

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**SEMINARIO DE GRADUACIÓN**

**“Comparación del contenido bacteriológico (en fluido crevicular y saliva) y la condición nutricional de pacientes con periodontitis de la preclínica de periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica en el segundo semestre del 2019”**

**Investigadora Principal:**

Dra. Gisella Rojas González

**Investigadores Asociados:**

Dr. Alberto Vega Chin

Dra. Georgina Gómez Salas

MsC. Jacqueline Castillo Rivas

**Sustentantes del Seminario de Graduación:**

Lucía Coto Chinchilla	B01989
Mónica Fabian Montecinos	B32475
Carolina Rivera Álvarez	B15427
Melany Vargas Arroyo	B47284
Vanesa Zamora Chacón	B27389

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio Brenes, Costa Rica

San José, Costa Rica

Año 2019

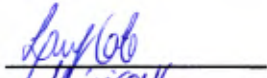
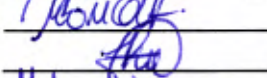
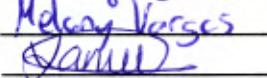
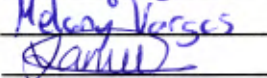

HOJA DE APROBACIÓN MEMORIA

SEMINARIO DE GRADUACIÓN

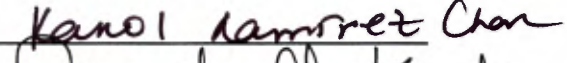
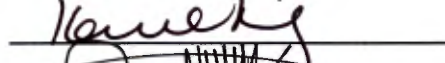
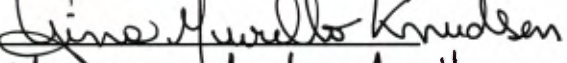

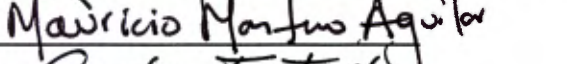

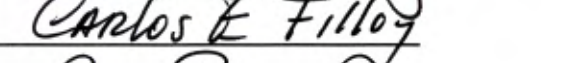
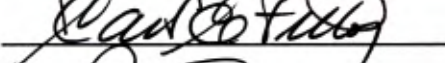
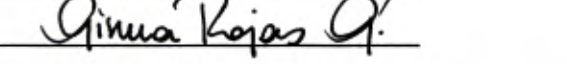
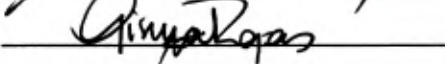
Nombre del proyecto: "Comparación del contenido bacteriológico (en fluido crevicular y saliva) y la condición nutricional de pacientes con periodontitis de la preclínica de periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica en el segundo semestre del 2019"

Sustentantes

Fecha: martes 10 de diciembre

Nombre:	Carné	Firma
Lucía Coto Chinchilla	B01989	
Mónica Fabian Montecinos	B32475	
Carolina Rivera Álvarez	B15427	
Melany Vargas Arroyo	B47284	
Vanessa Zamora Chacón	B27389	

Miembros del Tribunal

Nombre:	Firma:
	
	
	
	
	

## **Dedicatoria**

Este proyecto lo dedicamos a nuestras familias que durante nuestro proceso formativo siempre fueron ese apoyo tan importante, nos motivaron a seguir adelante desde el día uno en que iniciamos este viaje de aprendizaje.

A Dios por las bendiciones, la fortaleza y sabiduría en los momentos correctos, por guiarnos en este duro camino y poder permitirnos lograr una de nuestras metas.

A nuestros profesores por todo el conocimiento que nos transmitieron a lo largo de esta carrera.

Agradecemos a nuestros compañeros que estuvieron en los momentos difíciles, que nos brindaron ayuda, comprensión y paciencia durante los años en este proceso de formación profesional.



## Carta de filóloga

25 de noviembre del 2019.

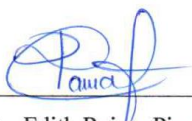
Señores  
Facultad de Odontología  
Universidad de Costa Rica

Estimados señores

La suscrita Edith Raissa Pizarro Alfaro con cédula de identidad N° 401780133, profesional en Filología, hace constar que revisó el documento denominado **“Comparación del contenido bacteriológico (en fluido crevicular y saliva) y la condición nutricional de pacientes con periodontitis de la preclínica de periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica en el segundo semestre del 2019”**, de las estudiantes Lucía Coto Chinchilla, Mónica Fabian Montecinos , Carolina Rivera Álvarez , Melany Vargas Arroyo y Vanesa Zamora Chacón, al cual se le aplicaron las revisiones y observaciones relacionadas con aspectos de construcción gramatical, ortografía, redacción, entre otros.

Dado lo anterior, certifico que el documento contiene las observaciones y correcciones solicitadas, quedando de conformidad con lo pactado.

Atentamente,



---

Licda. Edith Raissa Pizarro Alfaro  
Código del Colegio 3554



## Índice General

### CAPÍTULO I

1.1 Justificación.....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	2
1.3. Objetivos	
1.3.1. Objetivo General.....	2
1.3.2. Objetivos Específicos .....	3
1.4 Antecedentes.....	3

### CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2. 1. Características de salud periodontal y enfermedades periodontales.....	5
2.2. Etiología bacteriana en la enfermedad periodontal.....	8
2.3. Los macro y micronutrientes: ¿Qué son y por qué son importantes?.....	15
2.4. Deficiencias vitamínicas y su afectación periodontal.....	19
2.5. Deficiencias Nutricionales y enfermedad periodontal.....	24
2.6. Fluido crevicular gingival: importancia clínica y diagnóstica, protocolo clínico de obtención de FCG.....	27
2.7. Saliva como medio de recolección celular: cuál técnica utilizar.....	37
2.8. Técnicas de extracción de ADN y ARN: qué son y para qué se utilizan.....	44
2.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): reactivos, primers y secuencia de laboratorio.....	49
2.10 Técnica de Electroforesis capilar: QIAxcel .....	54

### CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1 Tipo de investigación.....	57
--------------------------------	----

3.2	Sujetos de investigación.....	57
3.3	Instrumentos de la investigación, recolección y procesado de las muestras.	
3.3.1	Protocolo para las muestras de fluido crevicular gingival.....	58
3.3.2	Protocolo para la extracción de ADN de muestras de fluido crevicular .....	59
3.3.3	Protocolo para la recolección de las muestras de saliva.....	60
3.3.4	Protocolo de extracción de ADN de las muestras de saliva.....	61
3.4.5	Cuestionario de frecuencia de consumo de dieta.....	69
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		
4.1	Resultados.....	71
4.2	Discusión.....	75
4.3	Conclusiones.....	80
4.4	Recomendaciones.....	81
CAPÍTULO V		
5.1	Cronograma de actividades del Seminario.....	82
5.2	Factores facilitadores / Obstáculos y dificultades.....	88
5.3	Referencias bibliográficas.....	90
5.4	Anexos.....	95

## Índice de Ilustraciones

<b>Figura 1.</b> Termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cyclor (Applied Biosystems, Wltham, MA).....	52.
<b>Figura 2.</b> Muestras de saliva en la centrifuga a 2500 rpm.....	61
<b>Figura 3.</b> NanoDrop 2000c.....	64
<b>Figura 4.</b> Muestra del ADN de las muestras de saliva tras la extracción.....	64
<b>Figura 5.</b> Preparación de las placas de muestras de ADN para llevar al termociclador.....	68
<b>Figura 6.</b> Fórmula para cuantificar la frecuencia de consumo de alimentos por paciente.....	70



## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Pureza y concentración de ADN en las muestras de saliva.....	65
<b>Tabla 2.</b> Volumen de distintos reactivos utilizados en la extracción de ADN de muestras de saliva.....	66
<b>Tabla 3.</b> Composición y temperatura de hibridación de los pares de primers.....	67
<b>Tabla 4.</b> Programa de amplificación del termociclador.....	68
<b>Tabla 5.</b> Estadísticos descriptivos de la edad según sexo.....	72
<b>Tabla 6.</b> Prevalencia de bacteria según medio de contraste.....	73
<b>Tabla 7.</b> Comparación de prevalencia según medio.....	73
<b>Tabla 8.</b> Estadística según sexo por grupo de alimento.....	74
<b>Tabla 9.</b> Estadística según IMC por grupo de alimento.....	75

## Índice de Abreviaturas

- TNF: factor de necrosis tumoral
- IL- 1: interleuquina 1
- PMNs: polimorfonucleares neutrófilos humanos
- IL-8: interleuquina 8
- ICAM-1: molécula de adhesión intercelular
- PGE-2: prostaglandinas 2
- FCG: fluido crevicular gingival
- LPMNN: leucocitos polimorfonucleares neutrófilos
- IFN-gama: interferón gama
- LDH: lactato dehidrogenasa
- AST: aspartato amino transferasa
- dNTP: desoxinucleótidos
- APR: Fase de Respuesta Aguda
- USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
- LPD: Células del ligamento periodontal
- FCG: Fluido crevicular gingival
- ATC: Sistema de clasificación anatómico
- TSG: Test de saliva global
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- CIBCM: Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular
- IMC: Índice de Masa Corporal

## Resumen:

En el presente proyecto de investigación se realizó una revisión bibliográfica de las generalidades de la enfermedad periodontal. Así como la relación entre microorganismos bacterianos presentes en saliva y fluido crevicular con la periodontitis. Al mismo tiempo se investigó acerca de los conceptos nutricionales para valorar si existe una relación de estos con la enfermedad periodontal.

Se realizó una extracción de muestras de líquido crevicular y enjuagues de saliva. Además de encuestas de valores de dieta en pacientes con enfermedad periodontal de la Preclínica de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica.

Las muestras fueron analizadas en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica, mediante la amplificación y extracción de ADN con la técnica de PCR y QIAxcel; finalizando con una comparación de los resultados de ambos fluidos y corroborando la relación de la periodontitis con el análisis de nutrición de cada persona.

Según los resultados encontrados en las pruebas de laboratorio las principales bacterias asociadas con la enfermedad periodontal fueron *Fusobacterium nucleatum* un 93% en fluido crevicular y un 87% en saliva, *Treponema denticola* en un 67% en fluido crevicular y saliva, *Prevotella intermedia* en un 40% en fluido crevicular y 33% en saliva. Y en cuanto al análisis nutricional no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el IMC y el estado de enfermedad periodontal.

Del estudio del año anterior se puede concluir que se obtuvo una gran cantidad de especies tanto en saliva como en fluido crevicular, con la diferencia de que la saliva presentaba mayor especificidad en cuanto a especies bacterianas, no así en el fluido crevicular, que presentó mayor diversidad de especies con menor cantidad de manifestaciones. Además, se determinó que, tanto para las bacterias por género como por especie, el uso de saliva o fluido crevicular es igualmente efectivo para la toma de muestras en enfermedad periodontal.

## **CAPÍTULO 1**

### **1.1. Justificación.**

Las enfermedades periodontales son de las patologías bucales más prevalentes en todo el mundo. (1) La periodontitis severa a escala mundial se encuentra entre un 5 y un 15% de la población. (2)

En Costa Rica, no se tienen estudios epidemiológicos respecto a la situación periodontal de la población, lo que dificulta el correcto abordaje de parte de los odontólogos para los y las costarricenses. (3)

Se desea realizar en un futuro un estudio epidemiológico a nivel nacional para determinar la presencia de bacterias periodontopatógenas en la población y la condición clínica. Estos estudios deben realizarse obteniendo muestras de los pacientes afectados, ya sea en el fluido crevicular gingival o en la saliva. Determinar cuál de los dos medios es más confiable para dicho estudio es parte de la interrogante que se trató de resolver.

La presente investigación, se basó en comparar muestras de fluido crevicular gingival y de saliva en pacientes con periodontitis de la Preclínica de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica, de agosto a octubre de 2019, para demostrar si existe similitud entre los microorganismos bacterianos presentes. Se pretendió relacionar los hallazgos microbiológicos de los pacientes con su condición nutricional y demás condiciones clínicas.

## **1. 2. Planteamiento del problema.**

Este proyecto de investigación se centró en el análisis de contenido bacteriológico en fluido crevicular gingival y la saliva, con el objetivo de poder demostrar o corroborar si pueden servir para protocolos de investigación de futuros estudios epidemiológicos, comparando cuál de las técnicas puede ser más confiable para un estudio de ese tipo.

Además de determinar si existe alguna relación entre la dieta y el estado nutricional y la presencia de enfermedad periodontal.

## **1.3. Objetivos**

### **1.3.1. Objetivo General**

- Comparar muestras de fluido crevicular gingival y de saliva de pacientes con periodontitis de la preclínica de periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica, de agosto a octubre de 2019, para demostrar cuál de las dos muestras es más confiable para estudiar los microorganismos bacterianos presentes, y también analizar si hay algún hallazgo relevante al relacionar la dieta y la nutrición de estos pacientes con la periodontitis.

### **1.3.2. Objetivos Específicos**

1. Detallar los métodos de recolección y análisis del muestreo de saliva en pacientes con periodontitis y estudiar los microorganismos presentes.
2. Describir los métodos de recolección y análisis del muestreo de fluido crevicular gingival en pacientes con periodontitis y estudiar los microorganismos presentes.
3. Relacionar los hallazgos microbiológicos en pacientes con periodontitis de la preclínica de periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica, de agosto a octubre de 2019, con la condición nutricional.

### **1.4 Antecedentes**

En su estudio previo, bajo la misma comparación, se utilizó la secuenciación del ARN 16S para el análisis de las muestras de ambos fluidos. Con el fin de hallar una técnica sencilla y de bajo costo, la cual obtenga la carga bacteriana más representativa, en el paciente con enfermedad periodontal. Las muestras de líquido crevicular fueron tomadas con puntal de papel mientras que las muestras de saliva con un enjuague de Listerine diluido. (4)

En el estudio mencionado anteriormente se obtuvo una gran cantidad de especies tanto en saliva como en fluido crevicular, con la diferencia de que la saliva presentaba mayor especificidad en cuanto a especies bacterianas, no así con el fluido crevicular que presentó mayor diversidad de especies con menor cantidad de manifestaciones. (4)

Además, Aguilar y colaboradores, pudieron comprobar la asociación que hay entre la saliva y el fluido crevicular gingival, y se verifica que ambos medios pueden ser utilizados de manera confiable. Tanto para las bacterias por género como por especie, se contempla cómo el uso de saliva o fluido crevicular es igualmente efectivo para la toma de muestras en enfermedad periodontal. (4)

Se ha descubierto la importancia de la biología molecular en el estudio de distintas enfermedades, como lo es la enfermedad periodontal. De esta manera es conocido que, en ella, su magnitud, su curso y el nivel de destrucción, son determinadas por la interacción del microorganismo con el tejido y su respuesta inmunitaria. (5)

Gracias a estos avances se conoce la capacidad de regular de forma negativa la expresión de IL-8 y ICAM-1 de *P. Gingivalis*. Así como el descubrimiento de que los patógenos periodontales tienen diferencias fenotípicas al momento de causar una periodontitis. (5)

La línea de estudio presente tiene como objetivo determinar el protocolo y resultado obtenido de muestras de fluido crevicular, saliva y su correspondiente comparación. Todo esto con una revisión bibliográfica de las generalidades en la enfermedad periodontal y así analizar los marcadores inmunoinflamatorios en técnicas de biología celular y molecular. (6)

## **CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO**

### **2. 1. Características de salud periodontal y enfermedades periodontales**

El periodonto de soporte dental está formado por un complejo de múltiples tejidos, incluyendo cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar. (7)

La Organización Mundial de la Salud define la salud periodontal como el estado libre de enfermedades periodontales inflamatorias que permiten que una persona funcione normalmente y no sufra ninguna consecuencia (mental o física) como resultado de una enfermedad pasada. Sin embargo, Bartold y Lang, proponen una definición más práctica: “Es el estado libre de enfermedad periodontal inflamatoria”, tomando en cuenta que la salud periodontal puede existir antes de iniciar la enfermedad, así como restaurarse en un periodonto anatómicamente reducido. (8)

Para determinar el estado de salud periodontal se debe de tomar en cuenta el sangrado al sondeo como principal parámetro para determinar la inflamación gingival. (9) Se debe realizar una presión en la pared lateral del surco periodontal, ejerciendo una presión de no más de 0,25 N, para evitar falsos positivos. Los sitios sangrantes, se asocian con un porcentaje significativamente mayor de células y tejido conectivo reducido en colágeno. Los sitios que no sangran al sondeo se podrían considerar clínicamente sanos y periodontalmente estables. La profundidad del sondeo, el nivel del epitelio de unión y la altura ósea en piezas aisladas no representan evidencia de enfermedad periodontal. (8)

Bartold y Lang, proponen criterios clínicos para diferenciar el estado de salud prístina de la salud periodontal clínica; en la salud clínica prístina, no se observa pérdida



del epitelio de unión, ni sangrado al sondeo, no hay presencia de edema, eritema o pus y la profundidad del sondeo es de >3 mm, mientras que en el estado de salud clínica periodontal, existe ausencia o niveles muy bajos de indicadores clínicos de inflamación, como sangrado al sondeo y marcadores inflamatorios en el líquido crevicular, sin embargo, se observa un periodonto intacto o reducido; además, los factores modificadores y predisponentes del huésped se encuentran controlados en ambos casos. Posterior al tratamiento de una enfermedad periodontal, el periodonto puede permanecer intacto, en el caso de gingivitis, o reducido, en la periodontitis, por lo que se considera al individuo en un estado de salud clínica periodontal, nuevamente. (8)

Por lo tanto, en la nueva clasificación de enfermedades y condiciones periodontales y periimplantares de 2017, se incorpora la periodontitis con periodonto reducido dentro de la clasificación de salud periodontal, siendo los factores modificadores y predisponentes del huésped los principales determinantes entre el estado de estabilidad de enfermedad periodontal, donde estos están controlados o enfermedad periodontal en remisión o control, en la cual, estos no se encuentran totalmente controlados. (8)

La pérdida del estado de salud periodontal e inicio de la enfermedad, es de origen multifactorial, donde la microbiota subgingival, el sistema inmune del huésped, las respuestas inflamatorias y los factores modificadores del entorno interactúan entre sí. (8)

Sin embargo, tanto las enfermedades y condiciones gingivales, como la periodontitis, pueden ser inducidas por placa dental o no inducidas por esta. En la primera, al perderse la armonía de los organismos comensales por la acumulación de

placa dental, inicia la disbiosis entre la microbiota y el sistema inmune del huésped, provocando un crecimiento más violento de los componentes y la activación de proteinasas derivadas del huésped que provocan la pérdida del epitelio de unión, y la propagación apical de la placa bacteriana a lo largo de la superficie de la raíz (8,10) potenciada por tres determinantes principales:

1. Factores modificadores del entorno: Fumado, medicamentos, estrés, nutrición.

2. Factores determinantes del huésped:

- Factores modificadores sistémicos: agentes o condiciones que alteran la forma en la que el huésped responde a la acumulación de placa dental (función inmune, salud sistémica, genética).
- Factores predisponentes locales: agentes o condiciones que contribuyen a la acumulación de placa dental (bolsas periodontales, restauraciones dentales, anatomía radicular, posición dental y apiñamiento, fenotipo gingival, recesiones, frenillo alto o mala inserción muscular, coloración anormal). (8)

3. Microbiota oral: Composición de la placa subgingival y supragingival

- Las enfermedades gingivales no inducidas por placa representan manifestaciones orales de condiciones sistémicas o desórdenes médicos que son clínicamente potenciadas por acumulación de placa e inflamación gingival subsecuente, dentro de las que se clasifican: anormalidades genéticas, infecciones específicas, lesiones y condiciones inmunes e inflamatorias, procesos reactivos, neoplasmas,

enfermedades nutricionales, endocrinas y metabólicas, lesiones traumáticas y pigmentaciones gingivales. (11)

## **2.2. Etiología bacteriana en la enfermedad periodontal**

La periodontitis es una enfermedad multifactorial. (12) La placa bacteriana es el factor iniciador, pero a la vez influyen una variedad de causas y factores de riesgo como: factores sociales, de comportamiento, psicológicos, genéticos, sociodemográficos composición microbiana de la placa, factores dentales, factores endocrinos, enfermedades sistémicas, enfermedades genéticas y problemas de higiene. (12)

Al ser una enfermedad multifactorial, su tratamiento es complejo, 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. Esta enfermedad es iniciada por un desafío bacteriano, creando a su vez, una inflamación crónica en los tejidos periodontales que ocasiona una destrucción de estos, y es impulsada por una compleja respuesta desequilibrada del huésped al desafío bacteriano. (12)

### **La etiopatogénesis de la Enfermedad Periodontal**

La enfermedad periodontal comienza cuando las bacterias producen factores de virulencia y estos van a entrar en contacto con las células del epitelio de unión que son las que producen defensinas y citoquinas pro-inflamatorias. (13) La citoquina IL-1 y TNF generan cambios a nivel vascular provocando un incremento del calibre de los vasos sanguíneos e inducen la expresión de proteínas de adhesión celular. (13)

Por otra parte, se produce la citoquina IL8, que presenta actividad quimiotáctica para PMNs, siendo estos atraídos al sitio donde se acumulan las bacterias. (13) Estos salen de los vasos sanguíneos y se acumulan en el tejido conectivo cercano al surco provocando alteración del tejido conectivo adyacente al epitelio de unión. No obstante, el agente infeccioso es controlado, durante el proceso, provocando una disminución y estableciendo un balance de la respuesta inmune. (13)

Después de estimular la respuesta inmune innata, se desencadena la respuesta inmune adaptativa y aparecen en el tejido conectivo linfocitos T CD4 y linfocitos B, ayudando a resolver el proceso inflamatorio. Los linfocitos tienen un tiempo de activación entre 5 y 7 días, por lo tanto, una buena respuesta innata es fundamental para mantener la salud periodontal. (13)

Pero a medida que avanza este proceso inflamatorio, se va volviendo crónico y comienza la degradación de los tejidos de soporte, dando como resultado la formación de la bolsa periodontal, pérdida de inserción clínica y pérdida ósea. (13)

Al ser el factor bacteriano tan importante para el inicio de la enfermedad se debe tener en cuenta que 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 comportan como patógenos. (14)

Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de más de 200 especies bacterianas que, por infestación metastásica, pueden llegar a diferentes órganos anatómicos y ocasionar cambios patológicos. Se debe destacar que entre las

propiedades de las bacterias se encuentran: la adherencia a las células huésped, la invasividad, toxigenicidad y capacidad para evadir el sistema inmunitario del huésped.

(14)

Al hablar de la periodontitis como enfermedad infecciosa se debe dar la presencia y multiplicación de microorganismos en el cuerpo. Hoy se sabe que para que aparezca esta infección, es necesario que intervengan una serie de bacterias, que se acumulan y producen factores de virulencia, por medio de los cuales van dañando los tejidos.(15)

Los factores de virulencia que presentan las bacterias son: (14)

- La cápsula: compuesta por polisacáridos, enmascara las bacterias de los fagocitos, razón por la cual es un factor antifagocitario.
- Las fimbrias: compuestas por la proteína llamada pilina, la cual le permite a la bacteria adherirse fuertemente a las superficies que más la favorecen, bien sea por nutrientes o por falta de defensa orgánica.
- Presencia de receptores: son aquellas proteínas de carga negativa que poseen las bacterias en su superficie; estas le permiten adherirse a los tejidos orgánicos de cargas positivas. Esto les posibilita a los microorganismos evitar las fuerzas de desplazamiento a que pueden estar sometidos.
- Producción de adhesinas: son sustancias de naturaleza glucopeptídica que les permiten a las bacterias adherirse químicamente a la fibronectina (proteína orgánica que recubre los tejidos), aunque esta físicamente trate de rechazarlas.
- Producción de polisacáridos extracelulares de alto peso molecular por parte de algunas bacterias, que lo hacen a partir de la sacarosa que se ingiere en exceso y

se queda en la placa o en los espacios retentivos de los dientes. Gracias a la acción de exoenzimas (de acción extracelular) originan mután, o dextrán (que son glucanos) y leván que es un fructano soluble. El mután o mutano es muy adhesivo y les permite a muchas bacterias resistir las fuerzas de desplazamiento; por su parte los dextrans y levanos usualmente son reserva alimenticia bacteriana.

- Endotoxinas: son los lipopolisacáridos que forman parte integral de la pared de los gram negativos y al liberarse con la muerte del microorganismo, tienen efectos tóxicos.

Las bacterias presentan algunos elementos en las estructuras que ayudan en su ataque al periodonto, algunos de ellos son: (14)

- Adhesinas: contribuyen a la adhesión, agregación y congregación.
- Endotoxinas: activan la vía alterna del complemento y los macrófagos; además, provocan daño tisular y reabsorción ósea.
- Cápsulas y proteínas superficiales fijadoras de inmunoglobulinas (Ig) con efecto antiopsónico y de bloqueo de fagocitosis.
- Flagelos y estructuras relacionadas: favorecen la penetración subepitelial de las bacterias.
- Coagulasa lisa: crea una cubierta de fibrina alrededor de las bacterias y las protege de la acción fagocítica.
- Exotoxinas: especialmente las leucotoxinas que destruyen polimorfonucleares (PMNs) y las epiteliotoxinas que favorecen la penetración subepitelial. (14)

Existen varias clasificaciones para denotar las bacterias presentes en cavidad oral. (16) Según Socransky y colaboradores esta clasificación incluía la presencia de seis grupos microbianos dentro de la placa dental, a los que asignaron un código de colores en función de su patogenicidad: (16)

- Complejo Azul: especies de *Actinomyces*.
- Complejo Amarillo: bacterias del género *Streptococcus*.
- Complejo Verde: especies de *Capnocytophaga*, *A. actinomycetemcomitans* serotipo a, *E. corrodens* y *Campylobacter concisus*.
- Complejo Púrpura: *Actinomyces odontolyticus*, *Veillonella párvula*.
- Complejo Naranja: *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter showae*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* y *Streptococcus constellatus*.
- Complejo Rojo: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*.
- Sin complejo: *A. actinomycetemcomitans* serotipo b.

Las especies del complejo azul son colonizadores iniciales del surco gingival y forman parte de la flora supragingival normal. Pueden presentarse en pacientes sanos e incluso en pacientes sin dientes. (16)

En el complejo naranja las especies preceden a la aparición de los periodontopatógenos y favorecen la formación de biocapas de especies más patógenas, especialmente *Fusobacterium* y *Prevotella*. (16)

El predominio del complejo naranja y rojo se basa en que las especies son más prevalentes en la placa subgingival que supragingival, la cual es la principal diferencia entre salud y enfermedad. (15) 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*. (17)

Al referirse al Género *Porphyromonas* estos son bacilos pleomórficos o cocobacilos, inmóviles, no esporulados. Comprende doce especies, pero solo tres se han aislado de la cavidad bucal del hombre; *P. gingivalis*, *P. endodontalis* y *P. asaccharolytica*. (17)

*P. gingivalis*, ha sido considerada una bacteria periodontopatógena por excelencia. (17) Se aísla del surco gingival especialmente cuando no existe una buena salud periodontal, y se ha asociado especialmente con la progresión de la periodontitis crónica en el adulto.<sup>11</sup> También se ha observado la presencia de elementos estructurales favorables para su patogenicidad; por ejemplo, fimbrias, que se comportan como adhesinas, que intervienen en el proceso de adhesión a tejidos del hospedero y en la coagregación bacteriana; hemaglutininas, que participan en la aglutinación de hematíes en los inicios de la colonización tisular; residuos proteicos, glucídicos y de lipopolisacáridos, que contribuyen a los procesos de adhesión a células epiteliales, y a la coagregación con otras bacterias; cápsula, cuya acción es fundamentalmente antifagocítica y vesículas superficiales, que participan en la captación de nutrientes. (17)

En cuanto al Género *Prevotella* estas especies son bacilos cortos, pleomórficos, generalmente de 0,4um por 0,6 a 1um de longitud, inmóviles, no esporulados. Capaces



de producir pigmentos, moderadamente fermentativos, sensibles a la bilis y resistentes a la vancomicina. Al igual que *Porphyromonas*, son exigentes en cuanto a Vitamina K, hemina y sangre para su crecimiento. Existe gran cantidad de subtipos, de las cuales las especies más implicadas en la periodontitis son *P. intermedia*, *P. loescheii* y *P. melaninogenica*, en las que se han descrito fimbrias, como adhesinas, que intervienen en la adhesión y coagregación bacteriana. (17)

Respecto al Género *Bacteroides* estos son bacilos pleomórficos, anaerobios estrictos, inmóviles, no esporulados, no fermentativos y que no crecen en bilis. Se encuentran una gran variedad de especies ubicadas en este grupo, pero en la cavidad oral solo se presentan o ven implicadas tres: *B. capillosus*, *B. heparinolyticus* y *B. forsythus*. (17)

El Género *Fusobacterium* se caracteriza por inducir bacilos largos fusiformes, inmóviles, no esporulados y generalmente no fermentativos. La producción de ácido butírico como principal producto metabólico permite diferenciar *Fusobacterium* de *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Bacteroides*. (17)

Se han descrito varias especies que habitan en el surco gingival, entre ellas las más comunes son *F. nucleatum*, *F. naviforme*, *F. periodonticum*, *F. alocis* y *F. sulci*. Estas especies han sido relacionadas con la enfermedad periodontal, sin embargo, su significado como patógenos es dudosa. Su poder patógeno está asociado a la presencia de fimbrias, lipopolisacáridos, a la producción de factores solubles inhibidores de la quimiotaxis de los polimorfonucleares y a la elaboración de metabolitos que se comportan como compuestos tóxicos tisulares. (17)

Es importante destacar y tener presente que en la cavidad oral se encuentran bacterias con predominio de *estreptococos* orales de hasta un 82% que se encuentran en equilibrio. Una vez que se rompe, es cuando surgen las enfermedades gingivales ligadas a placa que desencadenan el proceso inflamatorio. (18)

### **2.3. Los macro y micronutrientes: ¿Qué son y por qué son importantes?**

Los macronutrientes son nutrientes necesarios para el crecimiento, metabolismo y otras funciones del cuerpo. Estos son la principal fuente de energía y constituyen la mayor reserva energética del cuerpo. (21)

El organismo necesita una mayor cantidad de macronutrientes (gramos) que de micronutrientes para funcionar correctamente. Dentro de los macronutrientes se incluyen: carbohidratos, grasas y proteínas. (22) Los carbohidratos proveen 4 calorías por gramo, las proteínas proveen 4 calorías por gramo y las grasas proveen 9 calorías por gramo. (21)

Según la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y agricultura también se debe de mencionar que el agua constituye una gran parte de nuestro peso corporal, y es uno o el más importante componente de los fluidos corporales de los seres humanos. El cuerpo la necesita en mayor cantidad que cualquier otro nutriente. El organismo repone esa agua por medio de alimentos y líquidos que bebemos cada día. El agua también tiene las funciones de transporte de nutrientes a las células, eliminación de desechos a través de la orina, regulación de la temperatura corporal y el equilibrio iónico de la sangre. El agua es esencial para el correcto funcionamiento metabólico, lubricación y amortiguación.

De acuerdo con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) los carbohidratos son los macronutrientes que el cuerpo necesita en mayor cantidad, debe de ser de un 45-65%. Son la mayor fuente de energía del cuerpo y son fácilmente usados. Todos los tejidos y celulares del cuerpo utilizan glucosa para poder producir energía. Son utilizados por el sistema nervioso central, riñones, cerebro, corazón y músculos para poder desarrollar sus funciones apropiadamente. Pueden estar almacenados en músculo e hígado para ser luego utilizados en forma de energía. Son importantes para la salud intestinal y para la excreción de desechos. Se encuentran principalmente en: granos, frutas, papas, leche, yogurt, entre otros como vegetales y semillas en diferentes cantidades. (21)

De acuerdo con la USDA, del 10 al 35% de las calorías que se consumen deben de provenir de las proteínas, se necesitan para: crecimiento especialmente en niños, adolescentes y mujeres embarazadas; reparación celular; función inmune; producción de hormonas esenciales y enzimas; para proveer energía cuando no se cuenta con suficientes carbohidratos y para preservar la masa muscular. Se encuentran en carnes, pescado, leche, queso, semillas, legumbres. Cuando se consumen proteínas el cuerpo las rompe y las convierte en aminoácidos. Algunos de estos aminoácidos son esenciales, lo que significa que los obtenemos de la dieta mientras que otros son no esenciales, los produce el cuerpo. Las proteínas que se obtienen de origen animal contienen todos los aminoácidos esenciales que se necesitan, las proteínas de origen vegetal no contienen todos estos aminoácidos esenciales. (21)

Aunque las grasas cuentan con una mala reputación de hacer ganar peso, son necesarias. De acuerdo con la USDA se necesita de un 20 a un 35%. Para favorecer un

crecimiento y desarrollo normales, energía, absorción de ciertas vitaminas como lo son A, D, E, K y carotenos, dar protección a ciertos órganos, mantenimiento de membranas celulares y proveer el sabor, consistencia y estabilidad a las comidas. Las grasas se encuentran en carnes, nueces, leche, mantequilla, aceites, pescado, granos y aderezos de ensaladas. (21)

Hay tres tipos de grasas: las grasas saturadas, presentes en alimentos como carnes, mantequillas y cremas. Las insaturadas, que se encuentra en el aceite de oliva, aguacates, nueces, aceite de canola. Las grasas trans, se encuentran en snacks, comidas fritas y repostería. El reemplazar las grasas saturadas y trans por grasas insaturadas reduce el riesgo de padecer de problemas cardiacos. (21)

Según el Consejo Americano de Ejercicio los micronutrientes incluyen los minerales y las vitaminas. A diferencia de los macronutrientes, el organismo los requiere en cantidades muy pequeñas. Estos son extremadamente importantes para la actividad normal del cuerpo y su función principal es la de facilitar muchas reacciones químicas que ocurren en el cuerpo. Los micronutrientes no le proporcionan energía al cuerpo.

Las vitaminas son esenciales para el funcionamiento normal del metabolismo (crecimiento y desarrollo) y la regulación de la función celular. Las vitaminas, enzimas y otras sustancias son esenciales para mantener la salud del cuerpo. (23) Las vitaminas liposolubles (solubles en grasa), cuando son producidas en exceso se almacenan en los tejidos grasos del cuerpo. El exceso de las vitaminas solubles en agua se elimina a través de la orina y por esto, se deben consumir todos los días. (23)

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAO) las vitaminas solubles en agua incluyen la vitamina B y C, presentes en las verduras de hoja verde son ricas en vitamina B, mientras que la vitamina C se encuentra en abundancia en las frutas cítricas. Las vitaminas liposolubles incluyen las vitaminas A, D, E y K, que se pueden encontrar en los vegetales de hoja verde, la leche y los productos lácteos y los aceites vegetales.

Los minerales se encargan de regular la actividad de enzimas en el cuerpo, mantener el equilibrio ácido-base. Muchos minerales se encuentran en el cuerpo al igual que se obtienen en las comidas. La capacidad del cuerpo de utilizar minerales depende de la biodisponibilidad que tengan. Casi todos los minerales con excepción del hierro se absorben en su estado natural. Aproximadamente el 4% de la masa del cuerpo se compone de minerales. (23)

Los minerales se encuentran en forma ionizada en el cuerpo. Se clasifican de la siguiente forma: (23)

1. Macrominerales: calcio, potasio, hierro, sodio y magnesio. El hierro es un componente de la hemoglobina que está presente en la sangre.
2. Micro-minerales (o minerales traza): cobre, zinc, cobalto, cromo y fluoruro. En su mayoría cofactores necesarios para la función de las enzimas en el cuerpo.

El organismo necesita mayor cantidad de macro-minerales que de micro-minerales. Una consideración importante en cuanto al consumo de minerales particularmente cuando las personas toman suplementos minerales, es la posibilidad de que haya algún tipo de interacción no beneficiosa. Los minerales pueden interferir en la

absorción de otros minerales, por ejemplo la absorción de zinc se puede ver afectada cuando se consumen suplementos de hierro. (23)

#### **2.4. Deficiencias vitamínicas y su afectación periodontal**

Los nutrientes desempeñan un importante papel regulador en la preservación de la salud del cuerpo humano y de todos los tejidos metabólicamente activos. Los micronutrientes, las vitaminas y los antioxidantes desempeñan un papel esencial en los procesos regenerativos constantes, para enfrentar el estrés oxidativo y también para las respuestas inmunitarias adecuadas. En la salud bucal, la desnutrición o la malnutrición, en relación con ciertos componentes de los alimentos, puede provocar defectos en los tejidos dentales duros, la mucosa oral y el periodonto. (24)

Los hábitos nutricionales sanos y un suministro suficiente de vitaminas y minerales esenciales son de considerable importancia para la salud bucal. Por ejemplo, en el caso de los procesos inflamatorios, es importante una respuesta inmune rápida, que solo puede tener lugar de manera efectiva cuando hay un suministro suficiente de alimentos y micronutrientes para el cuerpo. Las enfermedades del periodonto, como la gingivitis y la periodontitis, son infecciones locales o generalizadas, que generalmente resultan en una reacción inflamatoria local. (24)

#### **Vitamina C**

La vitamina C es esencial para la formación y maduración del colágeno, y para la integridad de los tejidos conectivo, osteoide, y la dentina. Además, también es necesario para mantener las funciones adecuadas del sistema inmunológico. Una deficiencia de

vitamina C puede provocar escorbuto o interferir con la curación normal de las heridas.  
(24)

La importancia del ácido ascórbico, más conocido como vitamina C, para la salud periodontal se conoce desde hace mucho tiempo. Los marineros en el siglo XVIII a menudo sufrían de escorbuto, la enfermedad por deficiencia de vitamina C, asociada con el sangrado de las encías y la pérdida de los dientes. (25)

El papel de la vitamina C es promover la síntesis de una red de colágeno maduro normal mediante la prevención de la oxidación de lisil y prolilhidroxilasa dependiente del hierro y la protección de estas enzimas contra la autoinactivación. (25)

Las células del ligamento periodontal (LPD) están compuestas por células fibroblásticas y células mineralizadas formadoras de tejido, derivadas de tejidos fibrosos y conectivos que unen los dientes al hueso. Un gran porcentaje de las células se diferencian en fibroblastos; y una proporción sustancial de las células exhibe una respuesta osteogénica a la estimulación apropiada. Las células LPD comparten algunas propiedades con los osteoblastos como la alta actividad de la fosfatasa alcalina, la producción de proteínas asociadas al hueso (incluida la osteopontina, la osteocalcina, la sialoproteína ósea y la proteína morfogenética del hueso y la formación de nódulos mineralizados). Los mediadores de las respuestas osteogénicas en estas células aumentan la expresión de fosfatasa alcalina, colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, sialoproteína ósea y aumentan la formación de nódulos mineralizados en células del LPD. Debido a que el LPD está compuesta por células con diferentes funciones fisiológicas, es probable que los diversos fenotipos celulares muestren respuestas

variadas al ácido ascórbico. Al igual que las células osteoblásticas, las células del LPD formadoras de hueso que recubren la lámina dura pueden sufrir una diferenciación adicional en presencia de ácido ascórbico. En contraste, las células LPD fibroblásticas pueden responder al ácido ascórbico al aumentar la expresión de colágeno y colagenasa, manteniendo un alto estado de recambio de la matriz necesario para remodelar activamente un tejido como el LPD. (25)

Se ha sugerido que los altos niveles de ácido ascórbico alcanzables en los leucocitos contribuyen a la capacidad de estas células para reaccionar a los estímulos inflamatorios. (25)

## **Vitamina E**

La suplementación con vitamina E adyuvante mejora la curación periodontal y la defensa antioxidante. (26)

Es un agente soluble en grasa presente en todas las membranas celulares, que inhibe el daño oxidativo en los lípidos de la membrana. Presenta propiedades antiinflamatorias al reducir la producción de PGE2 de los macrófagos y mejorar la respuesta inmune humoral. Teniendo en cuenta sus posibles roles en el proceso inflamatorio, ambas vitaminas, C y E han sido investigadas por su uso complementario en pacientes con gingivitis y periodontitis. (27)

Una pequeña o ninguna mejora clínica significativa en el uso complementario de la vitamina E o la vitamina C se mostró cuando se aplicó como un solo componente, a pesar de los beneficios en los niveles séricos de marcadores de capacidad antioxidante.



Dado que muchas especies reactivas de oxígeno (ej radicales libres) se formaron en la fase acuosa, la vitamina E puede tener acciones limitadas como antioxidante en comparación con la vitamina C debido a su falta de solubilidad en agua y movilidad limitada a las membranas celulares. Sin embargo, se pueden esperar eventos sinérgicos cuando se combina la vitamina C, ya que se ha demostrado que reduce los radicales de la vitamina E creados después de eliminar los radicales de oxígeno. Las interacciones entre estas dos vitaminas tuvieron lugar tanto en la solución acuosa homogénea como en los ambientes de membrana liposomal, lo que puede proporcionar evidencia de las ventajas para el uso mixto de vitaminas C y E. (27)

### **Vitamina B**

El complejo de vitamina B comprende ocho vitaminas diferentes, que difieren considerablemente, tanto en su composición química como en sus propiedades farmacológicas. Las vitaminas B son necesarias como precursores importantes de varias coenzimas en los procesos metabólicos. (24)

### **Vitamina D**

La vitamina D regula el metabolismo del calcio del cuerpo humano y mantiene niveles suficientes de calcio y fosfato en el suero para la mineralización de los huesos. Se ha observado un efecto beneficioso en el curso de una periodontitis crónica después de un año de suplementos de vitamina D y calcio. (24)

Actualmente se sabe que un suministro adecuado de vitamina D y calcio son esenciales para el desarrollo óptimo del esqueleto y para mantener la masa ósea (25)

Se concluyó que vitamina D puede reducir la susceptibilidad a la inflamación gingival a través de su efecto antiinflamatorio.

En el grupo de sujetos que recibieron terapia de mantenimiento periodontal con complementos de vitamina D y calcio, hubo una tendencia hacia una mejor salud periodontal. (25)

Los niveles séricos de vitamina D juegan un papel importante en la homeostasis oral, y las disfunciones en el metabolismo de la vitamina D están asociadas con la enfermedad periodontal. Un nivel adecuado de vitamina D en suero, medido por 25-hidroxivitamina D (25 (OH) D), se considera  $\geq 20$  ng / ml, se ha sugerido que  $> 30$  ng / ml puede ser el nivel óptimo para la salud general. (28)

La insuficiencia de vitamina D desempeña un papel en las patologías dentales (formación alterada) y óseas orales (formación alterada, enfermedad periodontal y osteonecrosis de la mandíbula), cuyos mecanismos se basan en el comportamiento específico de las células orales y las células dentales, que responden a la vitamina D.

Las células epiteliales orales son capaces de convertir la vitamina D inactiva en la forma activa de 25 (OH) D, que se ha demostrado que induce la expresión del péptido antimicrobiano LL-37 y otros mediadores de defensa del huésped. Esto puede representar un mecanismo por el cual la vitamina D mejora las defensas inmunitarias innatas contra las bacterias patógenas periodontales. De hecho, otro estudio encontró que los rangos óptimos de la vitamina D sérica pueden reducir la susceptibilidad a la inflamación gingival y que la gingivitis puede ser un modelo clínico útil para evaluar los efectos antiinflamatorios de la vitamina D. Este resultado fue apoyado por los resultados

de un ensayo clínico aleatorizado más reciente, que mostró que la vitamina D tiene un efecto antiinflamatorio dependiente de la dosis en la gingivitis. Además, la vitamina D también puede reducir la enfermedad periodontal a través de sus efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores generales. (28)

Además de la vitamina D, el calcio también se ha asociado con una menor incidencia de periodontitis, probablemente por la prevención de la pérdida de hueso alveolar y una mejor dentición natural, es decir, el mayor consumo de calcio se asocia con una menor pérdida de dientes. (29)

Por lo tanto, la nutrición también puede desempeñar un papel importante en la patogénesis y el manejo de la periodontitis. De manera general se concluye que la evaluación de la literatura revisada mostró que la enfermedad periodontal se asocia con niveles bajos de suero / plasma de varios micronutrientes, principalmente vitamina D, vitamina C y otros antioxidantes. (25)

## **2.5. Deficiencias Nutricionales y enfermedad periodontal**

La sinergia entre la nutrición y la salud oral es indudable. La función masticatoria puede influenciar la manera en que se alimenta el ser humano y su estado nutricional, así como la dieta puede hacer la diferencia entre una buena o deficiente salud oral. (30)

Relación entre la nutrición y la integridad del periodonto:

El estado nutricional puede condicionar la respuesta inflamatoria y la reparación de tejidos. La inflamación crónica presente en la enfermedad periodontal progresa más rápidamente en un estado de desnutrición, debido al estado inmunológico del individuo.

La fase de respuesta aguda es el principal efecto a nivel sistémico del proceso inflamatorio, en ella las citoquinas pro- inflamatorias estimulan las células hepáticas. Así también se da la síntesis de proteína C-reactiva. (30)

La fase de respuesta aguda es la interacción de la nutrición y la respuesta inflamatoria de la infección. Además, se da la producción de mediadores inflamatorios como IL-1 y TNF- $\alpha$ , proliferación de células inmunitarias que varía como el organismo aprovecha los macronutrientes, así como el aumento de consumo de vitaminas y minerales por parte de la célula. (30)

Un aumento en la producción de radicales de oxígeno reactivo se relaciona con la enfermedad periodontal, que al no metabolizarse por completo se asocian con la pérdida de función y mutaciones, dando como resultado el daño celular. (30)

Un factor relevante por tomar en cuenta es la relación existente entre la escasa absorción de calcio y vitamina D y el riesgo de presentar la enfermedad periodontal. Así también se ha relacionado la deficiencia de vitamina C con la periodontitis por defectos en las membranas basales, en el colágeno y el hueso alveolar. (30)

“El diagnóstico de las deficiencias nutricionales es difícil y, a menudo, no se detecta hasta que aparecen signos avanzados; se ha de tener en cuenta, además, que, debido a que los micronutrientes suelen coexistir en los alimentos, es infrecuente que se produzcan deficiencias aisladas; lo habitual es que estas sean combinadas. Frecuentemente los signos primarios de algunas deficiencias nutricionales se hallan en la cavidad oral.” (30)

### **Deficiencias Vitamínicas en cavidad oral según Stifano:**

- Calcio y vitamina D: Relacionado con la pérdida de hueso alveolar.
- Hierro: Modificación en mucosa bucal y esofágica.
- Zinc: Función inmunitaria y reparación tisular.
- Vitamina C: Participa en procesos de detoxificación y procesos reparativos.
- Vitamina B 12: Glositis dolorosa, atrofia de papilas linguales, mucosa oral fina y eritematosa, gingivitis.
- Vitamina B2: Estomatitis, queilitis.
- Vitamina A: Xeroftalmia, xerostomía y susceptibilidad a las infecciones en mucosas.

La combinación de un adecuado estado nutricional y la remoción de estímulos inflamatorios periodontales son de gran importancia para disminuir el riesgo de sufrir enfermedad periodontal. En un estado de desnutrición el sujeto presenta hipofunción de las glándulas salivales, deficiencias inmunitarias y cambio en el microbiota a organismos anaerobios; lo cual repercute negativamente el periodonto. (30)

### **Importancia de las Vitaminas en la salud periodontal según Najeeb: (25)**

- Vitamina B: Acelera el sanado post-cirugía.
- Vitamina C: Mejora los resultados del tratamiento periodontal.
- Vitamina D: Acelera el sanado post- cirugía y osteointegración.
- Vitamina E: Curación de la gingiva deteriorada.
- Vitamina K: Su deficiencia puede conducir a sangrado gingival.

## **Importancia de los Minerales en la salud periodontal según Najeeb: (25)**

- Calcio: Requerido en formación de dientes y huesos. Mejora resultados de tratamiento periodontal no quirúrgico.
- Magnesio: Metabolismo celular y formación de hueso. Mejora resultados de tratamiento periodontal no quirúrgico.
- Hierro: Efecto antioxidante en el periodonto.
- Zinc: Efecto antioxidante en el periodonto.
- Flúor: Previene la caries dental.

## **2.6. Fluido crevicular gingival (FCG): importancia clínica y diagnóstica, protocolo clínico de obtención de FCG**

Durante muchos años el diagnóstico de la enfermedad periodontal se ha basado en métodos clínicos y radiográficos. Recientemente se utilizan métodos inmunológicos o bioquímicos con el objetivo de estudiar la respuesta inflamatoria del huésped. (31)

Las bacterias anaerobias Gram negativas, sus productos y constituyentes (como los lipopolisacáridos), son los responsables de crear el proceso infeccioso de la enfermedad periodontal. (31)

El fluido crevicular gingival (FCG) es un fluido fisiológico, así como un exudado inflamatorio que se origina en el plexo gingival de los vasos sanguíneos en el corion gingival, subyacente al revestimiento del epitelio del espacio dentogingival. Originalmente, la mayoría de los investigadores clasificaron el FCG como un exudado inflamatorio. Sin embargo, hay evidencia que sugiere que el FCG del tejido clínicamente

normal es un transudado sérico alterado que solo se convierte en un exudado inflamatorio cuando la enfermedad está clínicamente presente. (32)

El líquido crevicular gingival se origina en los vasos del plexo gingival de los vasos sanguíneos y fluye a través de la membrana basal externa y el epitelio de unión para llegar al surco gingival. Se ha demostrado que el FCG puede aislarse de un surco sano, aunque solo en pequeñas cantidades. En el periodonto sano, el FCG representa el trasudado del líquido intersticial del tejido gingival producido por un gradiente osmótico. Sin embargo, los infiltrados leucocíticos se ven en todo el epitelio de unión y los PMN siempre se pueden encontrar en el surco, incluso en situaciones clínicamente saludables donde el flujo de FCG es relativamente bajo. (32)

Los productos bacterianos y las citoquinas derivadas del epitelio, activan también a las células mononucleares del tejido que da forma a la respuesta inmune local. En la enfermedad periodontal, las citoquinas no son solamente un importante mediador de la defensa del líquido del surco, sino también son un mediador de la destrucción de los tejidos. Se sabe que las interleuquinas (IL) 1 $\alpha$  y 1 $\beta$  incrementan la fijación de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (LPMNN) y monocitos a las células endoteliales, estimulan la producción de prostaglandinas y la liberación de enzimas lisosomales, además de estimular la reabsorción del hueso. (31)

También hay pruebas de la presencia de interferón gamma (IFN gamma) en el FGC, el cual puede tener una función protectora en la enfermedad periodontal por su capacidad para inhibir la actividad de reabsorción ósea de la interleuquina 1 $\beta$ . (31)

El reconocimiento en la última década de que los neutrófilos migran al surco gingival, incluso en salud, tiende a ofuscar la caracterización del FCG como un exudado inflamatorio frente a un transudado fisiológico. Además, está claro que la composición del FCG difiere en términos de composición microbiana y la concentración, y composición de biomarcadores moleculares cuando uno compara sitios sanos de individuos enfermos versus sitios sanos de individuos periodontalmente sanos. Además, hay cambios claros en la composición del FCG durante la progresión de la enfermedad y ciertos mediadores se pueden usar para predecir los resultados futuros de la enfermedad basados en el paciente o en el sitio. Tomados en conjunto, los hallazgos sugieren que la composición del FCG puede usarse potencialmente para detectar alteraciones subclínicas en el metabolismo de los tejidos, células inflamatorias, reclutamiento y remodelación del tejido conectivo. El FCG se compone de suero y componentes generados localmente, como productos de descomposición de tejidos, mediadores inflamatorios y anticuerpos en respuesta a microorganismos orales presentes en la biopelícula dental, por lo que ofrece un gran potencial para reflejar la respuesta que las células y los tejidos periodontales promueven para intentar recuperar la homeostasis y también cómo ciertos periodontopatógenos copian estos mecanismos de respuesta para promover la supervivencia bacteriana dentro del surco gingival y la bolsa. (32)

### **Marcadores de la respuesta de la inmunidad celular en el fluido crevicular gingival**

La actividad de los responsables de la inmunidad celular, los linfocitos T y los macrófagos se mide en el FCG a través de sus mediadores, las citoquinas. Se incluyen principalmente, a las interleuquinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, y al factor de necrosis tumoral (FNT). La IL-8 identificada en el FCG es muy importante en el desarrollo de la



inflamación y tiene varios efectos en la actividad y función de los neutrófilos. Esta citoquina es inducida y secretada por diferentes células: monocitos, linfocitos, fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales. La IL-8 induce la adhesión de los LPMNN a las células endoteliales y su posterior migración. Presenta quimiotaxis y libera gránulos conteniendo una serie de enzimas lisosomales que producen la reabsorción ósea. (31)

La IL-1, conocida como factor de activación de los osteoclastos (FAO), es secretada en dos formas moleculares, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , por una variedad de células incluidos macrófagos, células B, neutrófilos, fibroblastos y células epiteliales. Se reportó que pacientes con enfermedad periodontal mostraban porcentajes importantes de sitios positivos, 56% para IL-1 $\alpha$  y 87% para IL-1 $\beta$ . La IL-1 $\beta$  es llamada proinflamatoria por sus efectos. Produce modificación de células endoteliales (lo que permite la adhesión de LPMNN y monocitos), estimulación de la producción de proteinasas y prostaglandina E (PGE) y estimulación de los osteoclastos. La PGE es un mediador inflamatorio resultado de la acción de una enzima ciclooxygenasa o ácido araquidónico. (31)

Muchas células producen PGE, pero en el medio periodontal es considerada un producto de los macrófagos. La evaluación de la concentración de PGE permite detectar el riesgo de pérdida de inserción ósea. Se ha sugerido que la PGE no solamente es un mediador de la inflamación, produciendo un aumento de la permeabilidad y dilatación de los vasos, sino que también induce la reabsorción ósea activando a los osteoclastos, actuando, así como un predictor de pérdida de inserción de tejidos periodontales (76% a 96% en sensibilidad y especificidad) y un potente estimulador de reabsorción ósea.

Puede detectar el riesgo de pérdida de inserción con seis meses de antelación al aumentar su concentración. (31)

### **Enzimas proteolíticas**

Las enzimas proteolíticas y sus sustratos específicos juegan un importante rol en la patogénesis de la enfermedad periodontal. La presencia de proteasas en el FGC es indicadora de la actividad de destrucción del tejido conectivo. Muchas de ellas, por ejemplo, hialuronidasa, gelatinasa, colagenasa, son producidas tanto por el huésped como por las bacterias. (31)

Las colagenasas, productos resultantes del deterioro tisular, son también marcadores de destrucción periodontal. Las enzimas colagenolíticas pueden ser producidas por LPMNN, fibroblastos, células epiteliales y algunas bacterias periodontales. (31)

### **Enzimas intracitoplasmáticas**

La lactato dehidrogenasa (LDH) y la aspartato amino transferasa (AST) pueden ayudar a monitorear la progresión de la enfermedad periodontal. La AST permite distinguir entre sitios de daño activos o inactivos. En la enfermedad periodontal también pueden ser usadas potencialmente como marcadoras de actividad. Las enzimas intracitoplasmáticas LDH y AST son también predictores de la enfermedad periodontal, ya que aumentan con de la destrucción celular o tisular. (31)

La elastasa se origina en los LPMNN y está relacionada con la pérdida de inserción ósea. (31)

La fosfatasa alcalina tiene su fuente en los LPMNN del huésped y en las bacterias. Es un buen indicador de actividad de la enfermedad periodontal, ya que está elevada cuando la enfermedad está activa, pero no antes. (31)

Es por ello que es un buen marcador de la actividad periodontal, pero no es predictor de la enfermedad ya que aumenta junto con el episodio de actividad. La  $\beta$ -glucuronidasa proviene de los LPMNN, y es un marcador de la liberación granular primaria. Está involucrada en la degradación de glicosaminoglucanos. Su nivel aumentado está asociado con la pérdida de inserción dentaria. (31)

### **Fluido crevicular utilizado como diagnóstico**

La recolección de FCG no es invasiva y, por lo tanto, este enfoque se ha explorado ampliamente en la búsqueda de posibles biomarcadores de diagnóstico de enfermedad periodontal. Como resultado de la interacción entre la biopelícula bacteriana y las células de los tejidos periodontales, el FCG aparece como un fluido oral atractivo debido a su facilidad de recolección y permite el muestreo simultáneo de múltiples sitios dentro de la cavidad oral. (32)

Los componentes del líquido o fluido crevicular gingival se usan para identificar o diagnosticar la enfermedad activa, anticipar el riesgo de padecerla y determinar su progresión. Para que ello sea clínicamente útil se deben registrar cambios importantes tales como, que un sitio específico se torne activo o, que un sitio previamente afectado por la enfermedad mejore su condición como producto de la terapia periodontal. (31)

Para su análisis, el fluido crevicular debe ser recogido de forma que se produzca un mínimo deterioro del entorno del surco, y en el menor tiempo posible; como referencia se ha estimado que la recolección no debe durar más de 30 segundos. Existen diferentes métodos de recolección de fluido crevicular gingival:

- 1. Tiras de papel.** Las tiras de papel son pequeñas bandas de celulosa que permiten absorber por capilaridad el fluido crevicular cuando son insertadas en el surco gingival, o cuando son colocadas en su entrada. Su principal limitación radica en el hecho de que solo permiten cuantificar el volumen de fluido generado. Una vez recogidas las muestras, existen varias técnicas para cuantificar el volumen de fluido: mediante análisis colorimétrico, mediante valoración del tamaño de la tira con fluido, y mediante fluorescencia. La determinación obtenida con esta aparatología puede verse influida por la temperatura ambiental y/o por el grado de humedad; para minimizar esta influencia fue desarrollada una nueva generación de lectores (Periotron 6000, ProFlow, Amityville, NY) considerado por algunos autores como más predecible que su predecesor. Las diferencias encontradas son registradas digitalmente para determinar el volumen total de fluido crevicular. (33)

El volumen de FCG recolectado refleja la suma de dos compartimentos: el volumen vacío de FCG, que es un volumen de reposo que es independiente del flujo, y la contribución de flujo de FCG que depende del tiempo de recolección y la velocidad de flujo. El volumen vacío de FCG depende en gran medida de la profundidad de la bolsa. Por ejemplo, cuando una bolsa aumenta de 3 mm a 6 mm, hay un aumento del 50% en el volumen vacío de la bolsa en reposo. Usando un método de cantidad total, uno

esperaría naturalmente que en la enfermedad haya un aumento en la profundidad de la bolsa y un aumento concomitante en la cantidad total de biomarcador. Puede o no reflejar ninguna contribución inflamatoria del tejido, pero se espera un aumento en la cantidad total de biomarcador como consecuencia de un aumento en el volumen vacío de la bolsa periodontal. (32)

Típicamente, este volumen vacío se absorbe dentro de los primeros segundos de la recolección y, por lo tanto, se absorbe rápidamente y se agota durante el primer muestreo, si se toman muestras repetidas. Además, dependiendo del período de tiempo que se recolecta la muestra, la contribución relativa del volumen vacío al volumen total puede variar y, por lo tanto, cambiará la cantidad total de mediador presente. (32)

Además, el volumen vacío por lo general contendrá neutrófilos (típicamente en el rango de  $10^4$ - $10^6$  células), que están presentes en la salud y la enfermedad que pueden contribuir a la medición de biomarcadores, si el marcador está asociado con neutrófilos. Como ejemplo, si se muestrea varias veces en el mismo sitio, la cantidad total de beta glucuronidasa disminuye rápidamente con cada muestra repetida. Esto es consistente con la recolección de menos neutrófilos en la tira de papel, ya que la bolsa se agota de neutrófilos hasta que la cantidad total alcanza una meseta más baja. Esto sugiere que el nivel de beta glucouronidasa presente depende en gran medida del número de neutrófilos que ingresan a la bolsa. (32)

Por el contrario, si uno mide los niveles de PGE2 dentro del FCG, que no es producido por neutrófilos u otras células dentro de la bolsa, el nivel de PGE2 permanece bastante estable con el muestreo repetido, ya que se produce dentro de los tejidos,

apuntando a la segunda fuente de Biomarcadores de FCG: el flujo del mediador de los tejidos adyacentes. Por lo tanto, el nivel de mediador presente es una función tanto del volumen de la bolsa en reposo, que depende de la profundidad de la bolsa, como del flujo de los tejidos hacia el surco. (32)

Si se desean evaluar los marcadores de inflamación de los tejidos, algunos investigadores prefieren el método de concentración, ya que es independiente de la profundidad de la bolsa y, en comparación con las muestras de biopsia de tejidos adyacentes, parece reflejar los niveles de tejido por difusión desde un nivel alto dentro de los tejidos a un nivel inferior dentro del compartimento del FCG. Esta diferencia en el muestreo y el informe de datos debe considerarse al examinar los estudios cuando los valores se expresan como nivel total de mediador versus concentración.

El almacenamiento de FCG en nitrógeno líquido tiene varias ventajas sobre el almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El nitrógeno líquido es más frío ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), pero lo más importante es que desplaza el oxígeno disuelto en la fase fluida. Esto evita la oxidación de la muestra biológica y la reacción con  $\text{H}_2\text{O}$  molecular. Como consecuencia, las muestras pueden almacenarse durante décadas en nitrógeno líquido y permanecer estables, sin oxidación, sin modificación por enzimas y disponibles para análisis molecular. (32)

- 2. Puntas de papel:** Se aísla el sitio escogido con rodillos de algodón, luego se elimina la placa supragingival con gasa estéril, posteriormente se introduce una punta de papel para endodoncia No. 30 estéril por 30 segundos, sin realizar

presión, y seguidamente se almacena en un tubo Eppendorf estéril, debidamente rotulado. (34) Este fue el método utilizado en este proyecto de investigación.

- 3. Micropipetas.** Las micropipetas son dispositivos que permiten recoger pequeños volúmenes de líquido, en este caso fluido gingival, para su cuantificación o análisis cualitativo. Para esto, la pipeta debe ser colocada a la entrada del surco para la recogida del fluido por acción capilar, y medir así el volumen del fluido que entra en el tubo. En relación con el análisis del fluido, este método presenta el inconveniente de la alteración en la composición del fluido al entrar en contacto con la superficie del tubo de la pipeta; determinadas sustancias podrían quedar adheridas a su superficie, y posteriormente, no podrían ser detectadas. (33)
- 4. Microjeringas.** Este es un método de valoración de la cantidad de fluido. Para ello se introduce un volumen conocido de una sustancia tampón mediante una pequeña jeringa en el surco gingival, y posteriormente es arrastrado junto con el fluido previamente existente en el surco. La sustracción de ambos volúmenes nos proporciona el valor correspondiente al fluido crevicular. (33)
- 5. Tiras de plástico.** Estas tiras de plástico sirven para recoger y la examinación de leucocitos intracreviculares. Permiten cuantificar el número de PMN en surco y relacionar su cantidad con la respuesta inflamatoria. (33)
- 6. Técnicas inmunitarias y bioquímicas.** Técnicas locales que nos permiten, una unión de un sistema de clasificación anatómico conocido, detectar la presencia de una molécula específica que queremos estudiar. El ATC generalmente con origen animal, es introducido en el surco unido a una pequeña gota magnética. Este complejo es después recogido en el surco por una sonda magnética. Permitiendo

detectar directamente lo que se busca y ya ha sido probado para el factor de necrosis tumoral. (33)

## **2.7. Saliva como medio de recolección celular: cuál técnica utilizar**

La secreción salival tiene un papel importante en la homeostasis de la boca los procesos fisiológicos y la composición molecular de la saliva contribuyen a la defensa lo cual es uno de los aspectos más importantes de ella; el flujo salival está sujeto a una serie de cambios, como son la ingesta de alimentos, el ritmo circadiano, la edad, el género y las enfermedades bucales. (35)

La saliva es un fluido compuesto de moléculas complejas que protegen a los tejidos blandos contra la sequedad y puede influir en la reparación de los tejidos. Es importante en el mantenimiento del pH, ya que posee diversos mecanismos para regular el pH del biofilm dental y ayuda a neutralizar el reflujo de ácidos a la cavidad bucal. El equilibrio de la mucosa bucal depende de la calidad de la saliva, el tipo de pH y la concentración de proteínas; estos factores hacen posible que la saliva proteja a los tejidos duros y blandos de la cavidad bucal. (35)

La secreción salival puede ser de tipo serosa, mucosa o mixta. Las glándulas serosas están compuestas sólo por células serosas que secretan un líquido claro, albuminoso, desprovisto de moco, es lo que se conoce como saliva de dilución, contiene  $\alpha$ -amilasa o ptialina. Las glándulas mucosas están formadas por células mucosas y secretan lo que se conoce como saliva de deslizamiento que es viscosa, pegajosa y contiene mucina. Las glándulas mixtas contienen estructuras tanto serosas como mucosas. (36)



El ultrafiltrado se enriquece en iones bicarbonato, producido en las células de las glándulas salivales, como resultado de la acción de la anhidrasa carbónica sobre el dióxido de carbono originado en los procesos metabólicos de las células. Excepto en tasas muy bajas de secreción salival, la concentración de iones bicarbonato es superior que la plasmática. El epitelio ductal es muy poco permeable al agua, por lo que la absorción neta de iones sodio y cloro reduce la osmolaridad de la saliva. Por ello, la saliva es siempre hipoosmótica con respecto al plasma. Sin embargo, la diferencia de osmolaridad se reduce con altas tasas de secreción, porque se acorta el tiempo disponible para la reabsorción de iones sodio y cloro en los ductos. Las moléculas neutras pequeñas procedentes del suero penetran en las glándulas salivales por difusión pasiva desde los densos lechos de capilares que rodean y bañan las glándulas salivales. Los electrolitos entran en la saliva vía gradiente osmótico y son regulados por la velocidad de secreción, naturaleza del estímulo y nivel de mineralocorticoides en la circulación. (36)

En cuanto a los mecanismos de transporte estos son diversos, se pueden dar:

- A través del espacio entre las células acinares (solo moléculas con un peso molecular inferior a 1900 D).
- Por filtración a través de los poros de membranas celulares (solo moléculas con peso molecular inferior a 400 D como es el caso de agua y electrolitos).
- Por un mecanismo selectivo a través de las membranas celulares: a. Difusión pasiva de moléculas lipofílicas (como sucede con los esteroides). b. Transporte activo de canales proteicos (como es el caso de péptidos).

- También por pinocitosis (el caso de algunas enzimas) (36)

La saliva tiene la ventaja de que contiene la secreción de todas las glándulas salivales, por lo que es un excelente indicador de microorganismos y de células epiteliales descamadas. (37)

### **Técnica de drenaje**

Para esta técnica se dan una serie de instrucciones generales al paciente, en las dos horas previas a la muestra, el sujeto no habrá ingerido comida ni masticado chicle o cepillado sus dientes, ni habrá fumado al menos 10 minutos antes. Puede realizarse a primera hora de la mañana en ayunas, en un ambiente tranquilo para evitar estímulos ajenos a la prueba. El sujeto debe de permanecer unos minutos en reposo, cómodamente sentado, con los ojos abiertos, la cabeza inclinada ligeramente hacia adelante y con los labios entreabiertos, el fluido producido no debe ser deglutido debe fluir libremente entre los labios procurando no realizar movimientos orales. La saliva debe de caer espontáneamente conforme se vaya produciendo hacia un tubo graduado el cual va fijado en un embudo, el sujeto expectora la saliva que le queda en la boca y posteriormente se procede a la lectura. Controlando el tiempo que se ha tardado en el proceso se calcula la cantidad de saliva producida en cc o ml por minuto. (37)

Existe algunas modificaciones a este procedimiento, como no hacer expectorar al sujeto la saliva que le queda al final de las pruebas. En un inicio se utilizaban periodos de una, dos o más horas. (37)

### **Técnica de expectorar**

Es una variante del anterior, las instrucciones generales son similares, en condiciones estándar como en la posición que debe adoptar el sujeto, permanece con los labios cerrados, permitiendo cada cierto tiempo vaciar el fluido producido a un vaso o contenedor graduado que está cerca de su boca. Después se calcula la tasa de fluido en cc o ml por minuto, al expectorar saliva se produce una ligera estimulación del fluido salival pudiendo obtener valores más altos que con drenaje. También existe el peligro de que el sujeto accidentalmente se trague la saliva. (37)

### **Técnica de recogida por eyector de saliva**

Técnica mixta de colección continua, la saliva se recoge a medida que se va produciendo mediante un eyector de saliva conectado a una bomba de vacío y situado debajo de la lengua, las secreciones salivales van a un tubo graduado, al final de las pruebas el eyector se mueve uniformemente alrededor de los vestíbulos y suelo de la boca para coleccionar la saliva residual. Se producen valores más altos debido a que es una técnica invasiva que produce una ligera estimulación, así como una pequeña irritación. (37)

### **Técnica de recogida mediante jeringa hipodérmica**

El objetivo era medir la reacción emocional y concentración de hidrogeniones en saliva. Consiste en una jeringa de 5cc de cristal, equipada con una aguja de 2 pulgadas de largo, con puntas redondeadas, así cuando se introduce entre los labios no produce

molestias, se coloca en el lado izquierdo entre los dientes superiores y mucosa yugal, a nivel del segundo premolar superior. (37)

### **Test de pasada de algodón**

Consiste en aplicar piezas de material absorbente en la apertura de los conductos, se utilizan tapones nasales, fabricados en láminas de 4cm de longitud y poco espesor, el material tiene buena adherencia a la mucosa oral, los tapones se colocan en la apertura de los conductos de las glándulas que quieren analizarse procurando bloquear los demás con rodillos, la secreción de los conductos es absorbida por las propiedades de la tira. Se requiere de un tiempo de 1 a 5 minutos dependiendo de la tasa de secreción. (37)

En el test de Strongin, Hinsie y Peck utilizaron 3 rollos de algodón dental de tamaño estándar de 1.5 pulgadas de largo, pesados previamente, uno en la zona lingual 2 en la zona bucal a ambos lados, durante 2 minutos, cuando se acaba la colección se vuelven a pesar y la cantidad viene dada por la diferencia entre el peso antes y después de la colección, los resultados se expresan en gr/min. (37)

### **Test del terrón de azúcar**

Fue ideado para controlar la evolución de la xerostomía de un grupo de pacientes que habían recibido o recibían radioterapia a consecuencia de un cáncer de cabeza o cuello. (37)

Se utiliza un terrón de azúcar de 9 gramos, que se posiciona en el dorso lingual y seguidamente se cierra la boca, procurando no efectuar movimientos musculares que

puedan disgregar el terrón. Se espera que la saliva empape y con un cronómetro se mide el tiempo transcurrido desde la colocación del terrón, hasta que adquiere en toda su superficie la característica coloración periósea y lúcida que indica su completa disolución, con este test se puede obtener el grado de humidificación de la cavidad oral y el grado de xerostomía. El azúcar se comporta como un estímulo gustativo y por lo tanto invalida el test para cualquier consideración en canto a saliva en reposo. (37)

### **Test de saliva global (TSG)**

Consiste en una tira de papel Whatman milimetrada de un centímetro de ancho, por 17 cms de largo introducida en una bolsa de polietileno de baja densidad de 21 cms de longitud por 5cm de ancho. (37)

Se extrae una tira blanca no milimetrada, se dobla el extremo en un ángulo de 90 grados, y se inserta en la cavidad bucal debajo de la lengua, al cerrar los labios quedan ligeramente en contacto con la bolsa de polietileno, que protege de la humedad a la porción milimetrada de la tira de este modo la mayor parte de la bolsa que contiene la tira queda afuera fuera de la boca, los dientes deben de permanecer en contacto. (37)

La saliva que se va acumulando en la valleculea lingual durante los 5 minutos que dura la prueba, va empapando lentamente la tira, luego se retira de la boca con un pequeño movimiento de deslizamiento y se leen inmediatamente los milímetros que están humedecidos, durante la prueba no se realiza ningún movimiento muscular. (37)

La saliva se clasifica de acuerdo con la forma en la que se obtiene, ya sea de forma estimulada y en reposo, basal o no estimulada.

- La basal o no estimulada se obtiene cuando el individuo está despierto y en reposo, obteniéndose una mínima estimulación glandular o en ausencia de estímulos exógenos.
- La saliva estimulada se puede obtener al excitar o inducir mediante mecanismos externos, la secreción de las glándulas salivales, mediante la masticación o el gusto, aquí la glándula Parótida se encarga de realizar el mayor aporte de fluido salival que es del 50%. (38)

La composición de la saliva mixta estimulada es muy parecida a la secreción de la glándula parótida cuando se estimula debido a su aporte a la saliva total. Entonces al hablar de flujo salival se puede definir como aquel compuesto fluido, que no es solo por las glándulas salivales mayores y menores, sino también por exudado gingival, microorganismos y sus productos, células epiteliales, restos alimenticios y exudado nasal. (38)

La tasa del flujo salival se puede obtener en estimulación o no y se calcula dividiendo el volumen salival entre el tiempo de recolección. El promedio de la tasa salival en reposo de saliva completa o mixta es de 0,4 ml/min, mientras que de la saliva mixta estimulada con parafina es de 2 ml/min. Aproximadamente 0,5 litros de saliva son secretados por día, del cual el 25% proviene de las glándulas submaxilares y un 66% proviene de las glándulas parótidas. (38)

En personas sanas, la tasa de flujo salival basal o no estimulada se puede ver afectada por: la edad, el ritmo circadiano, la posición corporal, la luminosidad ambiental, la tensión, el fumar, la estimulación gustativa previa, la estimulación olfativa, la estimulación psíquica y grado de hidratación. Existen muchos factores que tienen influencia sobre la tasa de flujo salival estimulada, cuyo valor promedio es de 7 ml/min aproximadamente. Estos factores son: el estímulo mecánico, el vómito, los estímulos gustativo y olfativo, el tamaño de la glándula y la edad. (38)

El método de recolección por medio de “babeo pasivo” es considerado por muchos investigadores como el gold standard, porque provee la muestra lo más pura posible, el inconveniente es que puede ser un poco complicado y desordenado y también se menciona el método de Torundas Orales el cual es más fácil que el anterior y ayuda a filtrar macromoléculas y otras partículas de la muestra. (39)

## **2.8. Técnicas de extracción de ADN y ARN: qué son y para qué se utilizan**

### **Extracción del ADN: Protocolo**

El ácido desoxirribonucleico está formado por dos cadenas de nucleótidos, que entre ellas forman una doble hélice. Son unidas por medio de enlaces de hidrógeno entre sus bases nitrogenadas. Dichas bases son: Adenina que se une con Timina y la Guanina que se aparea con Citosina. Al descifrar esa secuencia es posible conocer el mensaje genético. (40)

Según Alvarado entre las aplicaciones de la extracción del ADN se encuentran:

- Identificar distintas mutaciones.

- Diferenciar características en los tipos de ADN.
- Clonación de genes, cromosomas o individuos.
- Comparar ADN afectado y ADN sano.
- Encontrar agentes patogénicos en las muestras.
- Pruebas de resistencia microbiana.
- Estudiar desórdenes en los genes, neurodegenerativos, neoplásicos e inmunológicos.
- Identificación de individuos en medicina forense.
- Pruebas de paternidad.

Entre las ventajas de obtener el ADN de una muestra de saliva se encuentran la seguridad, es indoloro, no traumático, su recolección es sencilla de manipular, no requiere un personal entrenado, puede ser tomada fácilmente (41), su almacenamiento no requiere condiciones especiales y es de fácil transporte, es no invasivo. (40)

La extracción consiste en sacar del compartimento celular sus componentes por medio de lisis, inactivación de nucleasas y separación de los ácidos nucleicos. (40) El fin es obtener una cantidad y calidad adecuada de muestra. (42).

El protocolo puede ser tradicional o comercial, los cuales comparten los siguientes pasos: (42)

1. Homogenización del tejido.
2. Lisis Celular.

El protocolo tradicional continua de la siguiente manera: (42)



1. Separación de proteínas y lípidos.
2. Precipitación.
3. Redisolución.

El protocolo comercial continua de la siguiente manera:(42)

1. Unión de ADN a matriz inorgánica y lavado.
2. Recuperación del ADN de la matriz.

### **Homogenización del tejido:**

Esta puede ser mecánica, química (42) o enzimática (40). Consiste en el rompimiento de la unión entre células que permite la liberación del material genético. (42).

- Homogenización mecánica: uso de nitrógeno líquido, pistilos (42), molienda en mortero, bolitas de vidrio y sonicación (40).
- Homogenización química: uso de soluciones a altas temperaturas, agentes caotrópicos (42) y detergentes (40).
- Homogenización enzimática: uso de Lysozimas, Lyticasa, Proteasa (40).

### **Lisis celular:**

Se liberan los ácidos nucleicos por interacción entre las moléculas de la pared, la membrana celular y nuclear, las cuales se modifican o destruyen. (42) En esta etapa se usan detergentes, soluciones básicas que disuelven la membrana celular. También se utilizan inhibidores que inactivan las enzimas que degradan la molécula del ADN. (42)

## **Protocolo tradicional:**

### **Separación de proteínas y lípidos:**

Por medio de solventes orgánicos y ciclos de centrifugación se separan las proteínas y los lípidos que componen el ADN. Los grupos fosfato son separados en medios acuosos y las proteínas y lípidos en solventes orgánicos (42).

Las fases acuosa y orgánica son separadas en la centrífuga, lo que aísla el ADN (42).

### **Precipitación del ADN:**

Se eliminan los lípidos y proteínas y se recupera el ADN, adicionando etanol y soluciones con altas concentraciones de iones de sodio. Estos se unen a los grupos fosfatos de la molécula del ADN. De esta manera se reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de la doble hélice. Estas se pliegan sobre sí mismas lo que hace a la molécula insoluble. (42).

Luego de la centrifugación el ADN se asienta en el fondo del tubo y el etanol es desechado. Se realiza un lavado para remover etanol al 70% y el resto es eliminado por evaporación (42).

### **Redisolución del ADN:**

Se continúa hidratando el ADN para mantenerlo en solución. Se utiliza agua a una pH de 7 o solución amortiguadora como Tris- HCl y EDTA a un pH de 8.0. Debe evitarse

el pipeteo y la agitación agresiva para de esa manera evitar la fragmentación de las moléculas. (42)

## **Protocolo comercial**

### **Unión del ADN a la matriz inorgánica y lavado:**

Existen dos opciones según Alejos:

1. Membrana de sílice: la unión del ADN a esta columna de sílice, es impulsada por la deshidratación y formación de enlaces de hidrógeno (40). La alta concentración de sal puede ayudar a la unión del ADN a la sílice y la baja concentración permite eludir el ADN (40). Se le añade una solución de unión de un pH específico a la mezcla de lisis. Se adiciona etanol lo que expone los grupos fosfatos (42) y luego se hace pasar la solución por la columna. Los lípidos y proteínas se eliminan por lavado y centrifugado, ya que no son afines a la sílice. El material genético queda unido a la matriz (42).
2. Perlas magnéticas: utiliza soluciones y un imán o magneto que se encarga de atraer a las perlas, se separan de la solución en las que están suspendidas. A la solución de lisis se le añade la solución amortiguadora a un pH ácido, lo que carga positivamente las perlas. (42). Esto favorece la unión del ADN y las proteínas y lípidos que presentan poca afinidad por las perlas son eliminados por lavado. En la pared del microtubo son retenidas en la pared con ayuda del magneto, el resto es eliminado por pipeteo (42).

### **Recuperación del ADN de la matriz:**

El paso siguiente consiste en liberar al ADN de la matriz. El ADN y la membrana deben deshidratarse con soluciones de lavado y ciclos de centrifuga. Posteriormente se debe adicionar agua o solución amortiguadora en el centro de la membrana, el ADN se hidrata y se coloca en la centrifuga, de esa manera se recupera de la matriz y se resuspende. (42)

Se coloca una solución básica para que las perlas adquieran una carga neutra. Se separa el ADN de las perlas en otro tubo y las perlas son retenidas por el magneto. (42).

### **2.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): reactivos, primers y secuencia de laboratorio**

La Reacción en Cadena de Polimerasa, es un método in vitro de síntesis de ácidos nucleicos, en el que un específico segmento de ADN se amplifica rápidamente sin replicación concomitante del resto de la molécula de ADN. Es utilizada para determinar la verdadera extensión de las comunidades bacterianas y la composición de la microflora subgingival, en el caso de las investigaciones a nivel oral, (43) por lo que se utiliza para diagnosticar diferentes enfermedades, identificando microorganismos, clonación y secuenciación de genes, y realizando investigaciones cuantitativas y genómicas en una forma muy rápida y sensible. (44)

Los cromosomas contienen miles de genes, los cuales son unidades de ADN heredables de información que rigen la estructura y función celular y tienen tres

componentes estructurales básicos: potenciadores / represores, un promotor y una región de codificación o marco de lectura abierto; las regiones potenciadoras / represoras pueden aparecer en 5 y/o 3 región del gen. (45)

Cuando las células se dividen, los cromosomas están estrechamente agrupados por proteínas, este ensamblaje es necesario para separar con precisión los cromosomas duplicados entre las células en división sin dañar físicamente el ADN que se encuentra adentro. (45)

Los reactivos de PCR estándar incluyen un conjunto de primers apropiados para el gen diana deseado o segmento de ADN a amplificar, ADN polimerasa, un tampón para el ADN polimerasa específico, desoxinucleótidos (dNTP), la plantilla de ADN y agua estéril. (46) Los reactivos adicionales pueden incluir: sal de magnesio  $Mg^{2+}$  (0.5 a 5.0 mM), la cual aumentan la temperatura de hibridación del ADN y optimiza la reacción. Alta concentración de  $Mg^{++}$  disminuye la especificidad de la PCR y bajas concentraciones, aumenta la especificidad de la reacción; sal de potasio K (35 a 100 mM), el cual influye en la desnaturalización del ADN. A elevadas concentraciones del ión  $K^{+}$  se favorece la desnaturalización de secuencias cortas de ADN, mientras que las bajas concentraciones de  $K^{+}$  ayudan a la desnaturalización de secuencias largas de ADN. Además, se utiliza Dimetilsulfóxido (1-10%), formamida (1.25-10%), albúmina de suero bovino (10-100  $\mu g$  / ml) y Betaína (0.5 M a 2.5 M) como parte del tampón de la reacción. (47)

Al diseñar un conjunto de primers para una región específica del ADN deseado para la amplificación, el primer debe reconocer la cadena positiva, que por convención está

orientada en la dirección 5' → 3' (cadena sentido) y el otro primer debe complementar la cadena negativa, que está orientada en la dirección 3' → 5' (cadena antisentido). (46)

Consideraciones para el diseño del primer:

1. El contenido en G + C debe ser aproximadamente del 50%.
2. La relación máxima de purinas (A y G)/pirimidinas (T y C) será de 60%/40%.
3. Deben evitarse zonas con largas secuencias de una sola base.
4. No se deben seleccionar primers que en su extremo 3' tenga una importante estructura secundaria.
5. Se recomienda que los extremos de las últimas bases sean G o C.
6. Se debe evitar la complementariedad entre la pareja de primers.
7. Normalmente deben tener un tamaño de 18-30 pares de bases. (47)

**Parámetros de los ciclos:** El proceso se lleva a cabo en un termociclador (ver figura 1) en el cual se programan los ciclos en los tiempos y temperaturas de forma exacta. (47) Si hay menos de 10 copias de la plantilla en la reacción, se requieren aproximadamente 40 ciclos. (46)



**Figura 1:** Termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Waltham, MA)

**Fuente:** Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica. 2019

### 1. Desnaturalización inicial del ADN y activación enzimática:

Es esencial desnaturalizar por completo la plantilla de ADN en el comienzo de la PCR para garantizar la utilización eficiente de la plantilla durante el primer ciclo de amplificación. Si el contenido de la plantilla es 50% o menos de G+C, se debe realizar un inicial de 1-3 minutos de desnaturalización a 95 ° C. (46)

### 2. Desnaturalización

Un tiempo de desnaturalización del ADN de 30 segundos por ciclo a 95 ° C es normalmente suficiente para plantillas de ADN ricas en G+C. Este paso puede prolongarse hasta 3-4 min.<sup>6</sup> Sin embargo, hay que tener en cuenta que la actividad de la

enzima decrece de manera muy rápida a partir de los 95°C, por lo que a estas temperaturas o superiores es aconsejable disminuir el tiempo de incubación. (46)

### **3. Hibridación**

En este caso, la temperatura y el tiempo van a depender de 3 factores relacionados con los oligonucleótidos: la composición de bases, el tamaño y la concentración. La temperatura de hibridación puede oscilar entre 45°C y 65°C, durante un tiempo comprendido entre 30 segundos y 1 minuto. Un aumento de temperatura o del tiempo favorece la especificidad ya que disminuye las uniones incorrectas de los primers con la hebra molde. (47)

### **4. Elongación**

En la mayoría de las reacciones, la etapa de extensión se realiza a una temperatura de 72°C. El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación. Se puede estimar un tiempo de 1min para elongar hasta 2 Kb, para productos más grandes, el tiempo de extensión debe prolongarse por 1 min / kb. (47, 46)

### **5. Extensión final**

Después del último ciclo, se recomienda incubar la mezcla de PCR a 72 ° C durante 5-15 minutos adicionales para completar cualquier posible producto de reacción incompleto. El producto de PCR tiene que ser clonado en un vector, por lo que el paso de extensión final puede prolongarse hasta 30 minutos para garantizar la mayor eficiencia de la cola 3'-dA del producto de PCR. (46)



## 2.10 Técnica de Electroforesis capilar: QIAxcel

La electroforesis capilar es una técnica analítica utilizada en diferentes áreas de la investigación, como en la biotecnología, farmacia y medicina. Esta técnica nos permite la separación de diferentes analitos como iones, biomoléculas y células. (48)

La separación se basa en la migración diferencial de moléculas (ADN, proteínas, iones inorgánicos, carbohidratos, esteroides, fármacos, etc.) sujetas a un campo eléctrico (de 100 a 500 V/cm) a través de un capilar de menos de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro. (49)

Esta técnica permite obtener resultados en un corto tiempo, con una alta eficiencia de separación y una alta sensibilidad con un mínimo consumo de muestra. (48)

La separación se basa en las diferentes movilidades electroforéticas adquiridas por los analitos dentro del capilar al aplicar un campo eléctrico. (48) Durante el proceso los cationes fluyen hacia la terminal negativa, mientras que los aniones fluyen hacia la positiva, por la inducción del alto potencial eléctrico. (49)

Parte de la eficacia de esta técnica es que utiliza capilares que están recubiertos de un polímero que les confiere alta flexibilidad facilitando su manipulación (48). Al mismo tiempo el capilar debe ser química y eléctricamente estable, transparente a la luz UV. (50) En este compartimiento es donde se realiza la separación. (48)

Además del capilar, se cuenta con reservorios con solución amortiguadora en donde se sumergen los electrodos y el capilar, otros reservorios donde se colocan las muestras, los electrodos que permiten generar el ánodo y el cátodo, una fuente de alto

voltaje la cual genera del campo eléctrico, un sistema de inyección de muestra (hidrodinámica y electrocinética), un sistema de control de temperatura (por convección de aire o líquido) y un detector (conectado a un sistema de adquisición de datos). (48)

Al utilizar la técnica de electroforesis capilar se tienen beneficios como una alta eficiencia, debido a que la aplicación del campo eléctrico sobre el capilar genera el flujo electroosmótico, permite una excelente resolución, obteniendo platos teóricos mayores a 10.5, límites de detección de hasta ppm (partes por millón), dependiendo del analito y detector utilizado, se necesita un mínimo tratamiento de muestras, a la vez un mínimo consumo de muestras (nL) y reactivos, los tiempos de análisis rápidos que oscilan de 5 a 60 min. (48)

Durante el proceso el capilar y los viales se llenan con un electrolito con capacidad amortiguadora (50). Las soluciones amortiguadoras utilizadas pueden ser fosfatos, boratos, citratos, tris, etcétera, estas se van a introducir mediante presión para acondicionarlo y llenarlo. (48)

Cuando el capilar se encuentra lleno con la solución amortiguadora, se inyecta la muestra de forma hidrodinámica (aplicando presión) o electrocinética (aplicando un campo eléctrico). (48)

Posterior a la inyección de la muestra se realiza la migración y separación de los analitos dentro del capilar por la acción del campo eléctrico. (48) Al someter este sistema a la influencia de un campo eléctrico, las especies iónicas del electrolito y de la muestra migran hacia el electrodo correspondiente.

La separación de los analitos se basa en la diferencia de relación carga/masa y la afinidad a los diferentes aditivos (surfactantes, ciclodextrinas, aminas, solventes orgánicos, etcétera) de la solución amortiguadora, así como de la viscosidad del sistema y, por ende, de la temperatura de separación. (48)

La temperatura a la cual se realizan las separaciones varía de 10 a 60 °C, dependiendo de las características de la muestra. (48)

La detección de las muestras se realiza mediante fluorescencia, el método nos ayuda a detectar niveles inferiores a ppb's. Esta detección se lleva a cabo dentro del mismo capilar, al ser este de diámetros pequeño, hay una sensibilidad limitada. (50)

Finalmente, el software permite una recopilación de datos y análisis. Los datos se pueden ver tanto en electroferograma como en imagen de gel formatos (Qiaxcel) (50)

## **CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA**

### **3.1 Tipo de investigación:**

La presente investigación es de tipo descriptiva ya que consiste en la recopilación de datos que describen los acontecimientos y luego organiza, tabula, representa y describe la recopilación de datos. Los tres objetivos principales de la investigación son: describir, explicar y validar los resultados. La descripción surge después de la exploración, y sirve para organizar los resultados con el fin de encajar con las explicaciones, y luego probar o validar las explicaciones. (51)

### **3.2 Sujetos de investigación:**

Se trabajó con 21 pacientes experimentales de la preclínica de periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica, con edades entre los 25 y 66 años, de los cuales 11 fueron mujeres y 10 hombres. Los pacientes accedieron a participar firmando un consentimiento informado específico.

Criterios de inclusión de los sujetos experimentales:

- Haber sido diagnosticados con enfermedad periodontal, utilizando la nueva clasificación propuesta por Tonelli y colaboradores en el 2018.
- Presentar bolsas periodontales (profundidad al sondeo  $\geq 4$ ).
- No presentar ninguna enfermedad autoinmune como lupus, artritis reumatoide, etc.
- No haberse enjuagado o cepillado los dientes una hora antes de la toma de las muestras.
- No haber recibido tratamiento periodontal en los últimos 6 meses.

- No haber consumido antibióticos tres meses antes de la toma de la muestra.

Además, se trabajó con 2 sujetos control, los cuales fueron, un hombre, paciente de la Clínica de Integral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica y una mujer, de la Preclínica de Periodoncia. Ambos sujetos con 25 años, cuyo principal criterio de inclusión era no presentar bolsas periodontales, por lo que debían tener periodontograma completo y revisado, además, debían cumplir con el resto de criterios de inclusión.

### **3.3 Instrumentos de la investigación, recolección y procesado de las muestras.**

La presente investigación se dividió en dos procesos, por lo que se utilizaron dos tipos de instrumentos:

En primer lugar, se trabajó tomando muestras de fluido gingival crevicular y de saliva, tanto a los sujetos experimentales como de control. Segundo, se les realizó un cuestionario de frecuencia de consumo de dieta.

El procesado de las muestras de fluido crevicular y saliva se realizó en el Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica, utilizando sus protocolos respectivos.

#### **3.3.1 Protocolo para las muestras de fluido gingival crevicular**

Para la toma de muestras de fluido crevicular, se utilizaron puntas de papel número 40, estériles y el proceso de recolección de la muestra se realizó de la siguiente manera:

1. Se procedió a determinar las dos bolsas periodontales más profundas (pieza dental y localización en esta) en boca de los pacientes, según el expediente clínico, posterior a la revisión del periodontograma por el profesor a cargo de los estudiantes.
2. Se aislaron las piezas dentales con rodillos de algodón y gasas.
3. Se eliminó el biofilme dental supragingival con torundas de algodón, presente en las piezas dentales de interés.
4. Se introdujeron las puntas de papel suave y cuidadosamente en las bolsas periodontales, dejándolas absorber por 30 segundos, se utilizaron en la medida de los posible, 5 puntas de papel en las bolsas periodontales más profundas.
- 5 Se introdujeron todas las muestras ya tomadas, en un tubo eppendorf estéril, previamente rotulado con las iniciales del paciente y número de muestra.

Posteriormente, a la hora del análisis de las muestras en el laboratorio se utilizó el siguiente protocolo:

### **3.3.2. Protocolo para la extracción de ADN de muestra de fluido crevicular**

1. Se cortaron las puntas apicales de las puntas de papeles, y se depositaron en **tubos de 1.5 ml.**
2. Se agregó 1 ml de **PBS estéril.**
3. Se centrifugó 1 minuto a 15000 rpm, temperatura ambiente.
4. Se decantó.
5. Se agregó 100 µl de **Chelex.**

6. *Vortex* 10 segundos.
7. Se incubó en baño maría a 56°C por 30 minutos.
8. *Vortex* 10 segundos.
9. Se incubó en baño de agua hirviendo por 8 minutos.
10. *Vortex* 10 segundos.
11. Se centrifugó a 15000 rpm, temperatura ambiente, por 3 minutos.
12. Muestra lista para el proceso de PCR.

### **3.3.3 Protocolo para la recolección de las muestras de saliva**

Para la recolección de la muestra de saliva, se utilizó un tubo cónico de Polipropileno, con 20 ml de Listerine® (enjuague bucal) diluido 1:2 con agua desionizada y se procedió a tomar la muestra siguiendo estos pasos:

1. Se le entregó al paciente la mitad del preparado (10 ml) en un vaso y se le indicó enjuagarse vigorosamente por 1 minuto, procurando no llegar el líquido a la garganta.
2. Se recolectó en el mismo tubo del preparado, previamente rotulado, la primera parte de la muestra y se le indicó reposar por 30 segundos.
3. Transcurrido el tiempo de reposo, se le dio la segunda parte del preparado y se le indicó realizar el mismo procedimiento del primer paso.
4. Se depositó en el mismo tubo la segunda parte de la muestra, teniendo ya los 20ml de muestra en el tubo rotulado de la misma forma que el de la muestra de fluido crevicular.

### 3.3.4. Protocolo de extracción de ADN de las muestras de saliva

1. Obtener una muestra de saliva, mediante Listerine (1:2), 20 ml (Corning Inc., Corning, NY).
2. Se centrifugó la muestra de saliva a 2920 rpm (1800 rcf) a 4°C por 15 minutos (Centrífuga 5810 R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).
  - a. Muestra 1 aparenta tener un resto alimenticio.



**Figura 2:** Muestras de saliva en la centrífuga a 2500 rpm.

**Fuente:** Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica.2019

3. Se decantó el sobrenadante.
4. Se resuspendió en 40 ml de PBS estéril (InvitrogenWaltham, MA).
5. Se centrifugó a 2920 rpm (1800 rcf) a 4° C por 15 minutos.
6. Se decantó el sobrenadante.
7. Se resuspendió el *pelleten* **buffer lisis + buffer high TE**. El volumen de *buffer lisis + buffer high TE* depende del tamaño del *pellet*.
8. Se agregó 20 – 25 µl de **proteínasa K** (20 mg/ml) a cada muestra.



- a. Muestra N12 aparentó no haber tenido proteinasa K, se le agregó 25 µl de proteinasa K y se dejó dos días más en baño maría a 58° C.
9. Se incubó en baño maría, 56° C toda la noche.
10. Se agregó igual volumen de **NaCl 3 M**.
11. Se agregó igual volumen de solución **cloroformo – alcohol isoamílico (24:1)**.
12. Se mezcló en agitador a 250 rpm (Incubadora de agitación 211DS, Labnet International, Edison, NJ), temperatura ambiente por 1 hora.
13. Se mezcló en *vortex*(Axiom, Bürstadt, Alemania). Cada muestra por 30 segundos a máxima potencia.
14. Se transfirió la muestra a un tubo de **polipropileno de 15 ml** (Fisher Scientific, Waltham, MA).
  - a. La muestra N9 utilizó 2 tubos de 1.5 ml. Posterior se centrifugó a 2950 rpm, temperatura ambiente. Se continua con el protocolo.
  - b. La muestra N20 utilizó 2 tubos de 1.5 ml. Posterior se centrifugó a 2950 rpm, temperatura ambiente. Se continua con el protocolo.
15. Se centrifugó a 2920 rpm, 4°C, 5 minutos.
  - a. La muestra N9 se centrifugó a 2950 rpm, temperatura ambiente. Se continuó con el protocolo.
  - b. La muestra N20 se centrifugó a 2950 rpm, temperatura ambiente. Se continuó con el protocolo.
16. Se transfirió la **fase acuosa**(superior) a un nuevo tubo de **polipropileno de 15 ml** (Fisher Scientific).
17. Se agregó 2.5 veces el volumen de la fase acuosa de **etanol absoluto**.

18. Se invirtió el tubo varias veces hasta que el ADN precipite completamente y se forme un *pellet*.
  - a. Muestra E6 no se le formó el *pellet*. Se dejó a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Posterior a esto se continuó con el protocolo.
  - b. Muestra N19 se colocó a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Posterior a esto se continuó con el protocolo.
19. Se centrifugó a 3000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , 20 minutos
20. Se decantó el etanol absoluto.
21. Se resuspendió en etanol 70 %.
22. Se centrifugó a 14000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 minutos.
23. Se decantó el etanol 70 %.
24. Se colocaron los tubos con tapa abierta en incubadora a  $50^{\circ}\text{C}$  toda la noche.
25. Se resuspendió en 200 – 400 TE bajo en EDTA (Invitrogen, Waltham, MA).
26. Se colocó en baño maría a  $37^{\circ}\text{C}$  mínimo 6 horas.
27. Se transfirió la suspensión de ADN en TE bajo en EDTA a un tubo de 1.5 ml (Thermo Scientific, Waltham, MA)
28. Se cuantificó la pureza y concentración del ADN utilizando el NanoDrop 2000c. (ver cuadro 1)

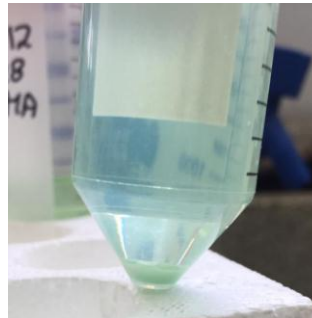


**Figura 3:** NanoDrop 2000

**Fuente:** *Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica. 2019*

29. Se ajustó la concentración de ADN de las muestras a 25 ng/μl.

30. Se colocó 2 μl de la muestra de ADN en tubos de reacción de 0.2 ml (MicroAmp®Reaction Tubes, Applied Biosystems, Waltham, MA)



**Figura 4:** Muestra del ADN de las muestras de saliva tras la extracción

**Fuente:** *Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica. 2019*

**Tabla 1:** Pureza y concentración de ADN en las muestras de saliva

Muestra	Concentración					Tipo
	(ng/ $\mu$ L) de muestra de saliva	A260 (Saliva)	A280 (Saliva)	260/280 (Saliva)	260/230 (Saliva)	
N1	510,4	10,208	5,455	1,87	2,17	ADN
N2	121,8	2,435	1,357	1,8	1,38	ADN
N3	289,7	5,794	3,108	1,86	2,07	ADN
N4	581,6	11,632	6,262	1,86	2,05	ADN
N6	507,3	10,147	5,465	1,86	1,47	ADN
N9	820,8	16,415	8,947	1,83	1,73	ADN
N10	238,2	4,764	2,517	1,89	1,82	ADN
N12	832,8	16,656	8,945	1,86	1,9	ADN
N13	167,5	3,349	1,789	1,87	1,48	ADN
N15	400,2	8,004	4,29	1,87	1,73	ADN
N19	96,9	1,937	0,995	1,95	1,04	ADN
N20	168,7	3,374	1,862	1,81	1,18	ADN
N21	143,4	2,868	1,562	1,84	1,27	ADN
C1	149,7	2,993	1,59	1,88	1,58	ADN
C2	63,1	1,261	0,682	1,85	1,34	ADN
N8	367,8	7,355	3,933	1,87	2,01	ADN
N11	332,4	6,648	3,613	1,84	1,38	ADN
N14	242	4,84	2,523	1,92	1,75	ADN
N16	423,8	8,476	4,582	1,85	1,53	ADN
N17	96,9	1,938	1,064	1,82	0,82	ADN
N18	527,1	10,542	5,583	1,89	1,75	ADN

**Fuente:** Elaborado por Alberto Vega Chinchilla. 2019

La investigación se inició con una muestra de 21 pacientes experimentales y 2 controles, sin embargo, no se logró extraer ADN significativo de las muestras de saliva N5, N8, N11, N14, N16, N17, N18, por lo que se excluyeron del estudio, así como las mismas de fluido gingival crevicular al no poder compararlas. Dado esto, la investigación se siguió trabajando con 15 pacientes (13 experimentales y 2 controles).

**Tabla 2:** Volumen de distintos reactivos utilizados en la extracción de ADN de muestras de saliva

Muestra	Volumen K (μl)	Volumen proteinasa (μl)	Volumen en NaCl 3 M (μl)	Volumen cloroforma – alcohol isoamílico (μl)	Volumen fase acuosa (μl)	Volumen de etanol absoluto (μl)	Foración de <i>pelle t</i> de ADN	Volumen en de TE bajo en EDTA (μl)
N1	500	20	520	1040	n/a	n/a	+	400
N2	500	20	520	1040	n/a	n/a	+	400
N3	250	20	270	540	n/a	n/a	+	400
N4	500	20	520	1040	n/a	n/a	+	400
N6	250	20	270	540	n/a	n/a	-	200
N9	500	25	550	1100	750	1875	+	400
N10	500	25	525	1050	1250	3125	+	400
N12	500	25	525	1050	800	2000	+	400
N13	250	25	250	550	525	1312	+	400
N15	500	25	500	600	≈725	1812.5	+	400
N19	250	25	300	600	600	1500	-	200
N20	500	25	550	1100	1350	3375	+	400
N21	300	25	350	700	800	2000	+	400
C1	300	25	300	5000*	500	1250	+	400
C2	250	20	270	540	n/a	n/a	+	400

\*se le agregó por error 5000 μl de cloroformo – alcohol isoamílico

**Fuente:** Elaborado por Alberto Vega Chinchilla. 2019

Los primers se escogieron basándose en las bacterias más comunes en la enfermedad periodontal. Además, siguiendo las características del diseño de los primers.

**Tabla 3:** Composición y temperatura de hibridación de los pares de primers con respecto a las muestras de fluido gingival crevicular y saliva

Bacteria	Oligonucleótidos 5' – 3'	Temperatura de hibridación (°C)	Tamaño del amplicon (pb)
<i>Prevotella intermedia</i> (1)	TTTGTTGGGAGTA AAGCGGG TCAACATCTCTGT ATCCTGCGT	50	575
<i>Treponema denticola</i> (1)	TAATACCGAATGT GCTCATTTACAT TCAAAGAAGCATT CCCTCTTCTTCTT A	56	316
<i>Fusubacterium nucleatum</i> (2)	TTGTGGTGTGAC GGGCGGTC ACGCTGGGCTAC ACACGTGC	60	201

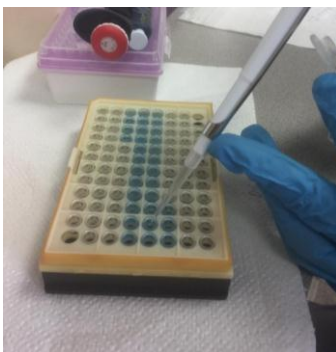
**Fuente:** Elaborado por Alberto Vega Chinchilla. 2019

Al tener la extracción del ADN de ambas muestras, tanto de saliva como de líquido fluido crevicular se necesita amplificó el ADN de las muestras del cuadro 2 en el termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cyler (Applied Biosystems, Waltham, MA) (ver figura 1)

Primeramente, se aumentó la temperatura a 95° C para desnaturalizar el doble enlace del ADN por 30 segundos, por lo tanto, como resultado nos queda una banda simple de ADN.

Esa banda simple luego pasó por el proceso de hibridación, las muestras se colocaron en una temperatura entre 50-60° C dependiendo del primer, cada primer de dichas bacterias se colocó a una temperatura específica.

En este proceso, los primers se unieron al ADN en las zonas donde tuvieran complementariedad. Después, la temperatura se aumentó a 72° C para la polimerización, ya que es la temperatura ideal para que la enzima polimerasa trabaje y logre unir los nucleótidos para formar una nueva doble banda y así se va duplicando el segmento específico de ADN inicial. Como resultado se obtuvo la banda de ADN inicial amplificada 45 veces ya que se realizó por 45 ciclos.



**Figura 5:** Preparación de las placas de muestras de ADN para llevar al termociclador

**Fuente:** Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica. 2019

**Tabla 4:** Programa de amplificación del termociclador

Activación de Taq polimerasa	Desnaturalización	Hibridación n	Polimerización n	Conservación n	
95° C	95° C	50 - 60° C	72° C	72° C	4° C
2 minutos	30 segundos	30 segundos	1 minuto	5 minutos	∞
45 ciclos					

**Fuente:** Elaborado por Alberto Vega Chinchilla. 2019

Posteriormente del proceso de amplificación de las muestras, estas se colocaron en el QIAxcel para obtener los resultados finales de la presencia de las bacterias. Este equipo realiza los estudios de electroforesis capilar de manera automática.

#### **3.4.5. Cuestionario de frecuencia de consumo de dieta**

En segundo lugar, durante la investigación también se trabajó con el instrumento “Cuestionario de frecuencia de consumo” elaborado por la Dra. Georgina Chaves, para la recolección de datos del consumo diario de macronutrientes de los 21 sujetos (experimentales y controles). El cual se adjunta como Anexo 1.

En este instrumento, se utilizó el mismo código para los sujetos que en las muestras de fluido crevicular y saliva (iniciales de nombre, apellidos y número de muestra).

Posterior a determinar el código respectivo por sujeto, se pesaron y midieron, para establecer el Índice de Masa Corporal (IMC) y utilizar este dato como variable para la relación con el diagnóstico periodontal.

En el cuestionario, los pacientes respondieron cuántas veces durante la última semana, ya fuera ninguna, 1 día, 2 días, 3-4 días, 5-6 días o todos los días habían consumido ciertos alimentos agrupados en harinas, cereales, carnes, huevos, lácteos, leguminosas, semillas, frutas, vegetales, grasas, bebidas azucaradas, comidas rápidas y snacks, además de la cantidad consumida, partiendo de una porción o una taza, según fuera el caso.



Teniendo estos datos, se cuantificó el consumo diario de los distintos alimentos utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Frecuencia de consumo diario: } \frac{\text{Cantidad de porciones x días de consumo}}{7 \text{ (días de la semana)}}$$

**Figura 6:** Fórmula para cuantificar la frecuencia de consumo de alimentos por paciente.

Posterior a esto, se promedió la cantidad del consumo diario, por grupo alimenticio.

## **CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. Resultados:**

El presente estudio tuvo como objetivo comparar el contenido bacteriológico en muestras de fluido crevicular y de saliva en pacientes con periodontitis de la Preclínica de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica, y así mismo relacionar la condición nutricional de los mismos.

Las técnicas estadísticas utilizadas para el análisis de la información son las distribuciones de frecuencia, cruce de variables y comparación de medias con base en el análisis de variancia. El nivel mínimo de confianza para las comparaciones fue del 95%. Para el procesamiento estadístico de los datos se diseñó una base de datos creada en Excel, el procesamiento estadístico de los datos se realizó en el programa SPSS versión 13.0 y en Excel.

Las técnicas de análisis de datos son el análisis de variancia, con el fin de probar la siguiente hipótesis:

$H_0$ : Los promedios en las poblaciones son iguales

$H_1$ : Al menos uno de los promedios es diferente

Cuando se trató de dos distribuciones de variables nominales y ordinales se utilizó 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 cumplieron los supuestos para utilizar pruebas estadísticas paramétricas.

## A. Características de los pacientes

Se estudiaron 15 pacientes con edades entre los 23 y 55 años; 53% mujeres y 47% hombres con diferencia estadísticamente significativa por edad ( $p=0.04$ ). Un paciente es fumador; 12 pacientes presentan enfermedad periodontal crónica generalizada, 1 paciente enfermedad periodontal crónica localizada, uno sano y otro con gingivitis inducida por placa bacteriana. Tres pacientes presentaron Hipertensión arterial, uno un tumor cerebral y otro con hipotiroidismo. Cinco de ellos tomaban medicamentos para tratar la enfermedad hipertensiva arterial.

**Tabla 5:** Estadísticos descriptivos de la edad según sexo.

	N	Media	Desviación estándar	Error Estándar	Mínimo	Máximo
Hombre	2	31.50	9.19	6.50	25.0	38.0
Mujer	13	58.15	10.11	2.80	42.0	73.0
Total	15	54.60	13.47	3.47	25.0	73.0

**Fuente:** Kolmogorov-Smirnov Z es la prueba estadística que permite probar si dos grupos provienen de poblaciones que tienen la misma distribución.

Elaborado por MsC Jacqueline Castillo Rivas. 2019

## B. Prevalencia de las bacterias

La tabla 6 muestra la prevalencia de bacterias que se encontró en los dos medios de contraste.

**Tabla 6:** Prevalencia de bacterias en ambos medios de contraste

Bacteria	N	Medio de contraste	
		Saliva	Fluido
			crevicular
Treponema denticola	15	67%	67%
Prevotella intermedia	15	33%	40%
Fusobacterium nucleatum	15	87%	93%
Porphyromonas gingivalis	15	0%	0%
Tannerella forsythia	15	0%	0%

**Fuente:** Elaborado por MsC Jacqueline Castillo Rivas. 2019

La tabla 7 compara la presencia de bacterias que se detectaron según los medios de contraste, donde no se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 7.** Comparación de prevalencia de microorganismos según medio de contraste.

	Diferencias emparejadas					t	gl	Significancia
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Treponema denticola Saliva - Treponema denticola Fluido Crevicular	0,0000	0,5345	0,1380	-0,2960	0,2960	0,0000	14	1,0000
Prevotella intermedia Saliva - Prevotella intermedia Fluido Crevicular	-0,0667	0,7037	0,1817	0,4564	0,3230	-0,3669	14	0,7192
Fusobacterium nucleatum Saliva - Fusobacterium nucleatum Fluido Crevicular	-0,0667	0,4577	0,1182	0,3202	0,1868	-0,5641	14	0,5816

**Fuente:** Elaborado por MsC Jacqueline Castillo Rivas. 2019

## Relación entre la enfermedad periodontal y dieta

### A. Características según IMC

No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el IMC y el estado de enfermedad periodontal ( $p=0,065$ ) No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el IMC y el sexo ( $p=0,789$ ).

No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la edad promedio según IMC ( $p=0,710$ ).

**Tabla 8:** Estadística según sexo por grupo de alimento

Grupo de alimento	Femenino		Sexo				Total		
	Media	N	Desviación estándar	Media	N	Desviación estándar	Media	N	Desviación estándar
Harinas	3,17	8	1,39	3,38	7	1,45	3,27	15	1,37
Proteína animal	3,01	8	0,99	2,20	7	0,78	2,63	15	0,96
Proteína vegetal	0,90	8	0,66	0,99	7	0,69	0,95	15	0,65
Futa	0,26	8	0,09	0,21	7	0,12	0,23	15	0,10
Vegetales	1,37	8	0,86	0,77	7	0,59	1,09	15	0,78
Comidas rápidas y snacks	0,35	8	0,30	0,50	7	0,59	0,42	15	0,45
Bebidas azucaradas	2,92	8	1,87	1,59	7	0,72	2,30	15	1,56
Postres	0,70	8	0,78	0,65	7	0,78	0,68	15	0,76

**Fuente:** Elaborado por MsC Jacqueline Castillo Rivas. 2019

Con respecto al consumo de diferentes alimentos no se encontró diferencia estadísticamente significativa por sexo, aunque sí se observó que las mujeres consumen más vegetales que los hombres al igual que alimentos azucarados.

**Tabla 9:** Estadística según IMC por grupo de alimento

Grupo de alimento	IMC								
	Normal			Sobrepeso			Total		
	Media	N	Desviación estándar	Media	N	Desviación estándar	Media	N	Desviación estándar
Harinas	3,37	7	1,59	3,18	8	1,25	3,27	15	1,37
Proteína animal	2,70	7	1,23	2,58	8	0,74	2,63	15	0,96
Proteína vegetal	0,68	7	0,53	1,18	8	0,70	0,95	15	0,65
Futa	0,25	7	0,08	0,22	8	0,13	0,23	15	0,10
Vegetales	1,02	7	0,76	1,15	8	0,85	1,09	15	0,78
Comidas rápidas y snacks	0,36	7	0,33	0,48	8	0,55	0,42	15	0,45
Bebidas azucaradas *	1,25	7	0,97	3,21	8	1,42	2,30	15	1,56
Postres	0,69	7	0,76	0,67	8	0,80	0,68	15	0,76

\* Diferencia estadísticamente significativa

**Fuente:** Elaborado por MsC Jacqueline Castillo Rivas. 2019

#### 4.2. Discusión:

La enfermedad periodontal es una enfermedad de origen multifactorial, donde la microbiota subgingival, el sistema inmune del huésped, las respuestas inflamatorias y los factores modificadores del entorno interactúan entre sí. (8)

Se puede mencionar que la placa bacteriana es el factor iniciador, pero a la vez influyen una variedad de causas y factores de riesgo. (12)

La presencia de ciertas bacterias en la persona es 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.

El fin del presente estudio fue demostrar la confiabilidad de las muestras de saliva y líquido crevicular de pacientes con enfermedad periodontal, en la Clínica de

Odontología de la Universidad de Costa Rica en el presente año. Los resultados indicaron que ambas técnicas son capaces de detectar la presencia de bacterias como lo son *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* y *Fusobacterium nucleatum*. No fue determinable, en este caso, la presencia de las demás bacterias estudiadas; *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia*. Debe tomarse en cuenta la ventaja de la muestra de saliva sobre la de líquido crevicular, respecto a facilidad y el ser menos invasivo para el paciente.

Lo que demuestra que los microorganismos están presentes en ambos medios, en los que puede variar las concentraciones de oxígeno, temperatura, disponibilidad de nutrientes, características anatómicas y más.

En estudios anteriores se llegó a determinar la mayoría de bacterias no identificables, ya que en estos se realizó una comparación de las diferentes bacterias que se lograrán identificar tanto en saliva como en líquido crevicular. Lo que resultó imposible fue identificar o agrupar todas las bacterias que se encuentran en la cavidad oral. Debido a esto, es importante destacar y tener presente que en la cavidad oral se encuentran bacterias con predominio de 82% *estreptococos* orales, que se encuentran en equilibrio. (18) Una vez que este se rompe, surgen las enfermedades gingivales ligadas a placa que desencadenan el proceso inflamatorio. (18)

Aunque la cantidad de bacterias es bastante numerosa, no todas estas van a tener las características de patogenicidad y provocar la enfermedad, ya que esto es un proceso que se va desarrollando conjuntamente con otros factores.

Según los datos obtenidos y como se observa en el cuadro 6, la diferencia de porcentajes de presencia de las bacterias en estudio entre las muestras de fluido crevicular y saliva no fueron estadísticamente significativas, lo que indica que ambas técnicas de muestreo se pueden utilizar para el diagnóstico de enfermedades periodontales.

En un estudio relacionado, donde se comparan bacterias periodontopatógenas según diferentes tipos de muestreo, Herrero indica 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, posiblemente debido a diferencias en la prevalencia de periodontopatógenos según la población de estudio. (52)

Sin embargo, en diferentes estudios se ha comprobado la superioridad del nicho subgingival y su relación como nicho primario sobre el resto (53) pero si se quiere controlar la infección de la cavidad oral en conjunto, es necesario realizar muestras de otras localizaciones orales, como la saliva, (54) lo que sustenta el principal objetivo de la presente investigación.

Las bacterias presentes en el análisis de muestras fueron del complejo naranja y rojo. Aunque estas especies tienen la característica de que son más prevalentes en la placa subgingival que supragingival, se logró corroborar que con las muestras de saliva brindan información sobre la presencia de este tipo de bacterias.

La composición dietética parece iniciar o acelerar determinados mecanismos que generan la enfermedad periodontal. En cambio, una dieta pobre no parece ser suficiente como para generar por sí sola la patogénesis de la enfermedad periodontal, pero



modifica la susceptibilidad del individuo a padecerla. Una dieta equilibrada ayuda a la resistencia contra la infección e influye además en la virulencia de los patógenos periodontales. Además, el tipo y cantidad de los alimentos que consumimos a diario influye en la formación de la placa bacteriana, al suministrar a las bacterias diferentes nutrientes o alterando el ambiente que las rodea. (55)

En el estudio no se encontró evidencia diferencia estadísticamente significativa entre el IMC y el estado de enfermedad periodontal ( $p=0,065$ ) a pesar de que sí está presente en la literatura una relación entre ambos. (55)

Diversos estudios epidemiológicos afirman una mayor prevalencia de periodontitis en sujetos con obesidad, colocando la misma como segundo factor de riesgo de mayor índole, después de fumar, a través de la destrucción tisular por inflamación. (55) En el estudio la mayoría de los pacientes de la muestra presentaban sobrepeso u obesidad por lo que sí existe una posible relación entre la enfermedad periodontal y el IMC de los pacientes. Sin embargo, debido al tamaño de la muestra no se pudo comprobar relación estadísticamente.

El principal efecto sistémico de un proceso inflamatorio es la denominada Fase de Respuesta Aguda (APR). Esta juega un rol importante en la estimulación de células hepáticas, por parte de citoquinas proinflamatorias producidas en los tejidos inflamados, y la síntesis de proteínas como la proteína C-reactiva. La APR es la donde interactúa la nutrición y las respuestas inflamatorias en el curso de la infección. Asimismo, el estado inflamatorio sistémico conlleva la producción de diferentes mediadores inflamatorios (IL-1, TNF- $\alpha$ ), la proliferación de células inmunitarias y diversas modificaciones metabólicas,

que alteran el aprovechamiento de varios macronutrientes y aumentan el consumo celular de importantes vitaminas y minerales. (56)

El estado nutricional condiciona la respuesta inflamatoria y los fenómenos reparativos de los tejidos, tiene influencia directa sobre la síntesis, la liberación y la acción de las citoquinas. El volumen, las propiedades antibacterianas y físico-químicas de la saliva se modifican negativamente en el curso de una malnutrición. (56)

Se observó que el grupo alimenticio más consumido tanto por los hombres como las mujeres fueron las harinas y de tercero las bebidas azucaradas. Dicho hallazgo es de relevancia ya que, la ingesta de azúcar se ha establecido durante mucho tiempo como el principal factor contribuyente en la formación de placa. (57)

La placa es una biopelícula de glicoproteínas, mucina y bacterias que se adhiere a las superficies de la cavidad oral. El cálculo poroso proporciona una superficie potencial para la habitación de patógenos periodontales, incluidos *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*. Los azúcares contribuyen a la caries dental y la enfermedad periodontal porque las bacterias los fermentan y producen ácido, lo que lleva a la desmineralización de la estructura dental. El xilitol, un alcohol de azúcar producido por la hidrogenación del azúcar de xilosa, es un edulcorante artificial utilizado como alternativa a los azúcares convencionales. Puede tener un efecto antibacteriano contra agentes patógenos periodontales como *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. De hecho, las medidas de higiene oral y el desbridamiento no quirúrgico regular contribuyen a mejorar la salud periodontal. Por lo tanto, una reducción de la ingesta de azúcar, junto con la

instrumentación, el alisado radicular y el uso de productos que contienen xilitol y maltitol tienen el potencial de mejorar la salud periodontal de la población en general. (57)

Las preferencias alimenticias encontradas no fueron las adecuadas. En el estudio de Salazar y colaboradores, se concluyó que las personas que comían una dieta de mejor calidad tenían menos probabilidades de tener periodontitis severa. (58)

#### **4.3. Conclusiones:**

- La técnica de muestreo de saliva con enjuague es más sencilla de realizar y le causa menos temor al paciente que la recolección del fluido crevicular gingival con puntas de papel.
- En ambas técnicas de muestreo dio positivo la presencia de ciertas bacterias, por ejemplo: *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* y *Fusobacterium nucleatum*; por el contrario, dieron negativo la presencia de *Porphyromonas gingivalis* y *Tanerella forsythia*.
- No existe diferencia estadísticamente significativa entre la composición de bacterias periodontopatógenas de las muestras de saliva y de fluido gingival crevicular.
- No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el IMC y el estado periodontal.
- No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el IMC en relación con el sexo y la edad.

- Según el cuestionario de dieta se observó que las mujeres consumen más vegetales que los hombres, al igual que alimentos azucarados.

#### **4.4. Recomendaciones:**

Para futuras investigaciones se recomienda que la población de estudio sea más extensa para que los resultados sean realmente significativos. Como se pudo observar en los resultados la presencia de las bacterias tanto en saliva como en fluido crevicular dio positiva, con el mismo porcentaje en *Treponema denticola*; y en *Prevotella intermedia* y *Fusobacterium nucleatum* un intervalo de diferencia de 6-7%, por lo que se recomienda que para futuros estudios epidemiológicos se utilice solo el método de muestreo de saliva para detectar la presencia de microorganismos bacteriológicos relacionados con la enfermedad periodontal. Esta técnica es más sencilla, económicamente más accesible, menos invasiva, menos sensible y logra demostrar la presencia de estos microorganismos al igual que la técnica de fluido crevicular gingival con puntas de papel.

## CAPÍTULO 5

### 5.1. Cronograma de actividades del Seminario

Fecha	Actividad	Recursos	Responsables	Evaluación del director	Evaluación del grupo
15/03/19	Recibimiento del programa	Programa impreso	Dra. Rojas Lucía Coto Mónica Fabian Carolina Rivera Melany Vargas Vanessa Zamora		
22/03/19	Reunión con la doctora Rojas y el seminario	Computadora. Presentación en Power Point	Dra. Rojas Lucía Coto Mónica Fabian Carolina Rivera Melany Vargas Vanessa Zamora		
05/03/19	Reunión con la doctora Rojas y el seminario	Computadora. Presentación en Power Point	Dra. Rojas Lucía Coto Mónica Fabian Carolina Rivera Melany Vargas Vanessa Zamora		
03/05/19	Reunión con la doctora Rojas y el seminario	Computadora. Presentación en Power Point	Dra. Rojas Lucía Coto Mónica Fabian Carolina Rivera		

			Melany Vargas Vanessa Zamora		
<b>31/05/19</b>	Reunión con la doctora Rojas y seminario	Computadora. Presentación en Power Point	Dra. Rojas Lucía Coto Mónica Fabian Carolina Rivera Melany Vargas Vanessa Zamora		
<b>21/06/19</b>	Reunión con la doctora Rojas y seminario	Computadora. Presentación en Power Point	Dra. Rojas Lucía Coto Mónica Fabian Carolina Rivera Melany Vargas Vanessa Zamora		
<b>02/07/19</b>	Sesión virtual	Computadora. Presentación en Power Point	Dra. Rojas Lucía Coto Mónica Fabian Carolina Rivera Melany Vargas Vanessa Zamora		
<b>23/08/19</b>	Reunión con la Dra. Georgina chaves para la inducción de los cuestionarios de dieta	Computadora. Presentación en Power Point	Dra. Rojas Lucía Coto Mónica Fabian Carolina Rivera		
<b>06/09/19</b>	Reunión con la doctora Rojas, doctor Vega y seminario	Computadora. Presentación en Power Point	Dra. Rojas Dr. Vega Lucía Coto Mónica Fabian		

			Carolina Rivera Melany Vargas Vanessa Zamora		
<b>20/09/19</b>	Reunión con la doctora Rojas, doctor Vega y seminario	Computadora. Presentación en Power Point	Dra. Rojas Dr. Vega Lucía Coto Mónica Fabian Carolina Rivera Melany Vargas Vanessa Zamora		
<b>20/09/19</b>	Redacción de lo faltante del marco teórico	Computadora	Lucía Coto Mónica Fabian Carolina Rivera Melany Vargas Vanessa Zamora		
<b>25/09/19</b>	Firma de consentimiento informado en de preclínica de periodoncia	Consentimiento informado	Dra. Rojas Dr. Vega Lucía Coto Mónica Fabian		
<b>02/10/19</b>	Firma de consentimiento informado en de preclínica de periodoncia	Consentimiento informado	Dra. Rojas Dr. Vega Lucía Coto Mónica Fabian		
<b>09/10/19</b>	Firma de consentimiento informado en de preclínica de periodoncia	Consentimiento informado	Dra. Rojas Dr. Vega Lucía Coto Mónica Fabian		
<b>13/10/19</b>	Correcciones del marco teórico	Computadora	Dra. Rojas Lucía Coto Mónica Fabian		

			Carolina Rivera Melany Vargas Vanessa Zamora		
<b>16/10/19</b>	Toma de muestras de grupo experimental	Instrumental básico Puntas de papel estériles Tubo de centrífuga con enjuague	Dra. Rojas Dr. Vega Lucía Coto Mónica Fabian		
<b>23/10/19</b>	Toma de muestras de grupo experimental	Instrumental básico Puntas de papel estériles Tubo de centrífuga con enjuague	Lucía Coto Mónica Fabian		
<b>30/10/19</b>	Toma de muestras de grupo experimental	Instrumental básico Puntas de papel estériles Tubo de centrífuga con enjuague	Lucía Coto Mónica Fabian		
<b>06/11/19</b>	Toma de muestras de grupo experimental	Instrumental básico Puntas de papel estériles Tubo de centrífuga con enjuague	Lucía Coto Mónica Fabian		
<b>13/11/19</b>	Toma de muestras de grupo control	Instrumental básico Puntas de papel estériles Tubo de centrífuga con enjuague	Lucía Coto Mónica Fabian Melany Vargas		
<b>20/11/19</b>	Toma de muestras de grupo experimental	Instrumental básico Puntas de papel estériles Tubo de	Lucía Coto Mónica Fabian Melany Vargas		



		centrífuga con enjuague			
<b>21- 25/10/19</b>	Inicio de extracción de ADN de las muestras de saliva y fluido crevicular en el CIBCM	Equipo del laboratorio de microbiología molecular		Dr. Vega	
<b>28/10/19- 01/11/19</b>	Continuación de extracción de ADN de las muestras de saliva y fluido crevicular en el CIBCM	Equipo de laboratorio de microbiología molecular		Dr. Vega Mónica Fabian Carolina Rivera Melany Vargas	
<b>04/11/19</b>	Entrega del borrador de la memoria del Seminario de Graduación	Borrador de memoria		Lucía Coto Mónica Fabian Carolina Rivera Melany Vargas Vanessa Zamora	
	Revisión de la memoria por parte de lectores y correcciones indicadas	Borrador de memoria Computadora		Profesores asignados Lucía Coto Mónica Fabian Carolina Rivera Melany Vargas Vanessa Zamora	
	Revisión de la memoria final por parte del filólogo y correcciones indicadas	Borrador de memoria Computadora		Filólogo Lucía Coto Mónica Fabian Carolina Rivera Melany Vargas Vanessa Zamora	
	Elaboración del	Computadora		Lucía Coto	

	afiche del pasillo	Programas de diseño Lona Impresora	Mónica Fabian Carolina Rivera Melany Vargas Vanessa Zamora		
	Elaboración del material audiovisual para la presentación oral	Computadora Power Point	Lucía Coto Mónica Fabian Carolina Rivera Melany Vargas Vanessa Zamora		
	Presentación oral del Seminario de Graduación a la Dra. Rojas	Computadora Presentación Power Point	Lucía Coto Mónica Fabian Carolina Rivera Melany Vargas Vanessa Zamora		
<b>10/11/19</b>	Presentación oral final del Seminario de Graduación	Auditorio Equipo audiovisual Micrófono Presentación Power Point	Dra. Rojas Lucía Coto Mónica Fabian Carolina Rivera Melany Vargas Vanessa Zamora		

## **5.2. Factores facilitadores / Obstáculos y dificultades**

Una de las facilidades fue contar con un banco de pacientes con enfermedad periodontal que son atendidos en la Preclínica de Periodoncia de la Facultad de Odontología en la Universidad de Costa Rica en el 2019, por lo cual fue de fácil acceso y no hubo la necesidad de ir en busca de sujetos de estudio fuera de la Facultad.

Por otro lado, tener la colaboración del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica, para realizar el análisis de muestras ya que este sería un proceso costoso al no contar con su colaboración por lo cual fue un factor positivo, así como contar con la ayuda de la Doctora Georgina Gómez Salas en el análisis de la encuesta de dieta que se obtuvo de cada paciente.

Una de las dificultades fue el tiempo, ya que se realizó toma de muestras con pacientes ingresados en el segundo semestre del año 2019 en la Preclínica de Periodoncia de la Universidad de Costa Rica y el análisis de las muestras es un proceso largo y de mucho cuidado, aparte que se contaba con una fecha establecida para presentar resultados.

El horario de la preclínica provocó algunos obstáculos para avanzar lo más pronto posible en la toma de las muestras, ya que solo se atienden una vez a la semana en ciertas horas del turno, y localizar al paciente fuera del horario de clínica se complicaba por asuntos como trabajo o residencia lejana.

Otro aspecto que dificultó el proceso, fue a la hora de toma de muestras para el líquido crevicular de las bolsas periodontales, ya que en estos casos era necesario la

ausencia de sangre en las muestras con las puntas de papel, y en las personas con esta enfermedad es muy común el sangrado gingival.

Relacionado también con los pacientes el criterio de exclusión e inclusión fue una limitante para tomar en cuenta o no al paciente, ya que estos debían cumplir con ambas, no bastaba con solo padecer enfermedad periodontal para poder ser sujeto de estudio.

## Referencias bibliográficas

1. Ainamo J., Barmes D., Beagrie G., Martin J. & Sardo-Infirri J. *Development of the World Health Organization (WHO) Community Periodontal Index of Treatment Needs (CPITN)*. WHO Index of Treatment Needs. 1982; Volume 32: N.3
2. Pulido M., Gonzalez F. & Rivas F. *Enfermedad periodontal e indicadores de higiene bucal en estudiantes de secundaria Cartagena, Colombia*. Rev. Salud Pública. 2011; 13 (5): 844-852
3. Lao W., Araya H. *Enfermedad periodontal en Costa Rica 2017*. Odontología Vital. 2018; 29:59-68
4. Aguilar A., Bermudez D. & Chacón L. *Seminario de Graduación: Comparación 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*. Universidad de Costa Rica. 2018
5. Newman MG., Takei HH., Carranza FA. & Klokkevold PR. *Periodontología Clínica de Carranza*. Venezuela Amolca. 2014
6. Chinchilla M., Diaz S. & Fong C. *Seminario de Graduación: Planeamiento de un protocolo para el análisis microbiológico en fluido crevicular y saliva*. Universidad de Costa Rica. 2017.
7. Chang H., Hajibandeh J., Suzuki T., Fan A., Shang P. & Mao J. *Three-Dimensional Printed Multiphase Scaffolds for Regeneration of Periodontium Complex*. Tissue Engineering Part A. 2013; 20: 7-8.
8. Caton J., Armitage G., Berglundh T., et al. *A new classification scheme for periodontal and periimplant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification*. *J Clin Periodontol*. 2018; 45(Suppl 20):S1–S8.
9. Holmstrup P., Plemons J. & Meyle J. *Non-plaque-induced gingival diseases*. *J Clin Periodontol*. 2018; 45(Suppl 20):S28–S43.
10. Lang NP., Bartold PM. *Periodontal health*. *J Clin Periodontol*. 2018; 45(Suppl 20):S9–S16.
11. Murakami S., Mealey BL., Mariotti A. & Chapple ILC. *Dental plaque-induced gingival conditions*. *J Clin Periodontol*. 2018; 45(Suppl 20):S17–S27.

12. McKinley Health Center. *Macronutrients: the importance of carbohydrate, protein and fat*. University of Illinois. 2013.
13. American Council of Exercise. *Micronutrients, Micronutrients and water*. 2019: 4-5
14. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. *Macronutrientes y Micronutrientes*. 2015:1-2
15. Aguilar FE., Sosa FJ., Bojórquez Y. & Fontes Z. *Periodontitis una enfermedad multifactorial: Diabetes Mellitus*. Revista Iberoamericana de las Ciencias de la Salud. 2017; Vol 6, Número 11: 4-5
16. Petrović M., Kesić L., Živkovic N., Obradović I & Obradović R. *Human Viruses and Periodontal Diseases*. Acta Stomatologica Naissi. 2017: 1110-1113
17. Escribano M., Matesanz P. & Bascones A. *Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis*. Av Periodon Implantol. 2005: 79-80
18. Botero JE. & Bedoya E. *Determinantes del diagnóstico periodontal*. Revisión bibliográfica. 2010: 94-95
19. Peña M., Calzado M., González M., Cordero S. & Azahares H. *Patógenos periodontales y sus relaciones con enfermedades sistémicas*. MEDISAN. 2012:1-5
20. Echeverría A., Vignoletti F., Fabrizi S. & Matesanz P. *Papel etiológico de los virus en la enfermedad periodontal*. Av Periodon Implantol. 2007: 91-97
21. Guillarte C. & Perrone M. *Bacterias Periodonto patógenas: Bacilos Anaerobios gran negativos como agentes Etiológicos de la Enfermedad Periodontal*. Acta Odontológica Venezolana. 2005; Vol 43(2).
22. Liébana J., Castillo A. & Álvarez M. *Enfermedades Periodontales: consideraciones microbiológicas*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2004
23. Alfageme M. *Transmisión de Periodontopatógenos (Tesis de Grado)*. Universidad de Sevilla, España. 2017: 6-11
24. Stifano M., Chimenos E. & López. *Nutrición y prevención de las enfermedades de la mucosa oral*. Odontología Preventiva. 2015.
25. Hong J., et al. *A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study for evaluating the effects of fixed-dose combinations of vitamin C, vitamin E,*

- lysozyme, and carbazochrome on gingival inflammation in chronic periodontitis patients.* BMC Oral Health. 2019;19:40.
26. Willershausen B., Ross A., Försch M., Willershausen I., Mohaupt Ph. & Callaway, A. *The influence of micronutrients on oral and general health.* European Journal of Medical. 2011.
27. Van der Velden U., Kuzmanova D., Chapple ILC. *Micronutritional approaches to periodontal therapy.* J Clin Periodontol. 2011; 38 Suppl 11:142–58.
28. Abreu J., et al. *Low vitamin D status strongly associated with periodontitis in Puerto Rican adults.* BMC Oral Health. 2016
29. Guedes P., et al. *Calcium and vitamin D supplementation and/or periodontal therapy in the treatment of periodontitis among Brazilian pregnant women: protocol of a feasibility randomised controlled trial (the IMPROVE trial).* Pilot and Feasibility Studies. 2019; 5:38.
30. Singh N., Chander Narula S., Kumar Sharma R., Tewari S. & Kumar SP. *Vitamin E supplementation, superoxide dismutase status, and outcome of scaling and root planing in patients with chronic periodontitis: a randomized clinical trial.* J Periodontol. 2014; 85:242–9.
31. Castro CE., Koss MA & López ME. *Marcadores bioquímicos de la enfermedad periodontal.* Med Oral. 2003; 8:322-8.
32. Barros S., Williams R., Offenbacher S. & Morelli T. *Gingival Crevicular as a Source of Biomarkers for Periodontitis.* Periodontol 2000. 2016; 70 (1): 53-64.
33. Faria R., Belén A. & Bascones A. *Nuevos métodos de diagnóstico en Periodoncia. Métodos bioquímicos.* Av Periodon Implantol. 2001; 13, 1: 29-37.
34. Rojas, G., Silva de la Fuente, S. *Técnica sencilla para determinar la presencia de genotipos virales y bacterianos en pacientes enfermedad periodontal.* Revista Científica Odontológica. 2011; Vol. 7, Núm. 2.
35. Zárate A., Leyva A., Franco F. *Determinación de pH y proteínas totales en saliva en pacientes con y sin aparatología ortodóncica fija (estudio piloto).* Revista odontológica Mexicana. 2004; Volumen 8, Num 3: 59.
36. Sánchez P. *La saliva como fluido diagnóstico.* Ed Cont Lab Clín. 2012-2013; 16: 93-108

37. López M. *Principales técnicas de recogida y registro del fluido salival en el hombre ventajas e inconvenientes*. 1993: 11-17.
38. Loyo K., Balda R., González O., Solórzano A., González M. *Actividad cariogénica y su relación con el flujo salival y la capacidad amortiguadora de la saliva*. Acta Odontológica Venezolana. 1999. Volumen 37. Num 3.
39. Salimetrics. *Saliva collection handbook*. 2019
40. Alvarado L. *Extracción de ADN*. 2009
41. Vidal M., Suarez A. *Evaluación de dos métodos para extracción de ARN en saliva en niños*. 2017.
42. Alejos L, Aragon M. *Extracción y Purificación del ADN*. 2015.
43. Cultura Kumawat RM et al. *Detection of Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola in chronic and aggressive periodontitis patients: A comparative polymerase chain reaction study*. Contemp Clin Dent. 2016; 7:481-6.
44. S. Shahi et al. *Polymerase chain reaction (PCR)- based methods: promising tools in dentistry*. International Journal of Biological Macromolecules. 2018; 117. 983-992
45. Yong kim et al. *The Gene: The Polymerase Chain Reaction and Its Clinical Application*. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. J Oral Maxillofac Surg. 2002; 60:808-815.
46. Lorenz, T.C. *Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies*. J. Vis. 2012; Exp. (63), e3998
47. Eva Mas et al. *Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)*. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza (España). 2001
48. Doroteo M. *Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de analitos*. 2012; Vol. 1, Núm. 2.
49. Magaña J., Arenas M., Gómez R. *La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico*. Rev. méd. Chile. 2009; 946-956.
50. Marrondo, R. *Desarrollo de métodos de electroforesis capilar en fase micelar*. 2002: 17-31.
51. Abreu, JL. *Hipótesis, Método & Diseño de Investigación*. International Journal of Good Conscience. 2012; 7 (2) 187-197.



- 52.. Herrero A. *Detección de herpesvirus y bacterias periodontopatógenas en muestras de fluido crevicular gingival y saliva en periodontitis crónica*. Universidad Complutense de Madrid. 2016.
53. Danser, M.M., van Wilkelhoff, A.J., de Graaf, J., Loos, B.G., van der Velden,U. *Short-term effect of full-mouth extraction on periodontal pathogens colonizing the oral mucous membrane*. Journal of Clinical Periodontology. 1994; 21(7), 484- 489.
54. Quirynen, M., van Assche, N. *Microbial changes after full-mouth extraction, followed by 2-stage implant placement*. Journal of Clinical Periodontology. 2011; 38(6), 581-589.
55. Aguilar C. *Dieta y Enfermedad Periodontal*. revisión bibliográfica. Sevilla. 2016.
56. Stifano M., Chimenos-Küstner E., López-López J., Lozano-de Luaces V. *Nutrición y prevención de las enfermedades de la mucosa oral*. Odontol. 2008; Prev;1(2):65-72
57. Najeeb S., Zafar M.S., Khurshid Z., Zohaib S., Almas K. *The Role of Nutrition in Periodontal Health: An Update*. Nutrients. 2016; 8:530.
58. Salazar CR., Laniado N., Mossavar-Rahmani Y., Borrell LN., Qi Q., Sotres-Alvarez D., Morse DE., Singer RH., Kaplan RC., Badner V., Lamster IB. *Better-quality diet is associated with lower odds of severe periodontitis in US Hispanics/Latinos*. J Clin Periodontol. 2018; 45(7):780-790.

# **Anexos**

# Anexo 1

Información general							
Código del participante:							
Fecha:							
Antropometría							
Talla (cm):		Peso (kg):		C. cuello (cm):		C. cintura (cm):	
Cuestionario de frecuencia de consumo							
Cuántas días durante la semana pasada usted consumió los siguientes alimentos?							
	Ninguno	1 día	2 días	3-4 días	5-6 días	Todos los días	Cantidad
<i>Harinas y cereales:</i>							
Pan blanco cuadrado							
Pan blanco bagette							
Pan bollito							
Pan integral							
Cereal de desayuno							
Galletas dulces							
Galletas integrales							
Tortillas							
Gallo pinto							
Papas							
Plátanos							
Pasta							
Queques/repostería							
<i>Carnes y huevo s</i>							
Huevos							
Embutidos							
Carnes rojas							
Pollo							
Pescado/atún							
Visceras							
Otro:							
<i>Lácteos:</i>							
Leche							
Queso							
Yogurt							
Natilla							
<i>Leguminosas y semillas:</i>							
Frijoles							
Garbanzos							
Lentejas							
Nueces/semillas							
<i>Frutas:</i>							
Banano							
Naranja							
Papaya							
Mango							
Sandía							
Otra:							

<i>Vegetales:</i>							
Lechuga							
Repollo							
Tomate							
Zanahoria							
vainicas							
Brócoli/coliflor							
Elote							
Chayote							
Otro:							
Azúcar							
Miel							
Jaleas							
<i>Grasas:</i>							
Mantequilla/margarina							
Frituras							
Mayonesa							
Aceite							
<i>Bebidas alcohólicas:</i>							
Cerveza							
Cocteles							
Destilados							
Vino							
<i>Bebidas:</i>							
Café							
Jugos o nectares envasados							
<i>Bebidas de té embotelladas</i>							
Bebidas gaseosas							
Bebidas gaseosas sin azúcar							
Cuántas días durante la semana pasada usted consumió los siguientes alimentos?							
	Ninguno	1 día	2 días	3-4 días	5-6 días	Todos los días	Cantidad
Hamburguesas							
Pizza							
Papas fritas							
Pollo frito							
Refrescos gaseosos							
Jugos comerciales							
Frescos naturales con azúcar							
Café o té con azúcar							
Dulces, confites, chocolates							
Postres							

Helados							
Gelatina							
Snacks en bolsita							

Mencione algún otro alimento consumido con frecuencia en la última semana:

---

Cuando consume frescos naturales

Endulza la bebida? si  no

Con qué la endulza?: \_\_\_\_\_

Cuántas cucharaditas agrega?: \_\_\_\_\_

Cuanto toma té o café

Endulza la bebida? si  no

Con qué la endulza?: \_\_\_\_\_

Cuántas cucharaditas agrega?: \_\_\_\_\_

## Anexo 2



**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**  
**VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN**  
**COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO**  
Teléfonos:(506) 2511-4201 Telefax: (506) 2224-9367

Facultad de Odontología

### **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.

Comité Ético Científico \_\_\_\_\_  
Universidad de Costa Rica



- 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 a 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).

Comité Ético Científico  
Universidad de Costa Rica



## 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<sup>º</sup>  
DE JUNIO DE 2008.  
CELM-Consentimiento informado saliva fluidocrev 2017 2018 (1).odt

Comité Ético Científico \_\_\_\_\_  
Universidad de Costa Rica





