

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DETECCION MOLECULAR DE BACTERIAS
ASOCIADAS A PERIODONTITIS DEL ADULTO

TESIS

COMO REQUISITO
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA

CD. MYRIAM ANGELICA DE LA GARZA RAMOS

MONTERREY, N. L., MEXICO DICIEMBRE 1998

TM
RK361
G37
c.1



1080087109

9514 14019

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DETECCION MOLECULAR DE BACTERIAS
ASOCIADAS A PERIODONTITIS DEL ADULTO

TESIS

COMO REQUISITO
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA

CD. MYRIAM ANGELICA DE LA GARZA RAMOS

MONTERREY, N. L., MEXICO DICIEMBRE 1998

**Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas**



**DETECCION MOLECULAR DE BACTERIAS ASOCIADAS A
PERIODONTITIS DEL ADULTO**

T E S I S

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA**

PRESENTA

CD MYRIAM ANGELICA DE LA GARZA RAMOS

MONTERREY, N.L., MEXICO

DICIEMBRE 1998

TM
RK 361
5 37



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DETECCION MOLECULAR DE BACTERIAS ASOCIADAS A PERIODONTITIS DEL
ADULTO**

**TESIS
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

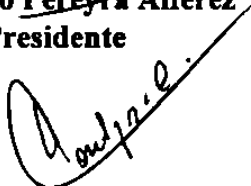
PRESENTA

CD MYRIAM ANGELICA DE LA GARZA RAMOS

COMISION DE TESIS



**Dr. Benito Pereyra Alferez
Presidente**



**M.C. Juan Fransisco Conteras Cordero
Secretario**



**Dr. Luis Jesus Galan Wong
Vocal**

MONTERREY, NUEVO LEON

DICIEMBRE DE 1998

Dedicatoria

A mis Padres, Dr. Hector Edmundo De La Garza Montemayor y CP. Olivia Ramos Ruvalcaba de De La Garza que siempre estuvieron con migo en todos los momentos de angustia, desvelo y estudio, por sus sabios consejos y orientación, por tanto amor y paciencia; los quiero....

A mi esposo Robbin, que siempre estuvo con migo, por su pasiencia y cariño.....Te quiero

A mi tía la Magistrado Lic. María Simona Ramos Ruvalcaba , por estar siempre preocupada por que toda saliera bien y porque nunca me faltara nada.

A Dios Creador de la vida y la inteligencia y gracias a ello el hombre puede descubrir cada día las maravillas de su creación.

A el Pbro. Carlos Carrillo Flores, por tantos sabios consejos y por apreciar la maravilla de este trabajo.

Agradecimientos

De una manera muy especial a MC.Luis Castulo Damas Buenrostro, por toda su paciencia y dedicacion, en cada momento de mis estudios de maestria y por haber creido en mi capacidad e impulsarme en esto que era un senio y hoy es una realidad; contodo mi respeto para todo lo que es, el , su familia.

Al Dr. Benito Pereyra Alferez por su apoyo siempre incondicional en el desarrollo de ideas y por su gran dedicacion.

Con todo carinio a MC. Maria Magdalena Iracheta Cardenas, por su apoyo en el laboratorio y por sus consejos y dedicacion, con todo carinio Gracias.

A la Dra. Cristina Rodriguez padilla y al Dr. Reyes tamez Guerra por impulsarme en la idea de realizar una Maestia en la Facultad de Ciencias Biologicas

A el Dr. Luis J. Galan Wong. Por el apoyo y la confianza que tuvo en el proyecto, siempre al pendiente de todos los detalles.

A la Facultad de Ciencia Biologica, que me abrio sus puertas y que me dio la oportunidad de hacer mis estudios de Maestria.

A el Postgrado de Peridoncias de la Facultad de Odontologia de la UANL. Por permitir tomar las muestras de los casos clinicos, y de una manera muy especial a el Dr. Manuel de la Rosa, Jefer de el postgrado de Periodoncias queien me ha dado la oportunidad de volver a empear en el area de la investigacion, asi como tambien a el Dr. Jorge Jaime Flores cordinador de el postgrado de Endodoncia.

Con todo mi carrinio a mis amigos y companeros de laboratorio, Myriam Hernandez, Ismael Hernandez, Alma, Ivett, Ernesto, Adriana, que estubieron siempre con migo apoyandome en todas mis dudas e inquietudes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia, por la beca otorgada y por el apoyo economico brindado.

A mis hermanos Hilda, Sonia, Diana, Irma, Edmundo, Silvia, y a todos mis sobrinos que siempre me alentaron en la realizacion de este trabajo.

Atodos mis amigos que nunca perfieron la fe en mi, Gloria, Nora, DOC, Yamel, Lorena, Maryjulia, Cecy Palacios, Belinda, Cesar Garza, Susana Lozano,Veronica Chaavez, Vanesa Juarez.

**Este trabajo se realizo en el Laboratorio de Genética y
Biología Molecular de Microorganismos. Departamento de
Microbiología e inmunología. Facultad de Ciencias
Biológicas / Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la
dirección del Dr. Benito Pereyra Alférez**

INDICE

Lista de abreviaturas	i
Lista de tablas	ii
Lista de figuras	iii
Resumen	1
Resumen en ingles	2
Introduccion	3
Hipotesis	5
Objetivos	5
Antecedentes	6
Material y metodos	
I Condiciones de cultivo	15
II Diseno de los iniciadores	15
III Universo de trabajo y toma de la muestra	17
IV PCR apartir de cultivos puros y muestras clinicas	18
Resultados	19
Electroforesis	20
Discucion	21
Conclusiones	23
Apendice	24
Literatura Citada	30
Anexos	

Lista de Abreviaturas

ADN	Acido desoxiribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
° C	Grado Celsius
cm	Centrímetro
dNTP's	Mezcla de los 4 Desoxirribonucleótidos Trifosfatados
EDTA	Acido etilen-diamino-tetracético
<i>et al.</i>	Colaboradores
g	Gramo (s)
h	Hora (s)
Kpb	Kilopares de bases
l	Litro
lb/pulg ²	Libras por pulgada cuadrada
M	Concentración molar
mM	Concentración milimolar
mg	Miligramo (s)
µg	Microgramo (s)
min	Minuto (s)
ml	Mililitro (s)
µl	Microlitro
mm	Milímetro (s)
ng	Nanogramo (s)
pb	Pares de bases
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso Molecular
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil-sulfato de sodio (siglas en inglés)
seg	Segundo (s)
U	Unidades de actividad enzimática
V	Voltios

Indice de Tablas y Figuras

Figuras	Paginas
1. Encia sana	8
2. Encia enferma	9
3. Serie radiografica	10
4. Diagrama de los fenomenos de la enfermedad	11
5 Toma de la muestra	17
6 Producto amplificado a partir de cultivos puros a distintas concentraciones (en Agarosa al 1%)	27
7 Producto amplificado a partir de cultivos puros a distintas concentraciones (en Poliacrilamida).	28
8 Productos amplificados a partir de pacientes	29
 Tablas	
1. Microorganismos asociados con la periodontitis	8
2. Clasificacion de la periodontitis	11
3. Relacion de microorganismos con la periodontitis	12
4. Factores de virulencia	13
5. Metodos tradicionales en la identificacion de bacterias	14
6. Lista de microorganismos para realizar la comparacion	16
7. Iniciadores utilizados	16

Resumen

Las enfermedades de la cavidad oral en humanos se encuentran ampliamente distribuidas, se calcula que aproximadamente un 90% de la población mundial padece o ha padecido de algún tipo de enfermedad bucal y de éstas, el 80% es periodontitis. El término periodontitis (enfermedad de encías) describen numerosos síntomas que afectan el periodonto (estructuras de soporte del diente) y su origen puede depender de diversos factores tales como agentes infecciosos, alteraciones inmunológicas, hormonales y al uso de ciertos fármacos (feniltolina y glucocorticoides). Normalmente su diagnóstico se basa en aspectos clínicos del paciente y aislamiento e identificación del agente causal. Sin embargo estos métodos son tardados. Otros métodos para su diagnóstico de los agentes infecciosos son técnicas de detección molecular como hibridación DNA-DNA, RFLP's y PCR. Las técnicas de PCR nos permitirán encontrar diferentes tipos y/o concentraciones de flora bacteriana en pacientes sanos y enfermos de gingivitis o periodontitis y de esta manera establecer un diagnóstico oportuno. El objetivo principal de este trabajo es la identificación de bacterias asociadas con periodontitis y gingivitis del adulto utilizando pruebas de amplificación génica tipo PCR. Para lograr este objetivo, se diseñaron iniciadores específicos para el gen que codifica para el RNAr 16S en *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *S. intermedius*. La Especificidad de los iniciadores se probó utilizando utilizando muestras de cultivos puros, organismos relacionados y finalmente con muestras de pacientes clínicamente enfermos y sanos. La estrategia del ensayo se diseñó de tal forma de que fuese la más simple y económica posible. De esta manera, la muestra se tomó con el dispositivo DIMOMA y este se colocó en un tubo ependorf de 0.5 ml con 100 µl de agua bidestilada estéril. Los tubos se agitaron vigorosamente y se colocaron 10 minutos en baño de agua hirviendo. Los tubos se centrifugaron y tomamos 15 µl de sobrenadante como muestra. Los resultados mostraron que los iniciadores son específicos y no mostraron "reacción cruzada" contra otros microorganismos relacionados. Con respecto a la sensibilidad, las muestras de pacientes "sanos" y 83 pacientes clínicamente enfermos, los resultados de los pacientes sanos fueron negativos, pero los pacientes enfermos 16 dieron amplificación positiva para *P. gingivalis* y *S. intermedius*, 22 para *P. intermedia* y 8 para *S. intermedius* 16 para *P. gingivalis*. El resto han sido negativos, lo cual sugiere que el motivo de la periodontitis no es de origen infeccioso. Estos resultados correlacionan con la edad de los pacientes y tipo de periodontitis, ya que la mayoría de los pacientes negativos tienen edad superior a los 50 años. Lo cual indica que podría tratarse de periodontitis ocasionada por otro microorganismo como *B. forsythus*.

Abstract

The oral diseases on humans are widely distributed, about 90% of the world population have or had some kind of oral disease, and 80% correspond to periodontitis. The term periodontitis (gum disease) describes numerous symptoms that affect the periodontum (support structure of the tooth) and the origin of it depends on several factors such as infections, immunologic or hormonal alterations and to the usage of several drugs (feniltoine and glucocorticoides). Diagnoses is usually based on clinical aspects of the patient as well as the isolation and identification of the causal agent. Unfortunately, these methods delay a while. Other techniques as molecular detection are also used to diagnose the infectious agents, for example DNA-DNA hybridization, RFLP's and PCR. The PCR techniques will allow us find different types and/or concentrations of bacterial flora in either in healthy and gingivitis or periodontitis ill patients establishing this way an opportune diagnose. The main objective of this study is to identify the bacteria associated with gingivitis or periodontitis during adulthood stage using genic amplification tests of the PCR type. In order to achieve this objective, specific primers were created for the gene that codifies the RNAr 16S for *P. gingivalis*, *P. intermedia*, and *S. intermedius*. In order to test the specificity of the primers, samples of pure cultures were used; also related organisms and finally probing patients that were clinically and ill. The strategy designed for the rehearsal was the simplest and cheapest possible. Therefore, the probe was taken with the DIMOMA device, then placed in a sterilized 0.5 µl ependorf tube with 100µl of bidestilled water. The tubes were agitated vigorously and then held for 10 minutes on boiling water. Proceeding with centrifugation of the tubes, that as probe 15 µl of the overflowing were taken. The results showed that the primers were specific and no "crossed reaction" was shown against other related microorganisms. Concerning to the sensibility, the tests taken to 83 healthy patients and 83 clinically ill patients showed that the outputs on the healthy patients were negative, but out of the ill patients, 16 gave a positive amplification for *P.gingivalis* and *S. intermedius*, 22 for *P. intermedia*, 8 for *S.intermedius* and 16 for *P. gingivalis*. The rest of the numbers were negative, which it with the age and type of periodontitis of the patients, due to the fact the mayor number of patients with negative out are older 45 years. This indicates other microorganism as *B. forsythus* could cause the periodontitis.

Detección Molecular de Bacterias Asociadas con la Periodontitis del Adulto

Introducción

Las enfermedades de la cavidad oral en humanos se encuentran ampliamente distribuidas, calculándose que el 90% de la población mundial padece o ha padecido algún tipo de enfermedad bucal (Wolinsky. 1992) y de éstas el 80% padecen de periodontitis (Nisengard *et al.*, 1992).

El término periodontitis (enfermedad de las encías) describe numerosos efectos clínicos que afecta al periodonto (estructuras de soporte de el diente), que incluye encía, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. Dentro de las enfermedades periodontales mas comunes se encuentra la gingivitis y la periodontitis del adulto. La gingivitis o inflamación de la encía se caracteriza, clínicamente, por cambios gingivales en color, forma y posición de la bolsa periodontal con presencia de sangrado en el área cervical. La periodontitis, por su parte, ocurre por la extensión de la inflamación del periodonto y los tejidos adyacentes a él (Carranza. 1992; Linde. 1990). La formación y profundización de la bolsa periodontal, traen como consecuencia la pérdida ósea y la movilidad de los dientes que se caracterizan como rasgos clave de la enfermedad (Glicman. 1960; Carranza. 1992).

Para su estudio, la periodontitis se ha dividido en varias clases: periodontitis juvenil, refractaria, del adulto, progresiva rápida, gingivitis ulceronecrotizante aguda (GUNA), etc. (Nisengard *et al.*, 1992) y su origen puede depender de diversos factores tales como agentes infecciosos, alteraciones inmunológicas y hormonales y al uso de ciertos fármacos (fenitoína y glucocorticoides) (Zambon. 1996). Recientemente se demostro la transmision de los agentes infecciosos ente miembros de la misma familia, principalmente entre parejas (M.Saarela y Troil-Londen 1993 ; Steenbergen y Petit, 1993). De estos agents infecciosos, sobresaliendo las bacterias *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus intermedius*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides forsitus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cabnocitophaga* sp. y *Prebotella intermedia* (Slots. 1982; Listgarten. 1988; Nisengard y Newman. 1992).

Normalmente, el diagnóstico de esta enfermedad está basado en aspectos clínicos del paciente que involucran una serie de signos y síntomas característicos de la enfermedad. En algunos casos, puede recurrirse al aislamiento e identificación de agentes infecciosos, pero el difícil manejo de las muestras hace impreciso el resultado, ya que la mayoría de las bacterias involucradas en la patogénesis son anaerobias estrictas y una adecuada identificación que toma hasta 7 días, periodo importante en el desarrollo de la afecciones que afectan la estructura de soporte del diente (hueso, cemento y ligamento) (Slots 1982; Socransky.1990). Otros métodos empleados para el diagnóstico de los agentes infecciosos

es la hibridación tipo ADN-ADN (Southern) (Holt *et al.*, 1993) y polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) con sondas moleculares que se basa en diferencias en el tamaño de determinado fragmento del ADN genómico de las bacterias, pero estas técnicas requieren del aislamiento y cultivo de las bacterias sospechosas y la purificación y manipulación del ADN total (Di Rienzo *et al.*, 1994). Otra técnica más reciente es la utilización de iniciadores específicos complementarios de un gen o región génica utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la actualidad la utilización de la PCR ofrece la ventaja de una alta especificidad y sensibilidad en la identificación de especies bacterianas y, algunas veces, no requiere de tener al microorganismo puro, sino que su diagnóstico puede realizarse directamente de la muestra biológica, en este caso de muestras de la bolsa periodontal (Bodinka *et al.*, 1994; Ashimoto *et al.*, 1996).

Con la implementación de técnicas moleculares de identificación de agentes etimológicos, específicamente PCR, nos permitirá establecer un diagnóstico temprano de los microorganismos involucrados en la enfermedad periodontal. Es importante señalar que será necesario establecer ciertos criterios previos tales como discriminar, a nivel población, el tipo y concentración de la flora normal. Este hecho nos lleva a preguntar, ¿existen diferencias medibles del tipo y/o concentración de la flora bacteriana en individuos clínicamente sanos y enfermos?.

Hipótesis

Las técnicas moleculares tipo PCR nos permitirán encontrar diferentes tipos y/o concentración de flora bacteriana en pacientes sanos y enfermos de periodontitis y, de esta manera establecer un diagnóstico oportuno de la enfermedad.

Objetivo General

Detección molecular de bacterias asociadas con periodontitis del adulto utilizando pruebas de amplificación génica tipo PCR a partir de muestras clínicas directas

Objetivos Particulares

- 1.- Diseñar iniciadores específicos para *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Streptococcus intermedius*.
- 2.- Probar la especificidad de los iniciadores con cultivos puros de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *S. intermedius* y organismos no relacionados.
- 3.- Empleo de estos iniciadores en muestras de pacientes clínicamente sanos y enfermos.

Antecedentes

Historia y Tratamiento de la enfermedad: La enfermedad gingival y periodontal en sus diferentes manifestaciones, ha hecho padecer a la humanidad desde principios de la historia. En estudios de paleopatología indica que la enfermedad periodontal destructiva, que se atribuye cuando hay pérdida de hueso, afectó a el hombre antiguo de culturas tan diversas como el antiguo Egipto y la América precolombina (Ruffer. 1921). Los documentos históricos más antiguos que tratan de temas médicos, revelan el conocimiento de la enfermedad periodontal y la necesidad de tratarla. Casi todos los escritos antiguos que se han conservado, tienen secciones o capítulos que tratan las enfermedades bucales, y los problemas periodontales ocupan un espacio significativo en ellos. Con frecuencia se relacionaron los cálculos con la enfermedad periodontal, se creyó que una enfermedad sistémica preexistente era causa de trastornos periodontales. Sin embargo, no había análisis terapéuticos metódicos, bien razonados, hasta que llegaron los tratados quirúrgicos árabes de la Edad Media y el tratamiento moderno, con textos ilustrados e instrumentación complicada que no se desarrolló sino hasta la época de Pierre Fauchard (Glickman. 1974).

Guerini (1909), reportó el hallazgo de platillos de oro en la Mesopotamia que datan del año 3000 A.C. donde se demostraba el interés por la higiene bucal y, al parecer los babilonios y los asirios, sufrieron de enfermedad periodontal ya que también se encontraron tablillas de barro que representan un tratamiento a base de masajes en la encía y la aplicación de diversas hierbas medicinales. Este tipo de enfermedad también fue descubierta en cuerpos embalsamados de los antiguos egipcios y en los escritos médicos y quirúrgicos de la época, la enfermedad periodontal era la más común en la cavidad oral.

Las obras de medicina de la India trataron ampliamente los problemas bucales y periodontales. En el Su ruta Samhita, hay muchas descripciones de enfermedad periodontal grave como pérdida de dientes y exudados purulentos de la encía. Los antiguos hebreos por su parte, reconocían la importancia de la higiene bucal, pero fueron los que incluyeron las primeras férulas (de alambre) aparentemente construida para ferulizar dientes aflojados por enfermedad periodontal destructiva crónica. Es indiscutible que "el gran salto" en la medicina odontológica la realizaron los Romanos durante la época del renacimiento, donde un anatomista destacado de nombre Libellus de Dentibus, escribió un libro pequeño de odontología de 30 capítulos, en el cual describió el soporte de los dientes en el maxilar: "Existe un ligamento muy fuerte que se adhiere a las raíces y después las conecta firmemente al alvéolo". "Las encías también contribuyen a su firmeza"(Eustachius, 1951, ver Carranza. 1993). Ambroise Paré (1517-1590) cirujano francés describió con detalle muchos procedimientos quirúrgicos bucales, entre ellos la gingivectomía de tejido gingival hiperplásico.

Ya en el siglo XVIII en Europa se comenzó a desarrollar la odontología moderna, sobretodo en Francia e Inglaterra. Pierre Fauchard que nació en Gran Bretaña en 1678 y se conoce como padre de la odontología, fue quien mejoró los instrumentos y las técnicas quirúrgicas así como también las técnicas odontológicas para tratamientos dentales y escribió un libro donde describió técnicas de odontología reconstructiva, prostodoncia, cirugía bucal, periodontología ortodoncia (Nisengard y Newman. 1992).

La escuela de Viena hasta principios de este siglo, formó los conceptos histopatológicos básicos sobre los cuales se fundamentó la periodoncia moderna y su representante principal de este grupo fue Bernhard Gottlieb(1885-1950). Por otra parte el grupo de Berlín que estuvo integrado por científicos clínicos, quienes realizaron y reafirmaron propuestas quirúrgicas como Obert Neumann y Oskar Weski, quienes realizaron además estudios que vincularon los cambios radiográficos y la histopatología de la enfermedad periodontal. También conceptualizaron el periodonto formado por cemento, encía, ligamento periodontal y hueso, y le dieron el nombre de "pariodontum" que mas tarde se le denominó "periodonto". Muchos investigadores desarrollaron y estudiaron modelos animales de enfermedad periodontal, en ellos factores tanto sistémicos como locales como Irvin Glicman (1914-1972) quien fue el mas notable. Por otra parte, el grupo escandinavo formado principalmente por Jens Waerhaug (1907-1980) de Oslo, que con su publicación realizada en 1952 titulada "The Gingival Pocket", abrió una nueva era en conocimientos de la biología del periodonto.

Es indiscutible que el avance de la microbiología, bioquímica y ecología microbiana de la cavidad bucal han permitido un mayor conocimiento del cuadro patológico del periodonto. Algunos de los factores involucrados en la enfermedad se encuentran la placa dentobacteriana, secreciones orgánicas e inorgánicas de la encía y microorganismos y factores mecánicos, pero el factor mas importante es la placa dentobacteriana (Løe *et al.*, 1992; Kamma *et al.*, 1994). La placa dentobacteriana se define como el conjunto de microorganismos adheridos a las superficies lisas de la boca, que incluyen tejidos duros (esmalte), y blandos (epitelio escamoso estratificado, queratinizado o parenquimatosa) (Carranza 1993), y que muchos de estos microorganismos pueden encontrarse normalmente en personas clínicamente sanas. Desde el punto de vista microbiológico, se ha determinado que la flora microbiana de un individuo sano y un enfermo puede variar, por tal motivo, es posible tomar como indicadores de enfermedad a alguna o algunas bacterias. En la tabla 1 se señalan los microorganismos de personas sanas y enfermas, resaltando que la flora de los enfermos, consta de ésta mas la flora normal.

Tabla 1.- Microorganismos aislados del periodonto de personas sanas y enfermas.

<u>Sano</u>	<u>Enfermo</u>
<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Actinomyces sp.</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Capnocytophaga sp.</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>Vellonella sp.</i>	<i>Bacteroides sp.</i>
	<i>Campylobacter sp.</i>
	<i>Capnocytophaga sp.</i>
	<i>A. actinomycetemcomitans</i>



Figura 1 ensia clínicamente sana

El papel que juega la placa dentobacteriana en la periodontitis, ha sido reconocido desde hace mucho tiempo, de manera que la remoción de ésta es importante en la prevención de enfermedades en la cavidad oral, y que de no realizarse, esto podría tener consecuencias graves, como la gingivitis y la periodontitis.



Figura 2 Encía con enfermedad Periodontal

La periodontitis: La enfermedad periodontal es causada por acumulo de bacterias en las áreas gingivales. Esta es una complejo de flora subgingival que contiene mas de 250 especies, también llamada complejo protein-patógeno y éste ha tomado mucho interés en los últimos años *Porphyromonas gingivalis*, *Proveyera intermedia*, *Streptococcus intermedius*, entre otros, son algunos de los patógenos que han tomado una fuerte vinculación con las enfermedades periodontales (Tañer y Haffer. 1979; Bragd *et al.*, 1987). Diferentes reportes han han recomendado considerar a muchas de estas bacterias para reforzar el diagnóstico de la enfermedad y poder seleccionar y evaluar la terapia; en tratamientos de casos difíciles para su predicción de algunas lesiones (Solos y. 1984; Listgarten. 1988). Recientes estudios, en pacientes tratados con periodontitis avanzada y moderada, sugiere que el incremento de los depósitos en el interior de la bolsa periodontal, estos estuvieron sujetos a un incremento de la bolsa con *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia* que pueden predisponer de un incremento en el grado de la aberia periodontal.

El objetivo de la remoción, durante la debridación de las raíces de los dientes, es la de retirar la enfermedad ocasionada por los microorganismos contaminantes del cemento

y reducir el número de patógenos en la bolsa periodontal debajo estos niveles de inductores de la enfermedad. Esto tuvo que ser mostrado en bolsas periodontales de activas, la composición de la flora microbiana cambia de proporción "enferma" a "sana" después de la terapia (Slots. 1979; Holdeman. 1985). Los niveles de potencial patógeno dados por *P. gingivalis* y *P. intermedia* fueron significativamente reducidos después de la terapia.

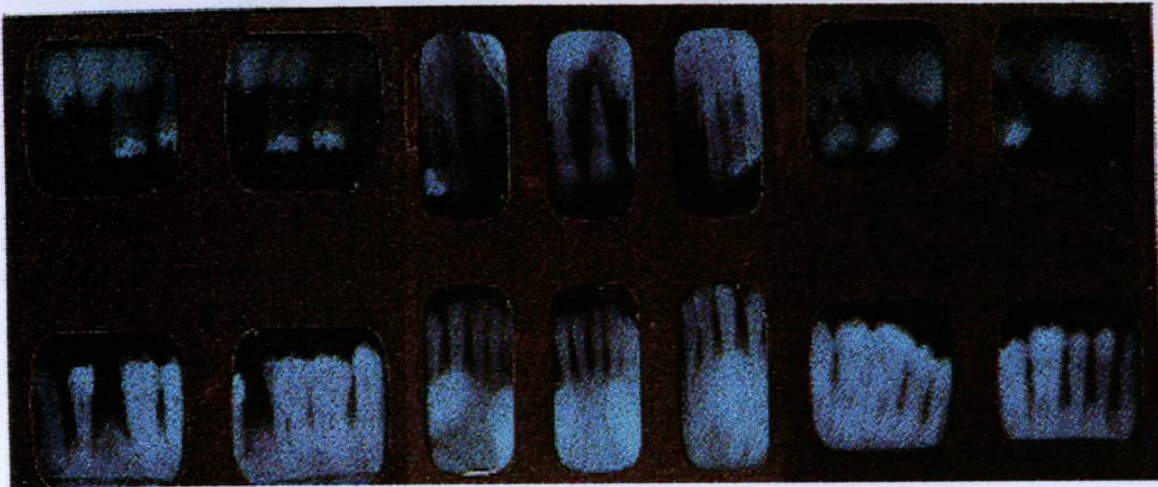


Figura 3 Serie radiografica de paciente con periodontitis del adulto. En esta se muestran perdida ósea de forma angular a nivel de caninos y horizontal en todo el resto de la boca.

Clasificación de la Enfermedad Periodontal: La enfermedad periodontal ha sido clasificada de acuerdo a su localización, edad y diferentes factores sistémicos, así podemos considerar 5 tipos que a su vez se divide en grupos como podremos observar en la Tabla 1.

Características patológicas generales: Toda virulencia es multifactorial, por lo tanto para que un microorganismo produzca periodontitis debe de contar con lo siguiente:

- 1) Alojamiento inicial y crecimiento en el ambiente periodontal.
- 2) Resistencia inmunológica
- 3) Producción de daño a tejidos

De acuerdo al tipo de enfermedad se ha logrado identificar a ciertos microorganismos asociados a cada una de estas enfermedades (Tabla 3) (Haffajee y Socransky 1994).

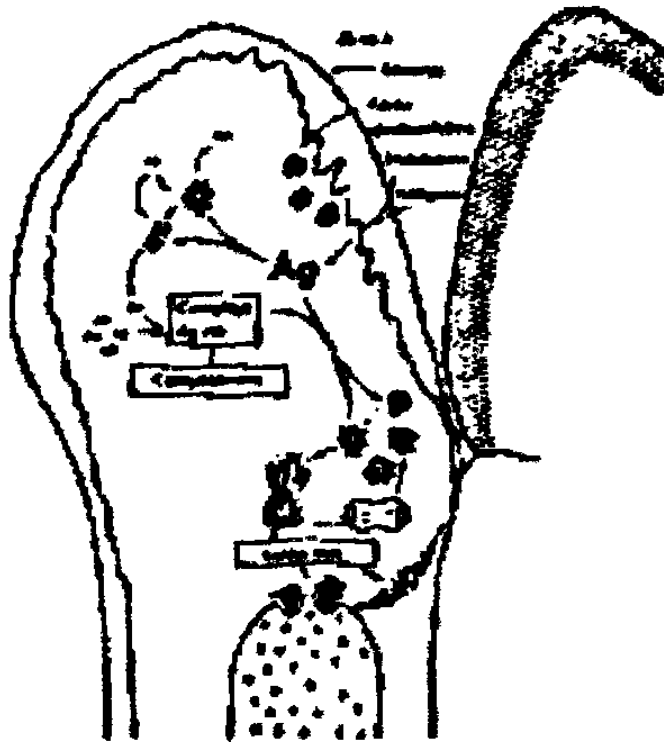


FIGURA 4 Diagrama de los fenómenos que se llevan a cabo durante el proceso de destrucción de tejidos de soporte

Tabla 2.- Clasificación de Periodontitis.

- | | |
|---|---|
| 1. Periodontitis del adulto | <ul style="list-style-type: none"> A. Incipiente B. Moderada C. Avanzada |
| 2. Periodontitis de aparición temprana | <ul style="list-style-type: none"> A. Periodontitis prepuberal <ul style="list-style-type: none"> Generalizada Localizada B. Periodontitis juvenil <ul style="list-style-type: none"> Generalizada Localizada C. Periodontitis progresiva rápida |
| 3. Periodontitis asociada con enfermedades sistémicas | |
| 4. Periodontitis ulseronecrotizante aguda (GUNA) | |
| 5. Periodontitis refractaria | |

Tabla 3.- Principales bacterias asociadas con la periodontitis

<u>Tipo de Periodontitis</u>	<u>Microorganismos Asociados</u>
Periodontitis del adulto	<i>P. gingivalis, P. intermedia, B. forsythus, C. rectus, S. intermedius</i>
Periodontitis Refractaria	<i>B. forsythus, P. gingivalis, C. rectus, P. intermedia</i>
Periodontitis juvenil localizada	<i>A. actinomycetemcomitans, Capnocytophaga</i>
Periodontitis juvenil del diabetico	<i>Capnocytophaga, A. actinomycetemcomitans,</i>
Gingivitis del embarazo	<i>P. intermedia</i>
GUNA	<i>P. intermedia, Espiroquetas</i>

Para relacionar la etiología bacteriana con la enfermedad periodontal nos hemos basado en diferentes factores como: 1) Identificación de los microorganismos asociados con los diferentes estadios de la enfermedad; 2) la eliminación o supresión de organismos que destruyen los tejidos dañados; 3) la respuesta del hospedero asociado con la enfermedad; 4) modelos animales infectados y 5) el potencial patógeno que puede contribuir a la formación de la enfermedad en forma inmediata.

Mecanismos de involucrados en la patogénesis de la enfermedad periodontal: La invasión de los tejidos, es el primer factor de importancia en la patogénia de la enfermedad, así mismo, los microorganismos comienzan a liberar sustancias como exotoxinas , endotoxinas y enzimas hialurónicas que dañan a los tejidos. Al comenzar la destrucción de los tejidos, se inicia una respuesta de el hospedero (respuesta inmune) que en ocasiones suele ser muy destructiva para el periodonto. En la tabla 4 se ilustra los factores de virulencia de dos de los microorganismos encontrados con más frecuencia en la enfermedad periodontal.

Tabla 4.- Factores de virulencia de *P. gingivalis* y *P.intermedia*

Colonización y Adhesión	EDH	Destrucción de Tejidos
Pilis Fibras largas Cápsula	Enzimas que hidrolizan componentes del plasma y proteínas del sistema de cascada	Formación de abscesos
Vesículas Crecimiento :	Inhibidores químicos PMN	Productos Metabólicos: Compuestos volátiles de sulfuro
Naptoquinona Esterdiol Succinato Hemina	Superóxido dismutasa Degradación complemento	Indol Amonio Acido Butírico

EDH : Enzimas

PMN : Leucocitos polimorfo nucleares

Diagnóstico: Un diagnóstico apropiado es esencial para aplicar un tratamiento adecuado. El diagnóstico periodontal consiste en el análisis de la historia clínica y una evaluación de los signos y síntomas, así como el resultado de varias pruebas (por ejemplo la evaluación por sondeo periodontal valoración de la movilidad, radiografías, pruebas sanguíneas, muestras de biopsias) para identificar el problema del paciente. El diagnóstico periodontal debe de determinar si la enfermedad existe, identificar su tipo y entender los procesos fundamentales y su causa

El diagnóstico también debe de contestar diferentes preguntas : ¿Cuales factores son los responsables de la acumulación de placa que llevan a una inflamación gingival y bolsas periodontales ? ¿El periodonto presenta evidencia de traumatismo por oclusión? ¿Existen relaciones oclusales que explican las lesiones traumáticas? ¿ Los cambios gingivales y periodontales son explicables por los factores locales, o sugieren la probabilidad de un daño en la respuesta de el hospedero?.

Diagnóstico microbiológico e inmunológico: Mucha información de las infecciones orales son proporcionadas al dentista por la identificación específica de los agentes etiológicos. En la clínica, debe de aprovecharse la información proporcionada para poder seleccionar la terapia adecuada. Así pues se conoce diferentes métodos que deben emplearse como soporte de la mayor parte de las patologías para tener un diagnóstico y tratamiento más adecuado, como los que nos ilustra la tabla 5.

Tabla 5.- Métodos tradicionales en la identificación de bacterias.

Examen directo (al microscopio)
Cultivo y ensayos de sensibilidad
Técnicas de cultivo
Técnicas específicas (GLC, homología de ADN)
Susceptibilidad a antibióticos
Ensayos Inmunológicos
Inmunofluorecencia
Aglutinación
Inmunodetección
Citometria de flujo
Otros ensayos
Pruebas de ADN

Las pruebas del ADN, las cuales determinan la similitud entre dos organismos diferentes, está basado en la habilidad de complementar cadenas simples de ADN. Las bacterias son lisadas, y el ADN es separado en fragmentos pequeños con endonucleasa

El contenido de bases del AND y su secuencia expresado por un microorganismo refleja su taxonomía y relación con otros gérmenes; las pruebas de AND-AND son técnicas que se han desarrollado para el diagnostico de microorganismos, especialmente bacterias que producen infeccion y son una herramienta muy útil en la practica odontológica.

MATERIALES Y METODOS

Para organizar este trabajo lo hemos dividido en cuatro partes

I Condiciones de cultivo

II Diseño de los iniciadores

III.- Universo de trabajo y toma de la Muestra

IV.- PCR apartir de cultivos puros y muestras clínicas

I.- Cepas y condiciones de cultivo: Las cepas “tipo” de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* ATCC 25611 y *Streptococcus intermedius* ATCC 27335 fueron proporcionadas por el Dr. Stanley Holt del Departamento de Microbiología y Periodoncia del “Texas Health Science Center” de la Universidad de Texas en San Antonio. Las cepas fueron conservadas de dos maneras: 1) resiembras periódicas en agar soya tripticasa suplementado con 5% de sangre de cordero e incubadas a 37 °C en una atmósfera libre de oxígeno utilizando gaspack y almacenadas en refrigeración a 4 °C hasta su utilización y 2) congelación en leche desnatada suplementada con un crioprotector y congeladas a -70°C.

II.- Diseño de los iniciadores (oligos): El diseño de los oligonucleotidos se realizó tomando como base la secuencia del gen que codifica para el RNAr 16S de *P.gingivalis*, *P. intermedia* y *S. intermedius* y realizar comparación múltiple con algunos organismos relacionados, tanto filogenéticamente como en la enfermedad (Tabla 6).

Tabla 6.- Listado de microorganismos para realizar la comparación del gen del ARNr 16S.

<i>Actinomyces actinomycetemacomitans</i>	<i>Fusobacterium mortiferum</i> <i>F. nucleatum</i> <i>F. paraphrophilus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Actinobacillus actinomycetemacomitans</i>	<i>Haemophilus aphrophilus</i> <i>H. sanguis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>
<i>Bacteroides heparinolyticus</i> <i>B. loescheii</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Campylobacter rectus</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Treponema denticora</i>
<i>Capnocytophaga sp.</i>	<i>Prevotella corporis</i> <i>P. intermedia</i>	<i>Wolinella recta</i> <i>W. succinogenes</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>P. nigrescens</i>	

La tabla 7 muestra la secuencia, posición en el gen y la talla del fragmento esperado para cada par de iniciadores. La comparación se realizó utilizando los programas Clustal W y FASTA. Las características deseadas en los iniciadores serán: estabilidad del oligo, complementaridad con otras regiones de las secuencias del ADN blanco, formación de dímeros, formación de horquillas, temperatura de alineamiento, longitud del fragmento amplificado, y las concentración de GC. Estas características serán evaluadas con los programas Oligo , Amplify y el programa Primer. Además, se utilizó también el programa Sim PCR el cual hace una comparación con todos los genes16S reportados en el banco de genes.

Tabla 7. Iniciadores utilizados en el diagnóstico molecular de bacterias asociadas a periodontitis del adulto.

Bacteria	Iniciador (5'—3')	Clave	Posición	Tamaño (pb)	Clave Genbank
<i>P. gingivali</i>	AAGGATTGTAAACTTCTTTATAC	VVJ-1	427	705	POYRR16SC
	ACTGTTAGCAACTACCGATGT	VVC-2	1132		
<i>P. intermedia</i>	GCATTIACCCTTCGAATAAGGACC	VVJ-3	449	540	PVORR16SD
	GAGTCAACATCTCTGTATCCTGCG	VVC-4	989		
<i>Bacteroides forsythus</i>	GCG TAT GTA ACC TGC ACC TGC CCG CA	MAG-7	121	350	BFORR16S
	GAA GGC AGC TTA CTA AGG	MGR-8	470		
<i>S. intermedius</i>	GTTAAGGAAGAACGAGTGTGAGAA	VVJ-5	343	833	SI16RNA
	TGCCGTCACCGGCTTGGACTCGT	VVC-6	1176		

III.- Universo de trabajo y toma de la Muestra: Las muestras se dividirán en tres grupos (tratamientos): 1) personas clínicamente sanas; 2) pacientes con gingivitis y 3) pacientes con periodontitis. El número de muestras se obtendrá de acuerdo a los reportado en el Anuario de Periodontología (World workshop) de 1996. Estimando una confiabilidad del 95%. Una vez identificado a los pacientes, y ya previamente bien diagnosticados por examen clínico y radiográfico con periodontitis del adulto de moderada a avanzada, se procederá a la toma de la muestra, que consiste en la introducción de un dispositivo especial para toma de muestras en cavidad oral (DIMOMA). El dispositivo será introducido a la bolsa periodontal seleccionada de acuerdo a las siguientes condiciones:

Profundidad de bolsa	4 a 7 mm
Edad del paciente	35 a 45 años
Enfermedades sistémicas	ninguna

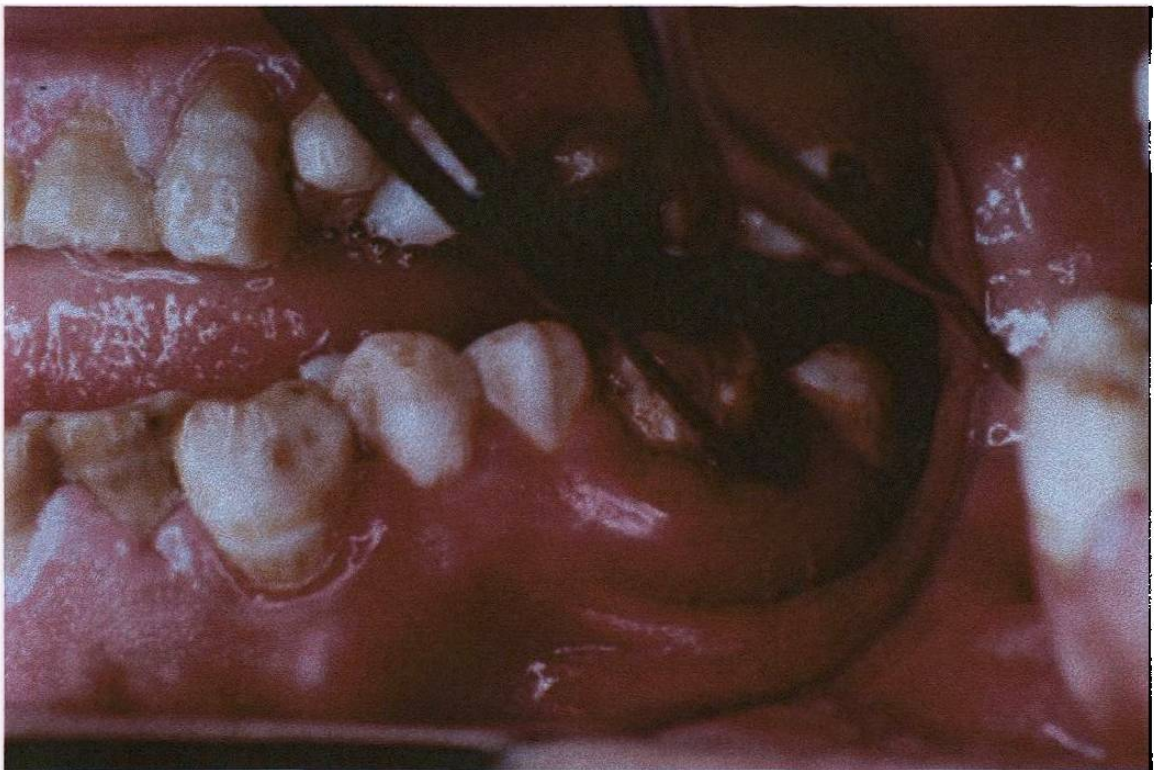


Figura 5 Toma de la muestra

Para ello se deberá de limpiar muy bien la zona donde se tomara la muestra, para evitar contaminación de placa dentobacteriana o cualquier otro artefacto que pudiera alterar a la muestra en el área supragingival con una gasa estéril y clorexidina para que posteriormente se depositara dicha muestra en un tubo de 0.5mm con solución buffer TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH8.0), y congeladas a -20 °C.

IV.- PCR apartir de cultivos puros y muestras clínicas: Apartir de cultivos puros se tomo una muestra de cada una de las cepas y se resuspendio en 100µl de H₂O mili Q estéril. Las muestras se colocaro 10 min en baño de agua hierviendolo. El tratamiento de las muestras ecencialmente igual, solo que las muestras periodontales se resuspendieron y centrifugaron a 10,000 rpm durante 30 segundos y se tomaron 15 µl del sobrenadante como fuente de DNA (Cerón *etal* 1995). Las muestras se mezclarán con los diversos componentes de la mezcla de reacción bajo el siguiente esquema:

H ₂ O mili Q	18.7 µl
dNTP's	2.0 µl
Buffer (10x)	5.0 µl
MgCl ₂ (1.5 mM)	3.0 µl
Primer1(1mM)	1.0 µl
Primer2(1mM)	1.0 µl
Primer3(1mM)	1.0 µl
Muestra	<u>18.0 µl</u>
	49.7 µl

Primer 1= VVJ1 y VVC2

Primer2= VVJ3 y VVC4

Primer3= VVJ5 y VVC6

La mezcla se colocó en un termociclador Perkin-Elmer y se sometió al siguiente programa: un pulso de desnaturalización (5 min/95°C), adicionar 0.3µL de Taq polimerasa (5 U/µL). Posteriormente, la muestras se sometieron a 30 ciclos de amplificación que consistió de lo siguiente: desnaturalización, 1 min/94°C; alineamiento, 1 min/36 °C y extensión 1 min 70°C y un ciclo final de 10 min de extensión. Los productos de la PCR (10 µl) se cargaron en geles horizontales de agarosa al 1.5% en buffer TAE (Tris-Acido acético-EDTA pH 8.0), y visualizaron con bromuro de etidio.

La especificidad de los oligonucleotidos se evaluó realizando PRC's cruzadas entre las tres cepas así como con diversas cepas aerobias y anaerobias

Resultados

El diagnóstico oportuno de una enfermedad puede ser la diferencia entre el alivio y padecer secuelas. Un ejemplo claro de ello son las enfermedades de la cavidad bucal, específicamente la periodontitis. Este padecimiento está ampliamente distribuido a nivel mundial. El diagnóstico de este padecimiento, es realizado por la base clínica de la sintomatología; sin embargo, existen varios tipos de afecciones que pueden enmascarar la verdadera naturaleza de la enfermedad. En este trabajo reportamos el diseño de un método molecular de detección de las tres principales bacterias asociadas a la periodontitis del adulto. Este sistema lo probamos con 82 pacientes clínicamente enfermos y 20 sanos, mismos que se ajustaron a las especificaciones señaladas anteriormente de no padecer enfermedad sistémica alguna ni estar bajo tratamiento médico de quimioterapia ni hormonales. Los iniciadores diseñados (primers) resultaron ser altamente específicos para el microorganismo blanco, ya que no se obtuvieron señales positivas en las reacciones de PCR “cruzadas”, ni tampoco dieron señal con otros microorganismos relacionados (dato no mostrado).

Debido a que los pacientes sanos no presentaron señal positiva para ninguna bacteria, nos concretamos al análisis de los pacientes enfermos. En la tabla 8 mostramos el concentrado de el análisis de los 83 casos clínicos, los cuales cumplen no las variables establecidas; a todos ellos se les aplicó pruebas estadísticas, y se comparó edad, sexo, profundidad de bolsa, presencia o ausencia de microorganismos con un grado de confianza de 95%. De esta pudimos confirmar que todos nuestros resultados se comportan de la misma manera y estos corresponden a la enfermedad periodontal del adulto (solamente un 10% de los pacientes enfermos sobrepasan los límites de edad, 3 por debajo de los 35 años y 9 superior a los 45 años; Sin embargo fueron negativos como se esperaba).

En la figura 6 se muestra las gráficas de análisis estadísticas realizados a dichas muestras

Debido a que las bacterias periodontales pueden ser patógenos en mínimas cantidades de ellas (tan solo 1%) dentro de todas las presentes en la placa dentobacteriana, fue necesario probar el grado de sensibilidad de los iniciadores. Se realizó diluciones de las colonias en 100µl de agua mili Q estéril y se efectuaron conteos de células utilizando un hematositómetro (Figura 8) 8.2×10^3 . Posteriormente se efectuó el mismo procedimiento antes descrito y se logró obtener señal positiva hasta 8.2×10^1

Con respecto a la amplificación a partir de cultivos puros (1 colonia) y pacientes clínicamente enfermos y sanos (Figura 7). En esta figura se puede observar que los pacientes de los carriles 1-3 dieron señal positiva para *Prevotella intermedia* y *Streptococcus intermedius*, pero el paciente del carril 4, solamente para *S. intermedius*. En cambio, el paciente sano, no dio señal alguna (carril 5)

En la figura 9 se muestra el resultado de 12 muestras de las cuales como se puede observar en los carriles 3 y 6 dieron señal positiva para *P. intermedia* y los carril 5 y 11 para *S. intermedius*. El resto de los pacientes no mostraron señal probablemente quizá por que el origen de la periodontitis puede ser originado por otro microorganismo que sea específico a otro tipo de enfermedad periodontal originado como resultado a trastornos sistémico (factores hormonales por ejemplo).

Como el tipo de enfermedad periodontal que pudiera presentarse en determinado caso no es de origen "típico" este debe de ser tratado de otra manera desde su inicio y no de la manera "tradicional" que ari que esta llegue a transformarse en crónica, (la cual persistirá hasta la pérdida de los dientes). Esto explicaría el porque la mayoría de los pacientes que se presentan a consulta de edades adultas (50 a 60 años) ya hayan perdido la mayor parte de sus piezas dentarias.

Fig. 6 Incidencia de Microorganismos (%) en pacientes con periodontitis del adulto detectadas a través de PCR.

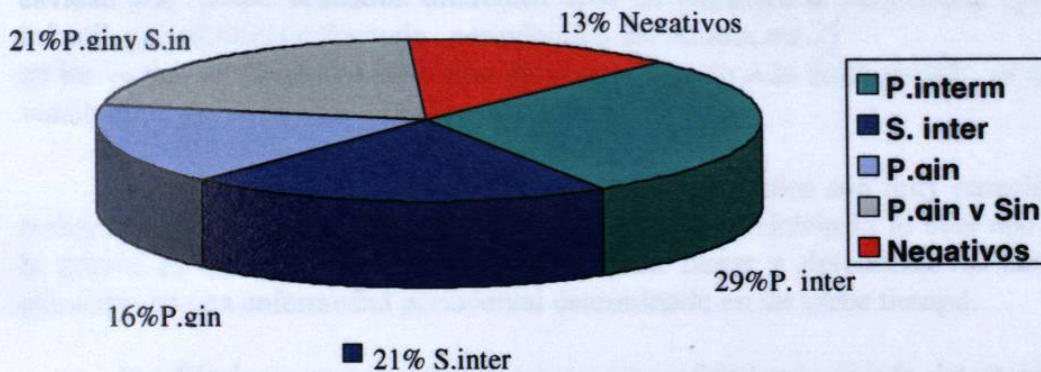


Tabla 8. Pacientes clínicamente enfermos

EDAD	SEXO M/F		PROFUNDIDAD DE BOLSA							MICROORGANISMOS					
			3	4	5	6	7	8	9	<i>P.inter</i>	<i>P.gin</i>	<i>S.inter</i>	<i>P.in,Sin</i>	<i>P.gin,Sint</i>	<i>Pin,P.gin</i>
30-35	4	11	3	4	6	2	0	1	1	4	0	3	0	8	0
36-40	9	18	0	7	10	8	1	0	1	6	7	3	0	4	0
41-45	10	13	0	6	8	3	1	3	2	8	8	2	0	3	0
46-50	2	7	1	1	5	1	0	1	0	4	2	0	0	0	0
51-80	5	4	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
TOTAL	30	53	6	21	32	15	2	5	4	22	17	8	0	16	0

La suma total de los pacientes fue de 83, de estos solamente 3 están por debajo de los 35 años y 9 por arriba de los 45 años.

Discusión

Considerando a las variables establecidas, los pacientes positivos (90%) e obtuvo el promedio de profundidad de bolsa para relacionar la presencia de microorganismos llegando a establecer un promedio de 5.59 mm de profundidad con una incidencia de *P.intermedia* en un 16%, *S. intermedius* 21%, *P.gingivalis* 16% y una combinación de *S. intermedius* y *P.intermedia* en un 21%. Cabe mencionar que nunca obtuvimos confinación entre *P. gingivalis* y *P. intermedius*, ni tampoco entre *P. gingivalis* y *S. intermedius*. Probablemente estas combinaciones se presenten en otro tipo de enfermedad que no hemos considerado en este estudio, o a otras variables que aquí no nos interesan.

Un resultado muy similar fue obtenido en el año de 1996 por Ashimoto A; C.Chen en la universidad de California en los cuales su principal objetivo fue de utilizar la técnica de PCR como herramienta para detectar la presencia de los “probables patógenos” en la cavidad oral, donde utilizaron diferentes tipos de enfermedad periodontal (periodontitis infantil, periodontitis refractaria, periodontitis del adulto, etc...) en los cuales no se evaluó ni el tipo de germen ligado a la enfermedad, ni el grado de sensibilidad por la técnica de PCR.

Es importante hacer mención de que estos resultados son muy parecidos a otros realizados por Meurman, en 1998 en la universidad de Helsinki lo cual nos indica que la prueba es lo suficientemente poderosa para llegar a determinar la incidencia de gérmenes en una enfermedad periodontal determinada en un breve tiempo.

Las diluciones nos permiten conocer una cantidad aproximada de gérmenes, esto nos hace pensar que muy probablemente podemos medir la cantidad de “patógenos”, y con ello quizá podamos evaluar la gravedad de la misma (Besnard C N *et al*) como en el caso de otros estudios en los cuales solamente era posible comparar grados de sensibilidad en pruebas de ELISA y DNA (Melvin WL, *et al* 1994). Al hacer una comparación de dichas pruebas podemos darnos cuenta que el grado de sensibilidad logrado por pruebas de PCR es más alto ya que por ELISA fue de 1.0×10^9 , por pruebas de DNA obtuvieron un resultado de 1.0×10^6 y nosotros un resultado por PCR de 8.2×10^3 .

Recordemos siempre que todo tipo de información aportada por cualquier laboratorio clínico no nos define siempre la enfermedad, ello sin embargo nos permite saber soluciones de la misma en base a sus reportes pero es bien claro tanto por médicos como por odontólogos que la terapia de algunas enfermedades no proviene siempre de la misma información (John W. Stamm). Por otra parte gracias al avance de estas técnicas de laboratorio podemos mejorar criterios sobre tratamientos, permitiéndonos proponer soluciones (Listgarten *et al*).

Recordemos siempre que las bacterias son esencialmente causante de periodontitis pero sin embargo estos son insuficientes para determinar la evidencia de esta. El papel que juega el hospedero, sin embargo, si es determinante (Roy C. Page), además de el estrés (20%) también es considerado un factor de riesgo. Todo esto nos apoya a mejorar la cantidad de métodos y herramientas para el diagnóstico "oportuno", por una parte medir y evaluar la carga microbiana (Besnard C N. *et. al*) que pudiera ser importante para la evaluación de la enfermedad. Por otra parte también el incremento de marcadores que pudiera llevarnos a definir el probable rumbo de la enfermedad de acuerdo a la especie de microorganismos (J. Slots, *et. al*)

Conclusiones

- De acuerdo a los resultados obtenidos existe la necesidad de tomar mas muestras a pacientes clínicamente sanos y enfermos
- Las pruebas moleculares tipo PCR deben de ser consideradas como un herramienta útil para el diagnostico oportuno de la enfermedad periodontal del adulto
- Promover las técnicas moleculares a nivel consulta privada para mejorar la calidad de el tratamiento, sobretodo en pacientes que acuden a consulta por primera vez
- De ser posible, dar seguimiento a los casos de pacientes positivos aun después de tratarse para ver si después del tratamiento la enfermedad logro o no ser frenada
- De encontrar pacientes sanos que resulten ser positivos habrá la necesidad de hacerles notar los riesgos que puede tener en el caso de descuidar su salud bucal
- Aplicar la técnica a pacientes que ya han sido tratados periodontalmente para observar si hay necesidad de reforzar el tratamiento
- Incrementar la cantidad de iniciadores (primers) para las bacterias mas representativas en los otros tipos de enfermedad periodontal (periodontitis juvenil,etc..)
- Considerar el hecho de que en la cavidad oral humana, existe un inmenso numero de microorganismos, muchos de los cuales ya han sido reportados como agentes etiologicos de otros trastornos y que se encuentran también en la periodontitis y gingivitis(*Helicobacter pilori*, gastritis, *Streptococcus sanguis*, endocarditis bacteriana ,etc...) y esto nos obliga a ver la gran necesidad de conservar una buena salud oral, y darle el verdadero valor que merece para conservar no solo una buen salud bucal sino también una buen salud general.

Apendice

Medios de Cultivo

- **Agar Trypticase de soya con Sangre de Carnero**

Disolver 3g de medio en 95 ml de agua destilada; esterilizar en autoclave 15 minutos a 20 libras por pulgada. Agregar 5 ml de sangre de carnero y aguitar suavemente hasta incorporar toda la sangre en el medio. Basiar el contenido en cajas petri de vidrio (esteril) o desechables

- **Caldo Brusela**

Caldo de brucella	2.8g
Dextrosa al 2%	
Polianetol sulfonato de sodio(0.5%)	
Cristeina (.024%)	
Sacarosa (10%)	
(100ml de volumen total)	

- **Agar brusella**

Agar brucella	4.3g
Dextrosa (D-glucosa)	1.0g
Glicerol	1.0g
Extracto de lebadura	0.5g

- **Dimetil Sulfoxido**

Mesclar 90ml de agua destilada y 10% de DMSO y esterilizar al autoclave a 20 minutos con 15 libras por pulgada

Por otra parte preparar 20ml de agua destilada con .2 g de leche descremada y esterilizar al autoclave 15 minutos a 20 libras por pulgada.

Mesclar ambas soluciones en un mismo matraz y basiar en tubos hasta $\frac{3}{4}$ partes de ellos

Posteriormente se colocan en un recipiente con hielo seco y alcohol (-70 °C) y se deposita una colonia de el microorganismo en cada tubo para ser inmediatamente congelados a -70° C

Preparacion de camara de Anaerobiosis

1. Limpiar las paredes de la camara con SDS
2. Cubrir las paredes con papel Oscuro y colocar en el interior una lampara de luz Ultra violeta durante 15 minutos
3. Sacar el aire (vacío de 20 pulgadas de Mercurio)
4. Conservar un grado constante de humedad de entre 30-40% con gasas húmedas de agua bidestilada esteril al autoclave (15 libras por pulgada a 20 minutos)
5. Colocar acetato de plomo como catalizador
6. Mantener cajas abiertas de *Staphilococcus aureus* y *Escherichia coli* (una caja de cada una) para ayudar a consumir O₂
7. Todo lo anterior debe realizarse 10 días antes de Trabajar
8. Saturar la atmosfera 2 veces con Nitrogeno puro durante 5 minutos
9. Saturar con mezcla anaerobia

Mescla anaerobia

- 70% Hidrogeno
- 20% Nitrogeno
- 10% CO₂

• Jarra de Brewer

Colocar en el interior de la camara un sobre de Gaspak por cada 10 cajas y un sobre de catalizador de la reaccion.

• Buffer TAE 10X

Tris-base	48.4g/l
Acido Acetico Glacial	57.1ml
EDTA 0.5M(pH8.0)	100ml

• Buffer T

Glicerina	14.4g
Tris-base	3.0g
Agua bidestilada	800ml
Metanol	200ml

• Gel de Agarosa 1%

Agarosa	1g
Buffer TAE 1Xcbp	100ml

- **Gel de acrilamida 3.5%**

	10ml
Acrilamida 30%	1.16ml
Agua Bidestilada cbp	6.77ml
5XTBE o TAE	2.00ml
(10%) Persulfato de Amonio	0.07ml(70µl)
Temed	3.5 µl

- **Buffer de Carga**

Azul de bromofenol	0.25%
Xilencianol	0.25%
Glicerol	.30%

- **SDS al 10%**

SDS	10g
Agua bidestilada cbp	100ml

- **Persulfato de monio al 10%**

Persulfato de amonio	10g
Agua bidestilada cbp	100ml

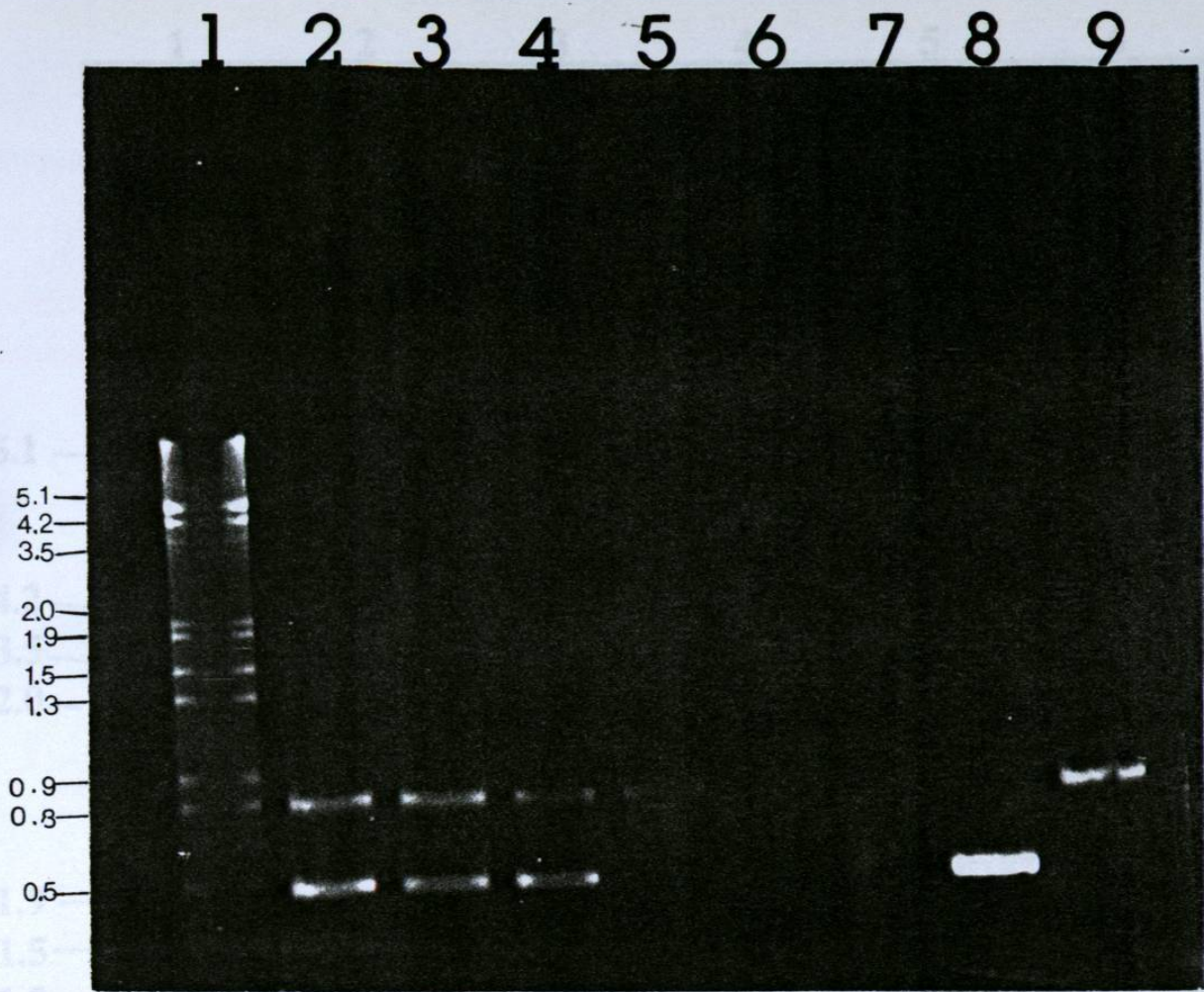


Figura Productos amplificados a partir muestras de pacientes con periodontitis del adulto. Carriles: 1, marcadores de talla molecular; 2-4, productos de PCR de cultivos puros de *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *S. intermedius*, respectivamente; 5-9, productos de PCR de cinco pacientes diferentes con periodontitis.

Figura Productos amplificados a partir de cultivos puros a diferentes concentraciones. Carril 1 marcador molecular fago λ digerido con *Hind* III y *Eco* RI; 2, 8.2^3 ; Carril 3, 8.2^2 ; carril 3, 8.2^1 ; 4, 5, 6, Negativos

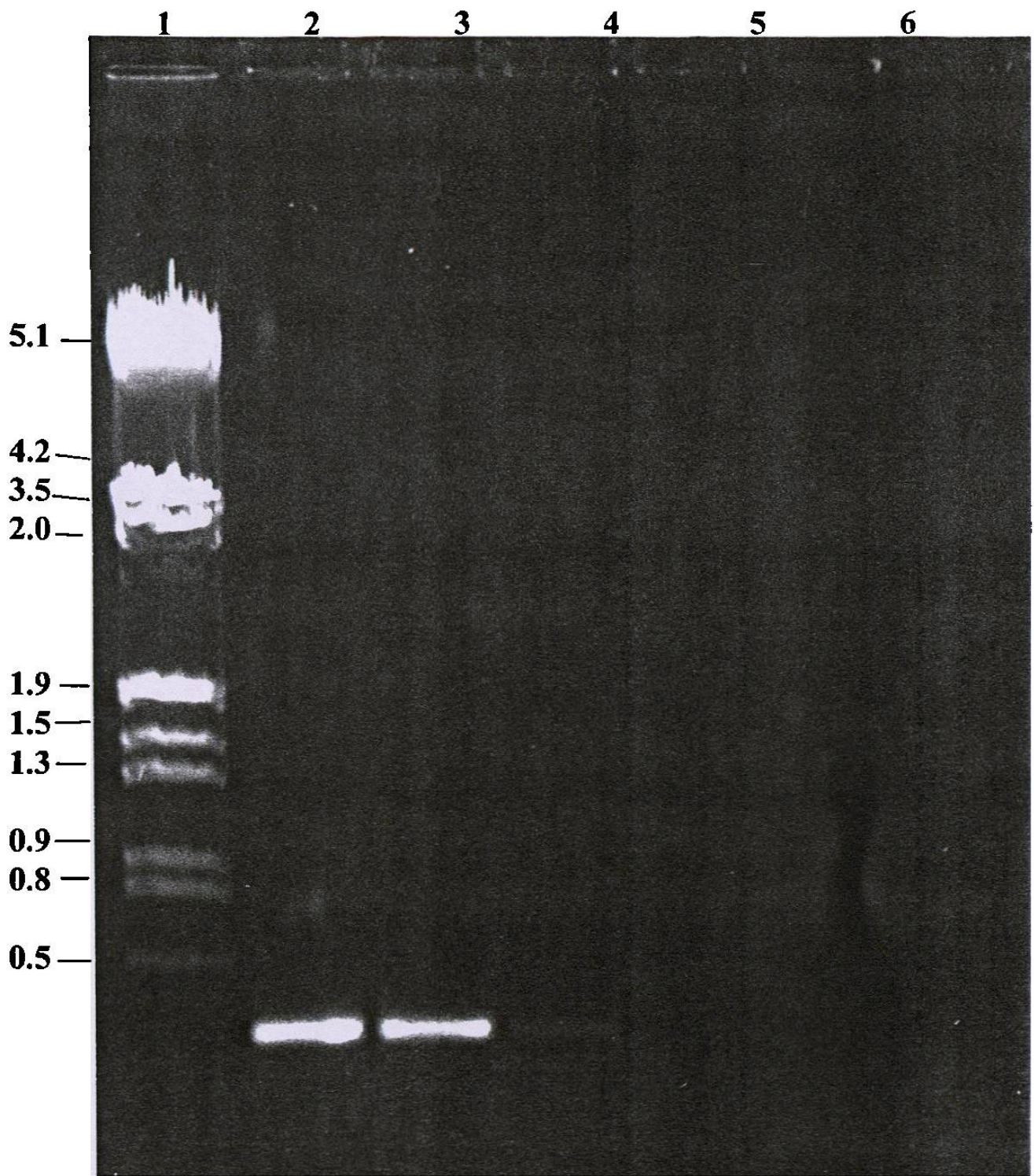
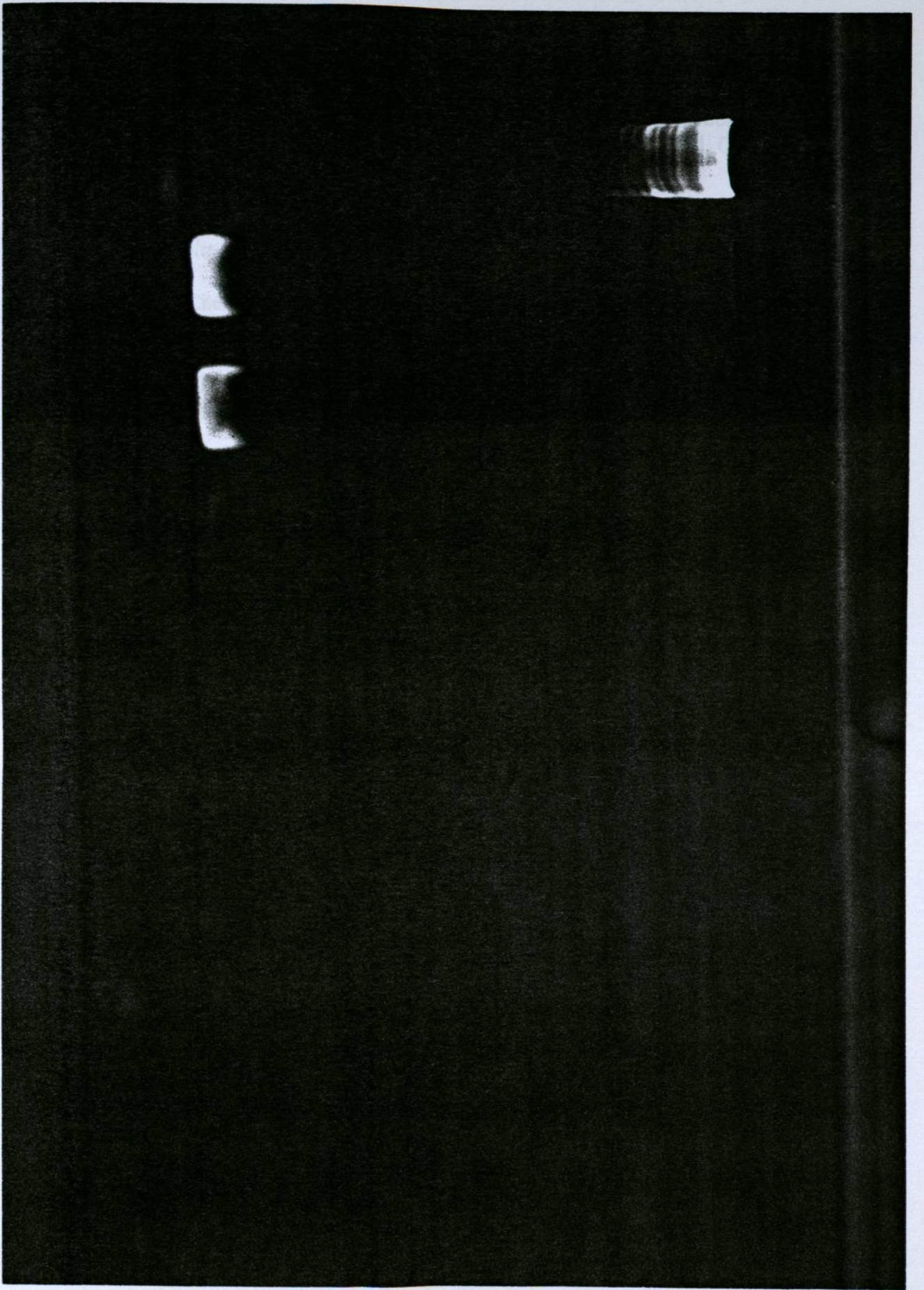


Figura Producto amplificado a partir de cultivos puros a distintas concentraciones. Carril 1 marcador molecular fago λ digerido con *Hind* III y *Eco* R1 ; 2, 8.2³ ; Carril 3, 8.2² ; carril 3, 8.2¹, 4,5,6, Negativos



Literatura Citada

- Ashimoto A, C.Chen,Y. Bakker y J. Slots, 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal patgens and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbial Immunol.* **11**: 266-273.
- Ashimoto A,MJ Flynn y J. Slots. 1995. Molecular genetic detection of *Bacteroides heparinoliticus* in adult periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.***10**:284-287.
- Baelum V., X. Chen, F. Manji, W-M. Luan y O. Fejerskov. 1996. Profles of destructive periodontal disese in different populations. *J. Periodont. Res.* **31**:(en prensa).
- Besnard C N y P.M. Andre. 1994. Automated quantitative determination of hepatitis C virus viremia by revese transcription-PCR. *J Clinic. Microbiol.* 1887-1893.
- Bodinka, A., H. Schmidt, B. Henkel, T.F. Flemming, B. Klaiber y H. Karch. 1994. Polymerase chain reaccion for the identification of *Porphyromonas gingivalis* collagenase genes. *Oral Microbiol. Inmmunol.* **9**: 161-165.
- Carranza, F.A. 1993. *Periodoncia Clínica de Glickman.* F.A. Carranza (De). (7a Ed). Edit. Mc Grae-Hill interamericana, México D.F.
- Cochron, W. 1976. "Tecnicas de Muestreo".C.E.C.S.A. Mexico, pp.105-111.
- DiRienzo, J.M., S. Cornell, L. Kazoroski y J. Slots. 1990. Probe-specific DNA fingerprinting applied to the epidemiology of localized juvenile periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* **5**:49-56.
- DiRienzo, J.M., J. Slots, M.Sixou, M-A. Sol, R. Harmon y T. McKay. 1994. Specific genetic variants of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* correlate with disease and healt in a regional population of families with localized juvenile periodontitis. *Infec. Immun.* **62**:3058-3065.
- Farber J .M.1996. An Introduction to the How and Ways of Molecular Typing. *Journal of Food Protection.* **59**: 1091-1101.
- Geha D J, Uhl J, Gustafarro C A, Persing D H. Multiplex PCR for Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococci* in Clinical Laboratory.
- Glickman.I 1974. *Periodoncia Clínica.* 1a Edicion. Nueva Editorial interamericana, S.A. de C.V. mexico D.F.
- Glickman, I. B., y Smulow,J.B.1966. Histopathology and histochemistry of chronic desquamative gingivitis. *Oral. Surg.*, **21**:325-335.

- Greene A.H.1962. A study of the characteristics of stippling and its relation to gingivalth health. J.periodontal.33. 176.
- Gürtler V y V.A.Stanisich . 1996. New approches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer Region. Microbiology . 142: 3-16.
- HaffajeeA.D, Socransky S.S. 1994. Microbial etiologial agents of destructive periodontal disease. 5. 78-111.
- Holt. S. C. y Progulske A.1993 General Microbiology, Metabolism, and Genetics.” Oral Microbiology and Inmumology”. Segunda edicion. W.B. SaundersComany. P.47-114.
- Kamma J.J. M. Nakou, y F. A. Manti. 1994. Microbiota of Rapidly Progrssive Periodontitis Lesions in Association with Clinical Parameters. J. Periodontal. 63. 1073-1078.
- Kerr K G. 1994. The rap on REP-PCR-based typing systems. Reviews in Medical Microbiology. 5,4: 233-244.Linde.
- Listegarten, M.A.1976. Structure and surface coatings on teeth. A. reviw. J.Periodontal.47. 139.
- Listegarten. M. A. 1992. Microbiological Testing in the Diagnostisis of Periodontal Disease.J. Periodontal. 63. 332-336.
- Léppine G,A.Progulske-Fox. 1996. Duplication and differential expression of hemagglutinin genes in *Porphyromones gingivalis*. Oral Microbiol Immunol. 11 : 65-78.
- Loe, H. 1967. Experimental gingivitis in man. J. Clin. Periodontal.2 282-290.
- Lotufo R F M, J.Flynn y C. Chen, J. Slots.1994. Molecular detection of *Bacteroides forsytus* in human periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 9 : 154-160.
- Kormman, K. S.1982. Age, supragingival plaque, and steroid hormones as ecologicants of the subgingival flora. In Genco,R.J., and Mergenhausen, S.E. (eds.): Host-Parasite Interactions in Periodontal Diseeae. Washigton, S. D. American Society of Microbiology. P. 132.

- Melvin W L, D.A. Assad , G.A. Miller y M.E. Gher M E.1994 .Comparision of DNA probe and ELISA Microbial Analysis Methods and Their Association Whit Adult Periodontitis. J Periodontal . 65: 576-582.
- Moncla B J, S.T.Motley, P. Braham, L. Ewing, T.H.Adams y N.M.J. Vermeulen. 1991. Use of Synthetic Oligonucleotide DNA Probes for Identification and Direct Detection of *Bacteroides forsytus* in Plaque Samples.J. Clin. Microbiol.; 29: 2158-2162.
- Moore W.E., L.H. Moore, R.R. Ranny, R.M. Smibert, H.A. Schenkein. 1991. The microflora of periodontal sites showing active destructive progressin.18. J.Clin. Periodontal. 729-739.
- Morgan. R.E.,y W.J. Wingo.1966. The oxigen consumption of gingival crevicular epithelium. Oral Surg.22. 257.
- Mulder J, N. Mc Kinney, C. Christopherson, J.Sninsky, L.Greenfield y S.KwoK.1994. Rapid and Simple PCR Assay for Quantitation of Human Immunodeficiency Virus Tyoe 1 RNA in Plasma: Application to Acute Retroviral Infection. J Clin Microbiology . 292-300.
- Nisengard, R.J., M.G. Newman y J.J. Zambon. 1992. Periodontal disease. En "Oral Microbiology and Immunology" Segunda Edición. R.J. Nisengard y M.G. Newman (Ed). Editorial W.B. Saunders Company. Filadelfia, EUA. pp. 360-384.
- Petit M D A, A.J.Van Winkelhoff, T.J.M. Van Steenbergen y J. de Graff.1993. *Porphyromonas endodontalis*: prevalence and distribution of restriction enzyme patterns in familis. Oral Microbial Immunol. 8 219-224.
- Piatk M, M.S. Saag , L.C. Yang , S.J. Clark, K-C. Luk, B.H. Hahn , G.M. Shaw, y J.D.Lifson. 1993. High Levels of HIV-1 in Plasma During All Stages of Infection Determined by Competitive PCR. Scince. 259: 1749- 1754.
- Plikaytis B B, J.L. Marden , J.T. Crawford, C.L.Woodley, W.R. Butler, T.M. y Shinnick. 1994. Multiplex PCR Assay Specific for the Multidrug-Resistant Strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 1542-1546.
- Plikaytis BB, J.TCrawford,C.L. Woodley, W.R.Butler, K.D. Eisenach, M.D. Cave y T. M. Shinnick . 1993. Rapid, amplification-based fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Gen. Microbiol. 139: 1537-1542.
- Polak B, M.A.Peck, J.K.Dyer, P. Bird , R.A. Reinhardt y G .Seymour.1995. Purification and caracterization of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane antigens. Archs Oral Biol. 40: 905-912.

- Ruffer. M.A. Studies in Paleopathology of Egypt. Chicago University of Chicago Press." *Periodontologia clinica de Glickman*" (7a Ed). Interamericana Mc. Graw-Hill. Mexico D.F. p. 1-13.
- Saarela, M., von Troil-Linden, H. Torkko, A. Stucki, Alaluusua, H. Jousimies-Somer S. Asikainen. 1993. Transmission of oral bacterial species between spouses. *Oral Microbiol Immunol.* 8: 349-354.
- Shen Z, Liu J, R.L. Wells y M.M Elkind, 1993. Rapid quantitative analysis of differential PCR products by high-performance liquid chromatography. *BioTechnoloquies.* 15: 90-94.
- Slots J. 1977. Microflora in the healthy Gingival Sulcus in Man. *Scand. J. Dent. Res* 85: 243. 254
- Slots J., L. Bragd, M. Wikstrom, G. Dahlen. 1986. The accuracy of *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J. Clin. Periodontal.* 13: 570-577.
- Slot J. Genco, J. 1990. "Contemporary periodontics" Mc. Graw-hill. St. Luis.
- Slot J. Genco, R.J. 1984. Back-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: Virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J. Dent. Res.* 63 :412.
- Slots, J., Y.B. Liu, J.M. Di Rienzo y C. Chen. 1993. Evaluating two methods for fingerprinting genomes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol. Immunol.* 8:337-343 .
- Smith, G. L., S.S. Socransky y S. Smith. 1989. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol. Immunol.* 4:47-51.
- Socransky S. S., S.D. Manganillo. 1970. The oral microbiota of man from birth to senility. *J. Periodontal.* 42: 485-496.
- Suami, J.C. Green, J.R. Vermillion, J. Doyle, J.J. Chang y E.C. Leatherwood. 1973. A Follow-up study of former participants in a controlled oral hygiene study. *J Periodontal.* 44:662-666.
- Tay, F., Y.B. Liu, M.J. Flynn y J. Slots. 1992. Evaluation of a non-radioactive DNA probe for detecting *Porphyromonas gingivalis* in subgingival specimens. *Oral Microbiol. Immunol.* 7: 344-348.

- Van-Steenbergen, T.J.M., M.D. Petil, L.H. Scholte, U. Van der Velden y J. Graff. 1993. Transmission of *Porphyromonas gingivalis* between spouses. J. Clin. Periodontol. 20:340-345.
- Wolinsky, L.E. 1992. Caries and cariology. En "Oral Microbiology and Immunology" Segunda Edición. R.J. Nisengard y M.G. Newman (Ed). Editorial W.B. Saunders Company. Filadelfia, EUA. pp. 341-359.
- Zambon J.J. L.A Christersson, J. Slots. 1983. Actinobacillus Actinomycetemcomitans in human periodontal disease. Prevalence in patients groups and distribution of biotypes and serotypes witin fammilies. J. Periodontal. 54: 707-711.

