

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Programa Macro de Investigación

Comparación de la secuenciación del ARNr 16S en la saliva y el fluido crevicular de pacientes con enfermedad periodontal de la Clínica de Periodoncia de la UCR en el año 2018

Investigadora Principal
Dra. Gisella Rojas González

Colaboradoras Asociadas:
Dra. Gina Murillo Knudse
Dra. Sandra Silva de la Fuente
MsC Jackeline Castillo Rivas

Sustentantes:

Fiorella Aguilar Valverde B10140
Daniela Bermúdez Madrigal B20944
Luis Leonardo Chacón Méndez B11765
María Fallas Alvarado A62092
Alejandro Quesada Molina B15134
Carolina Rivera Murillo B35791
Carmen Sandino Rodríguez A65373
Verónica Trujillo Moya B26713

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio Brenes, Costa Rica
San José, Costa Rica
Año 2018

HOJA DE APROBACIÓN MEMORIA

SEMINARIO DE GRADUACIÓN

Nombre del proyecto

Comparación de la secuenciación del ARNr 16S en la saliva y el fluido crevicular de pacientes con enfermedad periodontal de la clínica de periodoncia de la UCR en el año 2018

Sustentantes

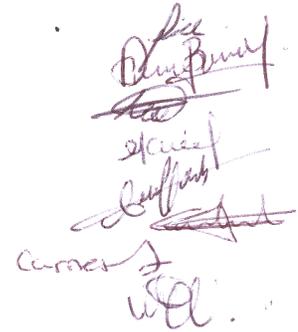
Nombre

Fiorella Aguilar Valverde
Daniela Bermúdez Madrigal
Luis Leonardo Chacón Méndez
María Fallas Alvarado
Alejandro Quesada Molina
Carolina Rivera Murillo
Carmen Sandino Rodríguez
Verónica Trujillo Moya

Carné

B10140
B20944
B11765
A62092
B15134
B35791
A65373
B26713

Firma

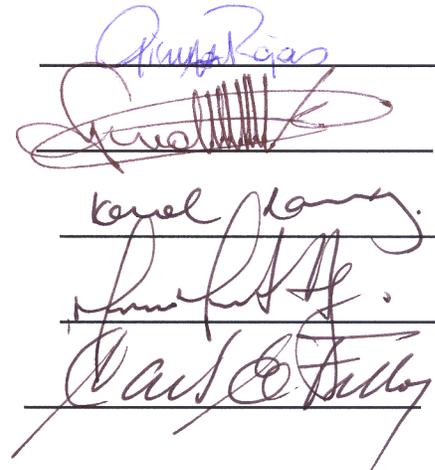


Miembros del Tribunal

Nombre:

Quina Rojas A
Quina Murillo Knudsen
Karel Ramirez Chan
Mauricio Montero Aguilar
Carlos E Filloy

Firma:



Dedicatoria

Dedicamos este proyecto a todas las personas que fueron parte de nuestro proceso formativo. En primera instancia, a todo el personal de la institución que ha sido una guía durante la carrera. Agradecemos a nuestras familias por ser un pilar de apoyo en los momentos difíciles y motivarnos a siempre seguir adelante. De igual manera, a los compañeros que comparten la pasión por la odontología y comprenden el camino para llegar a la meta. Finalmente, un agradecimiento a nuestros pacientes, los cuales nos impulsan a ser mejores profesionales cada día.

Reconocimientos

La realización de la presente investigación fue posible gracias al apoyo y cooperación recibida por parte de la Dra. Gisella Rojas González, la cual en su desempeño como investigadora principal procuró una adecuada coordinación y orientación entre la recolección de muestras y su análisis adecuado para exponer resultados concretos y actualizados.

Por otra parte, es necesario reconocer el incansable esfuerzo y apoyo brindado por la Dra. Sandra Silva de la Fuente en el procesamiento de las muestras recolectadas y posteriormente la obtención de los resultados y a su vez la MsC Jackeline Castillo, por asegurar una adecuada interpretación estadística de los resultados, garantizando datos completamente confiables sobre lo obtenido en las distintas muestras.

Y en general, es imprescindible reconocer el apoyo brindado por los pacientes y todas aquellas personas que de alguna u otra manera, ayudaron y hoy permiten la presentación de manera efectiva y concreta de la presente investigación.

San José, 27 de noviembre de 2018

Facultad de Odontología
Universidad de Costa Rica
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Estimados señores:

La suscrita, Laura Godínez Rojas, cédula de identidad 111150741, carné 62230 del Colegio de Licenciados y Profesores en Letras, Filosofía, Ciencias y Artes, hace constar que revisó filológicamente el documento, *Comparación de la secuenciación del ARNr 16S en la saliva y el fluido crevicular de pacientes con enfermedad periodontal de la Clínica de Periodoncia de la UCR en el año 2018*, realizado por los estudiantes:

Fiorella Aguilar Valverde	B10140
Daniela Bermúdez Madrigal	B20944
Luis Leonardo Chacón Méndez	B11765
María Fallas Alvarado	A62092
Alejandro Quesada Molina	B15134
Carolina Rivera Murillo	B35791
Carmen Sandino Rodríguez	A65373
Verónica Trujillo Moya	B26713

Se corrigieron aspectos de cohesión, coherencia, sintácticos, ortográficos y de estilo.
Por tanto, este documento está listo para presentarse.

Atentamente,



Laura Godínez Rojas
Lic. Filología Española

Indice General

Capítulo I.....	11
Introducción.....	11
Justificación.....	13
Planteamiento del Problema.....	19
Objetivos generales y específicos.....	20
Capítulo II.....	21
Marco Teórico.....	21
Generalidades de las Bacterias.....	39
Bacterias periodontopatógenas presentes en el líquido crevicular y saliva...43	
Características de los Virus.....	51
Herpes Virus.....	52
Relación de los virus con la enfermedad periodontal.....	55
Asociación de los herpesvirus con bacterias periodontopatógenas.....	60
Identificación bacteriana mediante la secuencia de ARNr 16's.....	67
PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	71
PCR cuantitativo o en tiempo real.....	72
PCR aleatoria.....	73
Electroforesis.....	73
Tinción de proteínas y ácidos nucleicos.....	76
Visualización de los fragmentos de ADN.....	77
Capítulo III.....	78
Metodología.....	78

Materiales y métodos.....	78
Extracción del ADN, a partir del enjuague bucal.....	82
Extracción del ADN, a partir de líquido crevicular absorbido en puntos N30.....	83
Determinación de la comunidad bacteriana de las muestras.....	83
Análisis de los fragmentos 16S amplificados.....	86
Limpieza de los productos de la primera PCR.....	86
Colocación de índices.....	87
Limpieza de los productos de la segunda PCR.....	90
Validación de la librería.....	91
Fase final: Cuantificación, normalización y mezcla de todas las muestras.....	91
Capítulo IV.....	94
Resultados.....	94
Discusión.....	114
Conclusiones.....	124
Recomendaciones.....	125
Capítulo V.....	126
Cronograma de actividades.....	126
Factores facilitadores /obstáculos/dificultades.....	128
Bitácoras.....	130
Referencias bibliográficas.....	131
Anexos.....	139

Lista de tablas

Tabla 1. Prevalencia de herpes virus en pacientes periodontales de varios países.....	54
Tabla 2. Iniciadores degenerados.....	84
Tabla 3. Reacción de amplificación.....	85
Tabla 4. Índices y secuencias.....	88
Tabla 5. Indicación sobre agregado de índices.....	89
Tabla 6. Hoja de trabajo para equipo.....	93
Tabla 7. Resultados clasificados por género de la muestra uno de enjuague del Sistema Ilumina.....	95
Tabla 8. Resultados de bacterias por género ordenados de manera ordinal.....	96
Tabla 9. Presencia y orden de importancia según género de bacteria.....	97
Tabla 10. Importancia de género según número de pacientes por medio.....	99
Tabla 11. Prueba asociación: género y medio.....	102
Tabla 12. Resultado de bacterias según especie de la muestra de saliva del paciente uno.....	103
Tabla 13. Presencia y orden de importancia según especie de bacteria.....	104
Tabla 14. Importancia y número de pacientes según especie por medio.....	108
Tabla 15. Prueba asociación: especie-medio.....	111
Tabla 16. Presencia de virus según medio.....	113

Lista de figuras

Figura 1. Molécula de ADN.....	62
Figura 2. Proceso General de la replicación del ADN.....	64
Figura 3. Estructura secundaria del ARNr 16s.....	68
Figura 4. El ribosoma bacteriano.....	81
Figura 5.Regiones conservadas y variables.....	81
Figura 6. Sistema dual de índices.....	89

Resumen

Estudios recientes han revelado que la carga bacteriana y viral presente en la saliva y líquido crevicular tienen una relación directa con la presencia de la enfermedad periodontal. Mediante la secuenciación del ARN 16S se analizaron varias muestras de enjuagues con saliva y de líquido crevicular en pacientes con enfermedad periodontal sin compromiso sistémico tomadas en la clínica de periodoncia en la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica. Las muestras de líquido crevicular se tomaron con puntas de papel de endodoncia estériles número 30 y las muestras de saliva con 20 ml de enjuague de Listerine® diluido 1:2 con agua desionizada estéril. Estas se llevaron al Laboratorio de Biología Molecular y Celular de la Universidad de Costa Rica, para la extracción del ARN 16s utilizando la técnica de PCR y electroforesis. Finalizado este procedimiento se realizó un análisis comparativo de los resultados de ambos fluidos.

Se logró implementar una técnica clínica sencilla y una técnica de laboratorio económica para aislar el ADN de virus y bacterias, según los resultados encontrados en las pruebas de laboratorio las tres principales bacterias asociadas a la enfermedad periodontal fueron *T. Forsythia* en un 20 % en saliva y en 60% en líquido crevicular, *P. Gingivalis* en un 30% en saliva y un 30% en líquido crevicular y *F. Nucleatum* 10% en saliva y 20% en líquido crevicular. De virus se encontró el citomegalovirus 80% en saliva y 10% el líquido crevicular, Epstein Barr 70% en saliva y 20% en líquido crevicular, HVS-I 30% en saliva y 60% en líquido crevicular y HVS-II 30% en saliva y 0% en líquido crevicular.

Capítulo I

Introducción

La periodontitis está definida como la enfermedad dada por la presencia de múltiples alteraciones en los tejidos que dan soporte al diente (encía, ligamento y hueso alveolar); es un proceso el cual está dado por múltiples factores (1).

Algunos de ellos son edad, hábitos de higiene, tabaquismo, estrés, enfermedades sistémicas (diabetes, hipertensión arterial, SIDA, discrasias sanguíneas, enfermedades de transmisión sexual), presencia de agentes bacterianos y virales, entre otros (2).

Al ser una enfermedad multifactorial, la presencia de varios de estos factores, puede dar el inicio de la periodontitis, en el momento en que estos causen la pérdida de equilibrio en la cavidad oral, se iniciará la destrucción de los tejidos periodontales y tejidos óseos, con esto se empezarán a notar cambios a nivel oral como movilidad dental, encías sangrantes, edema y más signos que indican su desarrollo. Con respecto a la cavidad oral, existen una gran cantidad de bacterias, las cuales se conocen como el principal factor etiológico de la enfermedad, muchos tipos de bacterias son agrupadas según características tales como patogenicidad, forma o su necesidad de oxígeno (3).

La presencia de las bacterias periodontopatógenas ha sido muy estudiada a nivel de fluidos en cavidad oral como lo son la saliva y el líquido crevicular. El líquido o

fluido crevicular se define como un exudado inflamatorio encontrado en el surco gingival de cada pieza dental el cual participa como mecanismo de defensa (4).

Además de la presencia de las bacterias, se pueden encontrar virus en estos fluidos que son coadyuvantes de la enfermedad periodontal, como lo son el citomegalovirus o el herpes virus (5).

Por la gran importancia que tienen las bacterias y virus presentes en la saliva y el líquido crevicular en la recurrencia de la enfermedad periodontal, se realiza la siguiente investigación, con el objetivo de comparar ambos fluidos, e identificar cuál de ellos presenta mayor relevancia, o son más estadísticamente significativos, para analizar la presencia de bacterias y virus que afecten en la enfermedad periodontal, o si bien; ambos son confiables de la misma manera.

De esta forma, considerar extrapolar el estudio de los patógenos periodontales a una población mayor, con la seguridad de utilizar el análisis de un fluido confiable y con resultados verdaderos.

Por lo que, se tomarán muestras de saliva y fluido crevicular en pacientes con enfermedad periodontal, analizando la presencia tanto de bacterias como de virus en ambos fluidos, dando mayor relevancia en los que presentan una acción comprobada en el desarrollo de la periodontitis.

Justificación

Las patologías periodontales, son enfermedades que afectan a gran parte de la población costarricense y mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades periodontales graves, las cuales pueden desembocar en la pérdida de dientes, afectan a un 15-20 % de los adultos en edad media a nivel mundial. Sin embargo, en muchas de las ocasiones en las cuales la enfermedad se presenta, los individuos no saben que la poseen por lo cual no se brinda el tratamiento ni cuidado requerido (6).

Al ser una enfermedad indolora, en la mayoría de los casos, los pacientes no acuden a la consulta, por lo que, en el momento del diagnóstico, la periodontitis se encuentra en un grado avanzado o establecido, con consecuencias irreversibles en el paciente.

La enfermedad periodontal, si bien afecta los tejidos orales en general, representa para el portador un factor de riesgo en su salud más allá de su boca. Comenzando con las afectaciones bien conocidas de la periodontitis, como pérdida de soporte dental, sangrado de encías, movilidad dental y demás; se sabe que sus repercusiones abarcan áreas más extensas que solamente la cavidad oral (7).

Padecer la enfermedad periodontal, aumenta significativamente el riesgo de una persona a desarrollar enfermedades sistémicas que coloquen su vida en riesgo. Un ejemplo importante es la relación de la periodontitis con el sistema cardiovascular (7).

Entre las afectaciones se encuentran endocarditis bacteriana, infarto al miocardio, cardiopatía isquémica, trombosis, insuficiencia coronaria y más. Ya que los microorganismos implicados en la pérdida de soporte dental, pasan al torrente sanguíneo, alojándose en válvulas del corazón, ocasionando inflamación (7).

Además de esto, se puede encontrar relación entre la enfermedad periodontal y las enfermedades respiratorias, si se presenta aspiración de bacterias en el área oro faríngea, penetrando en el tracto respiratorio hasta llegar al pulmón; produciendo neumonía bacteriana, bronquitis, abscesos pulmonares y más (7). Pero no se limita solo a estas áreas, ya que la presencia de enfermedad periodontal, aumenta el riesgo de padecer diabetes mellitus, y de la presencia de alteraciones renales y mucho más (7).

Un adecuado manejo de la enfermedad periodontal, disminuye el riesgo de aparición de estos padecimientos, así como una salud general mejor. La investigación y mayor comprensión de los padecimientos periodontales, coadyuvan a mejorar el diagnóstico y su el tratamiento (7).

La periodontitis, debe ser visto como un problema de salud pública; ya que además de ser frecuente, no se le toma la importancia necesaria, proyectada en el alcance que puede tener en la salud general de una persona; propiciando la aparición de enfermedades graves (7).

Por estas razones, es necesaria la investigación en enfermedad periodontal, para conocer prevalencia, factores de riesgo, consecuencias, tratamientos y demás, que puedan mejorar el trato a la enfermedad como tal. Ya sea en sus estadios severos, así como en su prevención.

La gran prevalencia de esta enfermedad en la población mundial, también se ve relacionada con el poco conocimiento que tienen las personas sobre esta enfermedad, o como reconocer variables patológicas en su cavidad oral (7). Muchas veces se atribuye la prevalencia, al poco interés en la promoción y prevención de la salud oral. Lo cual resalta la necesidad de utilizar técnicas motivacionales que impacten en la salud de los individuos (8). Esto resalta aún más la importancia de la investigación en periodoncia, con lo cual se puede, con respaldo científico, explicar la relevancia y problemática de la enfermedad, y de esta forma actuar para su prevención.

Sin embargo, la investigación en esta área representa retos que, en algunos casos, son invariables y pueden afectar sus resultados. Debido a la etiología variada de la enfermedad, existen muchos factores que actúan para la formación de la misma, su presentación es diferente en cada persona (7).

Como bien se ha resaltado, la enfermedad periodontal puede afectar el organismo en general; pero lo mismo ocurre en caso contrario, dado que las enfermedades sistémicas del paciente pueden afectar la severidad o presentación de la

enfermedad periodontal, por lo que si el paciente padece de hipertensión arterial o diabetes mellitus puede ser afectada su condición periodontal (9).

Además de otros factores, como lo son el fumado, la higiene oral del paciente, así como sus hábitos alimenticios, pueden cambiar la severidad o la presentación de la enfermedad. Estos elementos influyen, para que la manifestación de la enfermedad periodontal sea muy distinta entre individuos (10).

En la enfermedad periodontal existen diferentes etiologías entre las cuales se puede encontrar el biofilme dental, el cálculo, factores anatómicos del diente como proyecciones de esmalte, perlas de esmalte, posición de los dientes y espacios entre los dientes (9).

Los tratamientos dentales defectuosos, desde márgenes protésicos inadecuadamente ajustados y situados, restos de cemento subgingivalmente, coronas y restauraciones que invaden los espacios interproximales, es decir, todo aquello que, por estar situado tan estratégicamente a nivel dentogingival, constituye un factor irritativo, favorece el acumulo de biofilme dental y dificulta su eliminación (9).

Debido a la variabilidad de la etiología de la periodontitis, se presenta una limitante en su investigación, ya que son muchos los factores presentes en un solo individuo, por lo cual es imposible estandarizar cada elemento de manera que no exista diferencia en los resultados obtenidos. De esta forma, la diversidad en las

enfermedades, representa variabilidad en los resultados obtenidos, que pueden variar la veracidad de una investigación en esta área.

En la cavidad oral, se encuentran numerosas glándulas salivales mayores y menores, las cuales secretan saliva con una función importante de defensa contra alguna infección existente en boca. La saliva tiene muchos elementos moleculares que regulan los microorganismos patogénicos, en enfermedades orales, brindando protección ante agentes como hongos o bacterias (5).

En el surco gingival se presenta el fluido crevicular, el cual es un exudado que lleva todas las moléculas clave y las células responsables de la respuesta inmune ante la invasión subgingival de la placa bacteriana (5).

Debido a la importante participación de estos dos fluidos en la defensa del cuerpo humano ante patógenos como los presentes en la enfermedad periodontal, es que adquieren relevancia en el estudio de la patología; ya que su composición y cantidad cambia ante la presencia de dicha enfermedad.

Lo cual establece la relevancia en los componentes encontrados, tanto en la saliva como en fluido crevicular para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, y sobre todo para la presentación en cavidad oral de la misma. Por esta razón, se decide investigar la composición de los mismos, para establecer si ambos fluidos son

igualmente eficaces en la presencia de patógenos periodontales, tanto bacterianos como virales.

De esta forma, analizar la posibilidad de realizar estudios de mayor proporción con uno solo de los vehículos, para obtener resultados verdaderos y estadísticamente confiables, sin comprometer la veracidad de los estudios al no utilizar uno de los fluidos.

Planteamiento del problema

¿Cuál fluido es más representativo en cuanto a la carga microbiológica: la saliva o el líquido crevicular en pacientes con enfermedad periodontal?

Objetivo General

Determinar en cuál fluido oral es más representativa la carga microbiológica comparando los organismos presentes entre la saliva y líquido crevicular en pacientes con enfermedad periodontal, mediante la secuenciación del ARNr 16S.

Objetivos Específicos

1. Hacer una revisión bibliográfica sobre la enfermedad periodontal, bacterias y virus en saliva y líquido crevicular, biología molecular y técnicas de extracción del material genético, con la secuenciación del ARNr 16S.
2. Recolectar datos y muestras de saliva y líquido crevicular de pacientes con enfermedad periodontal.
3. Realizar el análisis de las muestras mediante PCR en el Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica.
4. Análisis comparativo entre las muestras de saliva y líquido crevicular para determinar cuál es más representativo.

Capítulo II

Marco teórico

Se le llama periodonto al conjunto de tejidos y estructuras de soporte de los dientes. Están conformados por: encía, hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento radicular. El periodonto se refiere a tejido gingival y los tejidos de soporte de las piezas dentales (9).

La gingiva es el recubrimiento oral situado cerca de los dientes incluyendo la mucosa masticatoria. Consta de encía marginal, surco gingival, encía insertada y la papila dental. La encía marginal es la encía que se encuentra alrededor del cuello dentario, abarca aproximadamente 1mm y forma la parte externa del surco gingival. El surco gingival es un espacio que se forma entre la encía marginal y el diente y tiene una profundidad de 1 a 2 mm en caras libres y de 2 a 3 mm en superficies interproximales. La encía insertada es la parte de encía que va desde la encía marginal hasta la mucosa alveolar. La papila dental es la parte de la encía que se encuentra entre los dientes (9).

El periodonto presenta características definidas cuando se encuentra sano y en condiciones óptimas, presenta una coloración rosa pálido que se debe a la sangre presente en los vasos sanguíneos, presenta un contorno que sigue los cuellos de las piezas dentales, es de consistencia firme aunque puede separarse del diente con un instrumento, tiene una superficie punteada que usualmente se compara con la cáscara de una naranja (9).

El periodonto se mantiene clínicamente e histológicamente sano mientras se encuentre en homeostasis, existiendo un equilibrio entre los organismos patológicos y el medio de defensa del individuo; sin embargo, al perderse ese equilibrio, la presencia de un componente bacteriológico en la cavidad oral induce al desarrollo de diversas enfermedades (9).

La enfermedad periodontal es una enfermedad infecciosa e inflamatoria de los tejidos orales; causada por esta pérdida de equilibrio entre las bacterias presentes y el estado inmunológico del huésped. Es multifactorial, ya que no depende exclusivamente de la presencia de las bacterias, sino que una serie de factores coadyuvan para que el individuo desarrolle la enfermedad. Interactúan la presencia bacteriológica, el sistema inmunológico, la presencia de agentes virales, el estado sistémico del paciente, características sociales, educación y técnicas de higiene, entre otros (9).

Si bien todos estos agentes presentan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad periodontal, se sabe que su factor etiológico principal es la placa bacteriana o biofilme dental, el cual da pie a la formación de la enfermedad y es lo que se busca controlar con tratamiento (9).

La placa bacteriana se presenta como una comunidad microbiana en una matriz de polímeros, en la superficie de los tejidos orales; si bien se forma en todos los tejidos, el cambio frecuente de las células en los tejidos blandos no permite que se acumule en

los mismos; caso contrario en las superficies dentales, en las cuales las bacterias logran formar comunidades especiales de estructura compleja, las cuales funcionan como una biopelícula, lo que les permite comunicarse con otras comunidades bacterianas y protegerse de modo que se crea una afectación mayor al huésped.

La formación de este biofilme, comienza con una biopelícula de glucoproteína en las superficies orales, la cual funciona como barrera de protección, y en algunos casos como limpieza para los tejidos; sin embargo, la misma se comporta como un sustrato para la adhesión de bacterias. De esta forma, se unen a ella los conocidos como colonizadores primarios, los cuales por medio de moléculas específicas forman una adherencia irreversible a esta biopelícula (9).

Los colonizadores primarios modifican las condiciones ambientales, propiciando un medio para la unión de más bacterias, más patogénicas y anaerobias, llegando los conocidos como los colonizadores secundarios, en su mayoría gram negativos. Esta invasión bacteriana en los tejidos, si no se controla de manera adecuada, es la que desarrolla la formación de la enfermedad periodontal, mediada por el sistema inmunológico del huésped (9).

Es importante reconocer diferentes tipos de bacterias presentes en el ambiente oral, las cuales se dividen en complejos dependiendo de su función en la colonización del surco gingival. Así, el complejo rojo y de mayor atención, serían la *T. forsythensis*, *T. denticola* y *P. gingivalis*; e incluyéndose en otros complejos, es necesario destacar el

papel de bacterias como la *Fusobacterium nucleatum*, la *Prevotella intermedia*, el género de *Streptococcus*, la *A. actinomycetemcomitans*, y más (9).

En la actualidad existe un modelo de sinergia polimicrobiana que se define como un aumento en la capacidad de una bacteria para colonizar, persistir o elevar los síntomas de la enfermedad cuando está presente de otras bacterias. Las comunidades microbianas mixtas brindan oportunidades para la competencia y la cooperación. Las interacciones interespecies dan forma a la naturaleza y función del ensamblaje completo.

Además, la señalización entre especies dentro de las comunidades brinda la oportunidad de regular colectivamente actividades que incluyen la expresión de genes, la adquisición de nutrientes y el intercambio de ADN. De esta forma, las comunidades de bacterias pueden exhibir una sinergia polimicrobiana (11).

Escribano, refiere que son muchas las bacterias implicadas en la aparición de la enfermedad, así, más de 500 bacterias distintas pueden colonizar el nicho subgingival, y alrededor de 300 aún se encuentran sin identificar (10).

A partir de la colonización de estas bacterias, se desarrolla la periodontitis, por esto es importante un control adecuado de la placa bacteriana. A pesar de esto, las mismas bacterias se pueden encontrar en individuos sanos, como en individuos enfermos, ya que al ser una enfermedad multifactorial, no depende solamente de la presencia de los microorganismos (9).

La enfermedad, en realidad se produce por la interacción entre estas bacterias, y el sistema inmunológico del hospedero tratando de defenderse del ataque bacteriano. Al desaparecer el equilibrio entre estas dos secciones, se produce la pérdida de los tejidos de inserción por medio de los agentes inmunológicos del cuerpo humano (9).

El sistema inmune, en el organismo, es indispensable para la supervivencia de los seres humanos día con día; con él, el cuerpo se enfrenta a las enfermedades, a la presencia de virus y bacterias a los que se encuentra expuesto, presentando diversas respuestas inmunes, según el tipo de ataque al que es sometido (12).

Así, se puede reconocer una respuesta inflamatoria, la inmunidad innata o la inmunidad adaptativa. La inflamación se presenta ante estímulos nocivos, es una respuesta no específica, distinguida por signos como calor, rubor, tumor en la zona, para eliminar el agente nocivo inmediato (12).

La respuesta innata, se presenta igualmente como no específica, se da por medio de células inmunes que buscan proporcionar una defensa contra una infección. Células como macrófagos o neutrófilos, auxilian para disminuir la infección presente en el organismo, sin embargo, no confieren una protección duradera. Mientras que la inmunidad adaptativa, se brinda a largo plazo. Reconoce al agente infeccioso, lo incorpora a las células que evitan la colonización, y la replicación del agente nocivo

presente en el organismo, usa agentes como los linfocitos y las inmunoglobulinas presentes en el cuerpo (9).

De esta forma, la enfermedad se desarrolla por la interacción entre los agentes patológicos, y el sistema inmune, realizando un proceso de forma secuencial, que podemos dividir en distintas etapas (9).

Comenzando, con la lesión inicial, en la cual se presenta una respuesta inmune dominada por polimorfonucleares, la cual es una respuesta innata al agente infeccioso presente, se da a los 4 días, de la presencia de los microorganismos y la mala higienización de los mismos (9).

Si no se controla la placa bacteriana, se desarrolla una lesión establecida, la cual se da de 7 a 14 días, mostrando signos de gingivitis, con una respuesta inmune adaptativa, con la presencia de linfocitos B y T CD4 (9).

En la lesión avanzada, se da una periodontitis ya verificada, la cual se puede constatar con signos clínicos como la formación de la bolsa periodontal y la pérdida de inserción clínica. Esta se presenta desde el día 21 después del contacto con el agente bacteriano y se llega al no controlar este factor en las etapas anteriores de la enfermedad. En esta etapa, la enfermedad se vuelve irreversible (9).

Desde 1999, ha emergido nueva información con estudios de población, investigaciones, factores de riesgo y demás; lo cual en el 2017 en el World Workshop llevó a una nueva clasificación periodontal la cual presenta tres formas de periodontitis; como lo son la periodontitis necrotizante, la periodontitis como manifestación de una enfermedad sistémica; y una categoría general de periodontitis, donde se agrupan las antes conocidas como agresiva y crónica (13).

En esta presente clasificación, se agrupa cada caso según su estado y el grado de la enfermedad. El estado es dependiente de la severidad de la enfermedad y de la complejidad de su tratamiento; se presenta en cuatro categorías, se determina tras considerar variables como la pérdida de inserción clínica, la cantidad y el porcentaje de pérdida ósea, la profundidad de sondeo, la presencia de defectos óseos angulares y la afectación de la furca, movilidad dental y la pérdida dental (13).

Mientras que el grado proporciona información sobre las características biológicas de la enfermedad, este incluye tres niveles, y abarca aspectos relacionados con el estado general de salud, y otras exposiciones como el tabaco o el control de la diabetes (13).

Botero (14) explica que todo comienza cuando las bacterias producen factores de virulencia, comprueba que el factor etiológico principal es el componente bacteriano. Cuando estos factores entran en contacto con células del epitelio del surco; se producen defensinas y citoquinas pro-inflamatorias.

Al producirse estas citoquinas, se comprueba la interacción entre el componente bacteriano y el sistema inmune del individuo. Es importante el papel de la IL-1 y del factor de necrosis tumoral alfa, los cuales generan cambios a nivel vascular, como el incremento del calibre de los vasos sanguíneos, produciendo mayor facilidad de sangrado de los tejidos a la manipulación, signo clínico que se comienza a notar desde los cambios en la gingivitis (14).

Además de esta, la citoquina IL-8, es importante, ya que presenta actividad quimiotáctica para los polimorfonucleares. En este caso células como neutrófilos, macrófagos y más, salen del torrente sanguíneo atraídas por quimiotaxis a la zona donde se encuentran acumuladas las bacterias, es decir al tejido adyacente al epitelio de unión del surco, alterando su composición (14).

Por medio de espacios intercelulares, los PMN, salen al surco donde se degranulan y liberan reactivos biológicos, en busca de crear un ataque a los microorganismos nocivos que se encuentran en la zona. Sin embargo, son agentes que pueden causar daño tisular igualmente (14).

Todo esto mediado por la respuesta inmune innata, como una defensa rápida del organismo ante un ataque nocivo. De esta forma, el cuerpo se defiende, y si se controla el estímulo presente, esta respuesta se puede disminuir y no afectar de forma permanente a los tejidos tisulares.

Sin embargo, si el estímulo continúa, y no se tiene un adecuado control del mismo por parte del huésped, se genera la respuesta adaptativa, con linfocitos T CD4 y linfocitos B, los cuales buscan resolver el proceso inflamatorio. Así, es como el perfil de linfocitos produce sustancias como IL-2 y el IFN γ , lo cual aumenta la respuesta de los polimorfonucleares y además de anticuerpos como IgG.

Cuando se pierde el balance entre las bacterias y el sistema inmune, el proceso inflamatorio se torna más complejo, y se presenta una microbiota más compleja, lo que puede marcar el inicio de la pérdida de inserción.

Botero (14) indica que en una lesión con estas características, se encuentra disminuida la respuesta innata, con abundantes plasmocitos y linfocitos T CD4 del perfil Th2; los cuales producen distintos tipos de interleucinas, favoreciendo la formación de inmunoglobulinas y la supresión de macrófagos

En una lesión avanzada, se van a presentar todos los indicadores de una respuesta inmune, tratando de atacar la placa bacteriana, y si bien los linfocitos B dominan la lesión, no brindan protección, mientras que propician la pérdida de inserción (14).

En este ataque al contenido bacteriano, los monocitos, macrófagos y fibroblastos, se estimulan para producir IL-1 β y TNF α . Los linfocitos T CD4 producen

RANK-L, estas citoquinas juntas, son claves en la activación de osteoclastos, generando cambios a nivel óseo, propiciando la pérdida de hueso alveolar y con ella la pérdida de inserción (14).

Además de producir productos para establecer pérdida ósea, se crean metaloproteinasas, las cuales propician la degradación de fibras colágenas, y la pérdida de la inserción del tejido conectivo. En este momento, con la pérdida ósea y del tejido conectivo, se pierde el soporte periodontal, produciendo una migración del epitelio de unión en sentido apical, formando clínicamente la bolsa periodontal (15).

Por lo que si bien las bacterias son importantes para dar inicio a la enfermedad, sin la respuesta inmunológica presente, esta no se desarrollaría. Su expresión varía de sujeto a sujeto; dependiendo de aspectos inmunológicos y genéticos. Por esta razón, se desconoce la cantidad de citoquinas necesarias para producir la pérdida severa de tejidos de soporte, ya que la misma varía en cada individuo (15).

Esto unido a factores como las enfermedades sistémicas, el estrés, el fumado, la presencia de virus, que también contribuyen para aumentar el riesgo de padecer de la enfermedad más fácilmente, ya que presentan factores de riesgo mayores que otros individuos (15).

Alvear, Vélez y Botero (15) explican que el tabaquismo es el factor de riesgo modificable más significativo, ya que su presencia afecta la prevalencia y progresión de la periodontitis, además de interferir en la cicatrización de los tejidos

Además, estudios han demostrado que la diabetes mal controlada, es el factor de riesgo que tiene más influencia en el desarrollo y progresión de la periodontitis, debido a que promueve la alteración de los neutrófilos y la deposición en los tejidos periodontales de los productos finales derivados de la glicación avanzada (15).

En cuanto a los factores que pueden ayudar de forma negativa a la enfermedad periodontal están los siguientes:

- Predisposición genética: existe una relación entre la periodontitis y la variación genética de cada individuo, ya que existen genes que codifican para distintas citoquinas proinflamatorias y mediadores involucrados en la etiopatología de la enfermedad periodontal como la IL-1, IL- 4, IL-10, TNF, PGE2, así como el fenotipo HLA (Human Leukocyte Antigen), que también se han investigado como una factor de susceptibilidad de la enfermedad periodontal (16).
- Hábitos de higiene oral: es uno de los factores con más peso. Si una persona es portadora de los patógenos, y además ayuda a generar un desequilibrio en la cavidad oral de las bacterias presentes, es claro que este individuo tendrá la enfermedad. Al tener una mala higiene, hablese de

una mala técnica de cepillado o no cepillarse, adicional no utiliza el hilo dental, es un individuo que no asiste a consulta odontológica regular para limpiezas, posee focos infecciosos como caries abundantes, restos radiculares, implantes con focos infecciosos, gingivitis persistente entre otros; si es un paciente con una o varias características de estas tiene posibilidades de desarrollar enfermedad periodontal (17).

- Mala nutrición: se sabe que en cualquier enfermedad la mala alimentación puede ser perjudicial, y provocar con más rapidez y mayor agresividad una enfermedad. La enfermedad periodontal no es la excepción, una persona que no tenga una buena dieta tendrá unas defensas pobres la cuales no actuarán con la eficacia requerida para atacar la condición y por el contrario será como una defensa inútil, permitiendo que la enfermedad avance (17).
- Edad: entre mayor sea la persona se ha determinado que mayores probabilidades tiene de padecer la enfermedad periodontal (17).
- Tabaco: tiene mucha relevancia ya que el tabaco, por la acción de la nicotina, induce la secreción de epinefrina, la cual tiene como efecto la disminución de la microcirculación gingival lo que a su vez provoca susceptibilidad tisular, enmascarando todos los signos primarios de la gingivitis permitiendo que la enfermedad evolucione a enfermedad

periodontal; además no permite una cicatrización adecuada de los tejidos (15).

- Comportamiento sexual: enfermedades de transmisión sexual como el papiloma y ciertos tipos de herpes pueden volver susceptible a la persona a desarrollar periodontitis. Además, estos virus actúan en conjunto con otras bacterias periodontopatógenas, lo cual puede volver más agresiva la enfermedad (18).
- Factores sistémicos: existen muchos factores sistémicos que pueden ayudar a la evolución y aparición de la enfermedad, uno de ellos es la inmunosupresión en personas que padecen enfermedades como SIDA, diabetes, ciertas discrasias sanguíneas, trastornos hormonales, hipertensión, entre otras que las harán más susceptibles (19).
- Estrés: cuando una persona está en periodos de estrés es susceptible a desarrollar la enfermedad ya que la higiene oral se ve disminuida. Además, si la persona no se alimenta bien, puede sufrir una baja en sus defensas. Asimismo, si es una persona fumadora, el consumo de tabaco aumenta; lo cual agrava la situación. Por otro lado, si es una persona con alguna condición sistémica que ayude negativamente a la aparición de la enfermedad, muy probablemente esta condición aumente por el estrés, por tanto, será más susceptible a la enfermedad (20).

- Otros: dentro de ellos se puede mencionar la transmisión que se da de madre a hijos, ya sea porque las madres besan a los niños en la boca, porque soplan la comida de los infantes, esto provoca que bacterias de las madres pasen a la cavidad oral de los niños. También es posible encontrarlo entre miembros de la familia (hermanos, pareja, etc) por la relación tan cercana y las costumbres que existen en cada familia. Existe la posibilidad de que la enfermedad periodontal sea tan transmisible como una gripe, la saliva es el origen de la transmisión de los distintos patógenos. Es importante recalcar que aunque los individuos posean los patógenos, no siempre desarrollan la enfermedad, por lo que individuos sanos también pueden ser portadores de ellos (21).

En Japón se inició un estudio en el 2004 y finalizó en el 2005, Vincent (22), con el fin de determinar agentes periodontopatógenos en niños y sus madres (las cuales padecían de enfermedad periodontal). Se tomaron muestras de saliva en el cual se determinó que *A. actinomycetemcomitans* era la especie más frecuentemente detectada en las madres (tasa de detección: 42.5%), seguido por *C. sputigena* (38.7%), *P. gingivalis* (25.5%) y *T. forsythensis* (13.2%). En cuanto a los niños, *C. sputigena* tenía el tasa de detección más alta (55.8%), seguida por *A. actinomycetemcomitans* (42.5%) y *T. denticola* (16.8%). *P. intermedia* no se detectó en ninguno de las muestras de madres y niños en este estudio". El número de especies bacterianas detectadas en madres era similar al número encontrado en niños

Al conocerse el proceso en el cual se desarrolla la enfermedad, el tratamiento más efectivo a nivel clínico hasta el momento, es controlar el factor etiológico primario. Se brindan instrucciones de higiene a los pacientes, y se realizan raspados y alisados en las zonas donde se presenta la pérdida de inserción. Esto con el fin de que sane la zona, y si bien, no se pueden recuperar los tejidos perdidos, no continúe la pérdida de inserción en el paciente (9).

Al ser una enfermedad multifactorial, su tratamiento es complejo, y no llega a ser un 100% efectivo, ya que si bien se puede llegar a controlar el componente bacteriano del individuo, no es posible controlar otros factores como la respuesta inmunológica, la presencia de virus, ni demás elementos que se encuentran agravando la enfermedad.

Conforme avanza la enfermedad periodontal, es posible distinguir diversas células, bacterias y citoquinas en los fluidos orales. La saliva y el fluido crevicular, son indicadores de la presencia y el grado de avance de la enfermedad periodontal, por lo que al analizarlos se pueden realizar conclusiones en relación a la enfermedad periodontal y sus componentes (9,23).

Además de la presencia de saliva, como medio relevante en la enfermedad periodontal, tanto en su defensa como en su avance, se encuentra el líquido crevicular. Este se presenta en el surco gingival, se encuentra en íntima relación con la

enfermedad periodontal y con los tejidos orales directamente afectados por la misma (24).

El líquido gingival se produce por la presión del plasma en las arteriolas que se encuentran sobre el epitelio de inserción. El líquido atraviesa estos vasos y se deposita en los tejidos de soporte de los dientes, presentándose en toda la boca y siendo esencial para la protección de los mismos (24).

El fluido presenta diversas funciones importantes, como la inmunitaria, brindada por la presencia de inmunoglobulinas que reaccionan para fagocitar bacterias presentes en la zona. Además, presenta enzimas con efectos destructores en las bacterias. Adicionalmente, esta defensa química que se produce en el surco gingival, se puede encontrar un arrastre mecánico, en el cual el líquido crevicular tiende a desplazarse hacia oclusal saliendo del surco, y así, bajando la población microbiana que se encuentra dentro del surco gingival.

Sin embargo, las características de la zona en la que se encuentra el fluido crevicular, también son coadyuvantes para la comunidad microbiana, debido a que la escasez de oxígeno es fácil para las bacterias anaerobias alojarse en este sitio. Muchas veces la entrada al surco gingival se encuentra bloqueada por placa bacteriana o inclusive por cálculo. Esto dificulta la salida de los microorganismos, así como el ingreso de más oxígeno, e impide la entrada de saliva con agentes antibacterianos (24).

Es importante destacar, que las sustancias proteicas presentes en el líquido crevicular, recubren a las bacterias presentes, dejándolas fuera de alcance para células defensivas y para anticuerpos, por lo que es un factor que se une al beneficio que las bacterias encuentran en esta zona (24).

En condiciones sanas, en el surco gingival se encuentran gran cantidad de bacterias, como *Streptococcus*, del grupo *sanguis*, del grupo *mitis*, el *Villonella párvula*, *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Treponemas* y más. Cuando el surco es invadido por bacterias relativamente patógenas, es cuando se rompe el equilibrio explicado anteriormente. Se presenta la enfermedad periodontal y llega a evolucionar en el periodonto, microorganismos como *Porphyromonas gingivales*, o *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* (24).

Debido a la relevancia y la relación que presenta el fluido crevicular con los tejidos de inserción de la cavidad oral, hay una variación significativa en la presencia de enfermedad periodontal. Se observa que la cantidad aumenta en la presencia de inflamación, debido a la cantidad de bacterias y de las células defensivas (24).

La presencia de IL-1 α , producida por los macrófagos, indica una gran actividad bacteriana en los tejidos. Falotico y Farias, explican que ésta es considerada como el más importante agente endógeno de destrucción ósea, ya que estimula la conversión

de osteoblastos en osteoclastos. La presencia de este agente en el líquido crevicular sería indicativo de un avance de enfermedad periodontal (24).

La IL-6 también es una importante interleuquina inflamatoria, y tiene relevancia en la resorción ósea. La presencia de bacterias como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, o de *Porphyromonas gingivalis* se da en la enfermedad periodontal y las mismas son estimuladoras en la producción de IL-1 α , así como la alta cantidad de neutrófilos que son indicativos de enfermedad periodontal (24).

Estos componentes son relevantes en el líquido crevicular en la presencia de periodontitis, y se deben tomar en cuenta al momento de analizar este fluido en pacientes afectados.

El principal factor etiológico sigue siendo el bacteriano; para que se inicie la enfermedad periodontal es necesaria la presencia de bacterias, las cuales por sus distintas formas de actuar atacarán el periodonto y hueso alveolar (15).

La cavidad bucal se encuentra colonizada por una gran cantidad de bacterias. Su aparición inicia desde unas horas después de haber nacido. Con el paso de los años en cada persona se van colonizando más cantidad de bacterias, de las cuales gran parte se comportarán como patógenos (23).

Generalidades de las bacterias

Las bacterias presentan importantes propiedades, tales como: adherencia a las células huésped, invasividad, toxigenicidad y capacidad para evadir el sistema inmunitario del huésped. Debido a estas propiedades las bacterias son microorganismos muy potentes, los cuales pueden llegar a ocasionar cambios patológicos como lo es la enfermedad periodontal (23).

Una bacteria es un microorganismo unicelular, el cual es denominado como una célula procariota ya que no presenta un núcleo definido. Presenta una membrana plasmática, la cual es rodeada por la pared celular. Esta pared es una estructura semirígida la cual encapsula a la membrana y microorganismos, tiene la función de proteger de los cambios del medio externo y darle forma a la bacteria (25-27).

Las bacterias pueden presentarse en distintas formas: esférica (cocos), bastón (bacilos), espiral (espirilo), coma (vibrio) o en forma de sacacorchos (espiroquetas) (26).

En su mayoría, las bacterias se reproducen por división celular, pero existen casos en los cuales no se dividen completamente una de otra, por lo cual se generan agrupaciones de ciertas formas, como lo es en el caso de los cocos: estreptococos (los cocos luego de la división quedan pegados en cadenas), estafilococos (cocos divididos en múltiples planos y toman una forma similar a un racimo de uvas), diplococos (cocos que permanecen pegados en pares luego de la división), tétradas (cocos divididos en

dos planos, pero están unidos en grupo de cuatro), y las sarcinas (divididas en tres planos, pero unidos en cubos).

En cuanto a los bacilos, existen algunos casos, por ejemplo, estreptobacilos, diplobacilos y cocobacilos (bacilos con forma oval muy parecidos a los cocos(26). Los bacilos pueden medir entre 0,2 a 10 micrómetros aproximadamente (son más grandes que los virus) y en su mayoría se reproducen por división celular (28).

Existen varios elementos en las estructuras de las bacterias que ayudan en su ataque al periodonto, algunos de ellos son (25,28,29):

- Adhesinas: ayudan a la adhesión, agregación y congregación.
- Endotoxinas: generan daño tisular y reabsorción ósea.
- Cápsulas y proteínas fijadoras de inmunoglobulinas con efecto antiopsónico y de bloqueo de fagocitosis.
- Flagelos: son apéndices externos similares a un látigo los cuales propulsan a las bacterias, también mejoran la penetración subepitelial.
- Coagulasa lisa: cubre a las bacterias con una capa de fibrina la cual las protege de la acción fagocítica.
- Fimbrias o pili: filamentos cortos los cuales permiten la adherencia de la bacteria al tejido, algunos pueden estar asociados al cambio de material genético entre bacterias.

Dentro de algunas bacterias se encuentra una estructura de gran importancia, las esporas. Son estructuras densas las cuales le permiten a la bacteria soportar el calor y la desecación, también son muy resistentes a la acción de los desinfectantes (27).

Para que se dé el crecimiento de estos microorganismos, se necesitan de materiales tales como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, entre otros. También energía, la cual en algunos casos es tomada por la luz (fotosíntesis), por oxidación de sales minerales o por fermentación (oxidación sin oxígeno) (27).

En cuanto a sus características, las bacterias se pueden dividir en gram positivas y gram negativas, esto en gran parte depende del resultado en la prueba de tinción de Gram (ya que esta se da por la presencia de diferencias estructurales en la pared celular de la bacteria).

La tinción de Gram consiste en colocar colorante de violeta de genciana, el cual va a teñir el citoplasma tanto de las bacterias gram positivas como las gram negativas. Luego se coloca alcohol el cual en el caso de las bacterias gram positivas va a deshidratar sus peptidoglucanos, y no crea ningún cambio en su coloración. En cuanto a las bacterias gram negativas, el alcohol logra disolver la membrana. Debido a esto lava el alcohol el color violeta y vuelve incolora a la célula. Por último, se utiliza safranina (tinción contraste) la cual es absorbida tanto por las bacterias gram positivas como gram negativas. Pero en el caso de las gram positivas el color violeta enmascara

al color rosa por lo cual se perciben con un color violeta, y las bacterias gram negativas si son teñidas quedando de color rosado (27,28).

Ahora bien, tanto las bacterias gram positivas como las gram negativas presentan ciertas características de importancia para distinguirlas entre ellas:

- Gram positivas: la pared celular solo presenta una capa de peptidoglucano, esta va a ser una capa gruesa y rígida (28,29)
- Gram negativas: su pared está compuesta por dos capas (28,29):
 - Capa interna: está conformada por peptidoglucano, pero es muy delgada, debido a esto aumenta su susceptibilidad a presentar ruptura mecánica.
 - Capa externa: presenta fosfolípidos, lipoproteínas y lipopolisacáridos, estos últimos son microorganismos los cuales su porción lipídica es conocida como endotoxinas. Esta capa externa tiene una carga negativa muy potente por lo cual muchas veces no permite que se dé la lisis de células ni la fagocitosis, también tiene la capacidad de no permitir el paso de ciertos antibióticos (penicilina).

Por su parte, las bacterias también se dividen dependiendo de la necesidad o no de oxígeno para el desarrollo de su metabolismo, se encuentran dentro de estas las aerobias, anaerobias o facultativas (28,29):

- Aerobias: necesitan oxígeno.

- Anaerobias: crecen en ausencia de oxígeno, el oxígeno es letal para ellas.
- Facultativas: logran multiplicarse tanto en ausencia como en presencia de oxígeno.

Para denominar a las bacterias se utilizan dos palabras: el género y la propia especie. El género se da dependiendo del descubridor, algún lugar geográfico o alguna característica propia del microorganismo (28).

Bacterias periodontopatógenas presentes en líquido crevicular y saliva

Existen varias clasificaciones para denotar las bacterias presentes en cavidad oral. Para efectos del presente estudio se utilizará la clasificación de SS. Socransky, la cual está dividida por color y se ordenada según patogenicidad (10,16, 28):

- Complejo rojo: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Tannerella denticola*.
- Complejo naranja: *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter Sp*, *Campylobacter showae*, *Streptococcus constellatus*, *Eubacterium. nodatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum vincentil*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum polymorphum*, *Fusobacterium periodonticum*.

- Complejo verde: *Eikenella chorrodens*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophag sputigena*, *Capnocytophag ochracea*, *Capnocytophag concisus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotipo a.
- Complejo amarillo: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus gordonil*, *Streptococcus intermedius*
- Complejo violeta: *Veillonella parpula*, *Actinomyces odontolyticus*.
- Complejo azul: Especies *actinomyces*.
- Sin complejo: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotipo b (existen 5 serotipos, y la diferencia radica en la pared bacteriana) (29).

Se han realizado diversos estudios en distintas poblaciones, en los cuales se han determinado ciertas bacterias de la clasificación anterior como las más frecuentes en pacientes con distintos tipos de enfermedad periodontal, y que además son responsables de la destrucción del periodonto y de hueso. Las más implicadas son la bacterias del complejo rojo, parte del complejo naranja y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotipo b. Las bacterias al poseer gran capacidad de adaptación pueden encontrarse tanto en saliva como dentro del surco gingival y por ende formar parte del líquido crevicular (30). Se han descubierto hasta 400 especies

bacterianas en las bolsas periodontales y 300 especies más en el resto de la cavidad oral (31).

Todas las bacterias relacionadas con la enfermedad periodontal tienen la característica de presentar los distintos mediadores osteolíticos, causantes de la pérdida del hueso periodontal. Uno de esos mediadores son los lipopolisacáridos, componentes presentes en la membrana externa de bacterias gram negativas. Este actúa desencadenando una respuesta inflamatoria, que da inicio a la resorción ósea, además es capaz de estimular la diferenciación y activación de los osteoclastos (células encargadas de generar resorción ósea) (32).

Otros mediadores osteolíticos son la presencia de proteasas, las cuales degradan proteínas de la matriz extracelular del hueso; también está la presencia de polisacáridos capsulares y proteínas fimbriales, ambos estimulan la producción de citoquinas pro-inflamatorias (32).

El péptidoglicano es otro mediador bacteriano, es una macromolécula la cual es parte de la estructura de la pared celular de bacterias gram negativas y gram positivas. Ayudan a la producción de citoquinas pro-inflamatorias (6). Los ácidos teicoicos y lipoteicoicos generan también citoquinas pro-inflamatorias pero estos a diferencia de los péptidoglicanos son componentes de la pared celular de bacterias gram positivas (32).

Ahora bien, si se habla específicamente de la presencia en líquido crevicular de bacterias determinantes de la enfermedad periodontal, se pueden mencionar: *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium* y *Bacteroides* (33).

Porphyromonas, estos son bacilos pleomórficos o cocobacilos, inmóviles, no esporulados. De ellas existen doce especies, pero solo tres se han encontrado en cavidad bucal, las cuales son: *P. endodontalis*, *P. asaccharolytica* y *P. gingivalis* (27). De este grupo se identifica a *P.gingivalis* como la bacteria más dañina, ya que presenta gran poder en colonización, destrucción del tejido periodontal y evasión de defensas del hospedero. También se ha observado la presencia de elementos estructurales favorables para su patogenicidad; por ejemplo, las fimbrias, residuos proteicos, glucídicos y de lipopolisacáridos (contribuyen a la adhesión a células epiteliales y coagregación con otras bacterias), cápsula, que genera una acción antifagocítica, entre otros; es capnófilo (necesita CO₂ para desarrollarse) (31,33).

Además *P. gingivalis* tiene habilidad para producir enzimas que alteran el periodonto, algunas son: las colagenasas (actúa sobre colágeno del ligamento periodontal y hueso alveolar), enzimas tripsicas (actúan sobre colágeno alterado), hialuronidasa (actúa sobre ácido hialurónico aumenta difusión del microorganismo), fosfatasa ácida y alcalina (genera pérdida del hueso alveolar). Por otro lado, estimula la liberación de citoquinas proinflamatorias, factor degradador de fibrinógeno, queratinasas, entre otros (33).

No menos importante, *P. gingivalis* produce ácidos grasos volátiles de cadena corta como son el succinato, el propionato, el butirato, el isobutirato, el isovalerato; además productos sulfurados como el metilmercaptano, todos los anteriores son citotóxicos para los PMN, fibroblastos gingivales y células del ligamento periodontal (33). Asimismo, presenta colagenasas, las cuales son mediadores osteolíticos que degradan colágeno tipo I de la matriz extracelular del hueso alveolar (32).

En Buenos Aires se estudió la microbiota presente en el fluido crevicular de 30 jóvenes, en la cual se logró demostrar una importante relación entre la concentración de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, lo cual nos indica que se debe dar la asociación entre especies bacterianas para que la enfermedad periodontal se mantenga (31).

Conforme al género *Prevotella*, son bacilos cortos, pleomórficos, inmóviles, no esporulados. Existe gran cantidad de subtipos, de las cuales las que influyen en la enfermedad periodontal son *P. intermedia*, *P. loescheii* y *P. melaninogenica*, las cuales poseen fimbrias (23). *P. intermedia* produce endotoxinas, adhesinas, complementasas, inmunoglobulinasas como: IgGasa, IgAasa, IgMasa. Además, producen factores de supresión como linfocitos B, de fibroblastos y otro factor que tiene acción fibrinolítica. Estas bacterias se encuentran muy elevadas en periodontitis crónica (29-35).

La *P. intermedia* produce degradación ósea alveolar debido a la acción de fosfolipasas ácidas y alcalinas, además es capaz de producir irritación periodontal y lesión en epitelio gingival, esto último por las epiteliotoxinas (30).

En un estudio realizado en Venezuela, en el cual se investigaron las bacterias presentes en el fluido crevicular de pacientes con enfermedad periodontal, obtuvieron que la *P. intermedia* fue el microorganismo encontrado en mayor cantidad en bolsas periodontales moderadas (1).

En cuanto a los *Bacteroides*, existe una gran variedad de especies ubicadas en este grupo, pero en la cavidad oral (enfaticado en el surco gingival) solo nos afectan tres: *B. capillosus*, *B. heparinolyticus* y *B. forsythus*. Estos son bacilos pleomórficos, anaerobios estrictos, inmóviles, no esporulados (33).

En el género de *Fusobacterium* se presentan como bacilos largos fusiformes, inmóviles y no esporulados. En el surco gingival se han observado varias especies: *F. nucleatum*, *F. naviforme*, *F. periodonticum*, *F. alocis* y *F. sulci*. Presentan fimbrias, lipopolisacáridos, también producen metabolitos que se comportan como compuestos tóxicos tisulares, y un factor soluble inhibidor de la quimiotaxis leucositaria (33).

Tanto *F. nucleatum* como los *Bacteroides* han sido muy poco identificados en investigaciones de fluido crevicular, esto debido a ser microorganismos extremadamente exigentes con su entorno (1).

Por otra parte, la diversidad de bacterias que se pueden encontrar en saliva depende de cada individuo. Sin embargo, las más comunes relacionadas con enfermedad periodontal son *F.nucleatum*, *P.gingivalis*, *T.forsythia*, *P.intermedia*, *T.denticola*, *A.actinomycetemcomitans*. De los cuales ya se describieron las características periodontopatogenas y destructivas de la mayoría (36-38).

En el caso de *T. denticola*, esta sintetiza proteasas que degradan el colágeno, tiene componentes lipídicos en la capa externa que inducen a la reabsorción ósea y a la activación de citoquinas inflamatorias (39).

A.actinomycetemcomitans es un cocco o bacilo pequeño gram negativo, es capnófilo, sacarolítico, anaerobio facultativo, se encuentra aumentada en pacientes con periodontitis agresivas y algunas crónicas sobre todo en las refractarias. Posee endotoxinas, (producto de su metabolismo); se sintetiza leucotoxinas, epiteliotoxinas. Produce colagenasa la cual degrada el colágeno del tejido conectivo subepitelial, ligamento periodontal y hueso alveolar. Además, produce factores inhibidores de la función leucocitaria, factores inmunosupresores que activan a los linfocitos T8, factores inhibidores de fibroblastos, sintetizan toxina CDT(cytolethal distending toxin), la cual se cree que actúa como nucleasa con lo que detiene el ciclo celular de linfocitos (causando alteración en la defensa del tejido periodontal) (16,40).

Adicional, *A.actinomycetemcomitans* presenta un mediador osteolítico propio de esta bacteria llamado: proteínas de choque térmico 60 de *A.actinomycetemcomitans*.

Estas proteínas poseen efecto osteolítico y estimulan la producción de citoquinas pro-inflamatorias (32).

Es importante tener presente que todas estas bacterias llegan a generar enfermedad periodontal en el momento en el que se da un cambio en el equilibrio. La enfermedad no aparecerá por la acción de un solo agente patógeno, sino por la acción en conjunto de varias bacterias que inician su colonización desde temprana edad (37). Por lo que tiene importancia tratar de determinar que bacterias asociadas a la enfermedad periodontal existen en la cavidad oral de un niño.

A modo de ejemplo, se realizó un estudio durante 2 años en Kuwait, con una población de 240 niños (as), divididos en grupos de edades de: <6 años (n = 40), 6-9 años (n = 60), 10-12 años (n = 40), 13-15 años (n = 40) y 16-18 años (n = 60); se tomaron muestras de saliva, las cuales se analizaron por medio del estudio con reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De esta manera, se determinó que el 77.1% de los niños fueron positivos para patógenos periodontales, 41% para *P.nigrescens*, 20% para *A. actinomycetemcomitans*, 10% para *T. forsythensis*, 8% para *P. intermedia*, 2% para *P. gingivalis*. Lo que indicó que los niños kuwaitíes albergan estos periodontopatógenos antes de la edad de 18 años, dato que se puede repetir en otras poblaciones infantiles como por ejemplo en Costa Rica (40).

La enfermedad periodontal se atribuye a múltiples agentes infecciosos. El principal factor etiológico son microorganismos anaerobios (39). Se saben de múltiples

estudios han logrado determinar que un grupo específico de virus encontrados en las distintas muestras obtenidas de pacientes con enfermedad periodontal, contribuyen en el desarrollo de la enfermedad y sus distintas manifestaciones, ocasionando un aumento de las manifestaciones clínicas que la enfermedad presenta (40-43).

Características de los virus

Ahora bien, con el objetivo de comprender un poco mejor el papel que desempeñan los virus en ese complejo desarrollo de la enfermedad periodontal, es importante aclarar que los virus son parásitos intracelulares, los cuales no tienen capacidad de producir energía, reproducir su propio genoma o sintetizar sus propias proteínas; consecuentemente su replicación depende completamente de la energía del huésped (37).

En su proceso de multiplicación, el virus pasa por diferentes fases (30):

- a) Adsorción a la célula del huésped.
- b) Penetración o entrada.
- c) Rotura de la cubierta para liberar el genoma.
- d) Producción de los componentes del virión.
- e) Ensamblaje
- f) Liberación de la célula.

Uno de los virus más relacionados con la enfermedad periodontal se detalla a continuación, el herpesvirus.

Herpesvirus

Específicamente, a nivel de la enfermedad periodontal, se ha determinado que los virus que se encuentran estrechamente relacionados con esta enfermedad son el citomegalovirus y los herpesvirus (5). Estos son constituidos por grandes bandas dobles de ADN recubiertas, se encuentran en las células eucariotas. Según Slots el contagio con alguno de estos virus puede ser gracias a (41):

1. Herpes virus tipo I, mediante un contacto labial.
2. El Herpes virus tipo II por relaciones sexuales.
3. El Citomegalovirus se obtiene durante el nacimiento del niño a través de la placenta.

Por otra parte, de la familia Herpesviridae se han identificado al menos 120 tipos de virus, sin embargo, tan solo son ocho los miembros capaces de infectar al hombre, los cuales a su vez se dividen en 3 subfamilias dependiendo de:

- la patogenicidad
- tipo de célula que infectaron
- las propiedades de su crecimiento

Las subfamilias son (3,42):

- **α (Alpha-herpesvirus):** dos virus del herpes simple, tipo 1 y tipo 2 (HSV-1 y HSV-2) y virus de varicela y zoster (VZV). Esta subfamilia es de crecimiento rápido y permanece en ganglios nerviosos sensoriales.

- **β (Beta-herpervirus):** citomegalovirus (CMVH), herpes virus 6 humano (HHV-6) y herpes virus humano tipo 7 (HHV-7). Son de replicación lenta y producen células grandes multinucleadas. Estos virus permanecen latentes en tejido linfoepitelial, de glándulas secretoras, riñones y otros tejidos. HCMV puede provocar en los pacientes severas enfermedades de inmunosupresión, particularmente neumonía.
- **γ (Gamma-herpesvirus):** virus de Epstein-Barr (VEB) y herpes virus humano 8 (HHV-8) los cuales permanecen latentes en tejido linfoide.

En la siguiente tabla según Slots se muestran los distintos grupos de herpesvirus y las enfermedades principales que causan (5):

TABLA 1. - PREVALENCIA DE HERPESVIRUS EN PACIENTES PERIODONTALES DE VARIOS PAÍSES					
Estudio	País	Estado periodontal	Virus herpes simple Tipo I	Virus Epstein-Barr	Citomegalovirus
Contreras y cols. (2000)	EE.UU	Periodontitis crónica avanzada	57% periodontitis 9% sanos/ligera gingivitis	79% periodontitis 27% sanos/ligera gingivitis	86% periodontitis 18% sanos/ligera gingivitis
Ting y cols. (2000)	EE.UU	Periodontitis agresiva localizada	55% periodontitis 9% sanos	64% periodontitis 18% sanos	73% periodontitis 18% sanos
Michalowicz y cols. (2000)	Jamaica	Periodontitis localizada	Sin datos	33% agresiva 45% incipiente 17% sano/gingivitis	73% agresiva 40% incipiente 22% sano/gingivitis
Kamma y cols. (2001)	Grecia	Periodontitis generalizada	35% E.P. activa 9% E.P. estable	44% E.P. activa 13 % E.P. estable	59% E.P. activa 13% E.P. estable
Saygun y cols. (2004)	Turquía	Periodontitis generalizada	78% agresivas 0% sanos	72% agresivas 6% sanos	72% agresivas 0% sanos
Kubar y cols. (2005)	Turquía	Periodontitis generalizada	Sin datos	89% agresivas 49% crónicas	78% agresivas 46% crónicas
Ling y cols. (2004)	Taiwan	Periodontitis crónica	31%	4%	52%
Lí y cols. (2004)	China	Periodontitis crónica	Sin datos	58% E.P. activa 23% <i>quiescent</i> 19% gingivitis	Sin datos
Idesawa y cols. (2004)	Japón	Periodontitis crónica	Sin datos	49% periodontitis 15% sanos	Sin datos

Fuente: Papel etiológico de los virus en la enfermedad periodontal, 2007.

Todos estos agentes patógenos producen una infección inicial, esta es seguida de un periodo de infección latente, en el cual el genoma viral se encuentra en las células y se conserva como epitoma (44).

Una vez que alcanza estas condiciones, este posee una limitada necesidad de expresión de genes específicos, con el objetivo de conservar el estado de latencia (44).

Ahora bien en el momento en el que se produce la reactivación del virus a causa de interacciones complejas de este con el sistema inmune del huésped, se logra observar el resultado final de la enfermedad recurrente. Pero en general, las enfermedades por herpesvirus están limitadas a pacientes jóvenes con un sistema inmunológico todavía inmaduro o a pacientes inmuno-deprimidos (42-44).

Por otra parte, la patogenia de los herpesvirus, se manifiesta en dos vías principalmente (43): vía directa; en donde tenemos la infección por parte del virus y posteriormente la replicación. O mediante una inhabilitación de la respuesta inmune del hospedero.

Es importante mencionar que la existencia y cantidad de los virus del herpes en la enfermedad periodontal depende de factores tales como (5):

1. predisposición genética
2. edad
3. etnia
4. el tipo de enfermedad periodontal que posee el paciente.

Relación de los virus con la enfermedad periodontal

Se piensa que los virus actúan sobre el huésped de forma directa e indirecta. Lo hacen directamente como resultado de la infección y siguiente replicación, o de forma indirecta como consecuencia de un desequilibrio en las defensas del hospedador que puede favorecer una agresión por parte de la flora bacteriana comensal (39,42).

Se ha observado, que la presencia de alguno de los miembros del herpes virus son capaces de aumentar la patogenia de la microbiota oral, así como producir alteraciones en acciones tales como: la adhesión, quimiotaxis, fagocitosis de los distintos polimorfonucleares, leucocitos entre otros, los cuales son encargados del control sobre bacterias periodontopatógenas (42).

La relación los herpes virus junto con la enfermedad periodontal es determinada utilizando los criterios de Hill, los cuales se deben de cumplir con el objetivo de establecer una relación, estos son (39):

- Fuerza de asociación: se ha observado una estrecha relación entre el herpes virus, los citomegalovirus, y el VEB-1, VEB-2 con la periodontitis, al comparar en distintas localizaciones sanas como periodontales, de tal forma, que en presencia de virus se ha observado un aumento en el número de bacterias. Además, se ha observado un aumento en la agresividad de la enfermedad del herpes virus en pacientes infectados con VIH, esto debido a la disminución en la capacidad de defensa por parte del sistema inmune del individuo, por tanto, un aumento en la agresividad de la enfermedad periodontal.
- Consistencia a la asociación: se refiere a la asociación repetida de diferentes poblaciones en circunstancias medioambientales distintas, en la tabla adjunta se muestra la asociación entre virus y la enfermedad en distintos países.

- Especificidad: este criterio se refiere a que la generación de un único efecto, sin embargo los virus generan múltiples consecuencias, por lo que no es aplicable.
- Temporabilidad: se refiere a que siempre la causa es seguida al efecto, sin embargo en relación con los virus se ha observado que presentan una reactividad, en donde la misma puede estar dada por la misma enfermedad periodontal, o por el estímulo infeccioso que ella genera.
- Gradiente biológico: se refiere a la relación establecida entre la dosis-efecto, en donde se ha observado que a mayor número de virus presentes, existe una mayor gravedad de la enfermedad.
- Plausibilidad biológica: se ha determinado que los virus son partícipes del proceso inflamatorio de la enfermedad, lo cual contribuye en aumentar la destrucción periodontal.
- Coherencia: se observa una concordancia entre la frecuencia con la que se observan virus en la enfermedad periodontal y la expresión aumentada de agresividad que presentan los procesos inflamatorios propios de la enfermedad periodontal.

- Evidencia experimental de disminución o desaparición del efecto al suprimir la causa, se ha determinado que la aplicación por parte del individuo afectado de estrictas técnicas de higiene muestran una considerable disminución de la cantidad de virus detectados.

Además los virus son capaces de generar inmunosupresión, y efectos citotóxicos sobre fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales y células inflamatorias, y posiblemente sobre osteoblastos, lo cual contribuye en un aumento en la agresividad de la enfermedad periodontal (5).

A su vez se ha observado que se genera una reducción en el recambio y capacidad de reparación de los fibroblastos infectados, así como las capacidades fagocíticas y bactericidas de los linfocitos y PMN, lo cual puede explicar el papel etiopatogénico de los virus en la enfermedad periodontal (39).

De acuerdo con lo mencionado es posible establecer que los herpesvirus son capaces de alterar la respuesta de defensa el huésped, tanto a nivel de la respuesta celular como con la respuesta humoral y a su vez pueden influenciar la producción de citoquinas, modulando de esta manera la respuesta inmune del huésped frente al ataque viral (43)

Gracias a esa capacidad de alterar la producción y funcionamiento normal de las citoquinas, se ha determinado un riesgo asociado entre la destrucción periodontal con

el aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias, ya que los herpesvirus, que están relacionados con citoquinas proinflamatorias, pueden obstaculizar la defensa antibacterial del hospedero, y a su vez estimular la reabsorción ósea por parte de los osteoclastos e impidiendo el recambio y reparación de los tejidos (5).

Tal y como se mencionó, los principales virus responsables de actuar durante el desarrollo o establecimiento de la enfermedad periodontal resultan ser el citomegalovirus humano, el virus de Epstein- Barr tipo 1 y el tipo 2.

El EBV se transmite usualmente por secreciones orales o por sangre y se replica en células epiteliales o células B de la orofaringe, el cual es el sitio principal de persistencia del virus. Afecta a un 90% de la población. El número de células latentes infectadas dentro de una persona permanece estable por años. Por otra parte, el HCMV es de contagio genital y perinatal principalmente, ya sea por medio de la placenta en el momento del parto o cuando se es amamantado. Alrededor de un 90% de la población es afectada a la edad de 20 años. Este virus puede ser encontrado en saliva, orina, semen y leche materna (42).

Se ha determinado que los virus de Epstein-Barr tipo 1 y Epstein-Barr tipo 2, es frecuente encontrarlos en pacientes mayores a 30 años, en cambio el citomegalovirus, es más común encontrarlo en pacientes mayores a los 45 años, en donde conforme el paciente envejece hay más presencia del mismo, y a su vez es más común encontrarlo ante la enfermedad periodontal crónica (43).

Asociación de los herpesvirus con bacterias peridontopatógenas

Ambos virus mencionados trabajan en conjunto con las bacterias típicas de la enfermedad periodontal, y es gracias a esas asociaciones que es posible encontrar distintas alteraciones en esta enfermedad (45).

Por ejemplo, en el caso del citomegalovirus, se ha observado que este contribuye a la pérdida ósea que se genera durante el desarrollo de la enfermedad, y con respecto al virus del Epstein-Barr junto con las bacterias presentes a nivel subgingival, se propicia el aumento en la severidad de la enfermedad periodontal (42-44).

Se ha logrado determinar en aquellos pacientes con una enfermedad periodontal crónica la existencia del citomegalovirus en estrecha relación con bacterias tales como; *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola*, *B. forsythia*, y en aquellos pacientes con enfermedad periodontal aguda se ha observado una relación entre las bacterias *P. gingivalis*, *A. actinomycescomitans* a nivel subgingiva (44).

Por su parte, el EBV se considera un potente activador de la proliferación policlonal de los linfocitos B, induciendo la proliferación y diferenciación de células secretoras de inmunoglobulinas. Tanto el aumento de la concentración gingival de determinadas citoquinas como la proliferación policlonal de los linfocitos B, son características asociadas con una progresión más rápida de la enfermedad periodontal (42-44).

Con respecto al HCMV, este ha demostrado alterar la respuesta inmune celular, favoreciendo un aumento de los linfocitos T CD8 positivos, lo cual también se ha evidenciado en formas agresivas de periodontitis (41).

Además, la infección por HCMV aumenta la secreción de $IL-1\beta$, $IL-6$, $TNF\ \alpha$, monocitos y macrófagos, alimentando de esta manera la respuesta inflamatoria. El daño tisular directo, el aumento de secreción de citoquinas catabólicas como la $IL-1$ la $IL-6$ y el $TNF\ \alpha$ o la activación policlonal de las células B que favorece una respuesta humoral aumentada e inespecífica, pueden en parte justificar la relación entre infecciones por herpesvirus y las formas agresivas de periodontitis (42-44).

En la actualidad, el estudio de la variación genética entre los individuos, poblaciones y especies para explicar patrones y procesos ecológicos-evolutivos se aborda mediante marcadores moleculares, segmentos de ADN con o sin función conocida que proporcionan información sobre la variación alélica y permiten distinguir individuos (46,47).

Con todo esto existen ciencias que facilitan lo antes mencionado. La biología molecular es una de ellas y consiste en una ciencia que permite comprender los mecanismos responsables de la transmisión y expresión genética que determinan la estructura y función celular, además de entender todos aquellos aspectos fisiopatológicos de las enfermedades de la cavidad bucal.

A través de la biología molecular se pueden utilizar técnicas de extracción del material genético tanto el ADN como el ARN, estas son de gran utilidad para la obtención de resultados concretos en los diversos estudios que se realizan hoy en día. En la odontología, la periodoncia es un área con un auge muy importante en las técnicas mencionadas, esto por los continuos progresos que han existido en el campo microbiológico y métodos de diagnóstico para la enfermedad periodontal. Esto permite un mejor entendimiento sobre la compleja ecología presentada a nivel subgingival y las interacciones entre las bacterias y el huésped. Todo esto se convierte en una valiosa herramienta nuevamente para el diagnóstico y tratamiento correcto de la enfermedad periodontal.

Estas son técnicas que tiene como principio fundamental a la replicación del material genético llámese ADN o ARN por lo que es de suma importancia tener presente los conceptos de los procesos de replicación.

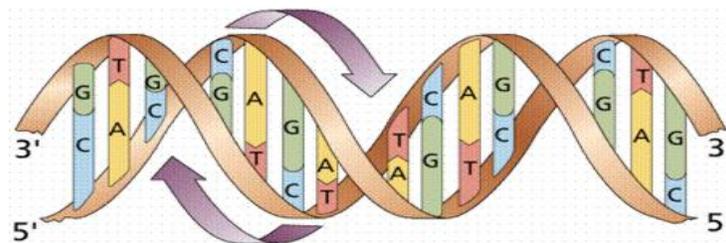


Figura 1. Molécula de ADN

Fuente: Biología molecular, Universidad Católica de Louvain, Facultad de Medicina.

Como se puede observar en la figura 1, la estructura básica de la molécula de ADN consta de dos hebras las cuales se encuentran unidas por puentes de hidrógeno entre las bases complementarias o ácidos desoxirribonucleicos las cuales son Adenina (A), Guanina (G), Citosina (C), Timina (T), siendo esta última la principal diferencia con el ARN ya que esta presenta un Uracilo (U) en vez de la timina. Estas bases son complementarias y se rigen bajo el principio de Watson y Crick el cual establece que una Adenina se une con una Timina y que una Citocina se una con una Guanina (48).

Otro aspecto que se debe de tener presente es que cada hebra presenta un extremo 5 prima (5') y un 3 prima (3') lo cual marca la direccionalidad de la hebra y ambas corren direcciones opuestas.

La replicación del ADN es el mecanismo que permite al ADN duplicarse es decir que crear una copia idéntica; con este proceso se puede obtener dos o más “clones” de la primera molécula (48). Meselson y Stahl en 1958 comprobaron que este proceso es un modelo semiconservativo ya que en cada una de las moléculas hijas se conserva una de las cadenas originales (48)

Arthur Kornberg quien es el padre de la replicación del ADN presenta este proceso de la siguiente manera:

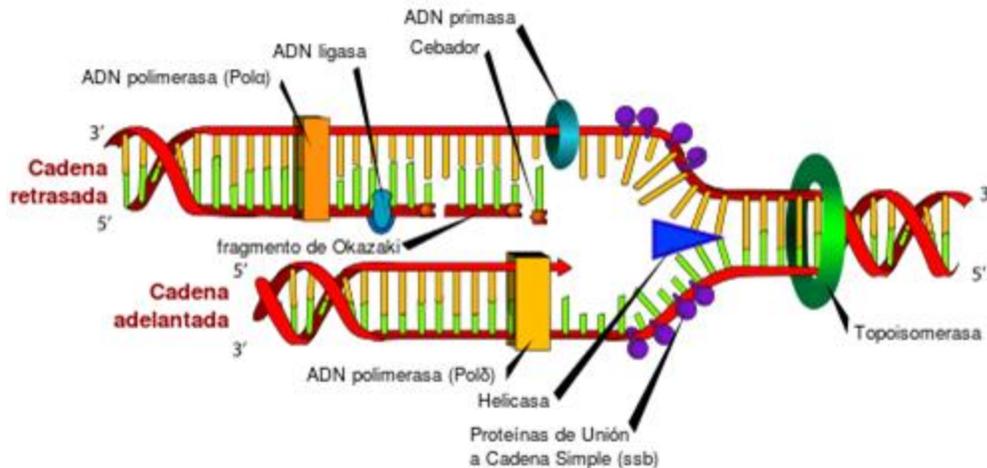


Figura 2. Proceso General de la replicación del ADN.

Fuente: *Epstein–Barr virus is associated with periodontal diseases: A meta-analysis based on 21 case–control studies. Medicine. 2017*

Hay varias moléculas que actúan en el proceso. Se inicia con la helicasa, la cual rompe los puentes de hidrógeno de la doble hélice permitiendo que se cree la horquilla de replicación; cada cadena de la horquilla será una hebra molde de la cual vamos a obtener una cadena complementaria y posteriormente obtendremos dos ADN idénticos a partir de uno.

Una enzima llamada primasa es la que inicia el proceso. Esta crea un pequeño segmento de ARN que se conocen como primer, la cual marca el inicio de la replicación. Posteriormente una enzima la ADN Polimerasa III se une al primer y empieza a agregar ácidos desoxirribonucleicos, no obstante, solo lo puede hacer en

sentido 5 prima (5') a 3 prima (3'), lo cual es una ventaja para esta hebra y solo necesita un primer (45).

En la hebra discontinua o en aquella en que corre en sentido opuesto, esta ADN polimerasa no puede agregar ácidos ya que su dirección es 3' a 5', por lo que en esta hebra la ARN polimerasa sintetiza varios primers y la ADN polimerasa sintetiza fragmentos de ADN entre cada primer, los cuales se conocen como fragmentos de Okazaki y van en dirección 5' a 3' (45).

Posteriormente, una enzima conocida como la exonucleasa elimina esos segmentos de ARN o primers para que la ADN polimerasa I los rellene con ácidos desoxirribonucleicos correspondientes. Por último, la ADN ligasa se encarga de unir todos los fragmentos de ADN mediante la condensación entre el grupo fosfato y el grupo hidroxilo, creando así dos cadenas de ADN idénticas. La topoisomerasa es una molécula de suma importancia en este proceso ya que es aquella que impide que el ADN se enrolle mediante el alivio del enrollamiento (45).

Con lo explicado, se podrá entender de una mejor manera el proceso y técnicas que se siguen en el presente estudio, con lo cual se podrán analizar de un modo detallado y claro, los resultados que se obtengan. El uso de este tipo de métodos diagnósticos se emplea porque si bien es conocido que las bacterias son esenciales para el desarrollo de la enfermedad periodontal, solo un pequeño número está relacionado con la etiología y progresión de la enfermedad (49).

Actualmente existe un problema y es que no existe una relación directa causa-efecto entre las bacterias específicas y la enfermedad periodontal. Si bien las bacterias son importantes, estas son insuficientes. El hecho de analizarlas no indica necesariamente que se esté analizando la enfermedad, ya que algunas están presentes sin que por ellas exista una pérdida de inserción o pérdida ósea (49).

Ligado a esto, existe una relación entre los virus encontrados en distintos estudios a nivel de la enfermedad periodontal tales como Citomegalovirus (CMV), Epstein-Bar (EBV) y la familia de los Herpes Viridae y las bacterias propias de la enfermedad periodontal. Esta relación puede verse reflejada en una deficiencia inmunológica continúa siendo esta una de las principales posibilidades de la persistencia de la enfermedad (42,44).

Actualmente, los métodos de diagnóstico para la detección de patógenos periodontales, buscan establecer esa relación ya mencionada para dar un correcto diagnóstico y con ello una alternativa o complemento al tratamiento convencional (50,51).

Estos métodos diagnósticos tienen diversos orígenes:

1. Pruebas microbiológicas utilizadas para demostrar la correlación entre las bacterias y las modificaciones de los parámetros clínicos, fundamentalmente el nivel

de inserción. En este grupo incluye los métodos de cultivo y los métodos inmunológicos (52).

2. Métodos desarrollados para la detección de bacterias en medicina y modificados para la identificación de patógenos periodontales; en este grupo se incluyen las sondas de ADN y PCR (50,51).

En la actualidad existen diversos métodos de diagnóstico celular, entre ellos encontramos la PCR, PCR cuantitativo o en tiempo real, electroforesis y la identificación bacteriana mediante la secuencia de ARNr 16s.

Identificación bacteriana mediante la secuencia de ARNr 16s

Los ácidos nucleicos y las proteínas, macromoléculas comunes a todos los seres vivos, cambian con el tiempo. Por ello, pueden considerarse como cronómetros moleculares o documentos de la historia evolutiva (53). Además, se debe recordar que los ribosomas son orgánulos complejos, altamente especializados que utilizan los organismos para el complicado proceso de síntesis de proteínas (53).

El ARNr 16s es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nucleótidos codificado por el gen rrs, también denominado ADNr 16s, a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica (53,54).

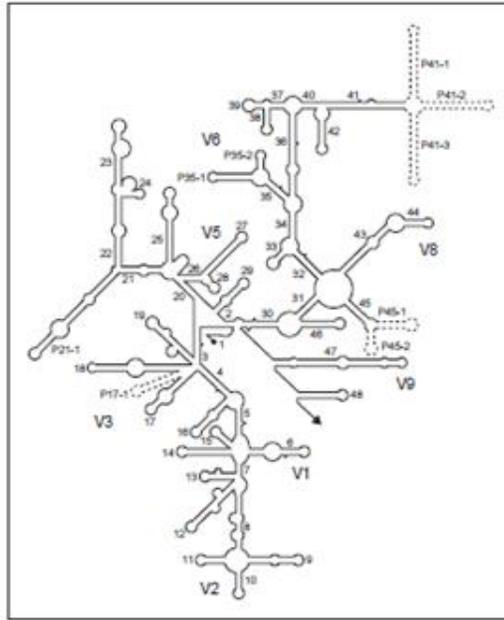


Figura 3. Estructura secundaria del ARNr 16s

Fuente: *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. 2004*

El ARNr 16s se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla. En eucariotas el ARNr 18S es la macromolécula equivalente. Sus secuencias se encuentran altamente conservadas, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen variaciones que se concentran en zonas específicas.

El análisis de la secuencia de los ARNr 16S de distintos grupos filogenéticos reveló la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma. Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en

todos los miembros de un determinado grupo filogenético y nunca (o sólo raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos (54).

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S incluye tres etapas:

- a) Amplificación por PCR del gen a partir de la muestra apropiada.
- b) Determinación de la secuencia de nucleótidos del producto de la PCR.
- c) Análisis de la secuencia.

La amplificación del ADNr 16S se consigue mediante un termociclador, gracias a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como sustrato se utiliza normalmente ADN purificado a partir de un cultivo puro del agente patógeno. Alternativamente, el ADN podrá obtenerse directamente de la muestra clínica (54).

Como se mencionó esta molécula es una herramienta para obtener información filogenética y taxonómica en organismos procariotas. En la actualidad, existen muchos cronómetros moleculares alternativos. Sin embargo, ninguno ha logrado reemplazar la ARNr 16s, ya que este presenta una serie de características, consideradas por Woese como el definitivo:

1. Se trata una molécula muy antigua, la cual se encuentra presente en todas las bacterias actuales, haciendo de esta una diana universal para su identificación.

2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado.
3. Esta molécula contiene suficiente variabilidad para diferenciar no solo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
4. El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S minimiza las fluctuaciones estadísticas.
5. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
6. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ADNr 16s existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento (54).

En los laboratorios clínicos la identificación basada en la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16s se usa principalmente en cepas cuya identificación por métodos fenotípicos resulta imposible, o requiere mucho tiempo, incluyendo los siguientes casos:

1. Bacterias no cultivables presentes en muestras clínicas.
2. Bacterias cuyas características bioquímicas no se adaptan las de ningún género o especie reconocido.
3. Bacterias para las cuales la caracterización fenotípica sea sustancialmente deficiente.
4. Bacterias fastidiosas, por requerimientos nutricionales.
5. Bacterias de crecimiento lento.

Con esto, se puede observar que la secuenciación del ARNr 16s constituye un método rápido y eficaz de identificación bacteriana, del cual puede beneficiarse la microbiología clínica, al igual que otras ramas de la microbiología o bien otras áreas de investigación (54).

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Esta técnica se basa en sintetizar grandes cantidades de ADN in vitro de manera similar como la célula lo realiza in vivo. Una reacción típica de este proceso incluye como reactivos: la molécula de ADN de doble cadena, dos oligonucleótidos iniciadores o primers, una mezcla de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP), buffer de reacción y magnesio (50,51).

Esta técnica consta de las siguientes etapas:

- a. Desnaturalización o separación de la cadena de doble hélice, del ácido nucleico por calentamiento a 90-95 °C.
- b. Annealing o hibridación: Se enfría la mezcla disminuyendo la temperatura a 40-60 °C, y las cadenas sencillas se hibridan con los cebadores.
- c. Extensión: Se eleva nuevamente la temperatura a 70-75°C y la polimerasa se comienza a extender a partir de los cebadores, usando como molde la cadena sencilla de ADN original, obteniéndose al final una cadena complementaria inicial (50,51).

La PCR ha demostrado ser superior al cultivo en términos de sensibilidad, especificidad y eficiencia, lo cual es de gran interés para la detección de

microorganismos específicos en aquellos estudios a gran escala (46,47). Entre los inconvenientes que presenta esta técnica se encuentra su capacidad para identificar serotipos (46,47).

Además, existen factores que pueden alterar la eficacia y especificidad de la PCR entre ellos la concentración de polimerasa y magnesio; concentración y pureza de ADN y primer, la temperatura de las etapas, así como el número de ciclos empleados (50,51).

PCR cuantitativo o en tiempo real

Esta es una variante de la PCR convencional que se emplea para cuantificación de ácidos nucleicos, tanto de ADN como de ARN mensajero en una muestra; con ella se puede monitorear el progreso de la PCR mientras este sucede (50,51).

Permite cuantificar las proporciones de *P. gingivales*, *P. intermedia* y *A. actinomycetemcomitans* y debido a su gran rapidez y sensibilidad son de gran utilidad en los estudios epidemiológicos (50,51).

Esta técnica lleva los mismos reactivos que la PCR convencional, más una sonda marcada con fluorocromo, que es un termo indicador equipados con sensores para detectar la fluorescencia emitida tras excitar el fluorocromo. Esa emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN que se va generando (46,47).

Una de las desventajas que presenta esta técnica es su elevado costo. No obstante, se acopla más al lado tecnológico ya que hace uso del programa qPCR programa informático que va registrando el crecimiento de la fluorescencia, que como se mencionó , es directamente proporcional al incremento de ácido nucleico en cada ciclo, y esta información se ve reflejada gráficamente en curvas de cinética de la reacción o de amplificación, por lo que sus resultados son más precisos (50,51).

PCR aleatoria

Esta técnica es similar a la PCR, pero utiliza cebadores (o primers) aleatorios. La amplificación aleatoria del ADN se utiliza para desarrollar marcadores genéticos en distintas especies y discriminar entre variedades y aislamientos de microorganismos patógenos. Constituye una herramienta epidemiológica para la investigación de fuentes de infección o vías de transmisión (50,51).

Electroforesis

La electroforesis es un método para separar moléculas biológicas dependiendo de su tamaño, forma y punto isoeléctrico bajo la influencia de un campo eléctrico. Esta técnica se basa en la capacidad de los solutos iónicos y macromoléculas cargadas de desplazarse en un campo eléctrico con velocidad (50,51, 55).

La velocidad de migración de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga efectiva y el gradiente de potencial eléctrico es inversamente proporcional al coeficiente de fricción, además depende de la densidad de carga de la

molécula (relación carga / peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis. El voltaje no se puede incrementar mucho porque se genera un exceso de calor, pero si se aplica bajo voltaje puede ocurrir una pobre separación (55).

La carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con pequeñas moléculas de iones u otras macromoléculas. Por lo que se puede inferir que el pH influye sobre la velocidad de migración de las moléculas, otro factor que puede influir es el punto isoeléctrico de la biomolécula (55).

La mayoría de las biomacromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos) poseen determinada carga eléctrica con grupos aniónicos y catiónicos capaces de disociarse. Cuando la separación es de proteínas, ADN o ácidos nucleicos pequeños (ADN, ARN o ribonucleótidos), el gel puede estar compuesto por tris-acetato-EDTA (TAE) y tris- borato-EDTA (TBE); además, tiene un iniciador de la polimerización, para producir redes de poliacrilamida de diferentes tamaños (55,56).

Las moléculas de ADN de las células son excesivamente grandes para avanzar a través de un gel de electroforesis normal, pero pueden analizarse si previamente se han fragmentado de forma controlada. Se suelen emplear geles de agarosa (concentración entre 0,3% y 2%), más porosos que los de poliacrilamida (56).

La preparación del gel de agarosa se realiza calentando la agarosa en una solución amortiguadora en un microondas o en una llama de bunsen en intervalos de 30s para mezclarlo bien, después se le agrega bromuro de etidio (EtBr) a una concentración de 0.5 μg / ml. Se deja enfriar, ya sea en la mesa de trabajo o por incubación en un baño de agua a 65 ° C. De lo contrario, la bandeja de gel se deforma (56).

Se coloca en una bandeja el gel en el aparato de fundición, alternativamente, también se pueden pegar los bordes abiertos de una bandeja de gel para crear un molde. Después se coloca un peine apropiado en el molde de gel para crear los pozos, en estos pozos se vierte la agarosa fundida en el molde de gel. Se deja que la agarosa se asiente a temperatura ambiente luego se retira el peine y se coloca el gel en la caja de gel (56).

Para la configuración del aparato de gel y separación de fragmentos de ADN, se agrega colorante de carga a las muestras de ADN que se van a separar, este colorante de carga de gel se fabrica típicamente a una concentración 6X (0,25% de azul de bromfenol, 0.25% de xileno cianol, 30% de glicerol). La carga del tinte ayuda a rastrear hasta dónde ha viajado su muestra de ADN y también permite que la muestra se hunda en el gel. Luego se programa la fuente de alimentación a la tensión deseada (1-5 V / cm entre electrodos), se agrega suficiente tampón para cubrir la superficie del gel.

Es importante usar el mismo búfer de funcionamiento usado para preparar el gel. Se conectan los cables de la caja de gel a la fuente de alimentación, se enciende la

fuente de alimentación y se verifica que tanto la caja de gel como la fuente de alimentación estén funcionando. Se retira la tapa, lenta y cuidadosamente se carga las muestras de ADN en el gel. Siempre se debe cargar un marcador de tamaño de ADN apropiado junto con muestras experimentales. Se vuelve a colocar la tapa de la caja de gel. El cátodo (cables negros) debe estar más cerca de los pozos que los ánodos (cables rojos). Por último, se enciende la alimentación y se ejecuta el gel hasta que el tinte haya migrado a una distancia apropiada (56).

Cuando ya se completó la electroforesis, se apaga la fuente de alimentación y se retira la tapa de la caja de gel y también el gel. Luego, se deja escurrir el exceso de tampón de la superficie del gel, y se coloca la bandeja de gel en toallas de papel para absorber cualquier extra de búfer en ejecución. Cuando ya se retira el gel de la bandeja de gel, expóngalo a la luz ultravioleta. Esto se hace comúnmente usando un sistema de documentación de gel. Las bandas de ADN deben aparecer como bandas fluorescentes de color naranja (56).

Tinción de proteínas y de ácidos nucleicos

Para los ácidos nucleicos se usa el azul de metileno o, más frecuentemente, compuestos fluorescentes e intercalantes, como el bromuro de etidio. Un compuesto intercalante es aquél que se introduce entre los pares de bases apilados del ADN.

Tras la electroforesis, el gel se sumerge en un recipiente con una disolución del colorante y se espera a que se impregne y así el colorante se una a las moléculas

separadas en el gel. Tras lavar el gel para eliminar el exceso de tinción no unida específicamente, se observa, fotografía o cuantifica mediante densitometría (50,51).

Visualización de los fragmentos de ADN

Una vez que los fragmentos se han separado, se puede examinar el gel y saber el tamaño de las bandas que se encuentran en él. Cuando un gel se tiñe con un pigmento que se une al ADN y se coloca bajo luz UV, los fragmentos de ADN brillarán, lo cual nos permite ver el ADN presente en distintos lugares a lo largo del gel (50,51).

Capítulo III

Metodología

Materiales y métodos

El presente estudio es de tipo descriptivo, acoplándose a una de las principales características de las investigaciones descriptivas; la cual radica en que el problema científico ha alcanzado cierto nivel de claridad pero aún se requiere de cierta información para llegar a establecer caminos que conduzcan a la clarificación de las relaciones causales. Otra variable que nos enmarca el estudio en esta categoría descriptiva es que muchas veces el problema es de naturaleza práctica, y sus soluciones se dan a través del conocimiento de las causas acomodándose esto al principal planteamiento de la investigación. Además, la mayoría de investigaciones clínicas describen la frecuencia de presentación de enfermedades, diferentes cuadros clínicos y todas aquellas características clínicas acomodando esto aún más la investigación en esta área (55).

Se investigaron las muestras obtenidas de 10 pacientes adultos, los cuales fueron diagnosticados con enfermedad periodontal en la Clínica de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica.

Criterios de inclusión:

1. Edad entre 18 a 65 años.
2. En la medida de lo posible, no presentar ninguna enfermedad metabólica (hipertensión arterial, diabetes).
3. No presentar ninguna enfermedad autoinmune (lupus, artritis).

4. No haber recibido ningún tipo de trasplante.
5. No haber recibido quimioterapia o radioterapia, si ya ha pasado un año de la última aplicación si es aceptado.
6. No haber recibido ningún tipo de tratamiento periodontal en el pasado.

Criterios de exclusión:

1. Presentar un cuadro viral activo
2. Haber consumido antibióticos una semana antes de obtener la muestra.
3. Haberse enjuagado o cepillado los dientes 30 minutos antes de tomar las muestras.

A todos los pacientes se les leyó el respectivo consentimiento informado (aprobado por el Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica) y este fue firmado por cada uno de los participantes de forma voluntaria.

Al momento de recolectar las muestras se llevó a cabo de la siguiente manera:

Muestra fluido crevicular:

1. Se estudia el expediente y se identificaron cuáles eran las piezas con bolsas periodontales más profundas y en que sitios se ubican.
2. Estas piezas se aislaron con rodillos de algodón (no se soplaron)
3. Se eliminó el biofilme dental presente con una torunda de algodón pasándola suavemente sobre la superficie cervical del diente

4. Se utilizaron puntas de papel para endodoncia esterilizadas N30, éstas se introdujeron dentro de las bolsas periodontales por 30 segundos o hasta el momento en que se notara la punta de papel llena de líquido
5. En general, se utilizaron 6 puntas de papel por paciente, las cuales se introdujeron en un tubo cónico pequeño de plástico.
6. Se rotuló el tubo.

Seguidamente se pasó a obtener la muestra de saliva:

1. A cada paciente se le entregó un tubo cónico de polipropileno (plástico no tóxico, de alta resistencia), con 20 ml de Listerine® (enjuague bucal) diluido 1:2 con agua desionizada, estéril.
2. Se le solicitó al paciente realizar un enjuague vigoroso, movilizándolo a través de toda la boca y entre los dientes, sin realizar gárgaras por al menos 30 segundos.
3. Se le pidió depositar el enjuague nuevamente, en el tubo.
4. Se rotuló el tubo (debe coincidir con el número del tubo con las puntas de papel) y este fue guardado a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica. El proceso mediante el cual se realizó este trabajo fue mediante un estudio metagenómico de secuenciación de próxima generación, NGS, por sus siglas en inglés. Se realiza comúnmente mediante el análisis del gen que codifica para el ARN de la subunidad

pequeña, 30S, del ribosoma bacteriano, denominado 16S procariótico. Este protocolo describe el método para preparar la muestra y secuenciar las regiones variables V3 y V4, del gen 16S del ARNr. El sistema es capaz de secuenciar 96 librerías (comunidades bacterianas completas de 96 muestras diferentes).

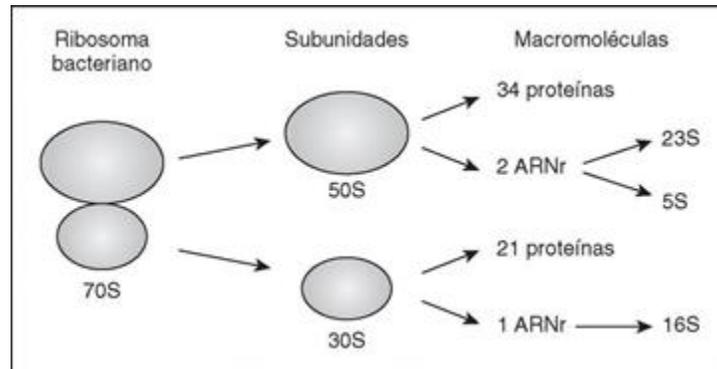


Figura 4. El ribosoma bacteriano

Fuente: *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. 2004.*

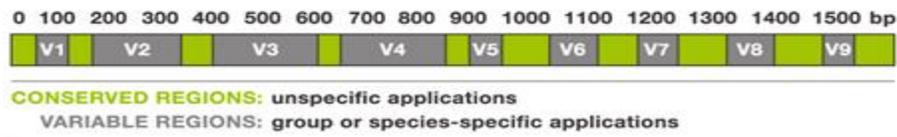


Figura 5. Regiones conservadas y variables

Fuente: *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. 2004.*

Diagrama del gen 16S, donde se muestran las regiones conservadas en verde y las variables en gris.

Extracción del ADN, a partir del enjuague bucal:

Cada muestra de enjuague se centrifugó a 1.800g, por 30 minutos, a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el botón que contiene células epiteliales y microorganismos orales, fue lavado dos veces con 25 ml de solución salina fosfatada (PBS). Después de los dos lavados, el botón fue resuspendido en 1 ml de buffer de lisis, al que se le agregó 25 ul de Proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó toda la noche en baño de agua a 56° C.

Al día siguiente, se agregó a cada tubo 1 ml de NaCl 3M e inmediatamente después se agregó 2 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (25:1). Los tubos se agitaron en vortex, por al menos 3 minutos. Se volvieron a centrifugar a 1.800 g a 4° C por 15 minutos.

Después de la centrifugación, se forman dos fases: una acuosa en la parte superior y otra orgánica en la parte inferior, que contiene el cloroformo-alcohol isoamílico. Estas fases están separadas por una capa intermedia que contiene todos los detritos celulares y restos de proteínas digeridas por la proteinasa K.

La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo de 50 ml, con cuidado de no arrastrar restos de la interfase. A este nuevo tubo se agregaron 2,5 volúmenes de etanol absoluto. El tubo fue invertido suavemente varias veces hasta obtener el precipitado de ADN. Este se removió del tubo usando una punta de pipeta de boca ancha y se colocó en un microtubo que contenía 1ml de etanol 70° y se incubó toda la

noche a temperatura ambiente, con el fin de permitir la disolución de la sal usada para la precipitación del ADN.

Al siguiente día, se centrifugaron los tubos en una microcentrífuga durante 10 minutos a 10.000g. Se decantó el etanol y los botones de ADN se dejaron secar con la tapa abierta en incubadora a 37°C, para eliminar el alcohol. El ADN total se resuspendió en 200ul de tampón TE pH 7.4 y se volvió a incubar toda la noche a 37°C. Por último, se agitó en vortex, se cuantificó y se almacenó en el refrigerador hasta su uso.

Extracción del ADN, a partir de líquido crevicular absorbido en puntas N30:

Las puntas de cada paciente fueron cortadas hasta la zona en la que se notaba que había absorbido líquido crevicular. Estas porciones fueron depositadas en un microtubo de 1,5ml. A cada muestra se le agregó 50 ul de resina Chelex-100 y se incubaron a 56 °C por 30 minutos. Posteriormente, se hirvieron en baño de agua por 10 minutos. Se guardaron en el refrigerador, hasta su uso.

Determinación de la comunidad bacteriana de las muestras

Primera amplificación: Los *primers* o iniciadores, usados en este protocolo son oligonucleótidos específicos para amplificar la región V3 - V4 del gen 16S ribosomal bacteriano (56).

Adaptadores de Illumina, fueron adicionados de manera que sobresale la secuencia gen-específica. La secuencia completa, usando la nomenclatura de la IUPAC es la siguiente:

16S Amplicon PCR Forward Primer = 5'-3'

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

16S Amplicon PCR Reverse Primer = 5'-3'

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

Letras de primers degenerados, se usan así con el fin de que puedan reconocer todas las variantes del 16S que puedan presentar las diferentes bacterias.

Tabla 2. Primers degenerados

IUPAC nucleotide code	Base
W	A or T
H	A or C or T
V	A or C or G
N	any base

Fuente: Elaboración propia, 2018.

Se utilizó una mezcla maestra de la enzima **Platinum SuperFi** ADN Polimerasa, Invitrogen, (enzima de alta procesividad que produce una copia del ADN, 100 veces más fiel que una polimerasa regular. Posee capacidad de corrección, es decir, actividad exonucleasa 3' a 5'. Adicionalmente, incluye un reactivo potenciador, para mejorar la amplificación de regiones de difícil desnaturalización, G-C ricas) y agua en los tubos de PCR. Este proceso dura alrededor de una hora, dependiendo del termociclador que se use.

Tabla 3. Reacción de amplificación

	Volúmen
Microbial DNA (5 ng/μl)	2.5 μl
Amplicon PCR Forward Primer 1 μM	5 μl
Amplicon PCR Reverse Primer 1 μM	5 μl
2x Platinum SuperFi Master Mix	12.5 μl
Total	25 μl

Fuente: Elaboración propia, 2018.

Programa de amplificación

95°C por 3 minutos

25 ciclos de:

95°C por 30 segundos

55°C por 30 segundos

72°C por 30 segundos

72°C por 5 minutos

Infinito a 4°C

Análisis de los fragmentos 16S amplificados

Mediante un QIAxcel Advanced Instrument, se analizó 1 ul del producto, con el fin de verificar el tamaño del amplicón. Cuando los primers para amplificar los fragmentos V3 y V4, el tamaño del producto del PCR debe ser de ~550 bp.

Limpieza de los productos de la primera PCR

- Se eliminaron todos los reactivos no consumidos, primers y dímeros de primers, dejando únicamente el ADN que ha sido amplificado. En este proceso se usan unas partículas magnéticas muy pequeñas, conocidas como *AMPure XP beads* que van a funcionar adhiriendo el ADN que está cargado negativamente, a ellas.
- Se mezclaron en vortex 30 segundos para que queden uniformemente dispersas. Se agregaron 20 uL de perlas a cada tubo y se agitaron a 1.800 rpm por 2 minutos, en un Eppendorf™ MixMate™.
- Se incubaron a temperatura ambiente 5 minutos.
- Luego, los tubos se colocaron en un magneto y las perlas cargadas con el ADN se adherieron a la parte lateral y al fondo del tubo, lo que permite remover todos los reactivos empleando una pipeta multicanal.
- Posteriormente, las perlas se lavaron con 200 uL de etanol al 80%, recién preparado.
- Se incubaron en el magneto 30 minutos a temperatura ambiente.
- El lavado con etanol al 80% se repitió otra vez, asegurándose de remover todo el alcohol.
- Se dejó secar a temperatura ambiente 10 minutos, en el magneto.

- Se removió la placa del magneto y se agregaron 52,5 uL de buffer de elución, para separar el ADN de las perlas, se agitó a 1.800 rpm por 2 minutos, Eppendorf™ MixMate™, se incubaron a temperatura ambiente 2 minutos. Se colocaron de nuevo en el magneto por 2 minutos.

Usando una pipeta multicanal, se retiró cuidadosamente, 50 uL de la elución y se colocó en una placa nueva de 96 pozos.

Colocación de índices

Se agregaron 5 uL del ADN fluido en el paso anterior, en tubos nuevos o en una placa nueva de 96 pozos. Los 45 uL restantes se pueden guardar para otros usos. Los índices son dos secuencias cortas de oligonucleótidos diferentes para identificar cada muestra. Uno de los dos índices se puede repetir, pero el otro no (ver tabla 4).

Con esto se puede conocer individualmente todas las bacterias contenidas en una muestra. Los tubos blancos son 8 y se colocaron verticalmente alineados en filas de la **A** a la **H** y los anaranjados son 12 y se colocaron horizontalmente, alineados en columnas de la **1** a la **12**, según se ve en la figura 6.

Tabla 4. Indices y secuencias

Index 1 (i7)	Sequence	Index 2 (i5)	Sequence
N701	TAAGGCGA	S501	TAGATCGC
N702	CGTACTAG	S502	CTCTCTAT
N703	AGGCAGAA	S503	TATCCTCT
N704	TCCTGAGC	S504	AGAGTAGA
N705	GGA CTCCT	S505	GTAAGGAG
N706	TAGGCATG	S506	ACTGCATA
N707	CTCTCTAC	S507	AAGGAGTA
N708	CAGAGAGG	S508	CTAAGCCT
N709	GCTACGCT		
N710	CGAGGCTG		
N711	AAGAGGCA		
N712	GTAGAGGA		

Fuente: Elaboración propia, 2018.

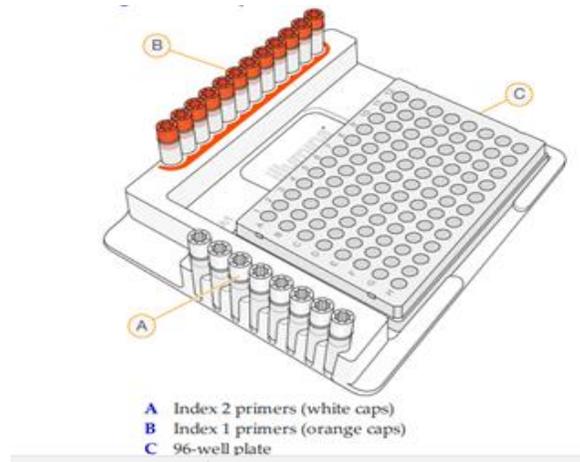


Figura 6. Sistema dual de índices

Fuente: 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation

Los índices se agregaron mediante otra reacción de PCR, siguiendo las indicaciones que se explican a continuación:

Tabla 5. Indicación sobre agregado de índices

	Volúmen
DNA	5 µl
Nextera XT Index Primer 1 (N7xx)	5 µl
Nextera XT Index Primer 2 (S5xx)	5 µl
2x Platinum SuperFi Master Mix	25 µl
Agua grado PCR	10 µl
Total	50 µl

Fuente: Elaboración propia, 2018.

La PCR se realizó mediante el siguiente programa de amplificación:

95°C por 3 minutos

8 ciclos de:

95°C por 30 segundos

55°C por 30 segundos

72°C por 30 segundos

72°C por 5 minutos

Infinito a 4°C

Limpieza de los productos de la segunda PCR

Se realizó de la misma manera que el primer lavado, usando el volumen total de la reacción, es decir 50 uL y se agregaron 40 uL de perlas AMPure. El resto del proceso fue igual al anterior.

Después se removió la placa del magneto y se agregaron 27,5 uL de buffer de elución (27.5 µl of 10 mM Tris pH 8.5) a cada pozo, para separar el ADN de las perlas. Se agitó a 1.800 rpm por 2 minutos, Eppendorf™ MixMate™, se incubó a temperatura ambiente 2 minutos. Se colocó nuevamente la placa en el magneto y usando una pipeta multicanal, se retiró cuidadosamente, 25 uL de la elución y se colocó en una placa nueva de 96 pozos.

Validación de la librería:

Se corrieron 2 µl de una dilución 1:5 de la librería final en el QIAxcel para verificar el tamaño de los productos de la PCR con los índices. Usando *primers* V3 y V4, el tamaño esperado es ~630 bp.

Fase Final: Cuantificación, normalización y mezcla de todas las muestras.

Illustra recomienda cuantificar las librerías mediante métodos fluorométricos que usan agentes intercalantes en la doble hebra del ADN amplificado.

La concentración del ADN se calculó en nanomolar (nM), con base en el tamaño de los amplicones, mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{(concentración en ng/ul)}}{\text{(660g/mol x tamaño medio de la biblioteca)}} \times 10^6 = \text{concentración en nM}$$

Por ejemplo:

$$\frac{15 \text{ ng/ul}}{\text{(660g/mol x 500)}} \times 10^6 = 45 \text{ nM}$$

Cada muestra se ajustó a una concentración de 10 nM. Todas las muestras se mezclaron usando 5 uL de cada una.

Después de realizar los cálculos anteriores a cada muestra, se les aplicó otra serie de procedimientos con el fin de lograr los resultados más exactos para el presente estudio, los pasos fueron los siguientes:

- Se procedió a realizar una dilución 1:2 de la mezcla total: 10uL de la mezcla + 10 uL de NaOH, 0.2 N. Esto implica que la mezcla quedó ahora a 5nM.
- Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir la desnaturalización del ADN.
- Se agregaron 20 uL de buffer EB (10 mM Tris pH 8.5), dejando la solución a 2,5 nM.
- En un tubo que contenía 997,6 uL de HT1 (Hibridization Buffer) se le agregaron 2,4 uL de la mezcla de muestras, lo que dejó la concentración a 6 pM.
- Se retiraron 250 uL a esta preparación y se agregaron 250 uL del PhiX (control interno para mitigar los cambios en las bibliotecas desbalanceadas y poco diversas) diluido a 6 pM.
- De la muestra final se cargaron 600ul en el cartucho de corrida que contiene todos los reactivos para la secuenciación de todos los ADN contenidos en cada muestra colectada.

Antes de iniciar la corrida se creó una hoja de trabajo para el equipo, la cual se adjunta a continuación:

Tabla 6. Hoja de trabajo para equipo

[Header]					
IEMFileVersion		4			
Date	7/16/2018				
Workflow	Metagenomics				
Application	Metagenomics 16S rRNA				
Assay	Nextera XT				
Description					
Chemistry	Amplicon				
[Reads]					
	301				
	301				
[Settings]					
Adapter	CTGTCTCTTATACACATCT				
[Data]					
Sample_ID	Sample_Name	I7_Index_ID	index	I5_Index_ID	index2
17	EP-01-Enjuague	N705	GGACTCCT	S503	TATCCTCT
19	EP-03-Enjuague	N706	TAGGCATG	S503	TATCCTCT
20	EP-04-Enjuague	N707	CTCTCTAC	S503	TATCCTCT
21	EP-05-Enjuague	N708	CAGAGAGG	S503	TATCCTCT
22	EP-06-Enjuague	N709	GCTACGCT	S503	TATCCTCT
23	EP-07-Enjuague	N710	CGAGGCTG	S503	TATCCTCT
24	EP-08-Enjuague	N711	AAGAGGCA	S503	TATCCTCT
25	EP-09-Enjuague	N712	GTAGAGGA	S503	TATCCTCT
26	EP-10-Enjuague	N701	TAAGGCGA	S504	AGAGTAGA
27	EP-11-Enjuague	N702	CGTACTAG	S504	AGAGTAGA
28	EP-01-Palito	N703	AGGCAGAA	S504	AGAGTAGA
30	EP-03-Palito	N704	TCCTGAGC	S504	AGAGTAGA
31	EP-04-Palito	N705	GGACTCCT	S504	AGAGTAGA
32	EP-05-Palito	N706	TAGGCATG	S504	AGAGTAGA
33	EP-06-Palito	N707	CTCTCTAC	S504	AGAGTAGA
34	EP-07-Palito	N708	CAGAGAGG	S504	AGAGTAGA
35	EP-08-Palito	N709	GCTACGCT	S504	AGAGTAGA
36	EP-09-Palito	N710	CGAGGCTG	S504	AGAGTAGA
37	EP-10-Palito	N711	AAGAGGCA	S504	AGAGTAGA
38	EP-11-Palito	N712	GTAGAGGA	S504	AGAGTAGA
101	Zymo-positivo	N706	TAGGCATG	S517	GCGTAAGA

Fuente: Sistema Illumina, 2018.

Nota :El sistema Illumina demoró alrededor de 60 horas en secuenciar una celda V3 de 600 ciclos.

Capítulo IV

Resultados

Del total de 10 pacientes evaluados, se presentan en la muestra 6 pacientes masculinos y 4 pacientes femeninas, entre los 24 y 65 años de edad, sin que se presentara diferencia estadísticamente significativa en la edad promedio por sexo ($p=0,0339$) En los cuales se presentan 5 pacientes con periodontitis crónica leve, y 5 con el diagnóstico de periodontitis crónica generalizada.

A partir de las pruebas tomadas tanto de saliva como de líquido crevicular, el Sistema Illumina analiza las bacterias más representativas en cantidad de cada una de las muestras; reportando las más predominantes según clase, orden, familia, género y especie.

Bacterias por género

El primer análisis, se realiza con el género de las bacterias, encontrando así, en las muestras entre 292 a 364 géneros diferentes reportados, con el conocimiento de la existencia de bacterias no reconocidas y debidamente registradas actualmente.

En este caso, para cada una de las muestras se reportan los ocho géneros más presentes, con un cuadro, como el ejemplo en la tabla 7, la cual corresponde al resultado de las bacterias según género del enjuague del paciente 1.

Tabla 7. Resultados clasificados por género de la muestra uno de enjuague del Sistema Illumina

Clasificación	Número de Lecturas	% Total de Lecturas
Streptococcus	20,934	26.08%
Veillonella	7,033	8.76%
Treponema	6,593	8.21%
Si clasificar a nivel de género	6,496	8.09%
Porphyromonas	3,119	3.89%
Selenomas	2,771	3.45%
Fusobacterium	2,451	3.05%
Neisseria	2,254	2.81%

Fuente: Sistema Illumina, 2018.

De esta forma, se conocen los géneros más representativos, tanto de las muestras de saliva como de fluido crevicular de cada paciente. A partir de estos datos reportados por el Sistema Illumina, se establece una escala, colocando con el 1 el género con más aparición en cada muestra, y con el número 8 el de menos aparición, como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Resultados de bacterias por género ordenados de manera ordinal

Bacterias por género	Muestra																					
Actinomyces						8									6							
Aggregatibacter														7								
Atopobium												5										
Bacteroides																		8				
Candidatus Tammella				7				5	6	8							7	6		6		
Campylobacter		5																		3		
Desulfobulbus																	8		8			
Filifactor				8																7		
Fusobacterium	7	6			7	1	5	6	4	5	5		7	8	5	3	7		6	8		
Gemella				1						7				6								
Haemophilus		8												3				6		8		
Halanaerobium												8										
Lautropia								4							5							
Leuconostoc						8																
Mannheimia		7												6				5		7		
Neisseria	8	4	3		6									5								
Peptostreptococcus			8																			
Porphyromonas	5		7		5		6	1	5	6	1	4	4		7	1				4		
Prevotella			4		3	5	1				3			4					2	4		
Selenomonas	6		1	4		7	8	8		2	8	1										
Serratia																				1		
Staphylococcus																				7		
Streptococcus	1	1	2	2	1	3	2	7	1	3	6	3	1	2	1			4		2	5	
Rothia							7						8		8					5		
Tannerella										7								5		4		
Treponema	3			5		6		3	2		7	6						4		3	2	
Unclassified at Genus level	4	3	5	3	4	2	3	2	3	1	2	2	3	4	3	2	3	2	3	2	3	1
Veillonella	2	2	6	6	2	4	4		8	4	4	7	2	1	2	6	1	5	1			

Fuente: Elaboración propia, 2018.

A partir de esto, se realiza un análisis colectivo de todas las muestras, y comparativo para determinar si ambos fluidos son significativos en la investigación de la enfermedad periodontal. Cuando se trate de dos distribuciones de variables nominales y ordinales se utilizará la prueba de homogeneidad de distribuciones basada en el estadístico de Kolmogorov – Smirnov; o bien con la prueba U de Mann Whitney cuando no se cumplan los supuestos para utilizar pruebas estadísticas paramétricas. El nivel mínimo de confianza para las comparaciones fue del 95%.

El análisis estadístico, se realiza registrando los géneros bacterianos según la presencia y el orden de importancia; generando la tabla 9.

Tabla 9. Presencia y orden de importancia según género de bacteria

Presencia y orden de importancia según género de bacteria.																		
Genero de	Orden de importancia																Total	
	1		2		3		4		5		6		7		8			
Bacteria	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
Unclassifiedat Genuslevel	2	10,0	6	30,0	8	40,0	3	15,0	1	5,0							2	100,0
Streptococcus	6	33,3	5	27,8	3	16,7	1	5,6	1	5,6	1	5,6	1	5,6			1	100,0
Veillonella	3	16,7	5	27,8			4	22,2	1	5,6	3	16,7	1	5,6	1	5,6	1	100,0
Fusobacterium	1	6,3			1	6,3	1	6,3	4	25,0	3	18,8	4	25,0	2	12,5	1	100,0
Porphyromonas	3	23,1					3	23,1	3	23,1	2	15,4	2	15,4			1	100,0
Treponema			2	20,0	3	30,0	1	10,0	1	10,0	2	20,0	1	10,0			1	100,0
Selenomonas	2	22,2	1	11,1			1	11,1			1	11,1	1	11,1	3	33,3	9	100,0
Prevotella	1	12,5	1	12,5	2	25,0	3	37,5	1	12,5							8	100,0
CandidatusTammella									1	14,3	3	42,9	2	28,6	1	14,3	7	100,0
Neisseria					1	20,0	1	20,0	1	20,0	1	20,0			1	20,0	5	100,0

															0		
Haemophilus				1	25,0				1	25,0			2	50,0	4	100,0	
Mannheimia								1	25,0	1	25,0	2	50,0		4	100,0	
Rothia								1	25,0			1	25,0	2	50,0	4	100,0
Gemella	1	33,3								1	33,3	1	33,3			3	100,0
Tannerella						1	33,3	1	33,3			1	33,3			3	100,0
Actinomyces										1	50,0			1	50,0	2	100,0
Campylobacter						1	50,0		1	50,0						2	100,0
Desulfobulbus														2	100,0	2	100,0
Filifactor												1	50,0	1	50,0	2	100,0
Lautropia						1	50,0	1	50,0							2	100,0
Aggregatibacter													1	100,0		1	100,0
Atopobium									1	100,0						1	100,0
Bacteroides														1	100,0	1	100,0

Halanaerobium												1	100,0	1	100,0
Leuconostoc												1	100,0	1	100,0
Peptostreptococcus												1	100,0	1	100,0
Serratia	1	100,0												1	100,0
Staphylococcus											1	100,0		1	100,0

Fuente: Elaboración por MsC Jackeline Castillo Rivas, 2018.

A partir del análisis, se origina la tabla 10, se observan las bacterias que tienen mayores manifestaciones, en forma ordinal de menor a mayor según la cantidad de manifestaciones encontradas en cada paciente. En este caso, las bacterias con más expresión son aquellas inespecíficas, el Streptococcus y la Veillonella.

Tabla 10. Importancia de género según número de pacientes por medio

Genero	Medio					
	Saliva		Fluido crevicular		Total	
	Promedio	N	Promedio	N	Promedio	N
Unclassified at Genus level	3	1 0	2	1 0	3	2 0

Streptococcus	2	1 0	3	8	3	1 8
Veillonella	3	1 0	4	8	4	1 8
Fusobacterium	6	9	5	7	6	1 6
Porphyromonas	5	8	3	5	4	1 3
Treponema	4	3	4	7	4	1 0
Selenomonas	6	4	4	5	5	9
Prevotella	3	7	5	1	3	8
Candidatus Tammella	6	1	7	6	6	7
Neisseria	6	4	4	1	5	5
Haemophilus	7	2	6	2	6	4
Mannheimia	6	2	7	2	6	4
Rothia	7	4			7	4
Gemella	7	2	1	1	5	3
Tannerella			5	3	5	3
Actinomyces	7	2			7	2
Campylobacter			4	2	4	2

Desulfobulbus			8	2	8	2
Filifactor			8	2	8	2
Lautropia			5	2	5	2
Aggregatibacter			7	1	7	1
Atopobium			5	1	5	1
Bacteroides	8	1			8	1
Halanaerobium			8	1	8	1
Leuconostoc			8	1	8	1
Peptostreptococcus	8	1			8	1
Serratia			1	1	1	1
Staphylococcus			7	1	7	1

Fuente: Elaboración por MSc Jackeline Castillo Rivas, 2018.

De acuerdo con la U Mann-Whitney, para probar asociación entre la prevalencia de manifestación de la bacteria por género, entre la saliva y el fluido crevicular no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p>0,05$), como se observa en la tabla 11. Se reportan las pruebas en las que se pudo calcular la prueba, ya que se presentaban manifestaciones en las dos muestras.

Tabla 11. Prueba asociación: género y medio

Prueba asociación: género y medio			
	Mann-Whitney U	Z	Sig.
Candidatus Tammella	2	(0,52)	0,600
Fusobacterium	29,5	(0,22)	0,829
Gemella	0	(1,22)	0,221
Haemophilus	1,5	(0,41)	0,683
Mannheimia	1,5	(0,41)	0,683
Neisseria	1	(0,71)	0,480
Porphyromonas	9,5	(1,57)	0,117
Prevotella	0	(1,58)	0,115
Selenomonas	7,5	(0,63)	0,532
Streptococcus	21,5	(1,70)	0,090
Treponema	9,5	(0,23)	0,816
Unclassified at Genus level	18,5	(2,50)	0,012
Veillonella	27	(1,18)	0,239

Fuente: Elaboración por MSc Jackeline Castillo Rivas, 2018.

Especies de bacterias

El segundo análisis se realizó con las especies de bacterias, en las muestras de enjuague se llegó a localizar hasta un total de 523 bacterias categorizadas por especie, en los análisis del fluido crevicular se localizó un máximo de 541 especies.

Para cada una de las muestras se reportaron las ocho especies más presentes (mismo análisis que géneros de bacterias), con un cuadro, como el ejemplo en el tabla 12, el cual corresponde al resultado de las bacterias según especie de la muestra de saliva del paciente #1.

Tabla 12. Resultado de bacterias según especie de la muestra de saliva del paciente uno.

Clasificación	Número de Lectura	% Total Lectura
Sin Clasificar a nivel de especie	26,042	33.52%
<i>Campylobacter gracilis</i>	5,180	6.67%
<i>Neisseria mucosa</i>	4,304	5.54%
<i>Veillonella atypica</i>	3,108	4.00%
<i>Streptococcus sanguinis</i>	2,504	3.22%
<i>Streptococcus lactarius</i>	2,233	2.87%
<i>Veillonella denticariosi</i>	2,218	2.85%
<i>Neisseria lactamica</i>	2,193	2.82%

Fuente: Sistema Illumina, 2018.

A partir de estos datos, se estableció una tabla (tabla 13) en la cual se muestra la presencia y orden de las ocho especies más presentes en todas las muestras tanto de líquido crevicular como de saliva.

Tabla 13. Presencia y orden de importancia según especie de bacteria

Presencia y orden de importancia según especie de bacteria.																			
Especie por	Orden de importancia																Total		
	1		2		3		4		5		6		7		8				
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	
Unclassified at Species level	19	95,0	1	5,0														20	100,0
<i>Veillonella atypica</i>			5	41,7	1	8,3	4	33,3			1	8,3	1	8,3				12	100,0
<i>Streptococcus tigurinus</i>			3	27,3	1	9,1	1	9,1	3	27,3			1	9,1	2	18,2		11	100,0
<i>Fusobacterium naviforme</i>			1	11,1	2	22,2	2	22,2			2	22,2	1	11,1	1	11,1		9	100,0
<i>Selenomonas infelix</i>			3	33,3					2	22,2			3	33,3	1	11,1		9	100,0
<i>Tannerella forsythia</i>					2	25,0	2	25,0	1	12,5	1	12,5	2	25,0				8	100,0
Candidatus <i>Tammella caduceiae</i>					3	42,9	2	28,6	2	28,6								7	100,0

Treponema medium			1	14,3	2	28,6				2	28,6	2	28,6			7	100,0	
Porphyromonas endodontalis							1	16,7	1	16,7	3	50,0	1	16,7			6	100,0
Porphyromonas gingivalis	1	16,7	2	33,3	2	33,3						1	16,7			6	100,0	
Mannheimia caviae					2	40,0			2	40,0	1	20,0					5	100,0
Neisseria mucosa					2	40,0	1	20,0	1	20,0				1	20,0		5	100,0
Haemophilus parainfluenzae					1	25,0	1	25,0			1	25,0	1	25,0			4	100,0
Streptococcus vestibularis							1	25,0	1	25,0				2	50,0		4	100,0
Veillonella dispar			1	25,0					2	50,0				1	25,0		4	100,0
Filifactor alocis							2	66,7	1	33,3							3	100,0
Fusobacterium nucleatum					1	33,3					1	33,3	1	33,3			3	100,0
Veillonella montpellierensis											1	33,3	1	33,3	1	33,3	3	100,0
Campylobacter showae									1	50,0				1	50,0		2	100,0
Gemella cunicula			1	50,0										1	50,0		2	100,0

Porphyromonas catoniae											1	100							1	100	
												,0								,0	
Prevotella oris																			1	100	
																				,0	
Prevotella tannerae																			1	100	
																				,0	
Prevotella veroralis																			1	100	
																				,0	
Rothia mucilaginosa																			1	100	
																				,0	
Serratia entomophila				1	100															1	100
					,0																,0
Streptococcus anginosus																				1	100
																					,0
Streptococcus lactarius																				1	100
																					,0
Streptococcus milleri																			1	100	
																					,0
Streptococcus pseudopneumoniae																				1	100
																					,0
Streptococcus sanguinis																				1	100
																					,0
Veillonella denticariosi																				1	100
																					,0

Fuente: Elaboración por MsC Jackeline Castillo Rivas, 2018.

Se dieron como resultado 45 especies, las cuales fueron las que aparecieron en mayor cantidad. A partir de esto, se realizó un análisis colectivo de todas las muestras (tabla 14), en donde se obtuvo que de estas 45 especies de bacterias aparecieron en mayor cantidad tanto en las muestras de fluido crevicular como de saliva de las especies sin ninguna clasificación.

La especie que más se encontró fue la *Veillonella atypica* en las muestras de saliva, mientras que en el fluido crevicular se presentó una mayor diversidad de especies con una menor cantidad de manifestaciones.

Tabla 14. Importancia y número de pacientes según especie por medio

Importancia y número de pacientes según especie por medio.						
Especie	Medio				Total	
	Saliva		Fluido crevicular		Total	
	Promedio	N	Promedio	N	Promedio	N
Unclassified at Species level	1	10	1	10	1	20
<i>Veillonella atypica</i>	3	9	5	3	4	12
<i>Streptococcus tigurinus</i>	4	8	7	3	5	11
<i>Fusobacterium naviforme</i>	4	4	5	5	5	9
<i>Selenomonas infelix</i>	5	4	5	5	5	9

Tannerella forsythia	7	2	4	6	5	8
Candidatus Tammella caduceiae	5	1	4	6	4	7
Treponema medium	3	2	6	5	5	7
Porphyromonas endodontalis	5	4	7	2	6	6
Porphyromonas gingivalis	4	3	2	3	3	6
Mannheimia caviae	4	4	5	1	4	5
Neisseria mucosa	5	4	3	1	5	5
Haemophilus parainfluenzae	6	3	3	1	5	4
Streptococcus vestibularis	6	4			6	4
Veillonella dispar	6	3	2	1	5	4
Filifactor alocis			4	3	4	3
Fusobacterium nucleatum	7	1	5	2	5	3
Veillonella montpellierensis	7	3			7	3
Campylobacter showae			7	2	7	2
Gemella cunicula	8	1	2	1	5	2
Lautropia mirabilis			5	2	5	2
Prevotella melaninogenica	5	2			5	2
Selenomonas artemidis			7	2	7	2

Treponema denticola			7	2	7	2
Aggregatibacter aphrophilus			8	1	8	1
Atopobium parvulum			7	1	7	1
Campylobacter gracilis			2	1	2	1
Gemella sanguinis			7	1	7	1
Halanaerobium alcaliphilum			6	1	6	1
Neisseria lactamica			8	1	8	1
Parapedobacter koreensis			8	1	8	1
Pectinatus cerevisiiphilus			5	1	5	1
Peptostreptococcus stomatis	4	1			4	1
Porphyromonas catoniae	6	1			6	1
Prevotella oris	8	1			8	1
Prevotella tanneriae	6	1			6	1
Prevotella veroralis	7	1			7	1
Rothia mucilaginosa	8	1			8	1
Serratia entomophila			2	1	2	1
Streptococcus anginosus			8	1	8	1
Streptococcus lactarius			6	1	6	1

Streptococcus milleri			4	1	4	1
Streptococcus pseudopneumoniae	8	1			8	1
Streptococcus sanguinis			5	1	5	1
Veillonella denticariosi			7	1	7	1

Fuente: Elaboración por MSc Jackeline Castillo Rivas, 2018.

De acuerdo con la U Mann-Whitney para probar asociación entre la prevalencia de manifestación de la bacteria por especie, entre la saliva y el fluido crevicular no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$), como se observa en la tabla 15. Es importante destacar que se reportan las pruebas en las que se pudo calcular la prueba ya que se presentaban manifestaciones en las dos muestras.

Tabla 15. Prueba asociación: especie-medio

Prueba asociación: especie – medio			
	Mann-Whitney U	Z	Sig.
Candidatus Tammella caduceiae	0,5	(1,323)	0,186
Fusobacterium naviforme	6	(0,992)	0,321
Fusobacterium nucleatum	0	(1,225)	0,221
Gemella cuniculata	0	(1,000)	0,317

Haemophilus parainfluenzae	0	(1,342)	0,180
Mannheimia caviae	1,5	(0,373)	0,709
Neisseria mucosa	0,5	(1,088)	0,277
Porphyromonas endodontalis	1	(1,476)	0,140
Porphyromonas gingivalis	2	(1,124)	0,261
Selenomonas infelix	9,5	(0,127)	0,899
Streptococcus tigurinus	3,5	(1,772)	0,076
Tannerella forsythia	1,5	(1,528)	0,127
Treponema medium	2	(1,194)	0,232
Unclassified at Species level	45	(1,000)	0,317
Veillonella atypica	5	(1,661)	0,097
Veillonella dispar	0	(1,414)	0,157

Fuente: elaboración por MsC Jackeline Castillo Rivas, 2018.

Virus

El tercer análisis se realizó en torno a la presencia de virus en las distintas muestras, saliva y el líquido crevicular, donde los virus más presentes fueron el Citomegalovirus, el Epstein-Barr y el Virus de herpes simple I y II. Tal y como se observa en la tabla 16, al comparar virus según el medio, es posible determinar una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) únicamente para el Citomegalovirus, el cual se encuentra en mayor cantidad en la muestra de saliva. Es decir, que con

respecto a los demás virus, no existe diferencia estadísticamente significativa respecto al medio en donde se toma la muestra.

Tabla 16. Presencia de virus según medio

Presencia de virus según medio				
Virus	N	Medio		Significancia
		Saliva	Líquido crevicular	
Citomegalovirus	10	80%	10%	0,016*
Epstein-Barr	10	70%	20%	0,063
HVS-I	10	30%	60%	0,250
HVS-II	10	30%	0%	0,250

* significativo al 95% de confianza

Fuente: Elaboración por MsC Jackeline Castillo Rivas, 2018.

Discusión

Se ha evidenciado, que si bien la enfermedad periodontal es multifactorial, y la presencia de ciertas bacterias y virus en la persona no es condicionante para su aparición, sí son uno de los factores más importantes y de mayor prevalencia en la manifestación de la periodontitis, ya que sin la presencia de estas, la enfermedad no se presentaría de la misma manera que lo hace actualmente. Sin embargo, se considera el biofilm dental, como el factor etiológico primario de esta enfermedad.

La categoría básica para identificar las bacterias, es la especie; y al realizar un conjunto de ellas se presentan los géneros (27). Por lo que al ser los dos niveles más específicos en la clasificación por nivel de organización, se utilizan para la comparación de los resultados obtenidos tanto en la saliva como en el fluido crevicular.

En el caso del género, según la tabla 9, se determinó que la mayor manifestación fue de bacterias no identificables, debido a la amplia variedad microbiana existente, en la actualidad, no es posible identificar o agrupar todas las bacterias presentes en la cavidad oral. Esto unido a la variedad de hábitats en la mucosa, dependiendo de concentraciones de oxígeno, temperatura, disponibilidad de nutrientes, características anatómicas y más (57). Razón por la cual, se presentan gran cantidad de bacterias no identificables en las muestras de saliva y fluido crevicular.

El género bacteriano identificado con más presencia en las muestras analizadas, es el *Streptococcus*, el cual se ha presentado como un referente en el biofilme dental, tanto en la producción de enfermedades como caries dental y enfermedad periodontal.

Las especies del género *Streptococcus* se encuentran en una alta proporción en tejidos blandos, saliva y en la lengua (57). Esta alta proporción, se relaciona con los resultados encontrados en los cuales este género predomina sobre los demás en la mucosa oral.

Las muestras especifican que los géneros más reportados son *Streptococcus*, *veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas* y *Prevotella*; relacionado con los grupos que reportados de bacterias que colonizan el surco periodontal, cuando está presente la enfermedad periodontal. De esta forma, se presenta el género *Streptococcus* en el grupo amarillo, el *Veillonella* en un grupo púrpura, el *Fusobacterium* en el grupo naranja y como uno de los más severos en el desarrollo de la periodontitis, *Porphyromonas* en el grupo rojo (10).

Por lo que se distingue una clara relación, en las bacterias relacionadas con el desarrollo de la enfermedad periodontal, y aquellas encontradas en las muestras analizadas de pacientes que presentan dicha patología.

Así como especifica Farías (29), algunas de las bacterias más frecuentes en las afecciones periodontales se encuentran *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromona*

gingivalis, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrecens*, *Streptococcus intermedius*, entre otras. Todas ellas pertenecientes a los géneros encontrados más prevalentes en esta investigación, como se presenta en la tabla 9.

En las muestras correspondientes a la saliva, se analiza que debido a la fuerte presencia del género *Streptococcus* en la mucosa oral en general, comentada anteriormente, se observa la prevalencia de este género en las muestras estudiadas. En el estudio realizado por Alicia Herrero, el patógeno hallado con mayor frecuencia en la saliva fue *T. denticola*, seguido por *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia* (58).

Si bien se presentan diferencias en las bacterias reportadas con el estudio en cuestión, se ve una alta presencia del género *Porphyromonas*, relacionado con el puesto prevalente en el cual este se encuentra en las muestras analizadas, como se muestra en la tabla 9, en la cual este género se encuentra en la quinta posición.

Inclusive, se ha sugerido que en saliva, el recuento de ciertos patógenos periodontales puede ser útil en el diagnóstico de periodontitis, fundamentalmente de *P. gingivalis* (58).

En el caso del fluido crevicular, se sabe que el surco gingival presenta gran cantidad de vida microbiana, debido a su ambiente anaerobio, en condiciones normales, predominan *Streptococcus* del grupo sanguis, *Streptococcus* del grupo mitis,

Veillonella prvula, además de pequenas cantidades de Fusobacterium, Prevotella y más (23). Lo cual presenta una clara relación con los géneros encontrados en las muestras analizadas.

En el caso de las bacterias encontradas en el fluido crevicular en pacientes afectados con enfermedad periodontal, Guilarte y Perrone encontraron que las bacterias del género de Prevotella son las más frecuentes en todas las edades, mientras Porphyromonas, Bacteroides y Fusobacterium se hallaron con mayor frecuencia en pacientes mayores de 40 años (1).

En el presente estudio, los géneros hallados por Guilarte y Perrone (33), se encontraron entre los cinco géneros más prevalentes en las muestras tomadas de líquido crevicular, lo cual se puede relacionar con lo reportado por estudios anteriores. Con esto, se observa que las bacterias periodontopatógenas estn presentes en cantidades importantes en el líquido crevicular.

En la tabla 14 se observan las principales bacterias encontradas clasificadas por especie. El presente estudio muestra la prevalencia en primer lugar de una gran categoría de especies sin ninguna clasificación, esto debido a que se sabe que en nuestra cavidad oral existe una amplia variedad de bacterias que inclusive al día de hoy pese a los grandes avances no se han logrado identificar y estudiar.

En el presente estudio se observa que por cada muestra obtenemos 8 principales especies de bacterias dándonos un total de 45 especies de mayor prevalencia del total de las 20 muestras. Entre estas 45 especies que se encontraron tenemos 3 principales especies las cuales han sido investigadas a profundidad en otros estudios en los cuales la metodología ha sido similar a la que se llevó a cabo en este estudio y las cuales prevalecen en la enfermedad periodontal siendo estas *T. Forsythia*, *P. Gingivalis* y *F. nucleatum*.

En la tabla 14 se ve que la *T. Forsythia* es la sexta bacteria que aparece en mayor cantidad en las muestras, se sabe que esta es una bacteria anaerobia gram negativa la cual tiene gran asociación con diferentes enfermedades como la gingivitis, periodontitis crónica y agresiva. Además, múltiples estudios asocian esta bacteria con la pérdida de inserción clínica en el progreso de la enfermedad (59).

La presencia de esta especie coincide con los resultados aportados por otros autores (40,60), los cuales manejan un linaje de materiales y métodos similares al del presente estudio, esto permite reforzar el empleo de estas dos técnicas para obtener muestras tanto de saliva como de líquido crevicular; ya que los resultados fueron muy similares entre la saliva y el fluido crevicular (40).

Otra especie de bacteria, la cual ha sido muy investigada es la *P. gingivalis*, es un cocobacilo anaerobio gram negativa (-) y es considerado un microorganismo periodontopatógeno. Este aprovecha las condiciones que el huésped brinda para

generar un mayor daño y al mismo tiempo es capaz de crear protección contra el sistema de defensa del huésped (34). Al igual que la *T. forsythia*, los autores respaldan la presencia de esta bacteria en los diversos estudios realizados en fluido crevicular, es el mayor recuento en pacientes con periodontitis.

Cabe destacar que a la *P. gingivalis* se le atribuye como una de las principales especies causales de la enfermedad periodontal, la presencia de esta especie bacteriana en este estudio, se da en ambos medios y es representativa en ambas, lo cual permite utilizar cualquiera de los dos medios para futuras investigaciones.

La tercera especie bacteriana que es considerada un agente causal o que tiene relación directa con la periodontitis es la *F. nucleatum* esta es una especie gram negativa (-), la cual es un comensal oportunista anaerobio de la cavidad oral. Esta especie tiene la capacidad de adherirse a las células epiteliales e invadir el endotelio (61). Al pertenecer al gran grupo de especies gram negativa (-) se le asocia directamente con la enfermedad periodontal. Esta bacteria es altamente invasiva y su actividad es comparable con la *P. Gingivalis* y la estimulación que esta produce sobre los factores tales como IL-8 es muy alta contribuyendo con la pérdida progresiva de inserción presente en la enfermedad (61).

Los distintos autores reportan la presencia de *F. nucleatum* con menor frecuencia en los estudios realizados coincidiendo estos datos con los del presente estudio ya que como podemos observar en la tabla 14 la *F. nucleatum* ocupa una

posición no tan alta en las principales especies encontradas en las muestras, reforzando esto el empleo de cualquier método para la obtención de futuras muestras.

Con los medios utilizados en el presente estudio se obtuvieron una gran cantidad de especies tanto en saliva como en fluido crevicular con la diferencia de que la saliva presenta mayor especificidad en cuanto a especies bacterianas no siendo así el caso del fluido crevicular que presentó mayor diversidad de especies con menor una menor cantidad de manifestaciones.

Actualmente, se ha determinado una estrecha relación entre la progresión y severidad de la enfermedad periodontal y la presencia de distintos virus como el citomegalovirus, y los Herpesvirus, específicamente el herpesvirus tipo 1 y el virus de Epstein Barr en pacientes con enfermedad periodontal. En esta investigación se evidencia la presencia de dos virus, principalmente los cuales según publicaciones anteriores suelen ser patógenos comunes en aquellos pacientes afectados por enfermedades periodontales (5).

Con respecto al Citomegalovirus tiene una relación compleja con la severidad de la enfermedad, implicado en la pérdida de hueso en las zonas afectadas (62). En los resultados de la tabla 16, se evidencia la alta presencia del virus en personas con enfermedad periodontal, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en otros estudios.

Este virus puede detectarse tanto en muestras de saliva como de líquido crevicular, siendo la primera más representativa de acuerdo a los resultados obtenidos (62,63,64) y a su vez el método más práctico de realizar.

En cuanto al HVS I, se ha observado que es de los principales virus que se alojan en las bolsas profundas de pacientes con enfermedad periodontal (63,64), tal y como se observa en los resultados obtenidos de esta investigación y en investigaciones relacionadas (64), es posible detectarlo mediante técnicas de PCR en muestras de saliva como en el fluido crevicular, independientemente del medio utilizado.

Según los resultados obtenidos, se observa que no se presenta diferencia significativa entre los medios utilizados para la obtención de las muestras. Tanto en el análisis de bacterias por género y por especie, como en el análisis viral, se contempla que el uso de saliva o de líquido crevicular es igualmente efectivo para la toma de muestras en enfermedad periodontal.

Esto se relaciona con lo reportado por Yamalik, Ozer y Caglayan, en el cual se analiza los niveles de pseudocolinesterasa, tanto el fluido crevicular como en saliva, en el cual se presenta mayor concentración en el fluido crevicular. Sin embargo, en ambos medios se da mayor presencia que en el grupo control, por lo que se especifica que ambos fluidos son útiles para la investigación en la enfermedad periodontal (65).

Esta coincidencia en los medios se encuentra apoyada en el hecho de que lo encontrado en el fluido crevicular contribuye a la concentración de la enzima en la saliva (65). Por esta relación entre los fluidos, ambos son funcionales para la realización de análisis de muestras periodontales.

Esto también comprobado por Viera, Morón, Morales, Carrillo y Rubio; los cuales especifican que en la enfermedad periodontal, la saliva puede ser considerada como un segundo fluido para el estudio, ya que la mayoría de sus constituyentes provienen del fluido crevicular gingival (66).

En un estudio más relacionado, Herrero explica que las investigaciones muestran que la saliva es un nicho adecuado para el estudio del biofilm subgingival, aunque los resultados de los estudios presentan cierta heterogeneidad en la calidad y cantidad bacteriana, y especifica que esto se debe a diferencia en la prevalencia de periodontopatógenos según la población de estudio, a variantes de cada especie bacteriana y a más factores asociados (58).

En dicho estudio se concluye que la concordancia entre la muestra de fluido crevicular y la saliva para la detección de *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* es alta; moderada para *T. denticola*; baja para *P. intermedia*, y muy baja para *T. forsythia*. Por tanto, la saliva podría emplearse como un método diagnóstico alternativo a la toma de muestra de líquido crevicular para la detección de algunas de las bacterias implicadas en ese estudio (58).

Conclusión similar a la realizada en el presente estudio, en el cual se reporta que existe concordancia en las muestras de saliva y de fluido crevicular para la detección de las bacterias halladas más representativas, así como para la presencia de virus orales, exceptuando el citomegalovirus.

Debido a esta relación, se comprueba una asociación entre la saliva y el fluido crevicular, y se verifica que ambos medios pueden ser utilizados de manera confiable en la investigación de enfermedad periodontal.

Conclusiones

· Se han realizado múltiples estudios enfocados en la recolección de muestras y extracción de ADN a partir de saliva y líquido crevicular con el objetivo de analizar las bacterias y virus presentes en la enfermedad periodontal, se ha evidenciado la estrecha relación de los virus y bacterias con dicha enfermedad.

·

El método de recolección de muestras de saliva con enjuague es más sencillo de realizar que la recolección de líquido crevicular con puntas de papel.

·

Los virus de mayor prevalencia en las muestras analizadas mediante PCR de pacientes con enfermedad periodontal fueron Citomegalovirus, Epstein-Barr y virus del herpes simple tipo I y II. En cuanto a las bacterias la diversidad obtenida fue numerosa no obstante se encontraron 3 principales bacterias asociadas a la enfermedad periodontal siendo estas *T. forsythia*, *P. gingivalis* y *F. nucleatum*.

No hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos medios de muestras para la detección de bacterias y virus presentes en cavidad oral.

Recomendaciones

Para futuros estudios epidemiológicos e investigaciones es recomendable solo tomar muestras de saliva con enjuague para detectar la presencia de especies bacterianas y virales, ya que es un procedimiento sencillo de realizar, económicamente accesible y logra mostrar los microorganismos presentes en cavidad oral.

Capítulo V

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Fecha	Actividad	Recursos	Responsables
09/03/2018	Introducción al proyecto de graduación	Facultad de odontología	-Alejandro Quesada -Carmen Sandino -Carolina Rivera -Daniela Bermúdez -Fiorella Aguilar -Luis Leonardo Chacón -María Fallas -Verónica Trujillo
22/03/2018	Discusión sobre realización de seminarios	Facultad de odontología	-Alejandro Quesada -Carmen Sandino -Carolina Rivera -Daniela Bermúdez -Fiorella Aguilar -Luis Leonardo Chacón -María Fallas -Verónica Trujillo
07/04/2018	Seminario por parte de la Dra Rojas, explicación de toma de muestras	Clínica Dental Tristán	-Alejandro Quesada -Carmen Sandino -Carolina Rivera -Daniela Bermúdez -Fiorella Aguilar -Luis Leonardo Chacón -María Fallas -Verónica Trujillo
11/05/2018	Seminario generalidades periodoncia por Carolina Rivera y María Fallas	Auditorio Odontología, video beam	-Alejandro Quesada -Carmen Sandino -Carolina Rivera -Daniela Bermúdez -Fiorella Aguilar -Luis Leonardo Chacón -María Fallas -Verónica Trujillo -Alejandro Quesada

01/06/2018	Seminario componente bacteriano por Carmen Sandino y Fiorella Aguilar. Y seminario componente viral por Leonardo Chacón y Verónica Trujillo	Auditorio Odontología, video beam	-Carmen Sandino -Carolina Rivera -Daniela Bermúdez -Fiorella Aguilar -Luis Leonardo Chacón -María Fallas -Verónica Trujillo
08/06/2018	Seminario biología molecular por Alejandro Quesada y Daniela Bermúdez	Aula 05 odontología, video beam	-Alejandro Quesada -Carolina Rivera -Daniela Bermúdez -Fiorella Aguilar -Luis Leonardo Chacón -María Fallas -Verónica Trujillo
05/07/2018	Reunión con Dra Rojas y Dra Silva, se comenta sobre microbioma y realización de metodología	Aula 05 odontología	-Alejandro Quesada -Carmen Sandino -Carolina Rivera -Daniela Bermúdez -Fiorella Aguilar -Luis Leonardo Chacón -María Fallas -Verónica Trujillo
04/08/2018	Reunión con Dra Rojas y Dra Silva. Exposición por Carmen Sandin sobre electroforesis	Clínica Dental Tristán	-Alejandro Quesada -Carmen Sandino -Carolina Rivera -Daniela Bermúdez -Fiorella Aguilar -Luis Leonardo Chacón -María Fallas -Verónica Trujillo

Factores facilitadores/obstáculos y dificultades

Unos de los primeros aspectos que facilitó la investigación fue que los materiales utilizados fueron dados por el Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica, estos materiales además de ser de muy bajo costo relativamente para la actual investigación se pueden obtener con mucha facilidad.

Otra de las facilidades fue contar con un banco de pacientes con enfermedad periodontal de fácil acceso por ser pacientes que se atienden en la facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica, por lo que no fue necesario salir del recinto en búsqueda de sujetos de estudio.

Sin embargo, relacionado al acceso de los pacientes, uno de los obstáculos con los cuales se lidio fue el hecho de manejar una expectativa inicial alta en cuanto al número de sujetos de estudio para la toma de muestras; lo cual no fue posible realizar, ya que la cantidad de pacientes nuevos que se presentaron a la Clínica de Periodoncia en el primer semestre del 2018 de la Universidad de Costa Rica no fue lo que se esperaba, si no mucho menor.

Adicional a lo anterior, el tiempo fue un factor que influyó negativamente ante la presente investigación, ya que al ser el análisis de las muestras un proceso largo, de mucho cuidado y precisión, no fue posible tomar en cuenta a los nuevos pacientes que ingresaron en el segundo semestre en la Clínica de Periodoncia de la Universidad de Costa Rica, ya que se tenía una fecha establecida para la presentación de resultados.

Los criterios de exclusión e inclusión fue un factor que obstaculizo el tomar en cuenta o no a los pacientes, ya que estos debían de cumplir tanto con las características exclusivas e inclusivas a la vez, por lo que aunque el paciente padeciera enfermedad periodontal no podía ser sujeto de estudio.

Por otro lado, en la toma de muestras para líquido crevicular de las bolsas periodontales de los pacientes era necesario la ausencia de sangre en cada punta de papel, un aspecto que dificulto el procedimiento, ya que como se comprenderá en la enfermedad periodontal la condición de sangrado es muy común, más aún si las bolsas son profundas.

Contar con un centro de investigación de Biología Celular y Molecular en la Universidad de Costa Rica, es un factor positivo, por ser el análisis de las muestras un proceso costoso, aumentaría el costo de la investigación, si no se tuviera en la universidad dicho centro.

Bitácora

Fecha	Actividad
9 marzo 2018	Introducción al proyecto de graduación
22 marzo 2018	Discusión sobre realización de seminarios
7 abril 2018	Seminario por Dra Rojas, explicación sobre toma de muestras
11 mayo 2018	Seminario Generalidades Periodoncia
1 junio 2018	Seminario Componente Bacteriano y Componente Viral
8 junio 2018	Seminario Biología Molecular
5 julio 2018	Reunión con Dra Rojas y Dra Silva
4 agosto 2018	Reunión con Dra Rojas y Dra Silva
7 setiembre 2018	Entrega de avance a Dra Rojas
18 setiembre 2018	Reunión con MsC Jackeline Castillo
21 setiembre 2018	Reunión con Dra Rojas
27 setiembre 2018	Reunión con Dra Silva
28 setiembre 2018	Reunión con Dra Rojas
8 octubre 2018	Visita al CIBCM
23 octubre 2018	Visita al CIBCM
23 octubre 2018	Reunión con MsC Jackeline Castillo
1 noviembre 2018	Reunión con MsC Jackeline Castillo
3 noviembre 2018	Reunión entre estudiantes

Referencias Bibliográficas

- 1- Guillarte C, Perrone M. *Detección de especies de bacilos anaerobios gram negativos en pacientes con periodontitis crónica. Acta Odontológica Venezolana. 2005: 45(1), 06-13.*
- 2- Pérez L, De Armas A, Fuentes E, Rosell F, Urrutia D. *Prevalencia de Enfermedad Periodontal y factores de riesgo asociados. Policlínico Pedro Borrás, Pinar del Río. Revista Ciencias Médicas Pinar del Río.2011: 15(2).*
- 3- Bascones A, Figuero E. *Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. Avances en periodoncia e implantología. 2005:17(3).*
- 4- Rosa G, Quirós S, Lucas G, Lucas O. *Evaluación de la Intensidad del Fluido Crevicular en Pacientes Fumadores y No Fumadores. Catedral de Fisiología Humana. Facultad de Odontología. U.N.N.E. 2001*
- 5- Slots, J. *Herpesviruses in periodontal diseases. Periodontology 2000. 2005; 38: 33–62.*
- 6- Aguilar FE, Sosa FJ, Bojórquez Y, Fontes Z. *Periodontitis una enfermedad multifactorial: Diabetes Mellitus. Revista Iberoamericana de las Ciencias de la Salud. Enero-Junio 2017; Vol 6, Número 11.*
- 7- Peña M, Peña L, Díaz A, Torres D, Lao N. *La enfermedad periodontal como riesgo de enfermedades sistémicas. Rev Cubana Estomatología. 2008:45*
- 8- Duque A, Cuartas C, Muñoz C, Salazar C, Sánchez Y. *Nivel de conocimiento sobre enfermedad periodontal en una muestra de empleados en Medellín. Rev.CES Odont. 2011:24(2)43-47*

- 9- Carranza F, Takei H, Klokkevold P, Newman. *Periodontología clínica*. Onceava edición. Amolca. 2014.
- 10-Escribano M, Matesanz P, Bascones A. *Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis*. Av Periodon Implantol. 2005; 17, 2: 79-87.
- 11-Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). *The keystone-pathogen hypothesis*. *Nature Reviews Microbiology*, 10(10), 717.
- 12-Prats G. *Microbiología Clínica (Ed. Rev.)*. Madrid, España: Panamericana. 2005
- 13-Caton J, Armitage G, Berglundh T, Chapple I, Jepsen S, Kornman K, Mealey B, Papapanou P, Sanz M, Tonetti M. *A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions- Introduction and key changes from the 1999 classification*. J Clin Periodontol. 2018; 45; 51-59.
- 14-Botero JE, Bedoya E, Determinantes del diagnóstico periodontal. Revisión bibliográfica. 2010, 97-99.
- 15-Alvear FS, Vélez ME, Botero L. *Risk factors for periodontal diseases*. Revista Facultad Odontología Univ Antioq. 2010; 22(1): 109-116.
- 16-Alfageme M. *Transmisión de Periodontopatógenos (Tesis de Grado)*. Universidad de Sevilla, Sevilla, España; 2017; 8-12
- 17-Sukugawa F. *Factores de riesgo para enfermedades gingivoperiodontales*. 2006. 22 (2).
- 18-Palacios SB, Cerero LR, Campo TJ, Esparza GG. *Alteraciones gingivales no relacionadas con placa*. 2006. 43-55.
- 19-Zerón Agustín. Consenso. *9o Taller Europeo-Enfermedades periodontales y Enfermedades sistémicas*. 2013. 213-223.

- 20-Bascones A. *Factores de riesgo de la enfermedad periodontal: factores genéticos. Avances en Periodoncia.* 2005 Ago 69-77.
- 21-Bascones MA. *El papel de la genética en la aparición y desarrollo de la periodontitis: I: evidencias científicas de la asociación entre periodontitis y genética. Avances en Periodoncia.* 2007 Ago. 71-81.
- 22-Vincent O. Rotimi, Nathanael O. Salako, Mary Divia ,Linda Asfour, Eija Kononen. *Prevalence of periodontal bacteria in saliva of Kuwaiti children at different age groups.* 2010. Vol 3: 76-82.
- 23-Peña M, Calzado M, González, M, Cordero S, Azahares H. *Patógenos periodontales y sus relaciones con enfermedades sistémicas. MEDISAN.* 2012; 16: 1-12.
- 24-Falotico G, Farias F. *El surco gingival. Aspectos clínicos y anatomofisiomicrobiológicos.* Odous científica. 2006: 2
- 25-De Agustín D. *Diccionario de Medicina.* Segunda edición. Madrid: Editorial Complutense. 2001.
- 26-Tortora G, Chase C, Funke B. *Introducción a la microbiología.* Madrid, España: Panamericana. 2007
- 27-De la Rosa F, Navarro M, Prieto J. *Microbiología en ciencia de la salud. Concepto y aplicaciones (3ª ed.).* Barcelona, España: ELSEVIR. 2011
- 28-Liébana J, Castillo A, Álvarez M. *Enfermedades periodontales: consideraciones microbiológicas. Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2004; S75-91: 76

- 29-Rodríguez F. *Enfermedad periodontal y microorganismos periodonto patógenos.* ODOUS Científica. Microbiología, Facultad de Odontología - Universidad de Carabobo. 2004: 2-4, 6-16
- 30-Taylor J, Preshaw P. *Gingival crevicular fluid and saliva. Periodontology 2000.* 2016: 70; 7–10.
- 31-Sánchez G, Acquier A, De Couto A, Busch L, Mendez C. *Association between Aggregatibacter actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in subgingival plaque and clinical parameters, in Argentine patients with aggressive periodontitis. Microbial Pathogenesis.* 2015; 82: 31-36.
- 32-Morero S, Contreras A. *Mecanismos moleculares implicados en la destrucción ósea de la periodontitis. Revisión de literatura. Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral.* 2013: 6; 142-147.
- 33-Guillarte C, Perrone M. *Bacterias Periodonto patógenas: Bacilos Anaerobios gran negativos como agentes Etiológicos de la Enfermedad Periodontal. Acta Odontológica Venezolana.* 2005:43(2),198-204.
- 34-Avila Y. *Aislamiento e identificación de Porphyromonas gingivalis y Prevotella intermedia en pacientes con gingivitis y periodontitis crónica. (Tesis de Grado).* Pontificia Universidad Javeriana. 2012; 16.
- 35-Ramos PD, Ávila C, Levano T. *Treponema denticola: patógeno en procesos periodontales y pulpares. Odontología Sanmarquina.* 2014. 38-41.
- 36-Vincent O. Rotimi, Nathanael O. Salako, Mary Divia ,Linda Asfour, Eija Kononen. *Prevalence of periodontal bacteria in saliva of Kuwaiti children at different age groups.* 2010. Vol 3: 76-82.

- 37-Nieves Y. *Microbiología de las Enfermedades Periodontales Microbiología Oral*. 2010-2011; 11-19
- 38-Alexandrina L. Periodontal Microbiology. A. L. Dumitrescu, *Etiology and Pathogenesis of Periodontal Disease*, 2010: DOI: 10.1007/978-3-642-03010-9_2. 6
- 39-Echeverría A, Vignoletti F, Fabrizi S, Matesanz P. *Papel etiológico de los virus en la enfermedad periodontal Av Periodon Implantol*. 2007; 19, 2: 91-99.
- 40-Feng X, Zhu L, Xu L, Meng H, Zhang L, Ren X, Lu R, Tian Y,, Wang X. *Distribution of 8 periodontal microorganisms in family members of Chinese patients with aggressive periodontitis. Archives of Oral Biology*. 2015: 60
- 41-Slots, J. *Biology and pathogenesis of cytomegalovirus in periodontal disease. Periodontology disease*. 2014: 64; 40-56
- 42-Petrović M, Kesić L, Živkovic N, Obradović I, Obradović R. Human Viruses and Periodontal Diseases *Acta Stomatologica Naissi*. 2011;27;1110 - 1118.
- 43-Mogensen T, Paludan S. *Molecular pathways in virusinduced cytokine production. Microbiol Mal Biol Rev*. 2001: 65;131-50.
- 44-Shivaprasad B, Sachin B et al. *Herpesviruses in chronic and aggressive periodontitis patients in a Indian population*. *Journal of Oral Science*. 2008: 51: 84
- 45-Gao Z, Lv J, Wang M. *Epstein–Barr virus is associated with periodontal diseases: A meta-analysis based on 21 case–control studies. Medicine*. 2017;96(6), e5980.

- 46-Meselson M, Stahl FW. *The Replication of DNA. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* 1958. 23: 9-12.
- 47-Patiño, P. J., & López, M. T. R. Replicación del ADN. *Fondo Editorial Biogénesis,* 119-132.
- 48-De Lima C, Acevedo A , Grisi D, Taba M, Guerra E, De Luca G. *Host-derived salivary biomarkers in diagnosing periodontal disease: systematic review and meta-analysis. Journal of Clinical Periodontology.* 2016: 43(6), 492-502.
- 49-Botero J. *Respuesta inmune en las enfermedades del periodonto: Desde salud hasta enfermedad y sus implicaciones terapéuticas.* Rev Fac Odontol Univ Antioq. 2009; 21(1): 122-128.
- 50-Matic-Petrovic S, Zelic K, Milasin J, Popovic B, Pucar A, Zelic O. *Detection of herpes simplex virus type 1 in gingival crevicular fluid of gingival sulcus/periodontal pocket using polymerase chain reaction.* 2014: 142(5-6); 296-300.
- 51-Zhu C, Li F, Wong M, Feng X, Lu H, Xu W. *Association between Herpesviruses and Chronic Periodontitis: A Meta-Analysis Based on Case-Control Studies. PLOS ONE.* 2015:10(12), e0144319.
- 52-López F, Cruz M, Ovando U. *Métodos de diagnóstico microbiológico en la enfermedad periodontal.*2009: 9.
- 53-Lee PY, Costumbrado J, Hsu C, Kim YH. *Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. Journal of Visualized Experiments (62).* e3923, doi:10.3791/3923 (2012).

- 54-Rodicio M, Mendoza M. *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica*. In: 22nd ed. Departamento de biología funcional. Área de microbiología. Universidad de Oviedo España.2004; 238-45.
- 55-Jiménez R. *Metodología de la investigación. Elementos básicos para la investigación clínica*. Editorial Ciencias Médicas, La Habana, 1998.
- 56-Klindworth A, Priesse E, Schweer T, Peplles J, Quast C. *Evaluation of general 16S ribosomal NA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies*. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41(1).
- 57-Serrano H, Sánchez M, Cardona N. *Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica*. *Revista CES Odontología*. 2015; 28 (2).
- 58-Herrero A. *Detección de herpesvirus y bacterias periodontopatógenas en muestras de fluido crevicular gingival y saliva en periodontitis crónica*. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 2016.
- 59-Sharma A. *Virulence mechanisms of Tannerella forsythia*. *Periodontol* 2000. 2010; 54(1):106-116.
- 60-Figuero E. *Detección y cuantificación de bacterias asociadas a enfermedades periodontales en bacteremias relacionadas con manipulaciones bucales no profesionales. Estudio piloto*. Universidad Complutense de Madrid. 2013.
- 61-Zerón A, De Velasco G, Porras D. *¿Un patógeno periodontal promotor de carcinogénesis colorrectal?* *Revista ADM*. 2016;73(6):280-285.

- 62-Slots J, Sugar C, Kamma JJ. *Cytomegalovirus periodontal presence is associated with subgingival Dialister pneumosintes and alveolar bone loss*. Oral Microbiol Immunol. Blackwell Munksgaard. 2002: 17;372.
- 63-Grenier G, Gagnon G, Grenier D. *Detection of herpetic viruses in gingival crevicular fluid of patients suffering from periodontal diseases: prevalence and effect of treatment*. Oral Microbiol Immunol. 2009: 24: 506-509.
- 64-Imbronito A, Shizuo O, Freitas N, Fraga R, Daumas F. *Detection of Herpesvirus and Periodontal pathogens in subgingival plaque of patients with chronic periodontitis, generalized aggressive periodontitis, or gingivitis*. Journal Periodontol. 2008: 79; 2317.
- 65-Yamalík N, Ozer N, Caglayan F, Caglayan G. *Determination of Pseudocholinesterase activity in the gingival crevicular fluid, saliva, and serum from patients with juvenile periodontitis and rapidly progressive periodontitis*. J Dent Res 69 (1): 87-89, 1990.
- 66-Viera N, Morón A, Morales T, Carrillo G, Elby R. *Niveles de Hsp60 en saliva y fluido crevicular gingival de pacientes con enfermedad periodontal*. Ciencia Odontológica. Vol. 13 N° 1: 44-51. 2016.

Anexos



FÓRMULA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
(Para ser sujeto de investigación)

(Comparación del contenido bacteriológico y viral en la saliva y el fluido crevicular de pacientes periodontalmente comprometidos y la condición clínica)

Código (o número) de proyecto: 157

Nombre del Investigador Principal: Dra. Gisella Rojas González

Nombre del participante: _____

- A. **PROPÓSITO DEL PROYECTO:** El programa Macro de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica, está realizando un estudio para conocer los microorganismos presentes en la saliva y en el líquido crevicular (líquido de las encías), en pacientes con enfermedad periodontal (enfermedad de las encías) y en pacientes sanos, para saber si el contenido es semejante o no, y ver la correlación que tiene con el cuadro clínico. Este estudio es importante porque determinará si es lo mismo hacer estudios de investigación obteniendo muestras de fluido crevicular y saliva o no. Esto permitirá aclarar cual muestra es más representativa para utilizarla en un futuro cercano en estudios epidemiológicos a nivel nacional. El estudio se espera realizar en dos años.
- B. **¿QUÉ SE HARÁ?:** Si usted participa de la investigación, además de los requerimientos que debe cumplir en la Clínica de Periodoncia de la Facultad de Odontología, aceptará que se obtenga una muestra del líquido que sale por la encía con puntas de papel, y aceptará que se obtengan dos muestras de saliva. Si por la condición clínica que usted presenta, requiere como parte del tratamiento periodontal que se le realice cirugía, se recogerá una muestra de encía de la que se debe desechar en el tratamiento quirúrgico.
- C. **RIESGOS:**
1. La participación en este estudio puede generar un bajo riesgo o molestia para usted por lo siguiente: al obtener las muestras del líquido de las encías se puede producir inflamación y dolor leve. Puede no gustarle el sabor del suero oral con el que se realizará el enjuague.
 2. Si sufriera algún daño como consecuencia de los procedimientos a que será sometido para la realización de este estudio, los investigadores participantes realizarán una referencia al profesional apropiado para que se le brinde el tratamiento necesario para su total recuperación.



- D. **BENEFICIOS:** Como resultado de su participación en este estudio, el beneficio que obtendrá será conocer que tipo de bacterias y eventualmente virus están presentes en su organismo y están produciendo alteraciones a nivel periodontal. Adicionalmente, como resultado de su participación en este estudio, los investigadores aprendan más acerca de los microorganismos que producen enfermedad periodontal y este conocimiento beneficie a otras personas en el futuro.
- E. Antes de dar su autorización para este estudio usted debe haber hablado con la Dra. Gisella Rojas González o con alguno de los investigadores sobre este estudio y ellos deben haber contestado satisfactoriamente todas sus preguntas. Si quisiera más información más adelante, puedo obtenerla llamando a la Dra. Rojas al teléfono 25115439 de lunes a viernes de 8 a 3 p.m. Además, puedo consultar sobre los derechos de los Sujetos Participantes en Proyectos de Investigación a la Dirección de Regulación de Salud del Ministerio de Salud, al teléfono 22-57-20-90, de lunes a viernes de 8 a.m. a 4 p.m. Cualquier consulta adicional puede comunicarse a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica g los teléfonos 2511-4201 ó 2511-5839, de lunes a viernes de 8 a.m. a 5 p.m.
- F. Recibirá una copia de esta fórmula firmada para mi uso personal.
- G. Su participación en este estudio es voluntaria. Tiene el derecho de negarse a participar o a discontinuar su participación en cualquier momento, sin que esta decisión afecte la calidad de la atención médica (o de otra índole) que requiere.
- H. Su participación en este estudio es confidencial, los resultados podrían aparecer en una publicación científica o ser divulgados en una reunión científica pero de una manera anónima.
- I. No perderá ningún derecho legal por firmar este documento.
- J. Las muestras obtenidas para esta investigación podrían transferirse a otros investigadores bajo el Acuerdo de Transferencia de Material Biológico (MTA).



CONSENTIMIENTO

He leído o se me ha leído, toda la información descrita en esta fórmula, antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por lo tanto, accedo a participar como sujeto de investigación en este estudio

Nombre, cédula y firma del sujeto (niños mayores de 12 años y adultos) fecha

Nombre, cédula y firma del testigo fecha

Nombre, cédula y firma del Investigador que solicita el consentimiento fecha

NUEVA VERSIÓN FCI – APROBADO EN SESION DEL COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO (CEC) NO. 149 REALIZADA EL 4 DE JUNIO DE 2008.
CELM-Consentimiento informado saliva fluidocrev 2017 2018 (1).cdr

