39	40	F	26				GINGIVITIS
40	25	M	41	44	VESTIBULAR		GINGIVITIS
41	68	F	37				PERIODONTITIS
42	45	F	47				PERIODONTITIS
43	54	M	27				PERIODONTITIS
44	54	F	21				GINGIVITIS
45	51	M	18				PERIODONTITIS
46	48	F	17				PERIODONTITIS
47	27	F	11				GINGIVITIS
48	32	F	17	18	VESTIBULAR	6mm	PERIODONTITIS
49	54	F	28				PERIODONTITIS
50	27	M	45	45	GINGIVITIS- LINGUAL		PERIODONTITIS
51	18	F	16				GINGIVITIS
52	18	M	15				GINGIVITIS
53	22	M	13	14	MEDIAL		GINGIVITIS
54	19	M	14	15	MESIAL		GINGIVITIS
55	25	F	26	27	VESTIBULAR	5mm	PERIODONTITIS
56	28	F	26				PERIODONTITIS
57	29	F	37				PERIODONTITIS

58	27	F	36				GINGIVITIS
59	17	M	27				PERIODONTITIS
60	28	F	46				GINGIVITIS
61	25	F	23				GINGIVITIS
62	27	F	44	45	VESTIBULAR		GINGIVITIS
63	26	M	43	33	VESTIBULAR		GINGIVITIS
64	21	M	13	23	VESTIBULAR		GINGIVITIS
65	25	F	47				GINGIVITIS
66	48	M	47	47	VESTIBULAR	8mm	PERIODONTITIS
67	56	F	47	48	VESTIBULAR	6mm	PERIODONTITIS
68	20	F	11	21	VESTIBULAR		GINGIVITIS
69	26	F	14	15	PALATINO		GINGIVITIS
70	46	M	31	33	LINGUAL	7mm	PERIODONTITIS
71	27	M	33	32	LINGUAL		GINGIVITIS
72	29	M	44	45	LINGUAL	5mm	PERIODONTITIS
73	25	F	16				GINGIVITIS
74	68	M	16	15	VESTIBULAR	7mm	PERIODONTITIS
75	27	M	44	45	LINGUAL		GINGIVITIS
76	27	M	33	32	VESTIBULAR		GINGIVITIS
77	27	F	17	27	LINGUAL		GINGIVITIS
78	68	F	24	23	PALATINA	4mm	PERIODONTITIS
79	45	F	36				PERIODONTITIS
80	52	F	21				PERIODONTITIS
81	63	M	41	31			PERIODONTITIS
82	54	F	47				PERIODONTITIS
83	28	M	12	11	VESTIBULAR	4mm	PERIODONTITIS
84	17	M	25	26	VESTIBULAR	6mm	PERIODONTITIS
85	58	F	26	26	VESTIBULAR	5mm	PERIODONTITIS
86	24	M	37	47	LINGUAL	4mm	PERIODONTITIS
87	60	F	22	23	PALATINO	5mm	PERIODONTITIS
88	69	F	41	33	VESTIBULAR	8mm	PERIODONTITIS
89	27	F	21	11	VESTIBULAR		SANO

90	28	F	21	11	VESTIBULAR		SANO
91	26	F	11	21	VESTIBULAR		SANO
92	26	F	31	41	VESTIBULAR		SANO
93	28	F	22	23	VESTIBULAR		SANO
94	24	F	14	15	VESTIBULAR		SANO
95	26	F	42	44	VESTIBULAR		SANO
96	26	F	15	25	VESTIBULAR		SANO
97	46	M	44	46	LINGUAL	7mm	PERIODONTITIS
98	53	F	41	43	VESTIBULAR		PERIODONTITIS
99	46	F	24	16	PALATINO	6mm	PERIODONTITIS
100	44	F	44	35	VESTIBULAR	4mm	PERIODONTITIS
101	46	F	26	26	VESTIBULAR	7mm	PERIODONTITIS
102	50	F	17				PERIODONTITIS
103	18	F	16	26	VESTIBULAR	4mm	PERIODONTITIS
104	20	F	14	25	VESTIBULAR	4mm	PERIODONTITIS
105	59	F	21	21	VESTIBULAR	10mm	PERIODONTITIS
106	45	M	17	27	VESTIBULAR	10MM	PERIODONTITIS
107	37	F	21	21	VESTIBULAR	5mm	PERIODONTITIS
108	36	F	25	27	PALATINO	5mm	PERIODONTITIS
109	22	M	23	23	VESTIBULAR	6MM	PERIODONTITIS
110	31	M	46	26	PALATINO	5mm	PERIODONTITIS
111	54	F	37	37	VESTIBULAR	7MM	PERIODONTITIS
112	63	F	31	31	VESTIBULAR	5MM	PERIODONTITIS
113	60	M	27	13	PALATINO	5MM	PERIODONTITIS
114	58	F	27	27	VESTIBULAR	6MM	PERIODONTITIS
115	59	F	26	26	PALATIO	9MM	PERIODONTITIS
116	30	M	16	17	PALATINO	9MM	PERIODONTITIS
117	29	M	27	27	VESTIBULAR	4MM	PERIODONTITIS
118	61	F	43	43	LINGUAL	12MM	PERIODONTITIS
119	55	F	17	17	PALATINO	5MM	PERIODONTITIS
120	24	M	46	46	LINGUAL	6mm	PERIODONTITIS
121	63	M	47	47	LINGUAL	5MM	PERIODONTITIS
122	53	M	33	47	LINGUAL	6MM	PERIODONTITIS

123	44	F	11	12	PALATINO	7MM	PERIODONTITIS
124	55	M	33	31	VESTIBULAR	4MM	PERIODONTITIS
125	50	F	27	15	PALATINO	4MM	PERIODONTITIS
126	55	F	28	48	LINGUAL	6MM	PERIODONTITIS
127	44	F	16	17	VESTIBULAR	7MM	PERIODONTITIS
128	26	M	18	17	PALATINO	6MM	PERIODONTITIS
129	28	F	24	17	PALATINO	6MM	PERIODONTITIS
130	45	M	45	32	LINGUAL	7MM	PERIODONTITIS
131	56	M	12	26	PALATINO	8MM	PERIODONTITIS
132	27	F	22	21	PALATINO	6MM	PERIODONTITIS
133	62	F	35	35	VESTUBULAR	6MM	PERIODONTITIS
134	28	F	26	16	VESTIBULAR	6MM	PERIODONTITIS
135	18	F	16	24	VESTIBULAR	7MM	PERIODONTITIS
136	37	M	37	37	VESTIBULAR	7MM	PERIODONTITIS
137	52	M	43	43	LINGUAL	5MM	PERIODONTITIS
138	54	M	26	26	VESTIBULAR	6MM	PERIODONTITIS
139	38	F	16	17	PALATINO	6MM	PERIODONTITIS
140	64	M	11	13	PALATINO	5mm	PERIODONTITIS

Anexo 3

CALDO DE TIOGLICOLATO

Composición

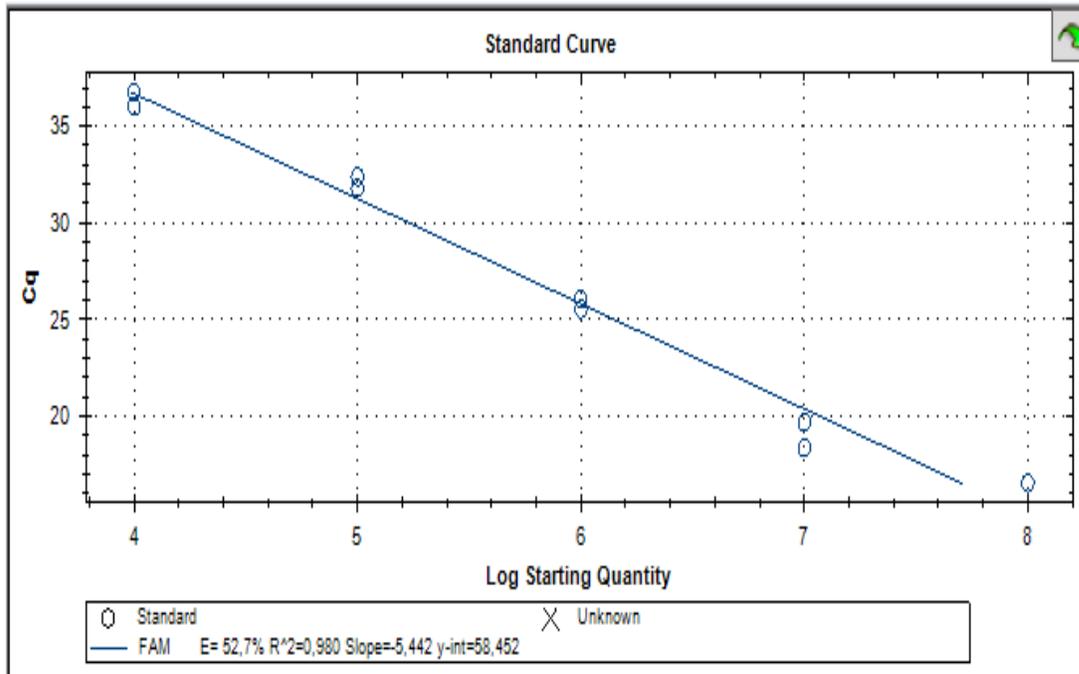
Digerido pancreático de caseína	20,0 gr
Cloruro de sodio	5,0 gr
Dextrosa	10,0 gr
Agar	20,0 gr
Tioglicolato de sodio	2,0 gr
Sulfoxilato formaldehido de sodio	1,0 gr
Azul de metileno	2,0 mg
Agua destilada	1000 mL

Preparación

Suspender 58 g de medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar vigorosamente calentar agitando frecuentemente y dejar hervir durante 1 minuto para disolver completamente los ingredientes. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Distribuir y enfriar a temperatura ambiente antes de su utilización.

Anexo 4

Curva de estandarización DNA universal (16s)



Anexo 5

CUANTIFICACION DE ADN					
MUESTRA	[] de ADN	260/280	MUESTRA	[] de ADN	260/280
1	17,2	1.9	45	32,8	1.80
2	62,8	2.00	46	96,4	2.00
3	60,7	1.86	47	159,7	1.96
4	248,4	1.94	48	25,9	1.78
5	169,3	1.83	49	52	1.84
6	173,4	1.9	50	96,1	1.71
7	135,7	1.6	51	165,2	1.92
8	194,6	1.86	52	138,7	1.70
9	212,6	2.02	53	38,1	2.00
10	178,1	1.83	54	130,1	2.64
11	265,2	2.00	55	113,8	1.68
12	157,1	1.94	56	192,1	1.78
13	179	1.70	57	162	1.98
14	273,1	2.16	58	177,1	1.86
15	137,7	1.83	59	217,9	2.60
16	162,3	1.56	60	155,3	1.92
17	112,2	1.64	61	197,8	2.29
18	202,9	2.02	62	315,3	1.68
19	175,2	1.90	63	228,2	1.90
20	148,7	1.76	64	179,4	1.83
21	257	2.10	65	193,2	1.62
22	172,3	1.84	66	114	2.1
23	316,2	1.68	67	159,3	1.64
24	124,8	2.10	68	167,8	1.50
25	199,6	1.86	69	174,7	1.98
26	236,1	1.94	70	367,1	1.62
27	99,3	2.66	71	22,1	1.78
28	202,8	1.80	72	71,3	1.80
29	192,1	2.07	73	79,5	2.02
30	139,8	1.64	74	120,3	2.26
31	247,6	1.96	75	156,5	1.68
32	160,6	1.70	76	296,2	1.94
33	165,6	2.06	82	247,1	1.86
34	149,2	1.90	83	141,7	2.00
35	216,5	1.86	84	128	1.94
36	216,4	2.40	85	348,6	1.70
37	183,9	1.83	86	164,6	1.83
38	203,1	1.96	87	126,8	2.04
39	330,7	1.76	88	436	1.84
40	224,9	1.80	89	179,7	1.90
41	255,4	2.28	90	327,7	1.62
42	134,7	1.84	91	198,9	1.82
43	50,6	1.77	92	257,4	2.14
44	55,3	1.96	93	335,8	1.84

MUESTRA	[] de ADN	260/280	MUESTRA	[] de ADN	260/280
94	332,4	1.78	139	102,9	1.86
95	422,6	1.80	140	70,9	1.80
96	179,3	2.06			
97	163,3	1.84			
98	48,9	2.6			
99	270,7	1.76			
100	275,4	1.98			
101	156,5	2.04			
102	175,5	1.84			
103	221,9	1.86			
104	320,1	1.92			
105	280,2	2.19			
106	111,9	2.62			
107	192,5	1.94			
108	57,2	2.00			
109	60	2.04			
110	37,2	1.86			
111	106,9	2.60			
112	75,9	1.86			
113	90,1	1.92			
114	71,2	1.84			
115	56,3	1.82			
116	188,6	1.68			
117	34,2	2.06			
118	81,2	1.86			
119	51,5	2.40			
120	44,5	1.94			
121	55,6	1.72			
122	123,3	2.30			
123	144,6	1.92			
124	149	1.82			
125	72,8	1.96			
126	68,8	1.82			
127	76,1	1.62			
128	66,4	1.90			
129	59,6	1.80			
131	67,8	1.84			
132	87,3	1.71			
133	100,1	2.02			
134	67,3	1.98			
135	102,5	1.86			
136	99,6	2.40			
137	64,6	2.02			
138	61,6	1.98			

132	PERIODONTITIS		
133	PERIODONTITIS		
134	PERIODONTITIS		
135	PERIODONTITIS		
136	PERIODONTITIS		
137	PERIODONTITIS	37,22	2x10 ¹
138	PERIODONTITIS		
139	PERIODONTITIS	42,36	0,00
140	PERIODONTITIS	37,01	3x10 ¹
		0,00	

30,57	3x10 ³
25,54	2x10 ⁶
30,76	3x10 ³
26,03	1x10 ⁶
43,02	0,00
25,18	4x10 ⁶
32,43	3x10 ²
30,22	6x10 ³
0,00	

30,65	1x10 ⁴
30,63	1x10 ⁴
24,37	4x10 ⁷
28,50	1x10 ⁵
24,18	5x10 ⁷
34,14	1x10 ²
31,22	6x10 ³
33,14	5x10 ²
39,25	

19,70	2.12x10 ²⁶
25,16	1x10 ¹⁷
17,05	7.23x10 ³⁰
13,72	3.54x10 ³⁶
15,63	1.93x10 ³³
22,62	2.23x10 ²¹
13,26	2.16x10 ³⁷
14,06	9.36x10 ³⁵
13,88	1.92x10 ³⁶
31.19	

Resumen

Introducción: La enfermedad periodontal es un proceso infeccioso relacionado con la acumulación de placa bacteriana ocasionada por un gran número de bacterias que en su mayoría son anaerobias, las cuales pueden actuar individual o de manera combinada. La enfermedad periodontal hace referencia a los procesos patológicos en los que se ven afectadas las estructuras del periodonto, la cual podemos dividir en dos categorías gingivitis y periodontitis. La etiología de la enfermedad periodontal involucra microorganismos Gram negativos, anaerobios que están aumentados significativamente en la placa bacteriana de pacientes con enfermedad periodontal. El acumulo de altas concentraciones de placa dental en el periodonto pueden ocasionar afección de las estructuras de periodonto, además de los factores genéticos, ambientales y el consumo de tabaco; entre otros. En Colombia, la enfermedad periodontal evaluada mediante la pérdida de inserción clínica afecta al 50% de la población; en su forma generalizada los individuos menores de 35 años muestran pérdida de inserción, la que aumenta después de los 60 años. Los avances de la ciencia hoy en día permiten la identificación de esta patología y de los agentes causales y así tratar al paciente de una manera más específica. El diagnóstico molecular ha demostrado ser seguro, rápido, reproducible y discriminatorio en patologías de origen infeccioso como la enfermedad periodontal. **Metodología:** Este es un estudio de tipo descriptivo, que se llevó a cabo en el centro de Investigaciones Odontológicas (CIO) de la Pontificia Universidad Javeriana. Se recolectaron 134 muestras de pacientes que asistieron a consulta en la facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana, las cuales 90 correspondían a periodontitis, 36 a gingivitis y 8 a sanos. Se realizó un estudio piloto con 21 muestras para determinar el mejor método de extracción de ADN, los 3 métodos fueron: método A: calentamiento a 95°C, método B: DNAzol y método C: hervido + proteína K+ lisozima, se tomaron alícuotas de 150 µl de cada una de las 21 muestras que fueron tomadas aleatoriamente, se evaluó la cuantificación y pureza de ADN. **Resultados:** En el análisis de la cuantificación de las 21 muestras extraídas por los tres métodos, se observó que de los tres el mejor es el método B ya que con este se obtuvieron las mejores concentraciones y calidad de ADN. Con este método, se realizó la extracción de las 134 muestras y se llevó a cabo la cuantificación. En los sanos se encontró *P. gingivalis* en un 87,5% (7/8) de los pacientes y ninguno amplificó para *P. intermedia* y *A. actinomycetemcomitans*. En los diagnosticados con periodontitis se encontró *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* en un 86,7% (78/90), 57,7% (52/90) y 20% (18/90), respectivamente. En pacientes con gingivitis, se encontró *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* en un 69,4% (25/36), 11,1% (4/36) y 19,4% (7/36), respectivamente. En los resultados obtenidos en la cuantificación de ADN de las 134 muestras, se obtuvieron resultados significativamente importantes para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *P. intermedia* que osciló entre (10^1 a 10^7); (10^1 a 10^{10}) y (10^1 a 10^7) número de copias, respectivamente, siendo concentraciones de ADN óptimas para las muestras. **Conclusión:** *P. gingivalis* fue la bacteria más prevalente en todos los pacientes estudiados; mientras que *A. actinomycetemcomitans* se identificó en un menor proporción. Con los resultados obtenidos se puede concluir que *P. gingivalis* y *P. intermedia* hacen parte del perfil microbiano de pacientes con periodontitis.

Summary

Introduction: Periodontal disease is an infection related to the accumulation of plaque caused by a large number of bacteria that are mostly anaerobic, which may act individually or in combination. Periodontal disease refers to pathological processes that are affected periodontal structures, which can be divided into two categories gingivitis and periodontitis. The etiology of periodontal disease involves Gram negative anaerobes that are significantly increased in the plaque from patients with periodontal disease. The accumulation of high concentrations of plaque in periodontal disease can cause periodontal structures, in addition to genetic, environmental and snuff consumption factors; among others. In Colombia, periodontal disease assessed by clinical attachment loss affects 50% of the population; in his widely individuals under

35 years show insertion loss, which increases after 60 years. Advances in science today enable the identification of this condition and the causative agents and thus treat the patient in a more specific way. Molecular diagnostics has proven to be safe, fast, reproducible and discriminatory in diseases of infectious origin as periodontal disease. Methodology: This is a descriptive study, which was conducted in the center of Dental Research (CIO) of the Pontificia Universidad Javeriana. 134 samples from patients who received attention at the Faculty of Dentistry at the Pontificia Universidad Javeriana were collected, which corresponded to 90 periodontitis, gingivitis 36 and 8 healthy. A pilot study of 21 samples to determine the best method of DNA extraction was performed 3 methods were: Method A: heating at 95 ° C, Method B: DNAzol and C method: Boiled + protein K + lysozyme, aliquots were taken 150 ul of each of the 21 samples that were taken at random, the DNA quantification and purity was assessed. Results: In the analysis of quantification of 21 samples extracted by the three methods, it was observed that the best of the three B is because with this method the best concentrations and quality were obtained DNA. With this method, the extraction was performed and 134 samples was conducted to quantify. In healthy P. gingivalis was found in 87.5% (7/8) of patients and none amplified for P. intermedia and A. actinomycetemcomitans. In those diagnosed with periodontitis P. gingivalis, P. intermedia, A. actinomycetemcomitans was found in 86.7% (78/90), 57.7% (52/90) and 20% (18/90) respectively. In patients with gingivitis, found P. gingivalis, P. intermedia, A. actinomycetemcomitans in 69.4% (25/36), 11.1% (4/36) and 19.4% (7/36) respectively. In the results of DNA quantification of the 134 samples, important results significantly actinomycetemcomitans A., P. gingivalis and P. intermedia which ranged from (101 to 107) were obtained; (101-1010) and (101-107) copy numbers, respectively, and optimal concentrations of DNA samples. Conclusion: P. gingivalis was the most prevalent in all patients studied bacteria; whereas A. actinomycetemcomitans was identified in a minor proportion. With the results we can conclude that P. gingivalis and P. intermedia are part of the microbial profile of patients with periodontitis.