

Diagnóstico molecular de *Porphyromonas gingivalis*: Estandarización del método

Molecular diagnosis of *Porphyromonas gingivalis*: Standardization of the method

Dra. María Rosenda Britos.*



Docente perteneciente a la Cátedra de Microbiología e Inmunología de Facultad de Odontología de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE).

Bioquímica investigadora del Laboratorio de Investigaciones Científicas de la Facultad de Odontología de la UNNE.

Dra. Cynthia Solange Sin.



Docente de la Cátedra de Microbiología e Inmunología de Facultad de Odontología de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE). Odontóloga Investigadora perteneciente al Instituto de Biotecnología Microbiana para la

Innovación Alimentaria (BiMIA) – (IMIT) Instituto de Modelado e Innovación Tecnológica – CONICET-Argentina.

Dra. Silvia Mercedes Ortega.



Profesora Titular de la Cátedra de Microbiología e Inmunología de Facultad de Odontología de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE). Odontóloga Investigadora perteneciente al Instituto de

Biotecnología Microbiana para la Innovación Alimentaria (BiMIA) – (IMIT) Instituto de Modelado e Innovación Tecnológica – CONICET-Argentina.

Dra. Olga Miriam Vasek.



Profesora Adjunta Facultad de Ciencias Exactas Universidad Nacional del Nordeste. Investigadora perteneciente al Instituto de Biotecnología Microbiana para la Innovación Alimentaria (BiMIA) –

(IMIT) Instituto de Modelado e Innovación Tecnológica – CONICET-Argentina.

Abstract

The objective of the present work was to standardize and optimize the conventional PCR technique for detection of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

Material and methods: *P. gingivalis* strain ATCC33277 was planted on Bruella agar enriched with sheep's blood supplemented with hemin and Vitamin K DNA was extracted using the protocol using cetyl trimethylammonium bromide (CTAB). The quantity and quality of the genetic material obtained with the UV Ampli-Quat photometer, AQ-07 Nucleic Acid. Conventional PCR was performed with different concentrations of 1 mM MgCl₂, 1.5 mM and 2.0 mM and at two alignment temperatures: 60°C and 55°C. PCR products were separated by electrophoresis on a 1% agarose gel.

The bands were visualized in a photodocumentator. Sensitivity was calculated by taking into account the number of bacteria in different dilutions.

Results: A concentration of 1.55x10⁶ ng / ul genomic DNA was obtained from a bacterial suspension of 10⁸ bacterial cells / ml, with purity index 1.648 (OD260 / OD280 ratio). The best results were obtained with a concentration of 2 mM MgCl₂ and an alignment temperature of 55°C. Regarding sensitivity, a limit of detection of 5 x 10⁵ μL bacterial cells in suspension was obtained.

Conclusion: In the standard PCR test for *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 the optimum standardization conditions are the concentration of 2 mM MgCl and 55°C and a minimum bacterial load of 5 x 10 cells / 5 ul as detection limit is required.

Key words: Standardization, PCR, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue estandarizar y optimizar la técnica de PCR convencional para detección de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

Material y métodos: La cepa de *P. gingivalis* ATCC33277 se sembró en agar Bruella enriquecido con sangre de carnero, suplementado con hemina y vitamina K. El ADN se extrajo empleando el protocolo que emplea bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB). Se evaluó la cantidad y calidad del material genético obtenido con el fotómetro UV Ampli-Quat, AQ-07 Nucleic Acid. Se realizó la PCR convencional con diferentes concentraciones de MgCl₂ 1 mM, 1,5 mM y 2.0 mM y a dos temperaturas de alineamiento: 60°C y 55°C. Los productos PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa 1% Las bandas se visualizaron en un fotodocumentador. La sensibilidad se calculó teniendo en cuenta el número de bacterias en diferentes diluciones.

Resultados: Se obtuvo una concentración 1,55x10⁶ ng/ul de DNA genómico a partir de una suspensión bacteriana de 10⁸ células bacterianas/ml, con índice de pureza 1,648 (relación de OD260/OD280). Los mejores resultados se obtuvieron con una concentración de 2 mM de MgCl₂ y una temperatura de alineación de 55°C. En cuanto a la sensibilidad se obtuvo un límite de detección de 5 x 10 / 5 μL células bacterianas en suspensión.

Conclusión: En la prueba de PCR convencional para *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, las condiciones óptimas de estandarización son la concentración de 2 mM de MgCl y 55°C y es necesario una carga bacteriana mínima de 5 x 10 células/5 ul como límite de detección.

Palabras clave: Estandarización, PCR, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

*María Rosenda Britos. Dirección postal: San Martín 435, Corrientes. Código postal: 3400. Tel. fijo: 379 4424230. Tel. móvil: 379 4336215. Correo electrónico: mariarosendab@gmail.com

Introducción

La periodontitis es una enfermedad que se caracteriza por la pérdida de inserción periodontal de las piezas dentarias. La periodontitis se considera una enfermedad infecciosa de origen poli-microbiano y la literatura menciona a más de 300 patógenos posiblemente relacionados con la destrucción periodontal⁽¹⁾. En la variada microbiota subgingival, diferentes especies Gram negativas, anaerobias estrictas y microaerófilas juegan un papel primordial en el inicio y la progresión de la enfermedad periodontal. Diferentes complejos microbianos se asociaron con la secuencia de colonización sobre la superficie de la pieza dentaria y con la gravedad de la enfermedad. El complejo rojo⁽²⁾, que aparece tardíamente en la secuencia del desarrollo del biofilm, comprende especies que se consideran microorganismos patógenos periodontales tales como *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Treponema denticola*, y *Tannerella forsythia*^(1,3,4). Los expertos coinciden en que estas bacterias inician la periodontitis humana y la perpetúan. De hecho, en el Taller Mundial de 1999 sobre Periodoncia Clínica se concluyó que la mayor parte de las periodontitis humanas son causadas por las especies antes mencionadas, a las que se suma *Aggregatibacter* (antes *Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*⁽⁵⁾.

P. gingivalis es un cocobacilo gramnegativo, anaerobio estricto, con factores de virulencia que le proveen un gran potencial para colonizar e invadir tejidos periodontales, modular la respuesta inmune del huésped, desencadenar una respuesta inflamatoria crónica y colaborar con los procesos de destrucción de tejido periodontal y hueso alveolar⁽⁶⁻⁹⁾.

Conocer los mecanismos mediante los cuales *P. gingivalis* evade los ataques del sistema inmune, es de suma importancia para comprender su rol en la periodontitis. La interacción entre las células del huésped y *P. gingivalis* puede ser la clave para mantener la salud o la progresión de la enfermedad. Este microorganismo desempeña un papel crucial en la disbiosis dentro de la comunidad microbiana oral, quizás, al servir como un disruptor de comunicación entre el biofilm poli-microbiano y el sistema inmune del

huésped⁽¹⁰⁾. Se considera que las comunidades microbianas exhiben una virulencia sinérgica que les permite soportar la respuesta inmunológica del huésped y, también, desarrollar mecanismos para valerse del proceso inflamatorio, utilizando los tejidos deteriorados del huésped como nutrientes. Surgen, de este modo, nuevos modelos para entender los mecanismos y la epidemiología de las infecciones poli-microbianas tales como la periodontitis, integrando la interacción microbiana y elementos de la inmunidad innata y adaptativa, que inician y propagan la inflamación periodontal crónica⁽¹¹⁾. Estas características permiten que se considere a *P. gingivalis* como el principal patógeno de la periodontitis y de enfermedades sistémicas como artritis reumatoidea y enfermedades cardiovasculares⁽¹²⁾. Teniendo en cuenta el rol que desempeña este microorganismo en la iniciación y el progreso del proceso inflamatorio periodontal, su identificación se hace necesaria para definir la etiología de la enfermedad e instaurar un tratamiento adecuado. Tradicionalmente, la tipificación se basó en métodos de cultivo a partir de su aislamiento, incluyendo a la microscopía, los criterios fenotípicos y bioquímicos. Sin embargo, estas pruebas son laboriosas y, a veces, proporcionan resultados conflictivos, lo cual puede originarse en la variación existente entre cepas de una misma especie. Las técnicas basadas en el análisis de ADN se utilizan para identificar bacterias en forma directa a partir de muestras clínicas y eludir la necesidad de cultivo *in vitro*⁽¹³⁾.

En microbiología, esta metodología permite la detección de secuencias de ácidos nucleicos (ADN o ARN) que son específicos y conservados para cada microorganismo, a partir de diferentes matrices. Su aplicación surge como una necesidad para detectar microorganismos de difícil crecimiento en cultivo tradicional o lento desarrollo. PCR es una de las técnicas moleculares más utilizadas y se aplica satisfactoriamente en el área de microbiología clínica⁽¹⁴⁾. Los métodos moleculares han sido un gran aporte para la detección de microorganismos de difícil aislamiento; sin embargo la optimización y estandarización de la técnica aumenta la confiabilidad de los resultados.

El aumento de la sensibilidad es directamente proporcional al aumento de la posibilidad de obtener falsos positivos o falsos negativos si no se han optimizado parámetros de estandarización. Desde su publicación, la técnica de PCR se utilizó ampliamente en ciencias médicas de la salud como la Odontología⁽¹⁵⁾. La amplificación de secuencias de ácidos nucleicos mediante PCR para la detección de los distintos microorganismos periodontopatógenos se utilizó para agentes etiológicos de distintos tipos de enfermedad periodontal^(16,17). El objetivo del presente trabajo fue estandarizar y optimizar la técnica de PCR convencional para la detección de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

Materiales y métodos

La cepa de *P. gingivalis* ATCC33227 se sembró en agar Bruella (Britania) enriquecido con sangre de carnero, suplementado con hemina (5 mg/ml) y vitamina K (1 mg/ml) (Sigma), fue incubada a 37°C en jarra de anaerobiosis durante 7 días. Extracción de ADN: Para la extracción de ADN se tomó una alícuota de 100 µl de una suspensión celular de 0,5 en la escala de Mc Farland, y se resuspendió en solución fisiológica (400 µl), luego se homogeneizó en vórtex durante 20 segundos. Se centrifugó (4 min, 12.100 g), se desechó el sobrenadante y se recuperó el pellet celular para la extracción del material genético. El ADN se extrajo empleando el protocolo que emplea bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) de acuerdo con lo sugerido por Stewart et al. (1993)⁽¹⁸⁾ y, posteriormente, se purificó con cloroformo-alcohol isoamílico. El ADN extraído fue almacenado, debidamente rotulado, a -20°C hasta su procesamiento.

Sensibilidad: Para determinar el límite de detección de la técnica se preparó una suspensión bacteriana al 0,5 de Mc Farland, a partir del cultivo, para obtener una concentración de 108 células bacterianas/ml y a partir de esta concentración se prepararon diluciones en agua destilada estéril (Amano et al. 1999)⁽¹⁹⁾. Se obtuvieron las siguientes concentraciones: 5 x 10⁵ / 5 µl, 5 x 10⁴ / 5 µl, 5 x 10³ / 5 µl, 5 x 10² / 5 µl, 5 x 10¹ / 5 µl.

Para evaluar la cantidad y calidad de ADN obtenido se utilizó el fotómetro UV

Ampli-Quat, AQ-07 Nucleic Acid, se midió la absorbancia a 260 nm (A260) y 280 nm (A280) utilizando la fórmula siguiente: $[ADN] = A260 \text{ nm} \times D \times 50 \mu\text{g/ml}$ D= factor de dilución. El grado de pureza se calculó dividiendo la absorbancia a 260 nm entre la absorbancia a 280 nm.

Selección de los iniciadores: Para el diseño y la optimización de la técnica de PCR se utilizaron iniciadores específicos para el gen que codifica una región conservada del ARNr 16S o ADN 16S (*gen-housekeeping*) en *P. gingivalis*. Se utilizaron los cebadores descriptos en el protocolo de PCR de acuerdo con Quintero et al. (2011)⁽¹⁶⁾ cuya banda se visualiza a 197 pares de bases (pb). Las secuencias de cebadores utilizadas fueron Pg-1F 5'-TG TAGATGACTGAAAACC-3' - Pg-2 R 5'-ACGTCATCCCCACCTCCTC-3'.

Los productos PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa 1% en *buffer* TBE1X. Se sembraron 10 μl en cada pocillo más 3 μl de Gel Red 10.000X (Biotium, USA), diluido (3X) en agua destilada-deionizada más 3 μl de *buffer* de carga (60% glicerol, 0,05% azul bromofenol). Como marcador de peso molecular (PM) se utilizaron 5 μl de Cien-Marker (Biodynamics). En una cuba horizontal Sub Cell® GT (Biorad) y usando TBE 1X (Trisma base, ácido bórico, EDTA, pH 8) como *buffer* de corrida; se aplicaron 100 voltios durante 30 min. Las bandas se visualizaron en un fotodocumentador (MaestroGen).

Optimización de la concentración de MgCl_2 y temperatura de alineamiento: Para determinar la concentración de MgCl_2 y la temperatura de alineamiento óptimas, se realizó el procedimiento con diferentes concentraciones de MgCl_2 1 mM, 1,5 mM y 2.0 mM y cada una con dos temperaturas de alineamiento: 60°C y 55°C.

Resultados

Con el método de extracción con CTAB y purificación se obtuvo una concentración $1,55 \times 10^6$ ng/ μl de DNA genómico, y el índice de pureza de 1,648 (relación de OD260/OD280). La prueba de PCR presentó un límite

de detección de $5 \times 10 / 5 \mu\text{L}$ células bacterianas en suspensión. Las concentraciones finales estandarización y optimización fueron para un volumen final de mezcla de reacción de 20 μl : 1X *buffer* de PCR, 2 mM de MgCl_2 , 0,25 mM de cada dNTP (Biodynamics) 1 μM de cada primer y 1,0 U Taq DNA polimerasa (Promega). Programa de termociclado. La secuencia de ciclado (termociclador Bio-Rad) consistió en 1 ciclo de desnaturalización durante 5 min a 94°C, seguido de 40 ciclos a 94°C durante 30 s, unión del cebador a 55°C durante 30 s, extensión a 72°C durante 45 s con extensión final a 72°C durante 10 min e incubación adicional a 4°C.

Discusión

Teniendo en cuenta que la técnica de PCR convencional es una de las más sensibles y ampliamente utilizadas, es importante optimizarla y estandarizarla para mejorar los resultados obtenidos. Su alta sensibilidad puede favorecer resultados falsos positivos o falsos negativos, cuando las condiciones de la prueba no se han optimizado. En el ensayo de estandarización y optimización realizado en el Laboratorio de Investigaciones Científicas de la Universidad Nacional del Nordeste, los mejores amplificados del gen ARNr 16S en *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 fueron obtenidos cuando se trabajó con una concentración de MgCl_2 de 2 mM y una temperatura de alineamiento de 55°C. Los diferentes estudios de amplificación publicados en la literatura refieren el protocolo del PCR utilizado en su metodología, Papone Virginia et al. 2015⁽²⁰⁾, Aline Martucci Geraldine 2010⁽²¹⁾, Michele Ciro Totaro et al. 2013⁽²²⁾, Alessandro Manuel Gandolfo Peña 2015⁽²³⁾, Arce Paniagua Marion et al. 2017⁽²⁴⁾, emplearon una temperatura de alineamiento de 60°C, mientras que, Quintero AJ et al. 2011⁽¹⁶⁾ reportan una temperatura de alineamiento de 55°C.

En el presente trabajo se evidenciaron bandas tanto a 55°C, como a 60°C, obteniéndose mayor nitidez que cuando se trabajó con 55°C. Teniendo en cuenta nuestros resultados y los de los trabajos previos, se puede considerar que el intervalo de 55-60°C es óptimo para la obtención de amplificados del genoma

de *P. gingivalis*. Para nuestras condiciones de trabajo la temperatura óptima de alineamiento fue de 55°C.

Con respecto a la concentración de MgCl_2 , en este trabajo se probaron concentraciones de 1 mM, 1,5 mM y 2 mM para obtener la concentración óptima, identificando las bandas más nítidas con una concentración de 2 mM, Arce Paniagua Marion et al. 2017⁽²⁴⁾, reportaron en su protocolo de trabajo una concentración de MgCl_2 4 mM, Carlos Martín Ardila Medina et al. 2014⁽²⁵⁾ 1,5 mM de MgCl_2 , Aline Martucci Geraldine 2010⁽²¹⁾ 2,5 mM de MgCl_2 y Alessandro Manuel Gandolfo Peña 2015⁽²³⁾ 1 mM de MgCl_2 . El límite de detección de *Porphyromonas gingivalis* para nuestras condiciones de trabajo fue de 50 células bacterianas, similar a lo reportado por Amano et al. en 1999⁽¹⁹⁾.

Conclusiones

En el ensayo de optimización realizado en el Laboratorio de Investigaciones de la Facultad de Odontología de la UNNE, los mejores resultados de amplificación del genoma de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 fueron obtenidos cuando se trabajó con una concentración de MgCl_2 de 2 mM y una temperatura de alineamiento de 55°C, y es necesaria como límite de detección de la técnica una carga bacteriana mínima $5 \times 10 / 5 \mu\text{L}$ células en suspensión. •

Conflicto de intereses: No existen conflictos de intereses.

Agradecimientos: Fuente de financiamiento: Secretaria General de Ciencia y Técnica Universidad Nacional del Nordeste.

Bibliografía

1. Bascones A, Caballero A. *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* como principales patógenos periodontales 2000;12:69-75. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/peri/v12n2/original1.pdf>
2. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25:134-44. DOI/10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x/abstract.

3. Holt S, Ebersole J. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, y *Tannerella forsythia*: el «complejo rojo», un prototipo de consorcio patógeno polibacteriano en la periodontitis. *Periodontology* 2000 2005;12:72-122. DOI: 10.1111/j.1600-0757.2005.00113.x.
4. Kumawat, R. M., Ganvir, S. M., Hazarey, V. K., Qureshi, A., & Purohit, H. J. Detection of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in chronic and aggressive periodontitis patients: A comparative polymerase chain reaction study. *Contemporary Clinical Dentistry* 2016 ; 7: 481.
5. Roy C, Kenneth S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology* 2000 1997; 14: 9-11.
6. Ramos D, Moromi H, Martínez E. *Porphyromonas gingivalis*: Patógeno predominante en la periodontitis crónica. *Odontol. Sanmarquina* 2011; 14: 34-38 Disponible en : http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/odontologia/2011_n1/pdf/a11.pdf
7. Moreno S, Contreras A. Factores de Virulencia de *Porphyromonas gingivalis*. *Rev Fundac Juan Jose Carraro* 2013; 37: 16-27. Disponible en: http://www.fundacioncarraro.org/download/revista37_art2.pdf
8. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuyami Y, Bartova J, Janatova T, Prochazkova J, Duskova J. *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *J Immunol Research* 2014 disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/476068>
9. Pandit N, Changela R, Bali D, Tikoo P, Gugnani S. *Porphyromonas gingivalis* : Its virulence and vaccine. *J Int Clin Dent Res Organ* 2015;7:51.Disponible en : <http://www.jicdro.org/text.asp?2015/7/1/51/153496>
10. Cugini C, Klepac-Ceraj V, Rackaityte E, Riggs J, Davey M. *Porphyromonas gingivalis*: keeping the paths out of the biont. *J Oral Microbiol* 2013; 5 Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3402/jom.v5i0.19804>
11. Hajishengallis G. *Porphyromonas gingivalis*-host interactions: open war or intelligent guerilla tactics? *Microbes Infect* 2009;11:637-45.Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2704251/pdf/nihms103806.pdf>
12. Burmistrz M, Dudek B, Staniec D, Rodriguez Martinez JI, Bochtler M, Potempa J, Pyrc K. Functional analysis of *Porphyromonas gingivalis* W83 CRISPR-Cas systems. *J Bacteriol* 2015;197:2631-41.Disponible en: <http://jb.asm.org/content/early/2015/05/19/JB.00261-15.full.pdf+html>
13. Perea EJ. La flora de la boca en la era de la biología molecular. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2004; 9: 1-10. Disponible en : <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v9Suppli/medoralv9supplip6.pdf>
14. Ferreira Dos Santos C, Sakai V, Machado M, de Andrade Moreira A, Schippers D, Greene A. Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. *J Appl Oral Sci* 2004;12:1-11. Disponible en : <http://www.scielo.br/pdf>
15. Ledder RG, Gilbert P, Huws SA, Aarons L, Ashley MP, Hull PS. Molecular analysis of the subgingival microbiota in health and disease. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 516-23. DOI: 10.1128/AEM.01419-06.
16. Quintero AJ, Prada P, Inostroza CM, Chapparro A, Sanz AF, Ramírez VL, Morales HC. Presencia de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en el biofilm subgingival de pacientes diabéticos tipo 2: estudio transversal. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral* 2011; 4:54-58.disponible en: www.scielo.cl/pdf/piro/v4n2/art03.pdf
17. Mayorga-Fayad I, Lafaurie G, Contreras A, Castillo D, Barón A, Aya M. Microflora subgingival en periodontitis crónica y agresiva en Bogotá, Colombia: un acercamiento epidemiológico. *Biomédica. Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia*, 2007;27:21-33.
18. Stewart CN, Via LE. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques* 1993;14:748-51. Disponible en :<https://es.scribd.com/doc/80909788/A-Rapid-CTAB-DNA-Isolation>
19. Amano, A., Nakagawa, I., Kataoka, K., Morisaki, I., & Hamada, S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* Strains with fimA Genotypes in Periodontitis Patients. *Journal of clinical microbiology* 1999;37(5):1426-1430. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/37/5/1426.full.pdf>
20. Papone Virginia, Verolo Carolina, Zaffaroni Lourdes, Battle Alicia, Capó Claudia, Bueno Luis et al. Detección y prevalencia de patógenos periodontales de una población con periodontitis crónica en Uruguay mediante metodología convencional y metagenómica. *Odontoestomatología*. 2015; 17(25): 23-32. Disponible en:http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&tid=S1688-93392015000100004&lng=es.
21. Gerales, A. M. Ocorrência de *Porphyromonas gingivalis* na microbiota bucal de pacientes submetidos à radioterapia para tratamento de lesões malignas de cabeça e pescoço. 2010. Disponible en: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/149293/000847973.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
22. Totaro, M. C., Cattani, P., Ria, F., Tolusso, B., Gremese, E., Fedele, A. L. & Ferraccioli, G. *Porphyromonas gingivalis* and the pathogenesis of rheumatoid arthritis: analysis of various compartments including the synovial tissue. *Arthritis research & therapy*, 2013; 15(3):R66.
23. Peña, A. M. G. Trabajo de Investigación, requisito para optar al título de Cirujano Dentista.
24. Arce Paniagua, M., Ulloa Carmona, M., Pozo Hernández, P., & Bravo Bown, J. Detección de *Porphyromonas gingivalis* en Pacientes Adultos con Periodontitis Crónica. *International Journal of Odontostomatology*, 2017 11(1):13-18. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/ijodontos/v11n1/art02.pdf>
25. Ardila Medina, C. M., Ariza Garcés, A. A., & Guzmán Zuluaga, I. C. Coexistencia de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola* en el Complejo Rojo Bacteriano en Sujetos con Periodontitis Crónica. *International Journal of Odontostomatology*, 2014 8(3): 359-364.