

**Detección de Odontopatógenos en Muestras de Sarro de Perros con Periodontitis Mediante PCR en Tiempo Real.**

Montoya Pavón Karla Patricia.

Matricula:2173066649.



Asesor interno: Doctor Daniel Martínez Gómez

30356

Asesora interna: Doctora Estela Teresita Méndez Olvera



Informe final para liberación de Servicio Social.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia.

El servicio social se desarrolló en un proyecto de investigación.

Lugar: Laboratorio de Microbiología Agropecuaria y Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco.

Fecha inicio: 19 mayo 2023

Fecha de finalización: 22 noviembre 2023

CDMX, enero 2023

## 1. Introducción.

La periodontitis es una enfermedad crónica inflamatoria irreversible que afecta los tejidos de soporte de los dientes, incluyendo encías y ligamento periodontal. La Asociación Mundial de Veterinarios de Pequeños Animales estima que el 80% de los perros que tienen más de dos años presentan al menos un grado leve de periodontitis (WSAVA, 2020). Debido a la dificultad para realizar un diagnóstico, por la evolución distinta en cada individuo, muchos casos no son detectados y tratados de manera adecuada. El conocimiento sobre la patogénesis y dinámica de esta enfermedad es aún desconocido en caninos. Si bien se conoce que la severidad de la enfermedad, principalmente en etapas avanzadas, está determinada parcialmente por la composición y estructura de las comunidades de odontopatógenos presentes, aun no se ha establecido las interacciones entre los agentes etiológicos de esta enfermedad multicausal. En este contexto existen técnicas que podrían aportar información relevante que ayude a resolver algunas cuestiones sobre el papel de cada uno de los géneros involucrados. En la actualidad es comúnmente aceptado que la diversidad bacteriana del microbioma bucal de los perros desempeña un papel fundamental en su salud. Para analizar la estructura y composición de las comunidades bacterianas se utilizan diversos índices, como el índice de Shannon, el índice de Simpson y el índice de Margalef. Estos índices permiten evaluar la diversidad de las comunidades y su aplicación en las áreas medicas ha permitido una mejor comprensión de la salud oral, además de proporcionar información relevante para la investigación microbiológica en este campo (Carmona, V. & Carmona-T, 2013).

En este estudio, se empleará la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), una herramienta precisa y sensible para la cuantificación de microorganismos en muestras biológicas. Con el objetivo de evaluar la diversidad de las comunidades de odontopatógenos en muestras clínicas, se analizarán muestras de sarro recogidas de perros con diferentes grados de periodontitis. Para ello, se diseñarán iniciadores específicos para los géneros bacterianos (*Treponema denticola*, *Tannerella spp*, *Porphyromonas spp*, *Campylobacter rectus*, *Capnocytophaga spp.*) y se realizará su cuantificación mediante la qPCR. La cantidad de copias genómicas de cada odontopatógeno presente en las muestras se determinará mediante la comparación con una curva estándar de referencia. Los valores recuperados se utilizarán para establecer los índices de diversidad (Shannon, Simpson y Margalef). Estos índices nos proporcionarán información sobre la riqueza y abundancia de las especies bacterianas presentes en las muestras de sarro de los perros

con periodontitis. Los resultados obtenidos en este estudio serán relevantes ya que permitirán establecer criterios de diagnóstico y evaluación de la severidad de la periodontitis en perros. Asimismo, estos hallazgos contribuirán a la realización de estudios epidemiológicos para conocer de manera más detallada la prevalencia de los odontopatógenos en caninos, lo que a su vez facilitará el desarrollo de estrategias de prevención y tratamiento más efectivas para esta enfermedad.

## **2. Planteamiento del problema y justificación.**

Distintos estudios epidemiológicos han estimado que alrededor del 80% de perros mayores a los 3 años presentan enfermedad periodontal. De aquí que se considere que la enfermedad periodontal es una alteración frecuente de la cavidad bucal de los perros, sin que a la fecha se conozca cuales odontopatógenos están involucrados con mayor frecuencia.

La periodontitis es una enfermedad oral caracterizada por la inflamación leve de las encías en su etapa inicial, pero a medida que progresa, se vuelve severa y afecta los tejidos de soporte y las piezas dentales. La gravedad de esta enfermedad está influenciada por diversos factores, siendo la edad, uno de los más importantes en perros. Otros de los factores que se mencionan son la presencia de placa bacteriana y sarro dental que favorecen el crecimiento de bacterias patógenas, el tipo de dieta (especialmente una dieta blanda y rica en carbohidratos) y la raza. Algunas razas, como los perros braquicéfalos, tienen una mayor predisposición a la enfermedad periodontal.

Es importante tener en cuenta que la enfermedad periodontal no solo afecta la salud bucal de los perros, sino que también puede tener un impacto en su alimentación, ya que el dolor durante la masticación puede alterar su capacidad para comer adecuadamente.

Considerando todo lo anterior, un análisis de las comunidades de odontopatógenos es necesario para resolver varias cuestiones como, ¿Todos los odontopatógenos antes mencionados están presentes en los casos de periodontitis? ¿Están en la misma proporción? ¿La estructura y composición de la comunidad de odontopatógenos está asociada a la severidad de la enfermedad?, entre otras. En este trabajo se obtuvieron índices de diversidad en muestras de sarro para establecer si la composición de la placa bacteriana puede asociarse a la severidad de la enfermedad. El conocimiento generado podrá ser utilizado para proponer métodos de diagnóstico más eficientes.

## **2.1 Objetivo general.**

Analizar la estructura y composición de la comunidad de odontopatógenos en muestras de sarro de perros con periodontitis utilizando la técnica de PCR en tiempo real.

## **2.2 Objetivo específico.**

1. Establecer un protocolo de extracción de ADN eficiente a partir de muestras de sarro de perros con periodontitis.
2. Cuantificar por medio de qPCR el número de copias de genoma de *Treponema denticola*, *Tannerella spp*, *Porphyromonas spp*, *Campylobacter rectus*, *Capnocytophaga spp.*, presentes en las muestras de sarro.
3. Establecer la diversidad de la comunidad de odontopatógenos.

## **3. Antecedentes.**

La periodontitis es una enfermedad multifactorial cuya severidad está asociada con características específicas del hospedero en particular la composición de la biopelícula. De los factores que interfieren en el desarrollo y progreso de la enfermedad se mencionan entre otros, la presencia de placa bacteriana, la estructura y composición del microbioma bucal y el estado inmunológico del individuo (Campello et al., 2019).

La placa bacteriana también llamada biopelícula, es una comunidad de microorganismos adheridos a superficies, compuesta principalmente por bacterias Gram negativas, que cuando se aloja en dientes y encías induce una respuesta inmunitaria que produce inflamación en el tejido periodontal. Las citoquinas liberadas durante esta respuesta pueden estimular que las células que residen en los tejidos de soporte, los fibroblastos y osteoblastos, produzcan enzimas proteolíticas como metaloproteasas y serina-proteasas que degradan la matriz conectiva y ósea, llevando a la pérdida de inserción dental y la destrucción del tejido periodontal. (De Gregorio, 2021).

En distintas etapas de la enfermedad periodontal se han encontrado odontopatógenos como *Campylobacter rectus*, *Capnocytophaga spp*, *Porphyromonas spp*, *Tannerella spp* y *Treponema denticola*. Estas bacterias tienen la capacidad de formar biopelículas resistentes y están asociadas con la inflamación y el daño tisular en los tejidos periodontales. En contraste, en perros con una salud bucal normal, se encuentran otros géneros bacterianos en la cavidad oral, como *Pasteurella multocida*, *Streptococcus spp*, *Staphylococcus spp*, *enterobacterias (Proteus spp)*, *Corynebacterium*

*spp*, *Eikenella corrodens*, *Clostridium spp*, *Peptostreptococcus spp* y *Propionibacterium spp*. Estas bacterias forman parte del microbiota oral normal en perros sanos y no suelen causar enfermedad periodontal. (Corrales, 2019).

La enfermedad periodontal tiene una evolución silenciosa, ya que la mayoría de los perros afectados no manifiestan molestias visibles e incluso la destrucción tisular no afecta de la misma forma a todas las piezas dentales, lo cual dificulta un diagnóstico temprano. Algunos síntomas pueden variar, sin embargo, destacan la tumefacción asimétrica, movilidad o pérdida dental, recesión gingival, cambios de conducta relacionados con el dolor bucal crónico, halitosis, problemas para cerrar o abrir la boca por completo, disminución de la masticación y pérdida de peso (Cárdenas y Cedeño, 2020).

Es importante destacar que la periodontitis no solo afecta la salud bucal de los perros, sino que también puede tener implicaciones sistémicas. Los odontopatógenos presentes en la cavidad oral pueden acceder al torrente sanguíneo y provocar infecciones en otros órganos, como el corazón, los pulmones y los riñones. Esto resalta la importancia de una buena salud oral en los perros y la necesidad de detectar y tratar la periodontitis de manera temprana (Schenkein *et al.*, 2020).

En ecología de poblaciones, la diversidad se refiere a la variedad y abundancia de cada una de las especies bacterianas presentes en un ambiente. Existen distintas formas de definir la diversidad bacteriana entre ellas se encuentra la diversidad alfa, que se refiere a la variedad de especies en un área específica tomando en cuenta dos aspectos. Por un lado, la cantidad de especies diferentes presentes, también llamada riqueza y por otro lado la proporción de cada especie en relación con el total de especies presentes en la muestra (abundancia relativa). Para evaluar la diversidad bacteriana alfa se pueden utilizar “índices de diversidad”. Estos índices permiten cuantificar y comparar la composición y estructura de las comunidades bacterianas. El índice de Shannon, el índice de Simpson y el índice de Margalef son tres medidas comunes utilizadas para medir la diversidad alfa en una comunidad (Carmona-Galindo & Carmona, 2013). El índice de Shannon se utiliza para medir la diversidad bacteriana considerando tanto la riqueza de especies y la distribución relativa de las diferentes especies presentes en una muestra. Un índice de Shannon más alto indica una mayor equitatividad en la distribución de las especies así que existe un equilibrio en la composición de las comunidades bacterianas. Una comunidad bacteriana con alta equitatividad significa que las especies están presentes en cantidades similares, sin que ninguna especie domine sobre las demás. Por el contrario, una comunidad con baja equitatividad indica que algunas especies

son mucho más abundantes que otras y es probable que exista dominancia por pocas especies presentes. El índice de Simpson, por otro lado, se enfoca más en la dominancia de especies. Mide la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar pertenezcan a la misma especie. Un valor alto de este índice indica una mayor dominancia de una o unas pocas especies, lo que resulta en una menor diversidad. Por último, el índice de Margalef permite medir la riqueza de especies en una comunidad, y se enfoca en el número de especies diferentes presentes en una muestra, en relación con la abundancia total. (Roswell *et al.*, 2021). En resumen, el índice de Shannon evalúa tanto la riqueza como la equitatividad de las especies, el índice de Simpson se centra en la dominancia de especies y el índice de Margalef proporciona una visión general de la riqueza de especies considerando el número total de individuos.

#### **4. Metodología.**

Este trabajo de investigación se realizó en 3 etapas, en la primera etapa se extrajo ADN de odontopatógenos a partir de muestras de sarro de perros con periodontitis siguiendo una metodología estandarizada. La segunda etapa consistió en cuantificar la cantidad de odontopatógenos (*Treponema denticola*, *Tannerella spp*, *Porphyromonas spp*, *Campylobacter rectus*, *Capnocytophaga spp.*) presentes en las muestras de ADN de sarro por medio de qPCR empleando un método de cuantificación absoluta. Por último, en la tercera etapa, con los resultados obtenidos se calcularon los índices de diversidad (Shannon y Simpson) de las comunidades de odontopatógenos. Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología Agropecuaria del Departamento de Producción Agrícola y Animal (LMA-DPAA), de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco.

##### **4.1 Protocolo de extracción de ADN**

Para la obtención de ADN de las muestras de sarro de perros con periodontitis se utilizó el método de tiocianato de guanidina y sílica. La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis (70V, 200mA durante 35min) en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio al 0.5 µg/mL. En cada gel se destinó un carril para el marcador de peso molecular. Las muestras se almacenaron a -15° C hasta su cuantificación.

Las concentraciones de ADN de las muestras se obtuvieron mediante espectrofotometría (SmartSPec 3000) ñ. Se utilizó una longitud de onda de 260nm y 280 nm estableciendo para un valor de 1 de absorbancia ( $A_{260}$ ) una concentración de 45 µg/mL ADN de doble cadena. Se colocó 1 mL de

TE (1mL TRIS, 0.2 mL EDTA) como blanco y para las mediciones 99  $\mu\text{L}$  de TE + 1  $\mu\text{L}$  de muestra previamente homogeneizada. Para su cuantificación las muestras de ADN fueron ajustadas a una concentración de 25 ng /  $\mu\text{L}$ .

#### **4.1.2 Diseño de iniciadores para la amplificación de odontopatógenos.**

Para cuantificar la presencia de odontopatógenos en las muestras de ADN, se implementaron cinco conjuntos de iniciadores específicos para *Treponema denticola*, *Tannerella spp*, *Porphyromonas spp*, *Campylobacter rectus* y *Capnocytophaga spp*. El diseño de estos iniciadores se basó en la alineación de 100 secuencias del gen 16sRNA correspondiente a cada odontopatógeno, recuperadas del banco de genes del NCBI. Las secuencias se alinearon utilizando la herramienta DNAMAN, y se seleccionaron las regiones conservadas para el diseño de iniciadores, los cuales tenían como objetivo amplificar fragmentos de aproximadamente 120 pb. La eficacia de los iniciadores se evaluó mediante la herramienta mencionada, considerando el contenido de G-C, la formación de hetero- y homo-dímeros, la generación de horquillas y la determinación de su temperatura de fusión ( $T_m$ ), con el fin de obtener iniciadores óptimos. Las condiciones de amplificación se ajustaron de acuerdo con la secuencia de cada iniciador.

#### **4.2 Amplificación cuantitativa de odontopatógenos por qPCR.**

Para lograr cuantificar odontopatógenos se realizaron pools con el ADN de las muestras tomando 1 $\mu\text{L}$  de muestras de ADN originales. Para la estandarización en PCR punto final se utilizó el kit comercial TaqMan Fast Advanced Máster Mix, siguiendo las indicaciones del fabricante.

##### **4.2.1 Validación de Cebadores Específicos y Optimización de Condiciones de Amplificación**

Antes de realizar la PCR en tiempo real (qPCR) para cuantificar la presencia de odontopatógenos, se llevó a cabo un proceso de estandarización en PCR de punto final. En esta etapa, se validaron los iniciadores específicos para cada uno de los odontopatógenos de interés: *Treponema denticola*, *Tannerella spp*, *Porphyromonas spp*, *Campylobacter rectus* y *Capnocytophaga spp*. Se procedió a determinar las condiciones óptimas de amplificación mediante la PCR de punto final. Esto incluyó la evaluación de la temperatura de desnaturalización, la temperatura de anillamiento, el número de ciclos requeridos para obtener productos de PCR de longitud deseada, la concentración de cebadores. Además de validar los cebadores y establecer la curva estándar, los datos de PCR de punto final también se emplearon para optimizar las condiciones de qPCR.

#### 4.2.2 qPCR

En los ensayos de cuantificación se empleó una curva estándar elaborada a partir de productos de PCR purificados de geles de agarosa. La prueba se estandarizó utilizando diluciones seriadas. Siendo la concentración de la dilución inicial de 10 µg/mL (tubo 1), se tomaron 2 µL de la dilución inicial (tubo 1) y se añadieron a 18 µL de agua, generando una solución con concentración reducida de 1 µg/mL (tubo 2). El proceso de dilución se repitió en pasos sucesivos hasta llegar al tubo 6, obteniendo una serie de soluciones con concentraciones decrecientes de 0.1 µg/mL, 0.01µg/mL, 0.001µg/mL respectivamente. Una vez estandarizado el ensayo, se analizaron 23 muestras problema. La cantidad de ADN en cada muestra fue transformada a número de copias genómicas por medio de la fórmula; número de copias genómicas= (ng \* número/mol) / (bp \* ng/g \* g/ mol de las pares de bases)

#### 4.3 Análisis de la diversidad y Construcción de índices.

El cálculo de la diversidad alfa la diversidad alfa evaluó la riqueza y equitatividad de los odontopatógenos dentro de cada muestra de sarro. Los índices de diversidad alfa de Shannon y Simpson se utilizaron para el análisis de la diversidad. Índice de diversidad de Shannon:

El índice de Shannon es una medida que combina tanto la riqueza (número de especies diferentes) como la equitatividad (distribución relativa de las especies) en una comunidad. Se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$H = -1 \sum_{i=1}^S p_i * \ln (p_i)$$

Donde  $p_i$  es la proporción de cantidad de cada odontopatógeno  $i$  en relación con la cantidad total de odontopatógenos en la muestra. Un valor mayor de  $H$  indica una mayor diversidad en la comunidad. En este contexto, el índice de Shannon proporcionará información sobre la diversidad general de la comunidad de odontopatógenos en las muestras de sarro de perros con periodontitis en conjunto se reportará el análisis de riqueza y equitatividad de especies detectadas.

Para el cálculo de equidad de especies se calculará según lo mencionado por Carmona-Galindo (2013).

$$J \approx \frac{H}{\ln(S)}$$



donde “H” es el índice de Shannon y la “S” es la riqueza de especies detectadas. J puede tomar valores entre 0 y 1. Siendo 0 alta dominancia, es decir, pocas especies.

El índice de Simpson se basa en la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar de una comunidad pertenezcan a la misma especie. Se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$D = \frac{1}{\sum_{i=1}^S p_i^2}$$

Donde  $p_i$  es la proporción de abundancia de cada odontopatógeno  $i$  en relación con la abundancia total de odontopatógenos en la muestra. Un valor menor de  $D$  indica una mayor diversidad en la comunidad. El índice de Simpson proporcionará información sobre la dominancia y diversidad de las especies de odontopatógenos en las muestras de sarro de perros con periodontitis.

El índice de Margalef se emplea para medir la riqueza de especies en una comunidad ya que relaciona la diversidad de especies con la abundancia de especies en las muestras. Este índice es una forma de cuantificar la biodiversidad, específicamente la riqueza de especies, en un ecosistema o muestra. El índice de Margalef aumenta con el número de especies, pero se incrementa más lentamente a medida que aumenta el número total de individuos. La fórmula para calcular el índice de Margalef ( $D_{mg}$ ) es:

$$D_{mg} = \frac{S - 1}{\ln(N)}$$

donde:

$S$  es el número total de especies (riqueza de especies),

$N$  es el número total de individuos en la muestra (abundancia),

$\ln$  es el logaritmo natural.

## **5. Resultados.**

### **5.1 Extracción de ADN**

Se obtuvo ADN a partir de muestras de sarro de perros con periodontitis, con el protocolo utilizado se logró una pureza y la integridad del material genético alta, lo cual es fundamental para garantizar la fiabilidad de los análisis moleculares subsiguientes.

## 5.2 Cuantificación de ADN de muestras de sarro.

Los resultados de la cantidad de ADN recuperado de las muestras de sarro de perros con periodontitis se presentan en el **Cuadro 1**. La concentración revela variabilidad significativa entre las muestras, oscilando desde 109.31 µg/mL hasta 663.05 µg/mL. En cuanto el nivel de pureza de ADN los valores obtenidos oscilan entre 0.934 y 1.560. Considerando que una relación óptima, alrededor de 1.8, sugiere una pureza adecuada del ADN, mientras que valores más bajos podrían indicar presencia de contaminantes, se podría decir que la calidad del ADN obtenido de las muestras de sarro era apta para los análisis moleculares.

**Cuadro 1.** Concentración de muestras de ADN obtenidas de sarro de perros con periodontitis cuantificadas mediante espectrofotometría  $A_{260}$  y  $A_{280}$ .

No. De muestra	Concentración (µg/mL)	260 nm	280 nm	Relación 260/280
10	132.97	0.033	0.027	1.247
11	120.08	0.030	0.029	1.049
13	276.13	0.690	0.059	1.174
14	127.83	0.032	0.028	1.132
15	505.76	0.126	0.097	1.302
21	465.66	0.012	0.087	1.341
29	663.05	0.166	0.162	1.026
32	510.94	0.128	0.093	1.367
36	140.88	0.035	0.023	1.560
39	175.43	0.044	0.033	1.311
40	371.29	0.093	0.069	1.339
42	151.16	0.038	0.030	1.244
44	121.57	0.030	0.024	1.269
45	203.91	0.051	0.048	1.072
47	109.31	0.027	0.023	1.192
48	347.64	0.087	0.082	1.057
49	612.03	0.153	0.108	1.141
50	202.92	0.051	0.054	0.934
51	137.53	0.034	0.029	1.195
52	141.92	0.035	0.032	1.104
53	166.08	0.042	0.036	1.162
56	334.67	0.084	0.077	1.090
57	142.22	0.036	0.030	1.205

## 5.3 Diseño de iniciadores para la amplificación de odontopatógenos.

En esta investigación, se llevó a cabo el diseño de iniciadores para la amplificación específica de fragmentos de ADN asociados con odontopatógenos de interés clínico. Se seleccionaron secuencias altamente conservadas en los genes 16S rARN de *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*,

*Porphyromonas spp.*, *Capnocytophaga spp.* y *Campylobacter Rectus*. A continuación, en el **cuadro 2.**, se presentan los resultados obtenidos para los iniciadores diseñados.

**Cuadro 2.** Detalles de Iniciadores para Amplificación de Odontopatógenos

Nombre	Secuencia	Odontopatógeno	Tamaño de producto amplificado (pb)
16sTrep104-R	TCTTCATTCACACGGCGTC	<i>Treponema denticola.</i>	104
16sTrep104-F	GAC ACA TTG GGA CTG AGA TAC G		
16sTan126-R	TTC ACG CGA CTT GGC TG	<i>Tannerella forsythia.</i>	126
16sTan126-F	ATG GTT AGG GGT TCT GAG AGG		
16sPor112-R	TAT CCC CCT CTG TAA GGC AAG	<i>Porphyromonas spp.</i>	112
16sPor112-F	ATA GGC TTA ACA CAT GCA AGT CG		
16SCap122-R	TAC AAC CCA TAA GGC ATT CTT C	<i>Capnocytophaga spp.</i>	122
16SCap122-F	CCC CAC ACT GGT ACT GAG AC		
Crect16S-225-R	CCGGTGCTTATTCCTTGG	<i>Campylobacter rectus.</i>	225
Crect16S-225-F	GGC TAT GAC GCG TAA CTG G		

### 5.3.1 Optimización de Condiciones de Amplificación

La amplificación del ADN de odontopatógenos se llevó a cabo mediante reacciones de PCR punto final, cada una diseñada para detectar secuencias particulares. Para *Treponema denticola*, se utilizó un conjunto de iniciadores (16sTrep104-F y 16sTrep104-R) con condiciones de amplificación que consistieron en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos, alineación a 55 °C durante 45 segundos, y extensión a 72 °C durante 45 segundos, con una extensión final a 72 °C durante 2 minutos. Un protocolo similar se implementó para *Tannerella forsythia* y *Porphyromonas spp.*, con sus respectivos conjuntos de iniciadores. Para *Capnocytophaga spp.*, se emplearon iniciadores 16SCap122-F y 16SCap122-R con condiciones de PCR similares. En el caso de *Campylobacter Rectus*, se utilizaron iniciadores Crect16S-225-F y Crect16S-225-R con una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos, 94 °C durante 45 segundos, alineación a 56 °C durante 45 segundos, y extensión a 72 °C durante 45 segundos, con

una extensión final a 72 °C durante 2 minutos con un número total de ciclos de 30. Estas condiciones fueron estandarizadas para garantizar la especificidad y eficiencia de la amplificación, proporcionando así la base para la identificación de odontopatógenos anteriormente mencionados.

### **5.3.2 Generación de Curva Estándar para la determinación de la presencia de odontopatógenos**

Una vez que se obtuvieron los productos de PCR de punto final, se purificaron y se utilizaron para crear curvas estándar las cuales generan una relación cuantitativa entre la cantidad inicial de ADN y la fluorescencia en el sistema de qPCR. Previo a la evaluación de las muestras, se evaluaron curvas estándar a distintas concentraciones de ADN, en las curvas se buscó obtener una  $R^2$  cercana a 0.99. Para analizar los resultados de la PCR en tiempo real. Se utilizó el resultado del número de copias de genoma es decir cantidad de material genético objetivo que se está replicando en la reacción de PCR. A este número de copias de genoma se les calculo el promedio y su desviación estándar.

### **5.4. Cuantificación de odontopatógenos mediante qPCR.**

**El cuadro 3.** proporciona datos detallados sobre la cantidad de odontopatógenos en muestras de perros con periodontitis, incluyendo el número de copias del genoma de cada patógeno por muestra y la cuantificación total de 16S rRNA, que es un marcador de la cantidad total de bacterias. Las columnas "SUMA" y "HRM" representan la suma de las copias de genoma de los cinco odontopatógenos y la cuantificación total de 16S rRNA, respectivamente, mientras que "HRM/SUMA" refleja la proporción entre estas dos medidas.

La proporción "HRM/SUMA" varía ampliamente entre las muestras, desde valores cercanos a 1 hasta más de 100. Un valor superior a 1 indica que la cantidad total de bacterias (cuantificación total de 16S rRNA) es mayor que la suma de las copias de genoma de los odontopatógenos, lo que sugiere que hay una presencia significativa de bacterias no patógenas junto con los odontopatógenos. Los valores extremadamente altos pueden indicar una gran cantidad de bacterias no patógenas o una menor proporción de odontopatógenos en el microbiota oral.

---

**Cuadro 3.** Número de copias de genoma de odontopatógenos por cada muestra.

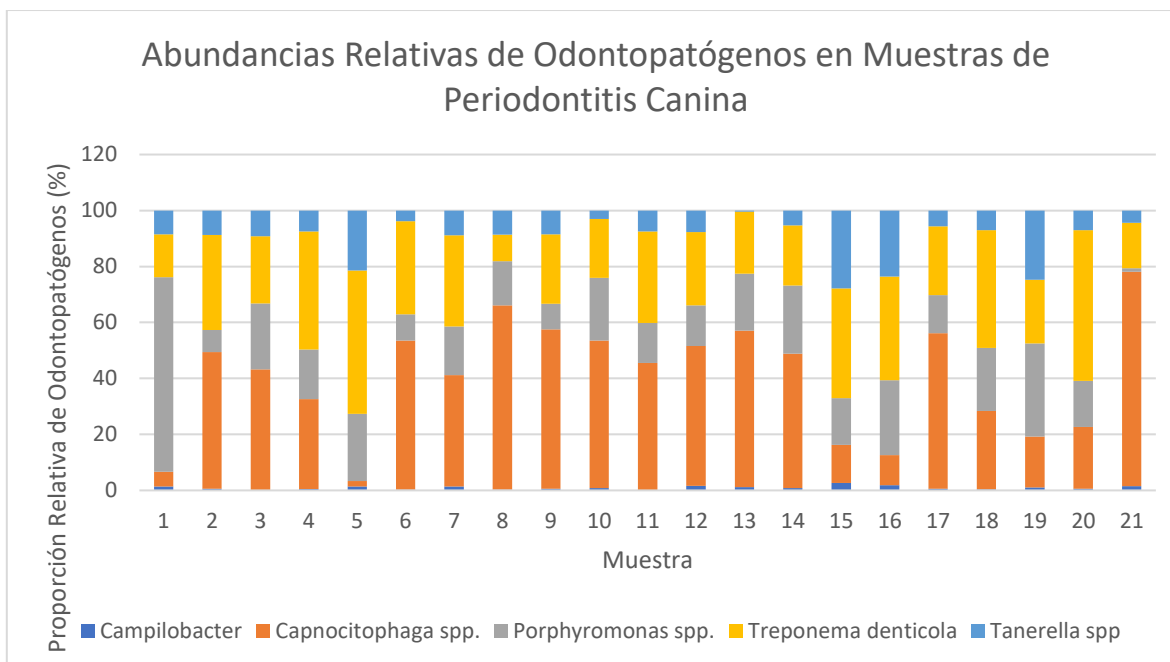
No.	CR	Cap	Por	Trep	Tan	SUMA	HRM	HRM/SUMA
10	1.70E+05	6.77E+06	5.07E+06	1.65E+07	2.14E+06	3.06E+07	5.23E+07	1.71E+00
11	2.26E+06	1.14E+07	1.41E+07	3.31E+07	2.35E+07	8.44E+07	8.96E+08	1.06E+01
13	1.16E+06	6.08E+07	9.92E+05	1.29E+07	3.45E+06	7.92E+07	1.16E+08	1.47E+00
14	5.34E+05	9.30E+06	1.70E+07	1.16E+07	1.26E+07	5.11E+07	1.69E+08	3.30E+00
15	1.34E+05	7.65E+05	1.91E+06	2.64E+06	1.68E+06	7.13E+06	5.49E+07	7.69E+00
21	1.20E+05	1.74E+05	2.10E+06	4.48E+06	1.88E+06	8.76E+06	1.32E+09	1.50E+02
29	1.88E+05	6.78E+05	9.11E+06	2.01E+06	1.11E+06	1.31E+07	9.03E+09	6.90E+02
32	6.52E+04	5.49E+06	4.38E+06	8.23E+06	1.38E+06	1.95E+07	7.01E+07	3.59E+00
36	6.78E+05	1.83E+08	4.40E+07	2.62E+07	2.41E+07	2.78E+08	6.30E+09	2.26E+01
39	5.01E+05	4.30E+07	1.06E+07	1.90E+07	4.41E+06	7.75E+07	5.43E+08	7.01E+00
40	1.11E+05	1.12E+07	1.80E+06	4.90E+06	1.67E+06	1.97E+07	3.91E+08	1.99E+01
42	3.48E+05	2.00E+07	1.02E+07	8.95E+06	2.20E+06	4.17E+07	4.66E+08	1.12E+01
44	1.07E+05	3.41E+07	1.07E+07	2.46E+07	5.59E+06	7.51E+07	9.47E+08	1.26E+01
45	2.47E+05	6.90E+06	3.01E+06	5.64E+06	1.54E+06	1.73E+07	9.97E+08	5.75E+01
47	9.20E+04	2.16E+07	1.18E+07	1.20E+07	4.61E+06	5.00E+07	1.37E+10	2.73E+02
48	1.42E+04	3.69E+06	6.50E+05	2.30E+06	2.66E+05	6.91E+06	3.99E+08	5.76E+01
49	1.50E+06	9.13E+07	3.88E+07	3.66E+07	5.18E+06	1.73E+08	2.68E+09	1.54E+01
50	2.68E+05	8.03E+06	2.35E+06	4.21E+06	1.23E+06	1.61E+07	1.94E+08	1.20E+01
51	9.29E+04	7.08E+06	1.13E+06	4.93E+06	1.27E+06	1.45E+07	7.07E+09	4.87E+02
56	3.31E+04	2.00E+06	1.10E+06	2.63E+06	4.66E+05	6.24E+06	1.08E+09	1.73E+02
57	2.71E+05	1.27E+07	4.62E+06	5.02E+06	8.70E+04	2.27E+07	2.66E+08	1.17E+01

Trep: *Treponema denticola*, Tan: *Tannerella spp*, Por: *Porphyromonas spp*, CR: *Campylobacter rectus*, Cap: *Capnocytophaga spp*, HRM: cuantificación total de 16S, SUMA: es la suma del no. De copias de genoma de los 5 odontopatógenos mencionados con anterioridad.

### 5.5 Abundancias relativas.

En la **Figura 1.**, se muestra el análisis de la periodontitis canina, los datos muestran variabilidad en la abundancia relativa de los odontopatógenos estudiados, lo que sugiere una complejidad significativa en el microbiota oral patógena de los perros afectados. *Porphyromonas spp.* destaca como el género más prevalente, con un rango de abundancia que va desde 7.8% hasta 69.5%, indicando que en algunos casos puede ser el agente patógeno predominante. *Treponema denticola* muestra una presencia significativa, con una variabilidad que oscila entre el 15.3% y el 53.8%.

*Capnocytophaga spp.* muestra abundancias que varían desde cerca del 1.9% hasta más del 65.9%. *Tannerella* mantiene rangos de alrededor de 0.38% a 27.8%. Por último, *Campilobacter rectus*, aunque menos dominante, mantiene una presencia habitual con rangos de aproximadamente 0.18% a 1.44%.

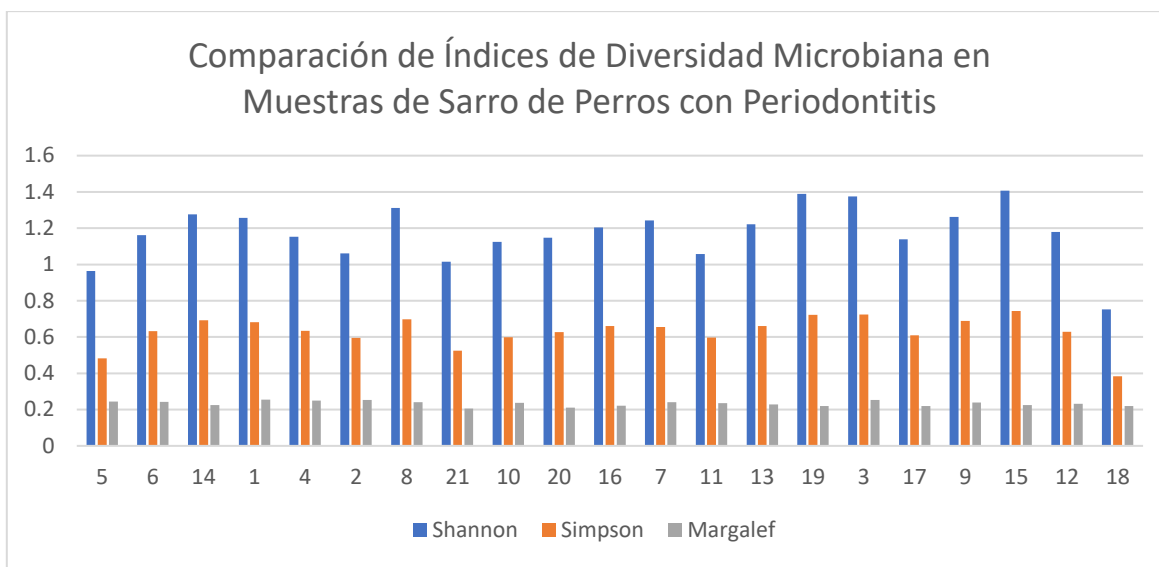


**Figura 1.** Representación de las abundancias relativas de *Campilobacter rectus* (azul oscuro), *Capnocytophaga spp.* (Naranja oscuro), *Porphyromonas spp.* (gris), *Treponema denticola* (naranja claro) y *Tannerella spp.* (azul claro) en muestras de sarro de perros diagnosticados con periodontitis, mostrando la proporción porcentual de cada patógeno en relación con el total de odontopatógenos identificados en cada muestra.

### 5.6 índices de diversidad.

Los datos presentados en la **Figura 2 y el Cuadro 4.** reflejan una evaluación de la biodiversidad de odontopatógenos en muestras de periodontitis canina, usando los índices de Shannon, Simpson y Margalef, junto con el porcentaje de odontopatógenos. El índice de Shannon varía de 0.75 a 1.41, el índice de Simpson de 0.38 a 0.74, y el índice de Margalef de 0.20 a 0.25, lo que indica diferentes niveles de diversidad y riqueza de especies entre las muestras. Curiosamente, existe una tendencia que sugiere que a medida que aumenta la diversidad (valores más altos en los índices de Shannon y Simpson), también lo hace el porcentaje de odontopatógenos, alcanzando hasta un 68.1% en algunas muestras. Los índices de Shannon, representados por las barras azules, tienden a ser los

más altos en la mayoría de las muestras, reflejando tanto la riqueza como la equidad de las especies presentes. Las barras naranjas corresponden al índice de Simpson, que da más peso a la abundancia de las especies más comunes, y las barras grises representan el índice de Margalef, basado en la riqueza de especies.



**Figura 2.** Gráfico de barras que compara los índices de diversidad de Shannon, Simpson y Margalef en muestras de sarro de perros diagnosticados con periodontitis. Cada conjunto de barras representa los valores de los tres índices en una muestra específica, ilustrando la variabilidad en la composición de la microbiota oral entre los diferentes casos estudiados.

**Cuadro 4.** Índices de Diversidad y Proporción de Odontopatógenos en Muestras de Periodontitis Canina.

No.	Muestra	Shannon	Simpson	Margalef	% OP	E. d especies
-----	---------	---------	---------	----------	------	---------------

1	56	1.257	0.682	0.256	0.577	0.781
2	48	1.062	0.595	0.254	1.735	0.660
3	15	1.376	0.724	0.253	12.996	0.855
4	21	1.152	0.634	0.250	0.665	0.716
5	29	0.964	0.483	0.244	0.145	0.599
6	51	1.162	0.633	0.243	0.205	0.722
7	50	1.244	0.655	0.241	8.310	0.773
8	45	1.311	0.697	0.240	1.740	0.815
9	32	1.262	0.689	0.238	27.889	0.784
10	40	1.124	0.598	0.238	5.034	0.698
11	57	1.057	0.597	0.236	8.527	0.657
12	10	1.179	0.629	0.232	58.580	0.733
13	42	1.222	0.661	0.228	8.950	0.759
14	47	1.277	0.693	0.226	0.366	0.793
15	14	1.406	0.743	0.225	30.257	0.874
16	44	1.204	0.660	0.221	7.933	0.748
17	39	1.139	0.610	0.220	14.273	0.708
18	13	0.752	0.383	0.220	68.086	0.467
19	11	1.390	0.722	0.219	9.428	0.864
20	49	1.147	0.627	0.211	6.480	0.713
21	36	1.015	0.524	0.206	4.420	0.631

**% OP:** Porcentaje de Odontopatógenos, **E. d especies:** Equidad de especies; El acomodo se realizó de menor a mayor en función al no. De copias de genoma de odontopatógenos (SUMA), siendo el no.1 el menos y 21 el que mayor cantidad posee.

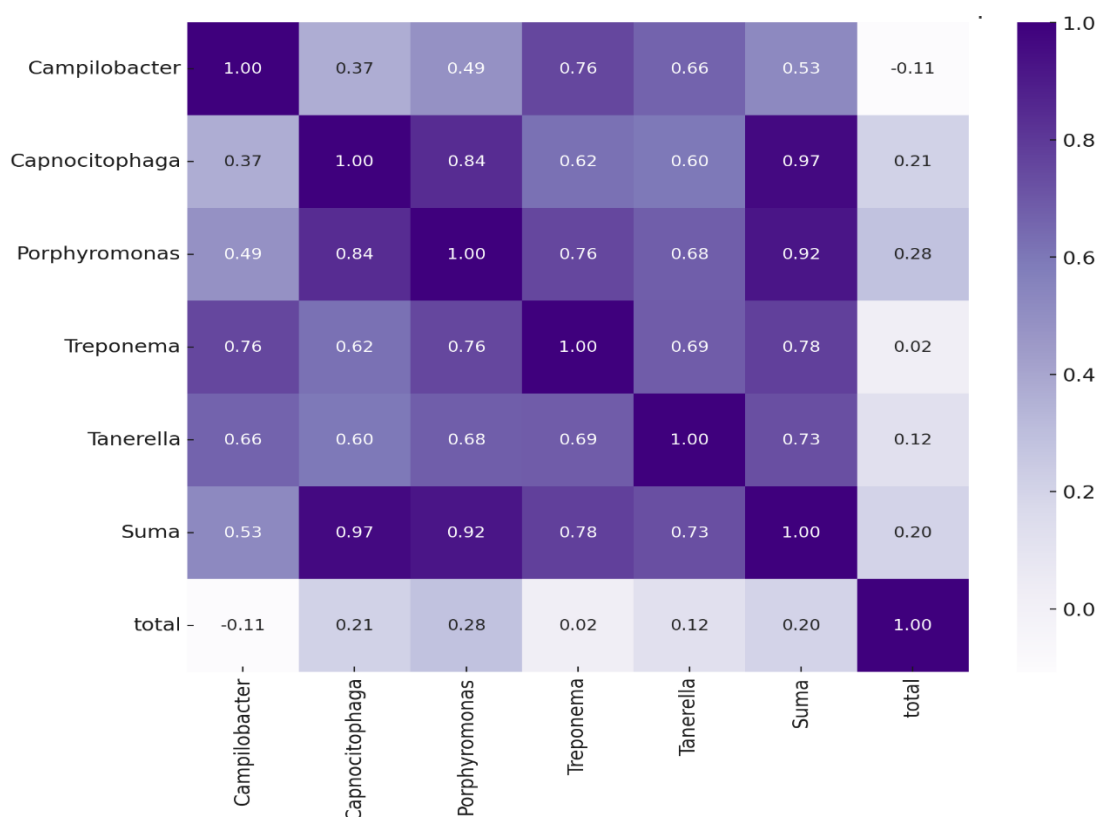
### 5.7 Correlaciones.

Las correlaciones más fuertes y positivas se observan entre los odontopatógenos mismos, especialmente entre *Capnocytophaga sp.* y *Porphyromonas sp.* (0.84), y entre *Porphyromonas sp.* y *Treponema sp.* (0.76).



Mientras que la correlación más alta con la Suma Total de odontopatógenos es con *Capnocytophaga sp.* (0.97), lo que sugiere que las variaciones en la abundancia de *Capnocytophaga sp.* tienen un impacto significativo en la suma total de odontopatógenos.

La falta de correlaciones fuertes entre la cuantificación total de 16S rRNA y la mayoría de los odontopatógenos sugiere que la abundancia de estos patógenos es relativamente independiente de la carga bacteriana total en la muestra. Lo que puede tener implicaciones en cómo se evalúa la presencia de estos patógenos en el contexto de la enfermedad periodontal.



**Figura 3.** Matriz de Correlación de Abundancia de Odontopatógenos y Carga Bacteriana Total en Periodontitis Canina. Cada celda de la matriz representa el coeficiente de correlación entre pares de variables, utilizando una escala de colores de tres clases en tonos de morado, donde los tonos más oscuros indican correlaciones más fuertes. Suma: suma de los odontopatógenos.

## 6. Discusión.

Esta investigación se centró en examinar la estructura y composición de la comunidad de odontopatógenos presentes en el sarro de los dientes de perros afectados por periodontitis, una enfermedad con una prevalencia notablemente elevada y consecuencias significativas para la salud bucal y sistémica de los perros. Mediante la aplicación de la técnica de PCR en tiempo

real, se logró no solo cuantificar la presencia de odontopatógenos claves como *Treponema denticola* y *Porphyromonas spp.*, sino también caracterizar la diversidad microbiana utilizando índices como Shannon, Simpson y Margalef. El objetivo principal era entender cómo estas comunidades microbianas varían y contribuyen a la patología de la periodontitis canina.

Se observó una notable variabilidad en las proporciones relativas de los odontopatógenos. *Porphyromonas spp.* sobresalió como el género más predominante, mostrando una amplitud en su rango de abundancia del 7.8% al 69.5%, indicando así su posible papel como principal agente patógeno en varios casos de periodontitis canina en este estudio. Este hallazgo concuerda con investigaciones anteriores que han identificado a *Porphyromonas spp.* como un patógeno significativo en la enfermedad periodontal, atribuible a su capacidad para inducir comunidades microbianas disbióticas mediante sus factores de virulencia (Xu W *et al.*, 2020; Hajishengalis, 2015). En humanos, se ha observado la presencia de *Porphyromonas spp.* en individuos sanos, aunque con una frecuencia reducida (Hajishengalis, 2015); no obstante, esta proporción tiende a aumentar con la presencia de periodontitis (Santibañez *et al.*, 2021).

Para analizar la estructura y composición de la comunidad de odontopatógenos en el sarro dental de perros, se aplicaron diversos índices biológicos. Los resultados de los índices de Shannon y Simpson revelaron variaciones en la diversidad microbiana entre las muestras, sugiriendo diferentes niveles de severidad en la enfermedad periodontal. Es notable que la muestra 15 exhibió el valor más alto de Shannon (1.406) y la mayor equidad de especies (0.874), indicando una comunidad microbiana diversa y equilibrada. En contraste, la muestra 18 registró el valor más bajo de Shannon (0.752) y la menor equidad de especies (0.467). Esta muestra presenta una comunidad predominantemente compuesta por odontopatógenos (68%) y un valor sustancial en '16S Total' (116,388,168.55), que representa la cantidad total de bacterias cuantificadas a través de los genes ribosomales 16S. Este hallazgo sugiere una posible relación entre una biomasa microbiana elevada y la predominancia de odontopatógenos, lo cual concuerda con la presencia de periodontitis severa. Estos resultados coinciden con las observaciones de Niemiec y colaboradores (2022).

Por otro lado, se observan muestras con una considerable biomasa bacteriana total acompañada de un bajo porcentaje de patógenos, como es el caso de la muestra número 6, que registra un valor total de 16S de aproximadamente 7.07 mil millones y solo un 8% atribuido a odontopatógenos. Esto podría indicar una comunidad microbiana donde las bacterias

comensales o no patógenas predominan, lo cual concuerda con lo reportado por Niemiec *et al.*, 2022, y Tavares *et al.*, 2023, quienes también documentaron situaciones similares en sus investigaciones. Estos hallazgos apoyan la noción de que una biomasa microbiana alta no necesariamente refleja un estado patológico y que la diversidad dentro de la comunidad bacteriana oral puede jugar un papel crucial en la salud oral general.

El análisis de correlaciones en la enfermedad periodontal en perros revela que *Capnocytophaga spp.* muestra una asociación significativa con la presencia de otros patógenos, evidenciada por una fuerte correlación de 0.97 con el total de patógenos. Esta relación robusta sugiere que *Capnocytophaga spp.* puede desempeñar un papel crucial en el ecosistema microbiano de la enfermedad periodontal canina, actuando posiblemente como un marcador de desequilibrio microbiano general o como un potenciador de la patogenicidad de la comunidad bacteriana.

La literatura previa, incluyendo el estudio de Camelo-Castillo *et al.* (2015), proporciona un contexto para estos hallazgos, mostrando que *Capnocytophaga sp.* tiene asociaciones negativas con indicadores clínicos de inflamación como el sangrado al sondaje. Esto podría interpretarse como que niveles elevados de *Capnocytophaga sp.* están vinculados a signos clínicos menores de inflamación, sugiriendo un papel más complejo para este género que va más allá de la asociación con patógenos en el biofilm. Podría haber una posibilidad de que *Capnocytophaga spp.* pueda asumir roles distintos dependiendo del contexto microbiano y del estado inmunológico del huésped, alternando entre un perfil patogénico y uno comensal. La investigación realizada por Niemiec y colaboradores (2021) *Capnocytophaga pp.* estaba entre las 20 especies con las abundancias relativas más altas en grupos más saludables, pero no en los grupos con enfermedad periodontal más severa.

Los resultados de este estudio tienen implicaciones significativas para el diagnóstico y tratamiento de la periodontitis en perros. La identificación de patrones específicos de patógenos puede guiar el desarrollo de tratamientos más dirigidos y personalizados. Además, estos hallazgos subrayan la importancia de considerar la composición completa de la microbiota oral, en lugar de centrarse únicamente en patógenos individuales.

Futuras investigaciones podrían ampliar el estudio del fenómeno explorando la relación entre los patrones microbianos y los factores ambientales o genéticos. Estudios longitudinales podrían

proporcionar una comprensión más profunda de cómo evolucionan estas comunidades microbianas a lo largo del tiempo y su relación con la progresión de la enfermedad.

## **7. Conclusiones**

A partir de los resultados obtenidos, se concluye que:

- La diversidad de odontopatógenos varía ampliamente entre las muestras, lo que apunta a la existencia de varios perfiles de enfermedad dentro de la población de perros con periodontitis.
- Las interacciones entre los odontopatógenos sugieren la posibilidad de sinergias patogénicas que podrían influir en la severidad de la enfermedad.
- La cuantificación de la carga total de bacterias no es un indicador suficiente del estado patológico, enfatizando la necesidad de identificar la presencia de patógenos específicos.

## **8. Recomendaciones**

Con base en estos hallazgos, se recomienda:

- Implementar protocolos de diagnóstico que incorporen la identificación y cuantificación de odontopatógenos claves para una mejor caracterización de la periodontitis canina y para el desarrollo de tratamientos personalizados.
- Realizar estudios longitudinales para entender la progresión de la periodontitis en relación con la dinámica de los odontopatógenos y la microbiota oral total.
- Investigar la eficacia de las intervenciones terapéuticas que no solo se dirijan a la erradicación de los odontopatógenos, sino que también busquen promover una microbiota oral equilibrada y saludable.
- Fomentar la educación de los propietarios de perros sobre la importancia de la higiene oral y los chequeos veterinarios regulares para la prevención de la periodontitis.

## **9. Referencias.**

Campello, P. L., Borsanelli, A. C., Agostinho, S. D., Schweitzer, C. M., Gaetti-Jardim, E., Jr, Döbereiner, J., & Dutra, I. S. (2019). Occurrence of periodontitis and dental wear in dairy goats. *Small Ruminant*

Research: The Journal of the International Goat Association, 175, 133–141.  
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.05.004>

Cardenas Groenow, N. I., & Cedeño Poma, C. L. (2020). Influencia de la alimentación basada en 3 dietas en la salud gingival-periodontal en perros. Universidad de Guayaquil-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Carmona, V. & C.-T. (2013). La diversidad de los análisis de diversidad. Bioma, 14, 20–28.  
[https://www.researchgate.net/publication/260192894\\_La\\_diversidad\\_de\\_los\\_analisis\\_de\\_diversidad](https://www.researchgate.net/publication/260192894_La_diversidad_de_los_analisis_de_diversidad)

Corrales MSc, Lucia Constanza, Antolinez-Romero, Diana Marcela, Bohórquez-Macías, Johanna Azucena, & Corredor-Vargas, Aura Marcela. (2019). Identificación de microbiota bucal en caninos en estado de abandono. Nova, 7(32), 39–64.  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702019000200039#:~:text=La%20microbiota%20natural%20de%20la,de%20salud%20del%20hu%C3%A9sped%204.](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200039#:~:text=La%20microbiota%20natural%20de%20la,de%20salud%20del%20hu%C3%A9sped%204.)

de Gregorio Paolasini, M. (2021). Periodontitis Canina: Higiene bucal, la clave para la prevención [UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO NEGRO].  
<https://rid.unrn.edu.ar/bitstream/20.500.12049/7222/1/De%20Gregorio%2C%20Mariana%20-%20Periodontitis%20Canina.pdf>

Niemiec, B. A., Gawor, J., Tang, S., Prem, A., & Krumbek, J. A. (2022). The bacteriome of the oral cavity in healthy dogs and dogs with periodontal disease. American journal of veterinary research, 83(1), 50–58. <https://doi.org/10.2460/ajvr.21.02.0027>

Özavci, V., Erbas, G., Parin, U., Yüksel, H. T., & Kirkan, Ş. (2019). Molecular detection of feline and canine periodontal pathogens. Veterinary and Animal Science, 8(100069), 100069.  
<https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100069>

Roswell, M., Dushoff, J., & Winfree, R. (2021). A conceptual guide to measuring species diversity. Oikos (Copenhagen, Denmark), 130(3), 321–338. <https://doi.org/10.1111/oik.07202>

Santibáñez, R., Rodríguez-Salas, C., Flores-Yáñez, C., Garrido, D., & Thomson, P. (2021). Assessment of changes in the oral microbiome that occur in dogs with periodontal disease. *Veterinary Sciences*, 8(12), 291. <https://doi.org/10.3390/vetsci8120291>

Schenkein, H. A., Papapanou, P. N., Genco, R., & Sanz, M. (2020). Mechanisms underlying the association between periodontitis and atherosclerotic disease. *Periodontology 2000*, 83(1), 90–106. <https://doi.org/10.1111/prd.12304>

Tavares, M. de O., dos Reis, L. D., Lopes, W. R., Schwarz, L. V., Rocha, R. K. M., Scariot, F. J., Echeverrigaray, S., & Delamare, A. P. L. (2023). Bacterial community associated with gingivitis and periodontitis in dogs. *Research in Veterinary Science*, 162(104962), 104962. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.104962>

WSAVA:Niemiec DAVDC, B. A., Davdc, J. G., Davdc, A. N., Davdc, D. C., Tutt, C., Davdc, M. G., Dacvaa, P. S., Dacvn, M. C., Morgenegg, G., Jouppi, R., & Stewart, K. (s/f). World small animal veterinary association global dental guidelines. *Wsava.org*. Recuperado el 11 de mayo de 2023, de [https://wsava.org/wp-content/uploads/2020/01/Dental-Guidleines-for-endorsement\\_0.pdf](https://wsava.org/wp-content/uploads/2020/01/Dental-Guidleines-for-endorsement_0.pdf)

Xu, W., Zhou, W., Wang, H., & Liang, S. (2020). Roles of *Porphyromonas gingivalis* and its virulence factors in periodontitis. En *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (pp. 45–84). Elsevier.