

## Detección de *Helicobacter pylori* en placa dental, mediante la reacción en cadena de la polimerasa

Roba Izzeddin<sup>1</sup>, Ruben Toro<sup>2</sup>, Rula Izzeddin<sup>2</sup>, Maria Salas<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Prosthodontia y Oclusión. <sup>2</sup> Unidad de Investigaciones Morfopatológicas<sup>2</sup>(UNIMPA).

Facultad de Odontología. Universidad de Carabobo.

rubaizzeddin@gmail.com, rubent39411@hotmail.com

Recibido: 22/06/2009

Aceptado: 20/01/2010

### Resumen.

La placa dental ha sido propuesta como un reservorio importante de *Helicobacter pylori*; en este sentido, el presente estudio tuvo como objetivo detectar la presencia de dicho microorganismo en placa dental en un grupo de pacientes del servicio de Gastroenterología del Hospital Ángel Larralde, así como también, investigar la relación existente entre la infección por este microorganismo y síntomas gástricos, y por último, estandarizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En consecuencia, se realizó una investigación tipo descriptivo de diseño no experimental y de corte transversal; para el cual se seleccionó una muestra de cincuenta y seis (56) individuos que presentaban sintomatología a nivel gástrico compatible con *H. pylori*. A cada paciente se le tomó muestra de placa dental de la región subgingival e interdental y se llevó a un vial de 1.5 ml, posteriormente, se amplificó el gen *ureC* bacteriano mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para identificar el microorganismo. De las 56 muestras examinadas, seis (10,7%) resultaron positivas para *H. pylori*; por lo tanto se puede concluir que hay coincidencia entre los resultados positivos y los pacientes con reflujo gastroesofágico, y además se logró estandarizar la técnica de PCR en la detección de *H. pylori* en la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo.

**Palabras clave:** Reacción en Cadena de Polimerasa, *Helicobacter pylori*, placa dental

### Summary. Detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque, by means chain reaction of the polymerase

The dental plaque has been propose like important reservoir of *Helicobacter pylori*; in this sense, the present study had as objective to detect the presence of this microorganism in dental plaque in a group of patients of the Service of Gastroenterology of the Larralde Angel Hospital, as well as, to investigate the existing relation between the infection by this microorganism and gastric symptoms, and finally, to standardize the technique of chain reaction of polimerasa (PCR). In consequence, an investigation of type descriptive was realized of non experimental design and of it cross section; for which a sample of fifty and six (56) individual, ones were selected which they presented/displayed group of symptoms at gastric level compatible with *Helicobacter pylori*. To each patient a sample from dental plaque of the subgingival region was taken him and interdentally and brought it to eppendorf tube. Of the DNA of the present bacteria in dental plate the gene was amplified *ureC* to identify the microorganism through the PCR

From the 56 examined samples, six (10.7%) were positive for the DNA from *H. pylori*; therefore it is possible to be concluded that there is coincidence between the positive results and the patients with gastroesophageal reflux, and in addition was accomplished to standardize the technique of PCR in the detection of *H. Pylori* in the Dentistry Faculty of the University of Carabobo

**Keywords:** PCR, *Helicobacter pylori*, dental plaque

## Introducción

*El Helicobacter pylori* (Hp), es un bacilo gram negativo, de forma espiral y con gran motilidad conferida por sus flagelos, responsable del 90% de las gastritis crónicas, 85-90% de las úlceras duodenales, 70-75% de las úlceras gástricas; y por estar asociado con la evolución de metaplasia a cáncer gástrico, en 1994 fue clasificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como carcinógeno tipo I. Adicionalmente, se ha asociado de manera concluyente a distintas formas de gastritis, úlcera péptica de estómago y de duodeno, adenocarcinoma gástrico y linfoma gástrico de bajo grado originado en Tejido Linfoide Asociado a la Mucosa(1).

En este sentido, la incidencia mundial promedio de *H. pylori* es del 60%, siendo una de las infecciones humanas más diseminadas a nivel mundial (2); y donde además diversos autores han mencionado el posible contagio por vía oral, ya que la saliva representa una vía potencial de transmisión del microorganismo y por tanto pudiera ser encontrada también, en surco gingival, en mucosa yugal o en placa dental (3).

Así la placa dental constituye un reservorio de reinfecciones postratamiento, por ende diversos autores se han abocado a estudiar la presencia de dicho microorganismo en cavidad bucal. La presencia del *H. pylori* a nivel dental, según Manson y Eley (4), se debe a que inmediatamente después de la limpieza dental, una fina capa de glucoproteínas salivales se deposita sobre la superficie dental, restauraciones y prótesis, adhiriéndose firmemente a dichas superficies y posteriormente es colonizada por bacterias. En pocas horas, algunas especies de *spp*, posteriormente, de

actinomicetes se adhieren a la película, dando inicio así a la etapa de colonización microbiana y a la formación de la placa dental. Posteriormente, otros microorganismos se radican sobre los que ya se encuentran, incrementando el espesor de la placa dental y del número de microorganismos, por multiplicación y por agregación bacteriana.

Paralelamente a la etapa de colonización microbiana surge la formación de la matriz de la placa, que ayuda a mantener estable la comunidad de microorganismos que conforman en sí la estructura de la misma (4,5). En consecuencia, han surgido diversas investigaciones, con el objeto de aislar esta bacteria en restauraciones, prótesis y superficies dentales, utilizando metodologías tradicionales de cultivo o bien por la técnica de la PCR, la cual se basa en la amplificación de una secuencia de ADN de cualquier género o especie en estudio, en este caso *H. pylori* constatando así la presencia del microorganismo. En este sentido, Song cols., (6), investigaron la presencia de *H pylori* en la placa dental supragingival de molares, premolares e incisivos en 20 pacientes. Dichos autores, evidenciaron que todas las muestras fueron positivas para el ADN de *Hpylori* en al menos uno de los lugares de recogida de la muestra, llegando así a la conclusión de que la placa dental realmente actúa como reservorio de esta bacteria, advirtiendo que los ensayos con PCR demostraron ser un método muy sensible y específico y por tanto lo consideran el método de elección para detectar el ADN de *Hpylori* en la cavidad bucal.

También Nguyen cols., (7) afirman que la colonización de *H. pylori* no se limita a la mucosa gástrica, ya que el nicho bucal puede servir como una posible fuente de reinfección de dicha mucosa. Para

Schein y Meryn (8) consideran que aunque se hayan empleado diferentes métodos de diagnóstico para identificar *H. pylori* en placa dental, solo algunos parecen ser realmente capaces de detectar la presencia de esta bacteria en las muestras obtenidas de la cavidad bucal. Para Cheng cols., (9), aún cuando la placa dental presenta una microbiota bastante compleja, podría actuar como uno de los principales reservorios de *H. pylori* y posiblemente desempeña un papel importante en la instauración de la infección periodontal y gástrica.

Adicionalmente, Perrone y Berroteran (10) afirman que la presencia de esta bacteria en la cavidad bucal hace que algunas consideraciones propuestas por los investigadores sean relevantes, entre ellas, la que refiere la presencia de *H. pylori* en la cavidad bucal como una consecuencia del reflujo gástrico, o como miembro de una microbiota transitoria, o bien como un microorganismo permanente de la cavidad bucal. Se han relacionado varios aspectos odontológicos con la presencia del microorganismo en la placa dental, entre los más nombrados figuran el uso de prótesis dental junto con el grado de higiene por parte del paciente, ambos aspectos conllevan a la acumulación de placa bacteriana y por consiguiente la colonización del mencionado microorganismo antes mencionado. No obstante, debido a la gran variabilidad genética del *Hp* demostrada por estudios de genotipificación y secuenciación (11), la mayoría de las investigaciones basadas en PCR se han dirigido hacia la amplificación de determinadas secuencias de genes específicos, en este caso, el *ureC*, que expresa la proteína fosfoglucoamina mutasa (GlmM) (9,13), la cual es esencial y específica en el genoma del *H. pylori* para su crecimiento. Así, dicha enzima ha sido objetivo para la detección específica de esta bacteria con valores acertados de sensibilidad y especificidad (12). De esta manera, los referidos antecedentes marcaron las pautas fundamentales para determinar la presencia de *H. pylori* en placa dental a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

## Materiales y métodos

En el presente estudio se utilizó una muestra de cincuenta y seis (56) pacientes cuyos criterios de inclusión fueron pacientes con síntomas gastrointestinales sugerentes de positividad para *H. pylori* y pacientes sin tratamiento con antibióticos al menos durante tres meses previos a la toma de muestra. A cada paciente se le informó el propósito del estudio para que aceptaran su participación en el mismo mediante un consentimiento escrito de participación sustentado en las normas de bioética que protegen a los seres humanos. La toma de la muestra de la placa dental se realizó con una cureta de Gracey Hyfriedy en la región subgingival e interdental y se llevó a un vial de 1,5 ml que contenía 50 µl de solución salina al 0,9% y se congeló a -20 °C, hasta la posterior extracción del ADN bacteriano.

## Extracción del ADN bacteriano de la placa dental

La extracción del ADN se inició con la centrifugación del vial a 7000 rpm durante 10 minutos, seguidamente se descartó el sobrenadante y el precipitado en el que se encontraban los microorganismos se sometieron a un tratamiento con el kit Wizard Genomic DNA Purification casa Promega. Al vial que contenía el precipitado se agregó 600 µl de solución de lisis nuclear e incubó 5 minutos a 80 °C; se descartó el sobrenadante, se llevó a temperatura ambiente y se agregó 3 µl de ARNasa e incubó durante 40 minutos a 37°C. Seguidamente se añadió 50 µl de solución precipitante de proteínas (proteínasa K, a concentración de 2 µg/µl) y se incubó en hielo durante 5 minutos; posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 3 minutos; se transfirió el sobrenadante a otro vial de 1,5 ml y se centrifugó, el sedimento con el ADN microbiana se recuperó y se le agregó 600 µl de etanol al 70%, se centrifugó, seguidamente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 60 µl de agua libre de nucleasas. La concentración de ADN se determinó a partir de una dilución 1:10 mediante un espectrofotómetro Gene Quant a una longitud de onda de 260nm y 280nm.

## Reacción en Cadena de la Polimerasa para detectar secuencias específicas de *Helicobacter pylori*

La preparación de la mezcla se realizó en una campana de flujo laminar, previa limpieza con etanol al 70% y aplicación de UV durante 15 minutos.

Los cebadores empleados permiten la amplificación un fragmento de 294 pares de bases (pb) del *gen ureC*, cuyas secuencias son:

5'GGATAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGG-3' y 5'-GCTTACTTTCTAACACTAACGCGC-3'.

La mezcla de reacción que se empleó fue kit GoTaq Gren Master Mix de Promega, la cual contiene: taq DNA polimerasa, desoxinucleótidos a una concentración de 400µM, cloruro de magnesio 3 mM de concentración y buffer a pH 8,5.

Como control positivo se empleó la cepa bacteriana de *Hp* 26695.

El ensayo se realizó con un volumen final de 25 µl y se le agregó 12,5 µl de Gotaq Gren master Mix, 0,25 µl de cebadores con una concentración de 0,1 pmol/µl; 11,5 µl de agua libre de nucleasas y 0,5 µl de ADN cuya concentración fue 2,2 ng/µl.

La amplificación se realizó en un termociclador marca MJ Research para alcanzar las condiciones de temperatura (desnaturalización, anillamiento y extensión). La programación del equipo fue la siguiente: La desnaturalización inicial se realizó a 95 °C durante 5 minutos y los 35 ciclos: con desnaturalización a 95 por 1 min., anillamiento a 56 °C durante 1min y extensión a 72 °C por 1min. La extensión final fue 72 °C durante 3 minutos. Cada amplificación incluyó un control negativo libre de ADN y un control positivo.

Obtenido el producto amplificado de PCR, para observar su calidad se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 90 minutos a 70 voltios y se expuso a luz ultravioleta para evidenciar las bandas del producto amplificado teñidas con bromuro de etidio. Finalmente se capturó y documentó la imagen,

para el análisis pertinente, utilizando el transiluminador UVP, modelo M-15, el cual está incorporado al sistema de fotodocumentación Photo Doc-it.

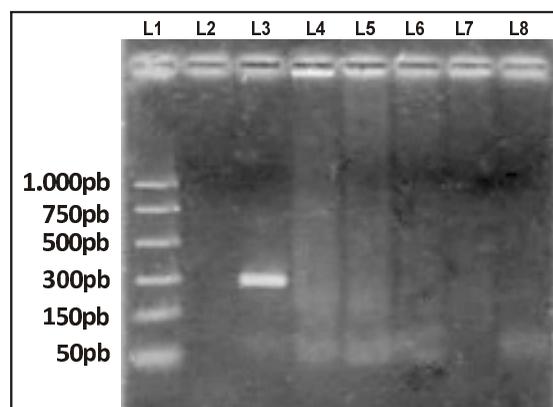
## Resultados

De las cincuenta y seis (56) muestras examinadas, seis (10,7 %) resultaron positivas para el *gen ureC* de *Hp*, tal como se presenta en la tabla I, mostrando el comportamiento migratorio de las bandas producto de amplificación para el *gen ureC* por PCR en electroforesis en gel de agarosa al 2% de dos pacientes que resultaron positivos (fig. 2), a diferencia de la imagen mostrada en la figura 1 que muestra ausencia de la banda esperada producto de la amplificación del *gen ureC* en 5 pacientes negativos *Hp*.

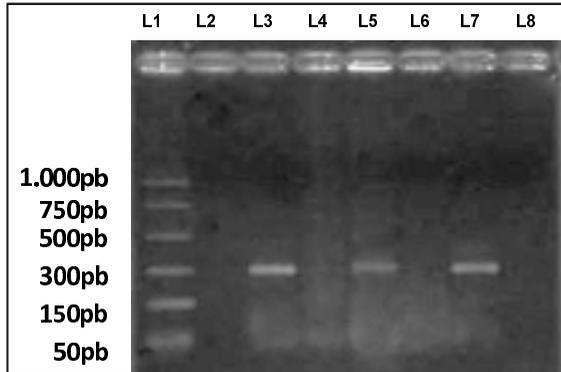
**Tabla 1.** Expresión del *gen ureC* de *Hp* en placa dental

Pacientes	Fm	Porcentual (%)
Positivos	6	10,7
Negativos	50	89,3
Total	56	100

**Figura 1.** Imagen de electroforesis en gel de agarosa al 2% TBE, donde se aprecia el marcador (línea 1), control negativo (línea 2), control positivo (línea 3) y cinco muestras con resultado negativo (línea 4, 5, 6, 7 y 8).



**Figura 2.** Imagen de electroforesis en gel de agarosa al 2% TBE, donde se aprecia el marcador (línea 1), control negativo (línea 2), control positivo (línea 3), dos resultados positivos (línea 5 y 7) y dos resultados negativos (línea 4 y 6)



También se observó que en los pacientes que formaron parte de la muestra, cinco de ellos usan prótesis dental y resultaron positivos a la amplificación del *gen ureC* para *H. pylori* en placa dental (tabla III).

**Tabla 2.** Relación entre pacientes positivos para el *gen ureC* de *Hp* y presencia de reflujo gastroesofágico

Pacientes	Pacientes con Reflujo Gastroesofágico	Pacientes positivo <i>Hp</i>
56	6	6

Los resultados del presente estudio demostraron que todos los pacientes positivos para *H. pylori* también revelaron síntomas de reflujo gastroesofágico según se indica en la Tabla II.

**Tabla 3.** Pacientes portadores de prótesis dental

Pacientes total	Paciente con prótesis fija	Pacientes positivos <i>Hp</i>
56	5	6

## Discusión.

Cabe resaltar que varios de los antecedentes expresan discrepancia entre los resultados, pues existen estudios con una alta prevalencia de positividad y otros que muestran escasos o ningún resultado positivo (14), probablemente pueda influir el método empleado para la toma de la muestra de placa dental. Uno de los que exponen esa condición es el de Perrone cols., quienes en el año 2006 concluyen que de las 69 muestras de placa dental evaluadas, solo una (1,4%), fue positiva para la amplificación del *gen ureC* (15); un mayor número de casos positivos se obtuvo en la presente investigación, pues de las 56 muestras procesadas seis (10,7%) resultaron positivas, hecho que podría dar indicio de la relación entre la infección por *H. pylori* y el desarrollo de enfermedades gastrointestinales (16), inclusive se podría dar sustento a la sugerencia de que la placa dental puede ser un reservorio del microorganismo para la posible vía de reinfección después de la terapia de erradicación del *Hp* (17).

Por otra parte, Scarano y cols., en el año 2005 observaron que la presencia de lesiones en la mucosa gástrica favorece la proliferación de *H. pylori* en el medio y consecuentemente aumenta la colonización de la mucosa gástrica por el patógeno, refiere además que la infección de la mucosa gástrica por *H. pylori* frecuentemente ocurre con presencia simultánea del patógeno en la placa dental (18). En concordancia con lo anterior los pacientes con los resultados positivos al *gen ureC* del *Hp* en placa dental presentaron síntomas de reflujo esofágico, que fue comprobado con un test estadístico aplicado representando el 100% de los casos en los que se amplificó el *gen ureC*. En contraparte, a lo expuesto en otro estudio del mismo año cuya muestra la conformaron 48 paacientes, resultó que 100% de los pacientes presentaron *H. pylori* en placa dental independientemente de la presencia de lesión en la mucosa gástrica. No obstante, los estudios realizados por Song cols., en el año 2000 y por Okuda cols., en el año 2003, corroboran a la cavidad bucal como reservorio de *Helicobacter Pylori* (6, 14).

Otro aspecto interesante que merece comentario es que de los 6 pacientes que resultaron positivos a la amplificación por PCR del *gen ureC* 5 utilizan prótesis dental, lo que guarda correspondencia con la afirmación de Perrone y Berroteran (10) quienes fundamentan que los portadores de prótesis dental presentan niveles altos de infección por dicho microorganismo, pudiendo plantearse que la prótesis dentales contribuye al microambiente redox requerido por microorganismo lo que favorece la colonización del *Helicobacter pylori* en la cavidad bucal.

### Conclusiones.

- Técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es sensible para amplificar el *gen ureC* del *Hp* a partir de muestras de placa dental.

- Todos los pacientes que resultaron positivo al *gen ureC* de *Helicobacter pylori* mostraron reflujo gastroesofágico.

- Se observó que 5 de los 6 pacientes que resultaron positivo para *Hp* fueron portadores de prótesis fija.

### Agradecimiento

Para la materialización del presente trabajo ha sido significativo el aporte del Fondo de Subvención de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo; además, el apoyo incondicional de la Profa. Flor Herrera y del TSU José Rivero, del Centro de Investigaciones Biomédicas (BIOMED-UC); de igual manera cabe resaltar, el cordial agradecimiento a la Dra. Mónica Contreras, del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C).

### Referencias.

1. Leontiadis GI, Sharma VK, Howden CW. Infecção por *Helicobacter pylori* fora do trato gastrointestinal. JAMA Brasil. 2000; 4: 3413-28
2. Kabris S. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by Polymerase: a review. 2004; 9:115-23.
3. Dowsett SA; Archiva L; Segret VA; Gonzalez CR; et al. *Helicobacter Pylori* infection in indigenous families of Centra America: Serastatus and Oral Finger nail Carriage. J. Clin Microbiol. 1999; 37: 2456-2460
4. Manson JD, Eley BM. O meio bucal na saúde e na doença. En: Manual de Periodontia. São Paulo; 1993. p.165.
5. Marsh, PD. Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub-and supragingival environment. Oral Disease. 2003; 9: 16-22.
6. Song Q, Haller B, Ulrich D, Wichelhaus A, Adler G, Bode G. Quantitation of *Helicobacter pylori* in dental plaque samples by competitive Polymerase Chain Reaction. J. Clin Pathol. 2000; 53:218-22.
7. Nguyen AMH, El-Zaatari FAK, Graham DY. *Helicobacter pylori* in the oral cavity. A critical review of the literature. Oral Sug Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1995; 76:705-9.
8. Schein W, Meryn S. *Helicobacter pylori* and the oral cavity-review and perspectives. Wien Klin Wochenschr. 1999; 106:547-9.
9. Cheng LHH, Webberley M, Hanson N, Brown R. *Helicobacter pylori* in dental plaque and gastric mucosa. Oral Sug Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 1996; 81:421-3.
10. Perrone M, Berroteran A. Detección de *Helicobacter pylori* en placa dental y saliva de pacientes con enfermedad de las vías digestivas superiores. Acta Odontol Venezolana. 1999; 36; 51-5.

11. Hirschl AM, Ritcher M, Makrithatis PM, Pruckl B, Willinger K, Schutze K, Rotter M. Single and multiple strain colonization in patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis: detection by macrorestriction DNA analysis. *J Infect. Dis.* 1994; 170: 473-475.
12. Lu JJ, Perng CL, Shyu RY, Chen CH, Lou Q, Chong SK, et al. Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissues. *J Clinical Microbiol.* 1999; 37: 772-4.
13. De Reuse H, Labigne A, Mengin-Lecreux D. The *Helicobacter pylori* ureC gene codes for a phosphoglucosamine mutase. *J Bacteriol.* 1997; 179: 3488-3493.
14. Brooks HJ, Ahmed D, McConnell MA, Barbezat GO. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by polymerase chain reaction: is it worth it?. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; 50: 1-5.
15. Perrone M, González G, Camorlinga M., Correnti M., Cavazza M., Lecuna V, Torres J. Identificación de genotipos de *Helicobacter pylori*, provenientes de muestras de placa dental en la población venezolana. *Acta Odontológica Venezolana.* 2006; 44 (1).
16. Jang-Jih L, Cherng-Lih P, Rong-Yaun S, Chi-Hsiang C, Qinyuan L. Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissues. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(3): 772-774.
17. Okuda K, Kimizuka R, Katakura T, Ishihara K. Ecological and immunopathological implications of oral bacteria in *Helicobacter pylori* infected disease. *J. Periodontol.* 2003; 74: 123-128.
18. Scarano GA, Correia de Medeiros A, Marques MS et al. Detección de *Helicobacter pylori* en placa dental y en mucosa gástrica de pacientes sometidos a endoscopia digestiva. *Acta Odontol Venez.* [serie en internet]. mayo 2005 [citado 04 Agosto 2009];43(2):?aprox. 5 p.?. Disponible en:[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-63652005000200003&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652005000200003&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0001-6365.

