



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



MÁSTER OFICIAL DE CIENCIAS ODONTOLÓGICAS:
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**DETECCIÓN DE LOS DISTINTOS
SEROTIPOS CAPSULARES DE
Porphyromonas gingivalis
MEDIANTE SUEROS DE
ANTICUERPOS ESPECÍFICOS**

NOHEMÍ ESPINOSA VILLARRUVIA

Tutor: Prof. Dr. David Herrera González

DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA III

ÍNDICE

1. Introducción.....	3
1.1. Justificación.....	8
1.2. Hipótesis.....	9
1.3. Objetivo.....	9
2. Material y métodos.....	10
3. Resultados.....	17
4. Discusión.....	25
5. Conclusiones.....	29
6. Referencias.....	31
7. Anexo: Figuras.....	35

1. INTRODUCCIÓN

Las periodontitis son enfermedades crónicas inflamatorias, que afectan a los tejidos de soporte del diente, produciendo pérdida de inserción clínica y destrucción de hueso alveolar, y que pueden conducir a la pérdida de los dientes. Además de los efectos locales (a nivel bucal), en los que la pérdida dentaria condiciona problemas funcionales y estéticos, en los últimos años, se ha asociado la presencia de periodontitis con diferentes condiciones sistémicas, como mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares (Offenbacher et al. 2009), nacimientos con parto prematuro (Offenbacher et al. 2006, Neves et al. 2010) o descompensación en el paciente diabético (Stewart et al. 2001, Pontes Andersen et al. 2007). La etiología de las periodontitis es multifactorial pero la infección bacteriana tiene un papel primario y esencial. Entre la variada ecología bacteriana subgingival, diferentes especies bacterianas Gram negativas, anaerobias estrictas, juegan un papel primordial según numerosas publicaciones y estudios (Dzink et al. 1985, Slots 1986, Page y Kornman 1997).

En concreto, *Porphyromonas gingivalis* está fuertemente asociada con la destrucción de los tejidos de soporte según multitud de estudios (van Winkelhoff et al. 1989, Haffajee y Socransky 1994). Es más, *P. gingivalis* ha sido reconocida como uno de los patógenos periodontales de asociación fuerte a periodontitis junto con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Tannerella forsythia* (World Workshop on Periodontology 1996).

A pesar de esta evidente asociación microorganismo-enfermedad, la simple presencia de *P. gingivalis* no conduce necesariamente a la destrucción periodontal, de modo que se puede afirmar que los patógenos periodontales son esenciales en la patogénesis de las periodontitis pero no suficientes para iniciar la destrucción del periodonto. Aparentemente, son necesarios también para iniciar la enfermedad un

huésped genéticamente susceptible o la presencia de otros microorganismos patógenos (van Winkelhoff et al. 2002), de ahí que la enfermedad periodontal sea considerada de etiología multifactorial.

La importancia de *P. gingivalis* es especialmente relevante en España: numerosos trabajos han estudiado la prevalencia de *P. gingivalis*, comparando estados de salud con enfermedad, e incluso, tratando de establecer un patrón de distribución geográfico. Se ha observado que, en sujetos con periodontitis crónica moderada-severa, al comparar España frente a Holanda (Sanz et al. 2000), *P. gingivalis* fue significativamente más prevalente en el grupo español, 64.5% frente a un 36.7% en el grupo holandés. Con los mismos criterios, se comparó España con Colombia y Chile (Herrera et al. 2008) concluyendo que, además de que *P. gingivalis* fue una de las bacterias más frecuentemente detectadas, los resultados obtenidos en los tres grupos fueron significativamente diferentes. Los sujetos colombianos mostraron una frecuencia de detección del 65.9%, menor que en los españoles (77.8%) y chilenos (83.8%).

Diversos estudios en España han revelado también la frecuente detección de *P. gingivalis* en poblaciones sin periodontitis, representando un 13% de la ecología total de sujetos con encías sanas (Lau et al. 2004), o la frecuente presencia en sujetos con halitosis sin periodontitis (Roldán et al. 2003) y en mujeres embarazadas (Carrillo et al. 2010). Por tanto, *P. gingivalis* se detecta también, aunque con menor frecuencia, en sujetos sin enfermedad (Slots y Ting 1999).

Una de las posibles explicaciones de estos hallazgos sería que diferentes cepas de *P. gingivalis* podrían tener diferente capacidad patógena. Esto ayudaría a explicar la presencia de *P. gingivalis* en poblaciones de pacientes sin periodontitis.

La asociación entre la severidad de la enfermedad y la presencia de un microorganismo específico viene determinada por la virulencia del microorganismo, que puede definirse como la capacidad del organismo para causar enfermedad medida por un procedimiento experimental. Esta virulencia depende de la capacidad de infección del organismo y de la severidad de la enfermedad producida, aunque están influenciados por la naturaleza y estado del huésped y del lugar de colonización (Curtis et al. 2005).

P. gingivalis posee factores de virulencia que pueden contribuir a la etiopatogénesis de las periodontitis (Laine et al. 1996). Estos factores de virulencia pueden tener un importante papel en la iniciación de la respuesta inflamatoria y destrucción de tejidos en las periodontitis (Holt et al. 1999). *P. gingivalis* posee una membrana externa en la que existen lipoproteínas, lipopolisacáridos y proteínas de transporte, fimbrias, proteinasas y enzimas que son considerados sus principales factores de virulencia.

Además de los factores mencionados, *P. gingivalis* posee una cápsula externa que contiene polisacáridos, que hacen a la bacteria resistente a la fagocitosis y que pueden actuar como antígenos (Jawetz et al. 1984, Mims et al. 1993, Laine et al. 1997). Este hallazgo resultó en la identificación de seis serotipos diferentes, que fueron descritos basándose precisamente en estos antígenos capsulares (K): K1 (cepa W83), K2 (cepa HG184), K3 (cepa A7A1-28), K4 (cepa ATCC-49417), K5 (cepa HG1690), K6 (cepa HG1691) y una variedad exenta de cápsula, K- (Laine et al. 1996, van Winkelhoff 1993). Todas las cepas encapsuladas, inoculadas subcutáneamente en modelos animales, dieron lugar a una infección acompañada de exudación, necrosis y ulceración sistémica y, en cambio, la no encapsulada fue menos virulenta y sólo dio lugar a absceso

localizado (Laine et al. 1998). Esto sugiere implicación directa de la cápsula en la virulencia de la bacteria. Además, existen diferencias en relación a la virulencia entre los distintos serotipos (Jawetz et al. 1984).

Aunque la bacteria puede producir daño directo, su patogenicidad depende sobre todo de la activación del sistema inmunológico. De la interacción biofilm-periodonto se obtiene como resultado la producción de citoquinas y mediadores inflamatorios, que promueven la liberación de enzimas y otras moléculas que finalmente inducen las alteraciones en el metabolismo del tejido conectivo y destrucción de tejidos de soporte, característicos de las periodontitis (Offenbacher 1996). Se han encontrado diferencias significativas en la expresión de citoquinas inducidas por los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis*, ya que se ha demostrado que las cepas K1 y K2 inducen mayor respuesta en células dendríticas y son más resistentes a la fagocitosis (Sundqvist et al. 1991). Los distintos serotipos inducen una diferente respuesta inmune y se observan diferencias cualitativas de esta respuesta (Vernal et al. 2009). Además, el serotipo K4 parece poseer una mayor capacidad de adhesión al epitelio de la bolsa periodontal (Dierickx et al. 2003). Sin embargo, aunque es evidente que la presencia y tipo de cápsula son importantes a la hora de determinar la patogenicidad de *P. gingivalis* (Jawetz et al. 1984, van Winkelhoff et al. 1993, Vernal et al. 2009), aún no es bien conocida su relación con la severidad de la enfermedad.

JUSTIFICACIÓN

Las diferencias observadas en la capacidad patógena de diferentes cepas de *P. gingivalis* y la detección de este patógeno en sujetos sin periodontitis, aunque con menor frecuencia (Slots y Ting 1999), sugiere que la detección de este patógeno y de sus diferentes serotipos K podría ser importante para controlar la evolución de la enfermedad y predecir resultados. Por ello, sería interesante contar con un método estandarizado que permitiera realizar un reconocimiento molecular de los distintos serotipos de *P. gingivalis* para establecer la prevalencia y distribución de los distintos serotipos. Estudios posteriores podrían establecer correspondencia con grados de enfermedad. Mediante la elaboración de sueros con anticuerpos específicos y la interpretación de resultados con técnicas de inmunofluorescencia, las variedades de *P. gingivalis* presentes en distintos grupos de sujetos se podrían tipificar y cuantificar y asociarlos a un grado de enfermedad. Esto permitiría controlar la evolución de la enfermedad y predecir resultados de tratamiento.

HIPÓTESIS

La detección y cuantificación de los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* es posible mediante la aplicación de una muestra a un suero de anticuerpos específicos y su posterior interpretación con técnicas de inmunofluorescencia.

OBJETIVO

El objetivo principal de este estudio fue desarrollar una herramienta para identificar los distintos serotipos de *P. gingivalis* mediante inmunoensayos, para poder establecer su prevalencia y correlacionarla con grados de enfermedad en estudios posteriores.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Siembra y crecimiento de bacterias.

Para la obtención de las muestras bacterianas, se realizaron los crecimientos de *P. gingivalis* a partir de criobolas almacenadas a -80°C en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid. Cada criobola contenía una cepa determinada de *P. gingivalis*: W83, HG184, A7A1-28, ATCC-49417, HG1690, HG1691, cada una de ellas seleccionada por presentar una variedad distinta de cápsula, y, además, una variedad exenta de cápsula.

Por otro lado, se prepararon 6 placas estériles con medio ágar sangre. Se trata de un medio de cultivo OXOID n°2 ágar base con 5% de sangre desfibrinada de caballo y 5% de solución de hemina y menadiona. En cada una de ellas, se realizó la siembra de una criobola determinada en condiciones de esterilidad y se etiquetaron convenientemente, se introdujeron en una jarra y se incubaron en una estufa a unos 35°C durante 7 días y en condiciones de anaerobiosis. Pasado este tiempo, se realizó el aislamiento de una sola colonia de cada placa, se volvió a sembrar en ágar-sangre y a incubar de la manera ya descrita. Este proceso volvió a repetirse una semana después.

Una vez se obtuvo la población de las 6 placas, se prepararon 6 tubos tipo Falcon con 15 mL. de medio de cultivo *Brain-Heart Infusion* (BHI) cada uno. El BHI estaba compuesto por extracto de cerebro de ternera (12.5 g.), extracto de corazón de buey (5 g.), triptosa (10 g.), cloruro sódico (5 g.), fosfato disódico (2.5 g.) y agua destilada (1000 mL.) y sintetizado en condiciones de esterilidad. En cada Falcon se añadió una colonia de bacterias, de manera que cada Falcon se correspondía con una placa de ágar-sangre, también fueron correctamente etiquetados. Las colonias se añadieron utilizando asas estériles desechables y cada Falcon se colocó en Vortex durante alrededor de 20 segundos.

Los 6 recipientes junto con un control negativo fueron de nuevo colocados en jarra y estufa a 35°C e incubados durante 7 días en condiciones de anaerobiosis para permitir el crecimiento bacteriano.

Transcurridos los 7 días, se retiraron los Falcon de la jarra. En condiciones de esterilidad se comprobó la turbidez de las preparaciones (signo de crecimiento bacteriano) y se colocaron en Vortex durante 20 segundos. A continuación se realizaron dos procedimientos para determinar el número de bacterias disponibles por mL. y para comprobar que no existía contaminación. En primer lugar, el número de bacterias aproximado se calculó mediante espectrofotómetro midiendo la turbidez de cada crecimiento. El número necesario era de 10^{11} - 10^{13} bacterias por mL. Gracias a este procedimiento se comprobó que el crecimiento había sido correcto y permitió seguir adelante con el lavado y fijación de bacterias apenas unas horas después.

En segundo lugar, se realizó un procedimiento que permitió descartar la existencia de contaminación y de nuevo comprobar si el número de bacterias en la preparación era adecuado. Para ello, se utilizó solución fosfato-salina o *Phosphate Buffered Saline* (PBS) compuesto por NaCl (8 g.), KCl (0.2 g.), Na_2HPO_4 (1.15 g.), KH_2PO_4 (0.2 g.), piruvato de sodio (0.036 g.), glucosa (1 g.), kanamicina (0.007 g.) y agua destilada (1000 mL.). Se colocaron 900µl de PBS previamente esterilizado en cada Eppendorf, con un total de 10 por cada cepa. En el primer Eppendorf se colocaron 100 µl de la preparación del Falcon con micropipeta. De ese Eppendorf se volvieron a coger 100 µl de volumen y se llevaron al siguiente, consiguiendo así sucesivamente diluciones logaritmo 10 hasta llegar al último Eppendorf. De éste último, se tomaron de nuevo 100 µl que fueron repartidos en dos placas de ágar-sangre y de nuevo colocados en jarra para incubar. Este proceso se repitió para cada cepa. Transcurridos 7 días se confirmó

mediante recuento de colonias que el número de bacterias en las placas de ágar-sangre era el adecuado y que no existía contaminación.

Recuperación de bacterias y preparación de inóculos.

Una vez se obtuvieron las poblaciones de bacterias, se realizó un proceso de lavado, previo a la fijación de la muestra. Se llevó a cabo con PBS previamente esterilizado.

En primer lugar, se pasó todo el contenido de los Falcon a recipientes previamente esterilizados específicos para el rotor de centrífuga a utilizar, en este caso, frascos de 35 mL. para el rotor SL32 (Sorvall). Se añadió a cada recipiente con contenido bacteriano un volumen de 35 mL. de PBS y se llevó a centrifugar durante 10 minutos, a 10000 revoluciones por minuto y a una temperatura de 4°C. Al retirar los recipientes, la totalidad del contenido bacteriano se había quedado adherida a la base de los recipientes, de manera que se retiró el PBS con pérdida mínima de bacterias para de nuevo repetir el mismo proceso en dos ocasiones más.

Una vez las preparaciones estuvieron lavadas, se resuspendieron en un 1 mL. de PBS, se añadió 1 mL. de formaldehído al 1% a cada uno de los frascos y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, se añadió Glicina 50mM a cada preparación y se dejaron reposar durante 10 minutos.

Se volvieron a realizar de nuevo tres lavados con PBS tal y como se ha descrito anteriormente. Por último, se resuspendieron todas las preparaciones en PBS para repartir el producto en 10 Eppendorf conteniendo 700µl por muestra. Estas

preparaciones fueron congeladas a -80°C hasta su posterior utilización en el proceso de inmunización de conejos.

Proceso de inmunización de conejos y obtención de sueros.

Se contó con seis conejos (raza neozelandés alvino) para la obtención de los sueros. A cada uno se le inoculó subcutáneamente una de las muestras previamente purificadas y fijadas, de manera que de cada conejo se obtuvo un suero con anticuerpos para cada cepa de *P. gingivalis*.

Las muestras fueron conservadas en hielo en los Eppendorf. Se añadió el adyuvante incompleto de Freund a cada uno de los Eppendorf a partes iguales. Este adyuvante consiste en una solución compuesta por un aceite mineral y un agente dispersante que permite liberar lentamente el antígeno para lograr un estímulo persistente que facilita la producción de anticuerpos. Los Eppendorf se cerraron con parafilm y se colocaron en Vortex durante un minuto, dejando reposar un minuto y repitiendo el proceso un total de 5 veces para obtener una emulsión de consistencia viscosa que se usó como inóculo.

La primera inoculación se realizó en el lomo de los conejos, habiendo rasurado la zona 2 días antes. Se realizaron de 15 a 30 punciones separadas por 2 cm. Las inmunizaciones secundaria y terciaria se llevaron a cabo 35 días después con punción intramuscular en las extremidades traseras, con el mismo protocolo.

Después de 10 días tras la inmunización terciaria se realizó punción en la oreja para obtener una alícuota de suero que permitiera determinar la afinidad de los sueros. Posteriormente se llevó a cabo una cuarta inmunización, y 10 días después se sacrificó a

los animales mediante punción intracardíaca para la obtención del volumen máximo de sangre a partir del coágulo formado y mediante centrifugación del mismo. Una vez obtenidos los sueros, se alicuotaron y se conservaron a -20°C.

Caracterización de sueros mediante ELISA.

Para caracterizar los distintos sueros, se realizaron test *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) que permitían detectar las distintas cepas de *P. gingivalis* de modo cuantitativo. En concreto, se realizó un ensayo en el que en el fondo del pocillo de las placas específicas para ELISA se colocó la cepa determinada de *P. gingivalis*. A continuación se añadió el suero obtenido con anticuerpos correspondiente a esa cepa y se lavó el exceso. Después de este lavado, se añadieron anticuerpos anti IgG de conejo, que estaban marcadas, y que se unieron al complejo antígeno-anticuerpo. A continuación, se realizó un último lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas al complejo, se dejó reposar y se leyó la densidad óptica mediante espectrofotometría.

El espectrofotómetro permitió medir la intensidad de la señal generada por la unión antígeno-anticuerpo, lo que proporcionó información acerca de la especificidad de los sueros previamente sintetizados.

Análisis de los datos.

Los datos obtenidos se analizaron mediante estadística descriptiva y se interpretaron mediante la realización de tablas y gráficos que permitieron observar la cantidad de respuesta generada por cada uno de los sueros al enfrentarse a una muestra de *P. gingivalis* de un serotipo determinado.

3. RESULTADOS

Se realizaron 6 procedimientos en los que se enfrentó cada suero, de manera independiente, con antisueros obtenidos de conejos inmunizados frente a los distintos serotipos de *P. gingivalis* (K1, K2, K3, K4, K5, K6, K-). Las bacterias fijadas diluidas a 1/250 para K1 y K4 y a 1/500 para K2, K3, K5, K6 y K-. Las diluciones a las que se debían utilizar las bacterias para su unión a la placa se obtuvieron de datos experimentales en los que se tituló la concentración de bacterias unidas a la placa frente a una cantidad similar de los distintos antisueros (datos no mostrados). Se realizaron también diluciones de los sueros y se analizó la señal luminosa emitida por las uniones específicas antígeno-anticuerpo por el método ELISA, tal y como se ha descrito en la sección de material y métodos. Los resultados de esta medición fueron registrados en Unidades de Densidad Óptica (UDO) a 490 nm. Los resultados obtenidos para cada suero se describen a continuación.

ELISA de captura de anticuerpos por bacterias de serotipo K1 unidas a la placa.

Las bacterias del serotipo K1 que fueron utilizadas para la inmunización de conejos, se utilizaron también para llevar a cabo los experimentos de ELISA. Para ello, se pegaron a la placa y se enfrentaron a los distintos sueros obtenidos, es decir, se realizó un tapizado con K1.

Al analizar la respuesta obtenida por el suero anti-K1 se pudo observar que fue el único suero capaz de generar una señal de 0.16 UDO, cuando se usó en una dilución de 1×10^{-3} . Observando los valores obtenidos para los demás sueros, todos ellos diluidos a 1×10^{-3} , se puede constatar que los sueros anti-K2, anti-K4 y anti-K5 fueron capaces de generar una señal de 0.07 UDO. Los sueros anti-K3 y anti-K6 generaron unas señales de

0.06 UDO y 0.05 UDO, respectivamente. Al comparar todos los sueros, se observó que para generar una señal de entre 0.05 y 0.08, el suero anti-K1 puede usarse mucho más diluido que los demás, en concreto 4×10^{-4} (10 veces) (**Fig.1**), lo que sugiere la presencia de 10 veces más de anticuerpos capaces de reconocer K1 que capaces de reconocer las otras cepas bacterianas.

ELISA de captura de anticuerpos por bacterias de serotipo K2 unidas a la placa.

Al colocar bacterias del serotipo K2 en el fondo de la placa y enfrentarlas a los distintos sueros obtenidos, se pudo observar que la reacción antígeno-anticuerpo que proporcionalmente emitió la señal luminosa más intensa, fue la obtenida tras la interacción serotipo K2- suero anti-K2, en concreto, se generó una señal de 0.4 UDO en una dilución del suero de 8×10^{-4} . Los demás sueros fueron capaces también de producir la misma intensidad de señal, pero encontrándose en una dilución menor: anti-K4 a 1×10^{-4} , anti-K5 a 9×10^{-3} , anti-K6 a 8.5×10^{-3} , anti-K3 a 8.3×10^{-3} y anti-K1 a 7×10^{-3} (**Fig. 2**). Lo que indica la presencia entre 8 y 8.75 veces más anticuerpos frente a K2 que frente a las otras cepas bacterianas.

ELISA de captura de anticuerpos por bacterias de serotipo K3 unidas a la placa.

Al realizar el tapizado con bacterias del serotipo K3 y enfrentarlo a las diluciones de los distintos sueros, se obtuvo que con todos los sueros, a excepción del suero anti-K6, se obtenía una señal de 0.6 UDO. El que se encontraba más diluido era el suero anti-K4 a 4×10^{-4} . El suero anti-K3 se encontraba a una dilución de 1×10^{-4} . Le seguían anti-K2 a 9.5×10^{-3} , anti-K1 a 7.5×10^{-3} , anti-K5 a 6×10^{-3} y, por último, anti-K6,

que emitía una señal de 0.3 UDO a 1×10^{-3} (**Fig. 3**). Estos datos indicaban que el suero anti-K3 tenía como mínimo 15 veces más de anticuerpos capaces de reconocer a K3 que a los otros serotipos. Los datos eran aún mayores frente a K6.

ELISA de captura de anticuerpos por bacterias de serotipo K4 unidas a la placa.

Al realizar un tapizado del serotipo K4 en la placa y enfrentarlo con diluciones de cada uno de los sueros obtenidos, se pudo observar que para el suero anti-K4, en una dilución de 4×10^{-4} , se obtuvo una señal de 0.18 UDO. Para obtener la misma señal con el suero anti-K6 se necesitó que este suero se encontrara en una dilución de 1×10^{-3} , es decir, que estuviera 40 veces menos diluido. Con respecto al suero anti-K2 se obtuvo la misma señal, siempre y cuando la concentración fuera de 7.5×10^{-2} . Los resultados obtenidos para los sueros anti-K5 y anti-K1, indican que la concentración necesaria fue de 1×10^{-3} para emitir una señal no superior a 0.12 UDO. Por último, el suero anti-K3 generó una señal de 0.24 UDO en una dilución 9 veces menor en comparación con el suero anti-K4 (**Fig. 4**).

ELISA de captura de anticuerpos por bacterias de serotipo K5 unidas a la placa.

Tras realizar el tapizado con bacterias del serotipo K5 y enfrentarlo a las distintas diluciones de los sueros obtenidos, se obtuvo que los sueros anti-K5 y anti-K2 producían una intensidad de señal de 0.4 UDO diluidos ambos a 4×10^{-4} . El resto de sueros, produjeron esta misma intensidad pero encontrándose sensiblemente menos diluidos: anti-K1 encontrándose en una dilución de 6×10^{-3} , anti-K4 en una dilución de

9.3×10^{-3} , anti-K3 diluido a 6.8×10^{-3} y, por último, el suero anti-K6 en una dilución de 4×10^{-3} (**Fig. 5**).

ELISA de captura de anticuerpos por bacterias de serotipo K6 unidas a la placa.

Al realizar el tapizado con bacterias del serotipo K6 y enfrentarlo a las diluciones de los distintos sueros obtenidos, se consiguieron los siguientes resultados: el suero anti-K4 produjo una intensidad de señal de 0.3 UDO diluido a 6×10^{-4} . Esta misma intensidad fue la producida por anti-K2 y anti-K3 en una dilución de 9×10^{-3} , en ambos casos. El suero anti-K6 también produjo una señal de 0.3 UDO a una dilución de 8.5×10^{-3} . Con respecto a los sueros anti-K1 y anti-K5, fueron los que necesitaron estar menos diluidos para producir esa misma intensidad: 8×10^{-2} y 7×10^{-2} , respectivamente (**Fig. 6**).

ELISA de captura de anticuerpos por bacterias de serotipo K- unido a la placa.

Al colocar la cepa exenta de cápsula, K-, en la base de la placa y exponerla a las diluciones de los distintos sueros, se halló una respuesta muy similar entre todos los sueros. Por un lado, los sueros anti-K3 y anti-K2 al encontrarse diluidos a 9×10^{-2} , produjeron como resultado una señal de 0.12 UDO. Los sueros anti-K6 y anti-K1 indujeron esa misma señal aunque a una dilución de 7×10^{-2} . Por último, los sueros anti-K5 y anti-K4 generaron una señal de 0.10 UDO también encontrándose en diluciones de 7×10^{-2} (**Fig.7**). Aquí debemos tener en cuenta que todas las señales obtenidas son mucho menores que las obtenidas frente a las bacterias con cápsula, lo que nos indica

que la mayoría de los anticuerpos presentes en los sueros reconocen proteínas de la cápside.

ELISA de captura de anticuerpos de sueros anti-K2 y anti-K5 con distintos tapices.

En relación al experimento de absorción anterior, se intentó maximizar la probabilidad de que se deplecionaran los anticuerpos comunes a los diferentes serotipos con el fin de aumentar la afinidad de los sueros a su serotipo correspondiente. Se realizó en los sueros anti-K2 y anti-K5 para comprobar la efectividad de la prueba.

El proceso se realizó en dos fases: en primer lugar, se absorbieron los sueros anti-K2 y anti-K5 con tapices de los distintos serotipos de *P. gingivalis* (K1, K2, K3, K4, K5, K6 ó K-), y, en una segunda fase, estos sueros absorbidos se enfrentaron a tapices K2 y K5 respectivamente y se midió la intensidad de la señal en un test ELISA.

Para el suero anti-K2, se realizó una primera absorción en la que se colocó el suero anti-K2 en una placa conteniendo un tapiz del serotipo K1 de *P. gingivalis*. Una vez los anticuerpos se unieron a las bacterias, se rescató el anticuerpo no absorbido, es decir, que debería estar deplecionado de anticuerpos capaces de reconocer K1, pero debería mantener los anticuerpos que eran específicos de K2. Este mismo procedimiento se realizó con el resto de serotipos de *P. gingivalis*, de manera independiente: se enfrentó el suero anti-K2 a tapizados de K3, K4, K5, K6 ó K-. De estas absorciones se obtuvieron sueros anti-K2 absorbidos (S2 abs.). Como control, se volvió a analizar el suero sin absorber frente a K2.

A continuación, estos sueros absorbidos se colocaron en placas independientes donde el tapizado era, de nuevo, bacterias del serotipo K2. Se midió la intensidad de la

señal luminosa generada por cada una de las uniones de los sueros absorbidos al tapiz y se representaron gráficamente (**Fig. 8**). Se utilizó la proteína albúmina de suero bovino (BSA) como control negativo (**Fig. 9**).

En la gráfica se puede observar que el suero absorbido con los distintos serotipos, produjo en mayor o menor medida una señal luminosa. Encontrándose todos ellos en una dilución de 1×10^{-3} , se obtuvo que el que mayor intensidad de señal produjo fue el suero anti-K2 absorbido con el serotipo K5 (1.08 UDO), seguido por el absorbido con el serotipo K6 (1.02 UDO). La absorción con los serotipos K3 y K- produjo en ambos casos una intensidad de señal de 0.8 UDO. El suero absorbido con el serotipo K4 generó una señal de 0.70 UDO, y, por último la absorción con los serotipos K2 y K1, produjo una intensidad de señal de 0.65 UDO.

Al enfrentar cada suero anti-K2 absorbido al tapiz correspondiente con el que se había realizado la absorción (**Fig. 10**), se pudo observar que todos ellos generaban una señal luminosa, en mayor o menor medida. En una dilución de 1×10^{-3} , la absorción del suero anti-K2 con K5 y enfrentado a un tapiz de este mismo serotipo, generó una señal luminosa de 0.74 UDO. Para esa misma dilución, el suero anti-K2 sin absorber en un tapiz K2 generó una señal de 0.65 UDO, y los sueros absorbidos con K3, K6 y K4, produjeron intensidades de 0.52, 0.41 y 0.23 UDO respectivamente. Por último, con las absorciones con K1 y K- se obtuvieron señales de 0.17 y 0.1 UDO, respectivamente.

Este mismo proceso se llevó a cabo para el suero anti-K5, es decir, se absorbió de manera independiente con los distintos serotipos y se enfrentó de nuevo a un tapizado con el serotipo K5 (**Fig. 11**), y posteriormente, a tapizados de los distintos serotipos (**Fig. 12**). Se utilizó de nuevo BSA como control negativo (**Fig. 13**).

Para una concentración del suero anti-K5 absorbido con los distintos serotipos en una dilución de 1×10^{-3} (**Fig. 11**), se obtuvo respuesta luminosa por parte de todas las variantes. Las absorciones con K4 y K6 produjeron la mayor intensidad de señal (1.15 UDO). El suero anti-K5 sin absorber previamente produjo una intensidad de 1.07 UDO, las absorciones con K2 y K- produjeron una señal de 0.90 UDO, el suero absorbido con el serotipo K1 produjo una señal de 0.80 UDO y, por último, la absorción con K3 produjo una intensidad de señal de 0.30 UDO.

Al enfrentar cada suero anti-K5 absorbido al tapiz correspondiente con el que se había realizado la absorción (**Fig. 12**), se pudo observar que el suero anti-K5 produjo la mayor intensidad de señal: en una dilución de 1×10^{-3} se obtuvo una señal de 1.07 UDO. El suero absorbido con el serotipo K2 y enfrentado en un tapiz de este mismo serotipo, produjo una intensidad de señal de 0.51 UDO. Las absorciones con K3, K6, K4 y K1 produjeron intensidades de 0.41, 0.30, 0.22 y 0.17 UDO, respectivamente. Por último, el suero anti-K5 absorbido con el serotipo K- y enfrentado a una placa con tapiz K-, produjo una señal de 0.09 UDO.

4. DISCUSIÓN

En este estudio, los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* fueron aislados, purificados e inoculados en conejos con el fin de obtener sueros con anticuerpos específicos para cada cepa. Al comparar las señales de los ELISAs de los sueros obtenidos con el antígeno frente al que fue obtenido y frente a los antígenos de las otras cepas de *P. gingivalis*, pudo medirse la especificidad de la reacción. Los sueros anti-K1, anti-K2, anti-K4 y anti-K5 obtenidos, demostraron poseer especificidad en relación a su antígeno correspondiente, ya que cuando estos sueros se encuentran diluidos en mayor proporción que el resto, se obtuvo una respuesta similar, o incluso mayor, a la de la obtenida con el resto de cepas. Podría decirse que, cuando en una muestra se encuentran distintos serotipos de *P. gingivalis*, estos sueros podrían reconocer la existencia de antígenos específicos en los casos de los serotipos K1, K2, K4 y K5. Sin embargo, estos sueros también son capaces de reconocer las otras cepas, aunque en menor medida. Es decir, que en una muestra con los distintos serotipos de *P. gingivalis*, los sueros anti-K1, anti-K2, anti-K4 y anti-K5, detectarían la presencia de los serotipos K1, K2, K4 y K5, respectivamente, en mayor medida que los demás, pero el resto también sería detectable. Por tanto, si en una muestra se encontraran los serotipos K1, K2, K4 y K5 en una concentración muy baja y el resto de cepas en proporciones muy altas, podría generarse una señal luminosa similar, o incluso más intensa para los anticuerpos específicos, cuando los que serían más prevalentes serían el resto. Esto implica que los sueros no se puedan utilizar para medir prevalencia de serotipos en mezclas biológicas complejas, ya que por la capacidad de reacción cruzada con otras cepas no permiten distinguir entre la cepa frente a la que fueron generados y otra cepa contaminante que fuese más prevalente.

En cuanto a los sueros anti-K3 y anti-K6, no se puede afirmar que en dichos sueros haya anticuerpos específicos frente a dichas cepas, aunque es evidente que ambos reconocen de manera mucho más eficaz a las cepas de *P. gingivalis* encapsuladas que a la carente de cápside, por lo que probablemente dichos sueros reconozcan antígenos comunes presentes en las distintas cepas de *P. gingivalis*. En los dos casos, otros serotipos son capaces de generar una señal más intensa. En una muestra en la que se encontrara una población de bacterias de distintos serotipos, estos sueros no serían capaces de discriminar la presencia específica de K3 ó K6, respectivamente.

El hecho de que todos los sueros sean capaces de detectar la presencia de otras cepas, en mayor o menor medida, puede ser debida a que la mayor parte de los componentes de las bacterias, sean del tipo capsular que sean, son compartidos. De manera que los serotipos son similares entre ellos, distinguiéndose en una fracción genética tan pequeña que los sueros no pueden reaccionar sólo ante una cepa.

Para intentar aislar de cada suero los anticuerpos específicos del fenotipo frente al que fueron generados, y así aumentar la señal específica, se procedió a realizar absorciones y purificaciones de los sueros anti-K2 y anti-K5 con los distintos serotipos de *P. gingivalis*. Teóricamente, al absorber un suero determinado con el resto de serotipos, el sobrante sería no sólo específico de K2 ó K5, sino que ya no debería reconocer los demás serotipos. Los resultados, en cambio, muestran que a pesar de estas absorciones, se sigue obteniendo reactividad con el resto de serotipos.

Las señales obtenidas en el test ELISA para los tapices K1 y K4, utilizando los sueros anti-K2 y anti-K5 absorbidos, son muy similares a los de los sueros sin absorber. Para los dos sueros, con los tapices K2, K3 y K5, los datos sugieren que la absorción con las bacterias dio lugar a la eliminación, durante la centrifugación, de una fracción de

anticuerpos de baja afinidad. Para el tapiz K6 el comportamiento fue intermedio entre los dos casos anteriores. El control del tapizado K-, demuestra que señales en ELISA superiores a 0.15 UDO para el suero anti-K2 y a 0.20 UDO para el suero anti-K5, son señales específicas de reconocimiento de bacterias con cápsula. El control del tapizado de BSA, demuestra que las señales en ELISA superiores a 0.10 UDO tanto para el suero anti-K2 como para el suero anti-K5 son específicas de reconocimiento de bacterias y no de unión a la BSA utilizada como agente de bloqueo. Estos datos se traducen en que, tras el segundo procedimiento, no se consiguió aumentar la especificidad de los anticuerpos debido a que seguían presentando múltiples reacciones cruzadas.

Los primeros estudios realizados para la detección de los distintos serotipos de *P. gingivalis* mediante ensayos inmunológicos no observaron este tipo de reacciones cruzadas y obtuvieron especificidad en todos los sueros, (van Winkelhoff et al. 1993, Laine et al. 1997) a diferencia del presente estudio. Estos trabajos no realizaron una interpretación mediante tests ELISA, sino que utilizaron la técnica de inmunodifusión doble (Ouchterlony) basada en la interpretación visual de un observador de los resultados en una placa estandarizada. Esta prueba, además de ser de interpretación más subjetiva, no permite cuantificar la intensidad de la respuesta. Estudios han demostrado que la falta de especificidad y la existencia de reacciones cruzadas, son un problema frecuente en las técnicas con inmunoensayos (Hamlet 2010). Por esta razón, los últimos ensayos están siendo encaminados a realizar una identificación genómica mediante *Polymerase Chain Reaction* (PCR) de los distintos serotipos (Morillo et al. 2003, Lau et al. 2004), incluso comparando los resultados con la inmunodifusión doble y obteniendo una respuesta más rápida y fiable (Brunner et al. 2008).

5. CONCLUSIONES

-Los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* son genéticamente similares, lo que hace que los sueros generados frente a las bacterias fijadas no reconozcan de manera suficientemente específica la presencia de una cepa u otra.

-La utilización de sueros a partir de los distintos serotipos capsulares de *P. gingivalis* puede ser una herramienta auxiliar, pero no independiente, para determinar la prevalencia de las distintas cepas.

-Las técnicas de PCR pueden ser de utilidad para la detección de los distintos serotipos capsulares, una vez se hayan obtenido las fracciones del genoma que evidencien las diferencias estructurales de los mismos.

-Son necesarios más estudios que aumenten la eficacia de los métodos de detección de los distintos serotipos de *P. gingivalis* para así poder aplicarlos en estudios de prevalencia y relacionar con grados de enfermedad.

6. REFERENCIAS

Brunner J., Crielaard W., van Winkelhoff A. J. (2008) Analysis of the capsular polysaccharide biosynthesis locus of *Porphyromonas gingivalis* and development of a K1-specific polymerase chain reaction-based serotyping assay. *Journal of Periodontal Research* 43, 698–705.

Carrillo de Albornoz, A., Figuero, E., Herrera, D. & Bascones-Martínez, A. (2010) Gingival changes during pregnancy: II. Influence of hormonal variations on the subgingival biofilm. *Journal of Clinical Periodontology* 37, 230-240.

Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. (1996) *Annals of Periodontology* 1, 926-932.

Curtis, M. A., Slaney, J. M. & Aduse-Opoku, J. (2005) Critical pathways in microbial virulence. *Journal of Clinical Periodontology* 32 (Supl. 6), 28-38.

Dierickx, K., Pauwels, M., Laine, M. L., Van Eldere, J., Cassiman, J. J., van Winkelhoff, A. J., van Steenberghe, D. & Quirynen, M. (2003) Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* serotypes to pocket epithelium. *Journal of Periodontology* 74, 844-848.

Dzink, J. L., Tanner, A. C. R., Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1985) Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *Journal of Clinical Periodontology* 12, 648-659.

Haffajee, A. D. & Socransky, S. S. (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. *Periodontology* 2000 5, 78-111.

Hamlet, S. M. Quantitative analysis of periodontal pathogens by ELISA and real-time polymerase chain reaction. (2010) *Methods of Molecular Biology* 666, 125-140.

Herrera, D., Contreras, A., Gamonal, J., Oteo, A., Jaramillo, A., Silva, N., Sanz, M., Botero, J. E. & León, R. (2008) Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *Journal of Clinical Periodontology* 35, 106-113.

Jawetz, E., Melnick, J. L. & Adelberg E. A. (1984) Cell structure. In: *Review of medical microbiology*. 16th ed. Los Altos, CA: Lange Medical Publications, 6-29.

Laine, M. L., Appelmek, B. J. & van Winkelhoff, A. J. (1996) Novel polysaccharide capsular serotypes in *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research* 31, 278-284.

Laine, M. L., Appelmek, B. J. & van Winkelhoff, A. J. (1997) Prevalence and distribution of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis patients. *Journal of Dental Research* 76, 1840-1844.

Laine, M. L. & van Winkelhoff, A. J. (1998) Virulence of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse model. *Oral Microbiology and Immunology* 13, 322-325.

Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Morillo, J. M., Martín, C. & Silva, A. (2004) Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Periodontology* 31, 1061-1069.

Mims C. A., Playfair J. H. L., Roitt I. M., Wakelin D. & Williams R. (1993) The organisms. In: *Medical microbiology*. London: Mosby Europe Limited, 3.1-3.30.

Morillo J. M., Lau L., Sanz M., Herrera D., Silva A. (2003) Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research* 38, 518-524.

Neves, A., Silva-Mato, A., Miranda, L. O., Mafra, F. Siqueira & Oliveira F. (2010) Maternal periodontal disease and preterm or extreme preterm birth: an ordinal logistic regression analysis. *Journal of Periodontology* 81, 350-358.

Offenbacher, S. (1996) Periodontal diseases: pathogenesis. *Annals of Periodontology* 1, 821-878.

Offenbacher, S., Boggess, K. A., Murtha, A. P., Jared, H. L., Lieff, S., McKaig, R. G., Mauriello, S. M., Moss, K. L. & Beck, J. D. (2006) Progressive periodontal disease and risk of very preterm delivery. *Obstetrics and Gynecology* 107, 29-36.

Offenbacher, S., Beck, J. D., Moss, K., Mendoza, L., Paquette, D. W., Barrow, D. A., Couper, D. J., Stewart, D. D., Falkner, K. L., Graham, S. P., Grossi, S., Gunsolley, J. C., Madden, T., Maupome, G., Trevisan, M., Van Dyke, T. E. & Genco, R. J. (2009) Results from the Periodontitis and Vascular Events (PAVE) Study: a pilot multicentered, randomized, controlled trial to study effects of periodontal therapy in a secondary prevention model of cardiovascular disease. *Journal of Periodontology* 80, 190-201.

Page, R. C. & Kornman, K. S. (1997) The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology* 2000 14, 9-11.

Pontes Andersen, C. C., Flyvbjerg, A., Buschard, K. & Holmstrup, P. (2007) Relationship Between Periodontitis and Diabetes: Lessons From Rodent Studies. *Journal of Periodontology* 78, 1264-1275.

Roldán, S., Winkel, E. G., Herrera, D., Sanz, M. & Van Winkelhoff, A. J. (2003) The effects of a new mouthrinse containing chlorhexidine, cetylpyridinium chloride and zinc lactate on the microflora of oral halitosis patients: a dual-centre, double-blind placebo-controlled study. *Journal of Clinical Periodontology* 30, 427-434.

Sanz, M., van Winkelhoff, A. J., Herrera, D., Dellelijn-Kippuw, N., Simón, R., Winkel, E. G. (2000) Differences in the composition of the microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *European Journal of Oral Sciences* 108, 383-392.

Slots, J. (1986) Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. *Journal of Clinical Periodontology* 13, 912-917.

Slots, J. & Ting, M. (1999) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontology* 2000 20, 82-121.

Stewart, J. E., Wager, K. A., Friedlander, A. H. & Zadeh, H. H. (2001) The effect of periodontal treatment on glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Periodontology* 28, 306-310.

Sundqvist, G., Figdor, D., Hanstrom, L., Sorlin, S. & Sandstrom, G. (1991) Phagocytosis and virulence of different strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Scandinavian Journal of Dental Research* 99, 117-129.

van Winkelhoff, A. J., van Steenberghe, T. J. M. & de Graaff, J. (1989) The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. *Journal of Clinical Periodontology* 15, 145-155.

van Winkelhoff, A. J., Appelmek, B. J., Kippuw, N. & de Graaff, J. (1993) K-antigens in *Porphyromonas gingivalis* are associated with virulence. *Oral Microbiology and Immunology* 8, 259-265.

van Winkelhoff, A. J., Loos, B. G., van der Reijden, W. A. & van der Velden, U. (2002) *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *Journal of Clinical Periodontology* 29, 1023-1028.

Vernal, R., León, R., Silva, A., van Winkelhoff, A. J., Garcia-Sanz, J. A. & Sanz M. (2009) Differential cytokine expression by human dendritic cells in response to different *Porphyromonas gingivalis* capsular serotypes. *Journal of Clinical Periodontology* 36, 823-829.

7. ANEXO: FIGURAS

Fig.1. ELISA de captura de anticuerpos por bacterias de serotipo K1 (dilución 1/250) unido a placa.

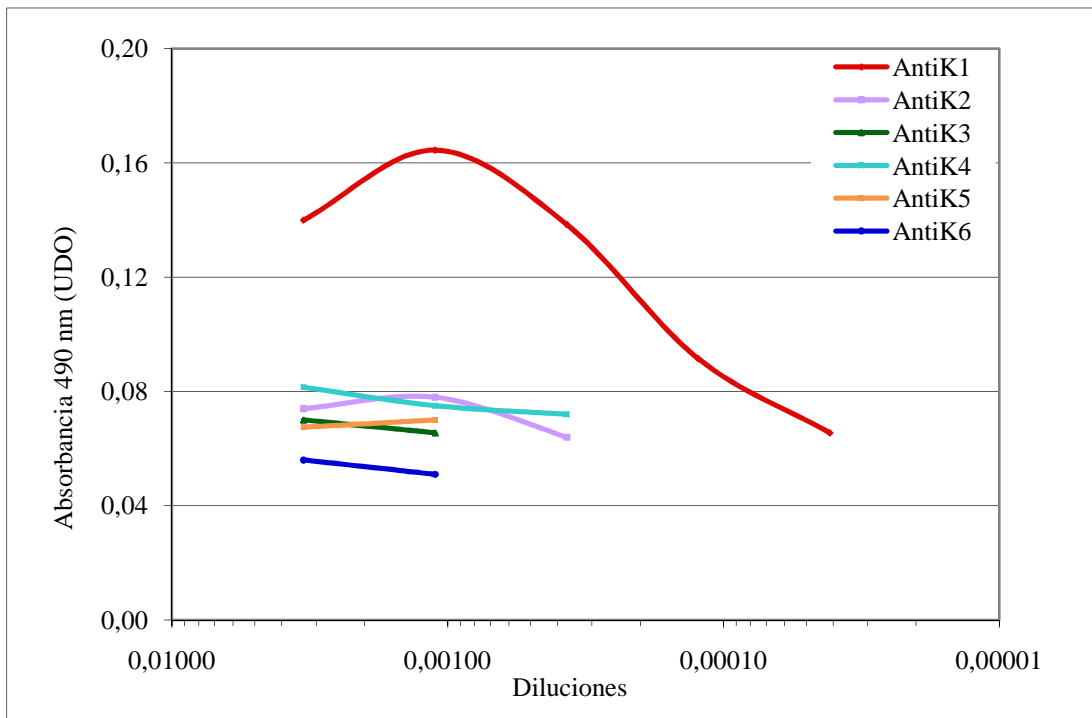


Fig.2. ELISA de captura de anticuerpos por bacterias de serotipo K2 (dilución 1/500) unido a placa.

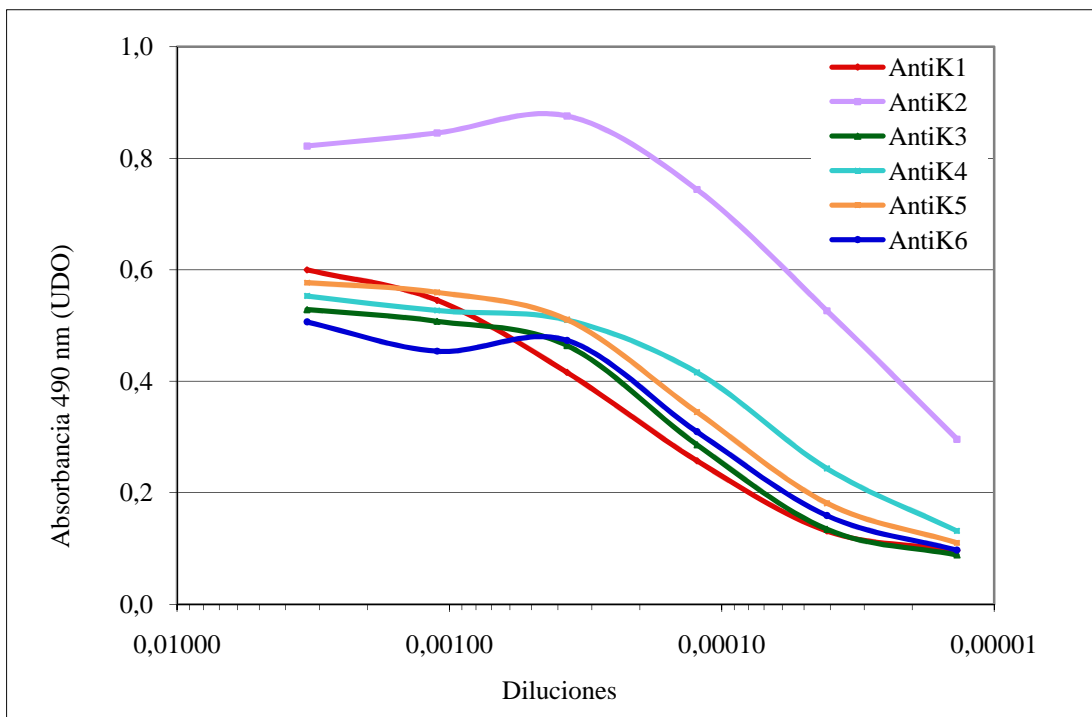


Fig. 3. ELISA de captura de anticuerpos por bacterias de serotipo K3 (dilución 1/500) unido a placa

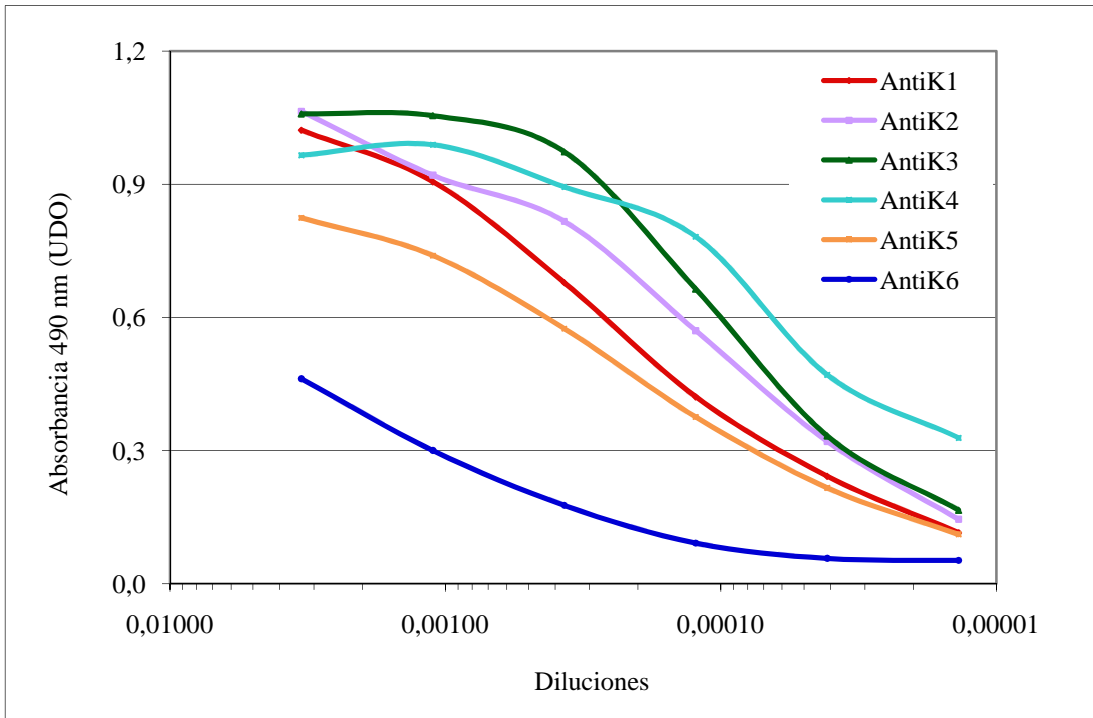


Fig. 4. ELISA de captura de anticuerpos por bacterias de serotipo K4 (dilución 1/250) unido a placa.

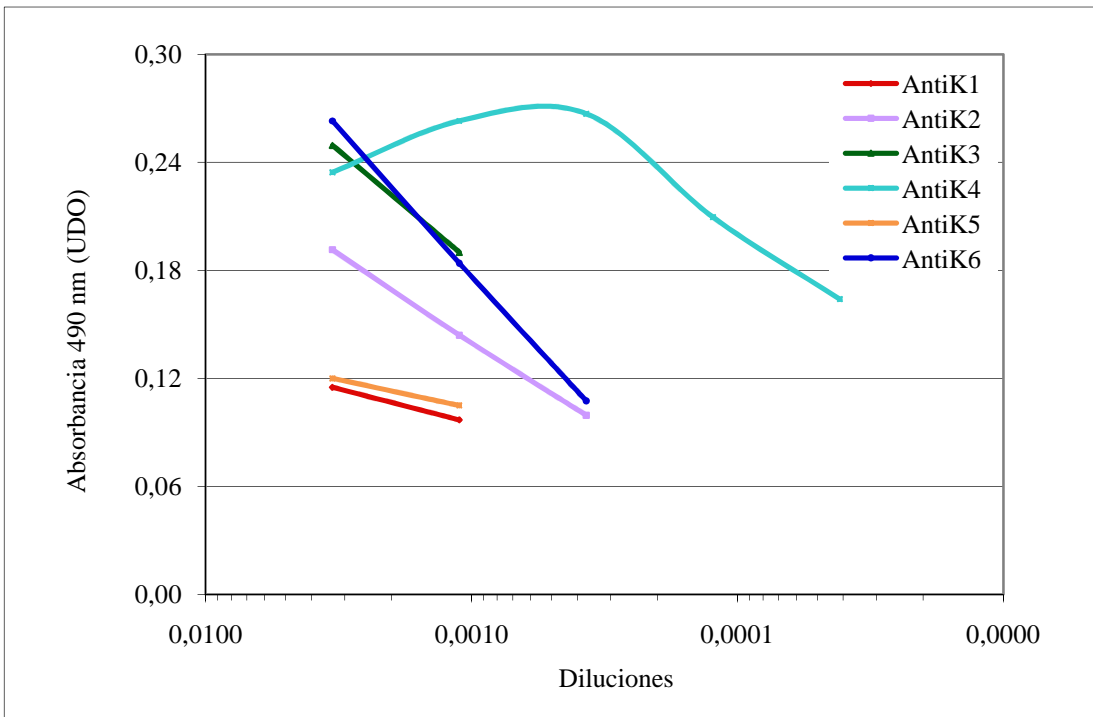


Fig. 5. ELISA de captura de anticuerpos por bacterias de serotipo K5 (dilución 1/500) unido a placa.

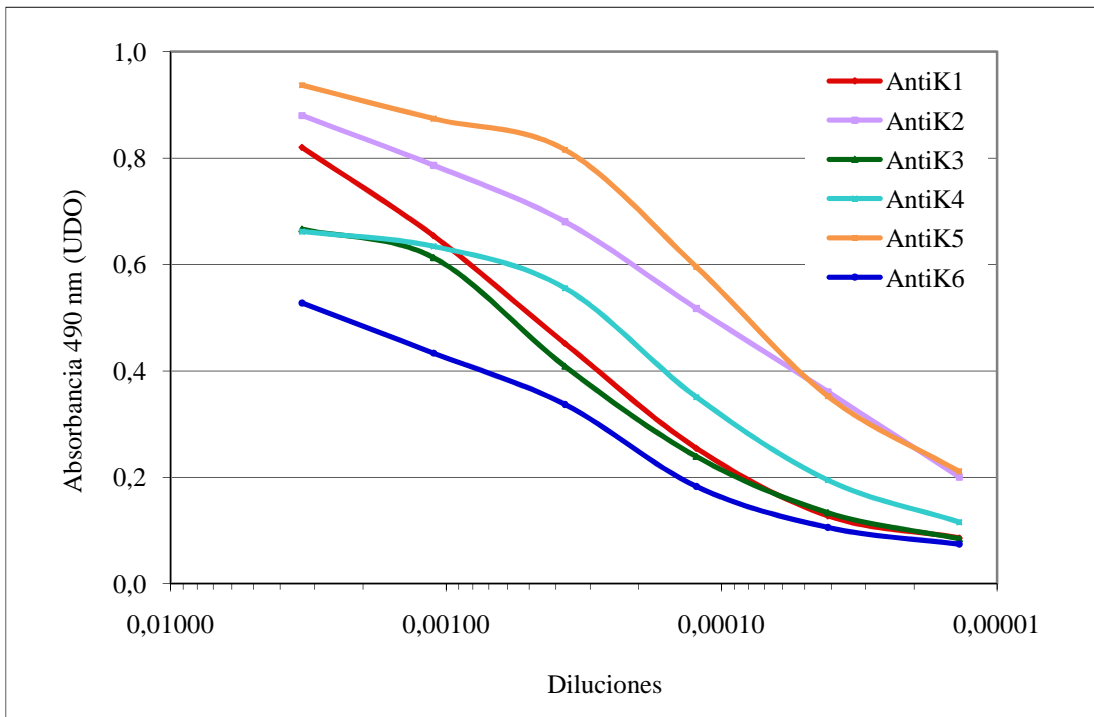


Fig. 6. ELISA de captura de anticuerpos por bacterias de serotipo K6 (dilución 1/500) unido a placa.

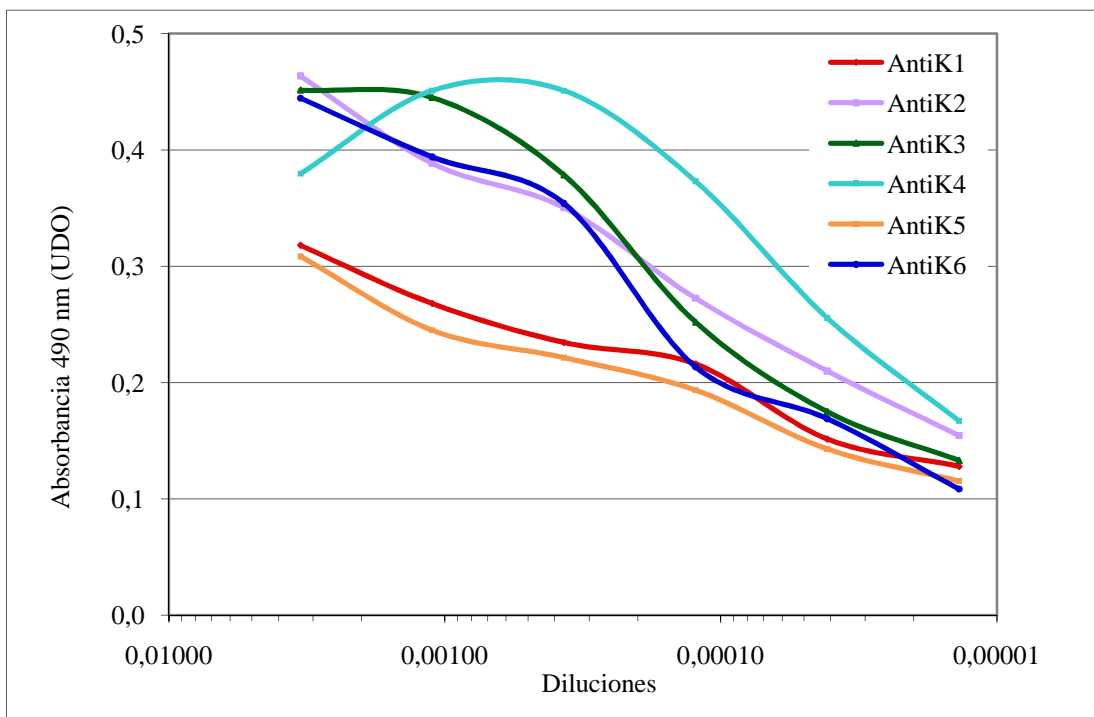


Fig. 7. ELISA de captura de anticuerpos por bacterias de serotipo K- (dilución 1/250) unido a placa.

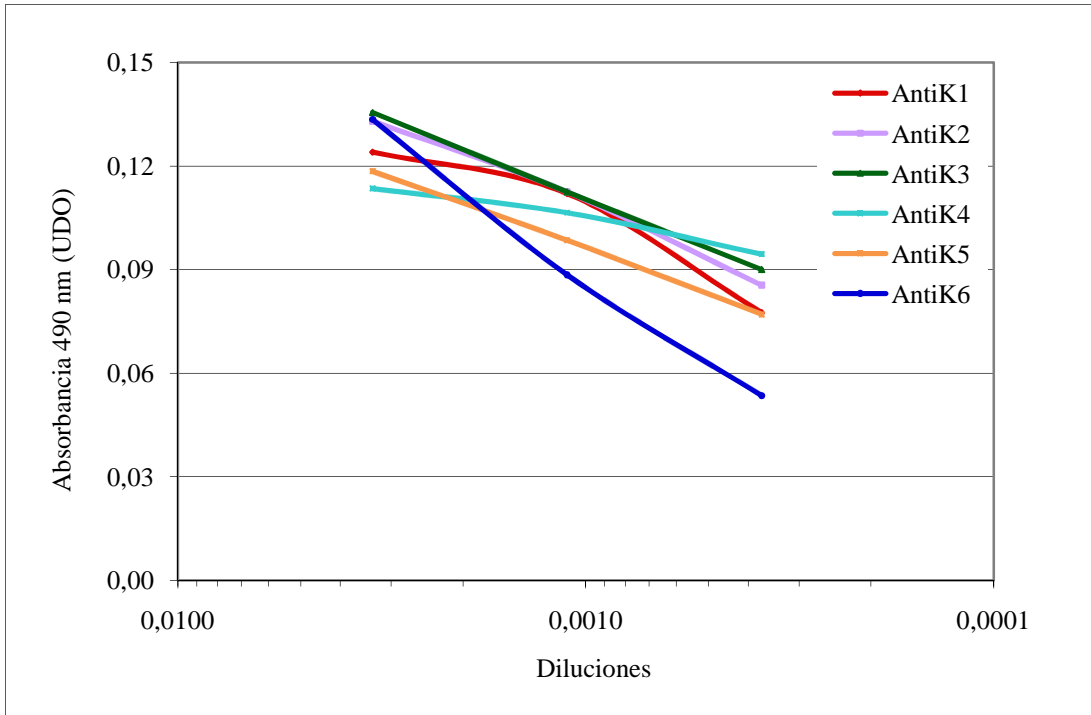


Fig. 8. ELISA de captura de anticuerpos de suero anti-K2 absorbido por bacterias serotipo K2 (dilución 1/500) unido a placa.

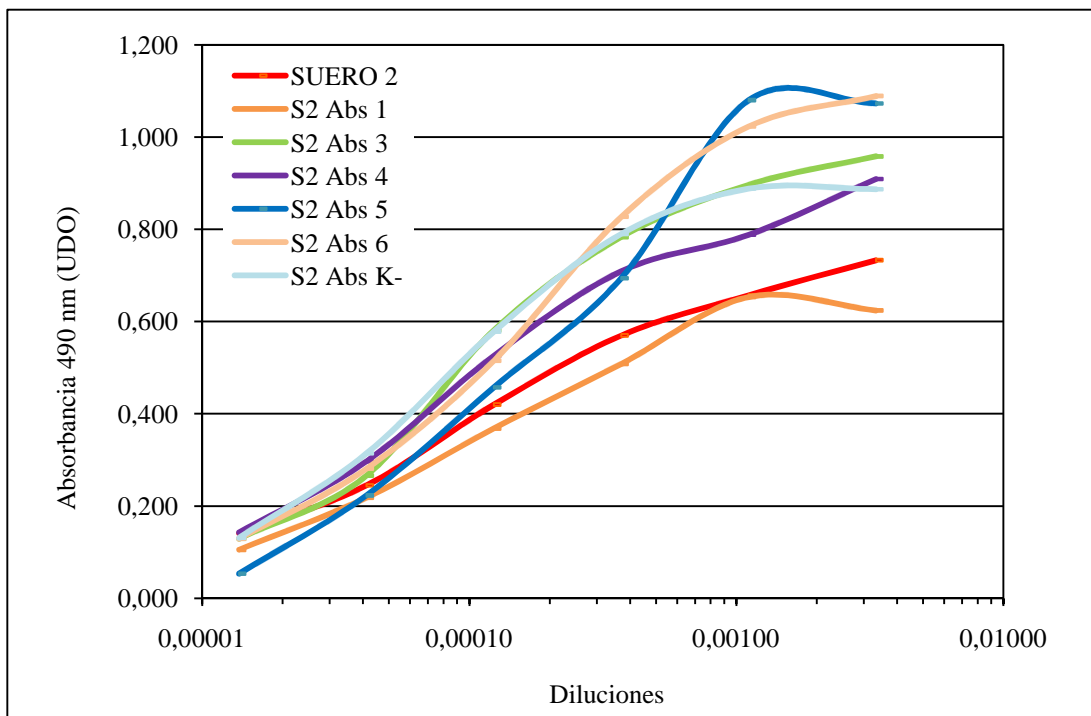


Fig. 9. ELISA de captura de anticuerpos de suero anti-K2 absorbido en BSA (control negativo).

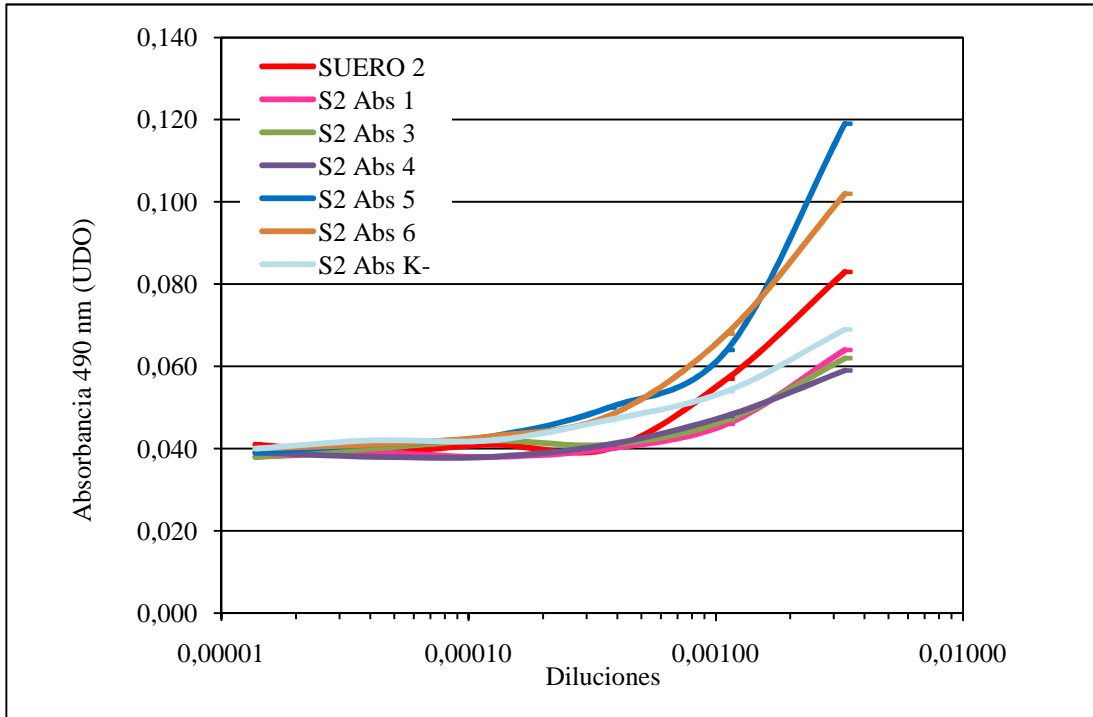


Fig. 10. ELISA de captura de anticuerpos de suero anti-K2 absorbido por bacterias serotipo K1, K2, K3, K4, K5, K6 (dilución 1/500) unido a placa.

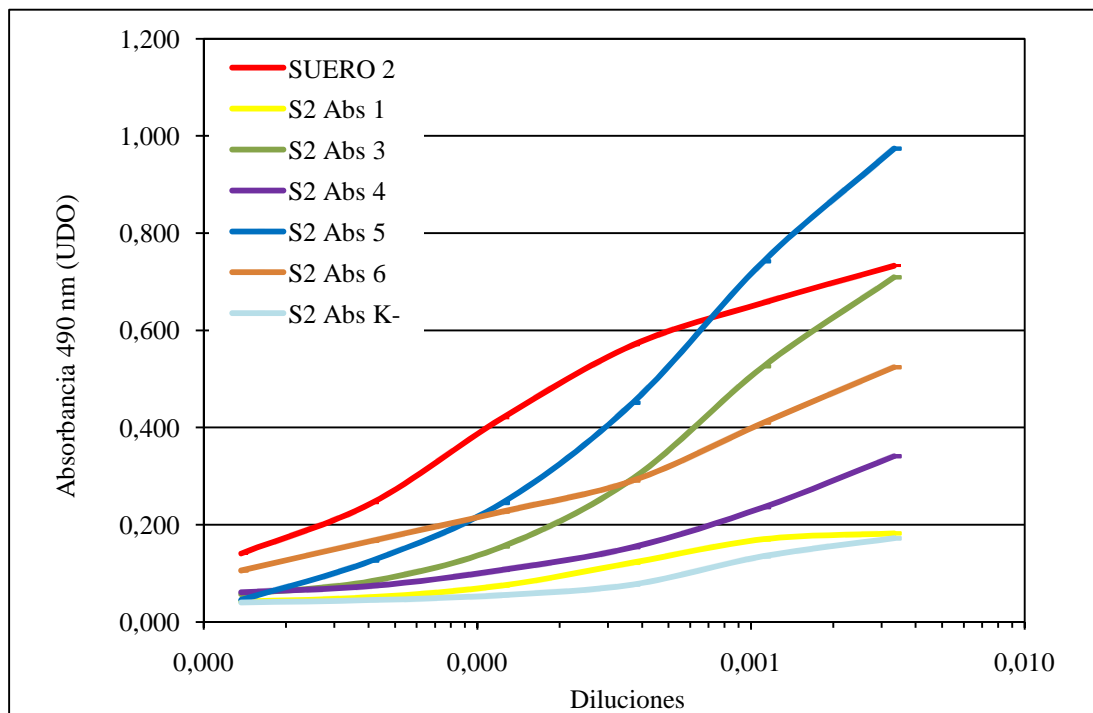


Fig. 11. ELISA de captura de anticuerpos de suero anti-K5 absorbido por bacterias serotipo K5. (dilución 1/500) unido a placa.

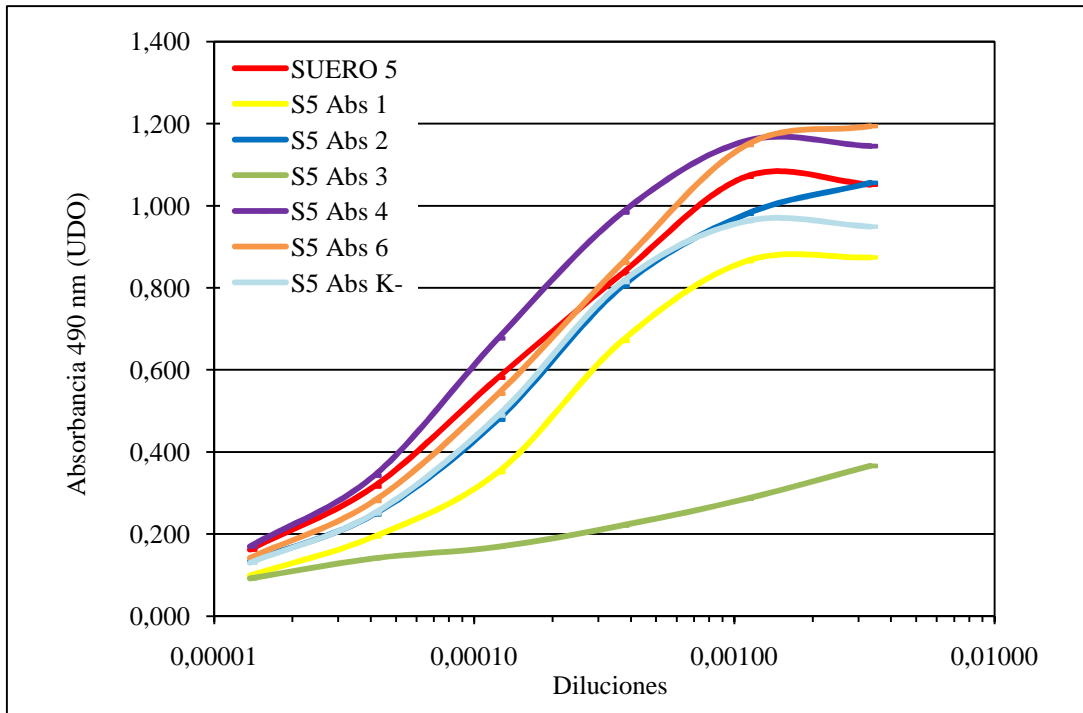


Fig. 12. ELISA de captura de anticuerpos de suero anti-K5 absorbido por bacterias serotipo K1, K2, K3, K4, K5, K6 (dilución 1/500) unido a placa.

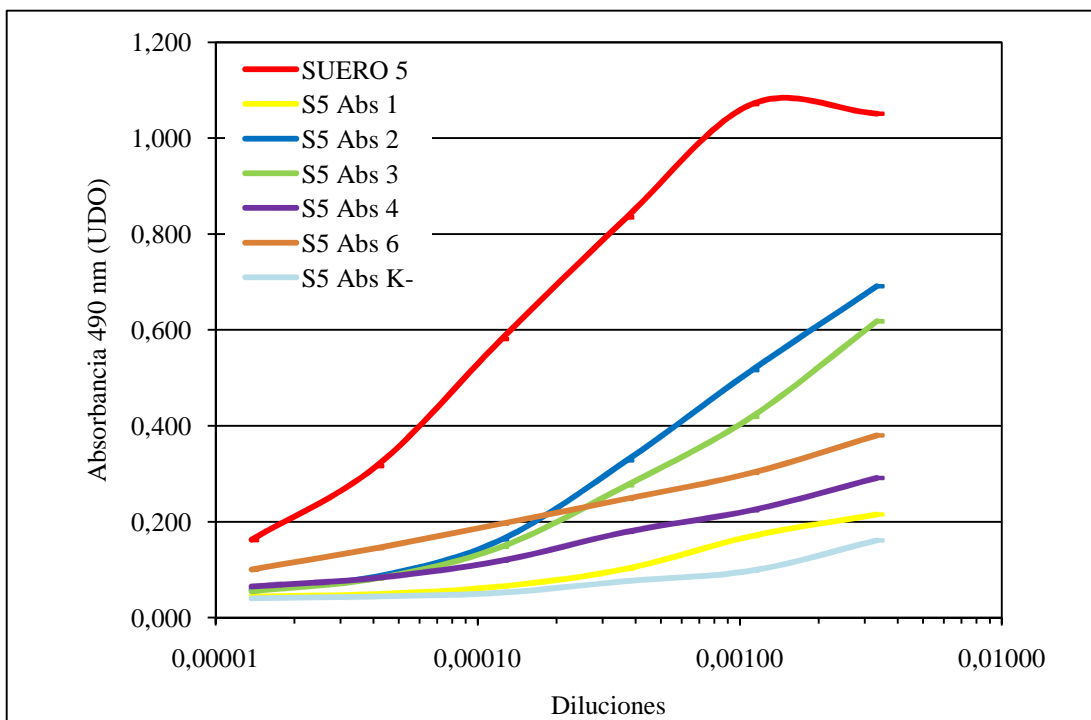


Fig.13. ELISA de captura de anticuerpos de suero anti-K5 absorbido en BSA (control negativo).

