

HUELLAS GENÉTICAS DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA EN LA SALUD BUCAL

Mendoza Lozano Gabina Zeltzin (1), Alegría Torres Jorge Alejandro (2), Lizeth García Torres (3),
Nuria Patiño Marín (4)

1 [Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | [gz.mendozalozano@ugto.mx]

2 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] |
[ja.alegriatorres@ugto.mx]

3 [Laboratorio de Investigación Molecular en Nutrición, LIMON, Universidad del Centro de México] |
[investigacion2@ucem.edu.mx]

4 [Doctorado en Ciencias Odontológicas, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí]
[nuriapaty@uaslp.mx]

Resumen

Se busca utilizar PCR en tiempo real como metodología para identificar la huella genética de cinco bacterias relacionadas al desarrollo de la enfermedad periodontal. Se utilizó ADN purificado de 5 bacterias ATCC *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 43718, ATCC *Porphyromonas gingivalis* 33277, ATCC *Prevotella intermedia* 25611, ATCC *Tannerella forsythia* 43037, ATCC *Treponema denticola* 35405 para amplificar un fragmento de 16S rRNA (para *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* y *T. forsythia*) y *waaA* (para *P. gingivalis* y *T. denticola*), por qPCR utilizando química de Evagreen, logrando identificar molecularmente a las 5 bacterias. Finalmente se corrió en gel de agarosa para corroborar los fragmentos amplificados con los tamaños moleculares esperados.

Abstract

The aim is to use real time PCR as a methodology to identify the genetic fingerprint of five bacteria related to the development of periodontal disease. Purified DNA from 5 bacteria ATCC *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 43718, ATCC *Porphyromonas gingivalis* 33277, ATCC *Prevotella intermedia* 25611, ATCC *Tannerella forsythia* 43037, ATCC *Treponema denticola* 35405 was used to amplify a fragment of 16S rRNA (for *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* and *T. forsythia*) and *waaA* (for *P. gingivalis* and *T. denticola*), by qPCR using chemistry of Evagreen, being able to identify molecularly the 5 bacteria. Finally it was run on agarose gel to corroborate the amplified fragments with the expected molecular sizes.

Palabras clave:

Diagnóstico, Molecular, PCR en tiempo real, Enfermedad Periodontal.

INTRODUCCIÓN

Conceptos

Diagnóstico molecular

El diagnóstico molecular es una prueba genética que permite confirmar una enfermedad genética sugerida clínicamente [1]. Las metodologías que se utilizan para el diagnóstico molecular son muy variadas, para el estudio de alteraciones del número y estructura de los cromosomas, lo más adecuado es solicitar un estudio citogenético (cariotipo), en cambio, para el estudio de alteraciones más pequeñas, es posible realizar hibridación *in situ* fluorescente (FISH) [2].

En la PCR convencional, el producto amplificado, se detecta mediante un análisis de punto final, corriendo el ADN en un gel de agarosa después de que la reacción haya terminado. Por el contrario, la PCR en tiempo real permite que la acumulación de producto amplificado sea detectada y medida a medida que la reacción avanza. La detección en tiempo real de productos de PCR se hace posible mediante la inclusión en la reacción de una molécula fluorescente que informa un aumento en la cantidad de ADN con un aumento proporcional de la señal fluorescente.

Inicialmente, la fluorescencia permanece a niveles muy bajos, aunque el producto se acumula exponencialmente los incrementos en la fluorescencia no son detectables. Eventualmente, se acumula suficiente producto amplificado para emitir una señal fluorescente detectable. El número de ciclo en que esto ocurre es llamado ciclo umbral o Cq.

Periodontitis y bacterias relacionadas

La periodontitis es una enfermedad infecciosa multifactorial que produce una destrucción irreversible de los tejidos periodontales. Esta condición está precedida por un estado reversible de inflamación de los tejidos periodontales, llamada gingivitis [3]. Desde un punto de vista microbiológico, este curso se caracteriza por alteraciones cuantitativas y cualitativas en la microflora del medio subgingival.

A pesar de la dificultad de catalogar a todos los miembros de la microflora oral y de la complejidad de las interacciones con su huésped humano, ciertas especies han sido identificadas como periopatógenas. Hay fuerte evidencia de que *actinomycescomitans*, *Aggregatibacter*(Aa-ha), *Porphyromonas gingivalis*, *forsythia* *Tannerella* y *Treponema denticola* son patógenos periodontales [4]. Mientras que el Aa-ha sido implicado como responsable de la periodontitis agresiva, *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola* son más asociadas a periodontitis crónica [5], aunque las cuatro especies se han implicado en diversas formas de periodontitis.

Justificación del proyecto

Teniendo en cuenta estos hallazgos, la detección de estas especies en placa dental podría ser una herramienta útil en la evaluación de riesgo periodontal para así determinar la terapia periodontal óptima y evaluar el resultado del tratamiento. En este estudio hemos evaluado varios ensayos de qPCR utilizando ADN de bacterias obtenido por catálogo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ADN (20 μ l con concentración de 500 ng/ μ l) se disolvió a 50 ng/ μ l. En placa de 96 pozos para PCR se colocó, por duplicado, 2 μ l de ADN y 8 μ l de mezcla de reacción. La mezcla de reacción estaba formada por 5 μ l de enzima EvaGreen, 0.3 μ l de oligonucleótidos F y 0.3 μ l de oligonucleótidos R (Tabla 1), completando a 10 μ l de agua grado biología molecular. Para cada bacteria se utilizó un control negativo, consistiendo en la mezcla de reacción con agua grado biología molecular (sin ADN bacteriano).

Las condiciones para qPCR fueron 10 minutos a 95°C, 40 ciclos: 30 segundos 95°C, 1 minuto 60°C. El análisis de los datos se realizó en el software del sistema de detección CFX96 de Biorad®.

Posteriormente, las mezclas resultantes de qPCR se llevaron a un gel de agarosa para realizar electroforesis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la qPCR se pueden apreciar Imagen 1, donde se observan los duplicados con sus respectivos controles.

En la tabla 1, donde se observa la Cq promedio obtenida de los duplicados para cada bacteria, así como la secuencia de nucleótido de cada uno de los oligonucleótidos (F y R) utilizados. El Cq será el control para la determinación cualitativa de patógenos a partir de la purificación de ADN bacteriano obtenido de placa dental de los pacientes con riesgo a tener periodontitis.

En la imagen 2 se corrió el gel y en todos se observa el fragmento amplificado con un tamaño aproximado de 150 pares de bases. En el caso de *T. forsythia*, la fuente bibliográfica consultada [6] propone dos estructuras secundarias, observándose como doblete, lo que coincide con la imagen del gel en el carril 3.

CONCLUSIONES

Se amplificaron exitosamente los controles ADN de bacterias asociados a periodontitis, para así poder diagnosticar el riesgo de esta enfermedad a partir de la purificación de ADN de bacterias de la placa dental de pacientes con esta enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guanajuato por crear este proyecto que nos inspira a investigar.

Al Dr. Alegría por permitirme y darme el apoyo para formar parte de este proyecto.

A la UCEM donde realice gran parte de la experimentación.

A Lizeth por enseñarme el amor por la investigación.

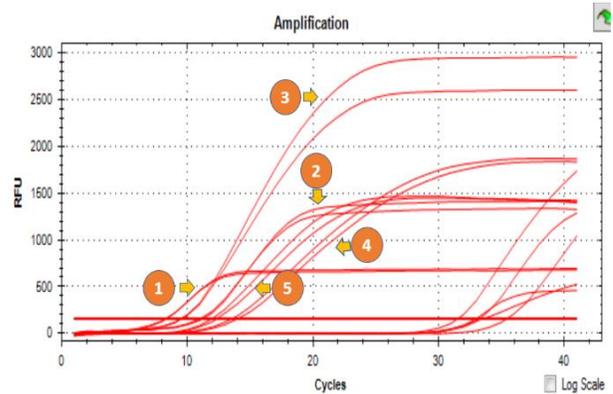


IMAGEN 1. (1) *A. actinomycetemcomitans*, (2) *P. gingivalis*, (3) *P. intermedia*, (4) *T. forsythia*, (5) *T. denticola*

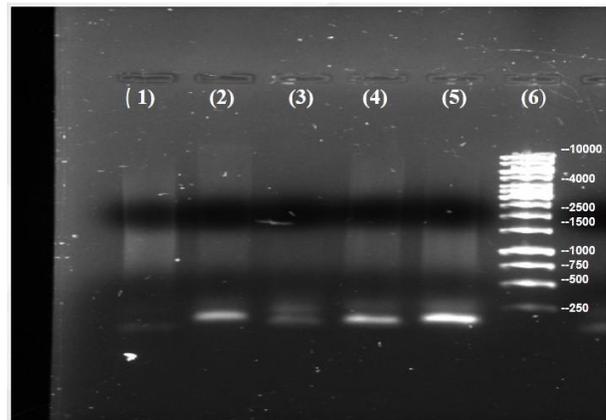


IMAGEN 2: Gel de agarosa bajo luz ultravioleta (1) *A. Actinomycetemcomitans*, (2) *P. Gingivalis*, (3) *P. Intermedia*, (4) *T. forsythia*, (5) *T. denticola* y (6) Marcadores.

Bacteria (Género especie)			
	Oligonucleotido	Cq	Referencias
Aggregatibacter actinomycetemcomitans	F: CTTACCTACTCTTGACATCCGAA RV: ATGCAGCACCTGTCTCAAAGC	8.35 ± 0.02	Maeda et al. [7]
Porphyromonas gingivalis	F: TGGTTTCATGCAGCTTCTTT R: TCGGCACCTTCGTAATTCTT	12.21 ± 0.25	Maeda et al. [7]
Prevotella intermedia	F: TCCACCGATGAATCTTTGGTC R: ATCCAACCTTCCCTCCACTC	11.18 ± 0.13	Maeda et al. [7]
Tannerella forsythia	F: GGGTGAGTAACGCGTATGTAACCT R: ACCCATCCGCAACCAATAAA	13.84 ± 0.30	Shelburne et al. [8]
Treponema denticola	F: CCTTGAACAAAAACCGAAA R: GGGAAAAGCAGGAAGCATAA	9.56 ± 0.05	Hyvarinen et al. [9]

REFERENCIAS

- [1] McPherson E.(2006) Genetic Diagnosis and testing in Clinical Practice. Clin Med Res, 4(1).pp 123-9.
- [2] Lagos M. & Poggi H. (2006). Tests genéticos: Definición, métodos, validación y utilidad clínica. Revista médica de Chile, 138(1), pp 128-132.
- [3] Loe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E(1986): Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. J Clin Periodontol 1986, 13(1) pp 431–445.
- [4] Slots J, Rams TE(1992). Microbiology of periodontal disease. In Contemporary oral microbiology and immunology. St. Louis: Mosby Year Book. pp 429–431.
- [5] Socransky SS, Haffajee AD(1992): The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. J Periodontol. 63 pp 322–331.
- [6] Kuboniwa M, Amono A, Kimura KR, Sekine S, Kato S, Yamamoto Y, Okahashi N, Lida T, Shizukuishi S. (2004): Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. Oral Microbiol Immunol, 19:168–176.
- [7] Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, Kokeguchi S, Petelin M, Arai H, Tanimoto I, Nishimura F, Takashiba S. (2003): Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, tetQ gene and total bacteria. FEMS Immunol Med Microbiol 39:81–86.
- [8] Shelburne CE, Prabhu A, Gleason RM, Mullally BH, Coulter WA (2000): Quantitation of Bacteroides forsythus in subgingival plaque - Comparison of immunoassay and quantitative polymerase chain reaction. J Microbiol Methods, 39:97–107.
- [9] Hyvarinen K, Laitinen S, Paju S, Hakala A, Suominen-Taipale L, Skurnik M, Kononen E, Pussinen PJ (2009): Detection and quantification of five major periodontal pathogens by single copy gene-based real-time PCR. Innate Immun, 15:195–204.
- [10] Decat E, Cosyn J, Bruyn H, Miremedi R, Saerens B, Mechelen E, Vermeulen E (2012): Optimization of quantitative polymerase chain reactions for detection and quantification of eight periodontal bacterial pathogens, Biomedcentral, 5:66.