

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



IDENTIFICACIÓN DE HERPES VIRUS A PARTIR DE PACIENTES CON
PERIODONTITIS CRÓNICA EN EL NORESTE DE MEXICO.

Por

MAURICIO GONZÁLEZ REYES

Como requisito para obtener el grado de MESTRÍA EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS con especialidad en Periodoncia

Agosto, 2011

IDENTIFICACIÓN DE HERPES VIRUS A PARTIR DE PACIENTES CON
PERIODONTITIS CRÓNICA EN EL NORESTE DE MÉXICO.

COMITÉ DE TESIS

DRA. MYRIAM ANGÉLICA DE LA GARZA RAMOS

Secretario

Vocal

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	
DEDICATORIA.....	
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	2
3.OBJETIVOS.....	3
3.1 Objetivo general	
3.2 Objetivos Específicos	
4. ANTECEDENTES	4
4.1 Periodontitis Crónica	6
4.2 Herpes Simplex Virus.....	7
4.3 Características Microbiológicas para PCR	10
4.4 Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR).....	11
4.5 Oligonucleótidos.....	12
4.6 Enzima ADN Polimerasa	12
4.7 Buffer del Taq Polimerasa	13
4.8 dNTP's	13
4.9 Etapas del PCR	14
4.10 Electroforesis.....	15
5. MÉTODOS.....	17
5.1. Parámetros Clínicos.....	17
5.2. Toma de la Muestra	19

5.3. Protocolo Utilizado para la Purificación de ADN	20
5.4 Preparación del ADN viral para PCR	21
5.5 Parámetros para el PCR	22
5.6 Electroforesis	22
5.7 Fotografías	23
6. RESULTADOS	25
7. DISCUSIÓN.....	27
8. CONCLUSIONES	29
APÉNDICES	30
LITERATURA CITADA	34
RESUMEN BIOGRÁFICO	43

RESUMEN

La periodontitis se define como una enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte de los dientes, causada por microorganismos o grupos de microorganismos específicos, que tienen como resultado la destrucción progresiva del ligamento periodontal y el hueso alveolar, la cual es atribuible a múltiples agentes infecciosos y está interconectada con las respuestas inmunitarias humorales y celulares del huésped. Este estudio tuvo como objetivo el determinar la presencia de herpesvirus en sujetos del noreste de México que presenten periodontitis crónica, por lo que se tomaron muestras de pacientes que se presentaron a la clínica de pregrado de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León. A cada paciente se le realizó el diagnóstico periodontal por medio del sondeo cuidadoso de las bolsas así como del llenado de su historia clínica, a los pacientes que efectivamente presentaban los objetivos de inclusión se les recolectó tres muestras de saliva en las piezas que presentaran las bolsas de mayor tamaño, dichas muestras se tomaron con un swap estéril el cual se colocó en solución glucosilada al 10% para su almacenamiento a menos ochenta grados Celsius, a dichas muestras se les realizó la purificación de ADN y se les sometió al PCR (reacción de cadena de la polimerasa), al término se les aplicó electroforesis dando como resultado la presencia de HVS 1 en cuatro pacientes de los cincuenta estudiados, como conclusión podemos llegar que en algunos casos si hay la presencia de herpes tipo 1 en las bolsas periodontales pero los resultados no dan una relación íntima de la presencia de este patógeno con la evolución de la periodontitis crónica en dichos pacientes.

ABSTRACT

Periodontitis is defined as an inflammatory disease of the supporting tissues of teeth caused by microorganisms or groups of specific microorganisms, which result in progressive destruction of the periodontal ligament and alveolar bone, which is attributable to multiple infectious agents and is interconnected with the humoral and cellular immune responses of the host. This study aimed to determine the presence of herpesvirus in northeastern of Mexico subjects presenting chronic periodontitis, samples were taken from patients presenting to the clinic of the Universidad Autonoma de Nuevo Leon. Each patient had periodontal diagnosis generalizations through careful probing of the bags as well as filling the medical history, patients who had the inclusion objectives were collected three saliva samples in the deeper pockets of the mouth, the samples were taken with a sterile swap which was placed in 10% glycosylated solution for storage at negative eighty degrees Celsius, those samples were make the purification of DNA and to PCR (Polymerase chain reaction), electrophoresis was performed resulting positive of HVS 1 in four of the fifty patients studied, and we conclude that in some cases there are herpes type 1 in periodontal pockets but the results wont give an intimate relationship to the presence of this pathogen on the evolution of chronic periodontitis in these patients.

1. INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica causada por la infección de microorganismos orales que afectan a la respuesta de defensa humoral y celular del huésped. (Saygun 2002)

La periodontitis crónica es la forma más frecuente de periodontitis. Está es de alta prevalencia en adultos mayores a 35 años, pero también se puede presentar en niños. La periodontitis crónica está vinculada con la acumulación de placa y cálculos y su progresión puede ser leve o moderada, sin embargo se observan periodos de destrucción más rápidos.

Es importante tomar en cuenta la composición de la microflora subgingival ya que esta varía significativamente cuando el periodonto se encuentra afectado patológicamente. Investigaciones previas sobre estas patologías se han enfocado en bacterias periodontales putativas y sus productos. (Saygun 2002)

Los Herpes Simplex Virus pueden infectar o alterar la estructura celular y la respuesta de defensa de los tejidos periodontales del huésped. (Contreras 2000).

La importancia de este trabajo radica en la determinación de Virus Herpes Simplex y sus serotipos en la relación que pueda existir entre la presencia de estos en la enfermedad periodontal crónica en la población del noreste de México.

2. HIPÓTESIS

Existe la presencia de virus Herpes Simplex en sujetos del noreste de México que presentan periodontitis crónica

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar la presencia de herpesvirus en sujetos del noreste de México que presenten periodontitis crónica.

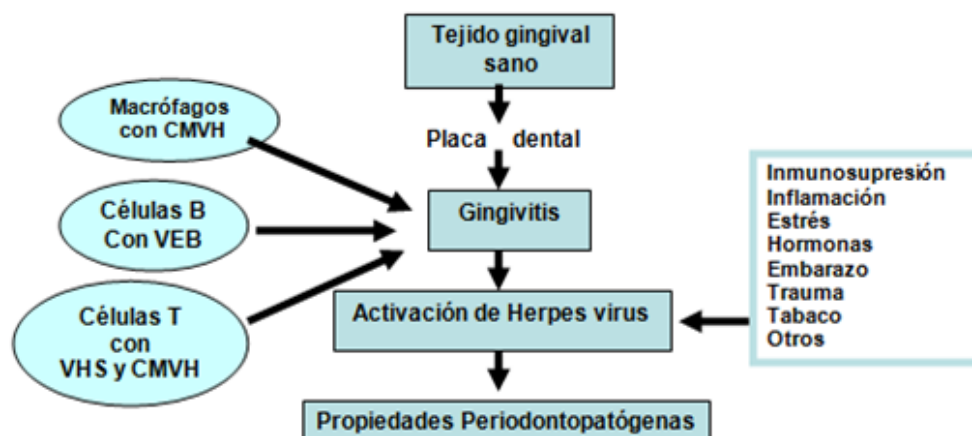
3.2 Objetivos Específicos

- 3.2.1 Reclutamiento de pacientes con enfermedad periodontal crónica.
- 3.2.2 Obtención de fluidos periodontales.
- 3.2.3 Análisis molecular por PCR de los fluidos periodontales.
- 3.2.4 Identificación en base a su PCR de los serotipos encontrados de HSV.
- 3.2.5 Análisis estadístico y reporte de datos.

4. ANTECEDENTES

La periodontitis se define como una enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte de los dientes, causada por microorganismos o grupos de microorganismos específicos, que tienen como resultado la destrucción progresiva del ligamento periodontal y el hueso alveolar con formación de bolsa, recesión o ambas. (Carranza 2010)

La periodontitis es una enfermedad atribuible a múltiples agentes infecciosos y está interconectada con las respuestas inmunitarias humorales y celulares del huésped. Desde mediados de la década de los 1990's, los Herpes Simplex Virus (HSV), han emergido como agentes patógenos putativos en diversos tipos de enfermedades periodontales. En particular, se considera que el virus citomegalovirus humano (CMVH) y el virus Epstein-Barr (EBV) juegan una importante participación en la etiopatogenia de los tipos graves de periodontitis.



La mayoría de los virus humanos conocidos por causar enfermedades orales son los virus con material genéticos ADN, los cuales son adquiridos en la niñez o en la juventud por contacto con sangre, saliva o secreciones genitales, su sello característico de acción es el daño en células endoteliales y/o epiteliales con consecuencias en el sistema inmune. (Contreras 2000)

Las células endoteliales infectadas por herpesvirus pueden reducir las defensas del huésped y favorecer el crecimiento y de bacterias patógenas en co-infecciones piógenas. Cytomegalovirus (HCMV) es el miembro más común de la familia de los herpesvirus, es el responsable de un porcentaje significativo de las infecciones virales asintomáticas. (Saygun 2002)

Dentro de los herpes simplex virus, los más frecuentemente encontrados han sido el HSV-1, HSV- 2, HSV-6, HSV-7 y HSV-8. Algunos estudios han encontrado la relación de estas subespecies con la enfermedad periodontal. (Contreras, 2000). Sin embargo otros estudios han encontrado estas subespecies tanto en pacientes con enfermedad periodontal como pacientes periodontalmente sanos. (Cassai, 2003)

Es bien conocido que la mayoría de los virus se relacionan entre si, por lo cual es común observarlos en enfermedades virales como co-infecciones, sobre todo en sujetos inmunocomprometidos, Contreras y Slots examinaron la frecuencia de HCMV, EBV-1, EBV-2, HSV y HIV en muestras subgingivales de 27 adultos con periodontitis y gingivitis usando el método de reacción en cadena de la polimerasa. (PCR). 89% de los examinados presento al menos 1 de los 5 virus en las bolsas periodontales. También demostraron la presencia de EBV-1, HCMV y otros herpesvirus en lesiones periodontales crónicas y juveniles. (Saygun 2002)

Gracias al desarrollo de la biología molecular existen herramientas de laboratorio que determinan la presencia del material genéticos de estas partículas, ya sea del ADN y/o RNA, estos pueden ser determinados y analizados desde especímenes clínicos hasta biopsias, los cuales ya son de uso rutinario en los laboratorios de inmunovirología. El genoma viral se puede medir directamente por medio de la hibridación, o ser detectados después de la amplificación del ácido nucleico. Actualmente lo mas practico es la PCR,

ya que representa un método rápido para identificar el ácido nucleico viral en especímenes clínicos. (Slots 2000)

Diversos laboratorios independientes de varios países han reportado la aplicación de técnicas de ampliación de PCR de las secuencias de ácido nucleico del CMVH, VEB y otros herpesvirus en lesiones de periodontitis graves de adolescentes y adultos (Slots 2006). Las lesiones de periodontitis que dan positivo para herpesvirus albergan mayores concentraciones de bacterias periodontales patógenas. Existe una clara asociación entre la infección activa por CMVH y la progresión de la periodontitis. Los herpesvirus tienen un alto potencial de replicación, en células de tejido conectivo, y estas a su vez facilitan la migración de otras células por medio de quimioattractantes o quimiocinas para desarrollar un proceso inflamatorio, esta producción de citosinas y quimiocinas que dañan los tejidos y participan directamente en la eliminación del virus, considerando que la mayoría de los virus desarrollan diferentes mecanismos de evasión inmunológica (Slots 2006)

4.1 Periodontitis Crónica

La periodontitis crónica se define como una enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte de los dientes causada por microorganismos o grupos de microorganismo específicos que producen la destrucción progresiva del ligamento periodontal y el hueso alveolar con formación de bolsa, recesión o ambas. (Carranza 2010) Esta es la más común y se da en adultos mayores a 35 años, pero también se puede presentar en niños. Está vinculada con la acumulación de placa y cálculo, su progresión puede ser leve o moderada, sin embargo se observan periodos de destrucción más rápidos. Diversos factores locales, sistémicos y ambientales influyen en la interacción de los tejidos de soporte del huésped así como las bacterias presentes en dicha enfermedad. La periodontitis crónica ocurre como una enfermedad localizada en que menos del 30% de los sitios valorados presenta una pérdida de inserción y ósea. Se

denomina generalizada cuando más de un 30 % de los sitios se encuentran afectados. (Armitage, G. 1999)

La enfermedad también se puede clasificar dependiendo de su intensidad. Así se clasifica como leve cuando existe una pérdida de inserción clínica de 1-2 mm; moderada cuando existe una pérdida de inserción clínica de 3-4mm y grave cuando existe una pérdida de inserción clínica de 5mm o más. (Armitage, G. 1999)

4.2 Herpes Simplex Virus

Los herpes simplex virus infectan mucosas, piel, ojos y el sistema nervioso como enfermedad más grave. Durante la infección primaria o aguda pueden o no existir manifestaciones: de un 88% a 99% de las infecciones virales orales causadas por herpes simplex virus son asintomáticas. Posterior a la infección primaria o aguda el virus infecta células sensoriales nerviosas y permanece en los ganglios trigéminos en cabeza cuando la infección es por HSV-1 e iliacos cuando infecta HSV-2.

Los herpes simplex virus presentan una envoltura icosaédrica de 100 nm con un ADN linear de 100×10^6 Dalton. Se replica en el núcleo de la célula huésped mediante adhesión a la membrana nuclear y causando tipos de infecciones una lítica en células epiteliales y/o endoteliales y otra de latencia en células neuronales. El tamaño del virus desnudo es de 110nm. Los herpes virus constan de una cubierta que contiene el ADN, una capsida isopentahédrica, y una bícapa lipídica. Ante los distintos estímulos hormonales, inmunológicos, físicos o químicos, el virus en su periodo de latencia se reactiva, migra de las neuronas y viaja a través del sistema nervioso, para finalmente causar lesiones en células endoteliales.

Los virus son causa de varias enfermedades infecciosas. Están implicados en un 15 a 20% de neoplasias en humanos. Además no tienen la propiedad de producir energía por lo que su replicación depende de la capacidad propiamente del virus de infectar al

hospedero para poder obtener su energía y realizar la síntesis de sus proteínas. La infección viral puede desencadenar en una replicación rápida del agente y la destrucción de la célula infectada.

Los virus ADN se replican en el núcleo y tienen mayor capacidad de supervivencia que los virus ARN. La replicación viral inicia cuando el virión se adhiere mediante sus receptores a la membrana de las células humanas. Una vez adherida, la partícula viral ingresa en la célula y ocurre la transcripción del mRNA seguida de la síntesis de la proteína viral y la replicación de dicha partícula en el genoma de la célula hospedera. La interacción entre la partícula viral y la célula hospedera, desencadena interacciones en la célula como inducción de citoquinas, prostaglandinas y cambios en el citoesqueleto. Una vez establecida la partícula viral en el genoma, los viriones son liberados por exostosis o por la lisis de la célula.

Los herpes virus se pueden encontrar en distintas fases entre ellas; una fase productiva y una fase o periodo de latencia. Durante el periodo de latencia, el ADN viral se integra y actúa como parte del genoma de la célula huésped. Posteriormente ingresa en un estado de productividad en el que el virus amplifica su genoma en unas 100 a 1000 veces como producto de la replicación viral. Aproximadamente existen 120 tipos de herpes virus identificados, sin embargo son ocho los implicados en afectar células humanas. Entre ellos se encuentran: herpes simple virus tipo 1 y tipo 2 (HSV), virus de varicela zoster, virus del Epstein-Barr (EBV por sus siglas en inglés), el citomegalovirus (HCMV por sus siglas en inglés), el herpes virus humano tipo 6, 7 y 8. Este último llamado virus del sarcoma de Kaposi. Para que el virus pueda sobrevivir y replicarse, necesita disminuir la cantidad de macrófagos, linfocitos y otras células, disminuyendo así la respuesta inmune del huésped.

Los herpes virus están confinados a actuar en sistemas inmunes inmaduros o sistemas inmunes comprometidos. Factores como el estrés, cambios hormonales, infecciones, fármacos inmunodepresores pueden hacer que el virus que se encuentra en una fase de latencia, se active e ingrese en su ciclo reproductivo, como se menciono anteriormente. Los herpes virus son altamente selectivos a la hora de escoger sus órganos blancos a los cuales infectar, reflejando así su capacidad de tropismo.

Por otra parte el virus citomegalovirus (HCMV) infecta monocitos y macrófagos, linfocitos T, células de los conductos salivares, células endoteliales, fibroblastos, leucocitos polimorfonucleares, y se establecen en las células mieloides en su periodo de latencia y el virus Epstein-Barr (EBV) infecta linfocitos B, tanto en su etapa reproductiva como en su periodo de latencia y también infecta el epitelio de la orofaringe.

La transmisión de los herpes virus se puede dar prenatal; de madre a hijo o de persona a persona por contacto directo mediante secreciones orofaríngeas, secreciones vaginales, semen, leche materna, lágrimas, saliva, heces fecales y sangre. Los herpes virus pueden estar en periodo latente, subclínico o clínico. Las manifestaciones clínicas más serias suelen apreciarse cuando la lesión ocurre en adolescentes. La infección con herpes virus en un paciente inmunocomprometido puede elevar el riesgo de otras infecciones de tipo bacteriana, fúngica u otras infecciones virales, como el caso de pacientes VIH+.

La respuesta inmune celular es la encargada de eliminar las células infectadas con herpes virus mediante los linfocitos. Los linfocitos T citotóxicos y las células asesinas (NK) son las encargadas de evitar la replicación del herpes virus y por ende las encargadas de mantener al virus en un estado de latencia.

La respuesta de los linfocitos T cambia conforme avanza el tiempo y está relacionada con la presencia del herpes virus ya que en los inicios se aprecia una respuesta de las células CD4+ bastante marcada. En el periodo de latencia el proceso de inmunidad se encuentra mediado por las células CD8+.

Los herpes virus actúan sobre la respuesta de los macrófagos y linfocitos disminuyendo la capacidad de defensa y así poder realizar sus procesos de supervivencia. Los herpes virus también actúan en la regulación de citoquinas ya que aumentan las citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , INF γ). En cantidades normales estas citoquinas resultan de gran ayuda en la respuesta del organismo al herpes virus, sin embargo, al verse estas citoquinas aumentadas, por los herpes virus, resulta en una respuesta exagerada convirtiéndose en un estímulo fisiopatológico. El herpes virus permanece latente en el ganglio de Gasser, y factores como luz solar, inmunosupresión, radiación y radioterapia pueden desencadenar la

recurrencia de las lesiones por herpes virus. En pacientes inmunocomprometidos, la recurrencia intraoral puede presentarse en epitelio queratinizado y no queratinizado, en cualquier parte de la boca, transformándose y convirtiéndose en lesiones severas que pueden complicarse y diseminarse con una morbilidad significativa y evolución más larga de lo normal.

Los anticuerpos juegan un papel importante en la inmunidad ante las infecciones virales. La IgA juega un papel importante en la resistencia a la reinfección. La IgG y la IgM son responsables en la neutralización del virus en plasma. La IgA neutraliza los virus en mucosas. La IgM aparece antes de la IgG en los primeros dos días a la infección viral. Actualmente se sabe muy poco de la actividad de la IgE en la respuesta viral. La fiebre, el interferón y los factores genéticos proveen resistencia a las infecciones virales. En el caso de la fiebre, la temperatura elevada disminuye la capacidad de replicación viral y ayuda a que el crecimiento de otras cepas de virus se vean afectadas.

El citomegalovirus es genéticamente distinto a los herpes virus 1 y 2. In Vitro, crece más rápido en fibroblastos que en tejido epitelial o células linfoides. La replicación de citomegalovirus es lenta y además ineficiente, sin embargo causa infecciones latentes en el epitelio renal, glándulas salivarias y ciertos leucocitos.

La transmisión del citomegalovirus ocurre de varias rutas dentro de las cuales se encuentran el contacto sexual, vía oral, transfusiones sanguíneas y trasplantes de órganos. El virus en periodo de latencia se puede reactivar cuando el huésped se encuentre en estado de inmunosupresión. El citomegalovirus presenta cuadros clínicos de mononucleosis caracterizada por fiebre, y malfuncionamiento del hígado

4.3 Características Microbiológicas para PCR

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 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 microorganismo depende absolutamente de la presencia de proteínas para llevar a cabo todas sus funciones vitales, incluyendo la síntesis de todos sus demás 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 al 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.

4.4 Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR)

El término PCR (Polimerase Chain Reaction) se define como el proceso enzimático de copiado de un segmento de ADN in Vitro, utilizando una enzima ADN polimerasa termoestable. Fue creado por Kary B. Mullis en el año de 1985, este proceso se efectúa utilizando una alta temperatura para la separación de la doble hélice del ADN a estudiar, a la cual se unen pequeñas moléculas de ADN sintéticas llamadas oligonucleótidos que proveen extremos 3' OH para la síntesis de ADN de la polimerasa.

Los reactivos necesarios para llevar a cabo la PCR es el ADN templado o blanco, este es el ADN del gen que se utiliza para detectar un organismo específico, en este caso herpes virus. Este ADN debe ser altamente específico para el organismo a estudiar y uno de los más usados es el gen del ARN 16S. Se emplean secuencias de alta variabilidad presentes en este gen. En teoría, 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.

4.5 Oligonucleótidos

Se trata de partículas de ADN de una sola hebra de aproximadamente 10 a 30 nucleótidos, sintetizados artificialmente. Estos son complementarios a los extremos de la secuencia de ADN blanco que se requiere detectar. Debe de tener ciertas características dentro de las que se encuentran, ser capaz de unirse por apareamiento específico de bases a una sola región en el ADN blanco, contener una alta proporción de guaninas y citosinas, alrededor de 50%, para tener mayor estabilidad, no deben ser complementarios consigo mismos, ni con el otro oligo utilizado ya que esto puede evitar su unión eficiente al ADN blanco, su diseño debe ser tal que uno reconozca la región 5' de la secuencia deseada y el otro la región 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 al ADN de otros microorganismos y también poseer una alta estabilidad de unión al ADN blanco. Lo cual se mide con el parámetro T_m (temperatura meeting, o valor de temperatura al cual el 50% de las moléculas del oligo están disociadas). La T_m debe ser mayor a 50°C.

4.6 Enzima ADN Polimerasa

Esta enzima es la que efectuará la síntesis del ADN blanco a partir de los extremos 3' de los oligos. Se emplea una enzima termoestable de la bacteria *Thermus aquaticus*. Esta enzima es también 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. El Taq requiere ciertas condiciones para efectuar el copiado de una molécula de ADN; estas son, el ADN que va a ser copiado, debe de

estar en forma de cadena sencilla, a esta condición se le conoce como desnaturalización del ADN, otra condición es 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 nucleótidos por nucleótido, la cadena complementaria a partir de nucleótidos precursores conocidos como dNTP's incorporando a la nueva cadena el nucleótido con a base nitrogenada complementaria a la cadena ADN blanco y también se requiere la presencia de iones Mg^{+2} que actúan como cofactores en la síntesis de ADN.

4.7 Buffer del Taq Polimerasa

Es una solución que mantiene el pH constante, La enzima sólo 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 enzimática.

4.8 dNTP's

La abreviación dNTP's significa cualquiera de los cuatro nucleótidos siguientes: dATP', dGTP, dCTPT o dTTP's Son nucleótidos trifosfatados precursores del ADN. Aunque el ADN consta de nucleótidos con un sólo fosfato, para su síntesis se requieren dNTP's.

4.9 Etapas del PCR

4.9.1 Desnaturalización

En esta etapa el ADN blanco que va a ser copiado se somete de aproximadamente 92°C-98°C. Bajo estas condiciones, las dos cadenas del ADN (unidas mediante puentes de hidrógeno) se separan por acción del calor. Esta etapa permite que las secuencias de nucleótidos de cada cadena sean expuestas y queden disponibles para ser reconocidas por los oligos en la etapa que sigue.

4.9.2. Alineamiento

En esta etapa, la temperatura se disminuye a un valor de por lo apareamiento específico entre los oligos las cadenas sencillas del segmento del ADN blanco. Esta etapa se efectúa normalmente a 50°C-55°C por un tiempo de 30 a 90 segundos. Las condiciones pueden variar dependiendo del diseño de los oligos. Esta etapa es crucial ya que es la que determina la unión específica de los oligos a la secuencia blanco.

4.9.3. 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 oligonucleótido. Esto se efectúa a una temperatura de 72°C en un tiempo aproximado de 30 a 90 segundos. (Barrera Saldaña, A. López, R. Rojas, A. 1993)

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 manera que al ADN se duplicará con cada ciclo. Además, el segmento que se duplica tiene un tamaño que está determinado por la distancia que existe entre los oligos, ya que la síntesis del ADN sólo se efectúa a partir del 3' de los oligos.

Después de un número determinado de ciclos sucesivos, se pueden tener 2N ejemplo, después de 20 ciclos, la cantidad de copias del ADN blanco es de 220, grandes cantidades de ADN específico que puede ser detectado por métodos convencionales de análisis de ácidos nucleicos como la electroforesis.

4.10 Electroforesis

La electroforesis es una herramienta de análisis simple y rápido para una mezcla de moléculas que migran en un campo eléctrico y son separadas en base a su carga. Se define como el proceso de moviendo de moléculas con carga eléctrica en soluciones de pH determinado aplicando un campo eléctrico a través de la mezcla. Este método permite separar las proteínas y otras macromoléculas como el ADN y ARN. EL movimiento de estas moléculas depende de su carga eléctrica, tamaño y forma.

Para realizar la separación del ADN por medio de electroforesis es necesario la utilización de una matriz sólida la cual puede estar compuesta de diferentes materiales tales como: celulosa, acetato y geles de poliacrilamida, agarosa u almidón.

La agarosa y la poliacrilamida son las más utilizadas 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 buffer (pH de 8) 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 en un tiempo aproximado de 1 a 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 etilo. 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 al ADN del tamaño conocido.

5. MÉTODOS

Se tomaron muestras clínicas (Swaps) de pacientes que acuden por primera vez a la clínica de pregrado de periodoncia de la Facultad Autónoma de Nuevo León, a los cuales se les realizó su historia clínica general y periodontal completa así como exámenes de diagnóstico tales como radiografías periapicales, modelos de estudio, fotografías y examen intraoral para así poder diagnosticar el padecimiento.

5.1. Parámetros Clínicos

Profundidad de Bolsa: Se define como la distancia entre el margen gingival a la base del surco (Cantón, J., 1989) (Armitage, G., 1996). Esta medición se realiza con una sonda periodontal calibrada tipo North Carolina No. 15 y un espejo dental No.5, y sus medidas promedio fisiológicas van desde 1mm hasta 3mm.

Nivel de inserción clínica: El nivel de inserción es la distancia entre la unión amelo-cemento y la base del fondo del surco (Armitage, G., 1996). Esta medición se realiza con sonda periodontal calibrada tipo North Carolina No. 15 y un espejo dental No.5.

Índice de placa: Se utilizará el índice de Quegley y Hein modificado por Turesky (1970) que pertenece a los índices que se utilizan para evaluar signos, síntomas y factores etiológicos asociados con enfermedades dentales. Este índice

mide la cantidad de placa bacteriana visible a través de un agente revelador (fucsina) en las superficies vestibulares y linguales de todos los dientes excepto los terceros molares.

Se emplean los siguientes dígitos de acuerdo a la apreciación clínica del registro:

0: no hay placa bacteriana visible en el diente, la superficie dental está limpia.

1: se observan manchas irregulares de placa en el tercio gingival del diente, sin llegar a formar una franja continua.

2: se observa una franja continua de placa bacteriana en el tercio gingival, pero sin llegar a cubrir por completo un tercio de la superficie examinada.

3: la placa bacteriana cubre el tercio gingival completo de la superficie examinada.

4: se observa placa bacteriana cubriendo dos tercios (gingival y medio) de la superficie examinada.

5: la placa bacteriana cubre más de dos tercios (gingival, medio e incisal u oclusal) de la superficie examinada, o incluso los cubre por completo.

Una vez registrados los valores de los dientes individuales, se suman y se dividen entre el número de dientes medidos para obtener el promedio de los valores de las áreas examinadas, el cual representa el índice de placa bacteriana.

Índice gingival: Este índice fue propuesto por Løe y Silness (1967) para registrar de manera objetiva los cambios cualitativos que se presentan en el tejido gingival, tales cambios en el color, edema o inflamación, sangrado y ulceración. Se desliza suavemente la sonda periodontal a lo largo de la pared blanda del surco, se determina el calor correspondiente a cada pieza de acuerdo al siguiente código:

0: ausencia de inflamación clínica, sin sangrado al sondeo.

1: clínicamente se observa inflamación leve caracterizada por ligero cambio en la coloración, ligero edema, poco cambio en la textura gingival y sin sangrado al sondeo.

2: puede observarse clínicamente inflamación moderada caracterizada por franco enrojecimiento de la encía, edema moderado, textura lisa con aspecto brillante, aumento de volumen con sangrado al sondeo

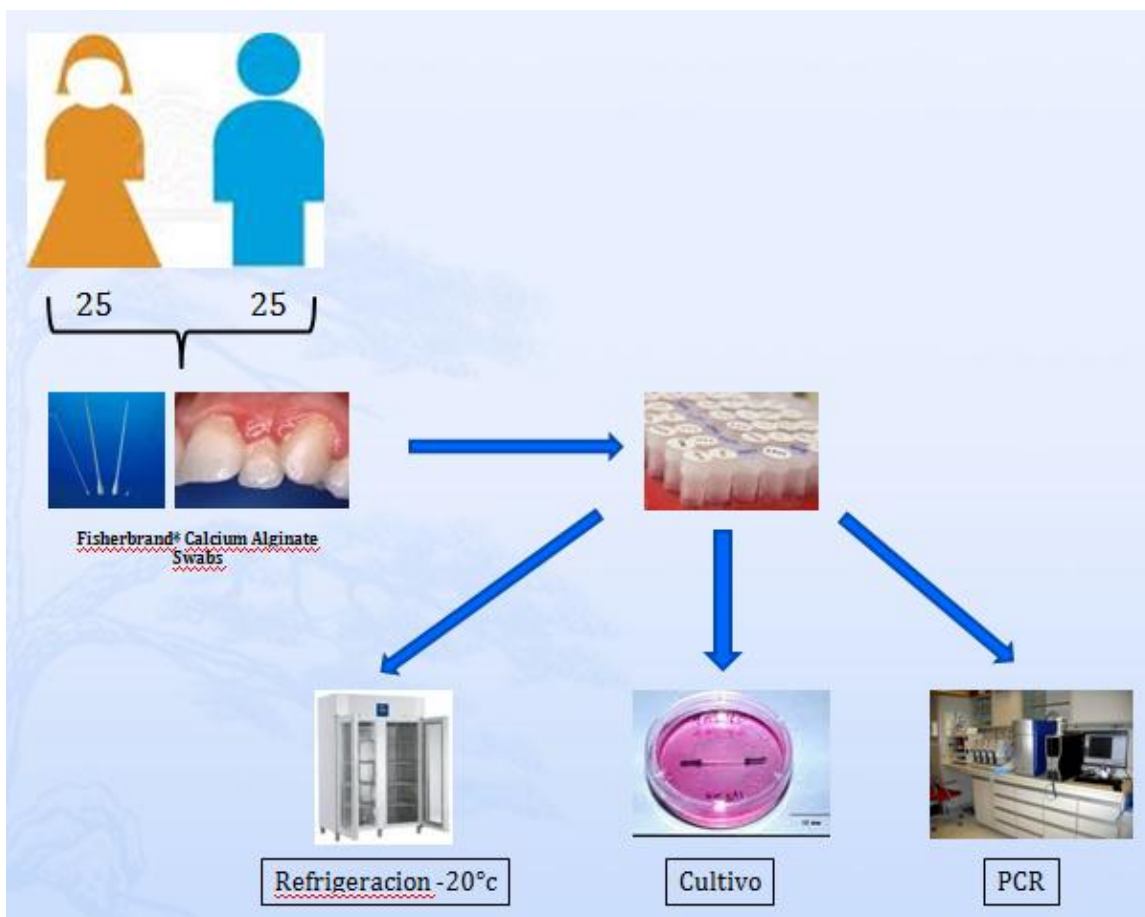
3: caracterizado por inflamación severa con marcado enrojecimiento y edema, superficie lisa y brillante, ulceración, aumento de volumen con sangrado al sondeo y tendencia a la hemorragia espontánea.

Se registran los valores correspondientes a los puntos mesial, medio y distal de la superficie vestibular y el punto medio de la superficie lingual. Cada uno de estos valores representa el Índice Gingival.

Posteriormente se suman los valores de las 4 áreas de cada diente y se dividen entre cuatro para obtener el valor del diente examinado.

5.2. Toma de la Muestra

A todos los pacientes se le aplicó un interrogatorio cuidadoso para determinar la presencia de aftas, se les explicaron las razones del estudio y se les pidió el consentimiento informado del mismo. A cada paciente se le tomaron tres muestras de la siguiente forma, se introdujo cada uno de los swaps en las bolsas más profundas de los sujetos y de manera independiente se colocaron en microtubos de 4 ml que contenían solución amortiguadora de PBS al 10% de glucosa estéril a 4° C, la parte activa del swap fue cortada con una pinza estéril dejando así la parte activa en cada tubo los cuales fueron depositados en una hielera para su transportación al congelador -80°C de las instalaciones de biología molecular de la Universidad Autónoma de Nuevo León así como al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Monterrey, N.L.



5.3. Protocolo Utilizado para la Purificación de ADN

Se realizó el protocolo del kit GENTRA® (QUIAGEM), primero se descongeló la muestra en el laboratorio y se centrifugó a 14,500 rpm por 10 minutos. Se eliminó cuidadosamente la solución glucosada y se agregó 300 µl de líquido para lisis celular y 1.5µl de Puregene proteinasa,, se mezcló bien y se incubó a 55 ° C toda la noche, después del tiempo transcurrido se añadió 100µl de solución de precipitación de proteínas, y se agitó vigorosamente durante 20 segundos a alta velocidad, se incubó

durante 5 minutos en hielo y se centrifugó durante 10 minutos a 14,500 rpm, las proteínas precipitadas deben formar un apretado pellet. Después en un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml, se pipeteó 300 µl de isopropanol y se añadió el sobrante del paso anterior mediante el vertido con cuidado asegurándose de que el coágulo de proteínas no se desplace durante el vertido, se mezcló suavemente 50 veces y se centrifugó durante 10 minutos a 14,500 rpm al termino se eliminó con cuidado el sobrante, y se vació el tubo volteándolo en una hoja limpia de papel absorbente, teniendo cuidado de que el coágulo se quede en el tubo, se añadió 300 µl de etanol al 70% y se movió varias veces para lavar el coágulo de ADN el cual se volvió a centrifugar durante 5 minutos a 14,500 rpm al termino se eliminó con cuidado el sobrante y se vació el tubo en una hoja limpia de papel absorbente, teniendo cuidado de que el coágulo se quede en el tubo, se dejó secar al aire durante 5 min y al terminar se añadió 100 µl de solución de hidratación del ADN y se agitó la mezcla durante 5 segundos a velocidad media y para terminar se incubó a 65 ° C durante 1 hora para disolver el ADN.

5.4 Preparación del ADN viral para PCR

La preparación se realizó siguiendo los lineamientos establecidos por los kits de la casa comercial Maxim Biotech INC. El cual es el siguiente, con una pipeta tipo Eppendorf de 10 µl se colocó 16 µl de la mezcla del kit cuyo contenido es el siguiente, buffer para PCR (dNTP's, químicos, potenciador) con los oligos de HVS 1, después se colocó 4 µl de la muestra así como .2 µl de la Taq polimerasa y se mezcló bien todos los componentes para así introducirlos al termociclador.

5.5 Parámetros para el PCR

ETAPA	TEMP (°C)	TIEMPO (MIN)	CICLOS
Calentamiento	96	1	1
Desnaturalización	94	0.5	30
Aliñamiento	58	0.5	30
Extensión	72	0.5	30
	72	10	1
Mantenimiento	4-25	-----	-----

5.6 Electroforesis

Para realizar la electroforesis primero se preparó el gel mezclando 4 ml de buffer y 96 ml de agua millipore en un matraz limpio al cual se le agregó 1 gr de agarosa, después se calentó hasta el punto de ebullición, se dejó enfriar la mezcla hasta que estuvo a 45 grados se anexó 30 μ l de bromuro de etilo, al termino se vertió en el molde con el peine integrado, al enfriarse la mezcla se retiró el peine y se introdujo el gel a la solución de electroforesis, de manera cuidadosa se colocó 5 μ l de cada muestra mezclada con 5 μ l de liquido de buffer, en cada uno de los espacios dejados por el peine. Se colocó el control y el marcador en los dos primero espacios y se realizó la electroforesis a 80 voltios por 30 minutos, al término de este proceso se pueden conocer los resultados así como digitalizarlos.

5.7 Fotografías

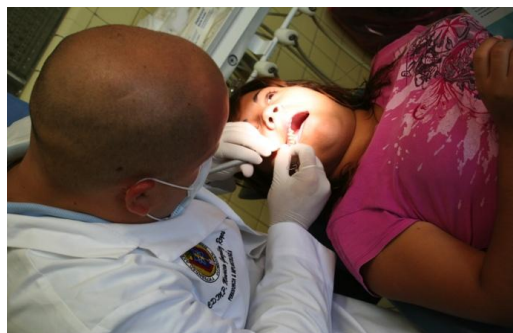


Figura 1. Toma de muestras



Figura 2. Aftas activas

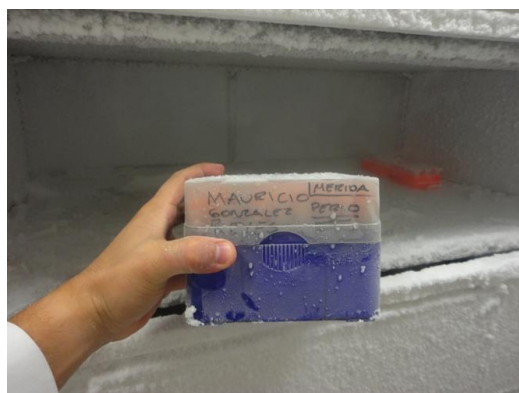


Figura 3. Congelamiento a -80°



Figura 4. Almacenamiento

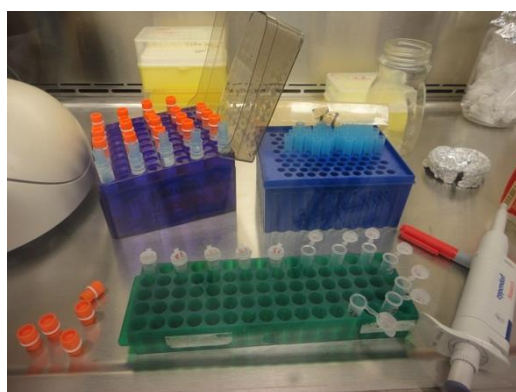


Figura 5. Descongelado de las muestras



Figura 6. Centrifugado

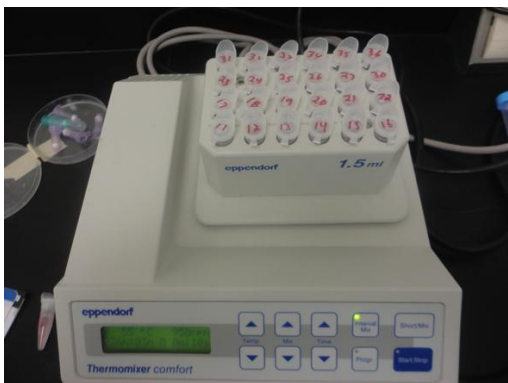


Figura 7. Termomixer

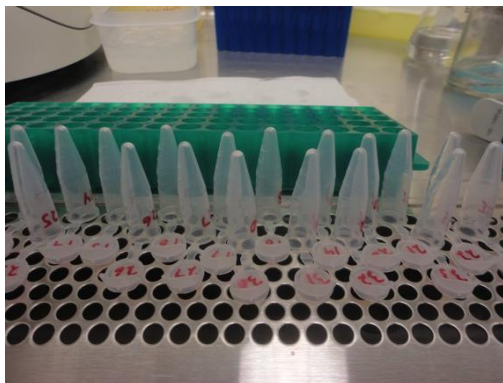


Figura 8. Secado del pellet de ADN



Figura 8. Colocación del ADN



Figura 9. Termociclador (PCR)

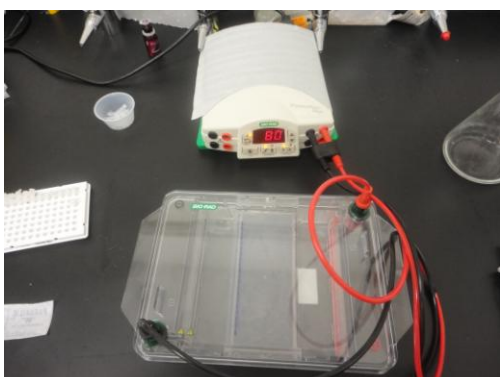


Figura 10. Electroforesis

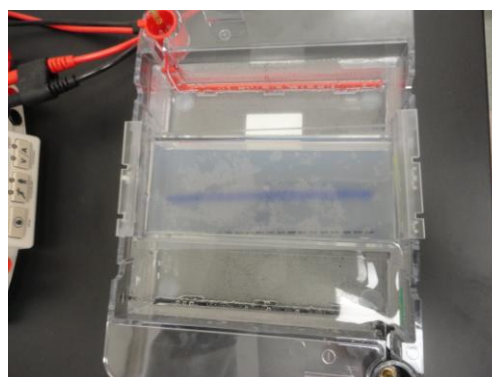
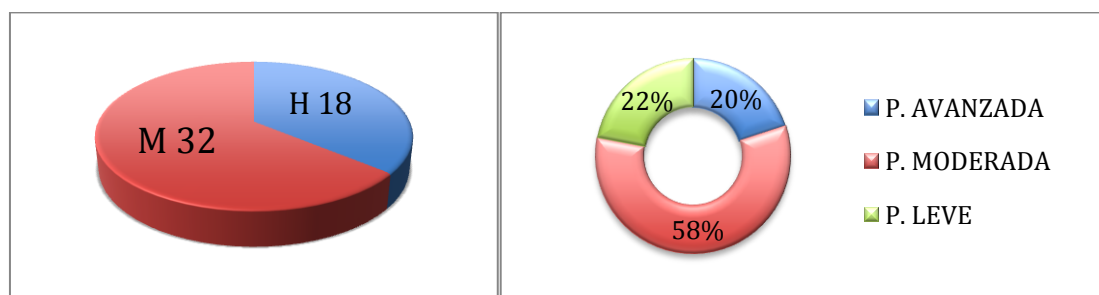


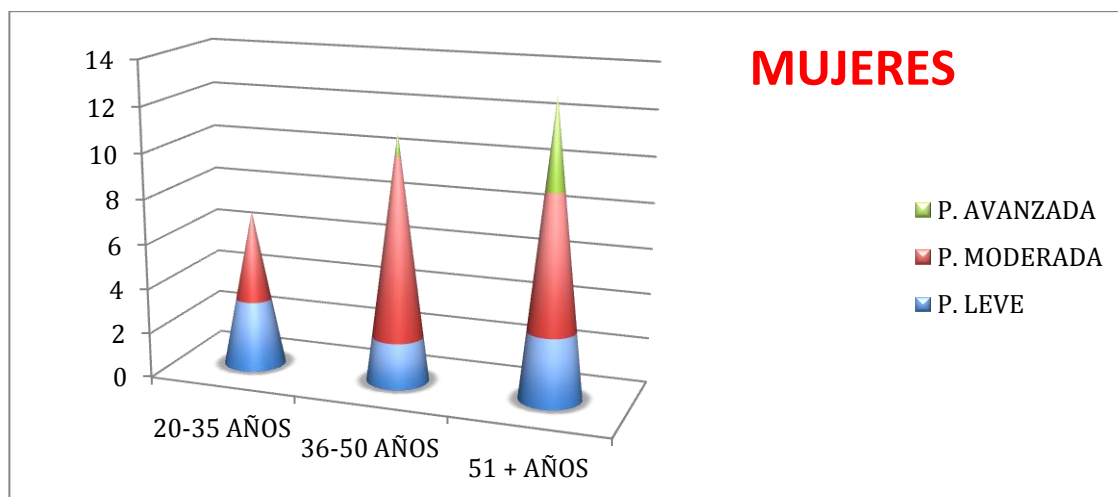
Figura 11. Resultados

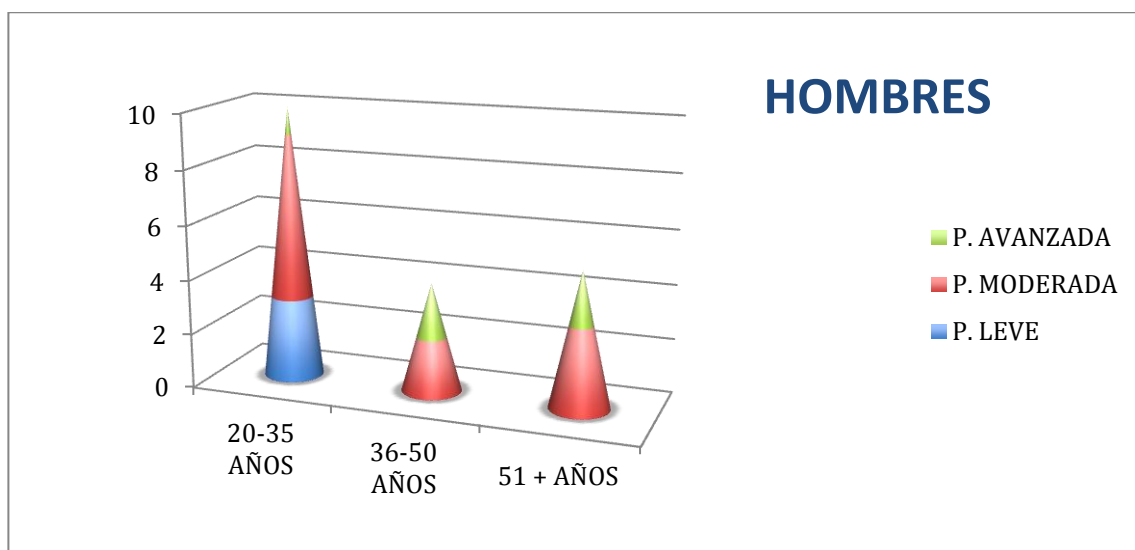
6. RESULTADOS

Se estudio a 50 pacientes con periodontitis crónica de los cuales 32 fueron mujeres y 18 hombres, la edad promedio de los pacientes fue de 41 años abarcando de los 24 a los 70 años. De acuerdo a sus niveles de inserción y su profundidad de bolsa se encontró que 11 presentaban periodontitis crónica leve, 29 con periodontitis crónica moderada y 10 con periodontitis crónica avanzada.



Según la incidencia de la enfermedad periodontal respecto a las edades se dio de la siguiente manera:

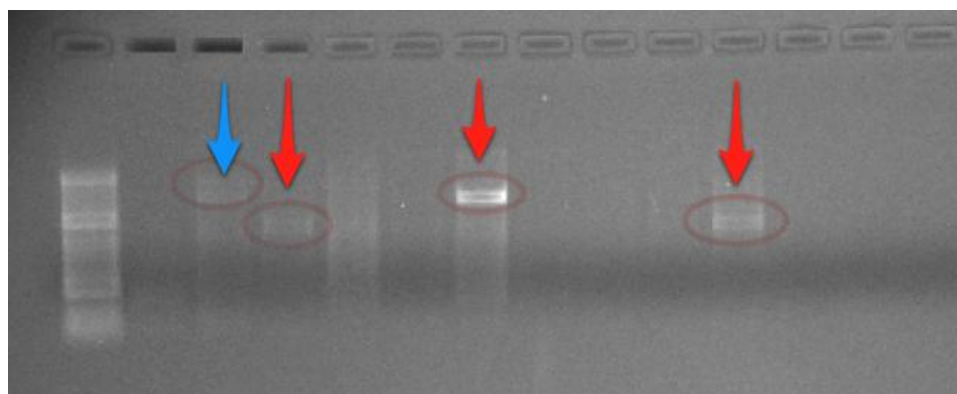




El resultado generales de los parámetros clínicos en los 50 pacientes estudiados se muestra en la siguiente tabla.

	P. Leve	P. Moderada	P. Avanzada
Índice de Placa	.8	1.64	1.92
Índice Gingival	.9	1.8	2.3
Prof. de Bolsa	4.7	6.1	8.4
Niveles de Inserción	4.7	6.4	9.2

De las 50 muestras procesadas 4 de ellas dieron positivo para HVS tipo 1, tres de estas fueron mujeres y un hombre.



7. DISCUSIÓN

La periodontitis crónica se define como una enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte de los dientes causada por microorganismos o grupos de microorganismo específicos que producen la destrucción progresiva del ligamento periodontal y el hueso alveolar con formación de bolsa, recesión o ambas. (Carranza 2010). Investigaciones recientes documentaron que hay un nexo entre la enfermedad periodontal crónica y el virus del herpes, particularmente el herpes tipo 1 y el citomegalovirus (Carranza 2004) (Slotz 1996). Así lo afirman también Contreras en 1999 así como Saygun en el 2002 en sus investigaciones las cuales confirman que el HSV se asocia con la enfermedad periodontal y que donde los parámetros clínicos se ven mayormente afectados, se ha encontrado la presencia de dicho virus.

La placa dentobacteriana esta directamente relacionada con las afecciones periodontales, especialmente la placa subgingival. (Listgarten, 1979). Socransky en el 2005 describe los distintos grupos bacterianos que están relacionados con la patogenia de la enfermedad periodontal. Refiere diversos grupos asociados a la colonización, coagregacion y bacterias patógenas. En este ultimo grupo cabe destacar la presencia de lo que Socransky denomina el complejo rojo, formado por *P. Gingivalis*, *B. Forsythus* y *T. Denticola*. El complejo rojo se relaciona con la magnitud de los parámetros clínicos como la hemorragia al sondeo, aumento de la profundidad de la bolsa, perdida en los niveles de inserción.

Algunas investigaciones vinculan a los herpes virus como agentes etiológicos de la enfermedad periodontal en sus formas de periodontitis marginal y periodontitis apical (Saygun et al. 2008. Slots 2005); en otras investigaciones se han asociado a periodontitis agresivas y a periodontitis crónica. (bilichodmath,L. et al 2008. Botero 2007 et al. Contreras, Slots, 2001 Li Jang ling et al 2004. Yapar et al 2003. Saygun et al 2004)

En el caso de esta investigación encontramos que en el 8% de las personas estudiadas provenientes del noreste de México y que padecen de periodontitis crónica poseen HVS-1 en las bolsas periodontales, en contraste al estudio realizado por Kaufman et al en 2005 en el cual se encontró incidencia del 37.5% en saliva, la discrepancia de las cifras se puede atribuir que en dicho estudio se tomaron las muestras en toda la cavidad oral a diferencia del de nosotros que se realizó tomando la muestra solo en las bolsas periodontales.

Recientemente Shivaprasad demostró que los pacientes con periodontitis crónica tuvieron una prevalencia de un 100% para el HSV-1 y en pacientes con periodontitis agresiva un 57%, las posibles razones por la cual nuestro estudio no obtuvo esos mismos resultados se puede atribuir a variaciones en nuestro estudio como lo son el rango de edad, las diferencias étnicas, el limitado tamaño de la muestra y la metodología utilizada, además del probable estadio de latencia de los herpes virus.

Nuestros resultados no son significativos para definir que la presencia de HVS-1 sea un catalizador en el avance y progresión de la enfermedad periodontal, lo que si indican estos resultados es la presencia del HVS-1 en nuestra población, abriendo así posibles cadenas de investigación en cuanto a la presencia de otros tipos de herpes virus, así como también el mejoramiento en el protocolo de toma de muestras y procesamiento de las mismas.

8. CONCLUSIONES

1. Se encontró la presencia de HVS-1 en del 8% de la muestras de la población del noreste de México que padece de periodontitis crónica.

2. Debido a la baja prevalencia de HVS-1 en la bolsas periodontales, no es atribuible que este sea un catalizador en el avance de la periodontitis.

3. El detectar la presencia del HVS-1 en bolsas periodontales en nuestra población abre líneas de estudio en cuanto al mecanismo de acción del mismo así como la presencia de otro tipo de herpes-virus.

4. El estado sistémico de los pacientes tiene una influencia directa tanto en la presencia de HVS así como también en la progresión de la enfermedad periodontal.

5. La baja incidencia de HSV en este estudio se puede atribuir a la baja cantidad de ADN recolectado por el swap, ya que este era de tamaño reducido para poder ser introducido a la bolsa periodontal.

“APÉNDICE B”

HISTORIA CLÍNICA**1. DATOS PERSONALES**

Nombre: _____
Edad: _____ **Sexo:** _____ **Fecha de nacimiento:** _____ **Estado civil:** _____
Dirección: _____ **Teléfonos:** _____

2. ANTECEDENTES MÉDICOS

Esta bajo algún tratamiento: No _____ Si _____ Cual? _____
Fuma?: No _____ Si (cuanto) _____ **Toma?:** No _____ Si (cuanto) _____

Utiliza o cuando fue la última vez que utilizo estas sustancias:

_____ Antibióticos o Sulfas	_____ Nitroglicerina
_____ Anticoagulantes	_____ Hormonas
_____ Aspirina u otro analgésico	_____ Vitaminas
_____ Medicamentos para la presión sanguínea	_____ Tranquilizantes
_____ Cortisona – Esteroides	_____ Marihuana
_____ Cocaína	_____ Anfetaminas
_____ Insulina – Tolbutamida	_____ M. naturistas

Otros: _____

Señale si padece de alguna de estas enfermedades:

_____ Presión sanguínea alta	_____ Artritis
_____ Presión sanguínea Baja	_____ Osteoporosis
_____ Problemas cardiacos	_____ Gastritis
_____ Arterioesclerosis	_____ Ulcera
_____ Diabetes	_____ Anemia
_____ Problemas del Riñón	_____ Hepatitis
_____ Alergias	_____ Tiroides
_____ Tuberculosis	_____ Sida
_____ Hernia	_____ Reflujo
_____ Colesterol Alto	_____ Triglicéridos

Otra enfermedad: _____

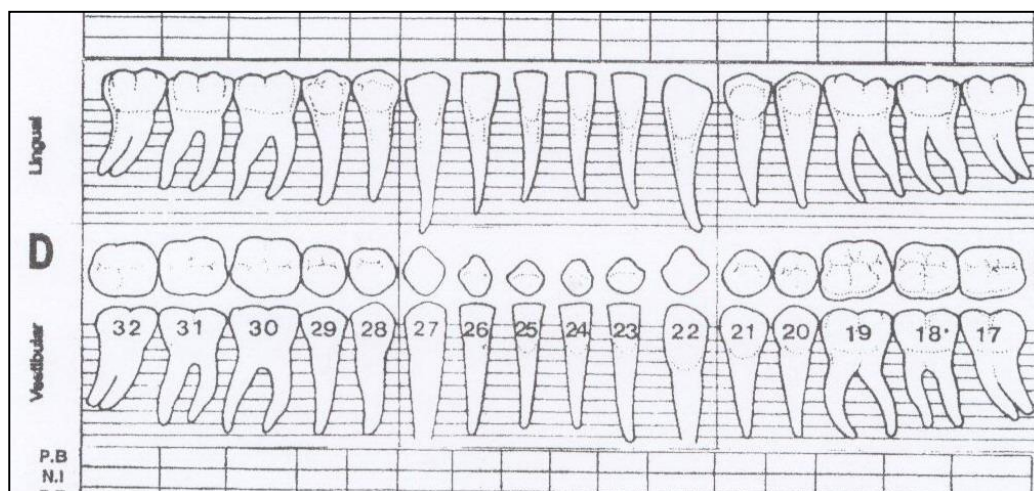
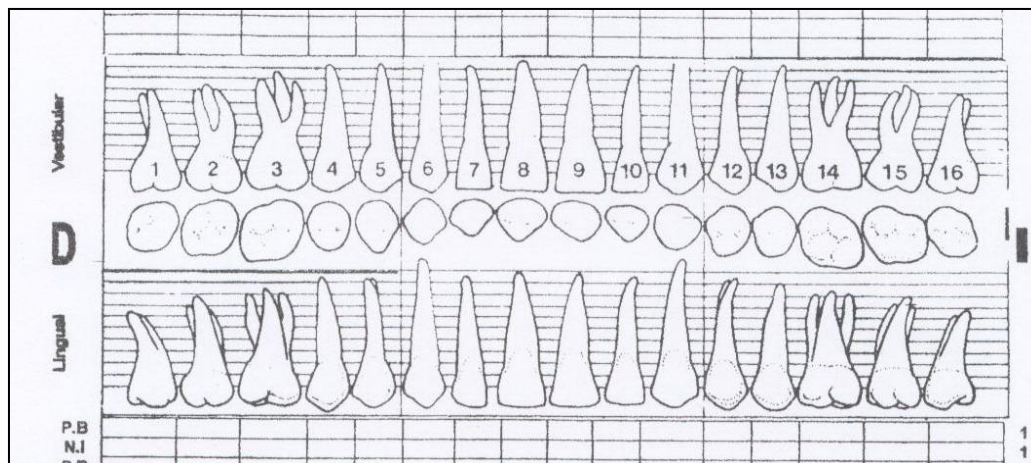
Mujeres:

Esta o a estado embarazada?: No _ Si _ **Es regular en su ciclo?:** No _ SI _

Toma algún tipo de píldora anticonceptiva?: No Si **Edad de Menarquía:** ____

3. HISTORIA DENTAL

Ultima visita al Dentista? ____ Le sangran las encías al cepillarte? No __ Si ____
 Siente mal olor en tu boca? No _ Si __ Le duele algún diente? No __ SI (Cual) __
 Padece de fuegos? No _ Si (ultima vez) _ Sensibilidad al calor, frio o dulce? No Si
 Cuando se pone nerviosa les salen granitos en la boca a los pocos días? ____
 Siente algún diente flojo? No __ Si (Cual) ____ Ultimo tratamiento dental? ____
 Utiliza palillos? No __ Si ____ Ha estado en alguna dieta? No ____ SI (Cual) __



Gingivitis: No __ Si I ____ II ____ III ____ **Periodontitis:** No __ Si (bolsa mayor) ____

Otros: _____

“APÉNDICE C”

Consentimiento Informado

Por medio de la presente hago constar que he sido informado/a del estudio el cual se me realizará y los motivos del mismo, el operador me ha comentado las ventajas y riesgos que este conlleva y doy mi autorización plena para la realización del mismo.

ATTE.:

Nombre y Firma:

LITERATURA CITADA

1. Armitage, GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2004; 34: 9-21.
2. Armitage GC. Classifying periodontal diseases – a long-standing dilemma. *Periodontol 2000* 2002;30:9–23.
3. Baringer JR, Swoveland P. Recovery of herpes-simplex virus from human trigeminal ganglions. *N Engl J Med* 1973: 288: 648–650.
4. Barrera Sadaña, A. Lopéz, R. Rojas, A. Reacción en cadena de la polimerasa. *Ciencia y Desarrollo*; 1993: 50-60
5. Becker Y. HSV-1 brain infection by the olfactory nerve route and virus latency and reactivation may cause learning and behavioral deficiencies and violence in children and adults: a point of view. *Virus Genes*. 1995;10:217–226.
6. Bilichodmath,S. Mangalekar,S. Sharma, D. Prabhakar,A. Herpes viruses in chronic and aggressive periodontitis patients in an Indian population. *Journal of Oral Science*, 2009; 51: 79-86.*Journal of Oral Science*, 2009; 51: 79-86.
7. Breinig MK, Kingsley LA, Armstrong JA, Freeman DJ, Ho M. Epidemiology of genital herpes in Pittsburgh: serologic, sexual, and racial correlates of apparent and inapparent herpes simplex infections. *J Infect Dis*. 1990;162:299 –305.
8. Botero JE, Contreras A, Parra B. Effects of cytomegalovirus infection on the mRNA expression of collagens and matrix metalloproteinases in gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 2008: 43: 649–657
9. Botero JE, Vidal C, Contreras A, Parra B. Comparison of nested polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR and viral culture for the detection of cytomegalovirus in subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol* 2008: 23: 239–244

10. Botero, J. Parra, B. Jaramillo, A. Contreras, A. Subgingival human cytomegalovirus correlates with increases clinical periodontal parameters and bacterial coinfection in periodontitis. *Journal of periodontology*. 2007; 78: 2303-2310.
11. Carranza, F. Newman, M. Takei, H, (2004). *Periodontología Clínica*. Novena edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México D.F., México
12. Carr DJJ, Harle P, Gebhardt BM. The immune response to ocular herpes simplex virus type 1 infection. *Exp Biol Med*. 2001;226: 353–366.
13. Cassai, E. Galvan, M. Trombelli, L. Rotola, A. HHV-6, HHV-7, HHV-8 in gingival biopsies from chronic adult periodontitis patients. *Journal of clinical periodontology*. 2003; 30:184-191.
14. Caton, JG. Polson, AM. The interdental bleeding index: a simplified procedure for monitoring gingival health. *Compend Contin Educ Dent*. 1985; 6: 88.
15. Chichili GR, Athmanathan S, Farhatullah S, et al. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of herpes simplex virus, varicella-zoster virus and cytomegalovirus in ocular specimens. *Curr Eye Res*. 2003;27:85–90.
16. Contreras A, Nowzari H, Slots J. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 15–18.
17. Contreras A, Slots J. Typing of herpes simplex virus from human periodontium. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 63–64.
18. Contreras, A. Umeda, M. Chen, C. Bakker, J. Morrison, J. Slots, J. Relationship between herpesviruses and adult periodontitis and periodontopathic bacteria. *Journal of periodontology*. 1999; 70:478-483.
19. Coyle PK, Sibony PA. Viral antibodies in normal tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1988;29:1552–1558.
20. Dibart, S, Skobe, Z, Snapp, K. et al. Identification of bacterial species on or in crevicular epithelial cells from healthy and periodontally diseased patients using DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiol Immunol*. 1998; 13:30.
21. Douglas RG Jr, Couch RB. A prospective study of chronic herpes simplex virus infection and recurrent herpes labialis in humans. *J Immunol*. 1970;104:289–295. 25.

22. Dzink, J. Socransky, S. Haffajee, A. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1998; 15: 316.
23. Enzo, P. Cutler, C. Microorganisms as risk indicators for periodontal diseases Paul J. Ezzo & Christopher W. Cutler. *Periodontology* 2000. 2003;32:24
24. Espy MJ, Uhl JR, Mitchell PS, et al. Diagnosis of herpes simplex virus infections in the clinical laboratory by Light Cycler PCR. *J Clin Microbiol.* 2000;38:795–799. 20.
25. Espy MJ, Ross TK, Teo R, et al. Evaluation of Light Cycler PCR for implementation of laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3116–3118. 21.
26. Fuller WA. *Introduction to Statistical Time Series.* New York: John Wiley & Sons; 1976. 23.
27. Garweg JG, Boehnke M. Low rate shedding of HSV-1 DNA, but not of infectious virus from human donor cornea into culture media. *J Med Virol.* 1997;52:320–325. 31.
28. Ghebrekidan H, Ruden U, Cox S, Wahren B, Grandien M. Prevalence of herpes simplex virus types 1 and 2, cytomegalovirus, and varicella-zoster virus infections in Eritrea. *J Clin Virol.* 1999;12:53–64.
29. Gibson JJ, Hornung CA, Alexander GR, Lee FK, Potts A, Nahmias AJ. A cross-sectional study of herpes simplex virus types 1 and 2 in college students: occurrence and determinants of infection. *J Infect Dis.* 1990;162:306–312.
30. Goldman. *Cecil Textbook of medicine.* 22 edition. 2004. Editorial Saunders.
31. Harrison. *Principios de medicina interna.* 17 edición, Editorial Mac Graw-Hill. 2008. Capt: 172-174.
32. J. A. Burmeister, A. M. Best, K.G. Pacanis, F. A. Caine and R. R. Rankey. J. Localized juvenile periodontitis and generalized severe periodontitis: clinical findings. *Clinical Periodontology* 1984; 11: 181-192.
33. Kajita K, Honda T, Amanuma R, Domon H, Okui T, Ito H, Yoshie H, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K. Quantitative messenger RNA expression of Toll-like

- receptors and interferon-alpha1 in gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 398–402
34. Kaldahl, W., Kalkwarf, K., Patil, K. & Molvar, M. (1990) Relationship of gingival bleeding, gingival suppuration and supragingival plaque to attachment loss. *Journal of Periodontology* 61, 347–351.
 35. Kameyama T, Sajaku C, Yamamoto S, Hwang CBC, Shillitoe EJ. Shedding of herpes simplex virus type 1 into saliva. *J Oral Pathol.* 1988;17:478 – 481. 26.
 36. Kamma JJ, Contreras A, Slots J: Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 879–885.
 37. Kaufman H. Et al. HSV-1 DNA in Tears and Saliva of Normal Adults. *IOVS*, 2005; 46:1: 241-247
 38. Kaufman HE, Brown DC, Ellison EM. Recurrent herpes in the rabbit and man. *Science.* 1967;156:1628–1629.
 39. Kaye SB, Madan N, Dowd TC, Hart CA, McCarthy K, Patterson A. Ocular shedding of herpes simplex virus. *Br J Ophthalmol.* 1990; 74:114 –116.
 40. Kessler, H. Muhlbauer, G. Rinner, B. Stelzi, E. Berger, A. Santner, B. Marth, E. Detectin of herpes simplex virus DNA by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology.* 2000: 2638-2642.
 41. Kleinfelder, J. Lange, D. Bocker, W. Some effects of non surgical therapy on gingival inflammatory cell sub-sets in patients with adult onset and early-onset periodontitis. *J Periodontol.* 2000; 71: 1561-1566.
 42. Kleinfelder, J. Lange, D. Some effects of non surgical therapy on gingival inflammatory cell sub-sets in patients with adult onset and early-onset periodontitis associated with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol.* 2001; 72: 1713-1719.
 43. Knaup B, Schunemann S, Wolff MH. Subclinical reactivation of herpes simplex virus type 1 in the oral cavity. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15:281–283. 24.
 44. Kornman, K. Loe, H. The role of local factors in the etiology of periodontal disease. *Periodontol* 2000. 1993; 2: 83.

45. Lang, N. P., Adler, R., Joss, A. & Nyman, S. (1990) Absence of bleeding on probing. An indicator of periodontal stability. *Journal of Clinical Periodontology* 17, 714–721.
46. Lang, N. P., Joss, A., Orsanic, T., Gusberti, F. A. & Siegrist, B. E. (1986) Bleeding on probing. A predictor for the progression of periodontal disease? *Journal of Clinical Periodontology* 13, 590–596.
47. Liesegang TJ. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea*. 2001;20:1–13
48. Lindhe, J, Karring, T, Lang, P(2003). *Periodontología Clínica e Implantología Odontología*. Tercera Edición. Editorial Panamericana. Munkgaard, Copenhagen.
49. Ling, L. Ho, C. Wu, C. Chen, Y Hung, S. Association between human herpesviruses and the severity of periodontitis. *J Periodontol*. 2004;75: 1479-1485
50. Ling PD, Lednicky JA, Keitel WA, et al. The dynamics of herpesvirus and polyomavirus reactivation and shedding in healthy adults: a 14-month longitudinal study. *J Infect Dis*. 2003;187:1571–1580.
51. Listgarten, M. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. *J Periodontol*. 1976; 47:1.
52. Loe, H. The gingival Index and the retention index systems. *J Periodontol*. 1967; 38: 610. (supplement).
53. Mandell Bennet-Dolin. *Principles and practice of infectious disease*. 5 edición. 2000. Editorial Churchill Livingstone
54. Marshall-Day, Rusell, G. Stephens and Lawrence, F. Quigley, Jr. *Periodontal Disease: MMWR Sexually transmitted diseases treatment guidelines*. 2006. Vol 5.
55. Meier L, Straus SE. Comparative biology of latent varicella-zoster virus and herpes simplex virus infections. *J Infect Dis* 1992; 166 (suppl 1): S13–S23.
56. Michalowicz BS, Ronderos M, Camara-Silva R, Contreras A, Slots J. Human herpesviruses and *Porphyromonas gingivalis* are associated with juvenile periodontitis. *J Periodontol* 2000;71:981–988.

57. Miranda-Saksena M, Boadle RA, Armati P, Cunningham AL. In rat dorsal root ganglion neurons, herpes simplex virus type 1 tegument forms in the cytoplasm of the cell body. *J Virol.* 2002;76: 9934–9951.
58. Noiri, Y. Li, L. Ebisu, S. The localization of periodontal-disease-associated bacteria in human periodontal pockets. *J Dent Res.* 2001; 10: 1930-1934.
59. Okinaga S. Shedding of herpes simplex virus type 1 into tears and saliva in healthy Japanese adults. *Kurume Med J.* 2000;47:273– 277.
60. Okada H, Kassay Y, Kida T. T lymphocyte subsets in the inflamed gingiva of human adult periodontitis. *J Periodontal Res* 1984: 19: 595–598.
61. Okada H, Kida T, Yamagami H. Identification of immunocompetent cells in inflamed gingiva of human chronic periodontitis. *Infect Immun* 1983: 41: 365– 374.
62. Parra B, Slots J. Detection of human viruses in periodontal pockets using polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 1996: 11: 289–293.
63. Pohl-Koppe A, Dahm C, Elgas M, Kühn JE, Braun RW, ter Meulen V. The diagnostic significance of the polymerase chain reaction and isoelectric focusing in herpes simplex virus encephalitis. *J Med Virol* 1992: 36: 147–154.
64. Posavad CM, Wald A, Hosken N, et al. T cell immunity to herpes simplex viruses in seronegative subjects: silent infection or acquired immunity? *J Immunol.* 2003;170:4380–4388. 29.
65. Ramos, J. *Infectología Clínica.* Ed Manual Moderno. Primera Edición. 2008.
66. Ranney, R. Classification of periodontal disease. *Periodontology* 2000;1993; 2:13.
67. Robert L. Mandell, Jeffrey L. Ebersole and Sigmund S. Socransky. J. Clinical immunologic and microbiologic features of active juvenile periodontitis. *Clin. Periodontol* 1987; 14: 534-540.
68. Robert P-Y, Adenis J-P, Denis F, Alain S, Ranger-Rogez S. Herpes simplex virus DNA in corneal transplants: prospective study of 38 recipients. *J Med Virol.* 2003;71:69–74. 22

69. Robin, R. Gutell, N. Woese, C. Lesons from an evolving rRNA:16S and 23s rRNA Structures from a comparative perspective. *Microbiology review*.1994;58: 10-26
70. Rooney JF, Felser JM, Ostrove JM, Straus SE. Acquisition of genital herpes from an asymptomatic sexual partner. *N Engl J Med* 1986; 314: 1561–1564.
71. Sabeti M, Slots J. Herpesviral-bacterial coinfection in periapical pathosis. *J Endodont* 2004;30:69–72.
72. Saygun I, Kubar A, Ozdemir A, Yapar M, Slots J. Herpesviral–bacterial interrelationships in aggressive periodontitis. *J Periodont Res* 2004; 39; 207–212.
73. Saygun I, Kubar A, Sahin S, Sener K, Slots J. Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. *J Periodontal Res* 2008; 43: 352–359
74. Seymour GJ, Taylor JJ. Shouts and whispers: an introduction to immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol* 2000 2004;35:9–13.
75. Schmutzhard J, Merete Riedel H, Zwegberg Wirgart B, Grillner L. Detection of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and varicella-zoster virus in skin lesions: comparison of real-time PCR, nested PCR and virus isolation. *J Clin Virol*. 2004; 29:120–126.
76. Scott DA, Coulter WA, Lamey PJ. Oral shedding of herpes simplexvirus type 1: a review. *J Oral Pathol Med*. 1997;26:441–447. 27.
77. Scott DA, Coulter WA, Biagioni PA, O'Neill HO, Lamey PJ. Detection of herpes simplex virus type 1 shedding in the oral cavity by polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay at the prodromal stage of recrudescence herpes labialis. *J Oral Pathol Med* 1997; 26: 305–309.
78. Sepúlveda, E. Brethauer, U. Jiménez, M. Figueroa, M. Rojas, J. Detección del virus herpes simple en lesiones de la mucosa oral en pacientes con terapia oncológica. *Med Oral*. 2003;8:329-333.
79. Shivaprasad, B. et al. Herpes viruses in chronic and aggressive periodontitis in an Indian population. *Journal of Oral Science*.2009;1 :79-86.

80. Slots, J. Herpes viruses in periodontal diseases. *Periodontology* 2000. 2005; 38: 33-62.
81. Slots J, Contreras A. Herpesviruses: a unifying causative factor in periodontitis? *Oral Microbiol Immunol* 2000;15:277–280. 14.
82. Slots J, Kamma JJ, Sugar C. The herpes- virus–*Porphyromonas gingivalis*–perio- dontitis axis. *J Periodont Res* 2003;38:318–323. 15.
83. Slots J, Sugar C, Kamma JJ. Cytomegalovirus periodontal presence is associated with subgingival *Dialister pneumosintes* and alveolar bone loss. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17:369–37
84. Smith JS, Robinson NJ. Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. *J Infect Dis.* 2002;186:S3–S28.
85. Socransky,S. Haffajee, A. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000. 2005; 38: 135-187.
86. Stanford TW, Rees TD. Acquired immune suppression and other risk factors/indica- tors for periodontal disease progression. *Periodontol* 2000 2003;32:118–135.
87. Stocher M, Holzl G, Stekel H, Berg J. Automated detection of five human herpes virus DNAs by a set of LightCycler PCRs comple- mented with a single multiple internal control. *J Clin Virol.* 2004; 29:171–178.
88. Stranska R, Schuurman R, De Vos M, van Loon AM. Routine use of a highly automated and internally controlled real time PCR assay for the diagnosis of herpes simplex and varicella-zoster virus infections. *J Clin Virol.* 2004;30:39–44. 30.
89. Streilein JW, Dana MR, Ksander BR. Immunity causing blindness: five different paths to herpes stromal keratitis. *Immunol Today.* 1997;18:443– 449.
90. Taylor, Gwen. *Current protocols of molecular biology.* Editorial Wiley Interscience. 2010.
91. Tateishi K, Toh Y, Minagawa H, Tashiro H. Detection of herpes simplex virus (HSV) in the saliva from 1000 oral surgery outpatients by the polymerase chain reaction (PCR) and virus isolation. *J Oral Pathol Med* 1994: 23: 80– 84.

92. Ting M, Contreras A, Slots J: Herpesviruses in localized juvenile periodontitis. *J Periodont Res* 2000; 35: 17-25.
93. Thouvenot D, Morfin F. Management of mucocutaneous herpes simplex virus infections in immunocompetent patients: significance and limits of antigen detection culture methods and antibody detection. *Ann Dermatol Venereol.* 2002;129:609–619.
94. Umadevi, M. Adeyemi, O. Patel, M. REichart, P. Robinson, P.G. (B2) Periodontal Diseases and Other Bacterial Infections. *Adv Dental Research.* 2006; 19: 139-145.
95. Valimaa H, Waris M, Hukkanen V, et al. Salivary defense factors in herpes simplex virus infection. *J Dent Res.* 2002;81:416–421. 28.
96. Waner JL. Human cytomegalovirus. In: Specter S, Bendinelli M, Friedman H, ed. *Virus-induced immunosuppression.* New York: Plenum Press, 1989: 101–116.
97. Weidmann M, Meyer-Koönig U, Hufert FT. Rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1565–1568.
98. Wheeler CE. The herpes simplex problem. *J Am Acad Dermatol* 1988; 18: 163–168.
99. Whiley DM, Syrnis MW, Mackay IM, Slots TP. Preliminary comparison of three LightCycler PCR assays for the detection of herpes simplex virus in swab specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003;22:764 –767.
100. Wu, Y. Yan, J. Ojcius, D. Chen, L. Gu, Z. Pan, J. Correlation between infections with different genotypes of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in subgingival samples and periodontal status of patients. *Journal of clinical microbiology.* 2007: 3665-3670.
101. Xu F, Schillinger J, Sternberg M, et al. Seroprevalence and coinfection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in the United States, 1988–1994. *J Infect Dis.* 2002;185:1019–1024.
102. Yapar, M. et al. Prevalence of human herpes virus in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2003;74: 1634-1640.

RESUMEN BIOGRÁFICO

MAURICIO GONZÁLEZ REYES

Candidato para el Grado de
Maestro en Ciencias Odontológicas con Especialidad en Periodoncia

Tesis: IDENTIFICACIÓN DE HERPES VIRUS A PARTIR DE PACIENTES CON
PERIODONTITIS CRÓNICA EN EL NORESTE DE MÉXICO.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Mérida, Yucatán, México el 23 de Julio de 1981, hijo de Santiago González Pardío y Miriam Teresa Reyes López.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Yucatán, grado obtenido Cirujano Dentista en 2006, con testimonio de desempeño sobresaliente (CENEVAL) y séptimo lugar en la generación.

Experiencia Profesional: Maestro por Asignatura de la Universidad Anahuac-Mayab desde 2010, práctica privada desde el mismo año.