



Universidad Nacional
del Nordeste

Facultad de Odontología

“ANÁLISIS POR BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA ASOCIACIÓN
ENTRE *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* Y LA ENFERMEDAD
PERIODONTAL CRÓNICA”

Bioquímica María Rosenda Britos

2019

Trabajo presentado para optar al grado Académico de

Magister en Investigación en Ciencias de la Salud

“Análisis por biología molecular de la asociación entre *Porphyromonas gingivalis* y la Enfermedad periodontal crónica”

Bqca. Maria Rosenda Britos

Tesista

Dra. Silvia M. Ortega

Directora

Dra. Carla Zimmerman

Co-Directora

Bqco. Gerardo Andino

Sub-Director

Este trabajo de Tesis fue realizado en



*“Laboratorio de Investigaciones Científicas de la Facultad
de Odontología de la UNNE” Área Biología Molecular y Área
Microbiología.*

*“Laboratorio de Medicina Genómica de la Universidad Nacional del
Nordeste” Directora: Dra. Maria Carla Zimmermann, Inv. CONICET*



Dedicatoria:

A Dios, por guiarme en cada paso de mi vida.....

A mis padres, Maria del Carmen y Antonio, que me enseñaron a no rendirme jamás....

A Gonzalo, mi compañero de la vida, que con su comprensión y apoyo incondicional me ayudo a lograr mi meta.

A mis hijas Maria, Florencia y Rosario, porque son mi luz y mi mayor alegría...

Agradecimientos:

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo de la Facultad de Odontología y la Secretaria General de Ciencia y Tecnología de la UNNE.

A mi orientador, Prof. Dra. Silvia M. Ortega, por haberme transmitido sus conocimientos y experiencia, con una disponibilidad incuestionable, por haberme ayudado a crecer como profesional y, por haber creído en mi capacidad, aportándome la motivación necesaria para la realización de este trabajo.

RESUMEN:

Los seres humanos poseen un “microbioma oral dominado por bacterias anaerobias”. La mayoría de estos microorganismos exhiben en la cavidad oral un comportamiento simbiótico y una relación con el huésped basada en beneficios mutuos. Actualmente se postula que algunas especies bacterianas de la placa periodontopatogena se comportan como factores de riesgo significativos para la salud humana, ya que pueden exacerbar enfermedades inflamatorias crónicas como diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoidea, y pueden provocar bacteriemia y parto prematuro.

En estado de salud, en el surco gingival, existe una microbiota normal en equilibrio con el huésped. Un aumento tanto en cantidad como en diversidad de microorganismos, dará inicio a la gingivitis, que podrá proseguir o no hasta desarrollar periodontitis. La periodontitis es una enfermedad multifactorial de etiología bacteriana, si no se instaura un tratamiento, su evolución tiene como resultado la pérdida de la pieza dentaria. Es considerada una infección bacteriana mixta, causada por bacterias Gram-negativas anaerobias estrictas provenientes de la placa subgingival. Estos factores tienen acceso al tejido conectivo y al torrente sanguíneo a través del epitelio dañado de la bolsa periodontal.

La Periodontitis crónica (Pc) es la presentación más frecuente y es prevalente en adultos

. Las especies bacterianas que forman la biopelícula periodontopatógena interactúan con los tejidos y las células del huésped causando la liberación de una amplia variedad de citocinas, quimiocinas y mediadores inflamatorios. Entre la variada ecología microbiana subgingival, algunas especies bacterianas se asocian al desarrollo y progreso de la enfermedad periodontal: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella spp*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythensis*. *Porphyromonas gingivalis* (Pg). *P. gingivalis* es considerada uno de los agentes etiológicos más importantes en la periodontitis crónica. Posee factores de virulencia que causan la destrucción de los tejidos periodontales, directa o indirectamente mediante la modulación de la respuesta inflamatoria. Posee un gran potencial para colonizar e invadir tejidos y es considerada una pieza clave en la transformación de la biopelícula dental benigna en una comunidad microbiana patógena al perturbar o trastornar la inmunidad del huésped y prosperar en condiciones disbióticas. Favorece el desarrollo de una respuesta inflamatoria crónica y contribuye con los procesos de destrucción de tejido periodontal y hueso alveolar. Es uno de los microorganismos patobionte mejor documentados y el conocimiento actual sobre su mecanismo de infección y factores de virulencia, afirman su papel como un componente clave en la periodontitis crónica.

En microbiología clínica, la identificación de los agentes patógenos es un requisito esencial para obtener un correcto diagnóstico y la aplicación posterior de un tratamiento adecuado. En la actualidad, la PCR (Polimerase Chain Reaction) es la técnica de Biología molecular más utilizada en microbiología clínica, sobre todo, cuando se intenta identificar patógenos de crecimiento tedioso in- vitro, anaerobios estrictos, crecimiento lento, y exigencias nutricionales como *P. gingivalis*.

La presencia de patógenos periodontales parece ser diferente en sujetos de diferente origen étnico y los factores geográficos también pueden influir en la distribución de estas especies. En nuestra región y en nuestro país, los datos científicos en referencia a la etiología y rol de las bacterias responsables de la enfermedad periodontal son escasos.

Objetivo: Establecer la prevalencia de *Porphyromonas gingivalis* en fluido gingival de pacientes adultos con periodontitis

Material y Método: Participaron en este estudio 45 pacientes de ambos sexos, sistémicamente saludables, con edades entre 35 y 65 años que asistieron al Módulo de Patología y Diagnóstico III de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional del Nordeste. Los pacientes fueron diagnosticados clínicamente con periodontitis crónica de acuerdo con la American Association Periodontology. Como grupo control, se incluyeron en el proyecto 20 pacientes de ambos sexos sin enfermedad periodontal y sin enfermedades sistémicas. Cada participante firmó el Consentimiento informado aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional del Nordeste. Se consideró la clasificación de enfermedad periodontal según lo sugerido por Escudero-Castaño y col. Se valoraron dos de los parámetros más importantes: profundidad de sondaje y pérdida de inserción clínica, para clasificar a la periodontitis crónica. Se seleccionaron dos sitios de muestreo, el de mayor profundidad de sondaje uno en la arcada superior y otro en la arcada inferior. Se tomaron muestras de líquido gingival con puntas de papel absorbente. Se introdujeron puntas de papel absorbente en el surco gingival del sitio elegido durante 60 segundos. Se transportaron luego en tubos Eppendorf bajo refrigeración almacenándose a -20 °C hasta su procesamiento. Se realizó la extracción de ADN utilizando el método de extracción con CTAB y posterior purificación. La prevalencia de *P. gingivalis* se determinó mediante la técnica de PCR de punto final. Se utilizó como control positivo la cepa de *P. gingivalis* ATCC 33277. La estrategia del ensayo se diseñó en forma simple y económica. Se utilizaron los cebadores descritos en el protocolo de PCR de acuerdo con Quintero y col (2011) cuya banda se visualiza a 197 pares de bases (pb). Las secuencias de cebadores utilizadas fueron: Pg-1 F 5'-TGTAGATGACTGAAAACC-3', Pg-2 R 5'-ACGTCATCCCCACCTTCCTC-3'. Para comprobar la especificidad de los primers se ensayó la PCR utilizando ADN obtenido de la cepa ATCC® de *P. gingivalis* 33277™ y ADN de

Staphylococcus aureus SARM (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina). Para comprobar la presencia de ADN bacteriano en las muestras de fluido gingival, se realizó una PCR de ARNr16S (procariotas). Para ello se utilizaron los cebadores BAK4 y BAK11, empleados universalmente para la detección de ARN ribosomal 16S en procariotas.

Los productos PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa 1,8 % en buffer TBE1X más 3 μ L de Gel Green 10,000X diluido 3X en agua destilada-desionizada y se visualizaron en foto documentador.

Resultados: La edad promedio de los pacientes evaluados fue de $40 \pm 8,87$ años y la distribución poblacional según el sexo fue de 64% para el sexo masculino y 36% para el femenino. El Índice de O'Leary, arrojó un promedio de 39,42 % en el sexo femenino y 41,90 % en el masculino. La distribución de frecuencias del grado de periodontitis en los pacientes evaluados fue de 13,3% de periodontitis leves, 46,7% moderadas y 40% de periodontitis severas. Se observó mayor frecuencia de periodontitis severa 72,2% y moderada 52,3% en pacientes de sexo masculino. La periodontitis leve se registró con mayor frecuencia en el sexo femenino, 66,7%. La prevalencia de *P. gingivalis* en la población estudiada fue del 44,4%. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grados de severidad de la periodontitis y la presencia de *P. gingivalis* ($p = 0.0002$ $\alpha = 5$ %).

Conclusión: En la población estudiada, la periodontitis prevaleció en el sexo masculino. Las periodontitis moderadas se dieron con mayor frecuencia. En el sexo femenino se registró con mayor frecuencia la periodontitis leve. La prevalencia de *P. gingivalis* en esta población con periodontitis crónica es de 44,4%. Se observó un aumento de la prevalencia de *P. gingivalis* en relación a la severidad de la periodontitis.

ÍNDICE

	Paginas
I. INTRODUCCION	
I.I. El Microbioma oral	1
I.II Placa bacteriana subgingival.....	2
I.III. El periodonto.....	4
I.IV. La Enfermedad Periodontal.....	6
I.V. La Periodontitis Crónica.....	8
I.VI. La Periodontitis Agresiva.....	9
I.VII. Diagnóstico clínico de la Enfermedad periodontal.....	10
I.VII. Microorganismos periodontopatógenos.....	10
I.VIII. <i>Porphyromonas gingivalis</i> (<i>P. gingivalis</i>).....	11
I.IX. Teoría del Patógeno clave o Patobionte.....	12
I.X. Factores de virulencia de <i>P. gingivalis</i>	13
I.XI. Evasión del sistema Inmune.....	14
I.XII. Repercusión de <i>P. gingivalis</i> a nivel sistémico.....	15
I.XII. Identificación de microorganismos periodontopatógenos....	16
I.XIV. Métodos moleculares.....	16
I.XV. ARNr 16S (rrs)	
gen diana para la identificación molecular bacteriana.....	17
I.XVI. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	18

II. OBJETIVOS E HIPOTESIS

II.I. Objetivos.....	19
II.II. Fundamentación.....	19
II.III. Hipótesis.....	21

III. MATERIAL Y METODO

III.I. Tipo de estudio.....	22
III.II. Población.....	22
III.III. Inspección clínica.....	22
III.IV. Obtención de las muestras.....	24
III.V. Extracción de ADN de las muestras clínicas.....	26
III.VI. Cuantificación y evaluación de pureza e integridad del ADN.....	27
III.VII. Control Positivo.....	27
III.VIII. Diseño y optimización de la técnica de PCR.....	29
III.IX. Preparación de la mezcla de reacción.....	30
III.X. Electroforesis en gel de agarosa.....	31
III.XI. Control interno.....	32
III.XII. Análisis estadístico.....	32

IV. RESULTADOS

IV.I. Población.....	33
IV.II. Inspección clínica.....	33
IV.III Reactivación de la Cepa ATCC 33277.....	35
IV. IV Diseño y optimización de la técnica de PCR.....	36
IV.V.PCR especie específica para <i>P.gingivalis</i>	37

IV.VI -Análisis estadístico.....	42
V. DISCUSION	
V.I. Población.....	44
V.II. Inspección clínica.....	45
V.III. Detección de <i>P. gingivalis</i> por Biología Molecular.....	46
V. IV. Frecuencia de <i>P. ginigivalis</i> en relación con la severidad de la periodontitis.....	48
VI. CONCLUSIONES.....	52
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	55

I.INTRODUCCION

I.I- El Microbioma oral:

El estudio del “microbioma humano” ha crecido de manera exponencial en la última década, y su importancia en el proceso de salud -enfermedad en el ser humano es cada vez más evidente. Las comunidades microbianas endógenas o “microbiota endógena” participan en múltiples funciones metabólicas, fisiológicas e inmunológicas del huésped. La “microbiota” se define como la comunidad de microorganismos que ocupa un hábitat específico, mientras que el término de “microbioma” se refiere a la microbiota y a la función que cumplen los microorganismos dentro de dicho entorno¹.

Durante años, el microbioma humano ha evolucionado con el hombre, desempeñando un papel significativo en su fisiopatología.² Las distorsiones de la función y de la composición del microbioma pueda tener consecuencias significativas para la salud del huesped^{1,3,4}El microbioma en el ser humano se encuentra ampliamente distribuido y es muy diverso y variable entre individuos. La mayor variabilidad microbiana corresponde a la “cavidad oral” y al “tracto gastrointestinal”. La relación entre el microbioma oral y el hospedador es dinámica y está influenciada por múltiples factores. Distintos hábitats en la cavidad oral albergan comunidades microbianas heterogéneas, y se encuentran vinculadas con la salud oral y sistémica.

La cavidad bucal es considerada un ecosistema poblado por microorganismos fisiológicamente diferentes, los cuales coexisten exitosamente gracias a mecanismos adaptativos y a la existencia de sitios que facilitan su adhesión. La colonización del medio oral está favorecida por la “película adquirida”, esta delgada capa está constituida por proteínas, glucoproteínas, lípidos y otros componentes (hidratos de carbono, ácidos nucleicos), procedentes principalmente de la saliva, pero también derivadas del líquido crevicular (en el surco gingival), de la mucosa oral y de las bacterias. Dicha película modula la unión de las bacterias a las superficies dentarias y epiteliales y brinda protección y lubricación a la mucosa.

Cuando esta película adquirida es colonizada por las bacterias se forma la “placa bacteriana dental” o “biofilm dental”. La saliva y el líquido crevicular contribuyen al mantenimiento y control del biofilm dental con la participación de numerosas proteínas y minerales, y componentes con actividad antimicrobiana como: inmunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidasa, lisozima, estaterina e histatinas. También a su vez, la saliva y líquido crevicular proporcionan nutrientes para el crecimiento microbiano^{5,6}

La relación entre la colaboración y antagonismo entre las especies bacterianas del biofilm contribuyen a la estabilidad ecológica, repercuten en la virulencia y el potencial patogénico de las bacterias e intervienen en la fenómeno tolerancia a las defensas del hospedador y a los agentes antimicrobianos⁷

Coexisten diferentes hábitats de colonización microbiana en la cavidad oral, como superficies dentarias, surco gingival, gingiva, lengua, mejilla, labios y paladar. En cada uno de estos nichos, las bacterias encuentran el sitio más adecuado de acuerdo con sus mecanismos de adhesión, exigencias nutricionales y ambientales, como la disponibilidad de nutrientes, pH del sitio, metabolitos tóxicos y condiciones del huésped que contribuyen a modelar la estructura y actividad de las comunidades microbianas que allí se instalan

Los seres humanos poseen un “microbioma oral dominado por bacterias anaerobias”. La mayoría de estos microorganismos exhiben en la cavidad oral un comportamiento simbiótico y una relación con el huésped basada en beneficios mutuos⁸. Las bacterias que constituyen el microbioma oral son cruciales para mantener la homeostasis en la cavidad oral⁹. Sin embargo, algunas de estas bacterias han sido también implicadas en enfermedades como la caries y la periodontitis, las cuales son enfermedades infecciosas comunes de la cavidad oral en los seres humanos¹⁰.

Actualmente se postula que algunas especies bacterianas de la placa periodontopatogena son factores de riesgo significativos para la salud humana, ya que pueden exacerbar enfermedades inflamatorias crónicas tales como tumores, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoidea, bacteriemia, el parto prematuro y el bajo peso al nacer en los bebés. Es ampliamente aceptado que los microorganismos bucales causan enfermedades principalmente por una forma sinérgica o cooperativa¹¹.

I.II. Placa bacteriana subgingival:

La placa bacteriana o biofilm adopta el nombre de supra o subgingival, de acuerdo con su ubicación y teniendo en cuenta el borde libre de la encía. Se inicia con la deposición de glicoproteínas salivales sobre la superficie dura de las piezas dentarias, comportándose tanto como receptores para adhesinas de las bacterias como de nutrientes para muchas de ellas. El borde libre de la encía marginal constituye un límite, algo impreciso, entre la zona supragingival y la subgingival. Por esto algunos microorganismos pueden estar presentes en ambas. El microambiente y las condiciones ambientales que proporciona el surco gingival puede influir en el desarrollo de la biopelícula. La forma y estructura del surco gingival y de la bolsa periodontal

los hacen menos accesibles a las actividades de limpieza; por tanto, estas áreas retentivas contribuyen a formar un microambiente relativamente estancado, donde los microorganismos que no pueden adherirse fácilmente a la superficie dentaria pueden tener oportunidad de colonizar. Existen también conagración y mecanismos de adhesión al epitelio de la bolsa. Las bacterias de estas localizaciones tienen acceso directo a los nutrientes e inmunoglobulinas presentes en el fluido del surco gingival¹² Durante su formación, la placa, atraviesa distintas etapas y, desde el punto de vista microbiológico, Socransky y Haffajee (1998)¹³ sugirieron el siguiente agrupamiento de los microorganismos componentes de la placa dental subgingival:

Un grupo de colonizadores primarios que derivan de la placa supra gingival: *Streptococcus (S.) mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *S. intermedius*, *S. gordonii*, *Actinomyces (Act.) naeshlundii* y *Act. viscosus* y *Veilonella spp.* Otro grupo formado por *Eikenella corrodens*, especies de *Capnocytophaga spp.* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A.a.)*, particularmente del serotipo a, que corresponden a los colonizadores secundarios. El grupo de colonizadores terciarios, que incluye a *Fusobacterium (F.) nucleatum* y *F. periodonticum*, *Micromonas micro*, *Prevotella (P.) nigrescens* y *P. intermedia* y bacterias asociadas a ellas, tales como *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter (C.) rectus*, *C. showae* y *C. gracilis*, y *S. constellatus*. Estas especies constituyen un nexo con las bacterias de aparición tardía¹⁴ que, por modificaciones en el ambiente ecológico favorecen la aparición del grupo rojo compuesto por *Porphyromona gingivalis*, *Tannerella forsythensis* y *Treponema denticola*, llamados colonizadores cuaternarios, estrechamente relacionados al desarrollo y progreso de la enfermedad periodontal. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans serotipo b*, *Actinomyces naeshlundii*¹³, *Actinomyces viscosus* y *Selenomonas noxia* se consideraron especies sin asociaciones claras. (fig 1)

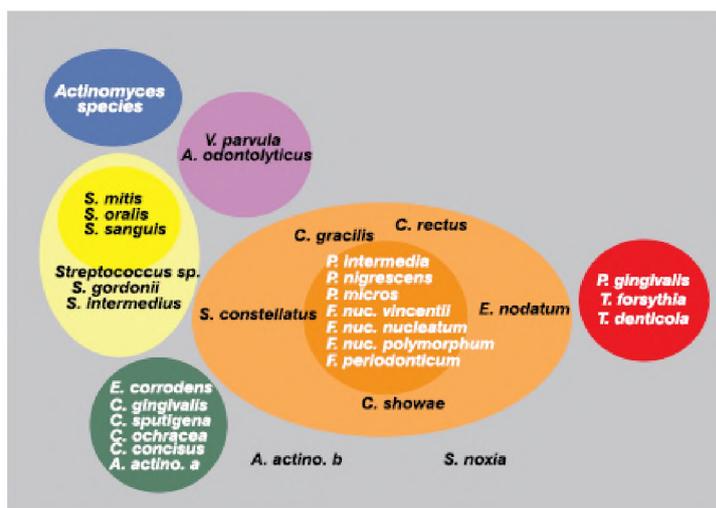


Figura 1. Esquema de las comunidades (complejos) bacterianas del biofilm periodonto-patógeno. Estas agrupaciones son secuenciales desde la superficie del diente a la superficie de la placa bacteriana, por lo

que la formación y maduración de éste va a depender de la existencia de una comunidad previa, desde el azul hacia el rojo. (Socransky y cols., 1998).

En estado de salud, en el surco gingival, existe una microbiota normal en equilibrio con el huésped, compatible con salud. Un aumento tanto en cantidad como en diversidad de microorganismos, dará inicio a la gingivitis¹⁵, que podrá proseguir o no hasta desarrollar periodontitis según la respuesta del huésped. Un sistema inmune disminuido, relacionado a factores de riesgo, tales como estrés, edad, higiene deficiente, consumo de tabaco, condición socio-económica, obesidad, entre otros, aumentará las probabilidades de progreso de la enfermedad¹⁶.

Sin embargo, bacterias no patógenas o benéficas contribuyen a mantener saludable el ecosistema subgingival, considerándose como tales, a aquellas presentes en elevado número en pacientes saludables y en bajo número en individuos en situación de enfermedad. Mecanismos de defensa tales como la competencia, exclusión, adhesión, desplazamiento, competencia por nutrientes y bacteriocinas, pueden ser importantes para la salud por su efecto protector frente a la invasión de microorganismos patógenos.

I.III. El periodonto:

Se denomina periodonto al conjunto de tejidos que rodean a la pieza dentaria, y su principal función es mantener a la misma dentro del hueso alveolar. Éste, se divide en periodonto de protección y periodonto de inserción.

El periodonto de protección (fig. 2), está formado por la encía. Definiendo a ésta, como la parte de la mucosa que rodea a la pieza dentaria y recubre las apófisis alveolares del hueso alveolar. Está formada por tejido epitelial y conectivo. En ella, se diferencian la encía marginal, la encía insertada y la encía interdental. Presenta color rosa o rosa coral en sujetos de raza blanca (fig. 3) y varios grados de color en otras razas, exhibe un aspecto punteado, se localiza adaptada a los tejidos subyacentes, y su margen termina en filo de cuchillo apoyándose sobre la pieza dentaria. El margen gingival se ubica en la unión entre el cemento y el esmalte ante inexistencia de patología. Rodeando a las piezas dentarias, forma un festoneado en el que la mayor altura se localiza entre las piezas dentarias, lo cual se denomina papila interdental. La vertiente externa forma parte de la mucosa que recubre la cavidad bucal y la vertiente interna de la encía forma un espacio virtual con la pieza dentaria, llamado surco gingival que en estado de salud mide de 1 – 3 milímetros (mm) de profundidad¹⁷. Éste espacio virtual con forma de V que rodea al diente, está limitado en su extremo apical por una línea de células especiales que se ubican en el fondo del

surco gingival y establecen la unión entre la encía y la pieza dentaria, denominándose adherencia epitelial o epitelio de unión¹⁸.

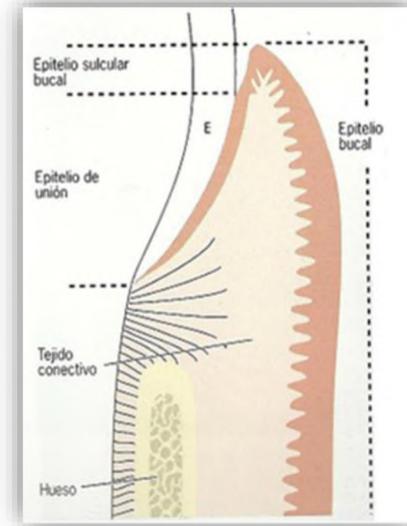


Figura 2. Periodonto de protección. Fuente: Lindhe y col. (2005).

En estado de salud, el sangrado es inexistente y el líquido crevicular se presenta en pequeño volumen. El líquido gingival o crevicular, que se filtra hacia el surco gingival desde el tejido conectivo de la encía, posee como función, mantener limpio al surco, mejorar la adhesión del epitelio a través de proteínas, generar efecto antibacteriano y acción inmunitaria para proteger a la encía¹⁹.

El periodonto de inserción o aparato de inserción (fig. 4), está formado por el cemento (tejido que recubre la pieza dentaria en la parte radicular), el hueso alveolar (ubicado en el hueso alveolar que forma parte del maxilar) y el ligamento periodontal, integrado por un conjunto de fibras de colágeno dispuestas desde el cemento de la pieza dentaria hacia el hueso alveolar, situado en el alvéolo. El periodonto puede sufrir variaciones con respecto a su función y a su morfología, también puede sufrir cambios por factores relacionados con la edad¹⁸.

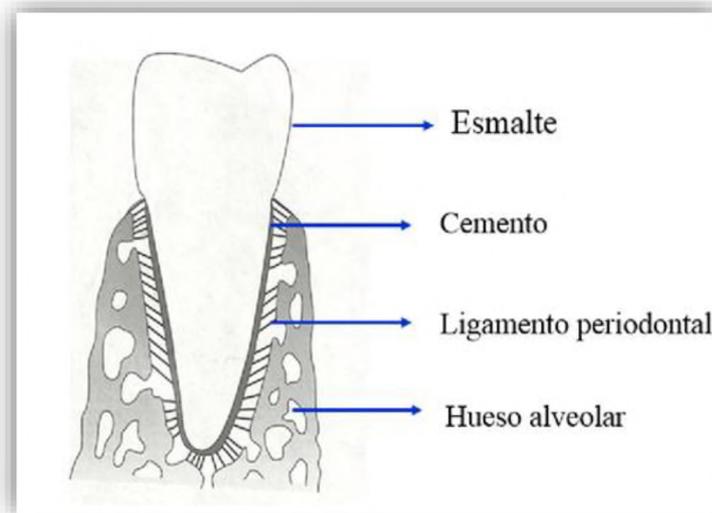


Figura 4. Periodonto de inserción. Fuente: Itoiz y Carranza (2004).

la permeabilidad a los antígenos bacterianos y otorga menor resistencia a los traumatismos. Durante la vida, el periodonto sufre modificaciones tanto funcionales como morfológicas. Según Needelman (2004)²⁰, el epitelio soporta un adelgazamiento que se torna notorio con el avance de la edad, lo cual incrementa

I.IV. La Enfermedad Periodontal:

La periodontitis es una enfermedad multifactorial de etiología bacteriana caracterizada por una respuesta inflamatoria desarrollada por el huésped frente a los microorganismos de la placa bacteriana y sus productos²¹. Es considerada una infección bacteriana mixta, causada por bacterias Gram-negativas anaerobias estrictas provenientes de la placa subgingival, que se comporta como una fuente de factores de virulencia. Estos factores tienen acceso al tejido conectivo y al torrente sanguíneo a través del epitelio dañado de la bolsa periodontal²². La periodontitis se caracteriza por presencia de inflamación gingival en localizaciones donde se ha perdido la inserción de fibras de colágeno al cemento y migración apical del epitelio de unión. Además, al proceso inflamatorio de pérdida de inserción del tejido conectivo se asocia reabsorción de la porción coronal del hueso alveolar de soporte²³. Debe considerarse también, la confluencia de diversos factores para el inicio de la periodontitis, si bien aún es difícil de diferenciar las consecuencias directas de los factores de virulencia de las bacterias de los efectos destructivos de la respuesta inmunológica exacerbada del huésped²⁴

Generalmente cursa como una enfermedad asintomática, pero si no se instaura un tratamiento su evolución tiene como resultado la pérdida de la pieza dentaria¹La pérdida de piezas dentarias naturales tiene actualmente, una importancia fundamental y puede ser considerada un acontecimiento grave en la vida de nuestros pacientes. Puede llevar a alteraciones que afectan funciones como la masticación, la ingestión de alimentos y la forma de hablar, en detrimento de la calidad de vida de los pacientes.

Las periodontitis son enfermedades de alta prevalencia y se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo. En Estados Unidos la prevalencia alcanza el 47,2% Eke y cols. (2012)²⁵ en Brasil la prevalencia es de 9% en jóvenes, 10% en adultos y 19% en adultos mayores y en Argentina es de 5%, 30% y 49%, respectivamente Gjermo y cols. (2002)²⁶, y en Chile la pérdida severa de inserción clínica es de 39% en adultos jóvenes entre 35-44 y 69% en adultos mayores entre 65-74 años Gamonal y cols. (2010)²⁷.

La Academia Americana de Periodontología (AAP) en 1999, convocó al Taller Internacional para la Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales. Según Armitage²³, esta clasificación de la AAP "...es enciclopédica.". Es muy completa, detallada y compleja, y tal vez no se presta para el uso en su totalidad a diario por los profesionales" ...

Esta clasificación se simplificó según lo que se expresa a continuación:

- I. Enfermedades gingivales
- II. Periodontitis crónicas
- III. Periodontitis agresivas
- IV. Periodontitis como manifestaciones de enfermedades sistémicas
- V. Enfermedad periodontal necrotizante
- VI. Abscesos del periodonto
- VII. Lesiones endodóntico-periodontales
- VIII. Deformidades y condiciones de desarrollo o adquiridas

Desde el taller de 1999, ha surgido información sustancial a partir de estudios de población, investigaciones de ciencias básicas y estudios prospectivos que evaluaron factores de riesgo ambientales y sistémicos involucrados en las afecciones periodontales. La El análisis de esta evidencia ha llevado a Academia Americana de Periodontología (AAP) y la Federación Europea de Periodontología (EFP) en el Taller Mundial de 2017 realizado en Chicago a desarrollar un nuevo marco de clasificación para la Periodontitis²⁸ En este nuevo Taller se acordó que de acuerdo con los conocimientos actuales, se pueden identificar tres formas de Periodontitis:

Periodontitis necrotizante³³, Periodontitis como una manifestación de Enfermedad Sistémica³⁰ y las formas de la enfermedad previamente reconocidas como "Crónicas" o "Agresivas", ahora agrupados en una sola categoría, "Periodontitis".^{28,29,30,31,32,33,34} Al revisar la clasificación, el taller acordó un marco de clasificación para la periodontitis caracterizado por un sistema de clasificación multidimensional que podría adaptarse con el tiempo a medida que surgen nuevas pruebas³⁴

I.V. La Periodontitis Crónica:

La Periodontitis crónica (Pc) es la más frecuente, se caracteriza clínicamente por alteraciones sucesivas en el color, textura y volumen de la encía marginal, sangrado y disminución de la resistencia al sondaje de los tejidos blandos de la bolsa gingival, pérdida del nivel de inserción durante el sondeo, retracción del margen gingival, pérdida de hueso alveolar, exposición de furcación radicular, aumento de movilidad dentaria y finalmente pérdida de la pieza dentaria²². Esta patología, es prevalente en adultos a partir de los 35 años, si bien puede afectar también a niños, su evolución es lenta a moderada, y está relacionada con la presencia de biopelícula dental y cálculo.

Entre los factores locales que predisponen a sufrir la lesión, se destacan la acumulación de placa por falta de higiene, factores sistémicos como diabetes mellitus, enfermedades oncológicas, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (S.I.D.A), y otros factores predisponentes locales tales como el hábito de fumar y el estrés. Su principal etiología se relaciona con el biofilm subgingival que alberga una gran variedad de microorganismos, la composición microbiana varía entre individuos y, a su vez, entre sitios de un mismo individuo. El biofilm ocasiona gingivitis que, no en todos los casos, evoluciona a periodontitis y la progresión hacia esta enfermedad dependerá de la susceptibilidad del huésped. La velocidad de avance de la lesión es lenta, incluso, aunque se inicie en la adolescencia los cambios se notan en la cuarta década de la vida. Ese avance no es igual en todos los sitios, en algunos es estático durante largos periodos, y en otros lo hace con rapidez tal como en los sitios interproximales, coincidiendo con una mayor formación de biopelícula y deficiente higiene.

... "La periodontitis crónica es una enfermedad específica de sitios"²⁷ ..., ya que la inflamación, formación de bolsas, pérdida de inserción clínica y hueso, están directamente relacionados con la acumulación de biopelícula subgingival en determinados sitios. Estos cambios ocurren en una sola superficie dentaria mientras que el resto de las superficies mantienen su nivel de inserción.

Cuando la lesión afecta a menos del 30 % de las piezas dentarias, toma el nombre de periodontitis localizada (PL), y cuando alcanza al 70 % o más de las piezas, recibe el nombre de generalizada²³

La gravedad de la periodontitis crónica a nivel de los sitios se clasifica en leve, moderada y severa o grave; estos términos pueden aplicarse para referirse a la boca entera, a una parte de ella o al estado patológico de un solo diente. La inserción clínica de la encía, está dada por la inserción de un grupo de fibras colágenas del tejido conectivo de la encía que se insertan desde la encía al cemento radicular. El nivel de inserción clínica es una medida lineal; la inserción de la encía se da de manera constante a 1.07 mm (aproximadamente) coronal a la cresta ósea. Según el grado de pérdida de inserción clínica, las periodontitis se clasifican en leve: 1 - 2 mm, moderada: 3 - 4 mm, avanzada o severa: más de 5 mm³⁵.

I.VI. La Periodontitis Agresiva:

La Periodontitis agresiva (P.a.) aparece, generalmente, durante la pubertad. Se diferencia de la PC porque se presenta en molares e incisivos, con pérdida de la inserción interproximal, y no afecta más que a dos piezas cuando es localizada.

Un rasgo particular de esta forma de periodontitis es la falta de inflamación, aunque se presenten bolsas periodontales, la cantidad de biopelícula es mínima, su crecimiento avanza con rapidez y se acompaña de migración de los incisivos, movilidad de primeros molares, sensibilidad térmica y táctil, entre otros²³. La forma generalizada, afecta a sujetos menores de 30 años y aún a personas mayores. En este caso, los huéspedes generan una respuesta inmune produciendo anticuerpos que atentan contra la viabilidad de los patógenos presentes y la pérdida de inserción no es exclusiva de los primeros molares ni incisivos. El avance de la lesión es episódico, tiene períodos de destrucción avanzada y períodos de estabilidad. Los factores de riesgo, inmunológicos, genéticos y ambientales, se asocian a microorganismos específicos, entre ellos la presencia de algunos microorganismos como *A. a.* quien se presenta con asidua frecuencia y en elevado número en la P.a.³⁶.

Mientras que la PC presenta una progresión lenta relacionada con factores locales, la P.a muestra una inflamación que aparece tempranamente y se caracteriza por una pérdida rápida de la inserción clínica y destrucción ósea³⁷.

El sexo femenino es mayormente afectado por P.a., y cuando se presenta en adolescentes, éstos exhiben defectos primarios en la capacidad quimiotáctica y fagocítica de los neutrófilos³⁸. Tinoco

y col. (1998)³⁹, propusieron una prevalencia de Periodontitis Juvenil Localizada (P JL) en un rango de 0,1 a 1,0 % en países industrializados y un rango de 0,3 a 8,0 % en países del tercer mundo.

I.VII. Diagnóstico clínico de la Enfermedad periodontal:

El diagnóstico de enfermedad periodontal se logra a través del reconocimiento de distintos signos y síntomas en los tejidos periodontales, mediante los cuales se establece si hay enfermedad, se determina la clase de periodontitis, su severidad y distribución. A la inspección clínica, pueden acompañar estudios radiológicos, de anamnesis y de laboratorio⁴⁰ En primera instancia, se realiza una evaluación general del estado del paciente y luego se efectúa una revisión de la cavidad bucal. Se evalúa la higiene bucal con el registro del índice de O'Leary, los olores bucales, y el estado de los tejidos tanto duros como blandos. Se examina la movilidad de las piezas dentarias y se procede al examen del periodonto. Se explora la presencia de biofilm y cálculos, el estado gingival, y la presencia de bolsas periodontales, así como la potencial pérdida de inserción clínica.

En presencia de enfermedad, la encía se observa engrosada, de color rojo azulado, lisa y brillante, y puede aparecer hemorragia o supuración como respuesta a la palpación. La bolsa, es el ... "surco gingival profundizado" ...⁴¹, en caso de profundización progresiva, se destruyen los tejidos de soporte, se produce movilidad dentaria y eventualmente podría perderse la pieza, refiriendo el paciente dolor localizado. Se reconoce una bolsa periodontal con el sondeo cuidadoso del surco gingival alrededor de la pieza dentaria. La profundidad de sondeo determina la profundidad de la bolsa, que es la distancia entre la base de la bolsa y el margen gingival. Generalmente cuando se produce hemorragia, ésta indica períodos de actividad o exacerbación en los que, por presencia de bacterias, se destruyen tejido conectivo y hueso⁴¹.

El diagnóstico clínico genera un conocimiento orientativo hacia el daño producido, pero es insuficiente para establecer esos periodos de actividad en los que la patología avanza con destrucción de los tejidos. Para ello es necesaria la información suministrada por el diagnóstico microbiológico, a fin de instaurar un tratamiento que conduzca a la cura del paciente, superando, como logro, el solo hecho de alcanzar la inactividad.

I.VII. Microorganismos periodontopatógenos:

Las especies bacterianas que forman la biopelícula periodontopatogena interactúan con los tejidos y las células del huésped causando la liberación de una amplia variedad de citocinas, quimiocinas y mediadores inflamatorios. Entre la variada ecología microbiana subgingival, algunas especies bacterianas se asocian al desarrollo y progreso de la enfermedad periodontal: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella spp*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythensis*^{22,42}.

I.VIII. *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*):

Es considerada uno de los agentes etiológicos más importantes en la periodontitis crónica. Esta bacteria posee factores de virulencia que causan la destrucción de los tejidos periodontales, ya sea directa o indirectamente mediante la modulación de la respuesta inflamatoria⁴³. Posee un gran potencial para colonizar e invadir tejidos y es considerada una pieza clave en la transformación de la biopelícula dental benigna en una comunidad microbiana patógena al perturbar o trastornar la inmunidad del huésped y prosperar en condiciones disbióticas^{44,45}. Favorece el desarrollo de una respuesta inflamatoria crónica y contribuye con los procesos de destrucción de tejido periodontal y hueso alveolar⁴⁶. Es uno de los microorganismos patobionte¹ mejor documentados y el conocimiento actual sobre su mecanismo de infección y factores de virulencia, afirman su papel como un componente clave en la periodontitis crónica⁴⁷.

P. gingivalis es una bacteria disbiótica, anaerobia estricta, gram negativa, miembro del microbioma oral humano, agente etiológico relevante en el desarrollo de las patologías en los tejidos periodontales y sus complicaciones⁴⁸. Morfológicamente es un bacilo corto inmóvil, asacrolítico que produce colonias pigmentadas (marrón-negro) en medios de cultivo enriquecidos con sangre y suplementados con hemina y vitamina K. Tiene un requerimiento absoluto de hierro en su crecimiento. Anteriormente se llamaba *Bacteroides gingivalis* previo a su reclasificación como un nuevo género, *Porphyromonas*. El nombre *Porphyromonas* proviene de adjetivo griego *porphyreos* que significa púrpura y el sustantivo griego *monas* que significa unidad.

P. gingivalis es una especie genéticamente diversa con capacidad para intercambiar material genético extracromosómico con otras cepas por competencia natural y conjugación. Este patobionte es capaz de colonizar biopelículas ya establecidas en el surco gingival, pero a diferencia de sus vecinos comensales, *P. gingivalis* tiene la capacidad de emplear múltiples estrategias para vulnerar a largo plazo las defensas del huésped. Es un "patógeno clave", capaz de interrumpir la homeostasis huésped-microbiota por manipulación molecular de los

mecanismos inmunológicos del huésped^{49,50}. *P. gingivalis* puede beneficiar a toda la comunidad microbiana al interferir en la respuesta celular innata mediada por leucocitos polimorfonucleares y en forma simultánea sobre estimular la respuesta inflamatoria^{51,52,53}.

Según un estudio²⁵, en la microbiota de los niños y adolescentes sanos no se encuentra *P. gingivalis*, sin embargo, es un patógeno importante en la periodontitis crónica del adulto, se manifiesta como un microorganismo oportunista, encontrándose en una proporción de 40% a 100% en pacientes con bolsas profundas⁵⁰.

L.IX. Teoría del Patógeno clave o Patobionte:

Actualmente se reconoce la importancia del microbioma humano en la salud y enfermedad del huésped. En su mayor parte los mecanismos por los cuales el microbioma media la enfermedad, o favorece la salud, siguen siendo poco conocidos. La hipótesis del "patógeno clave" sostiene que ciertos patógenos microbianos pueden orquestar enfermedades inflamatorias al transformar una microbiota benigna en una disbiótica⁵⁴.

Se llama "disbiosis" a un desequilibrio en la relación entre las bacterias que conforman una comunidad microbiana, o entre el microbioma y el huésped. Esta alteración puede manifestarse en cambios cualitativos o cuantitativos o en características individuales de las especies microbianas. La disbiosis siempre resulta perjudicial para el huésped. Eventualmente también puede ser el resultado de una desregulación de la respuesta inmune.⁵⁵

P. gingivalis ha desarrollado estrategias sofisticadas para evadir los componentes del sistema inmunitario del huésped, por ejemplo, receptores tipo Toll, en lugar de actuar directamente como una bacteria proinflamatoria^{56,57}. Los receptores tipo Toll (TLR) y el Sistema del complemento son componentes del sistema inmune innato que se activan rápidamente frente a una infección. La interrelación entre los factores del complemento y los TLR conocido como "crosstalk", refuerza la actividad de la inmunidad innata o pueden disminuir la amplitud de la inflamación excesiva, a través de interacciones "sinérgicas" o "antagonistas", respectivamente. Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement George Hajishengallis and John D. Lambris

Sin embargo, este fenómeno de regulación entre el complemento y TLR es utilizado por ciertos patógenos clave como *P. gingivalis* como un medio para modificar la respuesta del hospedero de manera que favorezca la persistencia de los patógenos, inhibiendo por distintos mecanismos la producción de interleuquinas como IL-12 bioactiva. La inflamación persistente favorece la

liberación de moléculas oxidativas y radicales libres y también un aumento del flujo de líquido crevicular gingival (GCF) que conduce a un incremento de moléculas como el grupo hemo y proteínas favoreciendo la instalación de una flora disbiótica en el surco gingival con un metabolismo fundamentalmente proteolítico.

La hipótesis de que este microorganismo es un “patógeno clave” fue apoyada por un estudio reciente⁵² que utilizó un modelo animal. En este estudio se demostró que aun a niveles de colonización muy bajos (<0.01% del recuento total de bacterias), *P. gingivalis* induce periodontitis acompañada de alteraciones significativas en el número y organización de las bacterias comensales orales⁵². Estas modificaciones en la microbiota ocurren poco después de la colonización por *P. gingivalis* y precede al inicio de la reabsorción ósea mediada por la inflamación, sugiriendo que la disbiosis es probablemente la causa de la enfermedad. La participación de la microbiota comensal en la patogenia de la enfermedad se demostró porque *P. gingivalis* fracasó en periodontitis en ratones libres de gérmenes, a pesar de su capacidad para colonizar este huésped.⁵²

I.X. Factores de virulencia de *P. gingivalis*:

Este microorganismo expresa una serie de factores de virulencia como endotoxinas, lipopolisacárido, hemaglutininas, fimbrias, capsula, proteínas cisteinproteasas, proteinasas no cisteinproteasas e inductores de metaloproteinasas de la matriz, enzimas del tipo de las tripsinproteasas, colagenasa, gelatinasa, fosfolipasa A, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, aminopeptidasas y hialuronidasas.⁵⁸ También presenta variación genotípica que ocasiona una variabilidad intra-especie con la potencialidad de inducir inflamación y destrucción periodontal.

Las fimbrias son responsables de la adhesión a las células del huésped. En conjunto con las gingipainas, las fimbrias son las responsables de la hemaglutinación ocasionada por la *P. gingivalis*⁵⁹. Las fimbrias están codificadas por el gen *fimA* y le permiten la adhesión a células epiteliales y coagregación con otras bacterias.⁶⁰

A través de los procesos de conjugación y competencia natural, *P. gingivalis* tiene la capacidad de intercambiar material genético cromosómico entre distintas cepas. Se demostró que el intercambio de los genes de *fimA* genera cambios fenotípicos que incluyen aumento en la cantidad de fimbrias sintetizadas aumentando su capacidad de adhesión, lo que eleva su patogenicidad⁴⁹. Existen seis variantes de genes que codifican la unidad proteica de las fimbrias lo que da origen a 6 genotipos (I, Ib, II, III, IV y V)⁶¹. Se ha observado que la progresión de la periodontitis está estrechamente ligada a las cepas que poseen el *fimA* tipo Ib, II y IV. Las cepas

fimA tipo I y V se detectan mayoritariamente en pacientes adultos sanos⁶². Las cisteinproteasas le permiten degradar los componentes de la matriz extracelular⁶³. El LPS es un componente de la pared celular de bacterias Gram negativas, constituido por el antígeno O y lípido A, siendo este último conocido como endotoxina, capaz de desencadenar la producción de mediadores inflamatorios. El lípido A puede comportarse como agonista o como antagonista de la activación de los receptores Tipo Toll-4, alterando así el equilibrio de los mediadores de esta respuesta inmunológica⁶⁴.

El polisacárido capsular (PSC), que media la adherencia entre especies, interviene en la evasión del sistema inmune del hospedero y reduce la respuesta pro-inflamatoria. Las cepas que poseen capsula son más resistentes a la fagocitosis, estimulan débilmente la vía alterna del complemento y son invasivas mientras que las no capsuladas causan abscesos localizados. En función a la respuesta serológica inducida por la capsula de *P. gingivalis* se han descrito 6 serotipos capsulares (K) diferentes, denominados K1, K2, K3, K4, K5 y K6, recientemente se ha sugerido un séptimo serotipo (K7) por R. E. Schifferle a través de una comunicación personal⁶⁵. Existen evidencias de que el polisacárido capsular de *P. gingivalis*, serotipo K5 posibilita la coagregación entre *P. gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*⁶⁶.

P. gingivalis es el único patógeno humano que expresa una enzima con actividad de amino-deiminasa (PAD), capaz de citrulinar proteínas humanas. Esta enzima es considerada un factor de virulencia ya que la citrulina, aminoácido no proteico, inhibe la actividad del C5a evitando de esta manera la lisis celular mediada por complemento⁶⁷. Estudios recientes demuestran que la citrulinación bacteriana endógena es un fenómeno particular que ocurre solo en presencia de *P. gingivalis* y no en presencia de ninguna otra bacteria presente en la cavidad oral⁶⁸

I.XI-Evasión del sistema Inmune:

P. gingivalis tiene la capacidad de invadir una variedad de células del huésped, incluyendo queratinocitos orales y células epiteliales. Esta estrategia le confiere la capacidad de supervivencia y de protección de los mecanismos de defensa del huésped. Su persistencia en un sitio de infección, da como resultado inflamación crónica. Desarrolla un sofisticado programa de tácticas para evadir varios puntos de control del sistema inmune innato. Esta bacteria, es exquisitamente resistente a la destrucción por el estallido respiratorio⁶⁹ y posee mecanismos de protección para superar el estrés oxidativo generado por la liberación o desgranulación de neutrófilos y la presencia de especies reactivas al oxígeno. Los neutrófilos deben recurrir a medios no oxidativos en un esfuerzo por controlar la infección por *P. gingivalis*.

Las proteasas de *P. gingivalis* tienen una enorme capacidad virulenta ya que actúan sobre diferentes sustratos de la matriz extracelular como colágeno, elastina, fibrinógeno, ácido hialurónico⁷⁰. Las serín y cisteín proteasas, las dos principales clases de proteasas, degradan caseína, gelatina, fibronectina, lisozima, colágeno tipo I, II, III y IV, factores del complemento C3, C4, C5, C5a, albúmina, hemopepsina, haptoglobina, transferrina, alfa-1-antitripsina, alfa-2-antiplasmina, alfa-2- microglobulina y antitrombina y además degradan inmunoglobulinas del hospedero⁷¹

I.XII. Repercusión de *P. gingivalis* a nivel sistémico:

Por medio de diversos factores de virulencia estructurales y de secreción, *P. gingivalis* induce reacciones adversas con repercusión a nivel sistémico e incluso puede generar o exacerbar procesos inflamatorios crónicos afectando no solamente a la salud oral, sino también la salud general del huésped. Este microorganismo está implicado en enfermedades sistémicas, como la aterosclerosis, la neumonía por aspiración, parto prematuro y nacimientos de bajo peso, la artritis reumatoide, diabetes mellitus, entre otras^{72,73,74}. Al ingresar al torrente circulatorio a través del epitelio inflamado de la bolsa periodontal, se convierte en un potente agente trombogénico porque induce adhesión y agregación plaquetaria por mimetismo de los sitios de unión al colágeno tipo I y III⁷⁵. *P. gingivalis* induce un aumento del fibrinógeno en el plasma y una elevación en el recuento de glóbulos blancos, en los niveles de proteína C reactiva y aumento de viscosidad de la sangre^{76,77}. La proteína C reactiva es una molécula que interviene directamente en el proceso aterogénico, desde las fases tempranas de formación de las placas de ateroma hasta la fase final de complicación y trombosis^{77,78}

Algunos microorganismos de la cavidad oral podrían llegar a los pulmones por aspiración. Se han reportado casos de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y alteraciones periodontales, en las cuales se ha identificado la presencia de *P. gingivalis*⁷⁹.

Los lipopolisacáridos y endotoxinas son capaces de estimular la producción de citoquinas y una serie de mediadores pro-inflamatorios, PGE₂ y FNT- alfa, que se convierten en un factor de riesgo para el nacimiento de niños con bajo peso y suponen un riesgo para la unidad feto-placentaria⁷⁹.

La teoría más fuerte que sostiene la relación entre *P. gingivalis* y artritis reumatoidea (AR), es el hecho que *P. gingivalis* expresa su propia y única enzima PPAD (*Porphyromonas peptidylarginine deiminase*) que no está relacionada genéticamente con las PAD eucarióticas. Esta enzima tiene actividad de “amino deaminasa” capaz de citrulinar proteínas humanas. La citrulinación es una modificación postraduccional que ocurre en organismos superiores y consiste

en eliminación de argininas en proteínas y péptidos. Ocurre en procesos fisiológicos, pero también en patologías como esclerosis múltiples, fibrosis, enfermedad de Alzheimer y artritis reumatoide⁸⁰. La reacción es catalizada por peptidilarginina-deimininasas (PAD), que se encuentran en los vertebrados, pero no en los organismos inferiores. Este proceso da origen a anticuerpos anti péptidos citrulinados (ACPA), los cuales son inmunoglobulinas altamente específicas para el diagnóstico de la AR y son marcadores en pronóstico y progresión de la enfermedad.⁷⁴

En un estudio de Makiura et al⁸¹, que tuvo como objetivo evaluar la relación entre la glucemia y la alteración del perfil microbiano subgingival después del tratamiento periodontal no quirúrgico en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2), se constató que las condiciones periodontales se mejoraron significativamente después del tratamiento y las tasas de ocurrencia de especies bacterianas periodontales, incluyendo *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola* y *Prevotella intermedia*, también se redujeron. Aunque, *P. gingivalis* fue detectada con mayor frecuencia en individuos con valores aumentados de HbA1c después del tratamiento periodontal que en aquellos con valores reducidos de HbA1c, los resultados sugieren que el nivel glucémico en la DM se ve afectado por la persistencia particularmente de clones *fimAII*, después del tratamiento. Otro estudio, realizado con animales, después de la inoculación con *P. gingivalis* concluyó que esta bacteria puede llevar a niveles séricos elevados de TNF- α e IL-6, comprometiendo el control glucémico⁸².

I.XII. Identificación de microorganismos periodonto patógenos:

En microbiología clínica, la identificación de los agentes patógenos es un requisito esencial para obtener un correcto diagnóstico y la aplicación posterior de un tratamiento adecuado. En la actualidad, la mayoría de las bacterias de interés clínico pueden identificarse fácilmente mediante técnicas microbiológicas convencionales, que consisten en cultivo, aislamiento y posterior identificación del agente mediante pruebas bioquímicas. Este proceso se basa fundamentalmente en las características fenotípicas. Sin embargo, existen situaciones en las cuales la identificación fenotípica resulta difícil, y lenta, como en el caso de microorganismos de cultivo fastidioso. En estas circunstancias, la identificación molecular basada en el análisis del gen que codifica el ARNr 16S para células procariotas, puede resultar una ventaja tanto en tiempo como en precisión, llegando incluso a competir con otras técnicas rápidas y eficaces, como las inmunológicas.

I.XIV-Métodos moleculares:

Las técnicas de Biología Molecular se basan en la aplicación de métodos de análisis genético para la detección e identificación de patógenos. Mediante el análisis del material genético único DNA o ARN de los microorganismos, es posible distinguir e identificar cepas con base en las diferencias de sus genotipos. Las técnicas moleculares deben ser estandarizadas para que resulten reproducibles, rápidas y seguras. La principal ventaja de esta metodología es que no utiliza microorganismos vivos y son específicas y muy sensibles⁸³

I.XV. ARNr 16S (rrs) gen diana para la identificación molecular bacteriana:

Una amplia variedad de genes ha sido utilizada como dianas moleculares en los estudios taxonómicos o de filogenia en los distintos géneros y especies constituyendo el análisis ARNr 16S el marcador inicial y en numerosas situaciones el marcador suficiente para realizar una identificación más precisa⁸⁴. Sin embargo, en otras circunstancias, la alta homología genética presente en determinados géneros bacterianos o un reciente cambio en su asignación taxonómica, no permite realizar con el ARNr 16S una identificación a nivel de especie o de géneros. En estos casos, podemos recurrir a otros genes dianas para realizar asignación de especie.

El ARNr 16S es un polirribonucleótido, codificado por el gen rrs, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de su secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla⁸⁵

Aunque existen cronómetros moleculares alternativos al ARNr 16S, hasta el momento ninguno ha conseguido desplazar su utilidad. De hecho, esta macromolécula presenta una serie de características, en base a las cuales fue considerado por Woese⁸⁶ como cronómetro molecular definitivo: Es una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales, su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, si existen cambios estos ocurren en forma muy lenta, es una molécula muy larga entonces minimiza las fluctuaciones estadísticas, la conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso y resulta relativamente fácil secuenciar por lo cual existen bases de datos amplias.

I.XVI- Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR):

Kary Mullis desarrolló este método de detección basándose en el análisis de ácidos nucleicos⁸⁷. En la actualidad, la PCR (Polimerase Chain Reaction) es la técnica de amplificación más sensible y la más satisfactoriamente utilizada en microbiología clínica, sobre todo, cuando se intenta identificar patógenos de crecimiento tedioso *in-vitro*, anaerobios estrictos, crecimiento lento, y exigencias nutricionales como *P gingivalis*.

II.OBJETIVOS E HIPOTESIS

II.I-Objetivos:

Objetivo general:

*Establecer la prevalencia de *P. gingivalis* en liquido gingival de pacientes adultos con periodontitis crónica

Objetivos específicos:

- * Detectar la presencia de *P. gingivalis* con la técnica de PCR de punto final en muestras de líquido gingival de pacientes con periodontitis crónica.
- * Evaluar la asociación entre *P. gingivalis* parámetros clínicos y la severidad de la enfermedad Periodontal
- * Comparar la prevalencia de *P. gingivalis* en con periodontitis crónica y en pacientes periodontalmente sanos

II.II-Fundamentación:

El proceso de evolución biológica es constante y las bacterias no escapan a ello por lo que han realizado una adaptación a nuevas condiciones de vida. La entidad conocida como biopelícula es una respuesta biológica de los microorganismos a la evolución de su propio medio. La cavidad oral constituye un sistema de estructuras que posibilitan la colonización de múltiples especies microbianas. Estas colonizaciones bacterianas que dan inicio a las enfermedades gingivales y periodontales, se denominan *biofilm* o biopelícula bacteriana y adquiere el nombre de supra o subgingival, de acuerdo a su ubicación con respecto al borde libre de la encía.

La Enfermedad Periodontal (EP) es una infección mixta, prevalente en adultos, causada por bacterias periodontopatógenas que conforman el *biofilm* subgingival. La EP se caracteriza por

inflamación crónica y destrucción progresiva del aparato de soporte dentario. El *biofilm* subgingival se forma por una sucesión de grupos bacterianos agrupados según Socransky¹⁵ de acuerdo al momento de aparición y afinidad. Los microorganismos *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forshytensis* y *Treponema denticola*, aparecen tardíamente cuando el nicho ecológico reúne los requisitos físicos y químicos para su desarrollo.

Porphyromonas gingivalis es un cocobacilo gramnegativo, anaerobio estricto, presenta factores de virulencia que le proveen un gran potencial para colonizar e invadir tejidos periodontales. Puede modular la respuesta inmune del huésped, desencadenar una respuesta inflamatoria crónica y colaborar con los procesos de destrucción de tejido periodontal y hueso alveolar. Este microorganismo evade al sistema inmune e interfiere en los mecanismos de la inmunidad innata. Altera el crecimiento y el desarrollo de toda la biopelícula, desencadenando un cambio destructivo en la interacción microbiana normalmente homeostática en el periodonto. La interacción entre las células del huésped y *Porphyromonas gingivalis* puede ser la crucial para la progresión de la enfermedad periodontal. Estas características permiten que se considere a esta bacteria como un “patógeno clave” en la periodontitis crónica. *Porphyromonas gingivalis* está implicada además en la exacerbación de procesos inflamatorios sistémicos crónicos y enfermedades sistémicas, como la aterosclerosis, la neumonía por aspiración, parto prematuro y nacimientos de bajo peso, la artritis reumatoide, diabetes mellitus, entre otras.

Tradicionalmente, la tipificación de los microorganismos periodontopatogenos se basó en métodos de cultivo a partir de su aislamiento, incluyendo la microscopía, criterios fenotípicos y bioquímicos. Sin embargo, estas pruebas son laboriosas y, a veces, proporcionan resultados conflictivos. Las técnicas moleculares, basadas en el análisis de ADN, se utilizan para identificar bacterias en forma directa a partir de muestras clínicas y eludir la necesidad de cultivo *In Vitro*.

La presencia de patógenos periodontales parece ser diferente en sujetos de diferente origen étnico y los factores geográficos también pueden influir en la distribución de estas especies. Las discrepancias encontradas en los estudios de prevalencia de distintas localidades geográficas se han explicado por diferencias étnicas y de hábitos y costumbres.

En nuestra región e igualmente en nuestro país, los datos científicos en referencia a la etiología y rol de las bacterias responsables de la enfermedad periodontal son escasos. Esta deficiencia puede basarse en la falta de registros clínicos y epidemiológicos adecuados, a lo cual se suman los hechos que la periodontitis sólo se diagnostica clínicamente, y no está instalada la cultura del estudio microbiológico. Por esta razón se propone como eje de este plan de trabajo la detección de *Porphyromonas gingivalis*, por PCR, en pacientes con enfermedad periodontal de la ciudad de Corrientes.

II.III-Hipótesis:

“En pacientes adultos con periodontitis crónica es posible detectar *P. gingivalis* en líquido crevicular”

“La presencia de *P. gingivalis* en pacientes adultos con periodontitis crónica se relaciona con la severidad de la enfermedad periodontal”

III.MATERIAL Y METODO

III.I-Tipo de estudio:

Este es un estudio es de tipo descriptivo trasversal, que se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigaciones Científicas de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional del Nordeste.

Consideraciones éticas:

El protocolo de este proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional del Nordeste de acuerdo a los principios de Helsinki⁸⁸. Cada participante fue informado sobre su participación en el proyecto y firmó el Consentimiento informado aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional del Nordeste. Resolucion:245/16 C.D

III.II-Población:

Participaron en este estudio 45 pacientes de ambos sexos sistémicamente saludables con edades entre 35 y 65 años que asistieron al Módulo de Patología y Diagnóstico III de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional del Nordeste. Todos los pacientes fueron diagnosticados clínicamente con periodontitis crónica de acuerdo con la American Association Periodontology (AAP), 1999²³.

Como grupo control, se incluyeron en el proyecto 20 pacientes de ambos sexos sin enfermedad periodontal y sin enfermedades sistémicas.

Los criterios de exclusión, para ambos grupos fueron: Embarazo, lactancia, presencia de diabetes u otra enfermedad sistémica que alterara el curso de la enfermedad periodontal, terapia periodontal en el último año y utilización de antimicrobianos en forma sistémica o tópica en los seis meses previos al examen clínico y a la toma de muestras microbiológicas.

III.III-Inspección clínica:

En la ficha odontológica periodontal se registraron datos del Índice de O'Leary; para ello, se tiñeron las superficies dentarias con un revelador de placa, se observó la presencia de biofilm bacteriano en las caras vestibular, lingual, mesial y distal sólo en la unión dentogingival. Este

índice, se obtiene hallando el porcentaje de superficies o segmentos con presencia de placa⁸⁹. Las piezas dentarias inexistentes se tacharon de la respectiva ficha.

$$IP = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de superficies teñidas o con placa}}{\text{N}^\circ \text{ total de superficies presentes en la cavidad bucal}} \times 100$$

Para la toma de muestras, se consideró la clasificación de enfermedad periodontal según lo sugerido por Escudero-Castaño y col, 2008¹⁵. Se valoraron dos de los parámetros más importantes: profundidad de sondaje y pérdida de inserción clínica, para clasificar a la periodontitis crónica. Los mismos mencionaron que a partir del World Workshop de 1999 se establecieron algunos parámetros para caracterizar la periodontitis de grado leve a moderada que se enuncian a continuación:

- ✓ la pérdida de inserción no debe superar un tercio de la longitud de la raíz,
- ✓ si el diente presentara lesión furcal, ésta no debe superar la clase I
- ✓ la profundidad de sondaje no debe ser mayor a 4 mm para lesiones leves, ni mayor a 6 mm para las moderadas, es decir, las pérdidas de inserción no deben ser superiores a 4 mm.

Para las lesiones severas o avanzadas las características a considerar son:

- ✓ una pérdida de inserción por encima de los 5 mm y superior a un tercio de la longitud radicular,
- ✓ la existencia de afectaciones furcales de grado II y/o III,
- ✓ profundidades de sondaje superiores a 6 mm.

De acuerdo con esta profundidad de bolsa, se clasificó a la periodontitis en leve (≤ 4 mm), moderada (5 - 6 mm) y severa (más 6 mm). Para medir la profundidad de sondaje se utilizó la sonda periodontal Sonda MM PC-15 COLOR-UNC (fig. 5).



Figura 5. Sonda periodontal.

Para obtener la profundidad de sondaje se introdujo la sonda en el surco gingival del sitio seleccionado como se esquematiza en la (fig. 6).

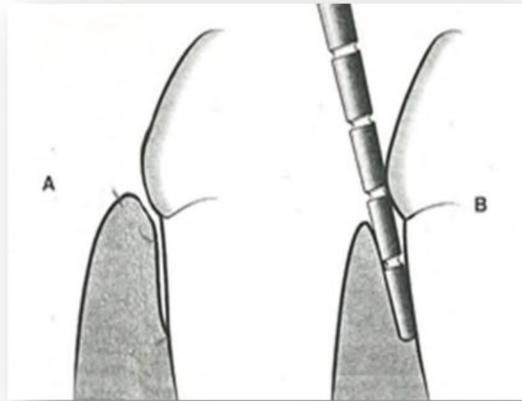


Figura 6 Profundidad biológica de la bolsa (A). Profundidad de sondaje (B).

Fuente: Itoiz y Carranza (2004).

En la (imagen 1) se presenta la maniobra ejecutada en el paciente para medir la profundidad de bolsa empleando la sonda periodontal mencionada.

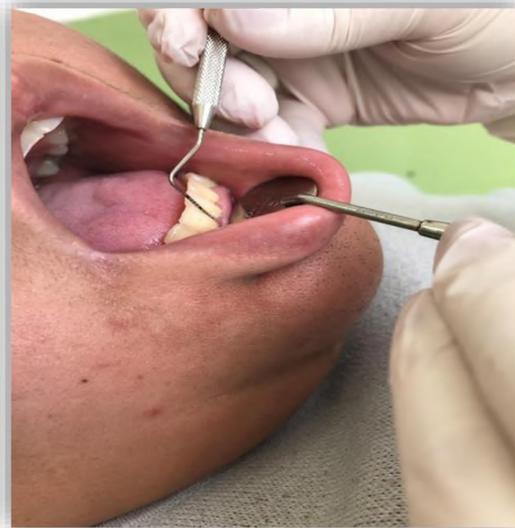


Imagen1. Sondaje de bolsas periodontales con sonda periodontal. Fuente: autor

III.IV-Obtención de las muestras:

Selección y preparación de los sitios de muestreo:

En cada paciente, se seleccionaron dos sitios de muestreo, el de mayor profundidad de sondaje uno en la arcada superior y otro en la arcada inferior. La zona se aisló con algodón y se removió la placa supra gingival con torunda de algodón estéril.

Toma y transporte de muestras para PCR:

Se introdujeron puntas de papel absorbente en el surco gingival del sitio elegido durante 60 segundos⁹⁰, (imágenes 2,3). Se transportaron luego en tubos Eppendorf bajo refrigeración almacenándose a -20 °C hasta su procesamiento, (imagen 4).

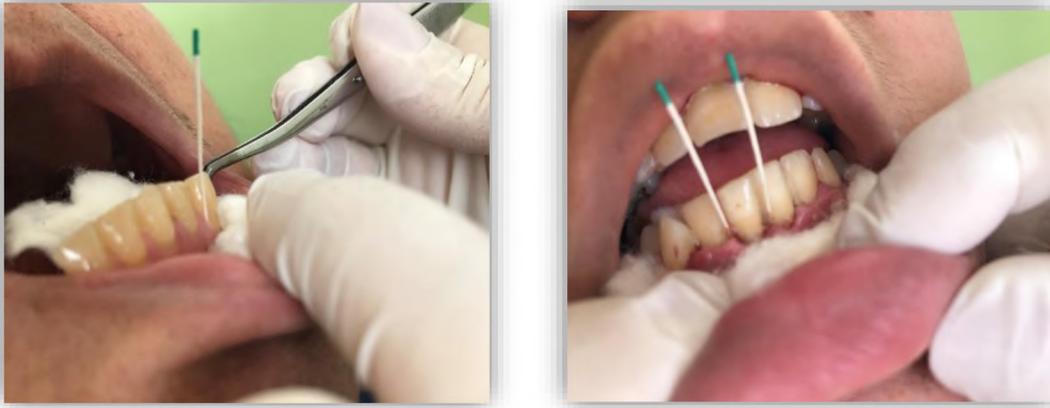


Imagen 2 y 3. Selección del sitio para la toma de muestra. Colocación del cono de papel. Fuente: autor



Imagen 4. Tubo Eppendorf en que se transportaron las muestras. Fuente: autor

III.V-Extracción de ADN de las muestras clínicas:

Se realizo la extracción de ADN utilizando el Método de Extracción con CTAB y posterior purificación con según el protocolo propuesto por Stewart et al. (1993)⁹¹

Composición de la solución de homogenización:

Para un volumen final (vf) de 150 ml: 2% (p/v) CTAB, 1,4 M NaCl, 0,2 % (p/v) β -mercaptoetanol, 20 Mm EDTA, 100 Mm Tris-HC l(pH:7,5)

A las puntas de papel con la muestra de líquido gingival, se les adicionaron una alícuota 500 μ L de solución fisiológica (NaCl 0,85 %), con la finalidad de obtener la suspensión de células bacterianas, se homogeneizaron mediante vortex (5 segundos), se extrajeron los conos de papel se centrifugaron 4 minutos (min) a 12.000 rpm y se desecharon los sobrenadantes.

A cada una de estas suspensiones celulares, se adicionaron luego 500 μ L de solución de homogenización y se incubaron en baño seco termostatzado (Bio Rad) durante 60 minutos a 60 °C, (imagen 5).



Imagen 5. Incubación en baño seco 60 minutos a 60 °C. Fuente: autor

Para purificar y separar las proteínas se agregaron 500 μ L de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se agitó vigorosamente y se centrifugó 3 min a 12.000 rpm, generándose tres fases. De la mezcla anterior, se extrajo la fase acuosa colocándola en otro tubo Eppendorf, se adicionaron 500 μ L de alcohol isopropílico frío, se agitó nuevamente y se centrifugó 10 min a 13.000 rpm eliminando el sobrenadante. El pellet se resuspendió en alcohol etílico - agua (70:30),

se homogeneizó y se centrifugó 5 minutos a 13.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar hasta la evaporación completa del alcohol y el ADN se suspendió en 20 µL de agua ultra pura.

III.VI-Cuantificación y evaluación de pureza e integridad del ADN:

Para evaluar la cantidad y calidad del ADN obtenido se utilizó el fotómetro UV Ampli-Quat, AQ-07 Nucleic Acid (imágenes 6 ,7), se midió la absorbancia a 260 nm (A260) y 280 nm (A280) para obtener el índice de pureza. Utilizando la siguiente fórmula se calculó la concentración de ADN:

$$[\text{ADN}] = A_{260 \text{ nm}} \times D \times 50 \mu\text{g/ml}$$

D= factor de dilución

El índice de pureza se calculó dividiendo la absorbancia a 260 nm entre la absorbancia a 280 nm. Un índice entre 1,7 y 1,9 está indicando una eliminación muy buena de proteínas y otros contaminantes.



Imagen 6 y 7. Medición de la cantidad y calidad de ADN por espectrofotometría. Fuente: autor

III.VII-Control Positivo:

Como control positivo de *P. gingivalis*, se utilizó la cepa de American Type Culture Collection (ATCC), *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277(Fig.10) La cepa se propago en medio agar base Columbia (Britania, Argentina); se enriquecido con sangre ovina al 5%, suplementado con hemina 5 mg/ml y Vitamina K 1 mg/ml (Sigma). Las placas se incubaron a 37° C en jarra de anaerobiosis estricta con sobres generadores (Anaero Pack, MGC, Japan) por 7 días a 37°C (imágenes 8-10)

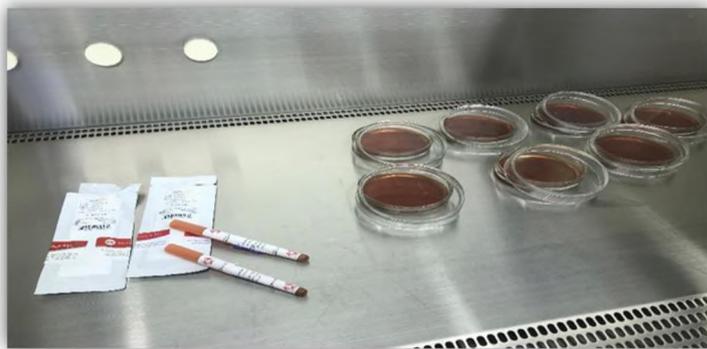


Imagen 8 y 9. Cepa de American Type Culture Collection (ATCC), *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 Fuente autor



Imagen 10. Siembra en jarra de anaerobiosis estricta de la cepa de *Porphyromonas gingivalis* en superficie en agar -sangre, en cabina de flujo laminar. Fuente: autor

Extracción ADN de la cepa control:

Para la extracción de ADN, se tomó una alícuota de 100µl de una suspensión celular al 0,5 en la escala de Mc Farland de las colonias obtenidas correspondiente a $1,5 \times 10^8$ células bacterianas/ml en suspensión ((Lennette et al., 1980; Li et al., 1993)^{92,93}, y se resuspendió en 500 µl de solución fisiológica, luego se homogeneizó en vortex durante 20 segundos. Se centrifugó 4 min, 12.000 rpm, se desechó el sobrenadante y se recuperó el pellet celular para la extracción del material genético. El ADN se extrajo empleando el protocolo que emplea Bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) de acuerdo con lo sugerido por Stewart et al. (1993)⁹¹ y, posteriormente, se purificó con cloroformo-alcohol isoamílico. El ADN extraído fue almacenado en 20 µL de agua ultra pura a -20 °C.

Visualización de la integridad del ADN:

Se comprobó la integridad del ADN extraído en una electroforesis en gel de agarosa al 1%, con solución amortiguadora 1% en buffer TBE1X de Tris-borato-EDTA teñida con GelGreen® 3X. La corrida de los ácidos nucleicos se realizó a 120 V durante 15 min. Para visualizar el ADN se utilizó un Fotodocumentador (MaestroGen, Taiwan) y los resultados se fotografiaron con una cámara digital 3700 (Nikon, Japón) para su posterior interpretación. La integridad del ADN extraído se determinó por apreciación visual.

III. VIII- Diseño y optimización de la técnica de PCR:

Selección de iniciadores: Se utilizaron iniciadores específicos para el gen que codifica una región conservada del ARNr 16S o ADN 16S (gen-housekeeping) en *Porphyromonas gingivalis*. La especificidad de los iniciadores se ensayó empleando material genético extraído de la cepa ATCC® de *Porphyromonas gingivalis* 33277™ y material genómico extraído de la cepa SARM (Staphylococcus aureus resistente a meticilina). La estrategia del ensayo se diseñó en forma simple y económica. Se utilizaron los cebadores descritos en el protocolo de PCR de acuerdo con Quintero y col (2011)⁹¹ cuya banda se visualiza a 197 pares de bases (pb). Las secuencias de cebadores utilizadas fueron:

Pg-1 F 5'-TGTAGATGACTGAAAACC-3'

Pg-2 R 5'-ACGTCATCCCCACCTTCCTC-3'

Optimización de la concentración de MgCl₂ y temperatura de alineamiento:

Para determinar la concentración de MgCl₂ y la temperatura de alineamiento óptimas, se realizó el procedimiento con diferentes concentraciones de MgCl₂ 1 mM, 1,5 mM y 2.0 mM y cada una con dos temperaturas de alineamiento: 60°C y 55°C.

Especificidad de los primers:

Para comprobar la especificidad de los primers se ensayó la PCR utilizando ADN obtenido de la cepa ATCC® de *Porphyromonas gingivalis* 33277™ y ADN de *Staphylococcus aureus* SARM (Staphylococcus aureus resistente a meticilina)

Valoración de la sensibilidad:

Para determinar el límite de detección de la técnica se preparó una suspensión bacteriana al 0,5 de Mc Farland que corresponde a $1,5 \times 10^8$ células bacterianas/ml, del cultivo de la cepa ATCC® de *Porphyromonas gingivalis* 33277™. A partir de esta suspensión se prepararon diluciones en agua ultra-pura $1,5 \times 10^6$, $1,5 \times 10^4$, $1,5 \times 10^2$ según (Amano et al 1999)⁹⁴ y se midieron por espectrofotometría UV (Ampli-Quat, AQ-07 Nucleic Acid) las concentraciones de ADN y el índice de pureza de material genómico obtenido para cada concentración. Se realizaron cada una de las mediciones por triplicado. Se corrió luego la electroforesis en gel de agarosa 1,8 % en buffer TBE1X más 3 µL de Gel Green 10,000X (Biotium, USA), en una cuba horizontal Sub Cell® GT (Biorad, China) y usando TBE 1X (Trisma base, ácido bórico, EDTA, pH 8) como buffer de corrida; se aplicaron 120 voltios durante 30 min. Como marcador de Peso Molecular se utilizó 5 µl de CienMarker, (Biodynamics, Argentina). Las bandas se visualizaron en un fotodocumentador (MaestroGen, Taiwan)

III.IX-Preparación de la mezcla de reacción:

La reacción se realizó con un volumen final de mezcla de reacción de 20 µl. Las concentraciones finales en la mezcla de reacción fueron: 1X buffer de PCR, 2 mM de MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP (Biodynamics, Argentina) 1 µM de cada primer y 2 UI Taq DNA polimerasa (Promega, Argentina).

H₂O(8µL),
Buffer de PCR 1X..... (4 µL),
MgCl₂ 2mM, (2µL)
dNTP 0,25 mM (1,5 µL)
Pg1 1µM..... (1,0 µL)
Pg2 1 µM.....(1,0µL)
2 UI Taq polimerasa ... (0,5 µL.)
Templado(2µL)

Programa de termociclado:

La secuencia de ciclado (termociclador Bio-Rad, China) consistió en 1 ciclo de desnaturalización durante 5 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 30 seg, unión del cebador a 55 °C durante 30 seg, extensión a 72 °C durante 45 seg con extensión final a 72 °C durante 10 min e incubación adicional a 4 °C.

III.X-Electroforesis en gel de agarosa:

Los productos PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa 1,8 % en buffer TBE1X más 3 µL de Gel Green 10,000X (Biotium, USA), diluido 3X en agua destilada-deionizada. Se sembraron 8 µL en cada pocillo más 1 µL de buffer de carga (60% glicerol, 0,05% azul bromofenol). Como marcador de Peso Molecular se utilizó 5 µl de CienMarker, (Biodynamics, Argentina). En una cuba horizontal Sub Cell® GT (Biorad, China) y usando TBE 1X (Trisma base, ácido bórico, EDTA, pH 8) como buffer de corrida; se aplicaron 120 voltios durante 30 min, imagen 11. Las bandas se visualizaron en un foto documentador (MaestroGen, Taiwan).

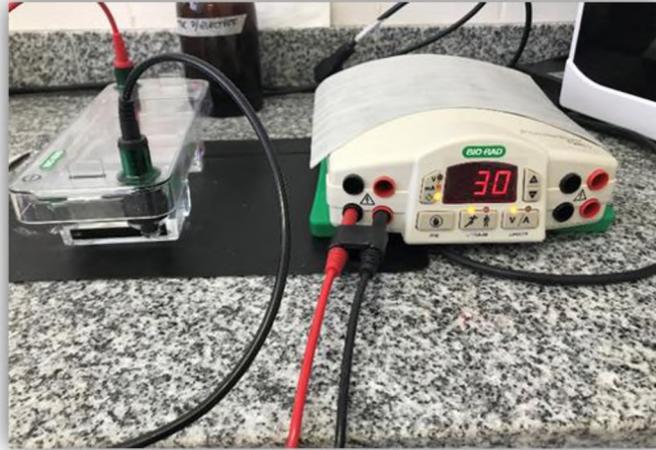


Imagen 11: Cuba de Electroforesis en gel de agarosa. Fuente: autor

III.XI-Control interno de la PCR:

Presencia de ADN bacteriano: Para comprobar la presencia de ADN bacteriano en las muestras de fluido gingival, se realizó una PCR de ARNr16S (procariotas). Para ello se utilizó los cebadores BAK4 y BAK11, empleados universalmente para la detección de ARN ribosomal 16S en procariotas.

Como mezcla de reacción de PCR se empleó: H₂O, Buffer Green 1X, MgCl₂ 25 mM, dNTPs 25 mM/dNTP (Biodynamics), cebador BAK 4 y BAK 11 (10 μM cada uno) y Taq polimerasa 2U/μL (Promega) en un volumen final de 25 μL. Como control positivo se utilizó un amplicón perteneciente a SARM (*Staphylococcus aureus* meticilina resistente) de 1529pb. Como marcador de peso molecular se utilizó un marcador visual standard llamado pGEM DNA marker y así poder detectar diferentes fragmentos de ADN cuyos tamaños alélicos fueron de 2645-1605-1198-676-517-460-396-350-222 pares de bases. Las bandas se visualizaron en gel de agarosa al 1% más 3 μL de Gel Green 10,000X con gel Green (Biotium) diluido 3X en agua destilada-deionizada. Las muestras clínicas que mostraron bandas detectables para el fragmento 1529 pb fueron incluidas en el estudio.

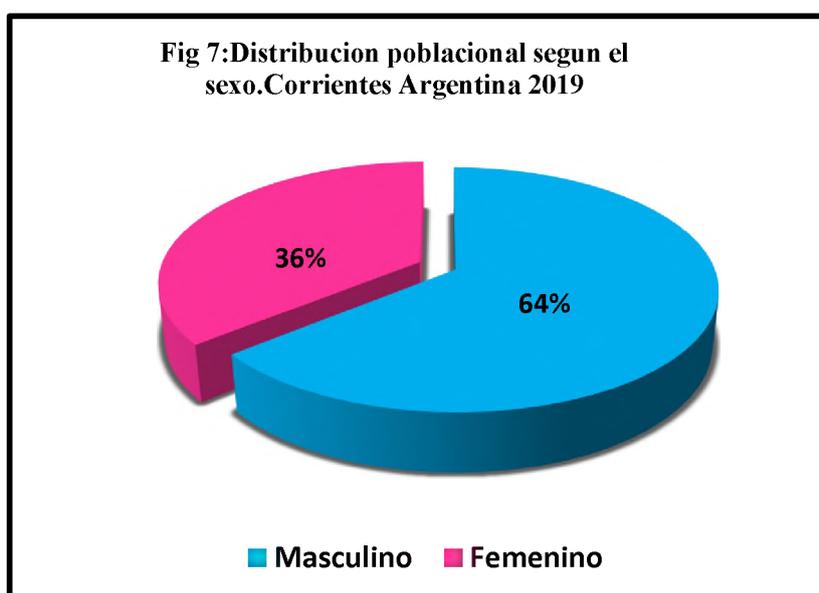
III.XII-Análisis estadístico:

InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina⁹⁵

IV. RESULTADOS

IV.I -Población:

Participaron en el trabajo 45 pacientes sistémicamente saludables, de ambos sexos, de raza blanca, con diagnóstico clínico de periodontitis crónica. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional del Nordeste. La edad promedio de los pacientes evaluados fue de $40 \pm 8,87$ años y la distribución poblacional según el sexo se muestra en la (fig. 7).



Como grupo control se incluyeron veinte sujetos, pertenecientes a ambos sexos, con edades comprendidas entre 35 y 65 años, de la misma raza, sin enfermedad periodontal y sin manifestaciones sistémicas de algún orden. El promedio de edad fue de $42 \pm 9,57$ años.

IV.II-Inspección clínica:

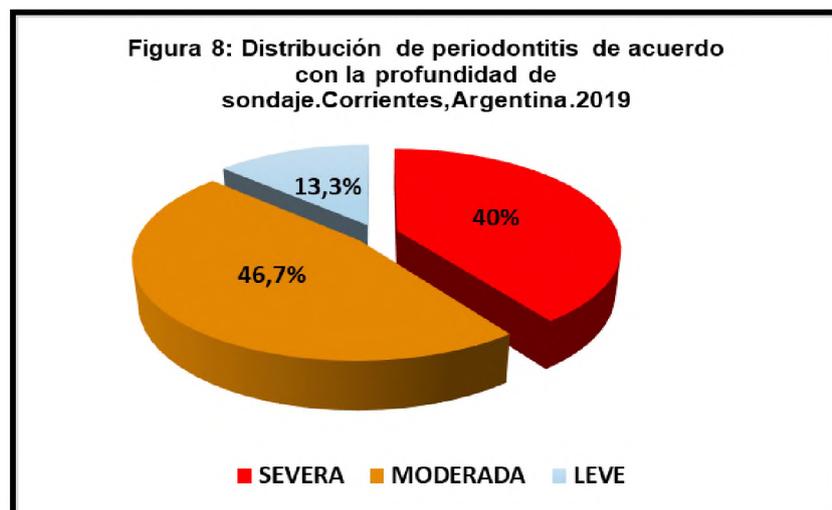
El Índice de O'Leary, que mide la presencia de placa dental, arrojó un promedio de 39,42 % en el sexo femenino y 41,90 % en el masculino.

La profundidad de sondaje, se midió en milímetros (mm) con sonda periodontal Sonda MM PC-15 Color-UNC, lo que permitió clasificar a la enfermedad periodontal crónica en leve, moderada y severa según Escudero-Castaño¹⁶. La distribución de frecuencias del grado de periodontitis en los pacientes evaluados, se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Distribución de periodontitis de acuerdo con la profundidad de sondaje. Corrientes, Argentina. 2019

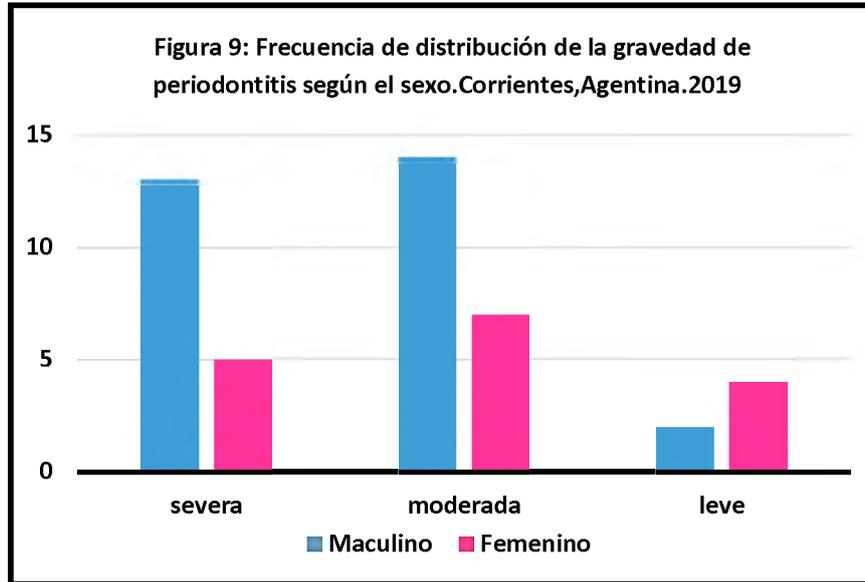
Frecuencia	Clasificación	
	(%)	Nº de pacientes
Leve	13,3	6
Moderada	46,7	21
Severa	40	18

La severidad de la periodontitis según la profundidad de sondaje, se distribuyó de acuerdo a lo que se muestra en la (fig. 8).



Se observó mayor frecuencia de periodontitis severa (72,2%) y moderada (53,2%) en pacientes de sexo masculino. La periodontitis leve se registró con mayor frecuencia en el sexo femenino (66,7%).

La severidad de la periodontitis según el sexo, se distribuyó de acuerdo con lo que se muestra en la (fig. 9).



IV.III- Reactivación de la Cepa ATCC 33277 de *Porphyromona gingivalis* :

Para la reactivación se utilizó medio de cultivo Brucella agar (Britania, Argentina) enriquecido con sangre ovina (Britania, Argentina), vitamina K y hemina en jarra de anaerobiosis. A los siete días se observó un crecimiento de colonias pigmentadas de color negro, convexas y brillantes (imagen 12).

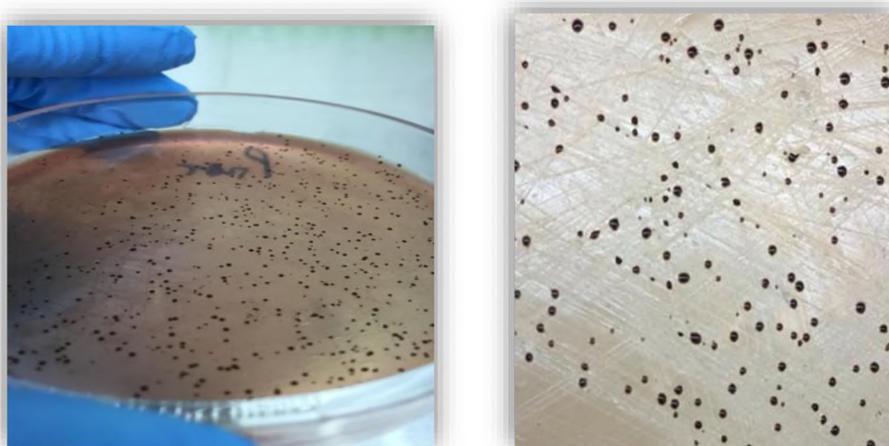


Imagen 12. Colonias negro pigmentadas en Agar-sangre. Fuente: autor

Se obtuvo una concentración promedio por espectrofotometría U.V de $1,55 \times 10^3$ ng/ul de DNA genómico a partir de una suspensión bacteriana de $1,5 \times 10^8$ células bacterianas/ml de las colonias obtenidas de la cepa ATCC. Se calculó el índice de pureza que arrojó un promedio de 1,75 relación de (OD260/OD280) en espectrofotómetro UV. Cada una de las mediciones se realizó por triplicado.

Integridad del material genético: Se comprobó la integridad del ADN extraído en una electroforesis en gel de agarosa al 1%, con solución amortiguadora 1% en buffer TBE1X de Tris-borato-EDTA teñida con GelGreen® 3X visualizado en fotodocumentador (Maestro Gen, China) obteniéndose el siguiente patrón de bandas de ADN genómico (imagen 13).

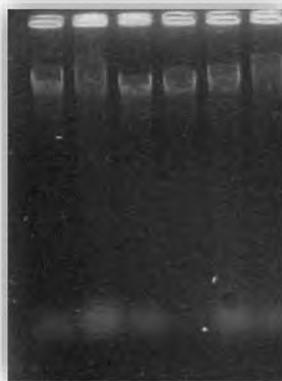


Imagen 13. Electroforesis del material genómico obtenido en gel de agarosa al 1%. Fuente: autor

IV. IV-Diseño y optimización de la técnica de PCR:

Especificidad de los Primers: La especificidad de los iniciadores se ensayó empleando material genético extraído de la cepa ATCC de *Porphyromonas gingivalis* 33277 y material genético de la cepa SARM. Se obtuvo banda de amplificación a la altura de 197 pares de bases (pb) utilizando los cebadores descritos en el protocolo de PCR de acuerdo con Quintero y col (2011)⁹² para la cepa ATCC de *P.gingivalis*, no visualizándose bandas para la cepa SARM, como se puede observar en (imagen 14).



Imagen 14. Perfil electroforético de amplicones PCR especie específica para *P.gingivalis* en gel de agarosa (1,8 %). visualizado en fotodocumentador (MaestroGen, China). Calle 1: control negativo (H_2O destilada). Calles 2 y 3: Banda coincidentes con fragmentos de 197pb pertenecientes a la Cepa ATCC 33277 de *P.gingivalis*. Calles 4, 5 y 6. Banda de amplificación no detectables cepa SARM. Calle 7: Marcador de peso molecular.Fuente autor

Optimización de la concentración de $MgCl_2$, temperatura de alineamiento y límite de detección de la prueba: Los mejores resultados se obtuvieron con una concentración de 2 mM de $MgCl_2$ a una temperatura de annealing de $55^\circ C$ y 150 ng/ μl de material genómico como templado. La reacción se realizó con un volumen final de mezcla de reacción de 20 μl . Las concentraciones finales en la mezcla de reacción fueron: 1X buffer 0,25 mM de cada dNTP (Biodynamics, Argentina) 1 μM de cada primer y 2 UI Taq DNA polimerasa (Promega, Argentina). La secuencia de ciclado: 1 ciclo de desnaturalización durante 5 min a $94^\circ C$, seguido de 35 ciclos a $94^\circ C$ durante 30 seg, unión del cebador a $55^\circ C$ durante 30 seg, extensión a $72^\circ C$ durante 45 seg con extensión final a $72^\circ C$ durante 10 min e incubación adicional a $4^\circ C$. Los resultados se visualizaron en gel de agarosa (imagen 15).

IV.V-PCR especie específica para *P.gingivalis*:

En este trabajo, se implementó la metodología de PCR en las condiciones estandarizadas y optimizadas para la detección de *P.gingivalis* en muestras de líquido crevicular obtenido con conos de papel absorbente⁹¹ del surco gingival de pacientes con periodontitis crónica, obteniéndose el siguiente perfil de bandas de amplificación (imagenes 16 y 17).

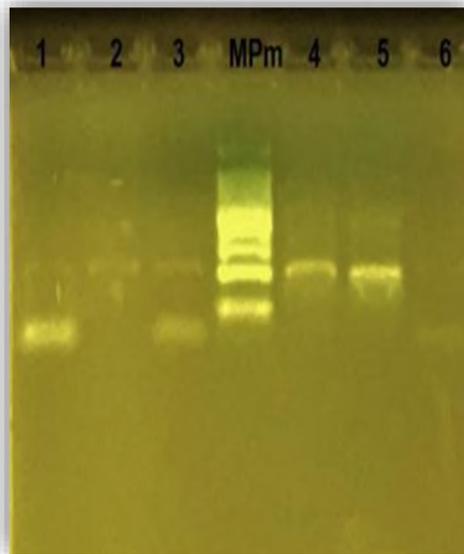


Imagen 15. Perfil electroforético de amplicones PCR especie específica para *P.gingivalis*: Calle 1: 50 ng/ μ L de templado; calle 2 y 3 : 100 ng/ μ L de templado; calles 4 y 5: 150 ng/ μ L de templado; calle 6: control negativo (H_2O destilada). Fuente: autor

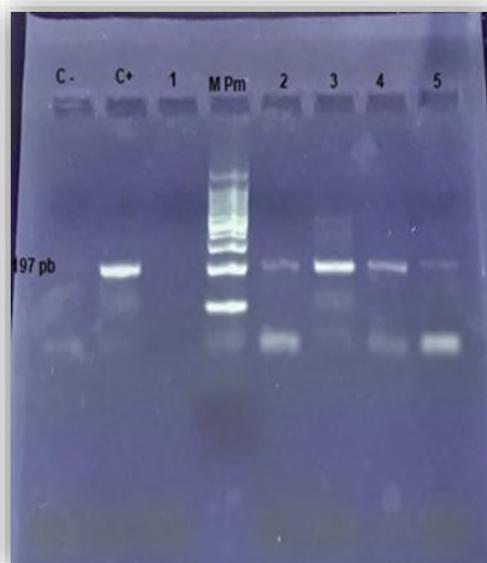


Imagen 16. Perfil electroforético de amplicones PCR especie específica para *P.gingivalis* en gel de agarosa (1,8 %), visualizado en transiluminador UV (Biorad, E.E.U.U.). C- : control negativo (H_2O destilada), C+ : control positivo cepa ATCC 33277, Mpm : Marcador de peso molecular. Calle 1: muestra clínica *P.gingivalis* no detectable, calles 2, 3, 4, 5: muestras clínicas de pacientes con fragmentos de amplificación de 197pb pertenecientes a *P.gingivalis*. Fuente: autor

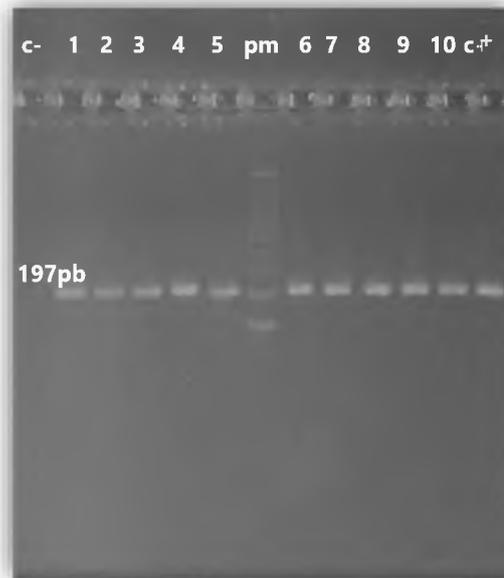
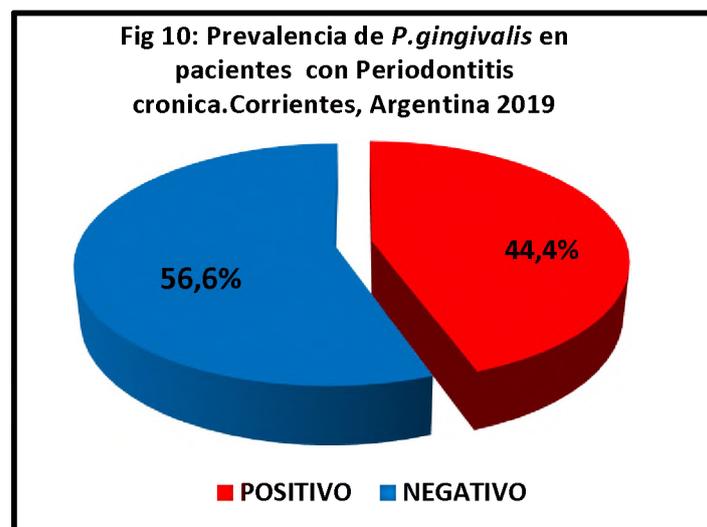
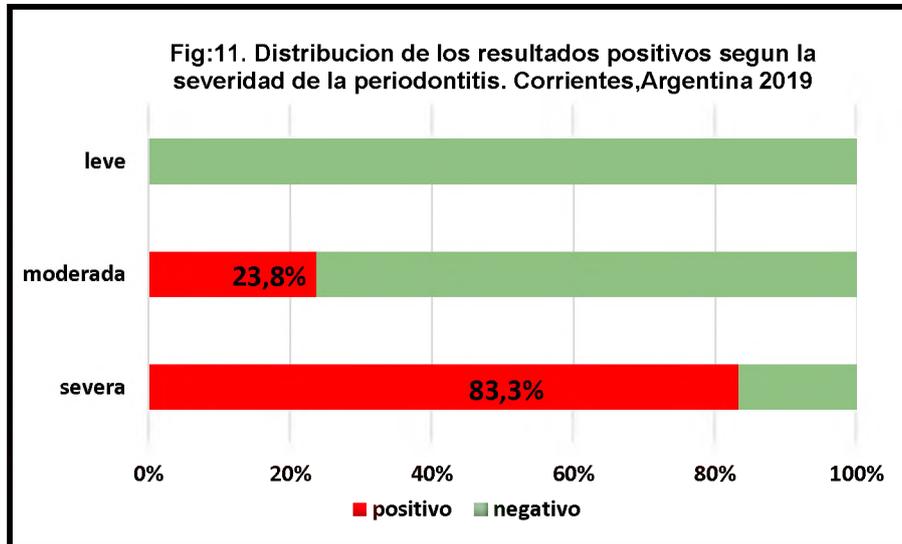


Imagen 17. Perfil electroforético de amplicones PCR especie específica para *P.gingivalis* en gel de agarosa (1,8 %) visualizado en fotodocumentador. C- : control negativo (H₂O destilada), C+ : control positivo cepa ATCC 33277, Mpm : Marcador de peso molecular. Calles 1-10: pacientes con fragmentos de amplificación de 197pb pertenecientes a *P.gingivalis*. Fuente: autor

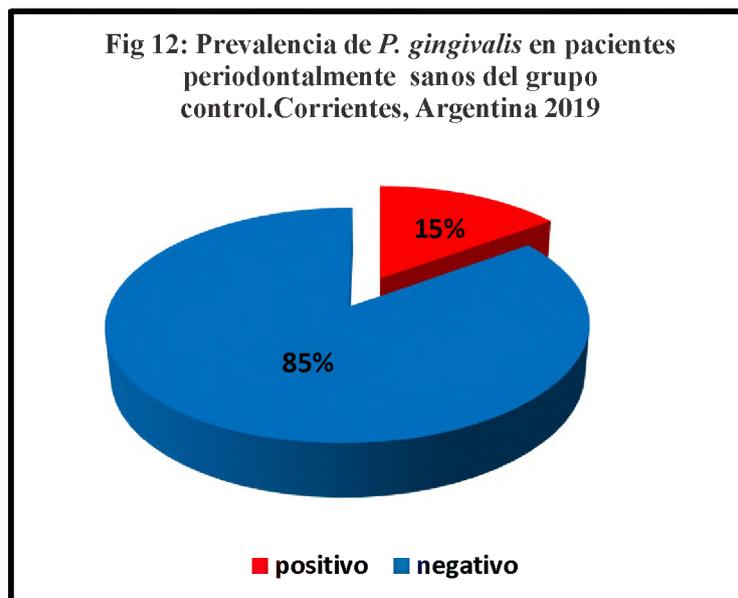
La prevalencia de *P.gingivalis* en la población estudiada fue del 44,4%.



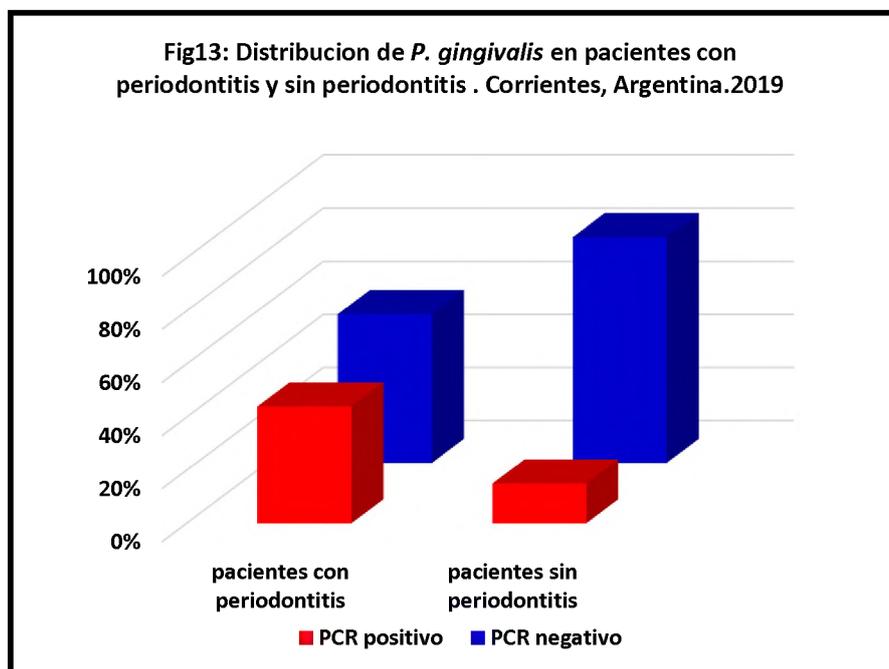
Se obtuvo mayor prevalencia de *P. gingivalis* en periodontitis severas. La distribución de prevalencia del microorganismo según los parámetros clínicos y la severidad de la enfermedad periodontal se muestra en (fig.11).



En este trabajo se incluyeron 20 pacientes sin periodontitis sistémicamente sanos como grupo control. Utilizando la metodología de PCR se detectó la presencia de *P. gingivalis* en 3 de los 20 pacientes estudiados (fig.12).



En la (fig.13) se muestra la frecuencia de *P. gingivalis* en las dos poblaciones estudiadas.



Las muestras que resultaron negativas para detección de *P. gingivalis* , se sometieron a la reacción de PCR empleando ARNr 16S. El objetivo fue detectar la presencia de ADN bacteriano y comprobar que la ausencia de bandas en el gel resultante de la reacción, no correspondía a la presencia de inhibidores o ausencia de ADN bacteriano en la muestras clínicas (imagen 18).

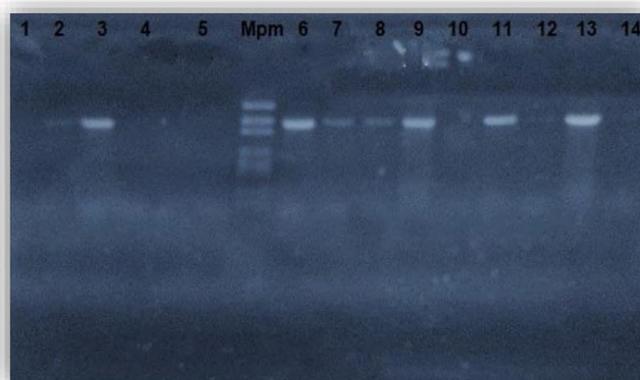


Imagen 18. Perfil electroforético en gel de agarosa (1 %). Calles 2, 3, 6,7,8,9 y 11 muestras clínicas en las cuales fue detectable el ADN bacteriano. Calles 1, 4, 5, 10 y 12 muestras en las que no se detectó ADN bacteriano. Mpm: marcador de peso molecular pGEM (pGEM DNA marcador). Calle 13: control positivo (SARM, 1529pb), calle 14: control negativo. Fuente: autor

IVVI-Analisis estadístico:

Para el análisis estadístico se utilizó el programa InfoStat versión 2014, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina⁹⁶.

Para evaluar la relación entre las variables frecuencia de detección de *P.gingivalis* y los diferentes grados de severidad se aplicó la prueba Chi Cuadrado. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el grado de severidad de la periodontitis y la presencia de *P.gingivalis* (Coeficiente de Chi Cuadrado Pearson) $p < 0,05$ ($p = 0.0002$ $\alpha = 5 \%$).Tabla 3

Tabla 3: Tabla de contingencia

PCR	Leve	moderada	severa	total
negativo	6	16	3	25
positivo	0	5	15	20
total	6	21	18	45

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	19.45	3	0.0002
Chi Cuadrado MV-G2	22.55	3	0.0001
Coef.Conting.Cramer	0.46		
Coef.Conting.Pearson	0.55		--

En los resultados correspondientes al grupo total de pacientes analizados 45 con diagnóstico de periodontitis crónica y 20 pacientes periodontalmente sanos se aplicó la prueba Chi Cuadrado para evaluar si la frecuencia de detección de *P.gingivalis*, se relacionaba con el estado de salud periodontal. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (Coeficiente de Chi Cuadrado Pearson) $p < 0,05$ ($p = 0.0219, \alpha = 5 \%$).Tabla 4

Tabla 4: Tabla de contingencia

Columna	Periodontitis	Sanos	total
negativo	25	17	42
positivo	20	3	23
Total	45	20	65

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	5,25	1	0,0219
Chi Cuadrado MV-G2	5,74	1	0,0166
Irwin-Fisher bilateral	-0.27		0.0263
Coef.Conting.Cramer	0.20		
Kappa (Cohen)	-0.28		
Coef.Conting.Pearson	0.27		

V.DISCUSIÓN:

V.I-Población:

Las enfermedades periodontales como gingivitis y periodontitis, constituyen un problema de salud pública debido a su alta prevalencia, su impacto en la calidad de vida y los altos costos que implica su tratamiento⁹⁶. Tanto la prevalencia como la gravedad de la enfermedad periodontal aumentan con la edad⁹⁷.

La periodontitis crónica, tiene su mayor expresión en la edad adulta, desde los 35 años en adelante y también puede presentarse en individuos más jóvenes, afectando tanto a hombres como mujeres. A mayor edad la extensión y severidad de la pérdida de inserción aumenta, llevando en muchos casos a la pérdida de la pieza dentaria^{98,99,100,101}

Se estudiaron en este trabajo individuos con edades comprendidas entre 35 y 65 años, hallazgos que coinciden con Bottello y col¹⁰² quien menciona que la mayor frecuencia de la enfermedad se encuentra en el rango de edad de 30-90 años y hallaron un mayor porcentaje en el género femenino que en el masculino, que difiere en nuestro caso ya que la mayor prevalencia se dio en el sexo masculino.

Aunque un estudio realizado en Estados Unidos durante los años 1988-2000 ha concluido que el género por sí solo, no tiene contribuciones sustanciales a las variaciones en la prevalencia y severidad de la periodontitis crónica¹⁰³. En este estudio se encontraron diferencias en cuanto a la severidad y la frecuencia de la enfermedad según el género. El sexo masculino presentó mayor severidad y frecuencia de periodontitis que el sexo femenino. Se observó mayor frecuencia de periodontitis severa 72,2% y moderada 52,3% en pacientes de sexo masculino. En la periodontitis leve se registró mayor frecuencia en el sexo femenino 66,7%. Bansal y col¹⁰⁴ y García-Conde y col¹⁰⁵, observaron mayor severidad de la enfermedad periodontal en hombres que en mujeres, resultados similares hallaron Sekhon y col¹⁰⁶ y reportaron mayor prevalencia de la gravedad de la enfermedad periodontal entre los hombres, esta diferencia podría atribuirse a la existencia de hábitos de higiene oral deficiente en comparación con las mujeres.

Autores como Ruggieri A. y col¹⁰⁷ sostienen que existe influencia de las hormonas en la respuesta inmunológica, y por lo tanto una diferencia en la inmunocompetencia entre hombres y mujeres, en respuesta a un estatus hormonal, genético y biológico. Mientras que otros autores

como Aljehani¹⁰⁸ sostienen que esta diferencia podría asociarse a la minuciosidad en la higiene oral que tienen las mujeres debido a su motricidad fina, lo que las ayudaría a no retener una mayor cantidad de placa bacteriana, como en el caso de los hombres.

V.II-Inspección clínica

En este estudio se clasificó a la periodontitis según la profundidad de bolsa, hallándose una distribución en la que, la periodontitis moderada alcanzó el 46,7 % y fue la más prevalente. Sin embargo, Serrano y col¹⁰⁹ hallaron una prevalencia de 63.0% de periodontitis severa, un 26% para la periodontitis moderada y solamente un 11% de periodontitis leve en una población de adultos mayores, mientras Ramírez y col¹¹⁰ encontraron una frecuencia del 43,2% de periodontitis severa en una población pacientes mayores de 35 años

Gjermo y cols²⁶ reportaron una prevalencia de 49% de periodontitis crónica en pacientes adultos en Argentina, mientras que Gamonal y cols²⁷ en Chile encontraron pérdida severa de inserción clínica de 39% en adultos jóvenes entre 35-44 años y 69% en adultos mayores entre 65-74 años.

La última encuesta de Salud Bucal¹¹¹ realizada en España, evidenció que sólo el 14,8 % de los adultos poseían las encías sanas, el 59,8 % tendría gingivitis, y el 25,4 % periodontitis. En personas de 65-74 años, sólo el 10,3 % presentaban encías sanas, el resto tendría algún tipo de enfermedad periodontal. En Colombia en un estudio retrospectivo transversal encontraron un 12,8 % de hombres y 10,2 % de mujeres presentaron con bolsas periodontales $\geq 6\text{mm}$ ¹¹²

En este trabajo, el mayor porcentaje correspondió a periodontitis moderadas, el 46,7 % de los pacientes estudiados, probablemente debido a la edad promedio de los pacientes, ya que en los pacientes con edades más avanzadas se observó mayor pérdida de inserción clínica.

En Argentina, se realizó un estudio para evaluar la necesidad de tratamiento periodontal de pacientes adultos; se estudiaron 3694 pacientes 2000 mujeres y 1494 hombres, rango de edad entre 18 y 84 años y se determinó que 14.3 % presentaban bolsas mayores a 5mm y 26.4 % una profundidad de sondaje de 3.5-5 mm¹¹³

En referencia al comportamiento de los sujetos para el control de placa bacteriana dental, se observó que el índice de O'Leary, promedio de la cantidad de placa dental presente en las caras dentales, arrojó un porcentaje mayor en hombres que en mujeres. De acuerdo con lo expresado en el capítulo de resultados, la periodontitis moderada se presentó con mayor frecuencia en ambos sexos. Resultados similares hallaron Suárez-Hernández y col¹¹⁴ al determinar el índice de higiene oral de O'Leary separados por género en una población adulta, encontraron valores menos

favorables para el sexo masculino. Esto concuerda con el estudio de Gamonal en Chile²⁷, donde se considera el género como un indicador de riesgo, debido probablemente a la escasa actitud positiva frente a la higiene en los hombres.

V. III. Detección de *P. gingivalis* por Biología Molecular:

Las técnicas de Biología Molecular en la actualidad han adquirido mucha importancia en el estudio de la salud oral. La existencia de distintos clones bacterianos en una misma especie puede manifestarse clínicamente y funcionalmente diferente y ser alguno más virulentos que otro. Por lo tanto, el análisis molecular es un pilar importante para un diagnóstico certero y un efectivo tratamiento¹¹⁵. En su mayoría, estas técnicas moleculares se basan en la obtención del material genético a partir de cultivos puros del microorganismo o de muestras provenientes de los tejidos afectados del paciente. La técnica más empleada para realizar este diagnóstico se denomina PCR (Polymerase Chain Reaction)^{88,116,117} Esta metodología utiliza oligonucleótidos complementarios a secuencias específicas de ADN, correspondientes a secuencias conservadas de los diferentes microorganismos, en calidad de cebadores. Es uno de los métodos con mayor sensibilidad además de ser relativamente simple, rápido y eficaz.

Tradicionalmente la tipificación microbiológica se basó en métodos de cultivo, aislamiento, microscopía y criterios fenotípicos y bioquímicos de identificación. Sin embargo, estas pruebas son laboriosas cuando se trabajan con microorganismos exigentes. Pueden aparecer también resultados conflictivos, lo cual puede originarse en la variación existente entre cepas de una misma especie. Frente a esta estrategia clásica, han surgido múltiples opciones moleculares.

Marsh y col¹¹⁸ en la década de los noventa, desarrollaron la “Hipótesis de la placa ecológica”, con el afán de unificar las teorías existentes que explicaban el rol de la placa dental en las patologías bucales. De acuerdo con esta teoría, tanto la cantidad total de la placa dental como la composición microbiana específica de la misma, pueden contribuir a la transición de un estado de salud a una disbiosis y enfermedad. Basándose en esta aseveración, se desarrollaron también metodologías moleculares para la co-detección de varios microorganismos en forma simultánea en una misma muestra, como la PCR-multiplex y poder comprobar que la existencia de un microorganismo, por sí mismo, no sería responsable del inicio y de la progresión de enfermedades infecciosas complejas como la enfermedad periodontal. En 1996, Tran y Rudney¹¹⁹ desarrollaron una PCR-multiplex para identificar *Agregatibacter actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* al considerar poco sensibles los métodos de cultivo para determinar la prevalencia de microorganismos periodontopatogenos en el surco gingival, para diagnóstico, plan de tratamiento y, monitoreo

del progreso de la enfermedad. Las secuencias de oligonucleótidos empleadas fueron para *A. actinomycetemcomitans* forward primer Aa F 5-ATT GGG GTT TAG CCC TGG TG-3 (*Escherichia coli* 870 a 896); *P. gingivalis* forward primer PgF, 5-TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAA ACC-3 (*E. coli* 1039 a 1063); y la porción conservada C11R 5-ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC-3 (*E. coli* 1227 a 1246), cuyos amplificadores se observaron a 197 Pb para *P. gingivalis* y 360 Pb para *A. actinomycetemcomitans*.

Teniendo en cuenta que la técnica de PCR convencional es una de las más sensibles y ampliamente utilizadas, es importante optimizarla y estandarizarla para mejorar los resultados obtenidos. Su alta sensibilidad, puede arrojar resultados falsos positivos o falsos negativos, cuando las condiciones de la prueba no se han optimizado. En el ensayo de estandarización y optimización realizado en el laboratorio de Investigaciones Científicas de la Universidad Nacional del Nordeste, los mejores amplificadores del gen ARNr 16S en *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 fueron obtenidos cuando se trabajó con una concentración de MgCl₂ de 2 mM y una temperatura de alineamiento de 55°C. Diferentes estudios^{120,121,122,123,124} de amplificación publicados en la literatura refieren en el protocolo de PCR utilizado el empleo de una temperatura de alineamiento de 60°C, mientras que otros⁹⁰ reportan una temperatura de alineamiento de 55°C.

En el presente trabajo, se evidenciaron bandas tanto a 55°C como a 60°C, obteniéndose mayor nitidez cuando se trabajó con 55°C. Teniendo en cuenta nuestros resultados y los de los trabajos previos se puede considerar que el intervalo de 55-60°C, es óptimo para la obtención de amplificadores del genoma de *P. gingivalis*. Para nuestras condiciones de trabajo la temperatura óptima de alineamiento fue de 55°C.

Con respecto a la concentración de MgCl₂, en este trabajo se probaron concentraciones de 1 mM, 1,5 mM y 2 mM para obtener la concentración óptima, identificando las bandas más nítidas con una concentración de 2 mM. Arce Paniagua y col¹²⁴, reportaron en su protocolo de trabajo una concentración de MgCl₂ 4 mM, sin embargo Carlos Martín Ardila Medina y col¹²⁵, Aline Martucci Geraldés¹²¹ y Alessandro Manuel Gandolfo Peña¹²³ utilizaron MgCl₂ en un rango de 1 mM a 2,5 mM.

El uso de PCR como metodología para la detección de *P. gingivalis* en muestras de placa subgingival en pacientes con periodontitis a nivel mundial muestra rangos de prevalencia muy variables, de 28% a 97,4%^{126,127,128,129}

En Asia^{94, 130,131,132} han informado prevalencias que varían del 60% al 95%, en Japón y en China¹³³ el 70%. En América, Rams y cols¹³⁴ observaron una prevalencia de 87% en Estados Unidos y del 78% en Brasil¹³⁵.

Quintero AJ y col⁹⁰ en Chile, realizaron un estudio descriptivo transversal de la microflora subgingival en pacientes diabéticos tipo 2 con periodontitis crónica, empleando PCR y como cebadores oligonucleótidos específicos para *P. gingivalis* Pg F: 5'-TGT AGA TGA CTG AAA ACC-3' y Pg R: 5'-ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC-3' que amplifica a 197 pb.

En el presente trabajo *P. gingivalis* fue detectado en un 44,4% de los pacientes con periodontitis crónica, este resultado coincide con los hallados por Stefony M¹³⁶ que reportó una prevalencia de 40% de *P. gingivalis* en pacientes chilenos con periodontitis crónica, por identificación mediante PCR de la subunidad 16S del RNA ribosomal (rRNA); empleó como control positivo DNA extraído de la cepa de *P. gingivalis* ATCC 49417 y como cebadores las secuencias: Pg F: 5'-AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG-3' y Pg R: 5'-ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT-3'

Farías y col¹³⁷ encontraron una prevalencia similar de 46,6 % de esta bacteria al estudiar por PCR muestras de biofilm subgingival de 29 pacientes con diagnóstico clínico y radiológico de enfermedad periodontal. Delgado y col¹³⁸ reportaron una prevalencia de *P. gingivalis* del 27,27% con un 14 % de asociación con *Treponema denticola* en pacientes con enfermedad periodontal crónica. Un estudio de Mujica Troncoso y col¹³⁹ realizado a pacientes chilenos periodontalmente enfermos, sin tratamiento periodontal previo, detectó *P. gingivalis* en un 31,3% de la población estudiada.

Sin embargo, autores como Badanian y col¹⁴⁰ analizaron una muestra de placa subgingival de pacientes uruguayos con cuadros de periodontitis crónica y hallaron una prevalencia de 85% de este microorganismo. Van Winkelhoff y col¹⁴¹ analizaron 158 pacientes con periodontitis encontrando *P. gingivalis* en 106, lo que representó una prevalencia de 67%, mientras que Herrera y cols¹⁴² en un estudio multicéntrico realizado en Chile, Colombia y España hallaron este periodontopatógeno en más del 65% del total de sujetos (37 en Chile, 41 en Colombia y 36 en España). Rojas y col en un estudio realizado en Chile con 45 sujetos con periodontitis crónica, detectó *P. gingivalis* en un 73,3%¹⁴³.

V. IV. Frecuencia de *P. ginigivalis* en relación con la severidad de la periodontitis:

En tiempos de la teoría específica, Loesche (1979)^{144,145} propuso que el origen de las enfermedades periodontales y caries se asociaba a la presencia y aumento en el número de patógenos específicos presentes en la placa dentaria

La prevalencia y la proporción de *P. gingivalis* se correlacionaron con la severidad y la pérdida de inserción clínica¹⁴⁶. En la periodontitis del adulto la prevalencia de esta bacteria es de un 40% a 100%, es el patógeno más importante y relevante en la periodontitis crónica y se encuentra en mayor proporción en las bolsas profundas⁵⁰.

Los microorganismos periodontopatógenos que pertenecen al complejo rojo de Socransky como *P. gingivalis*, se asocian con la progresión de la periodontitis y se encuentran en sacos periodontales más profundos, debido a su necesidad de anaerobiosis estricta (Faveri y cols., 2009)¹⁴⁷. Socransky y col¹³ analizaron la relación entre las bacterias presentes en la periodontitis y los parámetros clínicos, observaron que las bacterias del complejo rojo mostraban una fuerte asociación con bolsas profundas. Las razones sugeridas para tales hallazgos son los niveles más altos de anaerobiosis en sitios más profundos, es decir, tensión de oxígeno reducida, diferencias en la temperatura subgingival, requerimiento de hemina u otras sustancias y un suministro más fácil de materiales nutricionales del líquido crevicular gingival.

Los pacientes portadores de *P. gingivalis*, presentaban mayor profundidad de bolsa al sondaje y también mostraron sangrado al sondaje. *Porphyromonas Gingivalis* frecuentemente es aislada de lesiones periodontales activas, y ha sido correlacionada con el progreso de la enfermedad periodontal¹⁴⁸. George Hajishengallis y col⁵² propusieron la “hipótesis de patógenos Keystone”. Esta hipótesis plantea que algunos microorganismos como *P. gingivalis* aun en bajo número pueden predisponer al desarrollo enfermedades inflamatorias por propiciar disbiosis y cambios en la composición de la microbiota normal. Pese a ser un miembro natural de la ecología oral, aun encontrándose en pacientes sanos, es altamente destructiva, debidos a sus numerosos factores de virulencia¹⁴⁹. La correlación de los resultados microbiológicos con los datos clínicos demuestra la importancia de *P. gingivalis* en la etiología y progresión de la periodontitis crónica. En este trabajo se observó un aumento de la prevalencia de esta bacteria en relación al aumento de la severidad de la periodontitis, se obtuvo una prevalencia de 83,3% en periodontitis severas, un 23,8% en moderadas no se detectó la bacteria en periodontitis leve. Asimismo, Kulkarni, y col¹⁵⁰ informaron un aumento significativo de la prevalencia de *P. gingivalis* en bolsas profundas, en un estudio donde se identificó *Porphyromonas gingivalis* en pacientes con periodontitis crónica por PCR y su presencia se correlacionada con la severidad de los parámetros periodontales clínicos, 93.33% en bolsas > 5mm y 60 % en bolsas < 5mm de profundidad, estos resultados concuerdan con los hallazgos de Slots¹⁵¹ y Takeuchi et al¹⁵² quienes hallaron una fuerte asociación positiva de presencia de *P. gingivalis* el grado de pérdida de inserción periodontal.

Rojas y col¹⁴³ relacionaron la distribución de esta bacteria y los grupos con diferentes grados de severidad de periodontitis crónica observándose que *P. gingivalis* estuvo presente en un 46,6%,

73,3% y 100% en sujetos con las formas leve, moderada y severa de la enfermedad respectivamente.

Bazzano y col¹⁵³ evaluaron la composición microbiológica y los parámetros clínicos de bolsas periodontales ≥ 5 mm y encontraron como especie más prevalente a *P. gingivalis*, presente en 66% de los sitios. Sin embargo, Corona y col¹⁵⁴ en un estudio que incluyó a 80 pacientes detectaron por PCR una prevalencia de esta bacteria de 43,3 % en periodontitis moderada y 20% en periodontitis severa. También Kumawat, R. M y col¹⁵⁵ detectaron *P. gingivalis* con más frecuencia en sitios que mostraron bolsas periodontales profundas y pérdida severa de inserción y aumento de la gravedad de la inflamación gingival en pacientes con Periodontitis crónica.

A pesar de que *P. gingivalis* es considerada una de las bacterias más relacionadas con la enfermedad periodontal, no aparece exclusivamente en pacientes con dicha enfermedad, sino que también está presente en la placa subgingival de pacientes periodontalmente sanos, aunque en un porcentaje menor en un rango 23 a 36,6%¹⁵⁶

El nicho ecológico de *P. gingivalis* es el surco subgingival, aunque se puede encontrar de manera ocasional también en mucosas orales y en saliva. El hecho de que pueda estar presente en bolsas periodontales activas y en surcos gingivales sanos sugiere que es una especie heterogénea con subpoblaciones de elevada y baja patogenicidad. *P. gingivalis* se considera comensal de la cavidad bucal⁵². Este anaerobio gramnegativo también puede existir dentro de las células epiteliales del huésped sin la existencia de una enfermedad manifiesta. *P. gingivalis* parece ser un patógeno altamente adaptado del microbioma oral¹⁵⁷. Bascones y col.⁵⁰ también consideraron su presencia en un rango de 16% a 23 %, en pacientes sin periodontitis.

En este estudio el grupo de pacientes sistémicamente saludables sin enfermedad periodontal presentó una frecuencia de *P. gingivalis* del 15%. Asimismo, Corona y col¹⁵⁴ en una población de 30 pacientes periodontal y sistémicamente sanos encontraron una frecuencia de 16,6 %. Otros autores^{158,155} hallaron entre un 23 % y un 10% en pacientes sin enfermedad periodontal.

Considerando que *P. gingivalis* tiene vital importancia en el inicio y progresión de la disbiosis en el surco gingival, en un análisis metatranscriptómico longitudinal de las comunidades microbianas de sitios estables, se demostró que, entre las bacterias comúnmente asociadas con periodontitis pertenecientes al complejo rojo, sólo *P. gingivalis* expresó factores de virulencia en sitios sanos que progresaron luego a enfermedad. Por el contrario, la expresión de los genes de virulencia de *T. denticola* y *Tannerella forsythia* se sobre-expresaron posteriormente, cuando clínicamente se evidenciaban daños en los tejidos.¹⁵⁹

La presencia de *P. gingivalis* es probablemente un factor de riesgo importante para el inicio de la periodontitis. Aún en estado de salud y eubiosis, actúa como un patógeno clave que contribuye

a la instalación de un proceso disbiótico, mientras que otros patógenos periodontales pueden contribuir a la virulencia de la comunidad microbiana una vez que se interrumpe la homeostasis.⁵⁵

El análisis genético detallado de las bacterias ha demostrado una diversidad genética inesperada dentro de las especies, que a menudo revela linajes evolutivos que están asociados de manera desproporcionada con la infección. Hay evidencia de que algunos linajes evolutivos de bacterias se han adaptado a grupos étnicos particulares¹⁶⁰.

Por esta razón las diferencias entre los resultados de la literatura recién presentados y los obtenidos en este estudio, en relación a frecuencia de detección de *P. gingivalis* en líquido gingival, se podrían explicar por diferencias geográficas y étnicas^{161,162} así como el uso de distintas metodologías de obtención de muestras microbiológicas, métodos de procesamiento y tamaño de la muestra estudiada.

Actualmente la hipótesis sobre la “sinergia polimicrobiana y la disbiosis” explica el origen de muchas enfermedades entre ellas la enfermedad periodontal. Este modelo plantea que dicha enfermedad no sería iniciada por bacterias patógenas en forma individual sino por una “comunidad polimicrobiana sinérgica”¹⁶³.

P. gingivalis integra el “grupo rojo” junto a *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia*, los microorganismos de este grupo con frecuencia se aíslan juntos y están fuertemente asociados con sitios activos de enfermedad, así como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*¹⁶³. Otro microorganismo clave en la formación de la placa subgingival es *Fusobacterium nucleatum*, actúa como un “puente” microbiano entre los colonizadores tempranos y los colonizadores tardíos durante la formación de la biopelícula, asimismo la interacción de *Treponema denticola* y *Fusobacterium nucleatum* con *Porphyromonas gingivalis* mejoraría la unión de esta última a células del hospedero^{164,165,166}

Dado que la distribución de los patógenos periodontales difiere en relación a la ubicación geográfica y al grupo racial y étnico^{161,162} y puesto que los datos científicos en referencia a la etiología y rol de las bacterias responsables de la enfermedad periodontal en nuestra región son aún muy escasos, en el futuro la co- detección de estos microorganismos periodontopatogénicos en nuestra población ampliaría la evidencia obtenida en esta investigación aportando más información relevante sobre este consorcio microbiano.

CONCLUSIONES

- En la población estudiada la edad promedio de los pacientes fue de 40 años y la periodontitis prevaleció en el sexo masculino.
- Se observó mayor frecuencia de periodontitis moderada, la periodontitis severa fue más prevalente en el sexo masculino y en el sexo femenino predominó la periodontitis leve.
- La prevalencia de *P. gingivalis* detectado por PCR en periodontitis crónica fue del 44,4% y se observó un aumento de la prevalencia de *P. gingivalis* en relación a la severidad de la periodontitis encontrándose la mayor prevalencia en periodontitis severas.
- Se observó una prevalencia de *P. gingivalis* del 15% en pacientes periodontalmente sanos.
- El hecho de que *P. gingivalis* pueda estar presente en bolsas periodontales activas y en surcos gingivales sanos sugiere que es una especie heterogénea con subpoblaciones de elevada y baja patogenicidad.

INVESTIGACIONES FUTURAS

- La genotipificación de *P. gingivalis* permitiría determinar diferentes perfiles bacterianos y su probable asociación con el grado de virulencia de este microorganismo.
- Es un “patógeno clave” altamente adaptado del microbioma oral puesto que puede modificar también su expresión génica y también el patrón de expresión de los otros microorganismos en el biofilm.
- La identificación de especies clave en la ecología microbiana puede tener importantes implicaciones en términos de una mejor comprensión de la estructura de las comunidades microbianas y su interacción con sus huéspedes o su entorno.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- 1- Moreno del Castillo, M. C., Valladares-García, J., & Halabe-Cherem, J. Microbioma humano. Revista de la Facultad de Medicina UNAM, 2018 ;61(6):7-19. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2018/un186b.pdf>
- 2-Kilian, M., Chapple, I. L. C., Hannig, M., Marsh, P. D., Meuric, V., Pedersen, A. M. L. The oral microbiome—an update for oral healthcare professionals. British Dental Journal, 2016; 221(10): 657. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/sj.bdj.2016.865.pdf>
- 3-Krajmalnik-Brown, R., Ilhan, Z. E., Kang, D. W., & DiBaise, J. K. Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation. Nutrition in Clinical Practice, 2012; 27(2): 201-214. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3601187/pdf/nihms445274.pdf>
- 4-Relman, D. A. The human microbiome and the future practice of medicine. Jama, 2015; 314(11): 1127-1128. Disponible en: <https://fcsanahuac.files.wordpress.com/2016/12/the-human-microbiome-and-the-future-practice-of-medicine.pdf>
- 5-Marsh PD, Do T, Beighton D, Devine DA. Influence of saliva on the oral microbiota. Periodontol 2000. 2016; 70:80–92.
- 6-López-López J, Jané Salas E, Chimenos Küstner E. Pronóstico y tratamiento de la boca seca. Revisión sistemática. Med Clin (Barc). 2014; 142:119–24. Disponible en: <http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/53923/4/630870.pdf>
- 7-Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002; 15:167–93. Disponible en: <https://cmr.asm.org/content/cmr/15/2/167.full.pdf>
- 8- Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O. The oral microbiota: living with a permanent guest. DNA Cell Biol. 2009; 28(8):405–411. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2768665/pdf/dna.2009.0874.pdf>
- 9- Devine DA, Marsh PD, Meade J. Modulation of host responses by oral comensal bacteria. J Oral Microbiol. 2015; 7:26941. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3402/iom.v7.26941>
- 10- Takahashi N. Oral Microbiome Metabolism: From "Who Are They?" to "What Are They Doing?" J Dent Res. 2015; 94(12):1628-37

- 11-He J, Li Y, Cao Y, Xue J, Zhou X. The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. *Folia Microbiol (Praha)*. 2015;60(1):69-80
- 12-Chinchilla Hidalgo, M. J., Díaz Castro, S., Fong Xiao, C., González Villalobos, C., & Hernández Brenes, M. F. Planteamiento de un protocolo para el análisis microbiológico en fluido crevicular y saliva. Costa Rica. Facultad de Odontología. 2017. Disponible en: <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/6110/1/42469.pdf>
- 13-Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25 (2):134-44
- 14-Rupani D, Izano E, Schreiner H, Fine D, Kaplan J. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype f O-polysaccharide mediates coaggregation with *Fusobacterium nucleatum* Oral Microbiol Immunol 2008, 23(2):127-130.
- 15- Liébana J, Castillo AM, Álvarez M. Enfermedades periodontales: consideraciones microbiológicas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2004; 9:S75-91. Disponible en: URL: http://www.medicinaoral.com/pubmed/medoralv9suppl_i_p82.pdf
- 16- Escudero-Castaño N, Perea-García MA, Bascones-Martínez A. Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación clínica. *Av Periodon Implantol* 2008; 20(1):27-37 Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1699-65852008000100003&script=sci_arttext
- 17-Highfield J. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Australian Dental J* 2009; 54:11–26. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1834-7819.2009.01140.x>
- 18- Lindhe J, Karring T, Lang N. *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. 4ª ed. Buenos Aires: Panamericana. 2005
- 19- Itoiz ME, Carranza F. La encía. En: Newman M, editor. Carranza. Newman M, Takei H, Carranza F. *Periodontología clínica* 9na ed. México: Mc-Graw Hill Interamericana; 2004:16-37.
- 20- Needelman I. Envejecimiento y periodonto. En: Newman M, editor. Carranza. Newman M, Takei H, Carranza F. *Periodontología clínica*. 9 ed. México: Mc-Graw Hill Interamericana. 2004:59-63
- 21- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *Journal of periodontology*, 1992; 63: 322-331.
- 22-Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000 ,2005; 38: 135-187

- 23- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4:1–6 Disponible en: <http://www.ioponline.org/doi/pdf/10.../annals.1999.4.1.1>
- 24- González Díaz ME, Toledo Pimentel B, Nazco Ríos C. Enfermedad periodontal y factores locales y sistémicos asociados. *Rev Cubana Estomatol* 2002; 39(3):374-395. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072002000300006&lng=es
- 25-Eke P, Dye B, Wei L, Thornton-Evans G, Genco R . Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res* .2012;91(10):914-920.Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034512457373>
- 26-Gjermeo P, Rösing C, Susin C, Oppermann R. Periodontal diseases in Central and South America.*Periodontol* 2000. 2002; 29:70-78.
- 27-Gamonal J, Mendoza C, Espinoza I, Muñoz A, Urzúa I, Aranda W et al. Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *J Periodontol*.210;81:1403-1410. Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/123368/iop.2010.pdf?sequence=1>
- 28-Papapanou PN, Sanz M, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45(Suppl 20):162–170.Disponible en: <https://aap.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/JPER.17-0721>
- 29-Herrera D, Retamal-Valdes B, Alonso B, Feres M. Acute periodontal lesions (periodontal abscesses and necrotizing periodontal diseases) and endo-periodontal lesions. *J Clin Periodontol*. 2018; 45 (Suppl20):78–94. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jcpe.12941>
- 30-Albandar JM, Susin C, Hughes FJ. Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: case definitions and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol*. 2018;45(Suppl 20):171–189. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jcpe.12947>
- 31- Needleman I, Garcia R, Gkraniias N, et al. Mean annual attachment, bone level and tooth loss: A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2018;45(Suppl 20):S112–S129.Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jcpe.12943>
- 32-Fine DH, Patil AG, Loos BG. Classification and diagnosis of aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2018;45(Suppl 20): S95–S111.Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jcpe.12942>

33-Billings M, Holtfreter B, Papapanou PN, Mitnik GL, Kocher T, Dye BA. Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: findings from NHANES 2009 to 2014 and SHIP-TREND 2008 to 2012. *J Clin Periodontol*. 2018;45(Suppl 20):S130–S148. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jcpe.12944>

34-Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Clin Periodontol*. 2018;45(Suppl 20): S149–S161. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jcpe.12945>

35- Nagy R, Novak J. Periodontitis crónica. En: Newman M, Carranza F editores. Carranza. Newman M, Takei H, Carranza F. Periodontología clínica. 9ª ed. México Mc-Graw Hill Interamericana. 2004 p.421.

36- Wang X, Li L, Yang M, Geng Y, Chen H, Xu Y, Sun Y. Prevalence and distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its *cdtB* gene in subgingival plaque of Chinese periodontitis patients. *BMC Oral Health* 2014; 14: 37 doi: 10.1186/1472-6831-14-37 Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1472-6831/14/37>

37- Casarin, R. C. V., Del Peloso Ribeiro, É., Mariano, F. S., Nociti Jr, F. H., Casati, M. Z., & Gonçalves, R. B. Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis. *Journal of periodontal research* 2010; 45(5):635-642.

38- Navarro A, González A, Gil FJ, Bascones A. Transmisión intrafamiliar del *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Av Periodoncia* 2000; 12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4321/S1699-65852000000100006>

39-Tinoco EMB, Sivakumar M, Preus HR. The distribution and transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families with localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998; 25:99-105. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-051X.1998.tb02415.x/epdf>

40- Discepoli N, Bascones Martínez A. Controversias etiológicas, diagnósticas y terapéuticas de la periodontitis agresiva. *Av. Periodon. Implantol* 2008; 20(1):39-47 Disponible en: <http://www.scielo.isciii.es/pdf/peri/v20n1/original3.pdf>

41-Carranza F, Camargo P. La bolsa periodontal. En: Carranza. Newman M, Takei H, Carranza F. Periodontología clínica. 9na ed. México: Mc-Graw Hill Interamericana; 2004 p. 357-37

42- Hajishengallis G. *Porphyromonas gingivalis* - host interactions: open war or intelligent guerilla tactics. *Microbes and Infection* 2009; 11: 637-645. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2704251/pdf/nihms103806.pdf>

43-How KY, Song KP, Chan KG. *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Frontiers in Microbiology* 2016; 7: 53. Disponible en: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00053>

44-Cugini C, Klepac-Ceraj V, Rackaityte E, Riggs JE, Davey ME. *Porphyromonas gingivalis*: keeping the pathos out of the biont. *J Oral Microbiol* 2013; 5(0) Disponible en: <http://doi.org/10.3402/jom.v5i0.19804>

45-Maekawa T, Krauss JL, Abe T, Jotwani R, Triantafilou M, Triantafilou, K, Hajishengallis G. *Porphyromonas gingivalis* manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis. *Cell Host Microbe* 2014; 15(6):768–778. Disponible en: <http://doi.org/10.1016/j.chom.2014.05.012>

46- Moreno S, Contreras A. Factores de Virulencia de *Porphyromonas gingivalis*. *Rev Fundac Juan Jose Carraro* 2013; 37: 16-27. Disponible en: <http://www.fundacioncarraro.org/>

47- Rocha Leon VH, Nobre dos Santos Lima E, Montino Pimentel AC, Mares de Miranda P, Carvalho Filho C, Castro Trindade S, Tosta Xavier M. *Porphyromona gingivalis* and Chronic Periodontitis. *Recent advances Revista Bahiana de Odontologia* 2016;7(2):147-154.Dispinible en: <https://www5.bahiana.edu.br/index.php/odontologia/article/view/885/633>

48- Darveau, R. P., Hajishengallis, G., & Curtis, M. A *Porphyromonas gingivalis* as a potential community activist for disease. *Journal of dental research* 2012; 91(9): 816-820.Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3420389/pdf/10.1177_0022034512453589.pdf

49- Kerr J. E., Abramian J. R., Dao D. H., Rigney T. W., Fritz J., Pham T., et al. . Genetic exchange of fimbrial alleles exemplifies the adaptive virulence strategy of *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS ONE* 2014.9:e91696. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3953592/>

50-Bascones, A., & Caballeros, A *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* como principales patógenos periodontales. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*,2000; 12(2): 69-75. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/peri/v12n2/original1.pdf>

51-Daep, C. A., Novak, E. A., Lamont, R. J. & Demuth, D. R. Structural dissection and in vivo effectiveness of a peptide inhibitor of *Porphyromonas gingivalis* adherence to *Streptococcus gordonii*. *Infect. Immun*,2011;79: 67–74. Disponible en: <https://iai.asm.org/content/iai/79/1/67.full.pdf>

52-Hajishengallis, G. et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe*

,2011;10, 497–506. Disponible en: [https://www.cell.com/cell-host-microbe/pdf/S1931-3128\(11\)00299-X.pdf](https://www.cell.com/cell-host-microbe/pdf/S1931-3128(11)00299-X.pdf)

53-Liang, S. et al. The C5a receptor impairs IL-12- dependent clearance of *Porphyromonas gingivalis* and is required for induction of periodontal bone loss. J. Immunol,2011; 186, 869–877. Disponible en: <https://www.jimmunol.org/content/jimmunol/186/2/869.full.pdf>

54- Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. The keystone-pathogen hypothesis. Nature Reviews Microbiology, 2012;10(10): 717. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3498498/pdf/nihms419250.pdf>

55- Lamont, R. J., Koo, H., & Hajishengallis, G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. Nature reviews Microbiology, 2018;16(12):745-759. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6278837/pdf/nihms-998212.pdf>

56-Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. Nat Rev Microbiol. 2010; 8:481–490. Disponible en: <https://costinmarinescu.de/wp-content/uploads/2016/03/Periodontitis-a-polymicrobial-disruption-of-host-homeostasis.pdf>

57-Hajishengallis G, Lambris JD. Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity. Nat Rev Immunol. 2011; 11:187–200. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3077082/pdf/nihms264970.pdf>

58-Veith PD, Chen YY, Gorasia DG, Chen D, Glew MD, O'Brien-Simpson NM, et al. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles exclusively contain outer membrane and periplasmic proteins and carry a cargo enriched with virulence factors. J proteome research. 2014; 13(5): 2420-2432. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24620993>

59Nakayama K. *Porphyromonas gingivalis* cell-induced hemagglutination and platelet aggregation. Periodontology 2000 2010; 54: 45–52.

60-Nagano K, Hasegawa Y, Abiko Y, Yoshida Y, Murakami Y, Yoshimura F. *Porphyromonas gingivalis* FimA fimbriae: fimbrial assembly by fimA alone in the fim gene cluster and differential antigenicity among fimA genotypes. PLoS One. 2012 7:e43722. doi:10.1371/journal.pone.0043722.

61- Krishnan M, Krishnan P, Chandrasekaran SC. Detection of *Porphyromonas gingivalis* fimA Type I Genotype in Gingivitis by Real-Time PCR–A Pilot. JCDR 2016;10(6):ZC32-ZC35. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4963766/>

- 62-Fabrizi S, León R, Blanc V, Herrera D, Sanz M. Variability of the *fimA* gene in *Porphyromonas gingivalis* isolated from periodontitis and non-periodontitis patients. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2013; 18(1): e100-e105. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3548627/pdf/medoral-18-e100.pdf>
- 63- Bialowas K, Swierkot J, Radwan M. Role of *Porphyromonas gingivalis* in rheumatoid arthritis and inflammatory spondyloarthropathies. *Postepy Hig Med Dosw* 2014; 68: 1171 – 1179. Disponible en: <http://www.phmd.pl/api/files/view/29673.pdf>
- 64- Jain S, Darveau P. Contribution of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide to Periodontitis. *Periodontology* 2000, 2010; 54:53–70. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2943730/pdf/nihms-160315.pdf>
- 65-Brunner J, Wittink FR, Jonker MJ, de Jong M, Breit TM, Laine ML, et al. The core genome of the anaerobic oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol* 2010; 10:252. Disponible en: <http://images.biomedsearch.com/20920246/1471-2180-10-252.pdf>
- 66- Rosen G, Sela MN. Coaggregation of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* PK 1594 is mediated by capsular polysaccharide and lipopolysaccharide. *FEMS microbiology letters*. 2006; 256(2):304-10 Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00131.x>
- 67-Laugisch O, Wong A, Sroka A, et al. Citrullination in the periodontium- a posible link between Periodontitis and rheumatoid arthritis. *Clin Oral Invest* 2015; 20(4):675-683. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5146953/pdf/nihms833293.pdf>
- 68- Wegner N, Wait R, Sroka A, et al. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and α -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 2662–2672. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/art.27552>
- 69-Galicia JC, Benakanakere MR, Stathopoulou PG, Kinane DF. Neutrophils rescue gingival epithelial cells from bacterial-induced apoptosis. *J Leukoc Biol*. 2009;86:181-6. Disponible en: <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1189/jlb.0109003>
- 70- Lantz MS, Allen RD, Duck LW, Switalski LM, Hook M. *Porphyromonas gingivalis* surface components bind and degrade connective tissue proteins. *Journal of periodontal research*. 1991;26(3 Pt 2):283-5. Disponible en: <https://jb.asm.org/content/jb/173/14/4263.full.pdf>
- 71- Perfecto, D. R., Nakata, H. M., & Cadillo, E. M. *Porphyromonas gingivalis*: patógeno predominante en la periodontitis crónica. *Odontología Sanmarquina*, 2014;14(1): 34-38.

Disponible en http://200.62.146.145/bitstream/handle/123456789/4224/Odontologia_Sanmarquina_09v14n12_011.PDF?sequence=1&isAllowed=y

72-D' Aiuto,. Periodontitis y enfermedades cardiovasculares, 2019.Disponible en: <http://www.eldentistamoderno.com/wp-content/uploads/pdf/DM40-pag22-27.pdf>

73-Enríquez, M. G. S., Esparza, S. F., & Galaviz, A.. Expresión de la proteína de choque calórico hsp90 en pacientes con enfermedad periodontal. Contexto Odontológico,2018 1(2).

74-Huertas, Z. J. M., Arbeláez, J. J., Sánchez, S. A., Olivo, E. A. C., & Franco, J. E. S. The role of *Porphyromonas gingivalis* in the pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: Review of the literature. Acta Odontológica Colombiana,2018; 8(1): 9. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actaodontocol/article/view/70349/pdf>

75-Gibson FC, 3rd, Genco CA. *Porphyromonas gingivalis* mediated periodontal disease and atherosclerosis: disparate diseases with commonalities in pathogenesis through TLRs. Current pharmaceutical design. 2007;13(36):3665-75.

76- García, M., Chuki Rivas, E. M., & Muñoz, C. Proteína C reactiva en pacientes con periodontitis crónica. Rev. Fundac. Juan Jose Carraro, 2015;20(40):32-39. Disponible en: http://www.unisanitas.edu.co/Revista/68/02Rev%20Medica%20Sanitas%2021-3_MGarcia_et_al.pdf

77-De Freitas RBC, Luz de Aquino AR, Costa de Lima K, da Fonte Porto Carreiro A. Proteína C-reativa ultrasensible en pacientes con y sin periodontitis crónica severa generalizada. 2009; 21(3):145-155. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/peri/v21n3/original3.pdf>

78-Verma S, Li SH, Badiwala MV, Weisel RD, Fedak PW, Li RK, et al. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. Circulation. 2002;105(16):1890-6.Disponible en: https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/01.cir.0000015126.83143.b4?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rft_dat=cr_pub%3Dpubmed

79-Cardozo, M. O., Gil, M. A. P., Morales, Y. P. S., Guarín, E. M., & Henao, V. F. (2015). *Porphyromonas gingivalis* y enfermedades sistémicas. Revista CES Odontología, 2015;28(1): 57-73. Disponible en: <http://revistas.ces.edu.co/index.php/odontologia/article/view/3492>

80-Goulas, T., Mizgalska, D., Garcia-Ferrer, I., Kantyka, T., Guevara, T., Szmigielski, B., & Potempa, B. Structure and mechanism of a bacterial host-protein citrullinating virulence factor, *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase. Scientific reports, 2015;5, 11969. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4487231/pdf/srep11969.pdf>

- 81- Makiura, N., Ojima, M., Kou, Y., Furuta, N., Okahashi, N., Shizukuishi, S., & Amano, A. Relationship of *Porphyromonas gingivalis* with glycemic level in patients with type 2 diabetes following periodontal treatment. *Oral microbiology and immunology*, 2008;23(4):348-351
- 82-Taylor, J. J., Preshaw, P. M., & Lalla, E. (2013). A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes, 40. Disponible en:<https://doi.org/10.1111/jcpe.12059>
- 83-Negroni M. Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica. Editorial Panamericana. 1999.
- 84- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 2011;29(8):601-608. Disponible en:https://www.infobioquimica.com/new/wpcontent/uploads/2018/01/Metodos_identificacion_bacteriana.pdf
- 85-Neefs J-M, Van de Peer Y, Hendriks L, De Wachter R. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucl Ácidas Res* 1990;18:2237-2330. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC331875/pdf/nar00209-0026.pdf>
- 86-Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, 1987;51:221-7. Disponible en:
<https://mmb.asm.org/content/mmb/51/2/221.full.pdf>
- 87-Zambon JJ, Haraszthy VI. The laboratory diagnosis of periodontal infections. *Periodontology* 2000 1995; 7:69-82
88. Asociación Médica Mundial. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008. DoH Oct2008
- 89-Aguilar Agullo MJ, Cañamas Sanchis MV, Ibañez Cabanel P, Gil Loscos F. Periodoncia para el higienista dental. Importancia del uso de índices en la práctica periodontal diaria del higienista dental. *Periodoncia* 2003; 13(3):233-244. Disponible en :
http://www.uv.es/periodoncia/media/IndicesMariaJose_1.pdf
- 90- Quintero AJ, Prada P, Inostroza CM, Chaparro A, Sanz AF, Ramírez VL, Morales HC. Presencia de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en el biofilm subgingival de pacientes diabéticos tipo 2: estudio transversal. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral* 2011; 4:54-58. Disponible en:
www.scielo.cl/pdf/piro/v4n2/art03.pdf

91-Stewart CN, Via LE. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques* 1993;14:748-51. Disponible en :<https://es.scribd.com/doc/80909788/A-Rapid-CTAB-DNA-Isolation>

92-Lennette, E. H.; A. Balows ; W. J. Jr. Hausley; J. R. Truant. *Manual of Clinical Microbiology*. Third edition. American Society for Microbiology. Washington, U.S,1980

93-Li, R. C.; D. E. Nix ; J. J. Schentag. New turbidimetric assay for quantification of viable bacteria densities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1993; 2: 371-374. Disponible en: <https://aac.asm.org/content/aac/37/2/371.full.pdf>

94-Amano, A., Nakagawa, I., Kataoka, K., Morisaki, I., & Hamada, S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* Strains with fimA Genotypes in Periodontitis Patients. *Journal of clinical microbiology* 1999;37(5):1426-1430. Disponible en <http://jcm.asm.org/content/37/5/1426.full.pdf>

95- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW. *InfoStat* versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>

96-Morales, A., Bravo, J., Baeza, M., Werlinger, F., & Gamonal, J. Las enfermedades periodontales como enfermedades crónicas no transmisibles: Cambios en los paradigmas. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*,2016;9(2):203-207.Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/piro/v9n2/art19.pdf>

97-Botero, L., Vélez, M. E., & Alveart, F. S. Factores del pronóstico en periodoncia. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia*,2008;19(2).Disponible en: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/odont/article/viewFile/2230/1800>

98-Albandar JM. Underestimation of periodontitis in NHANES sur-veys. *J Periodontol*. 2011; 82:337-341.

99- Albandar JM. Epidemiology and risk factors of periodontal disea-ses. *Dent Clin North Am*. 2005; 49:517-532, v-vi.

100-Duque, A. Prevalencia de periodontitis crónica en Iberoamérica. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 2016;9 (2):208-215. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3310/331047133020.pdf>

101-. Tsai SJ, Lin MS, Chiu WN, Jane SW, Tu LT, Chen MY. Factors associated with having less than 20 natural teeth in rural adults: a cross-sectional study. *BMC Oral Health*. 2015;15(1):158. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4676875/>.

102-Botello, N. R. R., Espinosa, A. F., & Castro, M. A. Prevalencia, severidad y extensión de periodontitis crónica. *Revista odontológica mexicana*, 2011; 15(1):31-39. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rom/v15n1/v15n1a6.pdf>

103-Borrell LN, Burt BA, Taylor GW. Prevalence and Trends in Periodontitis in the USA: from the NHANES III to the NHANES, 1988 to 2000. *J Dent Res* 2005; 84 (10): 924-930. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.534.5240&rep=rep1&type=pdf>

104-Bansal M, Mittal N, Singh TB. Assessment of the prevalence of periodontal diseases and treatment needs: A hospital-based study. *J Indian Soc Periodontol.* 2015;19(2):211-215. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4439634/>.

105-García-Conde G, Espinosa de Santillana A, Martínez F, Huerta-Herrera N, Islas-Márquez AJ, Medina-Solís E. Periodontal treatment needs in adults from Mixteca rural area in Puebla State, Mexico. *Rev. salud pública.* 2010;12(4):647-657. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21340129>.

106- Sekhon T, Grewal S, Gambhir R. Periodontal health status and treatment needs of the rural population of India: A cross-sectional study. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine.* 2015 enero-junio; 6(1): 111-115. Disponible en: <http://www.jnsbm.org/article.asp?issn=09769668;year=2015;volume=6;issue=1;page=111;epage=115;aula>

107- Ruggieri, A., Anticoli, S., D'Ambrosio, A., Giordani, L., & Viora, M. The influence of sex and gender on immunity, infection and vaccination. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 2016; 52(2):198-204. Disponible en: <http://pdfs.semanticscholar.org/9a4d/75f0ddb68e447e8ec437defb31ceb494270b.pdf>

108-Aljehani Y. Risk Factors of Periodontal Disease: Review of the Literature. *Intern J Dentistry* 2014. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/ijd/2014/182513/cta/>

109-Serrano, S. O. D. O. Prevalencia de Enfermedad periodontal en pacientes hipertensos del área de Cardiología del Hospital Nacional Adolfo Guevara Velasco, Cusco. *Visión Odontológica*, 2018;5(2):57-63. Disponible en: <http://revistas.uandina.edu.pe/index.php/VisionOdontologica/article/view/62/57>

110- Ramírez, M., Carlos, J., Sánchez Lopera, N., Posada López, A., Agudelo-Suárez, A. A., & Enrique Botero, J. Periodontal disease and its relationship with clinical and sociodemographic variables in adult patients treated in a service/teaching institution. *Revista Odontológica*

Mexicana,2017; 21(3):165-172.Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/odon/uo-2017/uo173c.pdf>

111- Bravo M, Casals E. Encuesta de salud oral en España 2005. Rcoe 2006; 11(4): 409-456.Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/rcoe/v11n4/encuesta.pdf>

112-Mafla, A. C., & Patiño, M. A. Diferencias de sexo en severidad y factores de riesgo para caries dental y enfermedad periodontal. Revista Nacional de Odontología, 2019;15(28).

113-Romanelli H. Periodontal treatment needs in Argentine adult subjects. Acta Odontol Lationam 2007; 20(1): 39-47. Disponible en: <http://actaodontologicalat.com/wp-content/uploads/2017/07/articulo6-5.pdf>

114-Suárez-Hernández, S., Galindo-Hidalgo, B., Herrera-Ross, L., & Juárez-Membreño, I. Necesidad de tratamiento periodontal e higiene oral en pacientes Garantías Explícitas en Salud de 60 años de Punta Arenas. Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral, 2016;9(1):79-83. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/piro/v9n1/art14.pdf>

115-Zerón, A. Odontología genómica. La medicina oral del siglo XXI. Revista de la Asociación Dental Mexicana, 2006;63(2):52-61. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2006/od062c.pdf>

116-Shafee, T., Lowe, R. Eukaryotic and prokaryotic genevstructure. WikiJournal of Medicina 2017; 4(1):2 Disponible en: https://upload.wikimedia.org/wikiversity/en/0/0c/Eukaryotic_and_prokarvotic_gene_structure.pdf

117- Yarzabal, A. Técnicas de Biología Molecular para la Investigación en Odontología y Biología oral (1a PARTE). Odontología Activa Revista Científica, 2018,3(1):29-36. Disponible en: <http://oactiva.ucacue.edu.ec/index.php/oactiva/article/view/146/186>

118-Marsh, P., & Martin, M. (1999). Oral Microbiology. Oxford: wright.

119- Tran SD, Rudney JD. Multiplex PCR Using Conserved and Species-Specific 16S rRNA Gene Primers for Simultaneous Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. J Clin Microbiol 1996; 34(11):2674–2678.disponible en: <https://jcm.asm.org/content/jcm/37/11/3504.full.pdf>

120-Papone Virginia, Verolo Carolina, Zaffaroni Lourdes, Batlle Alicia, Capó Claudia, Bueno Luis et al . Detección y prevalencia de patógenos periodontales de una población con periodontitis crónica en Uruguay mediante metodología convencional y metagenómica. Odontoestomatología. 2015;17(25): 23-32. Disponible en:

http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S168893392015000100004&lng=es

121-Geraldes, A. M. Ocorrência de *Porphyromonas gingivalis* na microbiota bucal de pacientes submetidos à radioterapia para tratamento de lesões malignas de cabeça e pescoço.2010.

Disponível em

[:https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/149293/000847973.pdf?sequence=1&isAllowed=v](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/149293/000847973.pdf?sequence=1&isAllowed=v)

122-Totaro, M. C., Cattani, P., Ria, F., Tolusso, B., Gremese, E., Fedele, A. L. & Ferraccioli, G. *Porphyromonas gingivalis* and the pathogenesis of rheumatoid arthritis: analysis of various compartments including the synovial tissue. *Arthritis research & therapy*, 2013; 15(3):R66.

Disponível em: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/ar4243>

123- Gandolfo Peña, A. M. Recuento de microbiota total cultivable y presencia de *Porphyromonas gingivales*, *Tannerella forsythia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en individuos con periodontitis crónica tratados con azitromicina sistémica, 2015. Disponível em:

<http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/137612/Recuento-de-microbiota-total-cultivable-y-presencia-de-Porphyromonas-gingivales.pdf?sequence=1>

124-Arce Paniagua, M., Ulloa Carmona, M., Pozo Hernández, P., & Bravo Bown, J. (. Detección de *Porphyromonas gingivalis* en Pacientes Adultos con Periodontitis Crónica. *International journal of odontostomatology*, 2017; 11(1):13-18. Disponível em:

<http://www.scielo.cl/pdf/ijodontos/v11n1/art02.pdf>

125-Ardila Medina, C. M., Ariza Garcés, A. A., & Guzmán Zuluaga, I. C. Coexistencia de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola* en el Complejo Rojo Bacteriano en Sujetos con Periodontitis Crónica. *International journal of odontostomatology*, 2014; 8(3): 359-364.

126- Choi, B. K., Park, S. H., Yoo, Y. J., Choi, S. H., Chai, J. K., Cho, K. S., & Kim, C. K. Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced adult periodontitis patients using a nucleic acid-based approach. *Journal of periodontology*, 2000;71(9):1387-1394.

127-Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11: 266-273. Disponível em:

<https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.1996.tb00180.x>

128-Kojima T, Yasui S, Ishikawa I. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* in adult periodontitis patients. *J Periodontol* 1993; 64:1231-1237. Disponível em:

<https://doi.org/10.1902/jop.1993.64.12.1231>

129-Riggio MP, MacFarlane TW, Mackenzie D, Lennon A, Smith AJ, Kinane D. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* in subgingival plaque samples. J Periodontal Res 1996;31:496-501. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1996.tb01415.x>

130-Nozaki T, Kusumoto Y, Kitamura M, Hirano H, Koyama A, Hayakawa M, Takiguchi H, Abiko Y, Murakami S, Okada H (2001). "A sensitive method for detecting *Porphyromonas gingivalis* by polymerase chain reaction and its possible clinical application." J Periodontol 2001; 72(9): 1228-1235.

131-Fujise O, Hamachi T, Inoue K, Miura M, Maeda K "Microbiological markers for prediction and assessment of treatment outcome following non-surgical periodontal therapy." J Periodontol , 2002;73(11): 1253-1259.

132-Tomita S, Komiya-Ito A, Imamura K, Kita D, Ota K, Takayama S, Makino-Oi A, Kinumatsu T, Ota M, Saito A . "Prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in Japanese patients with generalized chronic and aggressive periodontitis." Microb Pathog ,2013;61-62: 11-15.

133-Deng T, Wang L, Lv J, Pang J, Liu B, Du Y, Ke J "Association of three bacterial species and periodontal status in Chinese adults: an epidemiological approach." J Clin Microbiol 2011;49(1): 184-188. Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/jcm/49/1/184.full.pdf>

134-Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ "Prevalence of betalactamase-producing bacteria in human periodontitis." J Periodontal Res , 2013;48(4): 493-499. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/ismei201423.pdf>

135-Avila-Campos MJ & Velasquez-Melendez G. "Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in Sao Paulo, SP, Brazil." Rev Inst Med Trop Sao Paulo ,2002;44(1): 1-5. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rimtsp/v44n1/a01v44n1.pdf>

136-Stefony, M., & Cassandra, M. Tipificación de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* en pacientes afectados con periodontitis,2013 Disponible en: http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/117483/Melendez_M.pdf?sequence=1&isAllo wed=y

137-Farias, B. C., Souza, P. R. E., Ferreira, B., Melo, R. S. A., Machado, F. B., Gusmão, E. S., & Cimões, R. Occurrence of periodontal pathogens among patients with chronic periodontitis. Brazilian Journal of Microbiology, 2012;43(3):909-916. Disponible en:

<http://www.scielo.br/pdf/bim/v43n3/09.pdf>

138- Delgado, N. E. Evaluación del tratamiento de periodontitis crónica con y sin cirugía mediante el seguimiento de los parámetros clínicos y la composición bacteriana de las bolsas periodontales a lo largo de un año-Evaluation of chronic Periodontitis treatment with and without surgery through the monitoring of clinical parameters and bacterial composition of periodontal pockets during a year. Revista de la Facultad de Odontología,2016; 10(2). Disponible en: http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/11173/delgadorfo-1022016.pdf

139-Mujica Troncoso C, Castillo-Ruiz M, Daille LK, Fuentevilla IA, Bittner M. Co-detección de Patógenos Periodontales en Pacientes Chilenos con Periodontitis Crónica. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral. 2010; 3(3): 118-122. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071901072010000300003&lng=pt

140-Badarian, A., Bueno, L., & Papone, V. Análisis bacteriano comparativo de cuadros de Periodontitis Crónica y Agresiva en una población muestra de Uruguay. Odontostomatología,2019; 21 (33):5-13. Disponible en: <http://www.scielo.edu.uy/pdf/ode/v21n33/1688-9339-ode-21-33-5.pdf>

141-Van Winkelhoff A, Laine M, Timmerman M, van der Weijden G, Abbas F, Winkel E y cols. Prevalence and serotyping of *Porphyromonas gingivalis* in an Indonesian population. J Clin Periodontol, 1999; 26:301-305. Disponible en: <https://doi.org/10.1034/j.1600-051X.1999.260507.x>

142- Herrera D, Contreras A, Gamonal G, Oteo A, Jaramillo A, Silva Ny cols. Subgingival microbial profile in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. J Clin Periodontol, 2008;35:106-113. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01170.x>

143- Rojas Miguel A., Jacques, Jaime, Molinett, Sebastian, Botelho, Juliana N., & Padilla, Carlos. (2017). Distribución gen fimA de *Porphyromonas gingivalis* en pacientes chilenos con periodontitis crónica. Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral, 2017;10(3): 141-144. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.4067/S0719-01072017000300141>

144-Loesche WJ. Clinical and Microbiological Aspects of Chemotherapeutic Agents Used According to the Specific Plaque Hypothesis J Dent Res 1979; 58(12):2404-2412. Disponible en: http://deepblue.lib.umich.edu/.../10.1177_002203457905

145-Loesche W. The identification with bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. *Oral Microbiol and Immunol* 1986; 1:65-70 Disponible en: www.onlinelibrary.wiley.com/

146-Takeuchi, Y., Umeda, M., Ishizuka, M., Huang, Y., & Ishikawa, I. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. *Journal of periodontology*, 2003;74(10):1460-1469. Disponible en: <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.10.1460>

147-Faveri, M., Figueiredo, L. C., Duarte, P. M., Mestnik, M. J., Mayer, M. P. A., & Feres, M. Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, 2009; 36(9):739-749. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-051X.2009.01449.x>

148-Pihlstrom, B. L. Periodontal risk assessment, diagnosis and treatment planning. *Periodontology* 2000,2001; 25(1), 37-58. Disponible en: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2001.22250104.x>

149-O'Brien-Simpson, N. M., Veith, P. D., Dashper, S. G., & Reynolds, E. C. *Porphyromonas gingivalis* gingipains: the molecular teeth of a microbial vampire. *Current Protein and Peptide Science*, 2003;4(6):409-426.

150-Kulkarni, P. G., Gosavi, S., Haricharan, P. B., Malgikar, S., Mudrakola, D. P., Turagam, N., & Ealla, K. K. Molecular Detection of *Porphyromonas gingivalis* in Chronic Periodontitis Patients. *The journal of contemporary dental practice*, 2018;19(8): 992-996. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/1a85/c9cd819ffe826ddbe475b87e4eb637c57560.pdf>

151-Slots J, Emrich LJ, Genco RJ, Rosling BJ. Relationship between some subgingival bacteria and periodontal pocket depth and gain or loss of periodontal attachment after treatment of adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 1985 Aug;12(7):540-552. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1985.tb01388.x>

152-Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Huang Y, Ishikawa I. *Treponema socranskii*, *Treponema denticola*, and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2001 Oct;72(10):1354-1363. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Yasuo_Takeuchi/publication/11655974_Treponema-denticola-and-Porphvromonas-gingivalis-are-associated-with-severity-of-periodontal-tissue-destruction.pdf

153-Bazzano, G, Parodi, R, Tabares, S, & Sembaj, A. Evaluación de la terapia mecánica periodontal en bolsas profundas: Respuesta clínica y bacteriológica. *Revista clínica de*

periodoncia, implantología y rehabilitación oral,2012; 5(3):122-126. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.4067/S0719-01072012000300004>

154-Corona Martínez José Daniel, Pérez Soto Elvia, Sánchez Monroy Virginia. Identificación molecular de bacterias en salud y enfermedad periodontal. Rev. Odont. Mex [revista en la Internet]. 2019; 23(1): 23-30. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870199X2019000100023&lng=es.

155-Kumawat, R. M., Ganvir, S. M., Hazarey, V. K., Qureshi, A., & Purohit, H. J. Detection of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in chronic and aggressive periodontitis patients: A comparative polymerase chain reaction study. Contemporary clinical dentistry, 2016;7(4):481–486. Disponible en: http://www.contempclindent.org/temp/ContempClinDent74481-8154927_223909.pdf

156-Moon, J.H., Herr, Y., Lee, H.W., Shin, S.I., Kim, C., Amano, A. & Lee, J.Y, "Genotype analysis of *Porphyromonas gingivalis* fimA in Korean adults using new primers", Journal of medical microbiology,2013; vol. 62, no. Pt9, pp. 1290-1294.Disponible en: https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jmm/62/9/1290_jmm054247.pdf?expires=1575327390&id=id&accname=guest&checksum=350478255728BA3764A27A4CC020BA1B

157-Jaroslav Mysak, Stepan Podzimek, Pavla Sommerova, et al., “*Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview,” Journal of Immunology Research, vol. 2014, Article ID 476068, 8 pages, 2014. Disponible en:<https://doi.org/10.1155/2014/476068>.

158-Silla, M. P. Estudio longitudinal de la relación entre presencia de bacterias periodontopatógenas y estado de salud periodontal (Doctoral dissertation, Universitat de València, Departamento de Estomatología),2015. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/71042022.pdf>

159- Yost, S., Duran-Pinedo, A. E., Teles, R., Krishnan, K., & Frias-Lopez, J. Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis. Genome medicine, 2015;7(1):27. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4410737/pdf/13073_2015_Article_153.pdf

160- Rylev, M., & Kilian, M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. Journal of clinical periodontology,2008; 35:346-361.disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01280.x>

161-Hurtado Camarena, A., Bojórquez Anaya, Y., Montañó Pérez, M. D. L., & López Mendoza, J. A. Bacterias asociadas a enfermedades periodontales. Oral, 2017;17(54):1374-1378. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/oral/ora-2016/ora1654f.pdf>

162- Lafaurie, G. I., Contreras, A., Barón, A., Botero, J., Mayorga-Fayad, I., Jaramillo, A., ... & Archila, L. H. Demographic, clinical, and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. Journal of periodontology, 2007;78(4):629-639. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/f462/e33e59123a4027728f55c6d260277a58d2a5.pdf>

163- Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. Dancing with the stars: how choreographed bacterial interactions dictate nososymbiocity and give rise to keystone pathogens, accessory pathogens, and pathobionts. Trends in microbiology, 2016; 24(6): 477-489. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4874887/pdf/nihms763674.pdf>

164-Meuric, V., Martin, B., Guyodo, H., Rouillon, A., Tamanai-Shacoori, Z., Barloy-Hubler, F., & Bonnaure-Mallet, M. *Treponema denticola* improves adhesive capacities of *Porphyromonas gingivalis*. Molecular oral microbiology, 2013;28(1): 40-53.

165-Metzger Z, Blasbalg J, Dotan M, Weiss EI. Enhanced attachment of *Porphyromonas gingivalis* to human fibroblasts mediated by *Fusobacterium nucleatum*. J Endod, 2009; 35(1): 82-85. Disponible en: <http://www.metzger-endo.co.il/wp-content/uploads/2015/10/18-Metzger-Attachment-2009.pdf>

166-Saito A, Inagaki S, Kimizuka R, Okuda K, Hosaka Y, Nakagawa T, Ishihara K. *Fusobacterium nucleatum* enhances invasion of human gingival epithelial and aortic endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2008; 54(3): 349-355. Disponible en: <http://ir.tdc.ac.jp/irucan/bitstream/10130/1121/1/i.1574-695X.2008.00481.x.pdf>