

Genotipificación de *Porphyromonas gingivalis* en Pacientes con Periodontitis

Genotyping of *Porphyromonas gingivalis* in Patients with Periodontitis

Abusleme L¹, Pozo P², Silva N³

RESUMEN

Porphyromonas gingivalis es un bacilo Gram-negativo y anaerobio, considerado como el mayor agente causal en la iniciación y progresión de las periodontitis. Este microorganismo presenta diversos factores de virulencia, como su capacidad de adherencia a los tejidos periodontales y a otras bacterias orales, el Lipopolisacárido (LPS) que induce la respuesta inmune del hospedero y la acción de múltiples proteasas. Las bases moleculares de estos mecanismos de virulencia y su relación con la diversidad genética no han sido suficientemente comprendidas aún.

El propósito de este estudio fue genotipificar aislados de *P. gingivalis* seleccionados desde pacientes con Periodontitis Crónica y Agresiva utilizando una metodología basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la "Secuencia de Inserción" IS1126. Se tomaron muestras de placa subgingival en 4 sitios periodontalmente afectados (el sitio de mayor profundidad de saco periodontal por cuadrante). Para ello se utilizaron conos de papel estériles, éstos se transportaron y almacenaron en RTF frío hasta su procesamiento en el laboratorio.

Se obtuvo, mediante cultivo, bacterias pigmentadas de negro para su posterior identificación fenotípica, molecular y genotipificación, de los aislados confirmados mediante PCR como *P. gingivalis*. Se genotipificaron 35 aislados, provenientes de 6 pacientes, caracterizándose 7 perfiles genéticos diferentes. Cuatro pacientes presentaron un solo genotipo en sus aislados, mientras que 2 pacientes mostraron dos perfiles genéticos distintos. Los aislados de *P. gingivalis* estudiados presentaron variabilidad genética a nivel de la secuencia IS1126 y tal vez por el número de aislados analizados, no se identificó un perfil genético bacteriano característico de periodontitis crónica o agresiva.

Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabíl. Oral Vol. 2(2); 54-58, 2009.

Palabras clave: *Porphyromonas gingivalis*, genotipificación, secuencias de inserción.

ABSTRACT

Porphyromonas gingivalis an anaerobic Gram-negative bacilli, is the major causative agent in the initiation and progression of severe forms of periodontal disease. This organism is armed with a number of putative virulence factors, like the ability to adhere to periodontal tissues and other oral bacteria and Lipopolysaccharide (LPS) that induces the host immune response and multiple proteases. These molecular bases of virulence and their relationship to genetic diversity have not been sufficiently understood yet.

The aim of the present study was to genotype isolates of *P. gingivalis* selected from patients with chronic and aggressive periodontitis, using a PCR-based methodology for the insertion sequence (IS1126). Subgingival plaque samples were collected from four affected sites (the site of greatest depth of periodontal pocket per quadrant). The samples were obtained by inserting sterile paper points and were pooled in cold RTF until processed in the laboratory.

Black-pigmented bacteria for subsequent molecular, phenotypic and genotyping identification were obtained by cultivation of the confirmed isolates by PCR as *P. gingivalis*. A total of 35 isolates were subjected to genotyping from 6 patients, and 7 different genotypes were identified. Four patients had a single genotype in their isolates, whereas 2 showed two distinct genetic profiles. In conclusion, the isolates of *P. gingivalis* studied showed genetic variability within the IS1126 sequence and perhaps because of the number of samples analyzed a bacterial gene profile characteristic of chronic or aggressive periodontitis was not identified.

Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabíl. Oral Vol. 2(2); 54-58, 2009.

Key words: Genotyping, *P. gingivalis*, insertion sequences.

INTRODUCCIÓN

P. gingivalis, es un bacilo anaerobio, Gram (-), pigmentado de negro, miembro representativo de la microbiota patógena asociada a la iniciación y progresión de la periodontitis⁽¹⁻³⁾. Presenta diversos factores de virulencia, como la fimbria que le confiere capacidad de adherencia a los tejidos periodontales y a otras bacterias, el Lipopolisacárido (LPS) de su pared celular y la producción de múltiples proteasas, entre otros⁽²⁻⁴⁾. Estos elementos que incrementan la virulencia han sido ampliamente estudiados, pero las bases moleculares de sus mecanismos y su relación con la diversidad genética no se han comprendido en su totalidad⁽⁵⁾. Para reflejar este hecho, diversos autores han demostrado que *P. gingivalis* puede estar presente en sacos periodontales y surcos gingivales sanos, lo que sugiere una gran heterogeneidad dentro de esta especie con subpoblaciones de alta y baja patogenicidad⁽⁵⁻⁷⁾.

Con el propósito de caracterizar individualmente los aislados de *P. gingivalis*, la biotipificación y serotipificación han sido utilizadas durante años^(8,9). Se han descrito dos biotipos basados en la presencia o ausencia de actividad enzimática de la catalasa y 6 serotipos de *P. gingivalis* de acuerdo a sus antígenos capsulares (K1-K6)⁽¹⁰⁾. Sin embargo, estos métodos tienen una aplicación limitada para apreciar la heterogeneidad genética de las diferentes cepas de *P. gingivalis* y observar sus particularidades⁽⁸⁻¹⁰⁾.

Por tanto se propone a la genotipificación de *P. gingivalis* como una herramienta molecular que permita determinar diferentes perfiles bacterianos y su probable asociación con el grado de virulencia de este microorganismo. Califano y cols.⁽¹¹⁾ sostienen que existe una gran diversidad genotípica de los aislados de *P. gingivalis*, ya que estos raramente muestran "Clonalidad Genotípica", definida como la situación en que los aislados de una especie bacteriana dada para todos los propósitos son

1. Departamento de Patología, Área de Microbiología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.

2. Departamento de Química y Farmacia, Universidad Católica del Norte. Chile.

3. Departamento de Patología, Área de Microbiología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.

Financiado por Proyecto FONDECYT N° 1050518.

genéticamente idénticos⁽¹¹⁾. A lo menos 100 tipos clonales distintos de *P. gingivalis* han sido encontrados en pacientes con periodontitis basándose en los patrones electroforéticos de su DNA genómico⁽¹¹⁻¹³⁾.

La variabilidad genotípica entre los aislados de *P. gingivalis* es un reflejo de las distintas secuencias en su DNA, por ese motivo los métodos moleculares de tipificación han sido un gran aporte para su estudio. Dentro de ellos destaca por su reproductibilidad y sencillez la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para secuencias de inserción (IS). Las Secuencias de Inserción (IS) se encuentran en el ADN bacteriano y son definidas como elementos génicos discretos que se repiten de manera constante en el cromosoma procariótico, su rango de tamaño va aproximadamente desde 800 a 2500 bp, pudiendo ser reconocidas por partidores especialmente diseñados^(13,14).

La IS1126 es la primera secuencia de inserción descrita para *P. gingivalis* por Maley y cols.⁽¹⁵⁾. Actualmente pertenece a la familia IS5 de las secuencias de inserción y tiene una longitud de 1,338 bp^(16,17). El genoma de *P. gingivalis* almacena un número variable de copias de la IS1126⁽¹⁶⁾ siendo la más numerosa de todas las secuencias de inserción descritas en este microorganismo. Otra característica de IS1126 es su aparición como la más activa de las secuencias de inserción, ya que se registró evidencia de recombinación mediada por IS1126 y transposición dentro de la cepa W83 y otras cepas de *P. gingivalis*^(18,19).

La técnica que describe la utilización de la PCR basada en la secuencia IS1126 para la genotipificación de *P. gingivalis* fue elaborada por Park y cols.⁽¹⁶⁾. Este método resulta en la producción de hasta 7 amplicones, los que representan el distinto número de fragmentos dentro de la IS1126 utilizando los partidores apropiados, que amplifican sólo los extremos de las secuencias repetidas⁽¹⁶⁾. Como consecuencia de ello, se observa un patrón electroforético único para cada aislado de esta bacteria, siendo un método útil y reproducible para la caracterización genotípica de *P. gingivalis*⁽¹⁶⁾. La razón principal de la elección de la secuencia de inserción IS1126 obedece a que es la más conservada y estudiada de éstas^(20,21), lo que permite caracterizar sus variaciones a través de la genotipificación.

El objetivo de este trabajo de investigación fue genotipificar aislados de *P. gingivalis* de pacientes con Periodontitis Crónica y Agresiva utilizando la Secuencia de Inserción IS1126, con el fin de determinar si existe un genotipo predominante o varios distintos, para obtener una aproximación molecular de la relación de los distintos genotipos con algunos aspectos clínicos de las periodontitis.

MATERIALES Y METODOS

1. Población a estudiar

Del total de pacientes examinados en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, entre los meses de Agosto y Octubre del 2008, se encontraron 15 pacientes que cumplían con los Criterios de Inclusión. Seis pacientes fueron considerados en el presente estudio, ya que sólo en éstos se pudo identificar molecularmente a *P. gingivalis* y obtener su genotipificación.

El diagnóstico clínico de la enfermedad se estableció de acuerdo a los criterios de clasificación internacionales⁽²²⁾ y fueron realizados por un clínico especializado (JG). De los 6 pacientes incluidos en este estudio 4 de ellos fueron diagnosticados con Periodontitis Crónica y 2 con Periodontitis Agresiva.

Luego de explicar a los pacientes el propósito del estudio, éstos firmaron el consentimiento informado, se tomaron las muestras microbiológicas y se procedió a realizar el tratamiento periodontal.

Esta investigación cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Criterios de inclusión

- Sin antecedentes médicos de enfermedad sistémica o embarazo.
- Enfermedad periodontal sin tratamiento.
- Sin antibioterapia ni terapias con analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos en los últimos 6 meses previos al estudio.

Medidas clínicas

Los parámetros clínicos fueron medidos por un clínico entrenado y calibrado (JG), en todas las piezas dentarias excluyendo terceros

molares. Las mediciones consideraron: nivel de inserción clínica, profundidad al sondaje, acumulación de placa supragingival y sangramiento al sondaje.

Se examinaron 6 sitios en cada diente: mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, distolingual, lingual y mesio-lingual.

2. Toma de muestra microbiológica

En los pacientes ingresados al estudio se tomaron muestras de placa subgingival en 4 sitios periodontalmente afectados, uno en cada cuadrante. Se seleccionaron sitios con una profundidad al sondaje mayor a 5 mm y una pérdida de inserción mayor a 3 mm.

Después de aislar el área con torundas de algodón y secar cuidadosamente con aire, los depósitos supragingivales fueron removidos con curetas estériles. Las 4 muestras microbiológicas se obtuvieron insertando 2 conos de papel estériles del n° 30 en el saco periodontal por 20 segundos⁽²³⁾. Las muestras de cada paciente se depositaron en viales con 2ml de medio de transporte RTF (Fluido de Transporte Reducido) frío sin EDTA. Los viales fueron transportados inmediatamente al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, a una temperatura de 4°C (en hielo), para la siembra.

3. Procedimientos microbiológicos

Las muestras de placa subgingival fueron dispersadas y mezcladas por 45 segundos agitando en un vórtex-mixer, seguido de diluciones seriadas en PBS (buffer fosfato pH 7,4) de la suspensión bacteriana mantenida en el RTF. Un volumen de 100 µl de la dilución adecuada (10⁻² y 10⁻³), se sembró en Agar Sangre de Caballo Hemina-Menadiona no selectivo, para la detección de *P. gingivalis*⁽²³⁾.

Las placas fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis a 35°C hasta 14 días en jarra con generador para la producción de atmósfera anaerobia (Anaerogen, Oxoid). Una vez transcurrido el período de incubación se efectuó un análisis macroscópico bajo lupa estereoscópica (Stemi 2000 C, Zeiss), para identificar las colonias pigmentadas de negro.

Se escogieron 8 a 16 colonias bacterianas pigmentadas de negro por paciente, en lo posible eligiendo cada colonia con diferente morfología. Inmediatamente fueron resembradas cada una por separado en Placas de Agar Sangre Hemina - Menadiona no selectivo⁽²³⁾ e incubadas en condiciones de anaerobiosis a 35° C durante 7 a 10 días.

Para diferenciar entre los géneros *Prevotella* y *Porphyromonas* se sometieron los aislados a la acción directa de Luz UV de onda larga (360 nm) suspendidos en metanol puro⁽²³⁾. La presencia de fluorescencia negativa (color negro), indica que los microorganismos pertenecen al género *Porphyromonas*⁽²³⁾.

Además de los aislados bacterianos obtenidos de las muestras clínicas, se utilizó una cepa de referencia ATCC 33277 de *P. gingivalis* como control positivo.

Extracción de ADN

A partir de los aislados identificados fenotípicamente como *P. gingivalis*, se realizó la extracción de ADN utilizando el método de extracción de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, de acuerdo con los protocolos estandarizados⁽¹⁶⁾. Posteriormente el ADN extraído fue congelado a -20°C, hasta ser requerido para su procesamiento.

Cuantificación de ADN

La cantidad de ADN extraído para cada aislado se estimó midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro (Spectrophotometer UV - 1601, Shimadzu). También se registró la relación de proteínas del ADN obtenido midiendo a una longitud de onda de 280 nm, para establecer su pureza.

4. Identificación y Genotipificación mediante PCR para la Secuencia de Inserción IS1126

Para la identificación y genotipificación de *P. gingivalis*, se utilizó la metodología descrita por Park y cols.⁽¹⁶⁾. La realización de ésta técnica comprende las siguientes etapas:

- i) Confirmar que las muestras a utilizar corresponden molecularmente a *P. gingivalis*. Para la identificación de *P. gingivalis* mediante PCR, se utili-

zaron los partidores PI1 (5' – CCC GGC TTA TGA CGT GAT TTC TCT- 3') y PI2 (5' – CTG TTG CGT TTG TGC CCT TGT GC – 3').

Los tubos de PCR contenían los siguientes reactivos en 50µl de volumen final: Buffer 10X 5 µl, MgCl² 50mM 3,0 µl, mezcla equimolar de desoxirribonucleótidos dATP, dGTP, dTTP, dCTP 1 µl, 2,0 µl del partidor PI1 2,2 µl del partidor PI2, 0,5µl de Taq polimerasa 2,5 U (Invitrogen™), agua nanopura 23,7 µl y 10 µl de ADN genómico con una concentración final de 100 ng. La amplificación del ADN fue realizado en un termociclador (Labnet Multigene) de la siguiente forma: 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 55,1°C por 30 seg. y extensión 72°C por 1 minuto. Además se contempló un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 mín. y una extensión final de 72°C por 5 mín.

ii) Someter a los aislados identificados anteriormente como *P. gingivalis* a la reacción de PCR para genotipificación. En la reacción de genotipificación se utilizaron los partidores PI1RC (5' AGA GAA ATC ACG TCA TAA GCC GGG -3') y PI2RC (5' GCA CAA GGG CAC AAA CGC AAC AG – 3'). Los tubos de PCR contenían los siguientes reactivos en 50µl de volumen final: Buffer 10X 5 µl, MgCl² 50mM 3,0 µl, mezcla equimolar de desoxirribonucleótidos dATP, dGTP, dTTP, dCTP 1 µl, 2,7 µl del partidor PI1RC, 2,6 µl del partidor PI2 RC, 0,5µl de Taq polimerasa 2,5U (Invitrogen™), agua nanopura 25,2 µl y 10 µl de ADN genómico con una concentración final de 100 ng. La reacción de genotipificación de *P. gingivalis* fue realizada utilizando 30 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 48,6°C por 30 seg. y extensión a 72°C por 1 minuto. Además se contempló una desnaturalización inicial de 94°C por 5 mín. y una extensión final de 72°C por 5 mín.

iii) Observar el tamaño de los amplicones obtenidos en la PCR, mediante electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio. Los resultados de la reacción de PCR para genotipificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y bromuro de etidio. El estándar de tamaño molecular utilizado fue de 1 kb (1kb DNA Ladder, Invitrogen™). El conjunto de amplicones obtenidos para cada aislado fue determinado usando una fotografía digital de cada gel sometido a electroforesis. Los geles de agarosa fueron observados en un transiluminador UV (National Labnet Company Transilluminator DNA) a una longitud de onda de 302nm. Cada gel fue registrado digitalmente con una cámara Olympus (Camedia digital camera D-425), para su posterior análisis.

5. Análisis de los datos obtenidos

Los datos clínicos se expresaron en promedio y desviación Standard. Se utilizó para ello el programa computacional Stata 8.

Para el análisis de los genotipos, las bandas de los amplicones obtenidos por electroforesis se analizaron utilizando la relación entre el log Mr del estándar de tamaño molecular y el Rf (migración relativa) de cada una de las bandas obtenidas, con ajuste de recta y a través del uso de la interpolación.

RESULTADOS

Las características clínicas de los 6 sujetos incluidos en nuestro estudio se aprecian en la Tabla 1. Las muestras microbiológicas utilizadas en este estudio fueron obtenidas de 6 sujetos: 4 con diagnóstico de Periodontitis Crónica Generalizada Severa y 2 con diagnóstico de Periodontitis Agresiva Generalizada.

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes (Promedio ± SD).

Variables Clínicas	P.Crónica (n= 4)	P.Agresiva (n= 2)
Edad (años)	62 ± 6.48	31 ± 16.97
Hombres (Nº)	3	1
Índice de placa (%)	66	68
Sangrado al Sondaje (%)	67	54
Profundidad al Sondaje (mm)	4.42 ± 0,46	4.64 ± 0,62
Nivel de Inserción Clínico (mm)	3.44 ± 0,46	3.68 ± 0,68

Se identificaron fenotípicamente como *P. gingivalis* 58 aislados de bacterias pigmentadas de negro, de los cuales 47 fueron con-

firmados mediante PCR. Se obtuvo la genotipificación de ellos en 35 aislados provenientes de 6 pacientes (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de aislados seleccionados.

Resultados de los aislados		
Nº de aislados total	58	(100%)
Nº de Pg positivos (PCR)	47	(81,03%)
Nº de Pg genotipificados	35	(60,34%)

Se identificaron molecularmente como *P. gingivalis*, a través de la técnica de PCR, a 35 aislados de bacterias pigmentadas de negro. En la Figura 1 se aprecia un gel de agarosa al 0,8%, en donde se observan los resultados de amplificación mediante PCR basada en la Secuencia de Inserción IS1126, utilizando los partidores PI1 y PI2. Se identificó como *P. gingivalis* a los aislados bacterianos en los que se visualizó la banda de 693 bp. La banda débil que se observa en el carril 17 se consideró positiva para la identificación de ese aislado como *P. gingivalis*.



Figura 1. Identificación de *P. gingivalis* mediante PCR basada en la secuencia de inserción IS 1126.

Carril M: Estándar de tamaño molecular 1Kb; **Carriles 1-3:** ADNg desde aislados paciente 1; **Carriles 4-7:** ADNg desde aislados del paciente 2, **Carriles 8-11:** ADNg desde aislados paciente 3; **Carril 12-16:** ADNg desde aislados paciente 4, **Carril 17 -19:** ADNg desde aislados paciente 5.

Posteriormente se obtuvo la genotipificación de los 35 aislados previamente identificados como *P. gingivalis*, provenientes de 6 pacientes. En la Figura 2 se aprecia un gel de agarosa al 0,8%, representativo donde se observan los resultados de amplificación mediante PCR basada en la Secuencia de Inserción IS1126, utilizando los partidores PI1RC y PI2RC. En el carril 18 se muestra el perfil de bandas de la cepa control ATCC 33277 de la especie *P. gingivalis*. En el resto de los carriles del gel se aprecian los perfiles de los aislados pertenecientes a los 6 pacientes, considerados en este estudio.

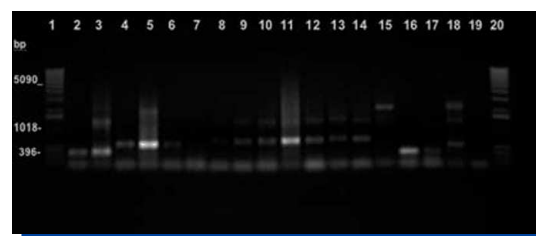


Figura 2. Genotipificación de *P. gingivalis* mediante PCR basada en la secuencia de inserción IS 1126.

Carril 1 y 20: Estándar de tamaño molecular 1Kb; **Carriles 2 y 3:** ADNg desde aislados del paciente 1; **Carriles 4 -6:** ADNg desde aislados del paciente 2, **Carriles 7-14:** ADNg desde aislados del paciente 3; **Carril 15:** ADNg desde aislado del paciente 4, **Carril 16:** ADNg desde aislado del paciente 5, **Carril 17:** ADNg desde aislado del paciente 6. **Carril 18:** ADNg cepa ATCC 33277 control positivo de *P. gingivalis*; **Carril 19:** ADNg control negativo de *P. intermedia*.

El análisis de los datos permitió establecer la presencia de 7 perfiles genéticos diferentes en los 35 aislados, determinados según el número de bandas y tamaño de las mismas presentes en la electroforesis para genotipificación (Figura 2). A cada perfil se le asignó arbitrariamente una letra, de acuerdo al número y tamaño de las bandas que presenta. De este modo se configuró el resto de los perfiles genéticos mostrados en la Tabla 3.

Tabla 3. Caracterización de perfiles electroforéticos.

Perfiles genéticos	Nº de bandas	Tamaños relativos de las bandas
Perfil A	3	2.036 bp 1.018 bp 506 bp
Perfil B	2	506 bp 396 bp
Perfil C	4	1.196 bp 787 bp 396 bp 344 bp
Perfil D	3	1.018 bp 396 bp 344 bp
Perfil E	4	2.036 bp 1.636 bp 1.131 bp 396 bp
Perfil F	3	2.036 bp 1.018 bp 601 bp
Perfil G	2	1.266 bp 614 bp

En la Tabla 4 podemos apreciar los perfiles genéticos encontrados en los aislados de cada uno de los pacientes estudiados. En los pacientes con Periodontitis Crónica, se observan 6 perfiles genéticos distintos en sus aislados, en 2 pacientes se identificaron dos perfiles genéticos diferentes. Cuatro pacientes presentaron un solo perfil en sus aislados. Los pacientes con Periodontitis Agresiva, mostraron un solo perfil genético (C y D respectivamente). Hay un genotipo común a Periodontitis Crónica y Agresiva, que corresponde al perfil D, en baja frecuencia. Los perfiles que predominaron en Periodontitis Crónica fueron el G y F. En Periodontitis Agresiva el genotipo más encontrado fue el perfil C.

Tabla 4. Genotipos o perfiles encontrados en los pacientes y su diagnóstico clínico.

Diagnóstico Clínico	Paciente	Tipo de Perfil	Frecuencia del Perfil
	1	A	1
		B	4
	2	F	7
Periodontitis Crónica	3	G	8
	4	D	2
		E	3
Periodontitis Agresiva	5	C	9
	6	D	1
4 P.Crónica 2 P.Agresiva	N=6	7 Perfiles genéticos	35 Aislados Genotipificados

DISCUSIÓN

De los 6 pacientes seleccionados se obtuvieron 58 aislados identificados fenotípicamente como *P.gingivalis*, se confirmaron 47 a través de PCR y fueron genotipificados 35 de ellos con la Técnica de PCR para la Secuencia de Inserción IS1126. La disminución en el número de aislados confirmados puede deberse a que en la identificación previa los aislados pertenecían al género *Porphyromonas*, pero molecularmente correspondían a una especie diferente.

Los 35 aislados de *P.gingivalis* genotipificados en este estudio presentaron diferentes perfiles genéticos. Los resultados mostraron

7 genotipos. Cuatro pacientes evidenciaron un solo perfil genético y 2 pacientes comparten el genotipo "D". Esta situación es similar a lo obtenido por Park y cols.⁽¹⁶⁾, en el único estudio que describe y trabaja la metodología basada en la PCR para la Secuencia IS1126. Estos investigadores genotipificaron 37 aislados de 12 pacientes con Periodontitis Agresiva y también encontraron que existen distintos patrones electroforéticos, a pesar de que no los caracterizaron como diferentes genotipos.

La heterogeneidad genética que exhiben los aislados de *P.gingivalis* a nivel de la Secuencia de Inserción IS1126, puede deberse a varias razones. Dong y cols.⁽¹⁸⁾ compararon la localización de la IS1126 a través de RFLP en el genoma de dos cepas de *P.gingivalis*, la cepa de referencia ATCC 33277 y la cepa W83, ambas provenientes de distintos laboratorios. Estos autores pudieron observar ganancia o pérdida de una banda en la electroforesis, debido a que habrían ocurrido fenómenos de duplicación, transposición o recombinación de la Secuencia IS1126. Al igual que en nuestro estudio, las diferencias en los perfiles genéticos en algunas ocasiones corresponden a la aparición o ausencia de una banda, lo que podría deberse a los eventos descritos por Dong y cols.⁽¹⁸⁾. Los resultados obtenidos corroboran la hipótesis planteada, respecto a la secuencia de inserción IS1126, reafirmando que existen variaciones a ese nivel. Una explicación para esta variabilidad es que la Secuencia IS1126 es un elemento muy activo y móvil dentro del genoma de *P.gingivalis*⁽¹⁸⁻²¹⁾.

Por otra parte, cuando nos referimos a la cantidad de perfiles o genotipos presente en cada paciente, en dos de ellos encontramos más de un perfil genético. Este fenómeno contrasta con lo descrito por Park y cols.⁽¹⁶⁾ quienes aseveran que, en la mayoría de los casos, los aislados de un mismo paciente corresponden a un solo genotipo. A pesar de trabajar con otra metodología (AFLP), van Wilkenhoff y cols.⁽²⁴⁾ apreciaron que, al evaluar la estabilidad clonal de *P.gingivalis*, determinaron que la cantidad de genotipos encontrados por paciente es variable. Prueba de ello es que pudieron detectar hasta 24 genotipos distintos en un paciente y clones idénticos de *P.gingivalis* en diferentes sujetos del estudio.

En la asociación de los perfiles genéticos encontrados con las entidades clínicas estudiadas, resulta complejo establecer una relación entre un patrón electroforético específico y cada tipo de periodontitis. La dificultad de vincular estos resultados tiene, como primer motivo, la escasa cantidad de pacientes analizados en el presente estudio, para poder identificar si hay algún genotipo predominante o no. En la literatura se describe el caso de otro patógeno periodontal, como *A.actinomycetemcomitans*, en el cual es posible identificar un tipo clonal (JP2) fuertemente asociado al desarrollo de Periodontitis Agresiva⁽²⁵⁾. En contraste a esta situación, es probable que por las características poblacionales de *P.gingivalis*, la cual no pertenece a una población clonal como *A.actinomycetemcomitans*, sería difícil identificar un tipo clonal asociado en mayor medida con una patología determinada. Se caracteriza a la especie *P.gingivalis* como una población de tipo "Panmítica", ésta se encuentra sufriendo cambios constantemente, con nuevas variantes emergiendo y otras desapareciendo. En cambio, las poblaciones bacterianas de estructura "Clonal" permanecen estables por largo tiempo⁽²⁵⁾. Gracias a esa variabilidad genética antes descrita, es común encontrar la estructura poblacional de tipo "Panmítica" en bacterias que ocasionan patologías humanas de tipo crónico, porque tienen la capacidad de persistir en el hospedero aunque existan cambios medioambientales en su nicho ecológico, tal como lo hacen las especies *H.pylori* y *Neisseria spp.*⁽²⁶⁻²⁸⁾.

Otro aspecto a analizar, son las implicancias de la variabilidad genética en los aislados de *P.gingivalis* encontrada en este estudio a nivel de la Secuencia de Inserción IS1126. Estos elementos genéticos móviles tienen un rol esencial en la diseminación de factores de virulencia a nivel inter e intraespecies de microorganismos. Se ha descrito una relación entre la Secuencia IS1126 con los mecanismos de virulencia y adaptación de *P.gingivalis*. En efecto Simpson y cols.⁽¹⁹⁾ demostraron que la transposición de esta secuencia modula la transcripción de los genes que codifican la gingipaina K (kgp), gingipaina R1 y R2 (*rgpB*), incrementando su virulencia⁽¹⁸⁾.

Naito y cols.⁽²⁰⁾ reportaron que cuando *P.gingivalis* es sometida a estrés oxidativo, puede existir transposición de la Secuencia de inserción IS1126, lo que contribuiría, a través del reordenamiento genético, a la adaptación de algunas cepas de *P.gingivalis* a las cambiantes concentraciones de oxígeno del saco periodontal⁽²¹⁾. Por lo tanto, las variaciones encontradas entre los genotipos de *P.gingivalis* pueden incidir

directamente en su potencialidad de invadir y generar daño a los tejidos periodontales del hospedero.

En resumen, la genotipificación de los aislados de *P. gingivalis* utilizando la Secuencia de inserción IS1126, puede ser considerada como un método útil para identificar variaciones genotípicas, y

asociado con otros métodos de tipificación, como la genotipificación mediante el gen *fim A* contribuiría a comprender de mejor forma la relación con los mecanismos de virulencia involucrados en la patogénesis de la periodontitis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Holt S, Ebersole J. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella frothythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology* 2000, 2005; 38:72 – 122.
- Amano A. Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with Host Cells: Implication for the microbial pathogenesis of Periodontal Disease. *J Periodontol* 2003; 74 (1):90-95.
- Lamont R, Jenkinson H. Life below the gum line: Pathogenesis Mechanism of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 1244-1263.
- Holt S, Kesavalu L, Walker S, Genco C. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology* 2000, 1999; 20: 168 – 238.
- Yoshino T. et al. Genotypic characterization of *Porphyromonas gingivalis* isolated from Swedish patients with periodontitis and from periodontal abscesses. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22: 195 – 200.
- Frandsen E, Poulsen K, Curtis M, Kilian M. Evidence of recombination in *Porphyromonas gingivalis* and random distribution of putative virulence markers. *Infect Immun* 2001; 69: 4479-4485.
- Lamell C, Griffen A, McClellan D, Leys J. Acquisition and colonization stability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in children. *J Clin Microbiol* 1998; 38: 1196-1199.
- Özmeriç N. et al. Genetic diversity of *Porphyromonas gingivalis* and its possible importance to pathogenicity. *Acta Odontol. Scand* 2000; 58:183 -187.
- Nagata A, Man-yoshi T, Sato M, Nakamura R. Serological studies of *Porphyromonas gingivalis* and correlation with enzyme activity. *J Periodontal Res* 1991; 26: 184-190.
- van Winkelhoff A. and Laine M. Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13 : 322-325.
- Califano J, Arimoto T, Kitten T. The genetic relatedness of *Porphyromonas gingivalis* clinical and laboratory strains assessed by analysis of insertion sequence (IS) element distribution. *J Periodont Res* 2003; 38: 411-416.
- Nishiara T, Koseki T. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontology* 2000 2004; 36: 16 – 24.
- Califano J. et al. Characterization of *Porphyromonas gingivalis* Insertion Sequence-Like Element ISPg5. *Infect Immun* 2000; 68 (9):5247-5253.
- Wang C, Bond V, Genco C. Identification of a second endogenous *Porphyromonas gingivalis* Insertion element. *J Bacteriol* 1997; 179(1): 3808-3812.
- Maley J, Roberts I. Characterization of IS1126 from *Porphyromonas gingivalis* W83: a new family member of the IS4 family of insertion sequence elements. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 123: 219-224.
- Park O. et al. Use of Insertion sequence element IS1126 in a genotyping and transmission study of *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol* 2004; 2(2):535 – 541.
- Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 1998; 62(3): 725-774.
- Dong H. et al. Genomic loci of the *Porphyromonas gingivalis* Insertion element IS1126. *Infect Immun* 1999; 7:3416- 3423.
- Simpson W. et al. Transposition of the endogenous insertion sequence IS1126 modulates gingipains expression in *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 1999; 67(10): 5012-5020.
- Naito M. et al. Determination of the genome sequence of *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in *P.gingivalis*. *DNA Research* 2008; 1: 1-11.
- Duncan M. Genomics of oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003; 12 (3): 175-183.
- Armitage G. Development of a Classification system for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4: 1-6.
- Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol* 1986; 1:48-57.
- van Winkelhoff A, Rijnsburger M, van der Velden U. Clonal stability of *Porphyromonas gingivalis* in untreated periodontitis. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 674-679.
- Kilian M, Frandsen E, Haubek D, Poulsen K. The etiology of periodontal disease revisited by population genetic analysis. *Periodontology* 2000 2006; 42: 158-179.
- Smeets C. et al. Molecular patchwork: chromosomal recombination between two *Helicobacter pylori* strains during natural colonization. *Infect. Immun.* 2003; 71:2907–2910.
- Maiden M. Population genetics of a transformable bacterium: the influence of horizontal genetic exchange on the biology of *Neisseria meningitidis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1993; 112:243–250.
- Hamilton L. and Dillard J. Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Mol. Microbiol.* 2006; 59:376–385.

CORRESPONDENCIA AUTOR

Nora Silva Steffens.

Departamento de Patología, Área de Microbiología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Chile.

norasilvasteffens@hotmail.com

Trabajo recibido el 14/07/2009.

Aprobado para su publicación el 16/08/2009.