

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
POSGRADO DE PERIODONCIA



DETECCION DE BACTERIAS Y VIRUS EN PACIENTES
CON PERIODONTITIS CRONICA
Y SU RELACION CON LA ENFERMEDAD

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE MAESTRIA
EN CIENCIAS CON ENFASIS EN PERIODONCIA.

PRESENTA:

GISELLA ROJAS GONZALEZ, CD.

MONTERREY, N. L., A 16 DE MAYO DEL 2005

TM

Z 6 6 6

FO

2 0 0 5

. R 6 4



1020150667

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

POSGRADO DE PERIODONCIA



DETECCION DE BACTERIAS Y VIRUS EN PACIENTES
CON PERIODONTITIS CRONICA
Y SU RELACION CON LA ENFERMEDAD

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE MAESTRIA
EN CIENCIAS CON ENFASIS EN PERIODONCIA

PRESENTA:

GISELLA ROJAS GONZALEZ, CD.

MONTERREY, N. L., A 16 DE MAYO DEL 2005

T M
Z 60
F O
r



FONDO
TESIS

*Detección de Bacterias y Virus en pacientes
con periodontitis crónica
y su relación con la enfermedad*

JURADO:

Dr. Manuel de la Rosa
Coordinador del Posgrado de Periodoncia

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Francisco Contreras, Director del Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas y a su equipo de trabajo, por toda la orientación brindada en la realización de este estudio.

A la Dra. Myriam de la Garza, por la ayuda brindada.

A mi familia, por estar siempre conmigo, aún en la distancia.

A mi esposo, Mauricio, por el apoyo que siempre me ha dado en la realización de mis sueños.

A Dios, por la fortaleza que siempre me da.

INDICE

I.	Introducción	5
II.	Antecedentes	7
III.	Planteamiento del Problema	8
IV.	Hipótesis	9
V.	Objetivo General	10
VI.	Objetivos Específicos	10
VII.	Diseño de la Investigación	11
VIII.	Marco Teórico	16
IX.	Materiales y Métodos	25
X.	Resultados	31
XI.	Discusión	36
XII.	Conclusiones	41
XIII.	Limitaciones	42
XIV.	Anexos	43
XV.	Bibliografía	49

INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad que afecta los tejidos que rodean al diente. Esta enfermedad es multifactorial y está relacionada con bacterias periodontopatógenas que inician un proceso inflamatorio que se torna crónico y que culmina con la destrucción de las estructuras de soporte dental, a saber, el hueso alveolar, el ligamento periodontal y el cemento, así como alteraciones en el contorno de la encía. Se caracteriza por la formación de bolsas y/o la recesión gingival. Se asocia principalmente a pacientes de edad adulta. Puede afectar un número variable de dientes y tiene diferentes niveles de progresión. Los agentes etiológicos que intervienen en la propagación de la enfermedad son muchos, así también la reacción que tiene el huésped a dicho proceso inflamatorio. (Carranza, 1998)

El término “enfermedad periodontal”, hace alusión principalmente a la infección producida por la acumulación de bacterias en la vecindad de la encía. Este término, aunque de uso frecuente, parece ignorar que las patologías periodontales pueden tener muchas etiologías. (van Steenberghe, 2000).

Está establecido que las bacterias periodontopatógenas alteran el equilibrio existente en la cavidad oral, o más específicamente, a nivel del surco gingival, e invaden los tejidos de soporte. Se han encontrado muchas de las bacterias periodontopatógenas en la flora normal de muchos pacientes que no desarrollan la enfermedad. Sin embargo, existen estudios que han demostrado la presencia de virus en la etiología de la enfermedad periodontal (Yapar 2003, Kamma 2003, Contreras 1999). La relación de los virus y las bacterias es un campo poco estudiado, a pesar de que algunos estudios recientes ya han logrado establecer algún tipo de interacción. (Kamma, 2003).

Una vez iniciado el deterioro del periodonto se inicia la defensa del organismo por medio del sistema inmunológico con la finalidad de proteger las estructuras afectadas y eliminar el agente causal. Sin embargo, en la actualidad se sabe que la susceptibilidad innata del huésped está regida por defectos en las respuestas inflamatoria, inmunitaria o reparadora (Kiname 2000).

Dado que son pocos los estudios que relacionan la presencia de virus, la presencia de bacterias periodontopatógenas y la presencia de la enfermedad periodontal, esta investigación pretende encontrar esta relación en un grupo de pacientes que presenten periodontitis crónica y compararlo con pacientes que no padezcan de esta enfermedad.

ANTECEDENTES

Enfermedad periodontal

La periodontitis crónica es el tipo de enfermedad periodontal que afecta de forma más frecuente a la población general. Antes de la última clasificación dada por la Academia Americana de Periodontología en 1999, era designada con el nombre de Periodontitis del Adulto o Periodontitis de Avance Lento. (WWP, 1989) A partir de la última designación, el término periodontitis crónica incluye no solo a adultos sino también a la población juvenil que presente las mismas características clínicas. Este tipo de enfermedad periodontal es la más frecuente, e incluye una cantidad importante de enfermedades periodontales destructivas que si responden al tratamiento periodontal y tienen una progresión lenta, aunque algunas formas exhiben períodos cortos de progresión rápida. (WWP, 1999)

Algunos patrones clínicos y características de esta enfermedad incluyen:

- Mayor prevalencia en adultos, pero puede aparecer en niños y adolescentes
- La cantidad de tejido destruido es consistente con la presencia de factores locales
- Se encuentra cálculo subgingival
- Asociada con un patrón microbiológico variable
- Progresión de lenta a moderada, aunque puede tener períodos de progresión rápida
- Puede clasificarse en la base de la extensión y la severidad
- Puede asociarse con factores locales predisponentes
- Puede ser modificada por y asociada a enfermedades sistémicas
- Puede ser modificada por factores como el fumado y el stress emocional

Etiología bacteriana y viral

La etiología de la periodontitis indica que una infección bacteriana es la causa primaria de la enfermedad. Algunas especies bacterianas que habitan normalmente la cavidad oral y forman la biopelícula dental, han sido asociadas con la periodontitis. Algunas de estas bacterias incluyen *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis* (*B. Forsythus*), *espiroquetas*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Treponema denticola*, *Streptococcus intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum* y *Eikenella corrodens*. (Haffajee y Socransky, 1994).

En la actualidad, se sabe que un número considerable de patógenos puede iniciar y perpetuar esta enfermedad en un huésped susceptible. Las infecciones por herpes simple I son bastante comunes en la población, así como la reactivación de la infección por herpes zóster (años después de la infección primaria de varicela), el papilomavirus humano y el virus de la inmunodeficiencia humana. Sin embargo, existen pocos estudios que

demuestren la presencia de virus como agente causal de la enfermedad periodontal.

Los virus humanos más comunes en la enfermedad periodontal son el citomegalovirus, Epstein-Barr tipo 1, el herpes simple y el herpes Zoster. Se conoce poco sobre la relación existente entre las bacterias y los posibles virus en este padecimiento. (Parra, 1996, Contreras, 1996, Saygun, 2002, Slots, 2003).

La presente investigación tiene como objetivo relacionar los hallazgos clínicos y de laboratorio en pacientes con enfermedad periodontal crónica antes del tratamiento para tratar de establecer una relación entre las bacterias periodontopatógenas, los virus humanos y la presencia de la enfermedad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La periodontitis es una enfermedad infecciosa que afecta en forma progresiva los tejidos de soporte de la pieza dentaria y se caracteriza por la presencia de lesiones gingivales inflamatorias, la formación de bolsas periodontales y la pérdida de hueso alveolar. Su etiología es multifactorial y su patogenia resulta de la interacción entre un biofilm predominantemente gram negativo anaerobio y el sistema inmune del huésped.

Durante mucho tiempo se ha considerado que el agente causal de la enfermedad periodontal es básicamente bacteriano. Sin embargo, estudios recientes sugieren la posible relación entre ciertos virus de la familia del herpes (HV), la periodontitis y sus agentes bacterianos.

Tendrán los herpesvirus alguna relación con el aumento de las bacterias periodontopatógenas, entre otros microorganismos? Poseen la capacidad de infectar las células inflamatorias que se presentan en la enfermedad periodontal?

El presente trabajo pretende dar explicación a estas interrogantes.

Hipótesis

Hipótesis general

¿Están los parámetros clínicos y de laboratorio relacionados con los hallazgos bacterianos y virales en pacientes con periodontitis crónica antes del tratamiento periodontal?

Ho: No existe relación entre los parámetros clínicos y de laboratorio encontrados en pacientes con enfermedad periodontal y la presencia del Epstein-Barr virus (EBV-1 y EBV-2), Cytomegalovirus humano (HCMV) y herpes simplex virus (HSV) y las bacterias *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *S. intermedia* y *A. a.* antes del tratamiento.

Ha: Existe relación entre los parámetros clínicos y de laboratorio encontrados en pacientes con enfermedad periodontal y la presencia del Epstein-Barr virus (EBV-1 y EBV-2), Cytomegalovirus humano (HCMV) y herpes simplex virus (HSV) y las bacterias *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *S. intermedia* y *A. a.* antes del tratamiento.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los parámetros clínicos en pacientes con enfermedad periodontal crónica para establecer el grado de deterioro del periodonto y relacionar este deterioro con la presencia de las bacterias *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *S. intermedia* y *A. a.* y la presencia del Epstein-Barr virus (EBV-1 y EBV-2), Cytomegalovirus humano (HCMV) y herpes simplex virus (HSV) en el fluido crevicular gingival y en la saliva.

Objetivos específicos

1. Relacionar la profundidad de las bolsas con la presencia de bacterias y/o la presencia de virus antes del tratamiento periodontal.
2. Valorar si existe alguna relación entre la movilidad dental y la pérdida de inserción con determinadas bacterias en presencia o no de virus.
3. Cuantificar el volumen de fluido crevicular gingival y determinar la relación que esta cantidad tenga con las bacterias y/o virus encontrados antes del tratamiento periodontal.
4. Comparar el nivel de sangrado gingival con las bacterias y/o virus encontrados.
5. Determinar si la presencia de las bacterias y virus estudiados en la saliva, tiene relación con el cuadro clínico de la enfermedad.
6. Medir los niveles de placa bacteriana y relacionar estos valores con la presencia de las bacterias y/o virus encontrados.

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Variables

Variable dependiente: periodontitis

Definición:

Se conoce como periodontitis, el tipo más común de enfermedad periodontal producida por la extensión de la inflamación, iniciada en la encía hacia los tejidos periodontales de soporte. Se caracteriza por la inflamación de las encías, sangrado espontáneo, dolor, pérdida del agarre epitelial, formación de bolsas periodontales, pérdida de hueso alveolar, movilidad dentaria e inclusive, la pérdida de piezas dentales.

- Parámetros clínicos
 - Profundidad de sondeo: profundidad del surco gingival, se mide desde el margen gingival y la base del surco gingival. Se mide con sonda periodontal, siendo las medidas normales de 1 a 3 mm, y las medidas patológicas mayores de 3 mm.
 - Medición del nivel de inserción: determina los cambios en el nivel del margen gingival con relación a la unión amelocementaria. Se mide la profundidad del surco gingival y se resta la distancia que exista desde el margen gingival a la unión amelocementaria. En condiciones de normalidad, el margen gingival se encuentra a 1 mm de la unión amelocementaria, en condiciones patológicas, la unión amelocementaria queda expuesta por la migración apical del margen gingival. Se mide con sonda periodontal.
 - Medición del grado de movilidad dental: se determina la movilidad patológica del diente con dos instrumentos duros. Un movimiento de 1 mm en sentido mesio distal o vestibulo palatino, se considera de Grado I, un movimiento de 2 mm en ambos sentidos se considera de Grado II y un movimiento en todos los sentidos, inclusive la intrusión del diente de 2 mm o más, se considerada de Grado III.
 - Volúmen de fluido crevicular gingival: El fluido crevicular es el líquido que emerge del surco gingival. El fluido crevicular gingival se tomará con un papel de filtro, el cual se dejará en el surco por 30 segundos, sin que se contamine con saliva o sangre, y se colocará inmediatamente en los sensores del Periotrón ® 6000 para correlacionar la lectura con el volúmen de fluido crevicular.
 - Índice gingival: este índice determina el grado de inflamación del tejido gingival según el sangrado que presente. Se realiza con un instrumento romo, el cual palpa la pared del tejido blando en el margen gingival a fin de indicar la inflamación de la encía. La hemorragia se valora en una escala que va del 0

al 3, donde 0 indica que no hay inflamación, y 3, que hay una inflamación grave.

- Índice de placa bacteriana: índice empleado para medir el hacinamiento de la placa. Se realiza colocando fucsina básica como agente revelador y un sistema de puntuación numérica que va desde 0, indicando ausencia de placa bacteriana, hasta 5, lo que indica una superficie cubierta en totalidad con placa bacteriana.

Variable independiente: hallazgos bacterianos y virales

- Parámetros de laboratorio
 - Pruebas de PCR para determinación bacteriana y viral en el fluido crevicular gingival: se tomará una muestra del contenido del surco gingival de las piezas seleccionadas, con cureta. El contenido será colocado en un tubo de ensayo esteril. Se realizarán pruebas de PCR para determinación bacteriana y viral.
 - Pruebas de PCR para determinación bacteriana y viral en saliva: se tomará una muestra de saliva del piso de la boca con pipeta Pasteur y se colocará en un tubo de ensayo esteril. Se realizarán pruebas de PCR para determinación bacteriana y viral.

Clasificación del estudio

El estudio se considera no experimental, longitudinal y descriptivo. (Hernández, 1998).

Metodología

1. Selección del paciente: los pacientes serán seleccionados conforme sean valorados en la clínica de admisión al posgrado, conforme al cumplimiento de los criterios de inclusión. Una vez que el paciente ha sido informado de la necesidad de su tratamiento, será invitado a participar de la investigación, para lo cual firmará una Hoja de Consentimiento donde se le explicará los objetivos de la investigación y los aspectos que debe cumplir para poder participar de este estudio.
2. Confección del expediente clínico: se completará la información por medio de un interrogatorio de los datos generales del paciente en un cuestionario predeterminado, donde se incluirá el nombre completo del paciente, sexo, la edad, fecha de nacimiento, estado civil, nacionalidad, dirección del domicilio, ocupación, lugar de trabajo, dirección laboral, médico de cabecera y fecha de ingreso a la clínica.

3. Revisión de la historia médica: se hará una evaluación del motivo de la consulta del paciente, enfermedad actual y sus antecedentes, antecedentes fisiológicos, antecedentes patológicos, antecedentes no patológicos, antecedentes patológicos familiares, análisis por sistemas de alteraciones, y cualquier otro dato relativo a la salud general del paciente en el pasado y en la actualidad.
4. Juego de radiografías periapicales: se le realizará un estudio radiográfico por medio de radiografías periapicales para determinar el nivel de hueso, presencia o no de patologías dentales u óseas, etc.
5. Examen del periodonto: se anotarán las piezas dentales ausentes, las piezas dentales presentes, patologías pulpares o dentales, restauraciones y el estado de las mismas, contactos dentales abiertos, malposiciones dentales, presencia de furcaciones y la presencia de defectos infraóseos. Una vez realizado esto se procederá a medir:
 - a. Profundidad del sondeo: La profundidad del surco gingival, o bolsa periodontal, en el caso de enfermedad, es la distancia entre el margen gingival y la base del surco gingival (extremo apical del epitelio de unión). En condiciones normales esta medida oscila entre los 1-3 mm. En estados patológicos mide de 3 hasta 9 mm o más. Se realizará la medición de todas las piezas dentales presentes por medio de una sonda periodontal tipo "0" (cero) de la Universidad de Michigan, con marcas Williams (en 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9 y 10 mm). Se realizarán seis mediciones por cada diente, de distal a mesial por vestibular y lingual.
 - b. Medición del nivel de inserción: cuando el margen gingival se localiza en la corona anatómica el nivel de inserción se establece restando de la profundidad de la bolsa la distancia desde el margen gingival hasta la unión amelocementaria. Si ambas son iguales, la pérdida de inserción es cero. Cuando el margen gingival coincide con la unión amelocementaria, la pérdida de inserción es igual que la profundidad de la bolsa. Si el margen gingival se localiza en sentido apical a la unión amelocementaria, la pérdida de inserción es mayor que la profundidad de la bolsa.
 - c. Medición del grado de movilidad dental: se realizará por medio de dos instrumentos rígidos (metálicos), intentando hacer un esfuerzo por mover el diente en todas las direcciones. La movilidad se cataloga como normal, si no produce un desplazamiento importante del diente en ningún sentido. Grado I es la movilidad un poco mayor de lo normal, Grado II, moderadamente más que la movilidad normal, y Grado III, intensa movilidad vestibulolingual, mesiodistal o ambas, en combinación con un desplazamiento vertical.
6. Obtención y cálculo del volumen de fluido crevicular gingival: la medición del fluido crevicular gingival, un líquido que emerge entre la superficie del diente y el integumento epitelial (Griffiths, 2003), se realizará por medio de puntas de papel de filtro, las cuales se introducirán por medio del método superficial (Løe y Holm-Pederson, 1965) por lapso de 30 segundos o hasta que se impregne el papel hasta la línea de medida. Luego se colocará en los sensores del Periotron ®

6000 para obtener una lectura que será luego correlacionada con un volumen de fluido.

7. Obtención de las muestras del contenido del surco gingival: la obtención del contenido de la bolsa periodontal o del surco gingival se hará por medio de una cureta esteril la cual se introducirá dentro de la bolsa y el contenido arrastrado, será colocado dentro de un tubo de ensayo esteril el cual se congelará para luego proceder con el análisis de laboratorio.
8. Obtención de las muestras de saliva: se tomará una muestra de saliva no estimulada del piso de la boca con pipeta de Pasteur esteril. La saliva será colocada en un tubo de ensayo esteril el cual será congelado hasta que se realice el análisis de laboratorio.
9. Medición del Índice de sangrado: este índice combina la estimación clínica de la inflamación y la hemorragia del tejido gingival. se realizará siguiendo los parámetros dados por el Índice Gingival de Løe y Sillness (1963). Con un instrumento romo, se palpa la pared del tejido blando en el margen gingival a fin de indicar la inflamación gingival de la encía. La hemorragia se valora en una escala que va del 0 a 3, donde 0 indica que no hay inflamación, y 3 donde hay una inflamación grave.
10. Medición del Índice de Placa bacteriana: el índice empleado para medir el hacinamiento de la placa, utiliza una escala numérica para medir la extensión de la superficie dental cubierta por la placa. La placa se define como un depósito dentario blando, no mineralizado, que incluye desechos y materia alba. El índice que se utilizará es el de Turesky-Gilmore-Glickman, modificado del de Quigley-Hein. Para realizar este índice se realiza un enjuague bucal de fucsina básica como agente revelador y un sistema de puntuación numérica que va desde 0 hasta 5.
11. Determinación de la Prueba de PCR: las muestras de fluido crevicular y de saliva serán analizadas mediante pruebas de PCR bacteriana y viral. Se seguirán los criterios descritos por Contreras (1999).

Población

Esta investigación se realizó con los pacientes de la Clínica del Posgrado de Periodoncia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en un periodo de tiempo comprendido entre abril a diciembre del 2004. Este grupo de pacientes estuvo conformado por aquellos pacientes que padezcan de enfermedad periodontal, grupo experimental, y pacientes que no padezcan de enfermedad periodontal, que acuden a esta clínica para recibir tratamiento periodontal previo a un tratamiento protésico (alargamiento de corona clínica, implantes, etc.).

Muestra

El grupo experimental estará constituido por un mínimo de 30 pacientes y el grupo control estará constituido por un mínimo de 15 pacientes.

Criterios de inclusión y exclusión

Grupo experimental:

- Pacientes con periodontitis crónica
- Edad entre los 30 a 60 años
- Ambos sexos
- No padecer de enfermedades generalizadas
- No haber recibido tratamiento periodontal en 6 meses
- No haber tomado antibióticos en 3 meses
- No fumar
- Mujeres no en estado de gestación, no estar bajo tratamiento hormonal ni a las que se les haya realizado una histerectomía
- *Estar anuentes de participar en el estudio y permitir la obtención de muestras de fluido crevicular gingival y de saliva antes y después del tratamiento periodontal.*

Grupo control:

- Edad entre los 30 y 60 años
- Ambos sexos
- No padecer de enfermedades generalizadas
- No haber recibido tratamiento periodontal en 6 meses
- No haber tomado antibióticos en 3 meses
- No fumar
- Mujeres no en estado de gestación, no estar bajo tratamiento hormonal ni a las que se les haya realizado una histerectomía
- *Estar anuentes de participar en el estudio y permitir la obtención de una muestra de fluido crevicular de una molar y una muestra de saliva.*

MARCO TEÓRICO

Enfermedad Periodontal

La periodontitis es una enfermedad atribuida a múltiples agentes infecciosos e interconectada con la respuesta inmune humoral y celular del huésped. Sin embargo, y a pesar de los múltiples estudios que se han realizado, resulta difícil establecer el rol específico de varios patógenos y la respuesta inmune en la patogénesis de la enfermedad periodontal. Resulta difícil justificar porqué en algunos pacientes con altos factores de riesgo presentes en su organismo, algunas infecciones periodontales producen pérdida de inserción y pérdida ósea, mientras que otras infecciones se limitan a producir inflamación a nivel gingival con pequeños cambios clínicos, a veces, imperceptibles. Inclusive, la detección de especies bacterianas periodontopatógenas en individuos sanos, no necesariamente, predice el curso de la infección clínica. Todos estos elementos que no se han podido esclarecer, son los que han generado que se hagan esfuerzos por encontrar factores etiológicos adicionales en la periodontitis.

Se sabe que algunos agentes infecciosos específicos son una parte importante en el desarrollo de la periodontitis, sin embargo, actualmente se conoce que no es uno ni un pequeño grupo de estos patógenos los que por sí solos causan esta enfermedad heterogénea.

Microbiología periodontal

La participación de microorganismos presentes en surcos gingivales en el desarrollo de enfermedad en la cavidad oral ha sido un tema muy discutido durante las últimas décadas, debido a que se han encontrado una gran variedad de bacterias anaerobias, aerobias y facultativas que podrían estar implicadas en el proceso infeccioso.

Cabe mencionar que se ha reportado un grupo de bacterias encontradas como flora normal dentro de los surcos gingivales sanos; algunas de estas son: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Rothia dentocariosa*, *Actinomyces viscosus* y *Actinomyces naeslundii*. Sin embargo, recientemente se han detectado bacterias asociadas a la enfermedad periodontal del adulto donde destacan *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* y *Campylobacter rectus* (Contreras, 1999).

Dentro de los microorganismos causales de la periodontitis del adulto destacan por su patogenicidad *P. gingivalis* y *P. intermedia*.

P. gingivalis, antes llamada *Bacteroides gingivalis* es una bacteria anaerobia gram negativa que frecuentemente se encuentra en placa subgingival de pacientes adultos que presentan periodontitis. Cabe mencionar

que la podemos encontrar en regiones de cabeza y cuello, tracto gastrointestinal así como vías respiratorias.

P. intermedia, antes conocida como *Bacteroides intermedius*, es una bacteria anaerobia estricta gram negativa, se encuentra asociada a inflamación gingival desde moderada hasta avanzada, en periodontitis del adulto así como en gingivitis ulceronecrosante.

Otro microorganismo que ha sido aislado de periodontitis del adulto es *S. intermedius*. Esta es una bacteria anaerobia estricta gram positiva alojada como flora normal en cavidad oral, se encuentra en ocasiones en abscesos endodónticos y en bacteremias después de realizarse una cirugía bucal.

Herpes virus humanos y su relación con la enfermedad periodontal

Desde mediados de 1990, los herpesvirus han surgido como posibles patógenos en varios tipos de enfermedad periodontal. (Contreras, 2000). En particular, el citomegalovirus humano (HCMV) y el virus Epstein-Barr (EBV) han tenido un rol importante en la etiopatogénesis de varias formas severas de periodontitis.

Los virus pueden causar enfermedades agudas y crónicas en el humano. Continuamente se están encontrando nuevos virus implicados en etiologías desconocidas.

Los virus ocupan una posición única en la biología. Son agentes intracelulares obligados, los cuales son metabólicamente y patogénicamente inertes fuera de una célula huésped. Se pueden considerar como entidades infecciosas que no están vivas. Los virus en general son entidades muy pequeñas, alcanzando un diámetro de 30-150 nm. Los virus miembros de los herpesvirus son considerados grandes, al tener largos de 125-235 kb.

Los virus consisten de dos componentes básicos, ácido nucleico (DNA o RNA) y una capa proteica protectora llamada cápside. Según el número de componentes que tenga un virus, así será la capacidad que este tenga de resistir los diferentes ambientes en los cuales se encuentre. Además del tipo de ácido nucleico que tengan, los virus se clasifican también por el tipo de configuración del genoma, la presencia o no de envoltura y otras características morfológicas, así como la composición química y la forma de la replicación.

El término herpes significa "creeping" que se traduce en levantamiento o crecimiento, por la característica clínica de la lesión patológica. Cytomegalovirus se refiere al aumento de tamaño de las células incluidas. Epstein-Barr es el término que recibió este virus por los dos primeros investigadores que lo describieron hace cuarenta años.

Debido a que los virus no pueden producir energía, su replicación depende de la maquinaria del huésped, para brindarles energía, sustratos y maquinaria para la reproducción.

Herpesvirus

Miembros de la familia *Herpesviridae*, han sido identificados aproximadamente 120 diferentes tipos de herpesvirus, ocho tipos principales conocidos por infectar a humanos, entre ellos el herpes simplex virus (HSV) tipo 1 y 2, virus varicella-zoster, EBV, HCMV, herpes virus humanos (HHV)-6, (HHV)-7 y HHV-8, (virus del sarcoma de Kaposi). Los investigadores han identificado más de 5000 trazas diferentes de herpesvirus. Los humanos son la única fuente de infección de los herpesvirus y se clasifican en tres tipos (alfa, beta y gamma) basados en el tropismo que tienen por los tejidos, patogenicidad, y comportamiento bajo las condiciones de cultivo de laboratorio.

Los herpesvirus pueden ocurrir en un estado latente o lítico de replicación. Durante el estado de latencia el DNA del virus es integrado y se comporta como DNA chromosomal. Para poder vivir necesitan explotar a los macrófagos, linfocitos y otras células del huésped, mientras que disminuyen o minimizan la respuesta inflamatoria del organismo huésped. Al producir este efecto en el organismo, es común que a floren en pacientes inmunológicamente deprimidos o inmaduros que no pueden montar una respuesta inmunológica adecuada. Se caracterizan por producir una primera infección seguida de una fase latente durante el tiempo en que el genoma viral se integra al genoma de la célula. De tiempo en tiempo pueden reactivarse y re-entrar la fase productiva. Stress psicosocial y físico, cambios hormonales, infecciones, medicación inmunosupresora, y otros eventos que involucren la respuesta inmunológica pueden reactivar la infección viral. Se sabe que tienen una capacidad de seleccionar las células en las cuales habitarán. Los HCMV tienden a infectar los monocitos y los macrófagos, los linfocitos T, células epiteliales de los ductos de las glándulas salivares, células endoteliales, fibroblastos y leucocitos polimorfonucleares. EBV infecta los linfocitos B maduros durante la infección primaria y durante latencia, y pueden infectar el epitelio orofaríngeo.

Existen muchos estudios que ya han asociado la presencia de los virus humanos en la enfermedad periodontal. También se han hecho investigaciones que han demostrado que los herpesvirus pueden no ser identificados en las lesiones periodontales. HCMV, EBV-1 se han asociado a coinfecciones con bacterias periodontopatógenas, entre ellas *P.gingivalis* y *D.pneumosintes* (Contreras, 2000). Adicionalmente se ha estudiado la habilidad de los herpesvirus de inducir inmunosupresión, lo que crea las condiciones ideales para que se de una proliferación bacteriana, principalmente bacterias periodontopatógenas, y así aumentar el riesgo de la progresión de la enfermedad periodontal. Se ha demostrado que los herpesvirus pueden producir efectos citopáticos en fibroblastos, keratinocitos, células endoteliales, células inflamatorias y células óseas. Esto puede generar una patología directa por la infección viral y la replicación viral, o como consecuencia de una inhabilidad del sistema de defensa de responder al ataque de los microorganismos.

Las infecciones de los herpesvirus a nivel periodontal puede inducir a una proliferación bacteriana, aunado al hecho de que el sistema inmunológico

está disminuido. Por esto, se sugiere que existe un modelo de desarrollo de la periodontitis conformado por los herpesvirus, las bacterias y la respuesta interactiva del sistema inmunológico.

Estructura del gen ARN ribosomal 16s

El éxito de la PCR en el diagnóstico de enfermedades infecciosas se basa en su capacidad para reconocer y amplificar características génicas particulares de un microorganismo determinado. Estas características están dadas en cualquier microorganismo en la composición de su ADN en pequeños segmentos de esta molécula llamados genes.

Cada gen consiste en una región de un tamaño definido de ADN con una composición determinada que posee la información necesaria para dirigir la síntesis de una proteína. Dado que un organismo depende absolutamente de la presencia de proteínas para llevar a cabo todas sus funciones vitales, incluyendo la síntesis de todos sus compuestos, entonces toda la información necesaria para construir un organismo reside finalmente en sus genes.

En un individuo, el número y tipo de genes es constante, solamente en escasas ocasiones se presentan cambios en estos elementos, de forma espontánea o inducida lo que generalmente provoca daño en el organismo; estos cambios en los genes se denominan mutaciones. Es por esta universalidad e inmutabilidad del material genético que las técnicas basadas en la detección de información genética son tan atractivas.

Para entender el funcionamiento de este tipo de técnicas, como la PCR, es necesario conocer la naturaleza del ADN. El ADN es una gran molécula polimérica (de hecho es la molécula más grande de todo el organismo), formada por pequeñas unidades enlazadas químicamente entre sí, llamadas nucleótidos.

En el caso del ADN existen cuatro diferentes nucleótidos que a su vez contienen uno de los siguientes componentes llamados bases nitrogenadas: adenina, timina, guanina y citosina.

Las bases guanina y adenina pertenecen al grupo de las purinas, debido a que su estructura es semejante a este compuesto, mientras que la timina y citosina son bases de tipo pirimidina. Además cada nucleótido se compone de otros químicos; cada base nitrogenada está unida químicamente al carbono 1 de un azúcar, que en el ADN es desoxirribosa. En el extremo opuesto (carbono 5) del sitio de unión de la base nitrogenada en el azúcar se une un grupo fosfato. En resumen cada nucleótido del ADN consiste de una de las cuatro bases nitrogenadas, un azúcar desoxirribosa y un fosfato.

En la molécula de ADN cada nucleótido está unido químicamente a otro nucleótido a través del grupo hidroxilo del carbono 3 del azúcar y el grupo fosfato de carbono 5 del otro nucleótido. Este enlace se denomina enlace

fosfodiéster. La molécula de ADN es extremadamente grande, y su longitud varía con respecto a la complejidad del organismo, así los virus tienen moléculas de ADN que constan de algunos miles de nucleótidos enlazados, mientras que en los humanos cada molécula puede tener hasta varios millones de nucleótidos.

Además de su gran tamaño, la molécula de ADN tiene una estructura muy particular que la capacita para efectuar sus funciones. En primer lugar cada molécula consta en realidad de dos cadenas de nucleótidos. Estas cadenas se unen a través de las bases nitrogenadas de cada nucleótido mediante enlaces débiles llamados puentes de hidrógeno. Estos puentes de hidrógeno se forman entre una base nitrogenada purina de una cadena con una base nitrogenada pirimidina de la otra. Específicamente, sólo la adenina se une a la timina mediante un par de puentes de hidrógeno, mientras que la guanina se une a la citosina por tres puentes de hidrógeno. A este hecho se le conoce como apareamiento específico de bases y es responsable de que las hebras sean complementarias, es decir si en una cadena se presenta una adenina en la otra existirá timina y si se presenta guanina en la hebra complementaria habrá una citosina.

Para que el apareamiento sea estable las dos cadenas de ADN se deben disponer de forma antiparalela, es decir, una en dirección del extremo terminal 5'fosfato hacia el extremo terminal 3'OH y la otra en dirección opuesta, de 3'OH a 5'fosfato. Además de ser una cadena doble, la molécula de ADN tiene una forma helicoidal donde cada hebra se enrolla sobre la otra, a semejanza de una "escalera de caracol" donde los "peldaños" son las bases nitrogenadas unidas de una cadena con la otra y el "pasamanos" son los azúcares y grupos fosfatos de cada hebra.

Cada molécula de ADN que forma un gen posee una secuencia u orden particular de los nucleótidos que la forman, esta secuencia es lo que se conoce como información genética, la cual es descifrada a partir de un código genético en los ribosomas, que son las estructuras celulares responsables de la síntesis de las proteínas. Dado que los organismos provienen de ancestros comunes se espera que la secuencia del ADN de sus genes sean parecidas, y además porque todas las células efectúan sus funciones vitales de manera semejante. Sin embargo, el proceso evolutivo ha generado lentamente mutaciones benéficas en el material genético de las especies, lo que ha llevado a la producción de las muy diversas formas de vida encontradas en la actualidad; así, realmente es imposible que dos especies de organismos, aunque provengan de un mismo ancestro, posean exactamente la misma secuencia de nucleótidos en sus genes. Por esto, es posible detectar un organismo determinado si se es capaz de encontrar características distintivas en la secuencia de sus genes.

En este punto es donde se apoyan las técnicas de identificación genética como la PCR. Uno de los genes más empleados para llevar a cabo este tipo de análisis es el gen que codifica para el ARN ribosomal 16s (ARNr 16s); el motivo por lo que este gen es tan utilizado es porque se encuentra en todos los organismos vivos, desde bacterias hasta humanos. Además, este

gen es vital para todos los organismos, debido a que el ARNr 16s es un componente indispensable de los ribosomas de todos los seres vivos. Debido a que a través del proceso evolutivo se han acumulado gran cantidad de mutaciones en algunas regiones de este gen (llamadas regiones de hipervariabilidad), es posible detectar diferencias entre organismos muy relacionados. Este gen se ha empleado exitosamente en la detección de un gran número de microorganismos.

En las bacterias este gen, que tiene un tamaño promedio de 1500 nucleótidos, se encuentra asociado con los demás genes del ARNr (23S y 5S) y con otros genes, en un arreglo conocido como operón. Dentro del mismo gen existen regiones que varían muy poco en su secuencia debido a que son indispensables en la función del ARNr 16s, sin embargo, otras regiones cuya secuencia no es relevante para función del gen muestran alta variabilidad entre las especies, y son estos los sitios de elección para la identificación de un microorganismo determinado.

Origen de la reacción en Cadena de la Polimerasa

Este proceso fue ideado en 1985 por Karry B. Mullis en Estados Unidos y fue perfeccionado durante el mismo año por investigadores del mismo grupo, aplicándolo exitosamente en el diagnóstico clínico de la anemia.

El término de PCR se define como el proceso enzimático de copiado de un segmento de ADN *in vitro*, utilizando una enzima ADN polimerasa termoestable. Este proceso se efectúa utilizando una alta temperatura para la separación de la doble hélice del ADN, a la cual se unen pequeñas moléculas de ADN sintéticas (oligonucleótidos) que proveen extremos 3'OH para la síntesis de ADN por la polimerasa.

Los reactivos necesarios para llevar a cabo la PCR son los siguientes:

-ADN templado o blanco:

Es el ADN del gen que se utiliza para detectar un organismo. Como se mencionó este ADN debe ser altamente específico para un organismo en particular y uno de los más usados es el gen del ARNr 16s. Específicamente se emplean las secuencias de alta variabilidad presentes en este gen. Teóricamente basta una sola molécula de ADN templado para iniciar la PCR, en la práctica se requiere la presencia de algunas decenas o cientos de ellas.

-Oligonucleótidos:

Son pequeñas moléculas de ADN de una sola hebra (de 10-30 nucleótidos por lo general) sintetizados artificialmente que son complementarios a los extremos de la secuencia de ADN blanco que se requiere detectar. Para un ensayo de PCR se usan por lo menos 2 oligos los cuales deben reunir los siguientes requisitos:

-Cada uno debe ser capaz de unirse por apareamiento específico de bases a una sola región en el ADN blanco.

-Deben contener una alta proporción de guaninas y citosinas (arriba del 50%) para tener mayor estabilidad.

-No deben ser complementarias consigo mismos ni con el otro oligo utilizado, ya que esto puede evitar su unión eficiente al ADN blanco.

-Deben estar diseñados de tal forma que uno reconozca la región 5' de la secuencia que se desea detectar y el otro la región 3'; además, sus extremos 3' deben estar dirigidos el uno hacia el otro.

-No deben unirse a otro ADN que no sea el blanco que se quiere detectar en el microorganismo o con el ADN de otros microorganismos.

-Deben poseer una alta estabilidad de unión al ADN blanco, lo cual se mide con el parámetro T_m (Temperature melting, valor de temperatura al cual el 50% de las moléculas del oligo están disociadas del ADN blanco). La T_m debe ser mayor a 50°C.

-Enzima ADN polimerasa

Esta enzima es la que efectúa la síntesis del ADN blanco a partir de los extremos 3' de los oligos. Generalmente se emplea una enzima termoestable obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus*; esta enzima, llamada Taq ADN polimerasa, tiene una temperatura óptima de actividad a 72°C y resiste muy bien por algún tiempo temperaturas de hasta 95°C sin perder su actividad. Al igual que todas las ADN polimerasas la Taq requiere ciertas condiciones para efectuar el copiado de una molécula de ADN, estas son:

- Que el ADN que va a ser copiado (ADN blanco) este en forma de cadena sencilla, a esta condición se le conoce como desnaturalización del ADN.
- Que existan oligos unidos al ADN blanco con sus extremos 3' libres. A partir de este sitio la polimerasa se une al ADN blanco y comienza a sintetizar nucleótido por nucleótido, la cadena complementaria a partir de nucleótidos precursores conocidos como dNTP's incorporando a la nueva cadena el nucleótido con la base nitrogenada complementaria a la cadena del ADN blanco.
- Se requiere la presencia de iones Mg^{+2} que actúan como cofactores en la síntesis de ADN.

-dNTP's

Son los nucleótidos trifosfatados precursores del ADN. Aunque el ADN consta de nucleótidos con un solo fosfato (dNMP), para su síntesis se requieren dNTP's. La abreviación dNTP significa cualquiera de los cuatro nucleótidos siguientes: dATP, dGTP, dCTP y dTTP.

-Buffer de Taq polimerasa

Es una solución que mantiene el pH constante. La enzima solo actúa a pH 9 y este buffer proporciona y mantiene constante este valor. Además provee el Mg^{+2} en la concentración necesaria para la actividad de la enzima.

Etapas de la PCR:

1. **Desnaturalización**: En esta etapa el ADN blanco que va a ser copiado se somete durante un breve lapso (generalmente de 30 a 90 segundos) a una temperatura elevada (92 a 98°C), bajo estas condiciones, las dos cadenas del ADN, que normalmente se encuentran unidas mediante puentes de hidrógeno, se separan, por acción del calor. Esto permite que las secuencias de nucleótidos de cada cadena sean expuestas y queden disponibles para ser reconocidas por los oligos en la siguiente etapa.
2. **Alineamiento**: En este paso la temperatura se disminuye a una valor de por lo menos 10 a 5 °C debajo de la temperatura de los oligos. Así en este momento se realiza el apareamiento específico entre los oligos y las cadenas sencillas del segmento del ADN blanco. Esta etapa se efectúa normalmente a 50-55 °C por un tiempo de 30 a 90 segundos, aunque las condiciones pueden variar dependiendo del diseño de los oligos. Cabe destacar que esta etapa es crucial ya que es la que determina la unión específica de los oligos a la secuencia blanco.
3. **Extensión**: Una vez que los oligos se unen al segmento específico de las cadenas sencillas del ADN blanco se inicia la síntesis de la cadena complementaria del ADN blanco a partir del extremo 3' de cada oligo. Esto se efectúa a una temperatura de 72 °C en un tiempo de 30 a 90 segundos.

Estos pasos pueden repetirse con los mismos componentes; para esto se usa un exceso de oligos y dNTP's. La gran ventaja de este proceso cíclico es que el ADN nuevo que ha sido copiado en el ciclo anterior es blanco para ser copiado en el siguiente ciclo y así sucesivamente. De tal forma que la cantidad de ADN blanco se duplica con cada ciclo. Además el segmento que se duplica tiene un tamaño que esta determinado por la distancia que existe entre los oligos ya que la síntesis del ADN solo se efectúa a partir del 3' de los oligos.

Así, después de un número determinado de ciclos sucesivos, se pueden tener 2^n copias de un segmento de tamaño específico, donde n es igual al número de ciclos. Por ejemplo, después de 20 ciclos, la cantidad de copias

del ADN blanco es de 2^{20} , es decir, más de 1,000,000. De esta forma es posible en unas cuantas horas sintetizar grandes cantidades (del orden de microgramos) de un ADN específico que puede ser detectado por métodos convencionales de análisis de ácidos nucleicos como la electroforesis.

Electroforesis de ADN

Es una herramienta de análisis simple y rápida para una mezcla de moléculas. Se define como un proceso de movimiento de moléculas con carga eléctrica en soluciones de pH determinado, aplicando un campo eléctrico a través de la mezcla. Este método permite separar proteínas y otras macromoléculas como ADN y ARN. El movimiento de estas moléculas depende de su carga eléctrica, tamaño y forma.

Para realizar la separación de ADN por medio de electroforesis es necesario la utilización de una matriz sólida la cual puede estar compuesta de diferentes materiales: celulosa, acetato y geles de poliacrilamida, agarosa y almidón. La agarosa y la poliacrilamida son las más usadas en investigación de ADN. En estos geles se coloca la mezcla de moléculas que se desea analizar y se aplica un voltaje determinado. Debido a la presencia de fosfato, las moléculas de ADN se cargan negativamente al pH del buffer (pH 8.0) y migran hacia el polo positivo.

Los geles de poliacrilamida y agarosa actúan como tamices moleculares seleccionando el tamaño de las moléculas de ADN. De esta forma se pueden analizar productos de PCR mediante electroforesis para determinar si el tamaño del producto amplificado corresponde al esperado según el diseño de los oligos. Las moléculas de menor tamaño migrarán más rápido al desplazarse con mayor facilidad a través de los poros del gel y llegarán más cerca del polo positivo, que las moléculas mayores.

Una vez que las moléculas han migrado lo suficiente a través del gel (1-2 horas), se genera un patrón de bandas donde cada banda indica la presencia de ADN de un tamaño determinado las cuales se hacen visibles al teñir los ácidos nucleicos con el colorante bromuro de etidio. Este compuesto se intercala entre las bases consecutivas de la doble hélice del ADN y absorbe luz ultravioleta emitiendo una fluorescencia de color rojo-naranja. El tamaño de las moléculas de ADN en cada banda se puede determinar comparándolas con un ADN de tamaño conocido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Índice Gingival (Løe y Sillness, 1967)

El registro de los cambios cualitativos del tejido gingival se hizo con el paso de una sonda periodontal (North Carolina) a lo largo del surco gingival. Se evaluó la hemorragia del tejido gingival empleando los siguientes dígitos:

IG-0: encía de color rosa pálido. La encía está firme a la palpación con un instrumento romo.

IG-1: encía con una leve inflamación manifestada por enrojecimiento ligero del margen gingival. Puede observarse exudado incoloro en el surco. No hay sangrado provocado con el instrumento.

IG-2: encía con inflamación moderada. Encía de color rojo. Sangrado provocado con el instrumento.

IG-3: encía con inflamación severa. Enrojecimiento marcado del tejido gingival. Tendencia al sangrado espontáneo.

Índice de Placa (Quiglye y Hein, modificado por Turesky, 1962)

El registro de la cantidad de placa bacteriana adherida a las superficies lisas de los dientes se hizo con un agente revelador (Disclosing solution concentrate, Red No. 28, Sultan®). Se emplearon los siguientes dígitos:

0= No hay placa bacteriana

1= Puntos separados de placa bacteriana en el tercio cervical del diente

2= Banda delgada y continua de placa bacteriana (no más de 1 mm)

3= Banda de placa de más de 1 mm de ancho y menor de 1/3 cervical de la corona

4= Banda de placa que cubre más de 1/3 de la corona pero menos de 2/3 de la corona

5= Placa bacteriana que cubre más de 2/3 de la corona

Muestras de los pacientes

A cada paciente incluido en el estudio se le tomaron las siguientes muestras:

1. Saliva del piso de la boca (tomada con pipeta Pasteur estéril), aproximadamente 0.5 ml, la cual fue depositada en un tubo Eppendorf.
2. Una muestra de fluido crevicular gingival con papel de filtro (por diente escogido) que se utilizó para obtener una lectura en el Periotrón®. La lectura se realizó inmediatamente después de haberse obtenido la muestra. La tira fue colocada posteriormente en un tubo Eppendorf estéril.

3. Una muestra con cureta de los mismos sitios. La muestra fue colocada en un tubo Eppendorf con agua mili Q estéril.

Una vez obtenidas las muestras correspondientes se conservaron en congelación a -20°C hasta el día de su procesamiento.

Método de extracción del DNA viral

La extracción del DNA de las muestras se realizó con tres protocolos. El primer protocolo utilizado fue con Trizol (ver anexo No.). Luego se utilizó el kit de Gentra y por último, la extracción con Sílica (ver anexo No.). Al realizar las pruebas de electroforesis, se concluyó que los dos primeros protocolos eran igualmente efectivos en la obtención del DNA para realizar posteriormente las PCR. El protocolo con sílica se utilizó como método experimental, ya que la sílica utilizada no arrojó los resultados esperados.

La extracción del DNA de las muestras de saliva y de cureta se realizó con Gentra®. El protocolo de la extracción es el siguiente:

1. Descongelar la muestra
2. Dar un spin en la centrífuga y no inclinar mas la muestra
3. Obtener 50 ul de la muestra y colocarla en un tubo de 1.5 ul estéril.
Agregar 250 ul de solución de lisis. Dar vortex.
4. Colocar en Baño María a 65° C por 15 minutos.
5. Dejar reposar a temperatura ambiente
6. Agregar 100 ul de PPS (solución de precipitación de proteínas)
7. Agitar por inversión lentamente (20 veces)
8. Colocar en hielo por 5 minutos
9. Centrifugar a máxima velocidad o a 14,000 rpm por 3 minutos
10. Obtener el sobrenadante
11. Adicionar al sobrenadante 300 ul de isopropanol absoluto
12. Mezclar por inversión
13. Centrifugar por 5 minutos
14. Decantar sobrenadante
15. Secar con papel absorbente
16. Agregar 300 ul de etanol 70%
17. Centrifugar por 5 minutos y volver a decantar
18. Secar a temperatura ambiente en campana de flujo laminar
19. Resuspender pastilla en 20 ul de solución de hidratación
20. Almacenar a -20°C.

Características de los primers de virus

Los primers utilizados en la PCR para detectar virus humanos fueron los reportados por Parra y Slots (Parra y Slots, Detection of human.....). Fueron obtenidos por medio del laboratorio Alpha DNA (Montreal, Quebec), por medio de Probiotec, el distribuidor en Monterrey, N.L. Las secuencias de los primers son las siguientes:

Primer	Ubicación	Secuencia 5'-3'
Cytomegalovirus	Externo	CAG ACA CAG TGT CCT CCC GCT CCT C
Cytomegalovirus	Externo	CCT AGT GTG GAT GAC CTA CGG GCC A
Cytomegalovirus	Interno	CAG ACA CAG TGT CCT CCC GCT CCT C
Cytomegalovirus	Interno	CCA GAG TCC CCT GTA CCC GC
Epstein-Barr virus	Externo	AGG GAT GCC TGG ACA CAA GA
Epstein-Barr virus	Externo	TGG TGC TGC TGG TGG CAA
EBNA Tipo 1	Interno	TCT TGA TGA GGA TCC GCT AGG ATA
EBNA Tipo 1	Interno	ACC GTG GTT CTG GAC TAT TCG GAT C
EBNA Tipo 2	Interno	CAT GGT AGC CTT AGG ACA TA
EBNA Tipo 2	Interno	AGA CTT AGT TGA TGC CGT AG
Herpes simplex virus	Externo	GGG CCA GGC GCT TGT TGG TGT A
Herpes simplex virus	Externo	TAC ATC GGC GTC ATC TGC GGG G
Herpes simplex virus	Interno	CAG TTC GGC GGT GAG GAC AAA
Herpes simplex virus	Interno	GCG TTT ATC AAC CGC ACC TCC

Condiciones de la PCR-virus

Las condiciones óptimas para la mezcla y los ciclos de temperatura para la PCR fueron determinados experimentalmente para cada virus utilizando DNA de control positivo y negativo. Cada tubo se preparó con 25 ul de mezcla total con 2.5 de DNA de la muestra. Las preparación de la PCR para virus se hizo de la siguiente manera:

Reactivo	Volumen
Buffer 10 X	2.5 ul
MgCl2	0.7 ul
dNTP's	2 ul
Mezcla de Oligonucleótidos de virus	6 ul
Agua	10.8 ul
DNA	2.5 ul
Taq polimerasa	0.5 ul
Volumen final	25.0 ul

Se realizó una PCR múltiple, ya que se colocó en un tubo la mezcla de los reactivos anteriores por cada muestra tomada. Se usaron como control positivos las extracciones de DNA de los Herpes virus y Cytomegalovirus (INNNS) y como control negativo se usó agua y medios de cultivos libres de virus.

La amplificación de la PCR se realizó en un Termociclador DNA Thermal Cycler Pekin Elmer que incluyó un primer paso de desnaturalización, seguido de 30 ciclos de desnaturalización y por último, la alineación de los primers. El siguiente cuadro incluye las temperaturas y los ciclos.

Temperatura	Tiempo
1. 94°C	4 minutos
2. 94°C	1 minuto
3. 55°C	1 minuto
4. 73°C	1 minuto
5. -	30 veces
6. 73°C	1 minuto
7. Final	

Electroforesis de ADN

Una vez concluido el ciclo en el termociclador, se procedió a realizar la electroforesis de cada muestra. Se preparó el gel de agarosa al 1.5%. Para esto se colocaron 1.5 gramos de agarosa en 150 ml de buffer TAE (Tris, acetato, EDTA pH 8.0). Se colocó en la cámara de electroforesis, se dispensó el TAE en la cámara, actuando como medio conductor. Cada mezcla se depositó en los pocillos del gel con buffer de carga (azul de bomofenol, xilencianol, glicerol). Se colocó un marcador de talla molecular conocido para determinar por medio de la comparación el tamaño del nucléotido de cada control positivo. Se conectó a la fuente de poder aplicándose un voltaje de 100 voltios durante 1 hora. Se dejó correr las muestras en el gel, se colocó el gel en bromuro de etidio, y se observó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta. Una vez vistas las bandas se procedió a tomar fotografías en blanco y negro de las mismas.

Características de los primers de bacterias

Los primers utilizados en la PCR para detectar bacterias fueron: *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Streptococcus intermedius* (27385) y *Tenereilla forsythensis*. Fueron obtenidos por medio del laboratorio Alpha DNA (Montreal, Quebec), por medio de Probiotec, el distribuidor en Monterrey, N.L. Las secuencias de los primers son las siguientes:

Primer	Iniciador 5'-3'	Posición
P.gingivalis	AAG GAT TGT AAA CTT CTT TTA TAC	427
	ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	1132
P.intermedia	GCA TTT ACC CTT CGA ATA AGG ACC	449
	GAG TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG	989
T. forsythensis	5'GCG TAT GTA ACC TGC ACC TGC CCG CA-7	121
	5'GAA GGC AGC TTA CTA AGG-8	470
S. intermedius	GTT AAG GAA GAA CGA TGT TGA GAA	343
	TGC CGT CAC CGG CTT GCG ACT CGT	1176

Condiciones de la PCR bacteriana

Se preparó una mezcla de los reactivos de PCR para cada uno de los microorganismos bacterianos en tubos para microcentrifuga de 1.5 ml. Los reactivos se colocaron de la siguiente manera:

Reactivos (concentraciones)	Cantidad (ul)
H2O mili Q	23.7
dNTP's	4
Buffer 10 X	5
Mezcla de primers	2
ADN lisado	15

Se colocaron tres gotas de aceite mineral estéril en cada tubo para evitar la evaporación de los reactivos. Fueron llevados al termociclador y sometidos a una temperatura de desnaturalización inicial de 95°C por 5 minutos y posteriormente se adicionó 0.3 ul de Taq polimerasa. Se colocaron los tubos en el termociclador programado con las siguientes temperaturas: 94°C por 1 minuto para la desnaturalización del ADN blanco, 36 °C por 1 minuto para el alineamiento de los oligos y 70°C durante 1 minuto para la extensión, por 34

ciclos. Finalmente se programó un segmento de 70°C por 10 minutos para extensión final, de productos de PCR incompletos.

Electroforesis de PCR bacteriana

Se preparó un gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE (Tris, acetato, EDTA pH 8.0) en un molde para cámara horizontal de electroforesis. Se mezclaron 10 ul de cada producto de PCR con 2 ul de buffer de carga (azul de bromofenol, xilencianol, glicerol). Se depositaron las mezclas en los pocillos del gel y se aplicó un voltaje de 100 voltios durante 1 hora utilizando buffer TAE como medio conductor. Después de transcurrido el tiempo de corrimiento se sacó el gel de la cámara y se sumergió en una solución de bromuro de etidio durante 30 segundos. El gel se colocó en un transluminador de luz ultravioleta de longitud de onda corta. Para obtener un registro permanente del gel se tomaron fotografías blanco y negro. Paralelamente a los productos de PCR se corrieron marcadores de talla molecular conocida para determinar con comparación el tamaño de nucleótidos de cada control positivo.

El área física en donde se realizó la estandarización de la técnica de extracción del DNA viral fue el Laboratorio de Virología de la Facultad de Biología de la U.A.N.L. y la fase experimental se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la U.A.N.L.

RESULTADOS

Este estudio analizó la relación entre los parámetros clínicos de la enfermedad periodontal y la presencia o no de herpes virus y bacterias periodontopatógenas.

La muestra estuvo constituida por 28 pacientes del grupo experimental y 15 pacientes del grupo control.

Del total de pacientes del grupo experimental, 58% fueron del sexo femenino y 42% del sexo masculino.

Los pacientes presentaron edades desde los 30 y hasta los 62 años. Un 33% de pacientes se encuentran en el rango de edad de 51 a 62 años.

Se tomó a cada paciente, una muestra de saliva del piso de la boca con pipeta esteril, la cual se colocó en un tubo plástico estéril. Además se tomó una muestra de cada una de las piezas con papel filtro para hacer la determinación del fluido crevicular gingival y por último, una muestra con cureta estéril del contenido de la bolsa (en el caso de los pacientes del grupo experimental) y del surco en los pacientes del grupo control. Dichas muestras eran colocadas en un tubo plástico que contenía agua mili Q estéril. Todas las muestras fueron conservadas a -20°C , hasta el momento de su utilización.

Las mediciones son sonda hechas en las bolsas periodontales se agruparon en 3 categorías: mediciones de 4 a 5 mm, mediciones de 6 a 7 mm y mediciones mayores de 7 mm. La mayoría de los sitios que fueron muestreados (77%), presentaban una profundidad de bolsa de 6 mm o más. El 16% presentó una profundidad de bolsa de 1 a 3 mm, 0% de 4 a 5 mm y 5% de 5 a 6 mm.

El análisis de la cantidad de volumen encontrado en el FCG en ambos grupos arrojó un valor de las medidas aritméticas considerablemente diferente. Para el grupo control el promedio fue de 0,4275 ul y para el grupo experimental de 1,1008 ul. Esto demostró el hallazgo clínico de que en condiciones normales la cantidad de FCG es menor que en pacientes periodontalmente enfermos.

Se encontró que no hubo ninguna variable del estudio que se alterara por el género del paciente. Considerando que el porcentaje de mujeres que participó del estudio fue mayor, no produjo ninguna alteración estadística.

Cuadro No. 1

Parámetros clínicos evaluados

Paciente	Sexo	Edad	Pieza	Medición	Volumen	IH	ICP
1	F	43	1.6	7 mm	1.3	2	1
2	F	45	3.1	7 mm	0.7	4	3
3	F	36	2.6	6 mm	1.3	1	3
4	M	47	2.4	10 mm	-	2	0
5	M	49	2.4	8 mm	-	1	0
6	F	42	1.5	6 mm	1.3	1	2
7	M	37	2.7	9 mm	1.2	1	2
8	F	38	3.7	10 mm	0.7	2	3
9	F	53	2.2	7 mm	0.7	1	2
10	M	52	2.3	7 mm	1.2	2	3
11	F	49	3.4	8 mm	1.2	1	3
12	M	52	1.7	6 mm	0.7	2	0
13	M	52	2.6	7 mm	0.7	2	1
14	M	32	2.1	9 mm	0.6	0	3
15	M	46	3.1	6 mm	0.5	1	2
16	F	56	2.2	7 mm	0.6	2	1
17	M	40	1.7	5 mm	0.5	3	2
18	F	42	1.2	8 mm	0.8	2	1
19	M	43	1.5	8 mm	0.9	1	3
20	F	52	3.7	8 mm	0.7	1	2
21	F	38	1.1	7 mm	0.6	2	0
22	F	49	1.3	5 mm	1.7	3	1
23	M	46	1.6	7 mm	1.2	3	1
24	F	54	2.3	7 mm	1.4	2	4
25	M	44	1.3	7 mm	0.7	3	4
26	M	51	1.6	6 mm	0.6	1	4
27	F	44	3.7	6 mm	2	2	2
29	F	51	1.6	8 mm	1.5	1	2
1C	F	40	1.6	2 mm	0.8	1	2
2C	F	42	1.5	2 mm	0.7	0	1
3C	F	51	1.6	3 mm	1.3	2	3
4C	F	62	2.4	2 mm	0.4	0	1
5C	F	48	2.1	2 mm	0.4	1	1
6C	F	30	1.1	2 mm	0.6	0	1
7C	M	52	1.3	2 mm	0.6	0	5

Cuadro No. 2
Microorganismos encontrados

Edad	HSV	EBV	CMVH	P.g.	P.i.	S.i.	T.f.	A.a.
30-35	-	-	-	-	-	-	-	-
36-40	-	-	-	-	-	-	-	-
41-45	-	2	2	+	-	-	-	-
46-50	-	2	2	+	-	-	-	-
51-80	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	0	4	4	2	0	0	0	0

Figura No. 1
Distribución de las muestras por género

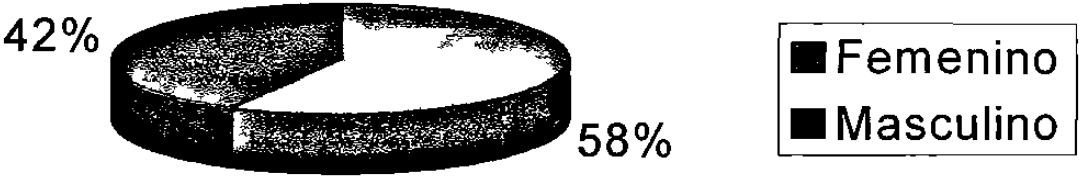
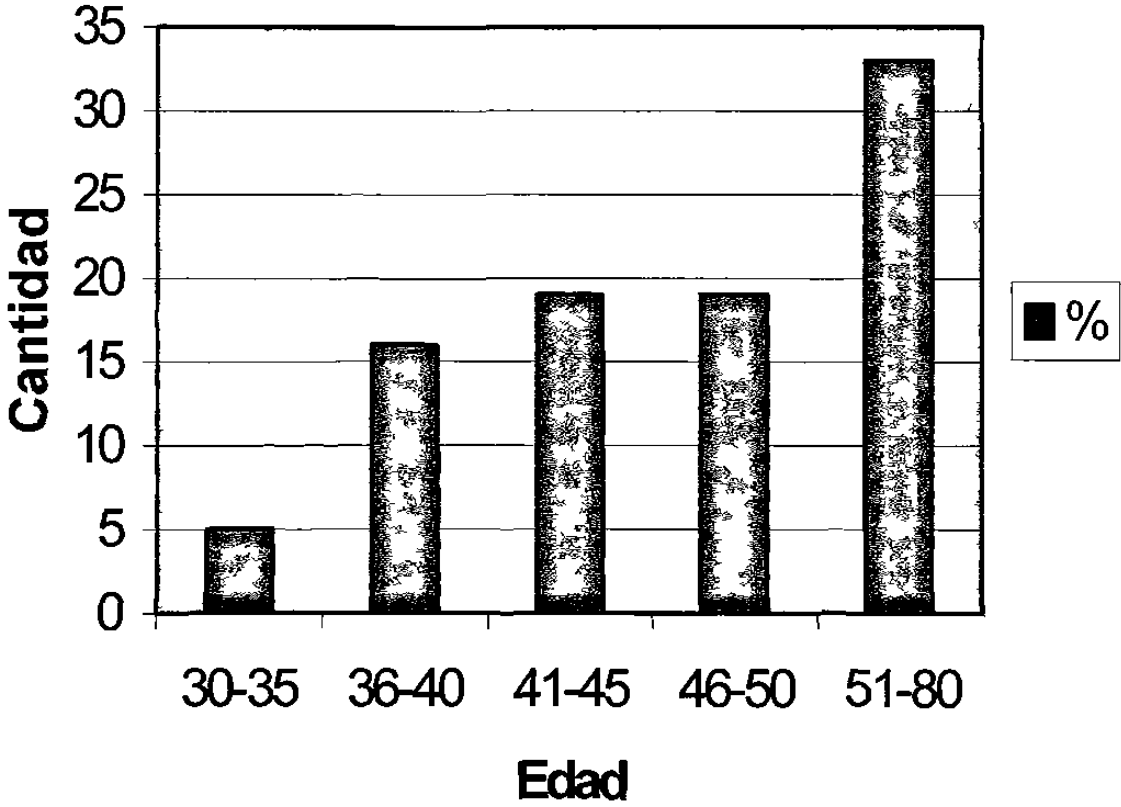


Figura No. 2
Distribución de las muestras por edad



DISCUSIÓN

La microbiota periodontal es una comunidad compleja de microbios. En la actualidad, se han descubierto alrededor de 500 microorganismos colonizando su flora bacteriana. (Paster, 2001). Sin embargo, hoy en día se conoce que solo un grupo limitado de bacterias tiene real efecto patológico en la enfermedad periodontal. Entre los agentes etiológicos con mayores factores de virulencia se presentan *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*, fusobacterias, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter rectus* y algunas espiroquetas.

De este grupo, *Porphyromonas gingivalis* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* son dos de las bacterias que han sido objeto de mayores investigaciones debido a su capacidad de colonización e invasión de los tejidos periodontales, a la forma de evadir las defensas del huésped y al daño tisular que producen en el periodonto.

P.gingivalis y *A. actinomycetemcomitans* son considerados microorganismos exógenos que se transmiten por la saliva y pueden causar enfermedades en huéspedes susceptibles cuando exceden los niveles de normalidad. Penetran los tejidos periodontales a través de ulceraciones en la pared de la bolsa periodontal o por perforación de los espacios intercelulares del epitelio.

P.gingivalis excreta proteasas destructivas tales como colagenasas y tripsinas (Holt, 1999). Esta bacteria, junto con algunas especies de *Prevotella*, constituye el grupo de microorganismos predominantes en la etiología de la Periodontitis crónica.

Actinobacillus actinomycetemcomitans libera toxinas como leucotoxinas, endotoxinas y citotoxinas, (Fives-Taylor P, 2000). Este microorganismo frecuentemente está relacionado con periodontitis agresivas en pacientes jóvenes como son la periodontitis prepuberal y en la periodontitis juvenil. Alrededor de los 21 a 40 años la presencia de esta bacteria relativamente disminuye, mientras que aumenta la cantidad de otros anaerobios gram negativos como *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *T. denticola*, Fusobacterias, *P. intermedia* y *P. nigrescens*.

En este estudio, fue comprobada la presencia de las bacterias periodontopatógenas en las muestras de saliva y cureta. Como se puede ver en la tabla de resultados, *P. gingivalis* fue la bacteria que se encontró más frecuente y esto es coincidente con otros estudios (Contreras, 1999; Michalowicz, 2000; Kamma, 2001; Pfister, 2002; Slots, 2003; Klein, 2003).

Sin duda alguna, los anaerobios gram negativos constituyen los microorganismos con mayor agresividad en la enfermedad periodontal.

Recientemente, algunas investigaciones han asociado la presencia de Cytomegalovirus humano (HCMV), el virus de Epstein-Barr (EBV) y el virus del Herpes Simple (HSV), en los tejidos periodontales con la etiopatogenia de la periodontitis. Estos miembros de la familia de los herpes virus (HV) también han sido relacionados con el aumento subgingival de la placa bacteriana y con las bacterias más agresivas para el periodonto.

Para comprobar la existencia de los HV en el tejido gingival y periodontal, Contreras y col. usaron el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el estudio de muestras gingivales y periodontales de 25 pacientes, 14 de ellos con periodontitis crónica (Contreras, 2000). En las muestras tomadas de los tejidos sanos se detectaron pocos casos de HCMV, EBV-1 y HSV. En cambio en las muestras de tejido gingival y periodontal procedente de pacientes con periodontitis se encontró una frecuente presencia de HV, el más común de ellos fue el HCMV, que se halló en un 64% en las muestras periodontales y en un 86% en los ejemplares de gíngiva, seguido de EBV-1 que se detectó en un 43% en las muestras periodontales y en un 79% en las biopsias gingivales. Todos los HV, en especial HSV, EBV-1, el virus del Herpes humano tipo 7 (HHV-7), el virus del Herpes humano tipo 8 (HHV-8), se hallaron con más frecuencia en el tejido periodontal enfermo. Esto demuestra una reiterada permanencia de HCMV y EBV-1 en las lesiones periodontales y una posible presencia de otros miembros de la familia de los herpesviridae en los tejidos gingivales.

En el presente estudio, de las muestras analizadas, se encontró un 40% positivo a HCMV, lo cual concuerda en alguna medida con los hallazgos del grupo de Contreras. No se encontraron resultados positivos de EBV ni de HSV. En el grupo de pacientes control, no fue posible encontrar ningún virus. El contenido tan bajo de virus encontrados en las muestras, obedece en parte al tipo de extracción de DNA, ya que en algunas ocasiones, era tan pequeño que no había posibilidad de que se realizara una buena amplificación de los primers virales. Por otra parte, la muestra tan pequeña que se logró tomar en algunos casos, hacía difícil realizar una extracción efectiva del material genético. Hay que mencionar además, que el hecho de que en este estudio no se haya encontrado más cantidad de virus en las muestras de pacientes con periodontitis, puede obedecer a el período de latencia del virus en el organismo del paciente a la hora de tomarse la muestra. Está documentado que existen períodos de latencia y períodos de actividad viral, aún siendo estos subclínicos (Knaup, 2000).

Debido a la periodicidad con que se puede encontrar HSV en las lesiones periodontales y a causa de la relativa posibilidad de detectar HSV-2 en la cavidad bucal, Contreras y col. realizó otro estudio (Contreras, 2001). Mediante PCR examinaron muestras periodontales procedentes de 26 pacientes con diferentes clases de periodontitis a quienes se les había detectado previamente HSV en el periodonto. Se comprobó la existencia de HSV-1 en las muestras de los 26 pacientes mientras que HSV-2 no fue detectado en ninguna de las muestras. Esto sugiere que el HSV-2 no tiene la capacidad de infectar los tejidos periodontales mientras que el HSV-1 si tiene dicha capacidad.

Con el fin de determinar la presencia subgingival y la relación que puede existir entre HCMV, EBV-1, HSV con la agresividad de la enfermedad periodontal y sus principales agentes bacterianos, Kamma y cols estudiaron un grupo de 16 pacientes con periodontitis de progreso rápido (Kamma, 2001). Estos pacientes asistieron a terapia y controles periodontales por un lapso de 5 a 10 años. Se obtuvo de cada paciente muestras de placa subgingival de dos sitios considerados estables periodontalmente y de dos lesiones en progreso. Fue detectada la frecuencia cada vez mayor de HV en sitios con periodontitis en progreso que en sitios estables. En los sitios de actividad se encontró un 59% de HCMV, 43% de EBV-1 y un 34% de HS y combinaciones de 2 o 3 de ellos en un 43%. La razón por la cual ciertos HV se presentan, aun en un mismo paciente, con mayor frecuencia en ciertos sitios periodontales, puede deberse al tropismo entre el tejido periodontal y los HV. Del grupo de bacterias estudiadas en el estudio de Kamma, *P. gingivalis* y *D. Pneumosintes* fueron encontradas con mayor frecuencia en los sitios de actividad, comparado con los sitios estables.

En la presente investigación, *P. gingivalis* fue la bacteria más encontrada, dándose una relación semejante con HCMV. Esto sugiere que sitios con profundidades de bolsa mayores de 6 mm, es probable encontrar ambos microorganismos.

Para evaluar la dependencia entre los HV y *P. gingivalis*, y la actividad de la enfermedad periodontal, Slots y col. analizaron los resultados de este mismo grupo bajo diferentes métodos estadísticos (Slots, 2003). Se encontró una alta asociación entre HCMV y HSV. Fue hallada una alta relación entre EBV-1 y HSV. No fue encontrada ninguna asociación entre HCMV y HSV. Se halló una relación de significancia entre HSV, *P. gingivalis* y la actividad de la periodontitis. También se encontró una estrecha relación entre HCMV, *P. gingivalis* y la actividad de la enfermedad, lo que refuerza la hipótesis de que ambos microorganismos son cofactores en el desarrollo de la actividad de la periodontitis. Aunque EBV-1 no presentó relación con *P. gingivalis*, sí fue significativo al ser relacionado con la agresividad de la enfermedad.

Debido a que se encontró una alta frecuencia de *D. pneumosintes* en las lesiones periodontales activas, Slots y col. realizaron un ensayo similar con el mismo grupo para sondear alguna posible interrelación entre HCMV, EBV-1 y HSV o alguna combinación de ellos y *D. pneumosintes* en el periodonto y algún consecuente signo de progreso de la periodontitis (Slots, 2002). Los resultados mostraron una estrecha relación entre la presencia de HCMV y la profundización de las bolsas periodontales, la pérdida ósea y el progreso de la enfermedad. EBV-1 y HSV fueron asociados con la presencia de bolsas periodontales profundas, pérdida de soporte periodontal y la actividad de la periodontitis. *D. Pneumosintes* estuvo relacionada con la profundidad de bolsas y el progreso de la enfermedad periodontal. HCMV mostró un estrecho nexo con *D. pneumosintes* sobretodo cuando se le vinculó con la pérdida ósea. No se presentó ninguna afinidad entre los restantes herpes virus y *D. Pneumosintes*. Esto podría proponer que una íntima relación entre HCMV y *D. pneumosintes* estimularía el progreso de ciertas periodontitis.

Genomas de HCMV y EBV-1 han sido hallados en periodontitis severas, en periodontitis juvenil, en periodontitis asociadas con el síndrome de Papillon Lefèvre, Síndrome de Down y el HIV.

Para investigar la relación de HCMV, EBV-1 y HSV con la periodontitis crónica y el vínculo entre estos y los parámetros clínicos, Saygun y cols. realizaron un análisis de muestras de placa subgingival de 30 pacientes con periodontitis crónica y 21 pacientes periodontalmente sanos junto con sus respectivos índices de evaluación. Los resultados confirmaron una repetida presencia de HCMV y EBV-1 en los ejemplares provenientes de las lesiones periodontales, observándose un fuerte vínculo de ambos virus y el hallazgo de bolsas periodontales profundas y la pérdida de inserción.

En el presente estudio, si se pudo demostrar que todos los parámetros clínicos que fueron registrados antes del tratamiento periodontal, tales como el Índice hemorrágico, el Índice de placa bacteriana, así como el volumen de fluido crevicular gingival, están íntimamente relacionados con sitios de actividad. En todos los pacientes del grupo experimental, se pudo observar un porcentaje muy elevado de sitios inflamados, con profundidades de bolsa mayores de 5 mm, y con porcentajes muy altos de placa bacteriana. Esto se pudo asociar también con la presencia de HCMV y *P.gingivalis*, ya que en los sitios en que ambos microorganismos fueron detectados, se pudo observar un nivel alto de placa bacteriana, un índice de hemorragia gingival alterado, y un volumen alto de fluido crevicular gingival. Se puede concluir de estos valores clínicos, que aquellos sitios que mostraron mayores profundidad de bolsa, así como hemorragia y placa bacteriana, están altamente relacionados con la presencia de HCMV y *P.gingivalis*.

Los herpes virus tienen la capacidad de infectar las células que intervienen en la respuesta inflamatoria. HCMV infecta en la etapa aguda a los monocitos periféricos y a los linfocitos, mientras que en la etapa latente, se puede encontrar en los monocitos. EBV puede ser detectado de forma latente en linfocitos B, (). El virus del herpes humano tipo 6 (HHV-6) infecta principalmente linfocitos T y en ocasiones a los linfocitos B. HSV puede infectar a los keratinocitos, monocitos y macrófagos. En la periodontitis el tejido periodontal es altamente infiltrado por células mononucleares sobretodo, linfocitos T y B, leucocitos polimorfonucleares y macrófagos.

Para examinar si HCMV, EBV-1, HHV-6 y HSV pueden infectar las células inflamatorias del periodonto, se realizó un estudio de 23 biopsias, 20 tomadas de lesiones periodontales de adultos y 3 de gingiva clínicamente sana, usando métodos de clasificación celular inmunomagnética y PCR (Contreras, 1999). Se encontró una presencia de HV en el 90% de las biopsias, con mayor frecuencia se detectaron HCMV (65%) y EBV-1 (50%), y HHV-6 en menor frecuencia. En el grupo de periodontitis, 70% de las fracciones celulares revelaron herpes virus. HCMV se halló en los monocitos/macrófagos (55%), y linfocitos T (20%). EBV-1 se detectó en linfocitos B en un 45%. HSV fue encontrado en 20% de la muestra de los linfocitos T y en 5% del antígeno usado para monocitos/macrófagos. HHV-6 no fue encontrado en ninguna fracción celular. En los polimorfonucleares no fue

detectado ningún virus. Las fracciones celulares procedentes de gingiva sana también estuvieron libres de la presencia de virus. Estos datos muestran que entre las células propias de la respuesta inflamatoria del periodonto pueden ingresar algunos monocitos/macrófagos, linfocitos T y B infectados por diferentes tipos de HV y esto podría inducir a anomalías en el metabolismo y en la respuesta de defensa de las células infectadas.

Ya que la frecuencia de HCMV y EBV-1 en casos de periodontitis agresivas y a su aparente relación con el aumento de *P.gingivalis*, *T. forsythensis*, *P. intermedia*, *P.nigrescens*, A.a. entre otros microorganismos gram negativos anaerobios y debido a la capacidad que estos HV poseen de infectar las células inflamatorias que se presentan en la periodontitis ciertos estudios los sugieren como un posible factor en la etiología de la enfermedad periodontal (Contreras, 2000; Slots,2000), se ha propuesto un nuevo modelo etiológico para ciertos tipos de periodontitis. Este se desarrollaría como resultado de un complejo proceso producto de la interacción entre los herpes virus, la flora bacteriana, la respuesta inmune del huésped y una variedad de factores del medio (inmunosupresión, tabaco, etc.). Se propone que con el desarrollo de la gingivitis, ocasionada por la formación y acumulación de la placa, las células de la respuesta inflamatoria, entre ellos los linfocitos T y B, los monocitos y macrófagos infectados por los HV, se infiltrarían en el tejido periodontal. Al producirse alguna reactivación de los HV periodontales la resistencia del tejido periodontal disminuiría, lo que conduciría al aumento de la población bacteriana y a la estimulación de la liberación de las citoquinas, interleucinas y otros mediadores químicos, que llevarían a la destrucción de los tejidos periodontales. Muchos factores que pueden producir la reactivación de los HV son también considerados indicadores de riesgo de la enfermedad periodontal, como por ejemplo, infecciones HIV, estados de inmunosupresión, estrés, cambios hormonales, tabaco, etc. Además la reactivación de los HV en el periodonto podría estar también influenciada por la liberación de las enzimas bacterianas, que ocasionaría un círculo vicioso en el desarrollo de la enfermedad periodontal.

CONCLUSIONES

- 1) Los parámetros clínicos de la enfermedad periodontal están estrechamente relacionados con la actividad de la enfermedad.
- 2) Los sitios que presentan bolsas periodontales profundas, presentan niveles mas altos de inflamación, acumulación de placa bacteriana y un mayor volumen de fluido crevicular gingival.
- 3) Se pudo determinar la presencia de HCMV en bolsas profundas, con niveles altos de fluido crevicular gingival, tendencia a la hemorragia y mayor acumulación de placa bacteriana.
- 4) Existe una estrecha relación entre los HCMV y la P.gingivalis y el deterioro del periodonto en los pacientes del grupo experimental.
- 5) No se pudo determinar la presencia de herpes virus en los sitios sanos, correspondientes a los pacientes del grupo control.
- 6) No se pudo determinar la presencia de bacterias en las muestras de pacientes del grupo control.
- 7) No se puede descartar que las muestras de los sitios con poca profundidad de bolsa no tengan virus ni bacterias, debido a que dichas muestras fueron muy difíciles de obtener, y probablemente, la extracción del DNA no se realizó exitosamente.

LIMITACIONES

- 1) Lograr la participación de los pacientes que reunieran todos los criterios de inclusión.
- 2) Fue difícil obtener las muestras de *fluido crevicular gingival* con cureta, ya que fácilmente se contaminaban con sangre, y el volumen recogido era muy pequeño.
- 3) La cantidad de DNA contenido en las muestras de saliva y cureta resultó ser muy pequeño para evidenciarse en una electroforesis, planteando la duda de si la extracción se realizó correctamente, o si la muestra no contenía virus o bacterias.
- 4) El tiempo para la realización del estudio se convirtió un factor limitante, principalmente por el atraso en la obtención de los cultivos de virus, para hacer la estandarización de la técnica.

ANEXOS

Anexo No. 1: Hoja de consentimiento

Proyecto de investigación:

“Detección de Bacterias y Virus en pacientes con periodontitis crónica y su relación con la enfermedad.”

Hoja de información para el paciente

La enfermedad que usted padece afecta los tejidos que rodean al diente, principalmente, la encía y el hueso. Esta enfermedad se caracteriza por:

- Producir enrojecimiento de las encías
- Sangrado de las encías al cepillarse o al comer
- Movilidad de los dientes
- Desplazamiento de los dientes fuera de su lugar normal
- Pérdida de hueso de soporte de los dientes
- Pérdida de los dientes

Son muchas las personas que padecen de esta enfermedad en nuestro país. Por este motivo, estamos desarrollando una investigación para determinar el efecto que pudiera tener la presencia de ciertas bacterias y virus en la enfermedad que usted padece.

La información que usualmente se recopila cuando se le hace su estudio (la historia médica, las radiografías y la historia clínica), será utilizada en este estudio. Además de esto, se le tomarán muestras de saliva y del líquido de las encías. Estos valores serán tomados antes y después de realizarle el tratamiento de fase inicial (limpiezas). Esto se hace con la finalidad de ver si el tratamiento altera en alguna medida la presencia o no de las bacterias o virus que pudieran encontrarse. Tanto las muestras de saliva como las del líquido de las encías, no producen dolor ni molestias. Una vez hechos los análisis de las muestras que se tomen, se le estará dando el resultado.

¿Que le implica a usted participar de este estudio?

- Estar anuente a participar en el estudio
- Asistir puntualmente a sus citas
- Realizarse el tratamiento de fase inicial (limpiezas)
- Permitir que tomemos muestras de saliva y del líquido de las encías antes y después de terminado el tratamiento de fase inicial (limpiezas).

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si usted no desea participar de este estudio, se realizará su tratamiento periodontal sin ninguna alteración. Este estudio está planeado realizarse con 30 pacientes que padezcan de esta enfermedad y 15 pacientes que no la padezcan.

No existe ningún riesgo que comprometa su salud al participar en esta investigación.

Hoja de Consentimiento Informado

Si usted desea participar en este estudio, favor lea, llene y firme la siguiente información:

Yo, Ausencia Brioyes Esquivel, acepto
(nombre completo)

participar en el proyecto de investigación "*Detección de Bacterias y Virus en pacientes con periodontitis crónica y su relación con la enfermedad*", teniendo conocimiento de que las autoridades pertinentes y el Comité de Investigación y Ética tendrán acceso directo a mis registros originales, sin violar la confidencialidad a la cual tengo derecho en la medida que lo permitan las leyes y regulaciones aplicables y que, al firmar el documento del Consentimiento informado yo o mi representante legal lo autorizamos.

En caso de que se publiquen los resultados del estudio, su identidad permanecerá confidencial y se mantendrá informado oportunamente sobre cualquier nuevo hallazgo que surja en el transcurso del estudio.

Gisella Rojas
31/05/04
Firma de Tesista
Gisella Rojas González

Ausencia B.-E.
Firma del participante

Anexo No. 1 : Hoja de consentimiento (parte de atrás)

Anexo No. 2: Hoja de recolección de la información

43 años
no tiene tel.

1-1.0

Nombre del paciente: Ausencia Briones Esquivel.	No. 1
Fecha: 2/6/04	Fecha:

Saliva:	1 A	1 B	Saliva:	A	B
---------	-----	-----	---------	---	---

1H | ICP

2 | 1

Pieza: 1.6 DV 7mm.

Lectura: C	
142	1.3
Volumen:	

FCG/PCR D viral	

FCG/PCR E viral	

2 | 1

Pieza: 1.2 MV 7mm.

Lectura: F	
189	1.5
Volumen:	

FCG/PCR G viral	

FCG/PCR H viral	

1 | 3.

Pieza: 2.7 MV 7mm.

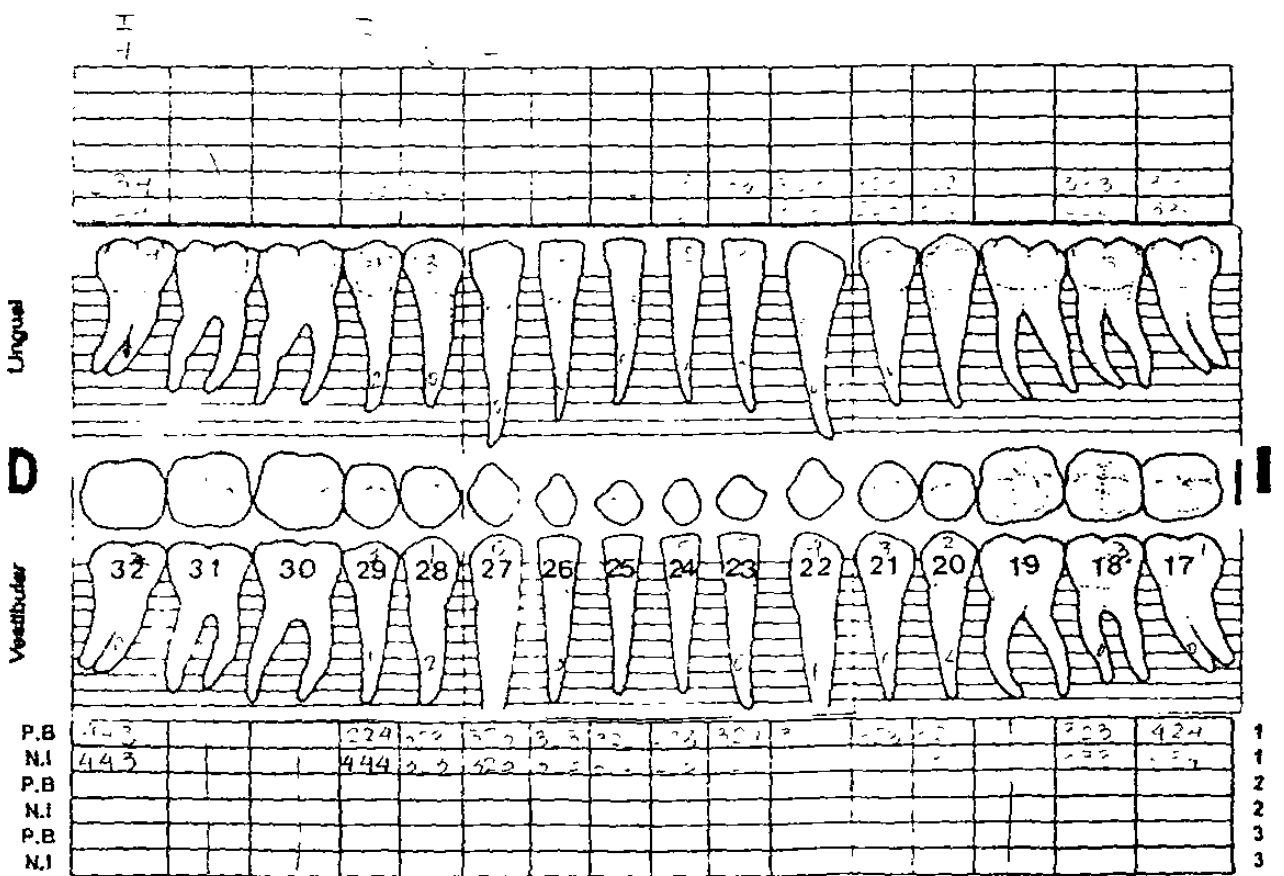
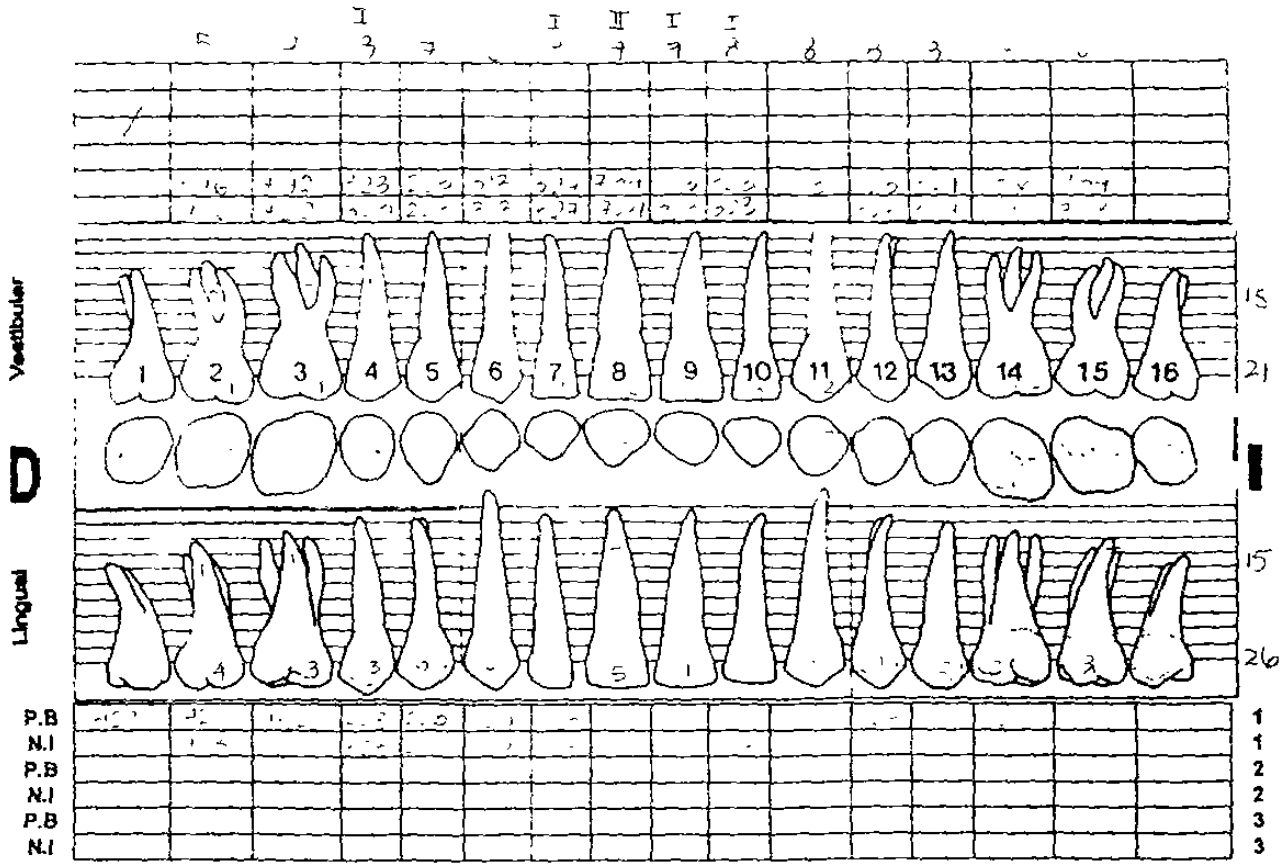
Lectura: I	
171	1.4
Volumen:	

FCG/PCR J viral	

FCG/PCR K viral	

PERIODONTOGRAMA

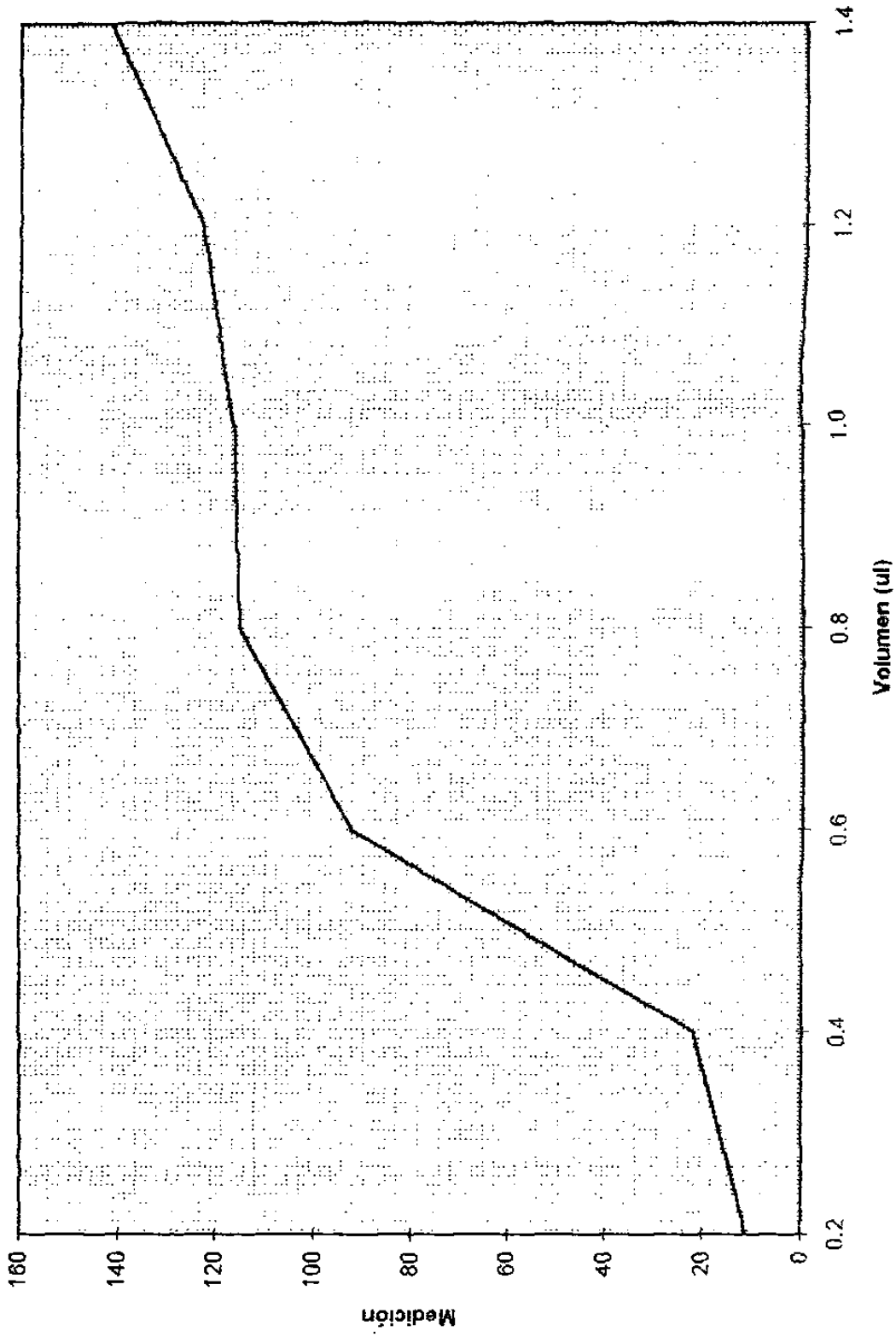
Examen de radiografía
y placa oral



- I Falta de diente
- Area periapical
- ✓ Cráter
- ⋈ Frenillo
- Caries
- ↑ ↘ ↻ Mal posición
- ✗ Diente a extraer
- || Impacto alimenticio
- I, II, III Movilidad
- ▲ Furcación
- ∩ Infraósea
- ∠ Margen Irregular

Anexo No. 3: Curva de calibración del Periotron 6000

Anexo 4: Curva de calibración del Periotrón 6000



Anexo No. 4: Protocolo de la extracción de DNA con Tryzol

II. ISOLATION OF DNA BY TRI REAGENT

The DNA is isolated from the interphase and phenol phase separated from the initial homogenate as described in the RNA isolation protocol. Following precipitation and a series of washes, the DNA is solubilized in 8 mM NaOH, neutralized and used for analysis. The DNA isolated by TRI REAGENT can be used for PCR, restriction digestion and Southern blotting. In addition, full recovery of DNA from tissues and cultured cells permits the use of TRI REAGENT for determination of the DNA content in analyzed samples (2).

PROTOCOL

Reagents required, but not supplied: ethanol, sodium citrate and sodium hydroxide.

The protocol includes the following steps:

1. DNA PRECIPITATION - phenol phase and interphase + 0.3 ml ethanol (1 ml TRI REAGENT).
2. DNA WASH - 1 ml 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol x 2.
- 2 ml 75% ethanol.
3. DNA SOLUBILIZATION - 8 mM NaOH.

The procedure is carried out at room temperature, unless stated otherwise.

The protocol describes isolation of DNA from the phenol phase and interphase of samples homogenized (or lysed) in 1 ml of TRI REAGENT.

1. DNA PRECIPITATION

Remove the remaining aqueous phase overlying the interphase. Precipitate DNA from the interphase and organic phase with ethanol. Add 0.3 ml of 100% ethanol per 1 ml of TRI REAGENT used for the initial homogenization, and mix samples by inversion. Next, store the samples at room temperature for 2-3 minutes and sediment DNA by centrifugation at 2,000 g for 5 minutes at 4 C. Careful removal of any residual aqueous phase is critical for the quality of the isolated DNA.

See Notes (6) for an alternative DNA isolation procedure.

2. DNA WASH

Remove the phenol-ethanol supernatant and store at 4 C for the subsequent protein isolation. Wash the DNA pellet twice in a solution containing 0.1 M sodium citrate in 10% ethanol. Use 1 ml of the solution per 1 ml of TRI REAGENT used for the initial homogenization. At each wash, store the DNA pellet in the washing solution for 30 minutes at room temperature with periodic mixing and centrifuge at 2,000 g for 5 minutes at 4 - 25 C. Next, suspend the DNA pellet in 75% ethanol (1.5-2 ml of 75% ethanol per 1 ml TRI REAGENT), store for 10 - 20 min at room temperature with periodic mixing and centrifuge at 2,000 g for 5 minutes at 4-25 C. This ethanol wash removes pinkish color from the DNA pellet.

An additional wash in 0.1M sodium citrate-10% ethanol is required for large pellets containing >200 µg DNA or large amounts of a non-DNA material.

3. DNA SOLUBILIZATION

Remove the ethanol wash and briefly air-dry the DNA pellet by keeping tubes open for 3 - 5 minutes at room temperature. Dissolve the DNA pellet in 8 mM NaOH by slowly passing through a pipette. Add an adequate amount of 8 mM NaOH to approach a DNA concentration of 0.2 - 0.3 µg/µl. Typically, add 0.3 - 0.6 ml 8 mM NaOH to DNA isolated from 50 - 70 mg of tissue or 10⁷ cells. The use of a mild alkaline solution assures full solubilization of the DNA pellet. At this stage, the DNA preparations (especially from tissues) still contain insoluble material (fragments of membranes, etc.) Remove this material by centrifugation at 12,000 g for 10 minutes and transfer the resulting supernatant containing DNA to new tubes. A high viscosity of the supernatant indicates the presence of high molecular weight DNA.

QUANTITATION OF DNA

For optimal spectrophotometric measurements, DNA aliquots should be diluted with water or buffer with a pH > 7.5. Distilled water with a pH < 7.0 falsely decreases the 260/280 ratio and impedes the detection of protein in RNA samples (7).

Calculate the DNA content assuming that one A₂₆₀ unit equals 50 µg of double-stranded DNA/ml. For calculation of the cell number in analyzed samples, assume that the amount of DNA per 10⁶ of diploid cells of human, rat and mouse origin equals 7.1 µg, 6.5 µg and 5.8 µg, respectively (5). A typical preparation of DNA isolated from tissues is composed of 60-100 kb DNA (70%) and ~20 kb DNA (30%). Preparations isolated from cultured cells contain >80% of 60-100 kb DNA and <20% ~20 kb DNA. The isolated DNA is free of RNA and proteins and has a 260/280 ratio >1.7.

Expected yield: A) Tissues (µg DNA/mg tissue): liver, kidney, 3-4 µg; skeletal muscles, brain, placenta 2-3 µg. B) Cultured human, rat and mouse cells 5-7 µg DNA/10⁶ cells).

AMPLIFICATION OF DNA BY PCR

Following solubilization in 8 mM NaOH, adjust the pH of the DNA sample to 8.4 using HEPES (see Table). Add an aliquot of the sample (typically 0.1 - 1 µg DNA) to a PCR reaction mix and perform PCR according to your standard protocol.

DIGESTION OF DNA BY RESTRICTASES

Adjust the pH of the DNA solution to a required value using HEPES (see Table). Alternatively, dialyze samples against 1 mM EDTA, pH 7 - pH 8. Carry out the DNA restriction for 3 - 24 h under optimal conditions for a specific restrictase using 3-5 units of the enzyme per µg DNA. In a typical assay, 80-100% of the DNA preparation is digested by restrictases.

Adjustment of pH in DNA samples solubilized in 8 mM NaOH.

For 1 ml of 8 mM NaOH use the following amounts of 0.1 M or 1 M HEPES (free acid):

Final pH - 0.1 M HEPES (µl)	Final pH - 0.1 M HEPES (µl)	Final pH - 1 M HEPES (µl)
8.4 86	7.8 117	7.2 23
8.2 93	7.5 159	7.0 32
8.0 101		

NOTES

1. If necessary, the phenol phase and interphase can be stored at 4 C overnight. Samples suspended in 75% ethanol can be stored at 4 C for a long period of time (months). Samples solubilized in 8 mM NaOH can be stored overnight at 4 C. For prolonged storage, adjust samples to pH 7 - 8 and supplement with 1 mM EDTA.
2. Molecular weight of the isolated DNA depends on the shearing forces applied during homogenization. When possible, use a loosely fitting homogenizer. Avoid using a Polytron homogenizer.
3. The isolation protocol can be modified if the DNA is isolated only for quantitative purposes: a) a more vigorous homogenization of samples can be performed, including the use of Polytron; b) phenol phase and interphase can be stored at 4 C for a few days or at -70 C for a few months; c) solubilization of DNA can be facilitated by replacing 8 mM NaOH with a 40 mM solution, and by vortexing of the DNA pellet instead of pipetting.
4. Do not shorten the recommended time of storing samples with the washing solutions. These are the minimal periods of time necessary for efficient removal of phenol from the DNA pellet.
5. To assure full recovery of DNA from small samples (< 10 µg DNA), we recommend the use of Polyacryl Carrier™ (cat. no. PC 152). Perform homogenization, phase separation and removal of the aqueous phase as described in the RNA Isolation section of the protocol. Remove any remaining aqueous phase overlying the interphase and add 2 - 8 µl of Polyacryl Carrier to the interphase - phenol phase. Perform DNA precipitation as described in Step 1 of the DNA Isolation procedure. Replace the sodium citrate washes described in Step 2 by performing two 10 minute washes of the DNA/carrier pellet using 75% ethanol with intermittent mixing. Proceed with DNA solubilization as described in the protocol.
6. This alternative procedure replaces steps 1 - 2 of the DNA Isolation procedure. Prepare a back extraction buffer containing: 4 M guanidine thiocyanate, 50 mM sodium citrate and 1 M Tris (free base).
Following phase separation (RNA Isolation Procedure Step 2), remove any remaining aqueous phase overlying the interphase and add back extraction buffer to the interphase - organic phase mixture. Use 0.5 ml of back extraction buffer per 1.0 ml of TRI Reagent used for the initial homogenization. Vigorously mix the sample by inversion for 15 sec and store for 10 min at room temperature. Perform phase separation by centrifugation at 12,000 g for 15 min at 4 C. Transfer the upper aqueous phase containing DNA to a clean tube and save the interphase and organic phase at 4 C for subsequent protein isolation. Precipitate DNA from the aqueous phase by adding 0.4 ml of isopropanol per 1.0 ml of TRI Reagent used for the initial homogenization. Mix the sample by inversion and store for 5 min at room temperature. If the expected DNA yield is less than 20 µg, add 2 - 8 µl of Polyacryl Carrier to the aqueous phase prior to isopropanol addition and mix. Sediment DNA by centrifugation at 12,000 g for 5 min at 4 - 25 C and remove the supernatant. Wash the DNA pellet with 1.0 ml of 75% ethanol and proceed with DNA solubilization as described in Step 3.
7. Also see the Troubleshooting Guide on the last page of this booklet.

Anexo No. 5: Protocolo de extracción de DNA con sílica

Extracción de DNA con partículas de Sílica

Materiales:

Sílica 100 g Sigma #S-5631
GuSCN 500 g
Triton X-100 10 mL
0.2 M EDTA (pH 8.0) 100 mL
Tris-HCl (pH 6.4) 250 mL
Ethanol (95% o 70%) 500 mL
NaCl
50 mL de tubos cónicos
1,5 mL de tubos para centrifugar
Papel aluminio
10 M HCl

Preparación de las soluciones:

A. Sílica (tiempo de preparación: 2 días)

1. Agregar 6 g SiO₂ a un tubo Falcon de 50 mL y llenarlo hasta la marca de 50 mL con agua desionizada (dH₂O)
2. Vortex y esperar que se asiente 24 horas a temperatura ambiente
3. Remover los 43 mL superiores de líquido (aspirar)
4. Rellenar con 50 mL de dH₂O, vortex y esperar a que se asiente 5 horas a temperatura ambiente
5. Remover los 44 ml de líquido superior
6. Agregar 60 uL de 10 M HCl
7. Vortex (homogenizar) y preparar alícuotas para almacenamiento. Se recomienda hacer alícuotas de 500 uL envueltos en papel aluminio (estable por 6 meses a temperatura ambiente).

B. Buffer de extracción

1. Combinar 24 g GuSCN (tiocyanato de guanidina) y 20 mL 0.1 M Tris-HCl (pH 6.4) en un tubo Falcon de 50 mL
2. Calentar a 60°C hasta disolver el GuSCN
3. Agregar 4.4 mL de 0.2 M EDTA (pH 8.0)
4. Agregar 0.5 mL Triton X-100
5. Mezclar por inversión
6. Agregar 0.5 mL de suspensión de sílica, mezclar y dejar reposar por 1 hora a temperatura ambiente

7. Eliminar la sílica por centrifugación. Conservar el sobrenadante envuelto en papel aluminio o transferirlo a una botella oscura (es estable 1 mes a temperatura ambiente).

Nota: pasos 6 y 7 remueven DNA contaminado del buffer

Buffer de lavado (hay que hacer el doble para que rinda lo mismo que el buffer de extracción)

1. Combine 24 g de GuSCN y 20 mL 0.1 M Tris-HCl (pH 6.4) en un tubo Falcon de 50 mL
2. Calentar a 60°C hasta disolver el GuSCN
3. Agregar 4.4 mL de 0.2 M EDTA (pH 8.0)
4. Mezclar por inversión
5. Agregar 0.5 mL de la suspensión de sílica, mezclar y dejar asentar por lo menos 1 hora a temperatura ambiente
6. Centrifugar para eliminar la sílica. Guardar el sobrenadante envuelto en papel aluminio o en una botella oscura (estable por 1 mes a temperatura ambiente)

Ethanol para lavar

70% EtOH suplementado con 10 mM NaCl (ej. para 500 mL agregue 368.4 mL EtOH 95%, 1.25 mL 4M NaCl, llenar hasta llegar a 500 ml con dH₂O)

Protocolo general para tejidos suaves

1. Combinar 900 uL del buffer de extracción y 40 uL sílica en suspensión a un microtubo de 1.5 mL y vortex
2. Agregar tejido y vortex
3. Dejar reposar 10 min a temperatura ambiente
4. Vortex brevemente para romper la sílica, luego centrifugar (15 s) a 12,000 x g. Descartar sobrenadante por aspiración into the side-arm flask
5. Lavar el pellet de sílica dos veces con el buffer de lavar al agregar 1 mL de buffer, vortex (a veces es más rápido usar la punta de una pipeta para quebrar el pellet) y centrifugar (15 s a 12,000 x g). Descartar (por aspiración) el sobrenadante cada vez.
6. Lavar dos veces con ethanol 70% (como se mencionó antes). Agregar 1 mL, vortex, centrifugar. Descartar (aspiración) el sobrenadante.
7. Secar el pellet final en la campana con la tapa abierta
8. Resuspender el pellet en 75 ul TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)
9. Vortex brevemente e incubar por lo menos 10 minutos (hasta varias horas) a 55°C.

10. Vortex. Centrifugar 2 minutos a 12,000 x g. Transferir sobrenadante a un nuevo tubo.
11. Repetir pasos 8-10, combinando el segundo alícuota de TE con el primero en el paso 10. Si queda mucha sílica es recomendable volver a centrifugar y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
12. Almacenar a 4°C (poco tiempo) o a -20°C (largo tiempo).

BIBLIOGRAFÍA

1. Amit, R. y otros. Detection of Herpes Simplex virus in gingival tissue. JP, 1992.
2. Avila-Campos, M.J. y otros. Specific primer for AP-PCR identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Clin Periodont, 1999.
3. Boom, R. y otros. A Highly sensitive assay for detection and quantitation of Human cytomegalovirus DNA in serum and plasma by PCR and electrochemiluminescence. J of Clinical Microbiology, 1999.
4. Boom, R. y otros. Rapid and Simple method for purification of nucleic acids. Journal of Clinical Microbiology. 1990.
5. Carranza, F. Y Newman, M. Periodontología Clínica. 8va. edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana, 1998.
6. Cassai, E. y otros. HHV-6, HHV-7, HHV-8 in gingival biopsies from chronic adult periodontitis patients. J Clin Periodont, 2003.
7. Contreras, A., Umeda, M., Chen, C., Bakker, I., Morrison, J.L. and Slots, J. Relationship Between Herpesviruses and Adult Periodontitis and Periodontopathic Bacteria. J. Periodontology, 1999.
8. Contreras, A. and Slots, J. Mammalian viruses in human periodontitis. Oral Microbiol Immunol, 1996.
9. Contreras, A. Slots, J. Active cytomegalovirus infection in human periodontitis. J. Microb Immunol, 1998.
10. Contreras, A. y otros. Herpesviruses in HIV-periodontitis. J Clin Periodontol, 2001.
11. Contreras, A. y Slots, J. Herpesviruses in human periodontal disease. J Periodontal Res, 2000.
12. Contreras, A. y Slots, J. Typing of herpes simplex virus from human periodontium. Oral Microbiol Immunol, 2001.
13. Contreras, A., Nowzari, H. and Slots, J. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. Oral Microb Immunol, 2000.
14. Contreras, A., Zader, H.H., Nowzari, H. and Slots, J. Herpesvirus infection of inflammatory cells in human periodontitis. Oral Microbiol Immunol 1999.
15. Ehrlich, J. y otros. Specific Herpes simplex virus antigen in human gingiva. JP, 1983.
16. Espy, M. y otros. Comparison of three methods for extraction of viral nucleic acids from blood cultures. Journal of Clinical Microbiology, 1995.
17. Griffiths, Gareth. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. Periodontology 2000, Vol. 31, 2003.
18. Haffajee, A.D. y Socransky, S.S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. En Microbiology and Immunology of periodontal diseases. Periodontology 2000, 1994.
19. Hartroth, B. y otros. Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters. Oral microb immunol, 1999.

20. Hernández, S. M., Fernández, C.C. y Baptista, P. Metodología de la Investigación. 2ª. Edición. Mc Graw Hill, México, 1998.
21. Hockman, N. y otros. Antibodies to herpes simplex virus in human gingival fluid. JP. 1981.
22. Holt, S. y otros. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Periodontology 2000, 1999.
23. Johnson, G. y otros. Comprehensive PCR-based assay for detection and species identification of human herpesviruses. Journal of Clinical Microbiology, 2000.
24. Kamma, J.J. , Contreras, A. and Slots, J. Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. J Clin Periodontol 2001.
25. Kamma, J.J., Slots, J. Herpesviral-bacterial interactions in aggressive periodontitis. J. Clin. Periodontology, 2003.
26. Kiname, D. Y Lindhe, J. Capítulo 5 del texto Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Linde, J. 3era. Edición. Editorial Panamericana, 2000.
27. Klein, M. y Goncalves, B. Detection of *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) and *Porphyromonas gingivalis* by Polymerase Chain Reaction in subjects with different periodontal status. JP, 2003.
28. Knaup, B. y otros. Subclinical reactivation of herpes simplex virus type 1 in the oral cavity. Oral Microb Immunol, 2000.
29. León-Ponce, M. Relación entre los herpes virus y la periodontitis. Ecuadontólogos, Vol. 2, No. 2. , 2004.
30. Löe H. y Holm-Pederson P. Absence and presence of fluid from normal and inflamed gingivae. Periodontics, 1965.
31. Löe H., Silness J. Periodontal disease in pregnancy. Acta Odontológica Scand 21:533, 1963.
32. Mardirossian, A. y otros. Herpesviruses 6, 7 and 8 in HIV-and non-HIV-associated periodontitis. J Periodont Res, 2000.
33. Mickalowicz, B. y otros. Human herpesviruses and *P. gingivalis* are associated with juvenile periodontitis. JP, 2000.
34. Parra, B. and Slots, J. Detection of human viruses in periodontal pockets using polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol, 1996.
35. Paster, BC. y otros. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol, 2001.
36. Pfister, E. Comparison of microbial cultivation based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. J Clin Periodon, 2002.
37. Rones, Y. y otros. Sensitivity of oral tissues to herpes simplex virus-in vitro. JP, 1983.
38. Roslog, L. y otros. Stress and immunity: implications for viral disease and wound healing. JP, 1999.
39. Sanchez, J. y Storch, G. Multiplex, Quantitative, Real-Time PCR Assay for cytomegalovirus and Human DNA. Journal of Clinical Microbiology, 2002.
40. Saygun, I. y otros. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus type 1 in periodontal abscesses. Oral Microbiology and Immunology, 2004.
41. Saygun, I., Sahin, S., Atilla, Özdemir, Kurtis, B., Yapar, M., Kubar, A. and Özcan, G. Detection of Human Viruses in Patients with Chronic

- Periodontitis and the Relationship Between Viruses and Clinical Parameters. *J Periodontol* 2002.
42. Shin, C. y otros. Detection and Typing of HSV-1, HSV-2, CMV and EBV by Quadruplex PCR. *Yonsei Medical Journal*, 2003.
 43. Slots, J. Herpesviruses in periodontal diseases. *Periodontology* 2000, 2005.
 44. Slots, J. The herpesvirus-*Porphyromonas gingivalis*-periodontal axis. *J Periodont Res*, 2003.
 45. Slots, J. y otros. Cytomegalovirus periodontal presence is associated with subgingival *Dialister pneumosintes* and alveolar bone loss. *Oral Microbiol Immunol*, 2002.
 46. Slots, J. y otros. Herpesviruses: a unifying causative factor in periodontitis? *Oral Microbiol Immunology*, 2000.
 47. Tang, Y. y otros. Molecular diagnosis of herpes simplex virus infections in the central nervous system. *Journal of clinical microbiology*, 1999.
 48. Turesky, S., Gilmore ND, Glickman I. Reduced plaque formation by the chloromethyl analogue of vitamin C. *J Periodontology* 41, 1970.
 49. Van Steenberghe, D. Capítulo 10 del texto *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. Linde, J. 3era. Edición. Editorial Panamericana, 2000.
 50. Yapar, M., Saygun, I., Özdemir, A., Kubar, A. and Sahin, S. Prevalence of Human Herpesviruses in Patients with Aggressive Periodontitis. *J. Periodontology*, 2003.
 51. Zakay-Rones, Z. y otros. Immunological response to herpes simplex virus in human gingival fluid. *JP*, 1982.
 52. Zakay-Rones, Z. y otros. The sulcular epithelium as a reservoir for herpes simplex virus in man. *JP*, 1973.

0150667

