

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



RELACIÓN DE LOS HERPES VIRUS Y LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Por

SERGIO ORTIZ PÉREZ

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

Monterrey, Nuevo León, 2010

APROBACION DE MAESTRIA

PREVALENCIA DE LOS HERPES VIRUS EN LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Aprobación de la Tesis:

Dr. Claudio Cabral
Asesor de tesis

Dra. Myriam de la Garza
Directora de tesis

Dra. Gloria Martínez de Zambrano
Asesor de tesis

Dr. Sergio Nakagoshi Cepeda
Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Tabla de contenidos

I. Antecedentes	8
II. Planteamiento del problema	9
III. Justificación	10
IV. Objetivos	11
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos.....	11
V. Hipótesis.....	12
Ha	12
VI. Marco Teórico	13
Enfermedad Periodontal Crónica.....	13
Enfermedad Periodontal Agresiva	13
Microbiología de la Enfermedad Periodontal	14
Herpes virus	15
Virus herpes simple tipo I (VHS-I).....	18
Virus herpes simple tipo 2 (VHS-2).....	19
Citomegalovirus o virus simplex tipo 5.....	20
Reacción de cadena de la Polimerasa (PCR)	21
Etapas de la PCR	22
Naturaleza del ADN	23
Oligonucleótidos	25
Enzima ADN polimerasa.....	26
dNTP's	27
Buffer del Taq polimerasa.....	27
Dentro de los parámetros clínicos que se evaluarán en este estudio están los que se describen a continuación.....	28
Profundidad de sondeo.....	28
Nivel de inserción clínica	28
Índice de placa	29
Índice gingival	30
VII. Diseño Metodológico.....	31

Tipo de estudio	31
Conocimiento que tienen los investigadores de los factores del estudio	31
Participación del investigador	31
Tiempo en que suceden los eventos	31
Relación que guardan entre sí los datos.	31
VIII. Materiales y Métodos.....	32
Unidad de observación	32
Tamaño de la muestra.....	32
Forma de asignación de los casos a los grupos de estudio	32
Temporalidad.....	32
Ubicación espacial.....	33
Criterios de inclusión	33
Criterios de exclusión	33
Criterios de eliminación	33
IX. Metodología.....	34
Selección del paciente.....	34
Historia clínica	34
Radiografías periapicales	34
Examen dental.....	34
Examen periodontal.....	34
Profundidad de sondeo.....	34
Nivel de inserción clínica	34
Índice de placa	34
Índice gingival	35
Obtención de la muestra.....	36
Pruebas de laboratorio	36
Extracción del ADN.....	36
Primers u oligos	37
Preparación del ADN viral para PCR (anexo I).....	38
Parámetros para la PCR (anexo I).....	38
Variable independiente	43

Variable dependiente	43
XI. Análisis Estadístico	44
XII. Resultados	45
XIII. Discusión.....	50
XIV. Conclusiones	56
XV. Resumen.	57
XVI. Referencias	58
XVI. Anexos	63
Consideraciones éticas.	74

I. Antecedentes

La enfermedad periodontal o periodontitis es una patología inflamatoria de los tejidos de soporte de los dientes causada por microorganismos o grupos de microorganismos específicos que producen la destrucción progresiva del ligamento periodontal y el hueso alveolar con formación de bolsa, recesión o ambas. (Ranney, R 1999, Carranza 2004)

En los últimos años se ha visto una relación entre los virus humanos y las bacterias periodontopatógenas. Se ha observado la presencia de los herpes virus humanos en bolsas periodontales compartiendo el mismo nicho que las bacterias periodontopatógenas. (Contreras, 1999)

Investigaciones recientes documentaron que hay un nexo entre la enfermedad periodontal crónica y el virus del herpes, particularmente el herpes virus tipo I y el citomegalovirus. (Carranza 2004) (Slotz, 1996). Dichos virus se han encontrado en muestras de placa subgingival y en sitios de profundidad de bolsa mayores a cinco mm. (Ling, 2004). El virus del herpes simple tipo I (HSV por sus siglas en inglés), se ha visto que tiene menos prevalencia que el citomegalovirus (HCMV por sus siglas en inglés) y que el virus del Epstein-Barr (EBV por sus siglas en inglés). El (HSV) se asocia con la enfermedad periodontal ya que donde los parámetros clínicos se ven mayormente afectados, se ha encontrado la presencia de dicho virus. (Contreras, 1996,1998, 1999), (Saygun, 2002). El HCMV se ha asociado a las manifestaciones de la enfermedad periodontal (índice periodontal, índice gingival, niveles clínicos de inserción). (Contreras, 2007)

Kamma et al mostraron que tanto el HSV como el HCMV estaban estadísticamente asociados a la enfermedad periodontal activa. (Kamma et al. 2001)

II. Planteamiento del problema

¿Existe una relación entre los herpes virus humanos y pacientes con enfermedad periodontal crónica y agresiva?

III. Justificación

El presente estudio pretende relacionar la presencia de los herpes virus con la enfermedad periodontal.

Se ha visto una implicación de los herpes virus en la enfermedad periodontal. Esta asociación se cree que está ligada con la severidad de la enfermedad periodontal en donde se ha visto mayor prevalencia en profundidades de bolsa mayores a 5mm y en mayor medida en pacientes con formas agresivas de la enfermedad.

Este estudio procurará dar a conocer más información acerca de la posible relación que pueda existir entre la presencia de herpes virus y la enfermedad periodontal.

Con este estudio se dará a conocer a fondo del tema a profesionales de la periodoncia y evaluar las investigaciones previamente realizadas. Se podrán expandir las líneas de investigación hacia este tema y eventualmente buscar nuevas modalidades terapéuticas.

IV. Objetivos

Objetivo general

Relacionar la enfermedad periodontal crónica y la enfermedad periodontal agresiva con la presencia del virus del herpes tipo 1, tipo 2 y citomegalovirus en pacientes que acuden al posgrado de periodoncia de la UANL.

Objetivos específicos

- 1.1 Determinar el índice gingival, índice de placa, profundidad de sondeo, niveles de inserción, en pacientes con periodontitis crónica y agresiva.
- 1.2 Estandarizar la técnica de detección de herpes virus.
- 1.3 Establecer la presencia del herpes virus mediante pruebas de reacción de cadena polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) en paciente con enfermedad periodontal crónica y agresiva.
- 1.4 Asociar el índice gingival índice de placa, profundidad de sondeo, niveles de inserción con la presencia de virus en pacientes con periodontitis crónica y agresiva.
- 1.5 Relacionar los objetivos anteriores por edad y género.

V. Hipótesis

Ha: Existe relación entre los parámetros clínicos y de laboratorio y la presencia los herpes virus en pacientes con periodontitis crónica y periodontitis agresiva que acuden al posgrado de periodoncia de la UANL.

VI. Marco Teórico

Enfermedad Periodontal Crónica

La periodontitis se define como una enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte de los dientes causada por microorganismos o grupos de microorganismo específicos que producen la destrucción progresiva del ligamento periodontal y el hueso alveolar con formación de bolsa, recesión o ambas. (Ranney, 1993)

La periodontitis crónica es la forma más frecuente de periodontitis. Está es más prevalente en adultos mayores a 35 años, pero también se puede presentar en niños. La periodontitis crónica está vinculada con la acumulación de placa y cálculos y su progresión puede ser leve o moderada, sin embargo se observan periodos de destrucción más rápidos. (Ranney, 1993)

Factores locales, sistémicos y ambientales influyen en la interacción de los tejidos de soporte del huésped así como las bacterias presentes en dicha enfermedad. (Carranza, 2004)

La periodontitis crónica ocurre como una enfermedad localizada en que menos del 30% de los sitios valorados presenta una pérdida de inserción y ósea. Se denomina generalizada cuando más de un 30 % de los sitios se encuentran afectados. (Armitage, G. 1999, 2004)

La enfermedad también se puede clasificar dependiendo de su intensidad. Así se clasifica como leve cuando existe una pérdida de inserción clínica de 1-2 mm; moderada cuando existe una pérdida de inserción clínica de 3-4mm y grave cuando existe una pérdida de inserción clínica de 5mm o más. (Armitage, G. 1999, 2004)

Enfermedad Periodontal Agresiva

Anteriormente llamada periodontitis de aparición temprana, este término se descartó ya que tenía ciertas limitaciones y entre ellas estaba la limitante de la edad. El término actual presenta dos subgrupos.

La periodontitis agresiva localizada y la periodontitis agresiva generalizada. Presentan rasgos en común como:

- Los pacientes, a pesar de tener el padecimiento periodontal, son pacientes sanos.
- Rápida pérdida del soporte periodontal
- Presenta cierto patrón a nivel familiar.

También pueden existir otras manifestaciones como lo son: Presencia de acúmulos bacterianos que no van acorde a la severidad de la enfermedad, a nivel de laboratorio altos niveles de *actinomices actinomycetencomitans* (A.a.) y de *Porphyromona. gingivalis*, anomalías en el sistema fagocítico mononuclear, altos niveles de prostaglandina proinflamatoria 2 y de interleuquina 1-beta (factores mediadores de la inflamación). (Annal, 1999)

Dentro de los parámetros para la clasificación de la enfermedad periodontal agresiva, presenta un inicio circumpuberal, respuesta inmune aumentada a agentes infecciosos, pérdida localizada confinada a primeros molares e incisivos con un patrón de 'pérdida vertical. (Parameter on aggressive periodontitis, 2000)

La periodontitis agresiva generalizada, afecta a personas menores de 30 años, con una pobre respuesta inmune ante agentes infecciosos, periodos episódicos de destrucción periodontal y pérdida ósea generalizada confinada a la superficie interproximal que afecta a por lo menos tres órganos dentales distintos a primeros molares e incisivos. (Parameter on aggressive periodontitis, 2000)

Microbiología de la Enfermedad Periodontal

En un periodonto afectado se puede encontrar aproximadamente entre un 70 a un 80% de bacterias de las cuales existe una variedad de 200 a 400 bacterias además de las posibles bacterias no identificadas. Se han encontrado también otros microorganismos como hongos, Micoplasma, protozoarios y virus.

Se encuentran microorganismos filamentosos en su mayor parte cocos y bacilos. Dentro de los microorganismos gram positivos se encuentran

Streptococcus mitis, *S. sanguis*, *A. viscosus*, *A. naeslundii* y especies de *Eubacterium*. Dentro de los microorganismos gram negativos se encuentran los filamentosos, bacilos flagelados y espiroquetas. En el tejido se puede apreciar la presencia de *S. oralis*, *S. intermedius*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* y *Fusobacterium nucleatum*. (Carranza, F 1982).

Herpes virus

Los herpes virus presentan una envoltura icosaédrica de 100nm con un ADN lineal de 100*106 Dalton. Se multiplican en el núcleo de la célula diana mediante uniones a la membrana nuclear y causan infecciones latentes. El tamaño del virus desnudo es de 110nm. (Ramos, 2008)

Los herpes virus atacan mucosas, piel, ojos y el sistema nervioso. Durante la infección primaria pueden o no existir manifestaciones: de un 88% a 99% de las infecciones virales orales causadas por herpes virus son asintomáticas. Posterior a la infección primaria, el virus ataca nervios sensoriales o autonómicos y permanece en los ganglios de la zona infectada. Ante los distintos estímulos, el virus en su periodo de latencia se reactiva, crece en las neuronas, viaja a través del sistema nervioso y causa lesiones en el lugar afectado. (Ramos, 2008)

Los virus son causa de varias enfermedades infecciosas. Están implicados en un 15 a 20% de neoplasias en humanos. (Ramos, 2008)

Los virus no tienen la capacidad de producir energía por lo que su replicación depende de la capacidad propiamente del virus de infectar al hospedero para poder obtener su energía y realizar la síntesis de sus proteínas. La infección viral puede desencadenar una replicación rápida del agente y la destrucción de la célula infectada. (Ramos, 2008)

Los virus ADN se replican en el núcleo y tienen mayor capacidad de supervivencia que los virus ARN. La replicación viral empieza cuando el virión se adhiere, mediante sus receptores, a la membrana de las células diana

humanas. Una vez adherida, la partícula viral ingresa en la célula y ocurre la transcripción del mRNA seguida de la síntesis de la proteína viral y la replicación de dicha partícula en el genoma de la célula hospedera. La interacción entre la partícula viral y la célula hospedera, desencadena interacciones en la célula como lo son:

- Inducción de citoquinas
- Inducción de prostaglandinas
- Cambios en el citoesqueleto de la célula

Una vez establecida la partícula viral en el genoma, los viriones son liberados por exostosis o por la lisis de la célula. (Ramos, 2008)

Los herpes virus constan de una cubierta que contiene el ADN, una capsida isopentahédrica, y una bicapa lipídica y se pueden encontrar en distintas fases: una fase productiva y una fase o periodo de latencia. Durante el periodo de latencia, el DNA viral se integra y actúa como parte del genoma de la célula huésped. Posteriormente ingresa en un estado de productividad en el que el virus amplifica su genoma en unas 100 a 1000 veces y comienza la replicación viral. (Slots, 2005)

Existen aproximadamente 120 tipos de herpes virus identificados, sin embargo son ocho los implicados en afectar células humanas. Entre ellos se encuentran: herpes simples virus tipo 1 y tipo 2 (HSV), virus de varicela zoster, virus del Epstein-Barr (EBV por sus siglas en inglés), el citomegalovirus (HCMV por sus siglas en inglés), el herpes virus humano tipo 6, 7 y 8. Este último llamado virus del sarcoma de Kaposi. (Slots, 2005)

Para que el virus pueda sobrevivir y replicarse, necesita disminuir la capacidad inmunológica del huésped y esto lo logra restringiendo la cantidad de macrófagos, linfocitos y otras células responsables de la respuesta inmune.

Los herpes virus están confinados a actuar en sistemas inmunes inmaduros o sistemas inmunes comprometidos. Factores como el estrés, cambios hormonales, infecciones, fármacos inmunodepresores pueden hacer que el virus, que se encuentra en una fase de latencia, se active e ingrese en su ciclo reproductivo. (Slots, 2005)

Los herpes virus son altamente selectivos a la hora de escoger sus órganos blancos a los cuales infectar, reflejando así su capacidad de tropismo.

La transmisión de los herpes virus se puede dar prenatal; de madre a hijo o de persona a persona por contacto directo mediante secreciones orofaríngeas, secreciones vaginales, semen, leche materna, lágrimas, saliva, heces y sangre. (Sepulveda, 2003)

Los herpes virus pueden estar en periodo latente, subclínico o clínico. La colonización en la mayoría de los individuos no se logra apreciar. Las manifestaciones clínicas más serias suelen apreciarse cuando la lesión ocurre en adolescentes. La infección con herpes virus en un paciente inmunocomprometido puede elevar el riesgo de otras infecciones de tipo bacteriana, fúngica u otras infecciones virales. (Ramos, 2008)

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

La respuesta de los linfocitos T cambia conforme avanza el tiempo y está relacionada con la presencia del herpes virus ya que en los inicios se aprecia una respuesta de las células CD4+ bastante marcada. En el periodo de latencia el proceso de inmunidad se encuentra mediado por las células CD8+. (Ramos, 2008. Harrison, 2008)

Los herpes virus actúan sobre la respuesta de los macrófagos y linfocitos disminuyendo la capacidad de defensa y así poder realizar sus procesos de supervivencia. (Ramos, 2008. Harrison, 2008)

Los herpes virus también actúan en la regulación de citoquinas ya que aumentan las citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , INF γ). En cantidades normales estas citoquinas resultan de gran ayuda en la respuesta del organismo al herpes virus, sin embargo, al verse estas citocinas aumentadas, por los herpes virus, resulta en una respuesta exagerada convirtiéndose en un estímulo fisiopatológico. (Ramos, 2008. Harrison, 2008)

El herpes virus permanece latente en el ganglio de Gasser, y factores como luz solar, inmunosupresión, radiación y radioterapia pueden desencadenar la recurrencia de las lesiones por herpes virus. (Ramos, 2008. Harrison, 2008)

En pacientes inmunocomprometidos, la recurrencia intraoral puede presentarse en mucosa queratinizada y no queratinizada, en cualquier parte de la boca, transformándose y convirtiéndose en lesiones severas que pueden complicarse y diseminarse con una morbilidad significativa y evolución más larga de lo normal. (Ramos, 2008. Harrison, 2008)

Los anticuerpos juegan un papel importante en la inmunidad ante las infecciones virales. La IgA juega un papel importante en la resistencia a la reinfección. La IgG y la IgM son responsables en la neutralización del virus en plasma. La IgA neutraliza los virus en mucosas. La IgM aparece antes de la IgG en los primeros dos días a la infección viral. Actualmente se sabe muy poco de la actividad de la IgE en la respuesta viral. (Ramos, 2008. Harrison, 2008)

La fiebre, el interferon y los factores genéticos proveen resistencia a las infecciones virales. En el caso de la fiebre, la temperatura elevada disminuye la capacidad de replicación viral y ayuda a que el crecimiento de otras cepas de virus se vean afectada. (Ramos, 2008. Harrison, 2008)

Virus herpes simple tipo I (VHS-I)

Los virus herpes simple tipo I se encuentran ampliamente diseminados en el mundo y su seroprevalencia es elevada. El 90% de los adultos tienen anticuerpos contra el VHS-1 al llegar a la quinta edad de vida. La persona se infecta con el VHS-1 por contacto con el virus, presente en lesiones o secreciones de individuos enfermeros o excretores asintomáticos. Principalmente infecta piel y mucosa facial, aunque también puede dar manifestaciones genitales y del sistema nervioso central. La vía de entrada es a través de la mucosa oral, generalmente sin síntomas.

Los virus siguen las terminaciones nerviosas que inervan la zona y viajan por los axones hasta las neuronas ganglionares donde permanecen en estado de latencia.

El cuadro clínico es característico: se inicia como un área hipersensible seguida de lesiones vesiculosas que confluyen y son muy dolorosas. El periodo de incubación varía desde uno hasta quince días y puede acompañarse de fiebre, odinofagia y puede afectar la mucosa oral y la porción anterior de la lengua y paladar duro, adenopatías cervicales o submaxilares.

El cuadro clínico dura de cinco a catorce días y la excreción del virus sigue hasta que desaparezcan las vesículas. Pueden ser contagiosas al contacto y las infecciones recurrentes son clínicamente menos graves que la primera vez y comprometen principalmente piel y mucosas.

El tratamiento suele ser asintomático, en general, es una enfermedad benigna.

Virus herpes simple tipo 2 (VHS-2)

El VHS-2 es la principal causa de herpes genital (enfermedad de transmisión sexual); sin embargo, se reconoce que hasta el 50 % del primer episodio puede ser por VHS. En el mundo la prevalencia es cercana al 20% y es mayor en mujeres. Esta prevalencia está en relación con la actividad sexual previa.

La afección genital por el herpes simplex virus tipo 1 y 2 es indistinguible por la clínica. La infección se transmite por el contacto directo con lesiones o con secreciones infectadas. Los desencadenantes de este virus son la menstruación, trauma local, fiebre, infecciones e inmunosupresión. Al activarse viaja a través de las neuronas y se elimina por vía vaginal o semen, lo que a veces se acompaña de manifestaciones clínicas.

Presenta un periodo de incubación de dos a veinte días, se observan vesículas múltiples, agrupadas, dolorosas, sobre una base roja que se ulceran y luego cicatrizan lentamente. Pueden afectar genitales externos y presentar malestar general, fiebre, adenopatías inguinales y cefalea. En las recurrencias

hay menos lesiones, son más localizadas y desaparecen en un lapso de siete a diez días.

Es una enfermedad altamente dolorosa, molesta y contagiosa; su diagnóstico es clínico y se pueden realizar frotis para el diagnóstico de laboratorio. (Rusell, G. 2005)

Citomegalovirus o virus simplex tipo 5

El citomegalovirus es de alta prevalencia en nuestro medio; su importancia radica en que puede reactivarse en inmunosupresión como trasplante, virus de la inmunodeficiencia humana, entre otras.

Presenta un amplio espectro y puede presentarse en forma benigna en pacientes inmunocomprometidos y manifestarse en forma de mononucleosis infecciosa, caracterizado por infección faríngea, adenomegalias, fiebre, dolor articular, rash y malestar general. La transmisión es por contacto con secreciones orofaríngeas, orina, secreciones vaginales, semen, leche materna, lágrimas, heces y sangre.

La infección por este virus es sistémica y se multiplica en todos los órganos y se excreta en todas las secreciones corporales. El daño celular es por acción directa de la replicación viral y la reactivación generalmente se encuentra libre de síntomas.

El citomegalovirus (HCMV) infecta monocitos y macrófagos, linfocitos T, células de los conductos salivares, células endoteliales, fibroblastos, leucocitos polimorfonucleares, y se establecen en las células mieloides en su periodo de latencia.

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

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

El citomegalovirus presenta cuadros clínicos de mononucleosis caracterizada por fiebre, y malfuncionamiento del hígado

El diagnóstico de la infección por citomegalovirus se realiza mediante el aislamiento del virus en cultivos celulares o por técnicas moleculares (PCR).

Reacción de cadena de la Polimerasa (PCR)

En 1985 Karry B. Mullins en Estados Unidos creó este procedimiento y lo fue perfeccionando durante ese mismo año aplicándolo exitosamente en el diagnóstico clínico.

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

Los reactivos necesarios para llevar a cabo la PCR son:

ADN templado o blanco:

Es el ADN del gen que se utiliza para detectar un organismo específico, en este caso herpes virus. Este ADN debe ser altamente específico para el organismo a estudiar. Se emplean secuencias de alta variabilidad presentes en este gen. En teoría, basta una sola molécula de ADN templado para iniciar la PCR; en la práctica se requiere la presencia de algunas decenas o cientos de ellas.

El éxito de la PCR en el diagnóstico de enfermedades infecciosas se basa en su capacidad para reconocer y amplificar características génicas particulares de un

microorganismo determinado. Estas características están dadas en pequeños segmentos llamados genes presentes en cualquier microorganismo.

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

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

Etapas de la PCR

1. Desnaturalización

En esta etapa el ADN blanco que va a ser copiado se somete durante un breve lapso (aproximadamente de 30-90 segundos) a una temperatura elevada de aproximadamente 92°C-98°C. Bajo estas condiciones, las dos cadenas del ADN (unidas mediante puentes de hidrógeno) se separan por acción del calor. Esta etapa permite que las secuencias de nucleótidos de cada cadena sean expuestas y queden disponibles para ser reconocidas por los oligos en la etapa que sigue. (Barrera Sadaña, A. López, R. Rojas, A. 1993)

2. Alineamiento

En esta etapa, la temperatura se disminuye a un valor de por lo menos 5°C-10°C debajo de la temperatura de los oligos. En este momento se realiza el apareamiento específico entre los oligos y las cadenas sencillas del segmento del ADN blanco. Esta etapa se efectúa normalmente a 50°C-55°C por un tiempo

de 30 a 90 segundos. Las condiciones pueden variar dependiendo del diseño de los oligos. (Barrera Sadaña, A. López, R. Rojas, A. 1993)

Esta etapa es crucial ya que es la que determina la unión específica de los oligos a la secuencia blanco. (Barrera Sadaña, A. López, R. Rojas, A. 1993)

3. Extensión

Una vez que los oligos se unen al segmento específico de las cadenas sencillas del ADN blanco, se inicia la síntesis de la cadena complementaria del ADN blanco a partir del extremo 3' de cada oligonucleótido. Esto se efectúa a una temperatura de 72°C en un tiempo aproximado de 30 a 90 segundos. (Barrera Sadaña, A. López, R. Rojas, A. 1993)

La gran ventaja de este proceso cíclico es que el ADN nuevo que ha sido copiado en el ciclo anterior es blanco para ser copiado en el siguiente ciclo y así sucesivamente, de tal manera que al ADN se duplicará con cada ciclo. Además, el segmento que se duplica tiene un tamaño que está determinado por la distancia que existe entre los oligos, ya que la síntesis del ADN sólo se efectúa a partir del 3' de los oligos.

Después de un número determinado de ciclos sucesivos, se pueden tener 2^n copias de un segmento de tamaño específico, donde n es igual al número de ciclos. Por ejemplo, después de 20 ciclos, la cantidad de copias del ADN blanco es de 2^{20} , es decir más de 1000000. De esta manera es posible en unas cuantas horas sintetizar grandes cantidades de ADN específico que puede ser detectado por métodos convencionales de análisis de ácidos nucleicos como la electroforesis. (Barrera Sadaña, A. López, R. Rojas, A. 1993)

Naturaleza del ADN

El ADN es una macromolécula polimérica formada por pequeñas unidades enlazadas químicamente entre sí llamadas nucleótidos. Los nucleótidos están compuestos por bases nitrogenadas dentro de las cuales se encuentran: adenina, timina, guanina y citosina.

Las bases guanina y adeninas pertenecen al grupo de las purinas (su estructura es similar a este compuesto). La timina y citosina son bases de tipo pirimidina.

Cada nucleótido se compone de otros grupos químicos:

Azúcar: Este azúcar es un sólido cristalino e incoloro, bastante soluble en agua. En este caso es la desoxirribosa.

Una base nitrogenada: Se encuentra unida químicamente al carbono 1 del azúcar. En el carbono 5 es el otro sitio de unión de la base nitrogenada en el azúcar y un fosfato.

Ácido fosfórico: De fórmula H_3PO_4 y este puede contener uno, dos o tres ácidos fosfóricos.

En la molécula de ADN cada nucleótido está unido químicamente a otro nucleótido a través del grupo hidroxilo del carbono tres del azúcar y el grupo fosfato del carbono 5 del otro nucleótido. Este enlace se denomina enlace fosfodiéster, el cual es un enlace de tipo covalente.

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

Además de su gran tamaño, la molécula de ADN tiene una estructura muy particular que la capacita para efectuar sus funciones.

Cada molécula consta de dos cadenas de nucleótidos que se unen a través de las bases nitrogenadas de cada nucleótido mediante enlaces débiles llamados puentes de hidrógeno. A este evento se le conoce como apareamiento específico de las bases y es responsable de la conformación clásica de las hebras en la que por ejemplo, si se presenta adenina de la cadena principal en la otra existirá timina y si se presenta guanina en la hebra complementaria habrá una citosina en la cadena.

Para que este apareamiento sea estable, las dos cadenas de ADN se deben disponer en forma antiparalela (una en dirección del extremo 5' fosfato hacia el extremo terminal 3' OH, y la otra en dirección opuesta)

La molécula de AND tiene una forma helicoidal donde cada hebra se enrolla sobre la otra, formando una escalera en forma de caracol.

Cada molécula de AND que forma un gen posee una secuencia u orden particular de los nucleótidos que la forman. Esta secuencia es lo que se conoce como la información genética, la cual es descifrada de un código genético en los ribosomas (estructuras celulares responsables de la síntesis de proteínas).

El proceso evolutivo ha generado mutaciones lentas benéficas en el material genético, lo que ha llevado a la producción de las muy diversas formas de vida encontradas en la actualidad. Realmente es imposible que dos especies posean exactamente la misma secuencia de nucleótidos en sus genes. Debido a esta característica es posible detectar un organismo determinado si se es capaz de encontrar características distintivas en la secuencia de sus genes. (Gardner, Simmons, 2008) (Anthony J.F, Jeffrey, H. Millar, D.)

Oligonucleótidos

Se trata de partículas de ADN de una sola hebra de aproximadamente 10 a 30 nucleótidos, sintetizados artificialmente. Estos son complementarios a los extremos de la secuencia de ADN blanco que se requiere detectar.

Debe de tener ciertas características dentro de las que se encuentran:

- Capaz de unirse por apareamiento específico de bases a una sola región en el ADN blanco.
- Contener una alta proporción de guaninas y citocinas, alrededor de 50%, para tener mayor estabilidad.
- No deben ser complementarios consigo mismos, ni con el otro oligo utilizado ya que esto puede evitar su unión eficiente al ADN blanco.
- Su diseño debe ser tal que uno reconozca la región 5' de la secuencia deseada y el otro la región 3' deben estar dirigidos el uno hacia el otro.

- No deben unirse a otro ADN que no sea el blanco que se quiere detectar en el microorganismo o con al ADN de otros microorganismos.
- Poseer una alta estabilidad de unión al ADN blanco. Lo cual se mide con el parámetro T_m (temperatura meeting, o valor de temperatura al cual el 50% de las moléculas del oligo están disociadas). La T_m debe ser mayor a 50°C.

Enzima ADN polimerasa

Esta enzima es la que efectuará la síntesis del ADN blanco a partir de los extremos 3' de los oligos. Se emplea una enzima termoestable de la bacteria *Thermus aquaticus*. Esta enzima es también llamada Taq ADN polimerasa. Tiene una temperatura óptima de actividad a 72°C y resiste muy bien por algún tiempo temperaturas de hasta 95°C sin perder su actividad. El Taq requiere ciertas condiciones para efectuar el copiado de una molécula de ADN; estas son:

El ADN que va a ser copiado, debe de estar en forma de cadena sencilla, a esta condición se le conoce como desnaturalización del ADN.

Los oligos deben estar unidos al ADN blanco con sus extremos 3' libres. A partir de este sitio, la polimerasa se une al ADN blanco y comienza a sintetizar nucleótidos por nucleótido, la cadena complementaria a partir de nucleótidos precursores conocidos como dNTP's incorporando a la nueva cadena el nucleótido con a base nitrogenada complementaria a la cadena ADN blanco

Se requiere la presencia de iones magnesio (Mg^{+2}) que actúan como cofactores en la síntesis de ADN.

dNTP's

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

Buffer del Taq polimerasa

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

Electroforesis

Es una herramienta de análisis simple y rápido para una mezcla de moléculas.

Se define como el proceso de movimiento de moléculas con carga eléctrica en soluciones de pH determinado aplicando un campo eléctrico a través de la mezcla. Este método permite separar las proteínas y otras macromoléculas como el ADN y ARN y el movimiento de estas moléculas depende de su carga eléctrica, tamaño y forma.

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

La agarosa y la poliacrilamida son las más utilizadas en investigación de ADN. En estos geles, se coloca la mezcla de moléculas que se desea analizar y se aplica un voltaje determinado. Debido a la presencia de fosfato, las moléculas de ADN se cargan negativamente al pH buffer (pH de 8) y migran hacia el polo positivo.

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

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

Dentro de los parámetros clínicos que se evaluarán en este estudio están los que se describen a continuación.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Índice gingival: Este índice fue propuesto por Løe y Silness (1967) para registrar de manera objetiva los cambios cualitativos que se presentan en el tejido gingival, tales cambios en el color, edema o inflamación, sangrado y ulceración.

Se desliza suavemente la sonda periodontal a lo largo de la pared blanda del surco, se determina el color correspondiente a cada pieza de acuerdo al siguiente código:

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

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

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

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

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

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

Dentro de los parámetros de laboratorio que se evaluarán en este estudio se encuentran los siguientes, extracción de ADN de las biopsias, prueba de PCR para herpes virus y electroforesis; previamente descritas.

VII. Diseño Metodológico

Tipo de estudio

Este estudio es un estudio longitudinal, observacional, comparativo y prospectivo.

Conocimiento que tienen los investigadores de los factores del estudio

Estudio Abierto

Participación del investigador

Experimental

Tiempo en que suceden los eventos

Prospectivo

Relación que guardan entre sí los datos.

Longitudinal

VIII. Materiales y Métodos

Unidad de observación

Se observaran tres poblaciones.

La población uno (PI) serán sujetos con periodontitis crónica.

La población dos (PII) serán sujetos con periodontitis agresiva.

La población tres (PIII) serán sujetos que no presenten enfermedad periodontal.

Tamaño de la muestra

Se tomará la muestra de un modo censal o por accidente de pacientes con periodontitis crónica y agresiva que acudan al posgrado de periodoncia de la UANL en un periodo comprendido desde agosto del 2009 hasta octubre del 2009.

Actualmente no existe una base de datos adecuada en el postgrado de periodoncia para determinar el número de casos que hay por año.

Forma de asignación de los casos a los grupos de estudio

Se asignaran los pacientes conforme vayan ingresando al posgrado de la UANL en el periodo comprendido entre agosto 2009 y octubre 2009.

Dependiendo del tipo de enfermedad periodontal se asignaran a los respectivos grupos.

Temporalidad

Este estudio se llevará a cabo en un periodo comprendido desde mayo del 2009 hasta mayo del 2010.

Ubicación espacial

Este estudio se llevará a cabo en las instalaciones del posgrado de Periodoncia y las instalaciones de biología molecular de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Criterios de inclusión

Pacientes con periodontitis crónica, periodontitis agresiva y sin enfermedad periodontal.

Pacientes con rango de edad entre 20 y 70 años.

Pacientes masculinos y femeninos.

Criterios de exclusión

Pacientes que no padezcan de enfermedades generalizadas.

Pacientes que no hayan recibido tratamiento periodontal en los últimos tres meses.

No haber tomado antibióticos en los últimos tres meses.

Pacientes femeninas que no se encuentren en periodo gestacional, ni estar en periodo de lactancia, ni estar bajo tratamiento hormonal.

Pacientes fumadores.

Criterios de eliminación

Cuando exista una mala manipulación de la muestra a la hora de la toma de la misma como a la hora del procesamiento.

IX. Metodología

Selección del paciente: Se seleccionaran sujetos que acudan a la consulta de periodoncia del posgrado de Periodoncia de la UANL con los criterios de inclusión previamente mencionados.

Historia clínica: Se revisarán los parámetros médicos de cada uno de los pacientes y la presencia de síntomas de la enfermedad periodontal.

Radiografías periapicales: A cada sujeto se le pedirán radiografías periapicales para observar la pérdida ósea y posibles lesiones en tejidos duros.

Examen intraoral:

Examen dental: Se buscará la presencia de caries y cálculo en las superficies dentales.

Examen periodontal:

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

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

Índice de placa: Se utilizará el índice de Quegley y Hein modificado por Turesky (1970) (ver fotografía 1)

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

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

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

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

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

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

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

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

Índice gingival: Se utilizará el índice propuesto por Løe y Silness (1967) (ver fotografía 2)

Se determinará el color correspondiente a cada pieza de acuerdo al siguiente código:

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

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

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

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

Se registran los valores correspondientes a los puntos mesial, medio y distal de la superficie vestibular y el punto medio de la superficie lingual.

Cada uno de estos valores representa el Índice Gingival.

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

El índice gingival se establecerá mediante la suma de los valores de los dientes y la división por el número de dientes examinados. Un valor de 0,1 a 1,0 indica inflamación leve; 1,1 a 2,0, inflamación moderada, y 2,1 a 3,0 inflamación intensa.

Obtención de la muestra: Para la obtención de las muestras se tomarán biopsias de tejido adquiridas de las piezas dentales donde se encuentre la mayor profundidad de bolsa a la hora de la intervención quirúrgica. (Ver fotografía 3)

Pruebas de laboratorio: Se realizará a la muestra respectiva el análisis de y PCR para los herpes virus descritos previamente.

Extracción del ADN

(Ver fotografía 6)

La extracción del ADN viral de las biopsias previamente obtenidas se realizará utilizando el Kit GENTRA® (QIAGEN, E.E.U.U) (ver anexo) siguiendo los siguientes pasos:

1. Moler de 50-100mg del tejido, previamente congelado en nitrógeno líquido, con un mortero. Mantener siempre el tejido en hielo.
2. Agregue 3 ml de la solución de lisis celular al tejido previamente molido.
3. Calentar la muestra a 65 °C durante un periodo de 1 hora.
4. Agregar 15µl de proteinasa K, mezclar por inversión unas 25 veces y se encubó a 55 °C por 24 horas, hasta que el tejido haya sido lisado completamente.
5. Agregar 15 µl de solución ARNasa y mezclar por inversión 25 veces. Incubar a 37 °C durante 15-60 minutos.
6. Incubar por tres minutos en hielo para enfriar la muestra.
7. Agregar 1 ml de solución de precipitación de proteínas y se mezcla vigorosamente por 20 segundos a alta velocidad.

8. Centrifugue por tres minutos a 13000-16000 x g. Se debe de formar un precipitado de proteínas con de consistencia viscosa.
9. Agregue 3 ml de isopropanol y agregue el precipitado obtenido en el paso anterior.
10. Mezclar mediante inversión 50 veces.
11. Centrifugue por un minuto a 13 000-16000.
12. SE vació el remanente del tubo asegurándose de que el precipitado quede intacto.
13. Agregue 300 µl de isopropanol al 70% y agítelo varias veces.
14. Centrifugue un minuto a 13000-16000.
15. Vacíe el remanente
16. Agregue 50 µl de solución hidratadora de ADN y agite vigorosamente por cinco s a velocidad media.
17. Incube a 65 °C durante una hora para disolver el ADN.
18. Incube a temperatura ambiente de la noche a la mañana.

Posterior a este paso se obtiene el ADN puro de la biopsia que será sometido a las pruebas de PCR tanto viral como bacteriano.

Primers u oligos

El diseño de los oligos que se utilizó fue el dado por la casa comercial Maxim Biotech. Inc. ® (San Francisco, E.E.U.U.) (Ver fotografía 7)

Nombre	Base de datos	5' oligo	3' oligo	Pares de bases
Virus Herpes 1	M74421	TACGACGGCCAGCAGATCCGCGTC	CCTTGTCGAGGCCCCGAAACCG	230
Virus Herpes 2	M16321	CACGCGCTACCTGCCCATCT	CACGTGGTTACCCGCGGTCT	106
Citomegalovirus	M21295	CCAAGCGGCCTCTGATAACCAAGCC	CAGCACCATCCTCCTCTCCTCTGG	435

Preparación del ADN viral para PCR (anexo I)

La preparación se realizó siguiendo los lineamientos establecidos por los kits de la casa comercial Maxim Biotech. Inc. (San Francisco, E.E.U.U.).

El volumen preparado total fue de 20µl distribuido de la siguiente manera.

- Con una pipeta tipo Eppendorf de diez µl se colocó 16 µl de la mezcla del kit cuyo contenido en el siguiente:
 - Buffer para PCR (dNTP's, químicos, potenciador) con los oligos del virus respectivo.
- Con una pipeta tipo Eppendorf de diez µl se colocó cuatro µl del ADN de la muestra.
- Con una pipeta tipo Eppendorf de dos µl se colocó 0,2 µl de la Taq polimerasa.
- Se mezclaron con una pipeta tipo Eppendorf de diez µl los componentes previamente mencionados.

Parámetros para la PCR (anexo I)

Se utilizó un termociclador **marca** con las siguientes características

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos(x)
Calentamiento	96	1	1
Desnaturalización	94	0.5	30
Alineamiento	58	0.5	30
Extensión	72	0.5	30
	72	10	1
Mantenimiento	4-25	-----	----

Electroforesis.

Los geles que se fabricaron fueron hechos con una relación de 1:10 con las siguientes características:

- En un tubo Erlenmeyer se agregó 72ml de agua destilada y 8ml de buffer medidos con una probeta.

- Se peso en una báscula un gramo de agarosa.
- Se mezclaron los componentes previamente mencionados.
- Se calentó la mezcla hasta que se encontrará homogénea.
- Se esperó a que la mezcla estuviera a una temperatura de 40 °C.
- Posteriormente se agregó con una pipeta tipo Eppendorf, diez µl de bromuro de etidio.
- Se colocó la mezcla en una gradilla y se esperó hasta que se enfriara.

Una vez edificado el gel para la electroforesis, se colocó con una pipeta tipo Eppendorf de diez µl, cinco µl del buffer de carga y cinco µl de cada una de las muestras con las condiciones de PCR previamente descritas.

Las condiciones para la electroforesis se realizaron en una cubeta de electroforesis a un voltaje de 80 voltios (V) durante hora y se realizó la interpretación. (Ver fotografía 9)

Para las pruebas que resultaron negativas para virus se realizó una prueba de electroforesis con controles negativos a base de actina, para descartar la posibilidad de una mala obtención del ADN de la muestra. Todas las pruebas negativas para los virus estudiados dieron positivos para la prueba de actina. (Ver fotografía 8)



Fotografía 1. Índice de placa



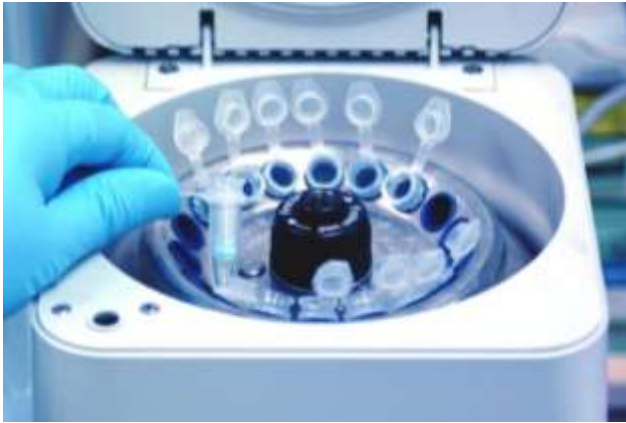
Fotografía 2. Toma del índice de sangrado

Comentario [SOP1]:
 Foto de biopsia
 Foto de kit de extraccion de column
 spin
 Foto de buffer de carga y PCR product
 Foto de gel
 Foto de electroforesis.

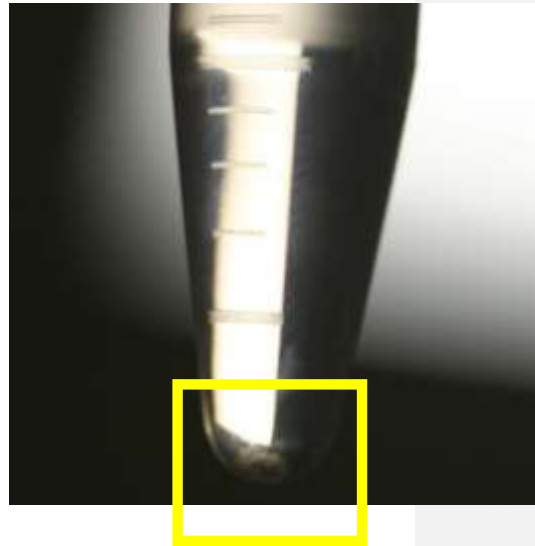


a

in" para extracción del ADN.



Fotografía 5. Máquina centrifugadora.

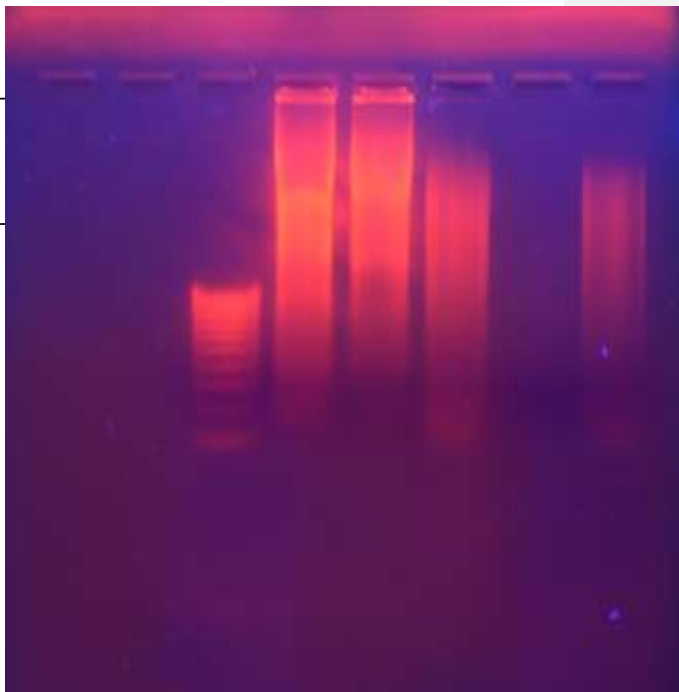


Fotografía 6. Extracción de ADN

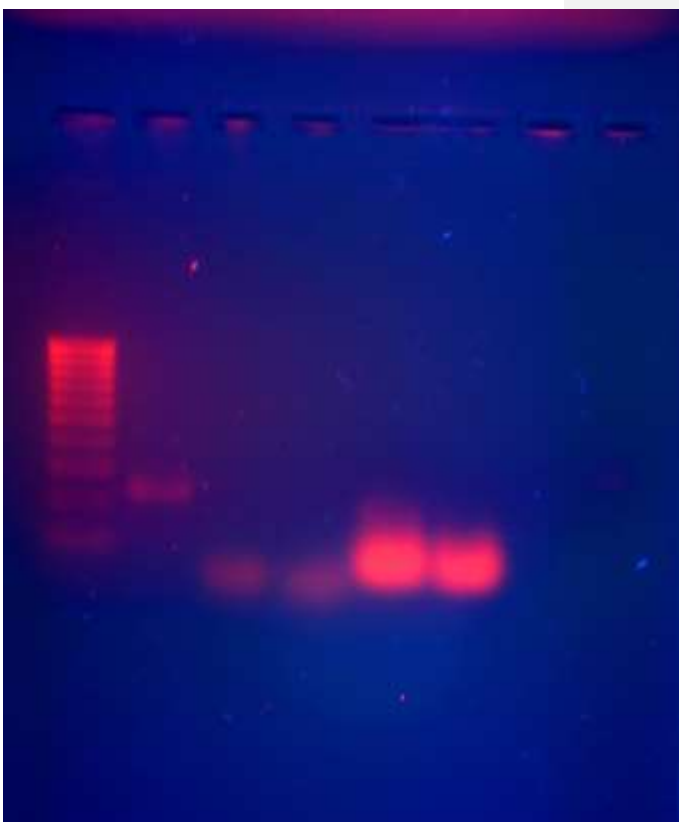


Fotografía 7. Contenido de los Kits Maxim Biotech®

Fotografía 8. Amplificación del ADN. Se muestran las casillas con la siguiente distribución. Hipper ladder- ADN 10µl- ADN 5µl-Control endógeno (actina)-Control negativo-control endógeno



Fotografía 9. Amplificación de ADN. No se encuentra la presencia de virus.
Se muestran las casillas con la siguiente distribución:
Hipper ladder- Control positivo-ADN en concentración 5µl – ADN concentración 10µl.



X. Definición de variables

Variable independiente

Virus herpes simple, edad, género.

Variable dependiente

Periodontitis crónica y periodontitis agresiva.

XI. Análisis Estadístico

Se utilizó para comparar, los parámetros clínicos de los pacientes con periodontitis crónica, periodontitis agresiva y pacientes control, la prueba de t de Student.

XII. Resultados

Las características de la población que se estudio se muestran en la tabla 1. El promedio de edad en los pacientes con periodontitis crónica fue de 52.1 años. La prevalencia de la enfermedad periodontal crónica fue mayor en mujeres que en hombres y el promedio de profundidad de bolsa fue de 6.5 mm. El índice gingival muestra un promedio de 1.86 que implica una inflamación de tipo leve y el índice de placa fue de 2.4, correspondiente a presencia de placa en el tercio apical. (Ver tabla 1 y figura 1)

Los pacientes con enfermedad periodontal agresiva (n=6) presentaron un promedio de edad de 26 años y hubo una relación de 1:1 en cuanto al género. El índice gingival muestra una inflamación moderada y el promedio de profundidad de bolsa periodontal fue de 8.7 mm al igual que el promedio del nivel de inserción. (Ver tabla 1 y figura 1)

Los pacientes del grupo control (n=8), presentaron un promedio de edad de 42 años de edad con una relación de 1:1 en cuanto a su género y una inflamación leve. (Ver tabla 1 y figura 1)

La distribución del diagnóstico periodontal se muestra en la tabla 2. La mayor distribución se encontró para la periodontitis crónica en un 33%, y los pacientes con periodontitis agresiva se presentaron en un 25% distribuido en un 12.5 % para pacientes con periodontitis agresiva localizada y el mismo porcentaje para pacientes con periodontitis agresiva generalizada. (Ver tabla 2 y figura 2)

Se utilizó para relacionar los parámetros clínicos de los pacientes con periodontitis y los pacientes sanos la prueba de t de Student, encontrando diferencia significativa en los distintos parámetros relacionados. (Ver tabla 3 y figura 3)

La evaluación de la presencia de los virus estudiados, herpes simple tipo 1, herpes simple tipo 2 y citomegalovirus en los grupos de periodontitis crónica, periodontitis agresiva y el grupo control, no fueron detectados en este estudio.

Se realizaron las pruebas con actina de todas las muestras que dieron negativo para los virus estudiados, dando estas pruebas positivas para el control de actina.

Tabla 1. Características de la población de estudio

Parámetro	Periodontitis Crónica (N=10)	Periodontitis Agresiva (N=6)	Control (N=8)
Promedio Edad	52.1	26	42
Género (femenino/masculino)	3:2	1:1	1:1
Índice gingival	1.86	2.1	0.8
Índice placa	2.4	2.3	1.5
Profundidad de bolsa (mm)	6.5	8.7	3.2
Niveles de Inserción (mm)	6.8	8.7	1.5

Tabla 2. Distribución del diagnóstico de la población.

Sujetos (n)	%	Diagnóstico
8	33	Periodontitis Crónica Severa
1	4	Periodontitis Crónica Moderado
1	4	Periodontitis Crónica Leve
3	12.5	Periodontitis Agresiva Localizada
3	12.5	Periodontitis Agresiva Generalizada
8	33	Control
Total= 24	100	

Tabla 3. Relación de los parámetros clínicos de los grupos evaluados.

	Periodontitis	Control	Δ
Nivel de inserción (mm)	7.3	1.5	5.3
Índice de placa	2.4	1.5	0.9
Índice de sangrado	1.9	0.8	1.1

Para una $p \geq 0.1$.

Figura1. Promedio de la profundidad de bolsa y niveles de inserción de la población.

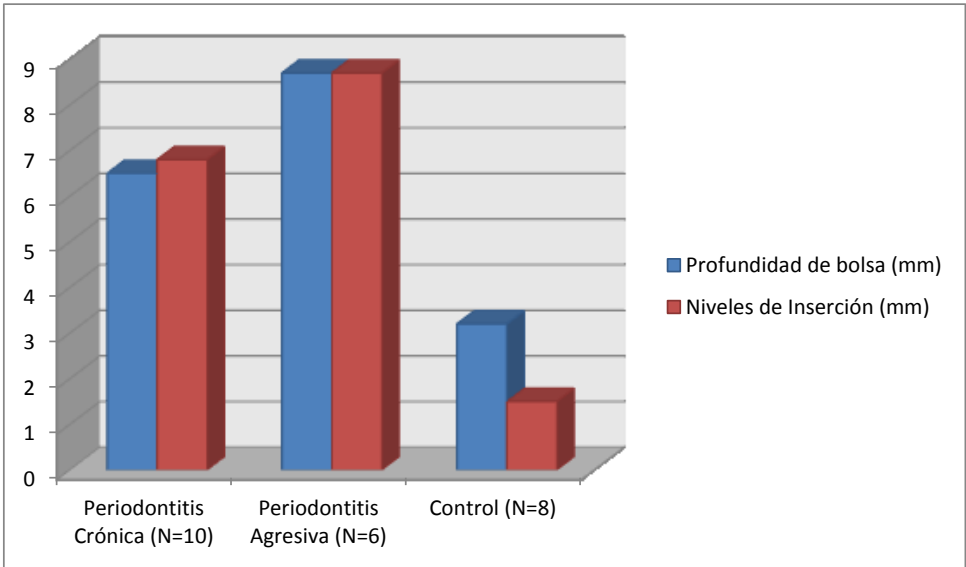


Tabla 2. Distribución del diagnóstico de la población.

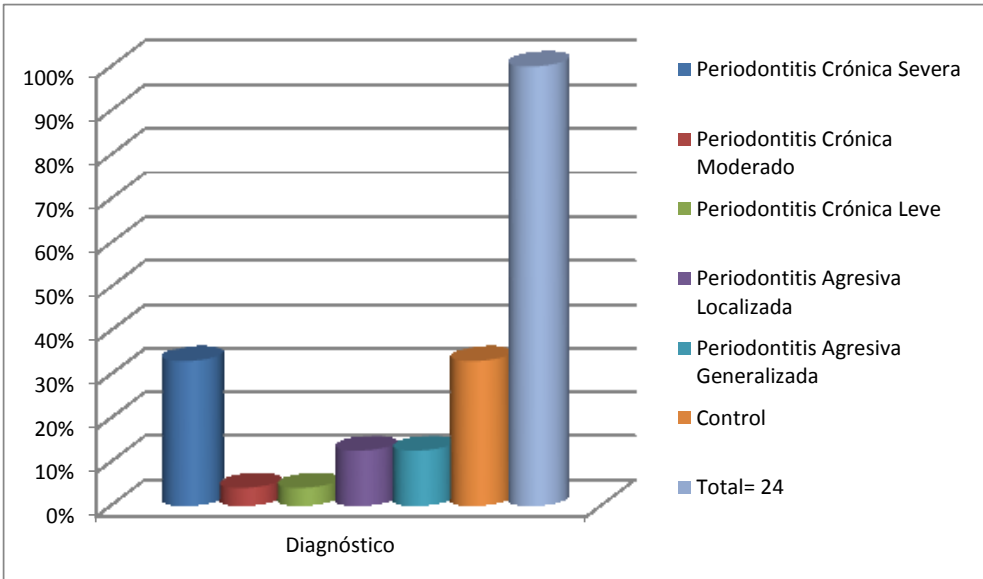
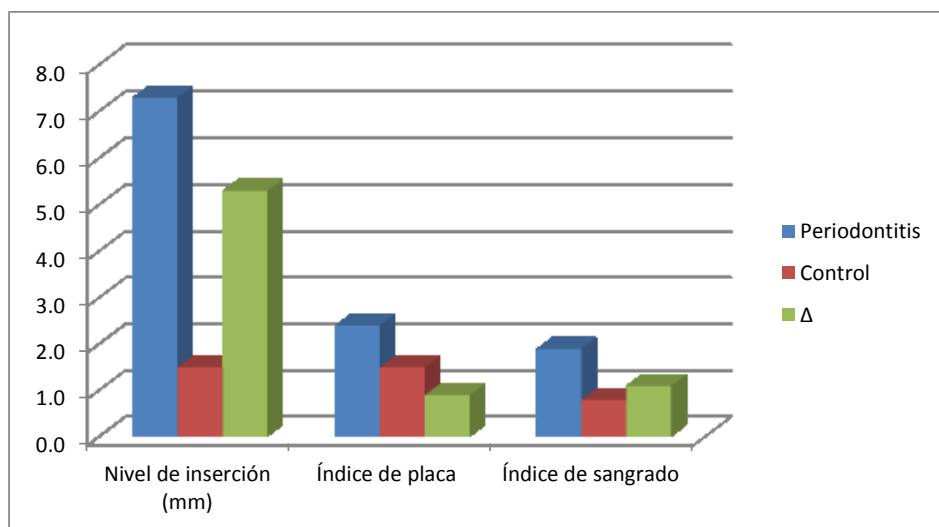


Figura 3. Relación de los parámetros clínicos de los grupos evaluados.



XIII. Discusión

La periodontitis es la enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte de los dientes causada por microorganismos o grupos de microorganismo específicos que producen la destrucción progresiva del ligamento periodontal y el hueso alveolar con formación de bolsa, recesión o ambas. (Ranney, 1993)

La progresión de la periodontitis está asociada con los aumentos en los niveles de ciertas bacterias de tipo anaeróbicas. (Noiri, Y. et al. 2001)

El reconocimiento de los microorganismos patógenos periodontales ha sido difícil por varios factores. La microbiota periodontal es una comunidad compleja de microorganismos, muchos de los cuales todavía resultan difíciles o imposibles aislar en el laboratorio. Hoy en día se sabe que muchas de las especies funcionan como patógenos y que algunas de ellas pueden actuar en un sitio específico así como en sitios sanos.

Pese a las dificultades inherentes a la caracterización de los microorganismos de los padecimientos periodontales, se reconoce un grupo limitado de gérmenes relacionados con el trastorno periodontal.

Es importante recalcar la importancia de la biopelícula ya que esta se forma en un principio por interacciones bacterianas con el diente y luego mediante interacciones físicas y fisiológicas entre especies diferentes de la masa microbiana. (Carranza, F. 2007)

La placa dentobacteriana está directamente relacionada con las afecciones periodontales, especialmente la placa subgingival. (Listgarten, 1979). La placa subgingival en contacto con el tejido es esencial en la destrucción de tejido blando que caracteriza las diferentes formas de periodontitis.

La placa subgingival presenta, en las diversas zonas, diferencias a nivel bacteriano ya que la placa en contacto directo con el diente se caracteriza por microorganismos de tipo bacilos y cocos grampositivos y conforme se avanza hacia las zonas más apicales se encuentran mayor concentración de bacilos gramnegativos y espiroquetas. (Diabart. Et al. 1998. Dzink. Et al. 1988)

Socransky en el 2005 describe los distintos grupos bacterianos que están relacionados con la patogenia de la enfermedad periodontal. Refiere diversos

grupos asociados a la colonización, agregación, coagregación y bacterias patogénicas. En este último grupo cabe destacar la presencia de lo que Socransky denomina el complejo rojo, constado por *P. gingivalis*, *B. forsythus* y *T. denticola*. El complejo rojo se relaciona con la magnitud de los parámetros clínicos como la hemorragia al sondo, aumento en la profundidad de bolsa, pérdida en los niveles de inserción, (Socransky, 2005). En este estudio, a pesar que no se evaluó la presencia de las bacterias previamente mencionadas se puede observar que dentro de los grupos experimentales (periodontitis crónica y periodontitis agresiva) existió hemorragia al sondeo, profundidad de bolsa aumentada y pérdida en los niveles de inserción, probablemente atribuibles a las características de las distintas bacterias asociadas a la enfermedad periodontal. Esta suposición es basada en que no se encontró en ninguno de los grupos presencia de los virus estudiados (herpes virus tipo 1 y 2 y citomegalovirus).

La diferencia entre salud y enfermedad del periodonto se da en la morfología bacteriana encontrada en los distintos sitios. En la periodontitis crónica se observan con mayor frecuencia las bacterias del complejo rojo y del complejo naranja (*Prevotella intermedia*, *Prevotella micros*) normalmente asociadas entre sí, ósea las tres bacterias juntas. (Socransky, 2005).

En la periodontitis agresiva es inminente la presencia de los microorganismos *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. El *A.a.* es el agente causal primario de la mayoría sino de todos los casos de periodontitis agresivas. (Kornman, K. et al . 1993. Socransky, S. et al. 1992)

Las bacterias producen sustancias que inhiben la actividad de los leucocitos polimorfonucleares y linfocitos, células que actúan en el proceso inmunológico del huésped. Ejemplo de ello es la leucotoxina producida por el *A.a.* que afecta la inserción conectiva tanto en la enfermedad periodontal crónica como en la periodontitis agresiva. Otro ejemplo de ello es la toxina liberada por el *P. gingivalis*, la gingipaina; esta degrada proteínas presentes en los tejidos conectivos, favoreciendo así la destrucción periodontal. (Hafstrom, C. et al. 1994)

Los herpes virus humanos pueden participar en el desarrollo y la progresión de la enfermedad periodontal, y existen varios estudios que han investigado este fenómeno.

La detección de herpes virus mediante biopsias presenta mejores resultados que la detección mediante puntas de papel o muestras de placa subgingival en la bolsa periodontal. (Contreras. Et al. 1999). En este estudio se utilizaron biopsias de pacientes con periodontitis crónica, periodontitis agresiva y pacientes control.

La actividad de la enfermedad periodontal se basó en parámetros clínicos como profundidad de bolsa, pérdida en los niveles de inserción, índice de placa e índice de sangrado. El sangrado al sondeo está asociado con la actividad de la enfermedad periodontal. (Kaldahl et al. 1990, Lang et al. 1986, Armitage 1996), y la ausencia de sangrado es considerada como un indicador de estabilidad periodontal (Lang et al. 1990).

En este estudio no se detectó, mediante el uso de técnicas de PCR, la presencia de ninguno de los distintos tipos de virus estudiados, sin embargo los parámetros clínicos encontrados se pueden atribuir a la presencia de bacterias periodontopatógenas.

Algunas investigaciones vinculan a los herpes virus como agentes etiológicos de la enfermedad periodontal en sus formas de periodontitis marginal y periodontitis apical (Saygun et al. 2008. Slots 2005.); en otras investigaciones se han asociado a periodontitis agresivas y a periodontitis crónica. (Bilichodmath, L. et al 2008. Botero 2007 et al. Contreras, Slots. 2001. Li Jang Ling. Et al . 2004. Yapar. Et al. 2003. Saygun, et al. 2004, 2002.)

En esta investigación se pudieron relacionar los parámetros clínicos entre sí, obteniendo resultados estadísticamente significativos entre NI, PB, IG y IP .Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con las investigaciones realizadas por Li-Jang Ling, 2004, Yapar, 2003, Saygun,2002, 2004 y Botero, 2007, en los que dichos parámetros presentan relación. Este dato estadístico es

importante ya que la parte clínica es la que presenta mayor trascendencia a la hora del diagnóstico, pronóstico y tratamiento periodontal. Las otras ramas diagnósticas como la biología molecular son una ayuda para el clínico sin embargo son técnicas relativamente recientes que presentan cierto grado de complejidad y su costo es una desventaja para ser utilizado como herramienta diagnóstica de rutina; es por ello que la parte clínica es la que presenta una mayor importancia para la terapia periodontal.

En esta investigación se encontró que el grupo de pacientes sanos no presentó ninguno de los virus estudiados. Este dato coincide con los estudios de Saygun (2002, 2004), en el que no se detectó la presencia de herpes virus simple tipo 1 y tipo 2, así como la ausencia de citomegalovirus. De igual manera Yapar en el 2003 no encontró la presencia de dichos virus en pacientes sanos.

Contreras y Slots en el 2001 no detectaron la presencia del herpes virus tipo 2 en pacientes con periodontitis, resultado que concuerda con los datos obtenidos en este estudio. La posible explicación de este fenómeno puede estar en la capacidad inmunológica de reconocimiento, ya que las moléculas virales del HSV1 y HSV 2 son similares por lo que el sistema inmune puede reconocer una molécula y desarrollar anticuerpos para el otro tipo de virus, sin embargo es una hipótesis que se encuentra en prueba.(Contreras et al.2001)

Recientemente Shivaprasad demostró que los pacientes con EPC tuvieron una prevalencia de un 100% (19) para el HSV1, un 15,6% para HSV2 y un 26% para HCMV y para pacientes con EPA, encontró para HSV1 un 57%, para HCMV un 7.14% y no se encontró HSV 2 en ninguna muestra.(Shivaprasad, B. et al. 2009). En nuestro estudio tampoco se encontró la presencia de herpes simple tipo 2.

Diversas investigación han detectado la presencia de los herpes virus tipo 1 y tipo 2 así como la presencia del citomegalovirus (Contreras ,A. et al. 1999, Saygun, I. et al. 2002, 2004.Li- Jane Ling. Et al. 2004), a diferencia de nuestra investigación en la cual no se detectó ningún virus, en los distintos grupos analizados. Es importante destacar que las posibles diferencias podrían radicar que en los primeros estudios se utilizaron los oligonucleótidos diseñados por

Parra y Slots en 1996. Dichos oligonucleótidos presentan características diferentes a los oligonucleótidos utilizados en este estudio. Los oligonucleótidos que se utilizaron son de 24 pares de bases para el virus herpes tipo 1, 20 pares de bases para herpes virus tipo 2 y 25 pares de bases para el citomegalovirus, mientras que los utilizados por las investigaciones previamente mencionadas son de 46 pares para HSV-1 y HSV-2 y de 48 pares para citomegalovirus. Sin embargo, se recomienda un número aproximado de 18 a 22 nucleótidos, porque es la cantidad necesaria para que probabilísticamente coincida un sitio de la cadena de ADN del virus a buscar. (Current Protocols of molecular biology. 2010). Otro de los posibles factores a considerar es que las zonas de los genes blanco son distintas en nuestro estudio que en los estudios mencionados anteriormente en los cuales todos utilizan los mismos oligonucleótidos. Los genes blancos de los kits utilizados (Maxim Biotech. Inc. ®. San Francisco, E.E.U.U.) son: para el herpes virus tipo 1 latency-associated transcript mRNA para el herpes tipo 2 gen polimerasa y el citomegalovirus major immediate early protein mientras que los diseñados por Parra y Slots presentan regiones de genes distintas.

Yapar en el 2003 investigó la presencia del citomegalovirus en 16 pacientes con periodontitis agresiva y 17 pacientes sanos. Encontró que ninguno de los pacientes sanos presentó el virus al igual que en nuestro estudio. También observó que pacientes que fueron tratados tanto con raspado y alisado como con cirugías periodontales y terapia antibiótica, no presentaron la presencia del citomegalovirus. En este estudio a todos los pacientes se les realizó una fase higiénica e instrucciones de control de placa previo a la obtención de la biopsia (que se adquirió al momento de la cirugía periodontal) posible razón por la cual se obtuvieron resultados negativos tanto para el CMV como para el HSV-1 y el HSV-2. Una de las posibles explicaciones es que esta fase del tratamiento periodontal pueda alterar la composición de la flora subgingival deteniendo la correlación entre los herpes virus y bacterias. Otra posible razón por lo que los sujetos con periodontitis no presentaron los virus a estudiar, puede ser dada a una posible disminución de monocitos y de células inflamatorias infectadas con

estos virus a causa de la instrumentación subgingival previamente realizada. (Ting, M. et al 2000. Contreras, A. et al. 1999).

En otros estudios realizados por Kleinfelder, JW, et al en el 2000 y en el 2001 en donde trataron pacientes con enfermedad periodontal crónica y enfermedad periodontal agresiva en los que les realizaron raspado y alisado radicular se encontró una disminución en las células plasmáticas, leucocitos y linfocitos, condición que disminuye la actividad de los herpes virus y citomegalovirus.

Otra de las posibles razones por la cual nuestro estudio no obtuvo resultados positivos ante los virus estudiados pudo haber radicado en la edad de los pacientes ya que entre el 40% y el 70% adquieren anticuerpos contra el herpes simple desde el primer año de vida hasta la adolescencia lo que pudo haber afectado nuestra muestra. (Parra 1996).

En ninguno de los estudios previamente mencionados se ha investigado el polimorfismo genético para los herpes virus haciendo más comprensible el rol de estos en la enfermedad periodontal. (Bilichodmath, 2008).

En el presente estudio existen variaciones con otras investigaciones que se pueden atribuir al rango de edad, las diferencias étnicas, el limitado tamaño de la muestra y la metodología utilizada, además del probable estadio de latencia de los herpes virus.

XIV. Conclusiones

1. Los parámetros clínicos si presentaron relevancia estadística entre sí.
2. Los parámetros clínicos no presentaron ninguna relación con los virus estudiados
3. El diagnóstico clínico es una herramienta fundamental para el diagnostico de la enfermedad periodontal.
4. La enfermedad periodontal es una enfermedad inflamatoria inmunosupresora, el hecho de que no se haya encontrado virus en los pacientes con periodontitis no implica que el paciente no lo haya manifestado en algún momento, sino que el virus se encontrara en un periodo de latencia.
5. La enfermedad periodontal es un ente infeccioso con un componente bacteriano predominante.
6. Se necesitan estudios longitudinales, microbiológicos y clínicos para determinar las implicaciones patogénicas y terapéuticas de este estudio.

XV. Resumen.

Sergio Ortiz Pérez

Fecha de Graduación:

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Odontología

Título del Estudio: PREVALENCIA DE LOS HERPES VIRUS EN LA ENFERMEDAD PERIODONTAL.

Número de páginas:

Candidato para el grado de Maestría en
Ciencias con especialidad en Periodoncia

Propósito y Método del Estudio: La periodontitis es la enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte de los dientes causada por grupos de microorganismo específicos que producen la destrucción progresiva del ligamento periodontal y el hueso. En la última década se ha visto una relación de esta enfermedad con la familia de virus de tipo herpes. El objetivo del presente estudio fue el de evaluar la prevalencia de los virus tipo 1 y tipo 2 además del citomegalovirus con los parámetros clínicos en pacientes con enfermedad periodontal crónica, enfermedad periodontal agresiva y pacientes control. Se utilizaron biopsias de pacientes de periodontitis crónica, periodontitis agresiva y pacientes control que fueron sometidas a pruebas de reacción de cadena polimerasa para la detección de los virus a estudiar.

Contribuciones y Conclusiones: En este estudio se pudo observar que existe una relación estadísticamente significativa entre los parámetros clínicos, sin embargo no se logró detectar la presencia de ninguno de los virus a estudiar.

FIRMA DEL ASESOR: _____

XVI. Referencias

1. Anthony J.F, Jeffrey, H. Millar, D. An introduction to genetics analysis. 6ta edición.
2. Armitage, GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. ANN Periodontol, 1999; 4:1-6. Review
3. Armitage, GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. Periodontol 2000. 2004; 34: 9-21.
4. B. Lijenberg and J. Lindhe. Juvenile periodontitis. Some microbiological, histopathological and clinical characteristics J. Clinical Periodontology: 1980; 7: 48-61.
5. Barrera Sadaña, A. López, R. Rojas, A. Reacción en cadena de la polimerasa. Ciencia y Desarrollo; 1993: 50-60
6. Bilichodmath,S. Mangalekar,S. Sharma, D. Prabhakar,A. Herpes viruses in chronic and aggressive periodontitis patients in an Indian population. Journal of Oral Science, 2009; 51: 79-86. Journal of Oral Science, 2009; 51: 79-86.
7. Botero JE, Contreras A, Parra B. Effects of cytomegalovirus infection on the mRNA expression of collagens and matrix metalloproteinases in gingival fibroblasts. J Periodontal Res 2008; 43: 649–657
8. Botero JE, Vidal C, Contreras A, Parra B. Comparison of nested polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR and viral culture for the detection of cytomegalovirus in subgingival samples. Oral Microbiol Immunol 2008; 23: 239–244
9. Botero, J. Parra, B. Jaramillo, A. Contreras, A. Subgingival human cytomegalovirus correlates with increases clinical periodontal parameters and bacterial coinfection in periodontitis. Journal of periodontology. 2007; 78: 2303-2310.
10. Bruno, G. et al. Genetic Structure of Populations of Porphyromonas gingivalis Associated with Periodontitis and Other Oral Infections. Infection and immunity. 1993; 61:204-212.
11. Carranza, F. Newman, M. Takei, H, (2004). Periodontología Clínica. Novena edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México D.F., México
12. Cassai, E. Galvan, M. Trombelli, L. Rotola, A. HHV-6, HHV-7, HHV-8 in gingival biopsies from chronic adult periodontitis patients. Journal of clinical periodontology. 2003; 30:184-191.

13. Caton, JG. Polson, AM. The interdental bleeding index: a simplified procedure for monitoring gingival health. *Compend Contin Educ Dent*. 1985; 6: 88.
14. Contreras A, Nowzari H, Slots J. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 15–18.
15. Contreras A, Slots J. Typing of herpes simplex virus from human periodontium. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 63–64.
16. Contreras, A. Umeda, M. Chen, C. Bakker, J. Morrison, J. Slots, J. Relationship between herpesviruses and adult periodontitis and periodontopathic bacteria. *Journal of periodontology*. 1999; 70:478-483.
17. Dibart, S, Skobe, Z, Snapp, K. et al. Identification of bacterial species on or in crevicular epithelial cells from healthy and periodontally diseased patients using DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiol Immunol*. 1998; 13:30.
18. Dzink, J. Socransky, S. Haffajee, A. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1998; 15: 316.
19. Enzo, P. Cutler, C. Microorganisms as risk indicators for periodontal diseases Paul J. Enzo & Christopher W. Cutler. *Periodontology* 2000. 2003;32:24–35.
20. Gardner, Simmons y Snustad. Principles of genetics and evolution. Ed Hardcover. 2008. 8va edición
21. Goldman. Cecil Textbook of medicine. 22 edition. 2004. Editorial Saunders.
22. Gronowicz G, Hadjimichael J, Richards D, Cerami A, Rossomando EF. Correlation between tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced cytoskeletal changes and human collagenase gene induction. *J Periodontal Res* 1992; 27: 562–568.
23. Harrison. Principios de medicina interna. 17 edición, Editorial Mac Graw-Hill. 2008. Capt: 172-174.
24. J. A. Burmeister, A. M. Best, K.G. Pacanis, F. A. Caine and R. R. Rankey. J. Localized juvenile periodontitis and generalized severe periodontitis: clinical findings . *Clinical Periodontology* 1984; 11: 181-192.
25. Jan Lindhe and Birgitta Linjeborg. Treatment of localized juvenile periodontitis. *J. Clinical Periodontology* 1984; 11: 399-410.
26. Kajita K, Honda T, Amanuma R, Domon H, Okui T, Ito H, Yoshie H, Tabeta K, Nakajima T, Yamazaki K. Quantitative messenger RNA expression of Toll-like receptors and interferon- α 1 in gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 398–402

27. Kaldahl, W., Kalkwarf, K., Patil, K. & Molvar, M. (1990) Relationship of gingival bleeding, gingival suppuration and supragingival plaque to attachment loss. *Journal of Periodontology* **61**, 347–351.
28. Kamma JJ, Contreras A, Slots J: Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 879–885.
29. Kenneth S. Kornman and Paul B. Robertson. Clinical and microbiological evaluation of therapy for juvenile periodontitis. *JOP*. 1984. 443-446.
30. Kessler, H. Muhlbauer, G. Rinner, B. Stelzi, E. Berger, A. Santner, B. Marth, E. Detectin of herpes simplex virus DNA by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2000: 2638-2642.
31. Kleinfelder, J. Lange, D. Bocker, W. Some effects of non surgical therapy on gingival inflammatory cell sub-sets in patients with adult onset and early-onset periodontitis. *J Periodontol*. 2000; 71: 1561-1566.
32. Kleinfelder, J. Lange, D. Some effects of non surgical therapy on gingival inflammatory cell sub-sets in patients with adult onset and early-onset periodontitis associated with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol*. 2001; 72: 1713-1719.
33. Kornman, K. Loe, H. The role of local factors in the etiology of periodontal disease. *Periodontol* 2000. 1993; 2: 83.
34. Lang, N. P., Adler, R., Joss, A. & Nyman, S. (1990) Absence of bleeding on probing. An indicator of periodontal stability. *Journal of Clinical Periodontology* **17**, 714–721.
35. Lang, N. P., Joss, A., Orsanic, T., Gusberti, F. A. & Siegrist, B. E. (1986) Bleeding on probing. A predictor for the progression of periodontal disease? *Journal of Clinical Periodontology* **13**, 590–596.
36. Lindhe, J, Karring, T, Lang, P (2003). *Periodontología Clínica e Implantología Odontología*. Tercera Edición. Editorial Panamericana. Munkgaard, Copenhagen.
37. Ling, L. Ho, C. Wu, C. Chen, Y Hung, S. Association between human herpesviruses and the severity of periodontitis. *J Periodontol*. 2004;75: 1479-1485
38. Listgarten, M. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. *J Periodontol*. 1976; 47:1.
39. Loe, H. The gingival Index and the retention index systems. *J Periodontol*. 1967; 38: 610. (supplement).
40. Mandell Bennet-Dolin. Principles and practice of infectious disease. % edition. 2000. Editorial Churchill Livingstone

41. Marshall-Day, Russell, G. Stephens and Lawrence, F. Quigley, Jr. *Periodontal Disease: MMWR Sexually transmitted diseases treatment guidelines*. 2006. Vol 5.
42. Newman, H. the approximal apical border of plaque on childrens teeth. 1. Morphology, structure and cell content. *J Periodontol* 1979; 50: 261.
43. Noiri, Y. Li, L. Ebisu, S. The localization of periodontal-disease-associated bacteria in human periodontal pockets. *J Dent Res*. 2001; 10: 1930-1934.
44. Parameter on aggressive periodontitis. American academy of Periodontology, *J Periodontol*. 2000; 71:867-869.
45. *Prevalence and Incidence. Journal of Periodontology*. 1955; 26: 185-203.
46. Ramos, J. *Infectología Clínica*. Ed Manual Moderno. Primera Edición. 2008.
47. Ranney, R. *Classification of periodontal disease*. *Periodontology* 2000;1993; 2:13.
48. Robert L. Mandell, Jeffrey L. Ebersole and Sigmund S. Socransky. J. Clinica immunologic and microbiologic features of active in juvenile periodontitis *Clin. Periodontol* 1987; 14: 534-540.
49. Robin, R. Gutell, N. Woese, C. Lesons from an evolving rRNA:16S and 23s rRNA Structures from a comparative perspective. *Microbiology review*.1994;58: 10-26
50. Saygun I, Kubar A, Özdemir A, Yapar M, Slots J. Herpesviral–bacterial interrelationships in aggressive periodontitis. *J Periodont Res* 2004; 39: 207-212.
51. Saygun I, Kubar A, Şahin S, Şener K, Slots J. Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. *J Periodontal Res* 2008; 43: 352–359
52. Sepúlveda, E. Brethauer, U. Jiménez, M. Figueroa, M. Rojas, J. Detección del virus herpes simple en lesiones de la mucosa oral en pacientes con terapia oncológica. *Med Oral*. 2003;8:329-333.
53. Shivaprasad, B. et al. Herpes viruses in chronic and aggressive periodontitis in an Indian population. *Journal of Oral Science*.2009;1 :79-86.
54. Slots, J. *Herpes viruses in periodontal diseases*. *Periodontology* 2000. 2005; 38: 33-62.
55. Socransky, S. Haffajee, A. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000. 2005; 38: 135-187.

56. Stashenko P, Funiyoshi P, Obernesser MS et al. Levels of interleukin 1b in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 548–554.
57. Taylor, Gwen. *Current protocols of molecular biology*. Editorial Wiley Interscience. 2010.
58. Ting M, Contreras A, Slots J: Herpesviruses in localized juvenile periodontitis. *J Periodont Res* 2000; 35: 17-25.
59. Umadevi, M. Adeyemi, O. Patel, M. REichart, P. Robinson, P.G. (B2) Periodontal Diseases and Other Bacterial Infections. *Adv Dental Research*. 2006; 19: 139-145.
60. Wu, Y. Yan, J. Ojcius, D. Chen, L. Gu, Z. Pan, J. Correlation between infections with different genotypes of human cytomegalovirus and epstein-barr virus in subgingival samples and periodontal status of patients. *Journal of clinical microbiology*. 2007: 3665-3670.
61. Yapar, M. et al. Prevalence of human herpes virus in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2003;74: 1634-1640.

XVI. Anexos

Anexo I: Especificaciones de los Kits virales

MAxim Biotech.Inc

Cat No. : SP-10315 (HSV-1003/HSV-1004)

Virus, Herpes Simplex virus type 1, ICPO, Primer set kit.

Componentes

Primers premezclados	1000ul
Buffer de PCR optimizado (Químicos, potencializador, estabilizador, dNTPs)	750ul en 4 tubos
Control Positivo	100ul
Marcador M.W., 100 bp escala	100ul
DDH ₂ O	1000ul

Primer Tm:

5' Oligo: 67°C

3' Oligo: 68°C

Almacenaje y Estabilidad

-20°C durante un año.

Plantilla de amplificación

DNA: si cDNA: N/A

Uso: El producto es capaz de amplificar las secuencias de los virus, herpes simplex virus 1, y ICPO. La cantidad del producto suministrada es suficiente para 50ul, 100 microarreglos en PCR *in Vitro*.

Protocolo de PCR

A. Preparación de la mezcla principal

Agregue 250 ul de cada primer premezclado a cada tubo del buffer para PCR optimizado. Esta mezcla principal debe ser "aliquot" y almacenada a -20°C

Reactivo	Cantidad por arreglo de PCR
Mezcla Principal	40.0ul
Taq DNA polimerasa	0.2ul
Espécimen o control cDNA	10.0ul

Haga un volumen final de 50ul con agua destilada si el requerimiento del espécimen o control cDNA es menor a 10.0ul.

Al ser muy pequeña la cantidad de Taq DNA polimerasa requerida para cada reacción, se recomienda que la mezcla principal y el Taq DNA polimerasa se mezclen en adecuadas cantidades para los requerimientos diarios. Esta mezcla del Taq polimerasa y la mezcla principal debe de ser rotulada como: "Mezcla principal lista para usarse". Esta "Mezcla principal lista para usarse" debe dispensarse en un vial individual antes de agregar el espécimen o control DNA. Esta "Mezcla principal lista para usarse" se puede preparar a diario y debe ser guardada a 4°C

B. Perfil de la reacción PCR

Esta reacción necesita ser optimizada según la maquinaria que tenga el usuario. Para una máquina Pekín Elmer tipo 2400 o 9600 se requiere realizar lo siguiente:

96°C	1min	1x	Desnaturalización
94°C	30seg	30-35x	Alineamiento Extensión
58°C	30seg		
72°C	30seg		
72°C	10min	1x	Extensión final
4-25°C	HOLD		

Análisis de la amplificación de muestra: un/décimo de las muestras amplificadas serán sujetas a electroforesis en gel de azarosa 0.5 ug/ml. Una banda de 230 pares indicada un resultado positivo o la presencia de las secuencias diana del espécimen. Se puede utilizar hibridización por medio de Slot o Southern-blot para la verificación y cuantificación del DNA amplificado.

Secuencias: (alineación en base de datos: M74421)

5' Oligo: **CACGCGCTACCTGCCCATCT**

3' Oligo: **CACGTGGTTACCCGCGGTCT**

MAxim Biotech.Inc
 Cat No. : SP-10317 (HSV-1008/HSV-1009)
 Virus, Herpes Simplex virus type 2 DNA polymerase, Primer set kit.

Componentes

Primers premezclados	1000ul
Buffer de PCR optimizado (Químicos, potencializador, estabilizador, dNTPs)	750ul en 4 tubos
Control Positivo	100ul
Marcador M.W., 100 bp escala	100ul
DDH ₂ O	1000ul

Primer Tm:

5' Oligo: 80°C
 3' Oligo: 77°C

Almacenaje y Estabilidad

-20°C durante un año.

Plantilla de amplificación

DNA: si cDNA: N/A

Uso: El producto es capaz de amplificar las secuencias de los virus, herpes simplex virus 2, y DNA polimerasa. La cantidad del producto suministrada es suficiente para 50ul, 100 microarreglos en PCR *in Vitro*.

Protocolo de PCR

A. Preparación de la mezcla principal

Agregue 250 ul de cada primer premezclado a cada tubo del buffer para PCR optimizado. Esta mezcla principal debe ser alícuota y almacenada a -20°C

Reactivo	Cantidad por arreglo de PCR
Mezcla Principal	40.0ul
Taq DNA polimerasa	0.2ul
Espécimen o control cDNA	10.0ul

Haga un volumen final de 50ul con agua destilada si el requerimiento del espécimen o control cDNA es menor a 10.0ul.

Al ser muy pequeña la cantidad de Taq DNA polimerasa requerida para cada reacción, se recomienda que la mezcla principal y el Taq DNA polimerasa se mezclen en adecuadas cantidades para los requerimientos diarios. Esta mezcla del Taq polimerasa y la mezcla principal debe de ser rotulada como: "Mezcla principal lista para usarse". Esta "Mezcla principal lista para usarse". debe dispensarse en un vial individual antes de agregar el espécimen o control DNA. Esta "Mezcla principal lista para usarse" se puede preparar a diario y debe ser guardada a 4°C

B. Perfil de la reacción PCR

Esta reacción necesita ser optimizada según la maquinaria que tenga el usuario. Para una máquina Pekín Elmer tipo 2400 o 9600 se requiere realizar lo siguiente:

96°C	1min	1x	Desnaturalización
94°C	30seg	30-35x	Alineamiento Extensión
58°C	30seg		
72°C	30seg		
72°C	10min	1x	Extensión final
4-25°C	HOLD		

Análisis de la amplificación de muestra: un/décimo de las muestras amplificadas serán sujetas a electroforesis en gel de azarosa 0.5 ug/ml. Una banda de 106 pares indicada un resultado positivo o la presencia de las secuencias diana del espécimen. Se puede utilizar hibridización por medio de Slot o Southern-blot para la verificación y cuantificación del DNA amplificado.

Secuencias: (alineación en base de datos: M16321)

5' Oligo: **TACGACGGCCAGCAGATCCGCGTC**

3' Oligo: **CCTTGTCGAGGCCCCGAAACCG**

MAxim Biotech.Inc
Cat No. : SP-10133 (CMV-1001/CMV-1002)

Componentes

Primers premezclados	1000ul
Buffer de PCR optimizado (Químicos, potencializador, estabilizador, dNTPs)	750ul en 4 tubos
Control Positivo	100ul
Marcador M.W., 100 bp escala	100ul
DDH ₂ O	1000ul

Primer Tm:

5' Oligo: 76°C
3' Oligo: 73°C

Almacenaje y Estabilidad

-20°C durante un año.

Plantilla de amplificación

DNA: si cDNA: N/A

Uso: El producto es capaz de amplificar las secuencias de Citomegalovirus, mayor immediate early. La cantidad del producto suministrada es suficiente para 50ul, 100 microarreglos en PCR *in Vitro*.

Protocolo de PCR

A. Preparación de la mezcla principal

Agregue 250 ul de cada primer premezclado a cada tubo del buffer para PCR optimizado. Esta mezcla principal debe ser alicuota y almacenada a -20°C

Reactivo	Cantidad por arreglo de PCR
Mezcla Principal	40.0ul
Taq DNA polimerasa	0.2ul
Espécimen o control cDNA	10.0ul

Haga un volumen final de 50ul con agua destilada si el requerimiento del espécimen o control cDNA es menor a 10.0ul.

Al ser muy pequeña la cantidad de Taq DNA polimerasa requerida para cada reacción, se recomienda que la mezcla principal y el Taq DNA polimerasa se mezclen en adecuadas cantidades para los requerimientos diarios. Esta mezcla del Taq polimerasa y la mezcla principal debe de ser rotulada como: "Mezcla principal lista para usarse". Esta "Mezcla principal lista para usarse". debe dispensarse en un vial individual antes de agregar el espécimen o control DNA. Esta "Mezcla principal lista para usarse" se puede preparar a diario y debe ser guardada a 4°C

B. Perfil de la reacción PCR

Esta reacción necesita ser optimizada según la maquinaria que tenga el usuario. Para una máquina Pekín Elmer tipo 2400 o 9600 se requiere realizar lo siguiente:

96°C	1min	1x	Desnaturalización
94°C	30seg	30-35x	Alineamiento Extensión
58°C	30seg		
72°C	30seg		
72°C	10min	1x	Extensión final
4-25°C	HOLD		

Análisis de la amplificación de muestra: un/décimo de las muestras amplificadas serán sujetas a electroforesis en gel de azarosa 0.5 ug/ml. Una banda de 435 pares indicada un resultado positivo o la presencia de las secuencias diana del espécimen. Se puede utilizar hibridización por medio de Slot o Southern-blot para la verificación y cuantificación del DNA amplificado.

Secuencias: (alineación en base de datos: M21295)

5' Oligo: **CCAAGCGGCCTCTGATAACCAAGCC**

3' Oligo: **CAGCACCATCCTCCTCTTCCTCTGG**

Anexoll : Kit para extracción de ADN viral marca ROCHE®

SA-40010: 50 reacciones

SA-40009: 100reacciones

Este kit provee un método para extraer RNA/DNA viral de plasma, suero u otros fluidos libres de células. Este kit no está diseñado para separar virus RNA de DNA celular.

Manejo:

Evitar el contacto de la muestra con el aro de la columna

Cambiar las puntas de las pipetas a la hora de transferir material.

No permitir que la punta de la pipeta toque la membrana de la columna.

Utilizar guantes y evitar el contacto de la muestra con los guantes.

Protocolo de centrifugación

Se recomienda una velocidad de centrifugación de por lo menos 6000x g (8000rpm)

Componentes

No de catálogo	SA-40010	SA-40009	Código de color
No de reacciones	50	100	
Portador de RNA	100ul	200ul	Amarillo
Proteinasa K	1 vial	2 viales	Café
Buffer	30ml	60ml	anaranjado
Buffer lítico	20ml	40ml	Amarillo
Buffer "lavador"	25ml	50ml	Verde
Elution Buffer	10ml	10ml	Azul
2.0ml tubos de microcentrifugado	50	100	
Spin Column	50	100	

Muestra

Suero, Plasma u otro fluido corporal.

Tamaño

100-500 ul

Almacenamiento

Las soluciones deben estar entre 2-8°C.

Equipo y reactivos

Etanol 96-100%

Tubos de 1.5ml

Puntas de pipetas libres de RNasa estériles

Microcentrifugadora.

Comentario [SOP2]:

Protocolo

Con una muestra de 500ul

Plasma, suero	500ul
Buffer concentrado	500ul
Buffer lítico	350ul
Portador de RNA	2ul
Proteinasa K	5ul
96-100% etanol	350ul
Washing buffer	500ul
Elution buffer	60ul

Preparación de los reactivos

Agregar 300ul de Elution buffer a la Proteinasa K y mezclar minuciosamente. Almacene los aliquots a -15°C o -25°C.

Preparación de la muestra

Se recomienda una cantidad de fluido de 3.5ml para obtener un volumen de 70ul.

1. Aplique los 3.5ml a la centrifugadora siguiendo los pasos del fabricante.
2. Centrifugue hasta obtener un volumen final de 140ul
3. El plasma por su viscosidad debe de ser centrifugado por mayor tiempo (hasta 6horas).
4. Agregue 70ul de la muestra en un tubo de 1.5 ml y la muestra está lista para purificar. (agregue el buffer lítico directo)

“Elution” de los ácidos nucleicos purificados

El DNA/RNA purificado es “eluted” en agua tratada DEPC (libre de DNasa y RNasa)

Si es RNA almacénelo a -80°C.

Si es DNA -20°C.

Protocolo

1. Agregue 500ul del buffer concentrado con virus a un tubo de 1.5ml. Transfiera 500ul de plasma o suero al buffer concentrado con virus en el tubo. Cierre el tubo y “vortex” por 5seg. Manténgalo a -20°C por 10 min. Centrifugue por 10 min. a 10 000xg, 4°C.
2. Vacíe 950 ul del supernatante, dejando aproximadamente 40-50ul del mismo. Agregue 350ul del buffer lítico, 2ul del portador de RNA, 5ul de la proteinasa K en un tubo de 1.5ml. Cierre el tubo y vortex por 20 seg.
3. Coloque el tubo en un bloque caliente e incúbelo a 55°C por 5-10min. (temperatura y tiempo requeridos para la lisis del virus).
4. Coloque 350ul de etanol en la mezcla y vortex por 15 segundos.
5. Coloque la muestra en un tubo “spin column” de 2.0ml y centrifugue por 1 min a 10000 x g.

6. Pase el contenido a un tubo de 1.5 ml. Agregue 500ul de washing buffer al tubo "spin column" de 2.0ml y centrifugue por 1 min a 10000x g.
7. Transfiera el contenido a otro tubo de 1.5ml y centrifugue por 1 min a 10000 x g. (esto evita cualquier residuo del washing buffer)
8. Transfiera el Spin column en un tubo de 1.5ml. Agregue 60ul de Elution Buffer y déjelo reposar por 1 minuto. Centrifugue por 1min a 10 000x g.

Anexo III:

Kit de extracción de AND viral de tejidos de la marca GENTRA® Protocol: DNA Purification from Tissue Using the Gentra Puregene Tissue Kit

This protocol is for purification of genomic DNA from 5–10 mg or 50–100 mg fresh or frozen solid tissue using the Gentra Puregene Tissue Kit.

Important point before starting

■ In some steps of the procedure, one of two choices can be made. Choose ■ if processing 5–10 mg tissue; choose ▲ if processing 50–100 mg tissue.

Things to do before starting

■ Preheat water baths to 37°C for use in step 3, 55°C for use in step 2b, and 65°C for use in steps 2a and 15 of the procedure.

Procedure

1. Dissect tissue sample quickly and freeze in liquid nitrogen.

Grind ■ 5–10 mg or ▲ 50–100 mg frozen or fresh tissue in liquid nitrogen with a mortar and pestle. Work quickly and keep tissue on ice at all times, including when tissue is being weighed.

2. Dispense ■ 300 µl or ▲ 3 ml Cell Lysis Solution into a ■ 1.5 ml or ▲ 15 ml grinder tube on ice, and add the ground tissue from the previous step. Complete cell lysis by following step 2a or 2b below:

2a. Heat at 65°C for 15 min to 1 h.

2b. If maximum yield is required, add ■ 1.5 µl or ▲ 15 µl Puregene Proteinase K, mix by inverting 25 times, and incubate at 55°C for 3 h or until tissue has completely lysed. Invert tube periodically during the incubation.

The sample can be incubated at 55°C overnight for maximum yields.

3. Add ■ 1.5 µl or ▲ 15 µl RNase A Solution, and mix the sample by inverting 25 times. Incubate at 37°C for 15–60 min.

4. Incubate for ■ 1 min or ▲ 3 min on ice to quickly cool the sample.

5. Add ■ 100 µl or ▲ 1 ml Protein Precipitation Solution, and vortex vigorously for 20 s at high speed.

6. Centrifuge for ■ 3 min at 13,000–16,000 x g or ▲ 10 min at 2000 x g.

The precipitated proteins should form a tight pellet. If the protein pellet is not tight, incubate on ice for 5 min and repeat the centrifugation.

Tissue Gentra Puregene Handbook 09/2007 40

7. Pipet ■ 300 µl or ▲ 3 ml isopropanol into a clean ■ 1.5 ml microcentrifuge tube or ▲ 15 ml centrifuge tube and add the supernatant from the previous step by pouring carefully.

Be sure the protein pellet is not dislodged during pouring.

Note: If the DNA yield is expected to be low (<1 µg) add ■ 0.5 µl Glycogen Solution (cat. no. 158930).

8. Mix by inverting gently 50 times.

9. Centrifuge for ■ 1 min at 13,000–16,000 x g or ▲ 3 min at 2000 x g.

10. Carefully discard the supernatant, and drain the tube by inverting on a clean piece of absorbent paper, taking care that the pellet remains in the tube.

11. Add ■ 300 µl or ▲ 3 ml of 70% ethanol and invert several times to wash the DNA pellet.

12. Centrifuge for ■ 1 min at 13,000–16,000 x g or ▲ 1 min at 2000 x g.

13. Carefully discard the supernatant. Drain the tube on a clean piece of absorbent paper, taking care that the pellet remains in the tube. Allow to air dry for up to 15 min.

The pellet might be loose and easily dislodged.

14. Add ■ 50 µl or ▲ 150 µl DNA Hydration Solution and vortex for 5 s at medium speed to mix.

15. Incubate at 65°C for 1 h to dissolve the DNA.

16. Incubate at room temperature overnight with gentle shaking. Ensure tube cap is tightly closed to avoid leakage. Samples can then be centrifuged briefly and transferred to a storage tube.

Hoja de captura de datos

Nombre paciente	Diagnostico	Prueba número	Grupo	Edad	Sexo	Zona	PD	GI	PI	CAL	Otros
-----------------	-------------	---------------	-------	------	------	------	----	----	----	-----	-------

PD: profundidad de bolsa

GI: Índice gingival

PI: Índice de placa

CAL: Niveles de inserción clínica

Presentación de resultados.

Se usarán tablas y/o gráficas (pastel, barras, histogramas, líneas, puntos).

Consideraciones éticas.

"Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

DE acuerdo al:

Título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección I, investigación sin riesgo, no requiere consentimiento informado.

Sin embargo, por ser pacientes que van a requerir cirugía periodontal, sellos firmaran la hoja de consentimiento informado del posgrado de periodoncia de la UANL.