

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**POSTGRADO DE PERIODONCIA**

**DETECCIÓN DE VIRUS HERPES SIMPLE I,  
CITOMEGALOVIRUS Y VIRUS EPSTEIN BARR EN  
PACIENTES CON PERIODONTITIS CRÓNICA Y  
AGRESIVA**

**Trabajo especial de grado presentado ante la Universidad Central de Venezuela por el Odontólogo Harold Harold Hernández Mendoza, para optar al Título de Especialista en Periodoncia.**

**Caracas, Octubre 2013.**

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
POSTGRADO DE PERIODONCIA**

**Detección de Virus Herpes Simple I, Citomegalovirus y  
Virus Epstein Barr en pacientes con periodontitis  
crónica y agresiva**

**Autor: Od. Harold Harold Hernández Mendoza**

**Tutor: Dra. María Correnti**

**Postgrado de Periodoncia**

**Caracas, Octubre 2013**

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b>	i
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	iv
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	vi
<b>FINANCIAMIENTO</b>	vii
<b>DEDICATORIA</b>	viii
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	ix
<b>RESUMEN</b>	x
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Periodontitis Crónica y Agresiva	3
1.1.1 Periodontitis Crónica	3
1.1.2 Periodontitis Agresiva	5
1.2 Relación de la periodontitis crónica y agresiva con la infección viral	8
1.2.1 Familia <i>Herpesviridae</i>	8
<b>2. ANTECEDENTES</b>	11
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	19
<b>4. OBJETIVOS</b>	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos específicos	21
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	23
5.1 Material biológico	23
5.2 Descripción de la muestra	23
5.3 Criterios de selección	24
5.4 Modelo del consentimiento informado	26
5.5 Reactivos	29
5.6 Extracción de ácidos nucleicos	29
5.7 Calidad del ADN	30
5.8 Detección de VHS1	31
5.9 Detección de VEB	33

5.10 Detección de CMVH	36
5.11 Visualización de los productos de amplificación	37
5.12 Análisis estadísticos	37
<b>6. IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LAS VARIABLES</b>	<b>38</b>
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>39</b>
7.1 Población de estudio	39
7.2 Promedios de las edades de los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y el grupo control	40
7.3 Distribución de los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y el grupo control, según el género	40
7.4 Procesamiento de las muestras	41
7.4.1 Evaluación de la calidad del ADN provenientes de las muestras de pacientes	41
7.5 Detección molecular de los genomas de CMVH, VHS-1 y VEB en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control	42
7.6 Diagnóstico molecular de la infección por Herpesvirus en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control	44
7.7 Detección molecular de la coinfección viral en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control	45
7.8 Relación de la infección viral con los grupos de estudio y el género en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control	46
7.9 Promedio general de los parámetros clínicos, en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control	47
7.10 Comparación de los parámetros clínicos con la presencia de CMVH, en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control	47

7.11 Comparación de los parámetros clínicos con la presencia de VHS1, en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control	48
7.12 Comparación de los parámetros clínicos con la presencia de VEB, en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control	49
<b>8. DISCUSIÓN</b>	51
<b>9. CONCLUSIONES</b>	61
<b>10. RECOMENDACIONES</b>	62
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	63

## ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1	Secuencias de iniciadores del protocolo de calidad de ADN, BIOMED-2	30
Tabla 2	Condiciones de la mezcla para el protocolo BIOMED-2.	31
Tabla 3	Condiciones iniciales del termociclador para el protocolo BIOMED-2	31
Tabla 4	Secuencia de los iniciadores para la detección de VHS1	32
Tabla 5	Condiciones de la mezcla para la detección de VHS1	32
Tabla 6	Condiciones iniciales del termociclador para la detección de VHS1	32
Tabla 7	Iniciadores para la detección de VEB	33
Tabla 8	Condiciones de la mezcla de la primera ronda de amplificación de la RCP anidada, para la detección de VEB	34
Tabla 9	Condiciones iniciales del termociclador para la primera ronda de amplificación de la RCP anidada, para la detección de VEB	34
Tabla 10	Condiciones de la mezcla de la segunda ronda de amplificación de la RCP anidada, para la detección de VEB	35
Tabla 11	Condiciones iniciales del termociclador para la segunda ronda de amplificación de la RCP anidada, para la detección de VEB	35
Tabla 12	Secuencia de los iniciadores para la detección de CMVH	36
Tabla 13	Condiciones de la mezcla para la detección de CMVH	36
Tabla 14	Condiciones iniciales del termociclador para la detección de CMVH	37
Tabla 15	Promedios de las edades de los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y el grupo control	40
Tabla 16	Frecuencia de detección de Herpesvirus en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control	45
Tabla 17	Prevalencia de la coinfección viral con Herpesvirus en los sacos periodontales, de los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control	45

Tabla 18	Relación de la infección viral, según el grupo de estudio y el género de los en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control	46
Tabla 19	Promedio general de los parámetros clínicos, en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control	48
Tabla 20	Comparación de los parámetros clínicos con la presencia de CMVH, en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control	48
Tabla 21	Comparación de los parámetros clínicos con la presencia de VHS1, en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control	49
Tabla 22	Comparación de los parámetros clínicos con la presencia de VEB, en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control	50

## ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1	Estructura general de la partícula viral de un miembro de la familia <i>Herpesviridae</i> .	9
Figura 2	Distribución de la población de estudio según el género	39
Figura 3	Distribución de los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y el grupo control, según el género	41
Figura 4	Gel de agarosa para la visualización de la calidad del ADN extraído de las muestras de pacientes con periodontitis y sujetos controles, con el protocolo BIOMED-2	42
Figura 5	Gel de agarosa para la visualización de los amplificados de CMVH	43
Figura 6	Gel de agarosa para la visualización de los amplificados de VHS-1	43
Figura 7	Gel de agarosa para la visualización de los amplificados de VEB	44
Figura 8	Ciclo de vida del Virus Herpes Simple 1	59

## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto **FONACIT, G-2005000408**.

Aprobado para María Correnti, del Laboratorio de Genética Molecular, del

Instituto de Oncología y Hematología, Ministerio del Poder Popular para la

Salud (MPPS).

## DEDICATORIA

A Dios Omnipotente, a la Virgen María, al Divino Santo Ecce homo.

A mi Familia.

A mis Profesores y Maestros.

A mis Amigos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Metropolitana de Barranquilla, Colombia

A la Universidad Central de Venezuela, coordinadores, profesores, maestros, trabajadores administrativos, trabajadores en general.

A la Dra. María Antonieta Méndez

A la Dra. Victoria Criado

A la Dra. Mireya García

A la Profesora Carolina Guilarte

A la Dra. María Correnti

A la Licenciada Andreina Fernandes

A la Licenciada Maira Ávila

A la Dra. Laura Escalona

A la Dra. Eva Núñez

A mis Amigos de postgrado: Paolo Bertossi, Sheila Sala, Ma Fabiola Paredes, Ma Gabriela Díaz, en especial a Rosamary Simone

A los compañeros de primer año de Periodoncia

A los Pacientes que participaron en el estudio

A la Familia Silvera Contreras

A la Familia Oliveros

A la Familia Malagón

A la Familia Chirinos Hernández

A la Familia Hoffmann León

## RESUMEN

La enfermedad periodontal es una enfermedad infecciosa multifactorial, que afecta progresivamente los tejidos de soporte de la estructura dentaria. Investigaciones recientes han propuesto que los virus de la familia *Herpesviridae* están relacionados con la enfermedad periodontal, demostrándose una posible asociación con la presencia de Citomegalovirus (CMVH), Virus Herpes Simple 1 (VHS-1) y Virus Epstein Barr (VEB) en los tejidos periodontales, biopelícula dental, fluido crevicular y saliva, con la etiopatogenia de la periodontitis.

Es por ello, que el objetivo de este trabajo fue analizar la asociación entre la presencia de Virus Herpes Simple I, Citomegalovirus y Virus Epstein Barr con la periodontitis crónica y agresiva, en 33 pacientes que fueron atendidos en el Postgrado de Periodoncia de la Facultad de Odontología, de la Universidad Central de Venezuela (UCV), durante los meses de Noviembre 2012 a Febrero 2013, en muestras de fluido crevicular.

El promedio de edad de la población total seleccionada fue de  $36,06 \pm 12,98$  años, con un rango entre los 14 y 61 años, donde un 69,70% de los pacientes pertenecía al género femenino y el 30,30% al género masculino. Para el grupo de periodontitis agresiva, el porcentaje de infección viral fue de 27,3% para CMVH, de 27,3% para VHS-1 y 0% para VEB. En el grupo de periodontitis crónica, el porcentaje de infección viral fue de 0% para CMVH, de 27,3% para VHS-1 y 18,2% para VEB. En el grupo control, el porcentaje de infección viral fue de 0% para CMVH y de 9,1% para VHS-1 y VEB, respectivamente. Se encontró un 18,18% de coinfección viral entre CMVH y VHS-1, dentro del grupo de la periodontitis agresiva, y un 9,09% entre VHS-1 y VEB, dentro del grupo de la periodontitis crónica.

En este estudio se pudo concluir que la presencia de CMVH está relacionada con la enfermedad periodontal, específicamente, con la periodontitis agresiva, pudiendo jugar un papel sinérgico con otros agentes infecciosos de la cavidad bucal, asociados al desarrollo de la periodontitis. Por ello, recomendamos realizar otros tipos de estudios, como cuantificación de la carga viral, para poder establecer un papel definitivo de los Herpesvirus en esta patología.

# 1. INTRODUCCIÓN

La periodontitis es una enfermedad infecciosa e inflamatoria. En su etiología, las bacterias tienen un papel esencial pero no son los únicos microorganismos asociados a esta enfermedad. Dependiendo de diversos factores, como la edad, el grupo étnico, el nivel socio-económico, las condiciones sistémicas o los hábitos del individuo, donde se incluye el cuidado bucal, el desarrollo y progreso de la enfermedad periodontal, será diferente, por lo que se considera que esta patología tiene un origen multifactorial <sup>(1)</sup>.

En 1965, Loe y col., definieron la enfermedad periodontal como lesiones con características inflamatorias causadas por una infección por placa bacteriana y/o patógenos específicos <sup>(2)</sup>.

Loesche en 1976, propone dos hipótesis para explicar la etiopatogenicidad de la enfermedad periodontal: a) Hipótesis de la placa dental no específica, la cual afirma que la enfermedad periodontal surge de la “elaboración de productos nocivos por todos los microorganismos de la placa”, y b) Hipótesis de la placa dental específica, que afirma que “sólo cierta placa es patógena, y que su patogenicidad depende de la presencia o el incremento de microorganismos específicos” <sup>(3)</sup>. En ese momento se aclaraba que la enfermedad periodontal era producida por microorganismos específicos y no por todos los microorganismos de la placa dental.

Marsh y Martín en 2000, sugieren la hipótesis de la placa ecológica, que propone los cambios en las condiciones ambientales locales en la región subgingival, como el incremento del fluido crevicular durante la inflamación, que

favorece el crecimiento de especies anaeróbicas estrictas proteolíticas, lo cual predispone a la zona gingival a la enfermedad <sup>(4)</sup>. Dicha hipótesis deja claro que la enfermedad periodontal, no sólo se relaciona con las bacterias y con otros microorganismos, sino también con las condiciones ambientales que favorecen la permanencia y crecimiento de los mismos en el periodonto.

En el 2005, Kinane y Lindhe afirman que la periodontitis crónica está relacionada con las características del sujeto y solo algunos individuos experimentan destrucción avanzada que afecta dientes específicos, y la progresión de esta enfermedad inflamatoria es continua, con breves episodios de exacerbación localizada y remisión ocasional <sup>(5)</sup>.

Por su parte, Kirkwood y col., en el 2010, la definen como una respuesta inflamatoria de los tejidos periodontales, inducida por microorganismos en la placa dental, que contribuyen a la destrucción de tejidos, pérdida ósea y con el tiempo, a la pérdida dental <sup>(6)</sup>.

Actualmente, podemos definir la enfermedad periodontal como una enfermedad infecciosa multifactorial, que afecta progresivamente los tejidos de soporte de la estructura dentaria; caracterizada por la presencia de lesiones gingivales inflamatorias, la formación de sacos periodontales y la pérdida de hueso alveolar <sup>(7)</sup>.

## 1.1. PERIODONTITIS CRÓNICA Y AGRESIVA

### 1.1.1. Periodontitis Crónica:

Para clasificar una enfermedad como periodontitis crónica (PC), debemos, en primer lugar, diferenciarla de una periodontitis agresiva (PA), teniendo en cuenta las características patognomónicas de una PA, una de ellas es la destrucción rápida de inserción gingival y ósea en incisivos y molares permanentes <sup>(8)</sup>.

Al realizar una evaluación clínica periodontal se obtienen valores de los parámetros clínicos periodontales: profundidad de sondaje (S), pérdida del nivel de inserción (PNI), sangrado al sondaje (SGS) e índice de biopelícula dental (IBD), con ellos podemos diagnosticar y clasificar la enfermedad periodontal.

Existe una clasificación para la enfermedad periodontal y unos parámetros para diferenciar periodontitis crónica de la agresiva que, según la Academia Americana de Periodoncia de 1999, es la siguiente: La periodontitis es una entidad infecciosa crónica, que produce inflamación en los tejidos de soporte dental, en cuya progresión se produce pérdida de inserción periodontal, debido a la destrucción del ligamento periodontal y resorción de la cresta ósea. Como lo muestra la clasificación, esta enfermedad se presenta en dos formas, de acuerdo a la extensión, mostrando idénticas características:

- a) **Periodontitis crónica localizada:** en la cual, el número de superficies dentales afectadas no supera un 30%.
- b) **Periodontitis crónica generalizada:** cuando el número de superficies dentales afectadas supera el 30% <sup>(9)</sup>.

Además se pueden considerar tres categorías de severidad:

- a) Leve: cuando se han perdido 1-2mm de inserción.
- b) Moderada: cuando se han perdido 3-4mm de inserción.
- c) Severa: cuando se han perdido 5mm o más de inserción <sup>(9)</sup>.

**Características:**

- Pérdida clínica de inserción
- Pérdida de hueso alveolar
- Presencia de sacos periodontales
- Inflamación gingival (edema, eritema, aumento de la temperatura del surco)
- Hemorragia a la presión
- Movilidad dental, que puede llevar a exfoliación
- Es más frecuente en adultos, pero puede presentarse también en jóvenes y niños
- La severidad de la enfermedad está directamente relacionada con la presencia de factores locales o predisponentes
- Presencia de cálculos subgingivales
- Asociado con un patrón microbiológico variable (*Porfiromona gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Campilobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Treponema denticola*, *Streptococcus intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens*)
- Patrón de progresión lento a moderado, pero puede presentar períodos de progresión rápida
- Puede estar modificada o asociada con enfermedades sistémicas

- Puede estar asociada con otros factores, como el estrés y consumo de cigarrillo <sup>(10)</sup>.

La periodontitis recurrente es el retorno de la enfermedad al periodonto y no se clasifica como una entidad separada, de la misma manera que la enfermedad que no responde positivamente a los tratamientos y conocida como periodontitis refractaria, no se separa de la definición de periodontitis crónica <sup>(9)</sup>.

### **1.1.2. Periodontitis Agresiva:**

Es un tipo específico de periodontitis, con características clínicas claramente diferentes de la periodontitis crónica. Estas entidades pueden, o no, estar relacionadas con algunos desórdenes sistémicos que afectan la encía y guían a la pérdida dental, en cualquiera de las dos denticiones. El grado de destrucción periodontal puede estar relacionado con la virulencia de la flora asociada y la susceptibilidad del hospedero. En varios estudios bacteriológicos se han encontrado organismos Gram negativos en alto porcentaje. Los microorganismos más frecuentemente encontrados son: *E. corrodens*, *P. intermedia*, bacilos anaeróbicos como *C. rectus* y Gram positivos como *P. micros*, siendo *A. actinomycetemcomitans* el microorganismo más relevante, ya que se ha reportado en el 90% de los casos, observándose una mayor respuesta al tratamiento cuando se controlan los niveles de esta bacteria, aunque la respuesta a la presencia de este patógeno puede variar de acuerdo a la susceptibilidad y, además se ha encontrado un patrón de respuesta asociado al origen étnico <sup>(10,11)</sup>.

Se ha hecho énfasis en la susceptibilidad del hospedero, debido a la relación desproporcionada entre la severidad de la destrucción periodontal y la cantidad de depósitos bacterianos, encontrándose en algunos pacientes, quienes han desarrollado la enfermedad, proponiéndose que hay alteración en las funciones migratorias y antibacterianas de los leucocitos polimorfonucleares (PMN). Las anomalías de los PMN pueden ser resultado de un estado hiperinflamatorio, causado por la presencia de citocinas pro inflamatorias en el suero. Las respuestas inflamatorias locales en los tejidos periodontales se caracterizan por altos niveles de mediadores inflamatorios, como PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  <sup>(10,11)</sup>.

De igual forma, se ha sugerido que la alteración de los PMN sea de carácter genético. A este respecto, se han realizado varios estudios, ninguno concluyente, cuyos resultados muestran una alta heterogeneidad en cuanto a los factores de susceptibilidad genética de la enfermedad. Se ha notado un patrón de distribución familiar, indicándose que la cantidad de miembros afectados de una misma familia puede llegar a ser del 40-50%, evidenciándose un patrón autosómico dominante, según los análisis de segregación, siendo la mayor sugerencia del patrón genético de la enfermedad periodontal, <sup>(10)</sup>.

La periodontitis agresiva se subclasifica, igual que la periodontitis crónica, según la extensión de la enfermedad, en generalizada y localizada. Las características de la enfermedad no necesariamente deben presentarse todas para poder diagnosticar la patología. Los hallazgos comunes de los dos tipos de enfermedad son:

- Los individuos están sistémicamente sanos, de no ser por la presencia de periodontitis.
- Enfermedad periodontal severa y de rápida progresión (pérdida ósea severa y pérdida de adhesión epitelial).
- Agregación familiar <sup>(11)</sup>.

#### **Características secundarias:**

- Cantidad de depósitos bacterianos no consistentes con la severidad de la enfermedad
- Elevada cantidad de *A. actinomycetemcomitans* y *P. Gingivalis*.
- Anormalidades fagocíticas
- La progresión de la enfermedad representada en la pérdida ósea y pérdida de adhesión, puede ser autodetenida
- Fenotipo hiper-sensible de macrófago, incluyendo elevados niveles de PGE2 e IL-1 $\beta$  <sup>(11)</sup>.

#### **a) Periodontitis agresiva localizada:**

Aparte de las características anteriores, puede estar asociado con: aparición circumpuberal, gran respuesta de anticuerpos séricos a agentes infecciosos y presentación localizada en los primeros molares e incisivos permanentes <sup>(11)</sup>.

#### **b) Periodontitis agresiva generalizada:**

Además de presentar las mismas características arriba mencionadas, se asocia con: aparición cerca de los 30 años, sin embargo, puede presentarse en

personas mayores, disminución de la respuesta de anticuerpos séricos a agentes infecciosos, pérdida del nivel de inserción y de altura de la cresta ósea generalizada, que afecta por lo menos tres dientes diferentes a los primeros molares e incisivos <sup>(11)</sup>.

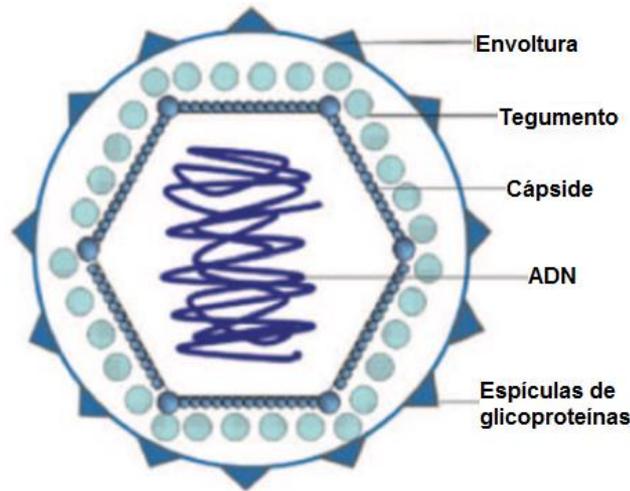
## **1.2. RELACIÓN DE LA PERIODONTITIS CRÓNICA Y AGRESIVA CON LA INFECCIÓN VIRAL**

Los Virus Herpes Simple 1 (VHS-1), Citomegalovirus (CMVH) y Virus Epstein Barr (VEB) han sido implicados en la patogénesis de la enfermedad periodontal y aunque varios estudios indican el papel de estos virus en los diferentes tipos de enfermedad periodontal, los mismos no se diagnostican frecuentemente en la práctica clínica <sup>(12)</sup>. En la actualidad, se considera la presencia de VHS-1, CMVH y VEB como un factor importante en la progresión de la enfermedad periodontal <sup>(13)</sup>.

### **1.2.1. Familia *Herpesviridae*:**

Según Bascones y col., 2011, Sapp y col., 1998 y en los textos de Carmona y Regezi, la familia *Herpesviridae* está conformada por el género *Herpesvirus*. Son virus envueltos de ADN bicatenario (bc), lineal e icosaédricos. El virión está conformado por un core que contiene el material genético; la cápside es de unos 100-110 nm de diámetro, con 162 capsómeros; presenta un material amorfo que rodea la cápside, denominado tegumento y unas glicoproteínas virales en la superficie (Figura 1). Puede codificar hasta 35 proteínas,

conteniendo incluso enzimas implicadas en el metabolismo de los ácidos nucleicos, síntesis de ADN y procesamiento proteico <sup>(13, 14, 15,16)</sup>.



**Figura 1.- Estructura general de la partícula viral de un miembro de la familia *Herpesviridae*. Modificado de <sup>(13)</sup>.**

Se describen ocho especies en tres subgrupos: alfa, beta y gamma. El subgrupo alfa, conocido como la subfamilia *Alfaherpesvirinae*, incluye VHS-1, Virus Herpes Simple 2 (VHS-2) y Virus de Varicela Zóster (VVZ). El grupo beta o subfamilia *Betaherpesvirinae*, incluye CMVH, Herpesvirus tipo 6 (HV-6) y Herpesvirus tipo 7 (HV-7). La subfamilia *Gammaherpesvirinae* incluye Virus Epstein Barr (VEB) y Herpesvirus tipo 8 (HV-8) o Sarcoma de Kaposi. En estados de latencia, VHS-1, VHS-2 y VVZ residen en los ganglios de los nervios sensitivos y en los monocitos. VEB reside en los linfocitos B y en el tejido de la glándula salivar. HV-6 permanece latente en los linfocitos y el epitelio ductal de las glándulas salivares. HV-7 en los linfocitos y el tejido glandular y HV-8 en linfocitos y macrófagos <sup>(13, 14, 15,16)</sup>.

Según varios estudios reportados, donde destacan los de Contreras y col., Löö y col., encontramos que de la familia *Herpesviridae*, los más relacionados con la enfermedad periodontal son:

**a) Virus Herpes Simple 1 (VHS 1):**

Es un virus de ADN<sub>bc</sub>, lineal, que se transmite por contacto directo, que penetra a través de la piel y mucosas. Su genoma es de 150 Kpb, codifica más de 75 productos genéticos y está envuelto en una cápsula proteínica. La primoinfección sucede antes de los 5 días de manifestarse las lesiones y durante la latencia se alojan en ganglios nerviosos. Su periodo de incubación es de 7 a 8 días <sup>(13, 14, 15,16)</sup>.

**b) Virus Epstein Barr (VEB):**

Consta de un núcleo de ADN<sub>bc</sub>, lineal de 175 Kpb, rodeado por una nucleocápside icosaédrica y de la envoltura viral, que contiene glicoproteínas. Tiene gran afinidad por los linfocitos B, iniciando la infección al unirse al receptor viral en la superficie del linfocito. El virus entra directamente a un estado de latencia sin pasar por un periodo de replicación completo <sup>(13, 14, 15,16)</sup>.

**c) Citomegalovirus (CMVH):**

Es un Virus de ADN<sub>bc</sub>, lineal, de 235 Kpb que codifica para unos 200 genes. Se puede detectar en sangre, semen, leche materna y saliva, la primera infección es asintomática y el sitio de latencia de CMVH no es conocido, aunque el virus se encuentra a menudo en glándulas salivales. Es un patógeno oportunista en pacientes inmunosuprimidos y con trasplantes <sup>(13, 14, 15,16)</sup>.

## 2. ANTECEDENTES

Desde hace varios años, se ha venido estudiando la presencia de VHS-1, CMVH y VEB en los procesos infecciosos e inflamatorios a nivel bucal. Esto permite sugerir una posible relación patogénica entre los distintos virus humanos y algunos tipos de enfermedad periodontal.

A mediados de la década de los setenta se comienza a estudiar la posible relación entre los virus, el fluido crevicular y la saliva. El objetivo principal era determinar la presencia de los virus, específicamente, los VHS, en el fluido crevicular y en el epitelio de unión del surco gingival, incluyendo a las células epiteliales y a los fibroblastos <sup>(17, 18)</sup>.

En la década de los ochenta, se detectaron anticuerpos IgG e IgA contra VHS, tanto en su fase de latencia como en su fase de aparición de las lesiones herpéticas, a nivel del fluido gingival, mediante inmunofluorescencia. Estas investigaciones buscaban determinar otras posibles localizaciones de la cavidad bucal como en los tejidos periodontales y fluido gingival, que funcionaran como reservorio del virus, asociado a sus distintas fases de virulencia <sup>(19, 20, 21, 22, 23, 24, 25)</sup>.

Finalizando la década de los noventa, se comienza a establecer una relación más directa entre los Herpesvirus y la enfermedad periodontal, basado en pruebas más sensibles y específicas, como es el caso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), la cual se basa en la detección de secuencias específicas del genoma viral. En estos estudios se trabajó con muestras de biopelícula dental de pacientes con periodontitis crónica y agresiva, en las

cuales determinaron que los virus encontrados con mayor prevalencia eran VHS, CMVH y VEB <sup>(26, 27, 28, 29, 30)</sup>.

Parra y Slots, en 1996 detectaron VHS en fluido crevicular, en pacientes con periodontitis y gingivitis. Reportaron un 78% de positividad para VHS en los pacientes con periodontitis y un 31% en los pacientes con gingivitis <sup>(31)</sup>.

En el mismo año, Contreras y Slots tomaron muestras de fluido crevicular, en pacientes con periodontitis y gingivitis. Detectaron CMVH, VEB y VHS con alta prevalencia, en los sacos periodontales profundos <sup>(26)</sup>.

Contreras y col., en 1997, tomaron muestras de fluido crevicular en niños nigerianos, de 3 a 14 años de edad, diagnosticados con gingivitis ulceronecrotizante y desnutrición. Encontraron una prevalencia de CMVH del 59%, de VEB-1 de 27% y de VHS de 23%, además de un 36% de coinfección entre CMVH y VEB <sup>(27)</sup>.

Ting y col., en el año 2000, estudiaron 11 pacientes con edades comprendidas entre 10 y 23 años de edad, con periodontitis juvenil localizada (LJP), hoy en día periodontitis agresiva. Con la técnica de RCP, detectaron el genoma de VHS-1, VEB-1, VEB-2 y CMVH, y a través de cultivo microbiológico identificaron la especie bacteriana *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*). Tomaron muestras subgingivales en 3 lesiones con periodontitis agresiva, alrededor del primer molar y en dientes incisivos (profundidades de saco periodontal entre 5 y 11 mm) y en 3 lesiones con gingivitis y sitios sanos, alrededor de los caninos (profundidad de sondaje de 2-3 mm) <sup>(32)</sup>.

De 11 muestras periodontales con sacos profundos, 72,7% mostraron la presencia de CMVH; 63,6% de VEB-1; 18,2% de VEB-2; 54,5% VHS-1 y 72,7% mostraron co-infección viral. De las 11 muestras en sacos periodontales de poca profundidad, 18,2% mostraron la presencia de CMVH; 18,2% de VEB-1; 9,1% de VHS-1 y 18,2% mostraron co-infección viral. La diferencia en la ocurrencia de CMVH y la co-infección viral entre los sacos periodontales profundos y poco profundos fue estadísticamente significativa ( $p = 0,031$ ). Los pacientes infectados con CMVH entre los 10 y 14 años, revelaron la activación del virus y mostraron evidencia clínica de LJP temprana. 2 de los 3 pacientes infectados con CMVH, entre los 15 y 23 años, revelaron una infección viral latente y presentaron evidencia radiográfica de lámina dura de la cresta alveolar, indicando una condición periodontal estable <sup>(32)</sup>.

La activación CMVH se relacionó con la ausencia radiográfica de la cortical de la cresta alveolar, pudiendo indicar la progresión de la enfermedad periodontal. La presencia de *A. actinomycetemcomitans* se encontró con mayor frecuencia en las muestras con infección activa que en las muestras con infección latente de CMVH. Los resultados se relacionan con la hipótesis, en la cual, la infección por virus de la familia *Herpesviridae* y, posiblemente la activación de CMVH, representan características importantes de la etiopatogenia de la periodontitis agresiva <sup>(32)</sup>.

En 2002, Saygun y col., estudiaron 30 pacientes con PC y 21 sujetos sanos. Analizaron la relación de CMVH, VEB-1 y VHS-1 con la PC. Por medio de RCP, detectaron los virus en fluido crevicular, encontrando un 44,3% de positividad para CMVH, un 14,3 % para VEB-1 y un 6,7% para VHS-1, en los pacientes

con PC. En los individuos sanos, encontraron un 14,3%, 14,3% y 0% de positividad, respectivamente <sup>(33)</sup>.

Yapar y col., en 2003, examinaron 17 pacientes con PA y 16 sujetos sanos, para detectar CMVH y VEB-1, en placa dental, utilizando una RCP. Detectaron CMVH en un 64,7% y de VEB-1 en un 70,6% de los pacientes con PA, y un 0% y 6%, respectivamente, en individuos sanos <sup>(34)</sup>.

En el 2005, Saygun y col., evaluaron la presencia de CMVH y VEB en la saliva de 20 pacientes con periodontitis, entre 21 y 56 años de edad, antes y después del tratamiento periodontal, el cual incluía la instrucción de higiene bucal, raspado y alisado radicular, y cirugía. Tomaron muestras de tejido gingival proveniente de sacos periodontales de 6 a 10 mm de profundidad y de saliva total estimulada. Realizaron una RCP en tiempo real (RCP- TR) para cuantificar las copias del genoma de CMVH y VEB. Al inicio del estudio, los 20 pacientes mostraron presencia de ADN de CMVH y de VEB en saliva y en el tejido gingival. La terapia periodontal redujo la profundidad de los sacos periodontales de 4,6 mm a 1,4 mm, el índice de placa de 2,1 a 0,9, y el índice gingival 2,1 a 0,4. Después del tratamiento, la presencia de CMVH disminuyó 37,5 veces en sitios subgingivales y 64,6 veces en la saliva, y el ADN de VEB disminuyó 5,7 veces en sitios subgingivales y 12,9 veces en la saliva <sup>(35)</sup>.

Botero y col., en el 2008, estudiaron a 33 pacientes con PC y PA, distribuidos de la siguiente forma: 28 sujetos con PC y un promedio de edad 43,2 años; 5 sujetos con PA y un promedio de edad 24,8 años y un grupo control (GC) de 24 sujetos sin periodontitis, con un promedio de edad de 30,8 años, para detectar la presencia de CMVH y de microorganismos periodontopáticos subgingivales

en estos pacientes. Los pacientes con periodontitis presentaron pérdida del nivel de inserción (PNI  $\geq 4$  mm), sacos periodontales (Con profundidad  $\geq 4$  mm), sangrado al sondaje (SGS) y pérdida ósea. Los sujetos del GC presentaban inflamación mínima, SGS, en ausencia de pérdida de inserción, un S $<3$  mm y sin pérdida ósea <sup>(36)</sup>.

Las muestras de placa subgingival fueron tomadas en duplicado de los 6 sitios más profundos, en pacientes con periodontitis, y de 6 sitios periodontalmente sanos en los sujetos del GC. Las muestras tomadas se utilizaron para realizar un análisis por cultivo microbiológico y para detectar y cuantificar CMVH (copias/ $\mu$ L), mediante una RCP- TR. La frecuencia de detección de CMVH fue de 60% en pacientes con periodontitis, en contraste con un 4,1% en los sujetos periodontalmente sanos. El número promedio de copias de CMVH fue de 635,6 copias/ $\mu$ L en periodontitis vs  $6,45 \times 10^{-04}$  copias/ $\mu$ L en sujetos sanos. Los parámetros periodontales SGS, S y PNI estuvieron aumentados en pacientes positivos para CMVH, así como la infección por *P. gingivalis* y *T. forsythia* <sup>(36)</sup>.

A finales de 2008a, Imbronito y col., detectaron la presencia de herpesvirus y patógenos periodontales en placa subgingival de 30 pacientes con PC, PA, gingivitis (G) y un grupo C. Utilizaron una RCP anidada para la detección de VHS-1, VEB-1, y CMVH. Las bacterias se identificaron mediante la amplificación del ARNr 16s. VHS-1, CMVH y VEB-1 se detectaron en un 86,7%, 46,7% y 33,3% respectivamente en el grupo con PA, en un 40,0%, 50,0% y 46,7% del grupo con PC, en su orden, en un 53,3%, 40,0%, y en un 20,0% del grupo G, respectivamente, y en un 20,0%, 56,7%, y 0,0% del grupo C, en su orden. *A. actinomycetemcomitans* se detectó con una frecuencia significativa en el grupo de PA, en comparación a los otros grupos. *P. gingivalis*

y *T. forsythia* se identificaron con mayor frecuencia en el grupo con PA. Los grupos PA, PC y G, presentaron mayor frecuencia de *P. intermedia*, en comparación al grupo C <sup>(37)</sup>.

En el 2010, Slots y Slots, realizaron un metanálisis sobre la presencia de patógenos bacterianos y virales en saliva, su relación con la enfermedad periodontal y el riesgo de infección. Recopilaron varias investigaciones sobre la asociación entre los Herpesvirus en saliva y la periodontitis; destacando los trabajos de los siguientes autores: Sahin y col., quienes estudiaron 42 pacientes, de los cuales, 14 pacientes presentaban periodontitis y eran sistémicamente sanos; 15 pacientes con gingivitis y 13 portadores de prótesis completa. Con la técnica RCP-TR detectaron la presencia de CMVH y VEB. El ADN de CMVH fue detectado en el 50% de los pacientes con periodontitis, pero no en los pacientes con gingivitis o sujetos edéntulos, y VEB se detectó en el 79% de los pacientes con periodontitis, en 33% de los pacientes con gingivitis y en 54% de los sujetos edéntulos. Dawson y col., recolectaron muestras de saliva y de placa subgingival, de 65 adultos con PC, para detectar el ADN de VEB, utilizando RCP- TR. Los pacientes que presentaron ADN de VEB en la saliva, fueron 10 veces más propensos de tener ADN de VEB en la placa subgingival, en comparación con los pacientes que carecían del genoma viral en la saliva. Imbronito y col., en 2008b, trabajaron con muestras de saliva y de placa subgingival, de 40 adultos con PC, analizadas mediante una RCP anidada, para detectar VEB y CMVH. Hallaron la presencia de VEB-1 en un 45% de las muestras subgingivales y en un 38% de las muestras de saliva. CMVH fue detectado en un 83% de las muestras subgingivales y en un 75% de las muestras salivales. Sugano y col., tomaron 33 muestras de saliva en

pacientes sistémicamente sanos, con periodontitis, de 25 a 68 años de edad, utilizando RCP- TR para la detección de ADN de VEB y *P. gingivalis*. Los pacientes VEB positivos mostraron mayor proporción en saliva de *P. gingivalis*, que los pacientes VEB negativos <sup>(38)</sup>.

Recientemente, Eres y col., en el 2011, determinaron la correlación entre la gingivitis en el embarazo con la presencia de VEB y CMVH. En 70 mujeres embarazadas y 40 mujeres no embarazadas, evaluaron los índices gingival y de placa dental, SGS y la PNI de toda la dentición. Las muestras de placa subgingival se obtuvieron de los sitios que mostraron signos de gingivitis, así como de los sitios sanos. Para la detección de infección por CMVH y VEB se utilizó una RCP convencional. Los resultados mostraron que las lesiones de gingivitis, en un 38,6% y un 14,3% de las embarazadas, fueron positivas para VEB y CMVH, respectivamente. En el grupo de no embarazadas, VEB y CMVH se detectaron en un 15% y un 20% de las lesiones, respectivamente, determinándose una diferencia estadísticamente significativa en relación con la presencia de VEB subgingival entre los dos grupos. Tanto en los sitios con gingivitis y sitios sanos, la PNI se vio afectada por la gestación y la presencia de VEB. El SGS se vio afectado por la presencia de CMVH y VEB. Concluyen que el embarazo aumenta el riesgo de infección por VEB en unas 3.647 veces <sup>(39)</sup>.

Los resultados de estas investigaciones indican que se han detectado con frecuencia la presencia de VHS-1, CMVH y VEB en tejidos gingivales, sacos patológicos y saliva. No obstante, si bien los VHS, CMVH y VEB no son el factor etiológico directo de la enfermedad periodontal, su presencia se

convierte en un agravante lesivo, empeorando la evolución y pronóstico de la enfermedad.

### **3. JUSTIFICACIÓN:**

La enfermedad periodontal es una enfermedad infecciosa multifactorial, que afecta progresivamente los tejidos de soporte de la estructura dentaria y actualmente, se considera la presencia de los virus de la familia *Herpesviridae* como un factor importante en la progresión de la enfermedad periodontal.

Los virus de la familia *Herpesviridae* han sido implicados en la patogénesis de la enfermedad periodontal y aunque varios estudios indican el papel de estos virus en los diferentes tipos de enfermedad periodontal, los mismos no se investigan con frecuencia en la práctica clínica.

Los resultados de varias investigaciones, indican que se han detectado con frecuencia la presencia de CMVH, VHS-1 y VEB, pertenecientes a la familia *Herpesviridae*, en tejidos gingivales, sacos periodontales, fluido crevicular, biopelícula dental y saliva. No obstante, si bien los virus no son el factor etiológico directo de la enfermedad periodontal, su presencia se convierte en un agravante lesivo, empeorando la evolución y pronóstico de la enfermedad periodontal.

Hoy en día, los odontólogos-periodoncistas debemos incluir a nuestro concepto de enfermedad periodontal, la relación con los virus y darle la importancia que se merece en el diagnóstico y plan de tratamiento, especialmente en los casos donde la enfermedad periodontal no evoluciona positivamente al tratamiento periodontal convencional.

Realizando una anamnesis detallada y haciendo uso de los medios diagnósticos disponibles, como es la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) convencional o en tiempo real, para la detección de CMVH, VHS-1 y

VEB en enfermedad periodontal, podemos obtener un diagnóstico, pronóstico y tratamiento eficaz, que permita una evolución más favorable de los pacientes.

En Venezuela, no existe ningún tipo de estudio que determine la asociación entre la enfermedad periodontal y los Herpesvirus CMVH, VHS-1 y VEB. Por lo antes expuesto, y por el número creciente de pacientes que acuden a la consulta del Periodoncista con esta enfermedad, consideramos relevante realizar este estudio, con el fin de hacer un aporte y ampliar el conocimiento de la etiología de la infección periodontal, que permita el establecimiento de las estrategias terapéuticas para el tratamiento de esta patología.

## **4. OBJETIVOS:**

### **4.1. Objetivo General:**

Analizar la asociación entre la presencia de Virus Herpes Simple I, Citomegalovirus y Virus Epstein Barr con la periodontitis crónica y agresiva, en pacientes que son atendidos en el Postgrado de Periodoncia de la Facultad de Odontología, de la Universidad Central de Venezuela (UCV).

### **4.2. Objetivos Específicos:**

- Realizar la evaluación de los parámetros clínicos periodontales: índice de biopelícula dental (IBD), profundidad de saco periodontal (S), pérdida del nivel de inserción (PNI) y sangrado al sondaje (SGS), para determinar el diagnóstico y clase de enfermedad periodontal.
- Detectar la presencia de Virus Herpes Simple I, Citomegalovirus y Virus Epstein Barr en el fluido gingival de pacientes diagnosticados con periodontitis crónica y agresiva, por medio de una Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP).
- Detectar la presencia de Virus Herpes Simple I, Citomegalovirus y Virus Epstein Barr en el fluido gingival de individuos sin enfermedad periodontal (sanos) considerados grupo control (GC), por medio de una Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP).
- Analizar el comportamiento de la periodontitis agresiva, la periodontitis crónica y del grupo control en relación a la edad y el género de los pacientes en estudio.

- Evaluar los cambios de los parámetros clínicos periodontales IBD, S, PNI, SGS en relación con la periodontitis agresiva, la periodontitis crónica y el grupo control.
- Evaluar los parámetros clínicos periodontales IBD, S, PNI, SGS en relación a la presencia de Virus Herpes Simple I, Citomegalovirus y Virus Epstein Barr en los pacientes evaluados.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS:**

### **5.1. Material biológico:**

Se evaluaron muestras de fluido crevicular de pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y del grupo control, que fueron remitidos al Postgrado de Periodoncia de la Facultad Odontología, de la Universidad Central de Venezuela, desde noviembre de 2012 a febrero de 2013. Los pacientes fueron invitados a participar en el estudio, con previa información del diseño y protocolo, el cual fue evaluado y avalado por el Comité de Bioética de la facultad.

### **5.2. Descripción de la muestra:**

La muestra total del estudio fue de 33 pacientes, dividida en 11 casos de periodontitis agresiva, 11 casos de periodontitis crónica y 11 casos de sujetos sin enfermedad periodontal. A cada paciente se le realizó un examen periodontal y radiográfico completo, excluyendo terceros molares, mediante el uso de una sonda periodontal (Universidad Carolina del Norte). Se registraron los siguientes parámetros clínicos periodontales: profundidad de sondaje (S), pérdida del nivel de inserción (PNI), sangrado al sondaje (SGS) e índice de biopelícula dental (IBD).

Se tomaron muestras de fluido crevicular en los sacos periodontales más profundos, en pacientes con periodontitis crónica y agresiva. De los pacientes sin enfermedad periodontal se tomaron muestras de fluido crevicular del surco gingival periodontalmente sano (ausencia de pérdida de inserción y de pérdida ósea).

Para obtener la muestra, se removió la placa dental supragingival con una gasa estéril, se aisló el sitio con algodones y se introdujo una punta de papel estéril hasta el fondo del saco/surco. Las puntas se mantuvieron en su lugar por 20 segundos y fueron transferidas a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se almacenaron a -70°C para hacer el análisis viral. Para la detección de los virus HSV1, CMVH y VEB se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). El procesamiento de las muestras se realizó en el Centro de Biotecnología asociada a la Odontología (CEBAO), del Instituto de Investigaciones Odontológicas Raúl Vincentelli, de la Facultad de Odontología de la UCV.

### **5.3. Criterios de selección:**

#### **Inclusión**

- Paciente venezolano
- Paciente inscrito en la Facultad de Odontología, de la Universidad Central de Venezuela
- Paciente referido al Postgrado de Periodoncia
- Paciente con periodontitis crónica y/o agresiva
- Tener mínimo 16 dientes en boca
- Paciente que aceptara ser incorporado al estudio, firmando un consentimiento informado por escrito

## **Exclusión**

- Pacientes con enfermedad cardiovascular
- Pacientes con diabetes
- Pacientes con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)
- Pacientes embarazadas
- Pacientes fumadores
- Pacientes con tratamiento periodontal previo (cuatro meses)
- Pacientes que hubieran consumido antibióticos previamente (cuatro meses)
- Pacientes que hubieran consumido antiinflamatorios previamente (dos semanas)
- Cada paciente que voluntariamente renunciara al estudio

## **5.4. Modelo del consentimiento informado:**

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

#### **PARA EL ESTUDIO: Detección de Virus Herpes Simple I, Citomegalovirus y Virus Epstein Barr en pacientes con periodontitis crónica y agresiva**

##### **FORMATO PARA EL DONANTE**

**Dirigido a los pacientes diagnosticados con periodontitis crónica y agresiva que serán atendidos desde enero hasta febrero de 2013 en el postgrado de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la UCV, para la entrevista, el examen clínico de la cavidad bucal y toma de muestras microbiológicas.**

Yo (Nombre) \_\_\_\_\_ identificado con CI \_\_\_\_\_ mayor de edad he sido informado(a) sobre el estudio de la Enfermedad Periodontal que se está realizando, que al hallar la presencia de Virus Herpes Simple I, Citomegalovirus y/o Virus Epstein Barr en fluido crevicular, la terapéutica y pronóstico es distinto al que regularmente se realiza, ya que el origen no es totalmente bacteriano, El periodoncista y/u odontólogo tendrá un diagnóstico más certero y le facilitaría la conducta a seguir al detectar estos virus para la evolución satisfactoria del tratamiento. El participante encontrara solución eficaz a su problemática e identificará su enfermedad.

Estoy de acuerdo en forma voluntaria y sin ninguna presión o inducción y autorizo la recolección de datos, toma de muestras, para el diagnóstico y análisis de los datos que son suministrados por mi voluntad.

El sujeto participara en el estudio de la siguiente forma: se le realizará una evaluación periodontal por medio de un sondaje periodontal, periodontodiagrama el cual tendrá un tiempo estimado de quince (15) minutos, la toma de muestra subgingival en fluido crevicular con conos de papel estériles en dos (2) dientes, tiene un tiempo aproximado de cinco (5) minutos para un total de veinte (20) minutos en una sola cita. He comprendido el método para coleccionar los datos y lo haré siguiendo las instrucciones dadas por el (la) odontólogo (a) y la proporcionaré el día y la hora cuando venga a la consulta.

He sido informado sobre el estudio investigativo y este implica riesgos mínimos para mi salud entendidos como: la probabilidad y magnitud del daño o incomodidad anticipados en el procedimiento a emplear no son mayores que aquéllas que se encuentran en la vida diaria o durante la realización de un examen físico o psicológico de rutina. Los investigadores garantizan la confidencialidad y el resguardo de la identidad de mi representado y de la información suministrada. Así como, de la utilización de las muestras diagnósticas y/o registros audiovisuales. El participante esta exonerado de todo pago del estudio. No contempla compensaciones ni indemnizaciones.

El uso que se dará a la investigación sólo se realizará con fines académicos y científicos pudiendo ser presentados en clases, congresos u otros eventos.

Tengo entendido que puedo terminar mi participación como donante en cualquier momento, notificándole al odontólogo (a) y acepto que puedo ser excluido como donante del programa en cualquier momento.

Confirmando que luego que aclararon mis dudas, me siento informado, comprendo la información, libre, sin persuasión, manipulación ni coacción para decidir voluntariamente, con el tiempo suficiente para meditar o consultar la decisión con quien considere pertinente, de acuerdo con mis valores e intereses y me declaro competente para tomar las decisiones que correspondan. En tal sentido DOY MI CONSENTIMIENTO AL FACULTATIVO A REALIZAR EL TRATAMIENTO PERTINENTE \_\_\_\_\_ o NO CONSIENTO \_\_\_\_\_, con el buen entendido que puedo retirar este consentimiento por escrito cuando así lo desee, sin represalia, ni penalidad alguna. Así mismo doy fe de que mi representado FUE ESCUCHADO SI\_\_\_ NO\_\_\_o dio su CONSENTIMIENTO SI\_\_\_ NO\_\_\_.

Nombre del participante en la investigación:

\_\_\_\_\_ CI: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre del representante legal:

\_\_\_\_\_ CI: \_\_\_\_\_

Parentesco: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Nombre de testigo:

\_\_\_\_\_ C.I.: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Nombre de testigo:

\_\_\_\_\_ C.I.: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Caracas, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_\_

## FORMATO PARA PERSONA QUE OBTIENE EL CONSENTIMIENTO

He explicado al participante: \_\_\_\_\_ la naturaleza y objetivo del estudio y que la información voluntaria de datos periodontales no constituye ningún riesgo para él o ella. He contestado y contestaré sus preguntas y le entregado una copia donde se explica el estudio y la importancia de los virus en la etiología de la enfermedad periodontal.

---

Investigador:

**Od. Harold Hernández Mendoza**

**C.I 72334357**

**Celular: 04267173037**

**Postgrado de Periodoncia UCV**

---

Tutora

**Dra. María Correnti**

**C.I 6135878**

**Celular: 04142773504**

**Facultad Odontología UCV**

### **5.5. Reactivos:**

Todas las soluciones que se utilizaron en este proyecto se prepararon con reactivos Grado Biología Molecular, siguiendo las especificaciones de las casas comerciales correspondientes.

### **5.6. Extracción de ácidos nucleicos:**

El aislamiento del material genético se realizó empleando el estuche comercial Pure Link Genomic DNA Kit (Invitrogen), siguiendo las especificaciones de la casa comercial.

Se colocaron los conos de papel en un Eppendorf de 1,5 ml y se añadieron 180  $\mu$ l de Pure Link Genomic Digestion Buffer y 20  $\mu$ l de Proteinasa K. Se mezcló en vórtex durante 10 segundos y se incubó a 55 °C, durante 15 minutos. Luego, se centrifugó a máxima velocidad durante 3 minutos, a temperatura ambiente. Se añadieron 20  $\mu$ l de RNase A y se mezcló brevemente en vórtex. Se incubó a temperatura ambiente, durante 2 minutos. Posteriormente, se añadieron 200  $\mu$ l de Genomic Lysis/Binding Buffer y se mezcló en vórtex durante 10 segundos. Se añadieron 200  $\mu$ l de etanol (96 - 100%) y se mezcló en vórtex durante 5 segundos. El lisado (640  $\mu$ l aprox.) fue transferido a una columna con un tubo colector y se centrifugó a 6.000xg, durante 1 minuto. Se descartó el tubo colector y se colocó uno nuevo. Se añadieron 500  $\mu$ l de Wash Buffer 1 y se centrifugó a 6.000xg, durante 1 minuto. La columna fue transferida a un tubo colector nuevo y se añadieron 500  $\mu$ l de Wash Buffer 2. Se centrifugó a 20.000xg, durante 3 minutos. Se colocó la columna en un Eppendorf de 1,5 ml nuevo y se añadieron 200  $\mu$ l de Genomic Elution Buffer. Se incubó a

temperatura ambiente, durante 1 minuto. Finalmente, se centrifugó a 20.000xg, durante 1 minuto. El eluato obtenido se guardó a -20 °C hasta su posterior estudio.

### 5.7. Calidad del ADN:

La evaluación de la calidad del ADN se llevó a cabo con el protocolo BIOMED-2 de van Dongen y col., 2003, el cual consta de 5 pares de iniciadores de genes control, que amplifican productos de 100, 200, 300, 400 y 600 pb. Los genes blanco se seleccionaron en base a la presencia de exones de gran tamaño con marcos abiertos de lectura, para reducir el riesgo de seleccionar regiones polimórficas <sup>(40)</sup>.

En las tablas 1, 2 y 3 se muestran las secuencias para los iniciadores de cada uno de los genes seleccionados, las condiciones de preparación de la mezcla de reacción y las condiciones del termociclador, respectivamente.

**Tabla 1.- Secuencias de iniciadores del protocolo de calidad de ADN, BIOMED-2.**

GEN	FOWARD	REVERSE	TAMAÑO (pb)
AF4/exón 3 <sup>a</sup>	5'GGAGCAGCATTCCATCCAGC3'	5'CATCCATGGGCCGGACATAA3'	600
AF4/exón 11 <sup>a</sup>	5'CCGCAGCAAGCAACGAACC3'	5'GCTTTCCTCTGGCGGCTCC3'	400
PLZF/exón 1 <sup>b</sup>	5'TGCGATGTGGTCATCATGGTG3'	5'CGTGTCATTGTCGTCTGAGGC3'	300
RAG1/exón 2 <sup>c</sup>	5'TGTTGACTCGATCCACCCCA3'	5'TGAGCTGCAAGTTTGGCTGAA3'	200
TBXAS1/exón 9 <sup>d</sup>	5'GCCCCGACATTCTGCAAGTCC3'	5'GGTGTGCGCGGAAGGGTT3'	100

a: gen AF4 humano (AF4, exón 3, número de entrada en el GenBank: Z83679, exón 11, número de entrada en el GenBank: Z83687); b: gen de la leucemia promielocítica humana (PLZF, exón 1, número de entrada en el GenBank: AF060568); c: gen de activación de la recombinación humana (RAG1, exón 2, número de entrada en el GenBank: M29474); d: gen de la tromboxina sintetasa humana (TBXAS1, exón 9, número de entrada en el GeneBank: D34621).

**Tabla 2.- Condiciones de la mezcla para el protocolo BIOMED-2.**

	<b>Cantidad (μl)</b>
dNTP's (100 mM)	0,4
Iniciador (100 pM)	5
Buffer 10X	6,5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	5
Taq Polimerasa	0,5
H <sub>2</sub> O	27,6
Volumen final	50

**Tabla 3.- Condiciones iniciales del termociclador para el protocolo BIOMED-2 (van Dongen y col., 2003).**

<b>PASO</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>N° DE CICLOS</b>
Preactivación	95	7'	1
Desnaturalización	95	30''	x35
Hibridación	60	40''	
Extensión	70	40''	
Extensión final	70	15'	1
Mantenimiento	4	∞	

### **5.8. Detección de VHS-1:**

La detección de VHS1 se realizó empleando el estuche comercial **Herpes Simplex virus type 1 DNA Polymerase, Primer set Kit** (Maxin Biotech. Inc, CA, USA), siguiendo las especificaciones de la casa comercial. En las tablas, 4 y 5 se muestran los iniciadores incluidos en el estuche comercial, las

condiciones de la mezcla de reacción y las condiciones del termociclador, respectivamente.

**Tabla 4.- Secuencia de los iniciadores para la detección de VHS1.**

<b>Oligo</b>	<b>Secuencia</b>
5'oligo	TACGACGGCAGCAGATCCGCGTC
3'oligo	CCCCCCGGCGCCCCTAAATCG

**Tabla 5.- Condiciones de la mezcla para la detección de VHS1.**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (µl)</b>
Iniciadores	5
Taq polimerasa	0,2
Búffer	25
Agua libre de nucleasas	4,8
Volumen final	35

**Tabla 6.- Condiciones iniciales del termociclador para la detección de VHS1.**

<b>Paso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>N° de ciclos</b>
Preactivación	96	1'	1
Desnaturalización	94	30''	
Hibridación	58	30''	x35
Extensión	72	30''	
Extensión final	72	10'	1
Mantenimiento	4	∞	

Se consideraron positivas sólo aquellas muestras en las que se observó una banda de 105 pb.

### 5.9. Detección de VEB:

La detección de VEB se realizó mediante dos rondas de amplificación con una RCP anidada, empleando los iniciadores mostrados en la tabla 7.

Tabla 7.- Iniciadores para la detección de VEB.

Nombre del iniciador	Secuencia	Ronda de amplificación
W1	5'CTA GGG GAG AAC GTG AA 3'	Primera
W2	5' CTG AAG GTG AAC CGC TTA CCA 3'	Primera
W3	5' GGT ATC GGG CCA GAG GTA AGT 3'	Segunda
W4	5' GCT GGA CGA GGA CCC TTC TAC 3'	Segunda

La primera ronda de amplificación se realizó bajo las condiciones mostradas en las tablas 8 y 9, donde se muestran las condiciones de la mezcla de reacción y del termociclador, respectivamente. Se tomaron 8  $\mu$ l de la muestra para esta primera parte.

**Tabla 8.- Condiciones de la mezcla de la primera ronda de amplificación de la RCP anidada, para la detección de VEB.**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (μl)</b>
Buffer 10X	6
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1
dNTP's (10mM)	2
Taq polimerasa	0,5
Iniciadores W1	0,5
Iniciadores W2	0,5
Agua libre de nucleasas	12
Volumen final	22,5

**Tabla 9.- Condiciones iniciales del termociclador para la primera ronda de amplificación de la RCP anidada, para la detección de VEB.**

<b>Paso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>N° de ciclos</b>
Preactivación	94	4'	1
Desnaturalización	94	45''	
Hibridación	66	30''	x30
Extensión	72	45''	
Extensión final	72	5'	1
Mantenimiento	4	∞	

De este amplificado de RCP se tomaron 3 μl y se agregaron a una segunda mezcla de amplificación, cuyas condiciones se indican en la tabla 10. Las condiciones del termociclador se muestran en la tabla 11.

**Tabla 10.- Condiciones de la mezcla de la segunda ronda de amplificación de la RCP anidada, para la detección de VEB.**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (μl)</b>
Buffer 10X	6
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1
dNTP's (10 mM)	2
Iniciador W3	0,5
Iniciador W4	0,5
Taq Polimerasa	0,5
Agua libre de nucleasas	12
Volumen final	22,5

**Tabla 11.- Condiciones iniciales del termociclador para la segunda ronda de amplificación de la RCP anidada, para la detección de VEB.**

<b>Paso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>N° de ciclos</b>
Preactivación	94	4'	1
Desnaturalización	94	45''	
Hibridación	66	30''	x40
Extensión	72	45''	
Extensión final	72	5'	1
Mantenimiento	4	∞	

Se consideraron positivas sólo aquellas muestras en las que se observó una banda de 192 pb.

### 5.10. Detección de CMVH:

La detección de CMVH se realizó mediante una RCP, empleando el estuche comercial **Virus, Citomegalovirus (CMVH) Major immediately early, Primer set kit** (Maxim Biotech.Inc, CA, USA), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. En las tablas 12, 13 y 14 se muestran los iniciadores incluidos en el estuche comercial, las condiciones de la mezcla de reacción y las condiciones del termociclador, respectivamente.

**Tabla 12.- Secuencia de los iniciadores para la detección de CMVH.**

<b>Oligo</b>	<b>Secuencia</b>
5'Oligo	CCAAGCGGCCTCTGATAACCAAGCC
3'Oligo	CAGCACCATCCTCCTCTTCCTCTGG

**Tabla 13.- Condiciones de la mezcla para la detección de CMVH.**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (<math>\mu</math>l)</b>
Iniciadores	8
Taq polimerasa	0,2
Búffer	25
Agua libre de nucleasas	1,8
Volumen final	35

**Tabla 14.- Condiciones iniciales del termociclador para la detección de CMVH.**

<b>Paso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>N° de ciclos</b>
Preactivación	96	1´	1
Desnaturalización	94	1´	
Hibridación	62	1´	x35
Extensión	72	1´	
Extensión final	72	10´	1
Mantenimiento	4	∞	

Se consideraron positivas sólo aquellas muestras en las que se observó una banda de 435 pb.

#### **5.11. Visualización de los productos de amplificación:**

Los productos de amplificación de la RCP para cada uno de los virus fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con búffer TBE 1X y teñidos con SYBR Safe (Invitrogen). El registro fotográfico se realizó con un fotodocumentador ChemiDoc XRS (BioRad).

#### **5.12. Análisis Estadísticos:**

Para los análisis estadísticos se realizó una prueba  $\chi^2$ , para evaluar la independencia de las variables, con el programa IBM SPSS Statistics, versión 2.0. Valores de  $p$  menores o iguales a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

## **6. Identificación y clasificación de las variables**

Presencia de VHS, CMVH y VEB en fluido gingival

Género

Edad

Índices periodontales

## 7. RESULTADOS:

### 7.1 Población de estudio:

Se tomaron muestras provenientes de fluido crevicular de 33 pacientes, que asistieron a consulta en el Postgrado de Periodoncia de la Facultad de Odontología, de la Universidad Central de Venezuela, durante los meses de Noviembre 2012 a Febrero 2013, este grupo de pacientes fueron incluidos según los criterios de selección del estudio. La población de pacientes atendida fue considerada para la muestra en base al diagnóstico clínico de periodontitis agresiva, periodontitis crónica y sujetos sin enfermedad periodontal. Previo a la toma de muestra, cada paciente firmó un consentimiento informado, aprobado por el comité de bioética de la Facultad de Odontología. El promedio de edad de la población total seleccionada fue de  $36,06 \pm 12,98$  años, con un rango entre los 14 y 61 años. Al realizar la discriminación entre géneros, encontramos que, del total de los pacientes, un 69,70% (23/33) de las muestras provenía de pacientes de género femenino, mientras que el 30,30% (10/33) restante provenía de pacientes de género masculino (Figura 2).

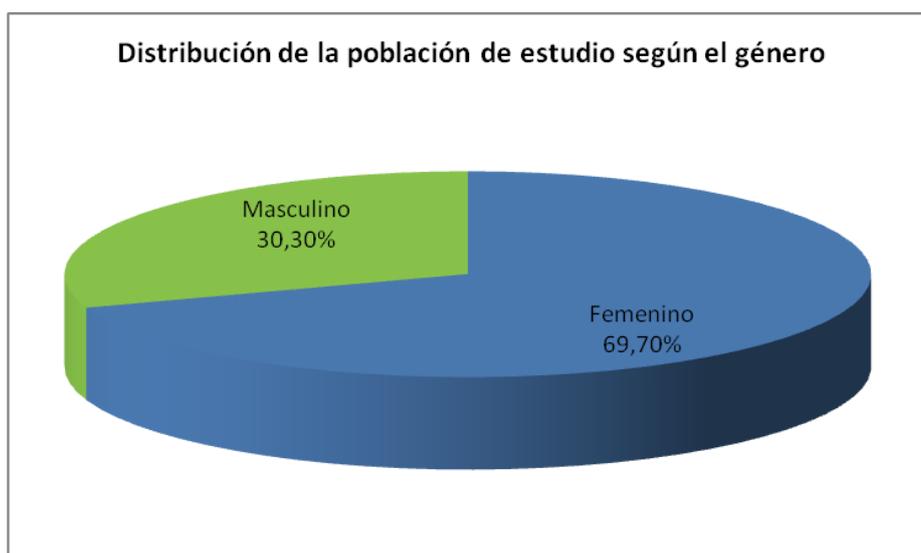


Figura 2.- Distribución de la población de estudio según el género.

## 7.2 Promedios de las edades de los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y el grupo control.

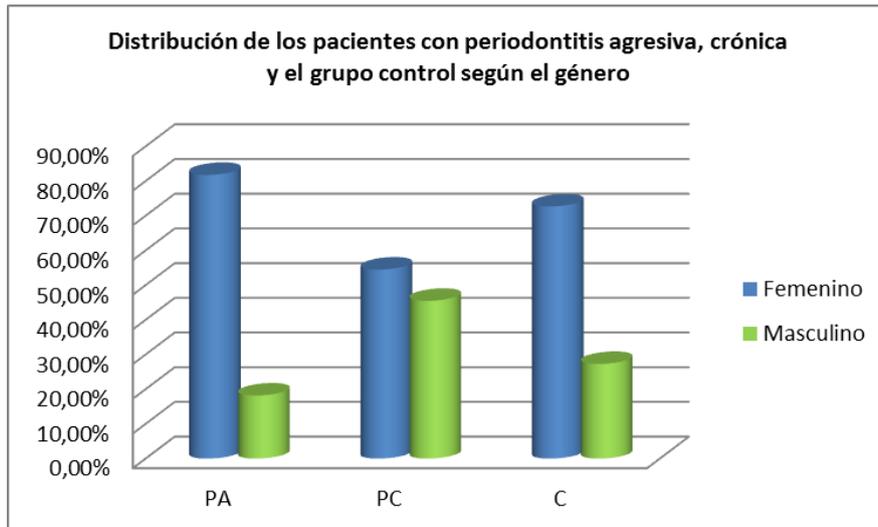
Los promedios de las edades de la población de pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y del grupo control, se muestran en la tabla 15, observándose una varianza amplia, debido al rango de edad de los participantes del estudio.

**Tabla 15.- Promedios de las edades de los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y el grupo control.**

Grupos de Estudio	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.	Varianza
Periodontitis Agresiva	11	14	39	24,27	7,669	58,818
Periodontitis Crónica	11	29	58	43,82	11,107	123,364
Control	11	28	61	40,09	10,977	120,491

## 7.3 Distribución de los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y el grupo control, según el género.

La distribución de los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y el grupo control, según el género se muestra en la figura 3, donde se observa que la mayor proporción de los participantes pertenecía al género femenino.

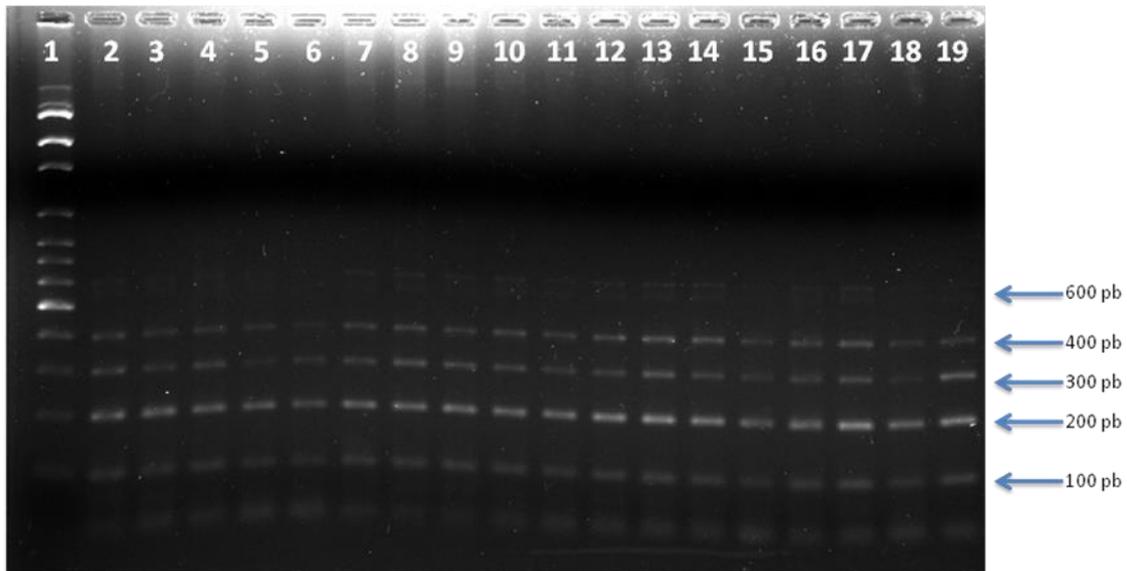


**Figura 3.- Distribución de los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y el grupo control, según el género.**

#### **7.4 Procesamiento de las muestras:**

##### **7.4.1 Evaluación de la calidad del ADN provenientes de las muestras de pacientes:**

Para la obtención del material genético a partir de las muestras de fluido crevicular, de cada uno de los grupos de estudio, se realizó una extracción basada en una lisis alcalina. Posterior a la extracción del ADN, se evaluó la calidad del mismo mediante el protocolo BIOMED-2 <sup>(40)</sup>, para la amplificación, mediante una RCP, de 5 genes control (Tabla 1). En la figura 4 podemos observar que tanto las muestras de pacientes con periodontitis, como aquellas de los individuos sanos amplificaron todos los genes blanco, indicando que el material genético obtenido, luego de la extracción, estaba en condiciones óptimas para la detección posterior de los genomas virales correspondientes, evitando así falsos negativos.

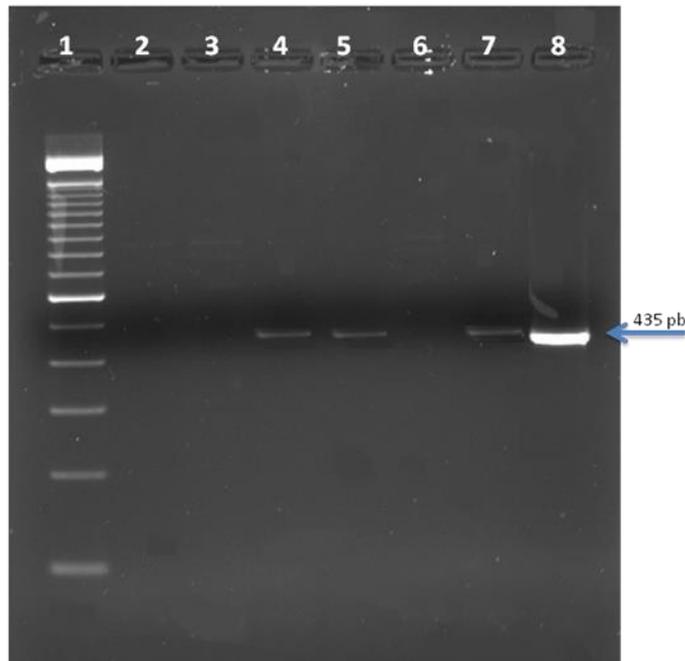


**Figura 4.- Gel de agarosa para la visualización de la calidad del ADN extraído de las muestras de pacientes con periodontitis y sujetos controles, con el protocolo BIOMED-2. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2 – 12: ADN de muestras de pacientes con periodontitis, carril 13 - 19: ADN de muestras de sujetos sanos**

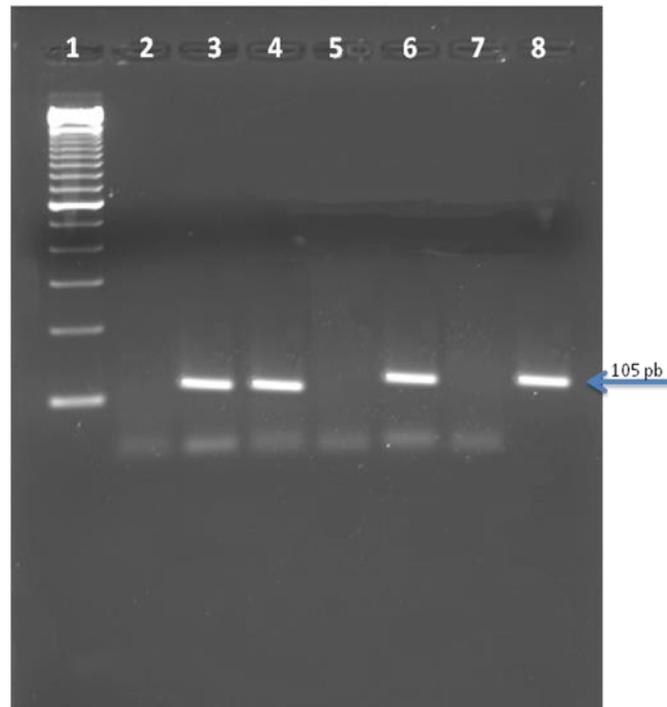
### **7.5 Detección molecular de los genomas de CMVH, VHS-1 y VEB en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control:**

Luego de ser evaluada la calidad del ADN de las muestras, se realizó la detección del genoma de CMVH, VHS-1 y VEB, mediante una RCP con iniciadores específicos (Tablas 4, 7, 12), para cada uno de los grupos de estudio, donde se incluyeron pacientes con periodontitis agresiva, pacientes con periodontitis crónica y individuos periodontalmente sanos.

En las figuras 5, 6 y 7, se muestran los registros fotográficos de los gels de agarosa para cada uno de los virus estudiados. En el caso de CMVH se amplificó una banda única de 435 pb (Figura 5). Para VHS-1, la banda amplificada fue de 105 pb (Figura 6) y la de VEB, de 192 pb (Figura 7).



**Figura 5.- Gel de agarosa para la visualización de los amplificados de CMVH. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control negativo, carriles 3 y 6: muestras negativas para la presencia del genoma viral, carril 4, 5 y 7: muestras positivas para la presencia del genoma viral, carril 8: control positivo.**



**Figura 6.- Gel de agarosa para la visualización de los amplificados de VHS-1. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control negativo, carriles 5 y 7: muestras negativas para la presencia del genoma viral, carril 3, 4, y 6: muestras positivas para la presencia del genoma viral, carril 8: control positivo.**

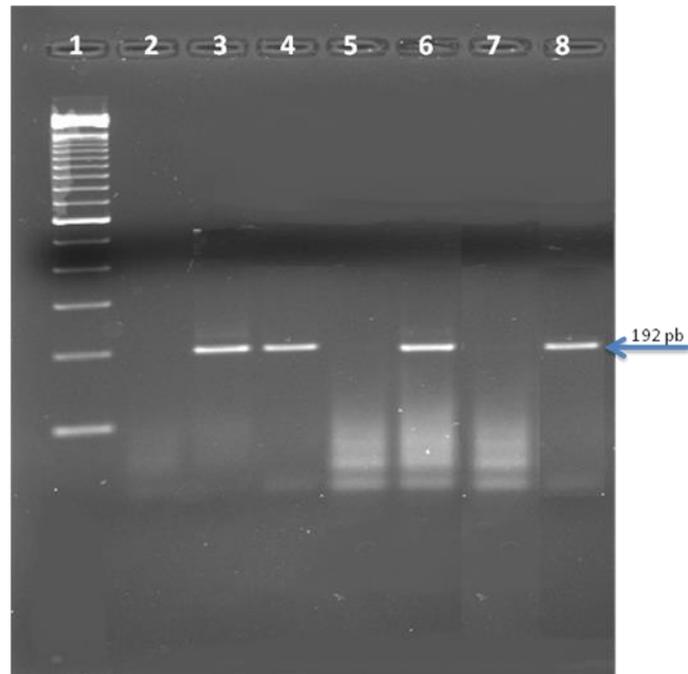


Figura 7.- Gel de agarosa para la visualización de los amplificados de VEB. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control negativo, carriles 5 y 7: muestras negativas para la presencia del genoma viral, carril 3, 4, y 6: muestras positivas para la presencia del genoma viral, carril 8: control positivo.

## 7.6 Diagnóstico molecular de la infección por Herpesvirus en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control

En la tabla 16 se muestra el porcentaje de positividad para cada uno de los virus, según el grupo de estudio correspondiente, indicándose los valores de  $p$ , luego de la realización de la prueba estadística ( $p < 0,05$ ). Para el grupo de periodontitis agresiva, el porcentaje de infección viral fue de 27,3% (3/11) para CMVH, de 27,3% (3/11) para VHS-1 y 0% para VEB. Para el grupo de periodontitis crónica, el porcentaje de infección viral fue de 0% para CMVH, de 27,3% (3/11) para VHS-1 y 18,2% (2/11) para VEB. Finalmente, para el grupo control, el porcentaje de infección viral fue de 0% para CMVH, de 9,1% (1/11) para VHS-1 y 9,1% (1/11) para VEB.

**Tabla 16.- Frecuencia de detección de Herpesvirus en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control.**

Virus	Periodontitis Agresiva		Periodontitis Crónica		Control		Valor p	Chi <sup>2</sup>
	+	-	+	-	+	-		
	(N) %	(N) %	(N) %	(N) %	(N) %	(N) %		
<b>CMVH</b>	(3)27,3	(8)72,7	0	(11)100	0	100	0,037*	6,600
<b>VHS-1</b>	(3)27,3	(8)72,7	(3)27,3	(8)72,7	(1)9,1	(10)90,9	0,484	1,451
<b>VEB</b>	0	(11)100	(2)18,2	(9)81,8	(1)9,1	(10)90,9	0,333	2,200

\*(p≤0,05)

### **7.7 Detección molecular de la coinfección viral en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control**

Al evaluar la presencia de infecciones mixtas en los grupos de estudio (Tabla 17), encontramos un 18,18% (2/11) de coinfección viral entre CMVH y VHS-1, dentro del grupo de la periodontitis agresiva, y un 9,09% (1/11) de coinfección viral entre VHS-1 y VEB, dentro del grupo de la periodontitis crónica.

**Tabla 17.- Prevalencia de la coinfección viral con Herpesvirus en los sacos periodontales, de los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control.**

Coinfección viral	Periodontitis Agresiva		Periodontitis Crónica	
	N (11)	%	N (11)	%
CMVH + VHS-1	2	18,18	0	0
VHS-1 + VEB	0	0	1	9,09

### 7.8 Relación de la infección viral con los grupos de estudio y el género en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control:

Luego de realizar la detección viral, se quiso establecer una posible relación en cuanto al grupo de estudio y el género de los pacientes. En la tabla 18 se muestran los porcentajes de positividad para cada uno de los Herpesvirus trabajados, según el género, por cada grupo de estudio. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Se puede observar que la mayor proporción de pacientes positivos para los virus estudiados, pertenecía el género femenino, lo cual podría asociarse a que el 69,70% (23/33) eran mujeres.

**Tabla 18.- Relación de la infección viral, según el grupo de estudio y el género de los en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control.**

Grupos de Estudio	Género	Frecuencia	CMVH		VHS1		VEB							
			(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)						
			N	%	N	%	N	%	N	%				
P.A	F	9	3	33,3	6	66,7	3	33,3	6	66,7	0	-	2	100
	M	2	0	-	2	100	0	-	2	100	1	50	1	50
P.C	F	6	0	-	6	100	3	50	3	50	1	16,7	5	83,3
	M	5	0	-	5	100	0	-	5	100	1	20,0	4	80,0
C	F	8	0	-	8	100	1	12,5	7	87,5	1	12,5	7	87,5
	M	3	0	-	3	100	0	-	3	100	0	-	3	100

P.A: periodontitis agresiva; P.C: periodontitis crónica; C: control.

### **7.9 Promedio general de los parámetros clínicos, en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control:**

A cada paciente se le realizó una evaluación intrabucal, donde se registraron los siguientes parámetros clínicos: índice de biopelícula dental (IBD), profundidad de saco periodontal (S), pérdida del nivel de inserción (PNI) y sangrado al sondaje (SGS) para determinar el diagnóstico y clase de enfermedad periodontal. En la tabla 19, se muestran los promedios de cada uno de estos parámetros, según el grupo de estudio. Podemos observar como los valores en la periodontitis agresiva, para el S y PNI, son más elevados con respecto a la periodontitis crónica y el grupo control. El SGS y el IBD se mantienen dentro de un mismo rango, entre los grupos.

**Tabla 19.- Promedio general de los parámetros clínicos, en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control.**

	<b>S (mm)</b>	<b>PNI (mm)</b>	<b>SGS</b>	<b>IBD</b>
PA	9,45±2,38	8,45±2,42	0,90±0,30	2,36±0,50
PC	4,72±1,27	4,63±1,36	1±0	2,72±0,78
Control	1,72±0,64	1,36±0,50	0,09±0,30	0,36±0,50

P.A: periodontitis agresiva; P.C: periodontitis crónica; S: profundidad de sondaje; PNI: pérdida del nivel de inserción; SGS: sangrado al sondaje; IBD: índice de biopelícula dental.

### **7.10 Comparación de los parámetros clínicos con la presencia de CMVH, en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control:**

Al evaluar la relación de los parámetros clínicos con la presencia del grupo de los Herpesvirus, según el grupo de estudio, podemos observar que en el caso de los pacientes positivos para CMVH (Tabla 20), los promedios de los parámetros estuvieron levemente elevados, a excepción del SGS.

**Tabla 20.- Comparación de los parámetros clínicos con la presencia de CMVH, en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control.**

Índices	CMVH	P.A			P. C			C		
		N	Promedio	Valor p	N	Promedio	Valor p	N	Promedio	Valor p
<b>S</b>	+	3	9,3 ± 1,15	0,752	0	0	-	0	0	-
	-	8	9,1 ± 2,84		11	4,72 ± 1,27		11	1,72 ± 0,64	
<b>PNI</b>	+	3	8,66 ± 1,52	0,639	0	0	-	0	0	-
	-	8	7,89 ± 2,97		11	4,63 ± 1,36		11	1,36 ± 0,50	
<b>SGS</b>	+	3	0,66 ± 0,57	0,087	0	0	-	0	0	-
	-	8	1 ± 0		11	1 ± 0		11	0,09 ± 0,30	
<b>IBD</b>	+	3	2,4 ± 0,55	0,898	0	0	-	0	0	-
	-	8	2,33 ± 0,5		11	2,27 ± 0,78		11	0,36 ± 0,50	

P.A: periodontitis agresiva; P.C: periodontitis crónica; C: control; S: profundidad de sondaje; PNI: pérdida del nivel de inserción; SGS: sangrado al sondaje; IBD: índice de biopelícula dental.

### **7.11 Comparación de los parámetros clínicos con la presencia de VHS1, en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control**

La relación entre la infección por VHS-1 (Tabla 21) y los parámetros clínicos no se presentaron diferencias significativas. Con respecto a la periodontitis agresiva y el grupo control, el promedio de dichos parámetros se vio disminuido en los pacientes positivos, en comparación a aquellos en los que no se detectó la presencia viral. Para la periodontitis crónica, los parámetros que se vieron incrementados en las muestras positivas fueron S e IBD, en el resto, se observó una relación inversa.

**Tabla 21- Comparación de los parámetros clínicos con la presencia de VHS1, en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control.**

Índices	VHS1	P.A			P. C			C		
		N	Promedio	Valor p	N	Promedio	Valor p	N	Promedio	Valor p
<b>S</b>	+	3	9 ± 1	0,583	3	5,33 ± 1,52	0,781	1	1 ± 0	0,382
	-	8	9,62 ± 2,77		8	4,5 ± 1,19		10	1,8 ± 0,63	
<b>PNI</b>	+	3	7,67 ± 1,15	0,266	3	3,33 ± 1,15	0,292	1	1 ± 0	0,428
	-	8	8,75 ± 2,76		8	5,12 ± 1,12		10	1,4 ± 0,51	
<b>SGS</b>	+	3	0,66 ± 0,57	0,087	3	1 ± 0	-	1	0	0,740
	-	8	1 ± 0		8	1 ± 0		10	0,1 ± 0,31	
<b>IBD</b>	+	3	2,33 ± 0,57	0,898	3	2,66 ± 0,57	0,557	1	0	0,428
	-	8	2,37 ± 0,51		8	2,12 ± 0,83		10	0,4 ± 0,51	

P.A: periodontitis agresiva; P.C: periodontitis crónica; C: control; S: profundidad de sondaje; PNI: pérdida del nivel de inserción; SGS: sangrado al sondaje; IBD: índice de biopelícula dental.

### **7.12 Comparación de los parámetros clínicos con la presencia de VEB, en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control:**

La comparación de los parámetros clínicos con la infección por VEB (Tabla 22), en el grupo con periodontitis crónica, mostró un incremento del promedio de S, en aquellos pacientes positivos, el resto de los parámetros presentó una relación inversa. Con respecto al grupo control, el promedio de todos los parámetros se vio disminuido en los pacientes positivos, en comparación a aquellos en los que no se detectó la presencia viral.

**Tabla 22.- Comparación de los parámetros clínicos con la presencia de VEB, en los pacientes con periodontitis agresiva, periodontitis crónica y grupo control.**

Índices	VEB	P.A			P. C			C		
		N	Promedio	Valor p	N	Promedio	Valor p	N	Promedio	Valor p
<b>S</b>	+	0	0	-	2	5,5 ± 2,12	0,520	1	1 ± 0	0,382
	-	11	9,45 ± 2,38		9	4,55 ± 1,13		10	1,8 ± 0,63	
<b>PNI</b>	+	0	0	-	2	4 ± 0	0,569	1	1 ± 0	0,428
	-	11	8,45 ± 2,42		9	4,77 ± 1,48		10	1,4 ± 0,51	
<b>SGS</b>	+	0	0	-	2	1 ± 0	-	1	0	0,740
	-	11	0,90 ± 0,30		9	1 ± 0		10	0,1 ± 0,31	
<b>IBD</b>	+	0	0	-	2	2 ± 0	0,118	1	0	0,428
	-	11	2,36 ± 0,50		9	2,33 ± 0,86		10	0,4 ± 0,51	

P.A: periodontitis agresiva; P.C: periodontitis crónica; C: control; S: profundidad de sondaje; PNI: pérdida del nivel de inserción; SGS: sangrado al sondaje; IBD: índice de biopelícula dental.

## 8. DISCUSIÓN

Kirkwood y col., en el 2010, definen a la enfermedad periodontal como una respuesta inflamatoria de los tejidos periodontales, inducida por microorganismos en la placa dental, que conlleva a la destrucción de tejidos, a la pérdida ósea y con el tiempo, a la pérdida dental <sup>(6)</sup>.

Actualmente, la podemos definir como una enfermedad infecciosa multifactorial, que afecta progresivamente los tejidos de soporte de la estructura dentaria; caracterizada por la presencia de lesiones gingivales inflamatorias, la formación de sacos periodontales y la pérdida de hueso alveolar <sup>(7)</sup>.

Estos conceptos usan palabras como infecciosa y multifactorial, los cuales dejan abierta una ventana a la participación de otros elementos infecciosos como los virus, ya que no especifican los microorganismos involucrados en la periodontitis.

Investigaciones recientes han propuesto que los virus de la familia *Herpesviridae* son los que están más relacionados con la enfermedad periodontal, demostrándose una posible asociación con la presencia de CMVH, VHS 1 y VEB en los tejidos periodontales, biopelícula dental, fluido crevicular y saliva, con la etiopatogenia de la periodontitis <sup>(41,42)</sup>.

Dentro de las evidencias que soportan la relación de los virus con la enfermedad periodontal, se presentan una serie de mecanismos virales que son claves en el desarrollo de la periodontitis. Los virus son capaces de producir un daño local en el tejido periodontal, por un efecto lítico directo. En el caso particular de los Herpesvirus, estos pueden ocasionar efectos citopáticos

directamente sobre los fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, células inflamatorias, como los leucocitos PMN, linfocitos y macrófagos, y probablemente, sobre células óseas <sup>(43)</sup>. CMVH infecta células endoteliales, fibroblastos y el epitelio de las glándulas salivales. Además, CMVH y VHS pueden destruir fibroblastos infectados *in vitro* y producir pérdida de sustancia epitelial, especialmente en sujetos inmunosuprimidos <sup>(44)</sup>.

Los Herpesvirus también actúan a través del papel que juegan en el sistema de defensa del hospedero, siendo capaces de alterar tanto, la respuesta celular, como la humoral. Pueden influir en la producción de citocinas, modulando de esta manera la respuesta inmune del hospedero frente al ataque viral. Además, la infección por CMVH aumenta la secreción de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  por parte de los monocitos y macrófagos, jugando un papel importante en la periodontitis, debido a su habilidad de causar inflamación, inducir la resorción ósea e interferir con la formación del colágeno. Aunado a esto, CMVH y VEB pueden interferir con la recuperación en la terapia periodontal regenerativa, tal vez debido a la liberación de dichas citocinas o por la infección de los fibroblastos periodontales <sup>(1, 43)</sup>.

A pesar que existen reportados numerosos estudios acerca de la relación de los Herpesvirus con la periodontitis, los resultados son muy controversiales, ya que en algunos no se han encontrado un porcentaje de positividad significativo, o simplemente, no han detectado la presencia de las secuencias virales en las muestras estudiadas.

Tal es el caso de Watanabe y col; en el 2007, quienes trabajaron con 30 pacientes brasileiros, con diagnóstico de PA, detectando la presencia de CMVH

solo en un 6% del total de la muestra <sup>(45)</sup>. Rotola y col; 2008, en Italia, no encontraron la presencia de CMVH en biopsias de tejido gingival de 27 pacientes con periodontitis <sup>(46)</sup>. Por su parte, en el 2013, en Alemania, Stein y col; trabajaron con 65 muestras de biopelícula dental, tomadas de pacientes con PA y de 65 sujetos controles, reportando apenas una positividad del 1,5% para CMVH y VHS-1, tanto en los pacientes, como en los controles; mientras que para VEB fue de 10,8% y 13,9, respectivamente <sup>(47)</sup>.

Sin embargo, la mayoría de los trabajos que encontramos reportados en la literatura, nos llevan a pensar en una posible relación de los Herpesvirus con la enfermedad periodontal. Estas investigaciones comenzaron desde la década de los 90 y desde entonces, se ha reportado un porcentaje de positividad muy amplio para la infección viral. En el caso de CMVH lo encontramos entre 20 – 70%, para VEB entre 14 – 70% y para VHS-1 entre 7 – 90%, a nivel mundial <sup>(38)</sup>.

En este estudio determinamos una relación estadísticamente significativa para el grupo de periodontitis agresiva, siendo el porcentaje de infección viral de 27,3% para CMVH, mientras que en el grupo de PC y GC fue de 0%. En cuanto a la relación entre la infección viral con los grupos de estudio y los parámetros clínicos, los valores en la periodontitis agresiva, de S y PNI, son más elevados con respecto a la PC y el GC.

Con estos resultados podemos indicar que la presencia de CMVH podría estar asociada con la enfermedad periodontal, particularmente con la periodontitis agresiva, ya que fue el único grupo de estudio donde se detectó la presencia del genoma de este virus de la familia *Herpesviridae*, resultado que coincide

con lo reportado por Kamma y col., en 2004<sup>(48)</sup>, donde en 16 pacientes con PA, observaron una relación significativa con la presencia de CMVH y VEB en las muestras del estudio. Además, los parámetros clínicos periodontales como SGS fueron más elevados en la PA.

Por otro lado, Ting y col., en el año 2000, en EE.UU estudiaron 11 pacientes con PA, entre los 10 a 23 años de edad. Mediante el uso de la RCP, detectaron el genoma de VHS-1, VEB-1, VEB-2 y CMVH, De las 11 muestras periodontales profundas, 72,7% mostraron la presencia de CMVH, 63,6% de VEB-1, 18,2% de VEB-2, 54,5% VHS-1 y 72,7% mostraron co-infección viral. De las 11 muestras en sacos periodontales de poca profundidad, 18,2% mostraron la presencia de CMVH, 18,2% de VEB-1, 9,1% de VHS-1 y 18,2% mostraron co-infección viral. La diferencia en la ocurrencia de CMVH y la co-infección viral entre los sacos periodontales profundos y poco profundos fue estadísticamente significativa <sup>(32)</sup>.

Yapar y col., en 2003, examinaron 17 pacientes con PA y 16 individuos sanos, en una población griega, para detectar CMVH y VEB-1, en placa dental. Reportaron la presencia de CMVH en un 64,7% y de VEB-1 en un 70,6% en pacientes con PA, y un 0% y 6%, respectivamente, en sujetos sanos, confirmando una relación de CMVH con la PA <sup>(34)</sup>.

En Colombia, Botero y col., en 2008, estudiaron 33 pacientes con periodontitis, 28 con PC, 5 PA y 24 sujetos sin periodontitis. Detectaron la presencia de CMVH y de microorganismos periodontopáticos subgingivales. La frecuencia de detección de CMVH fue de 60% en pacientes con periodontitis, en contraste con un 4,1% en los sujetos periodontalmente sanos. El número promedio de

copias de CMVH fue de 635,6 copias/ $\mu$ L en periodontitis vs  $6,45 \times 10^{-04}$  copias/ $\mu$ L en sujetos sanos. Los parámetros periodontales SGS, S y PNI estuvieron aumentados en pacientes positivos para CMVH, así como la infección por *P. gingivalis* y *T. forsythia*. Los promedios de edades según el grupo de estudio estuvieron en rangos similares al nuestro, el grupo de PC con un promedio de edad 43,2 años; PA con un promedio de edad 24,8 años y el GC con un promedio de edad de 30,8 años <sup>(36)</sup>.

En la India, Bilichodmath y col., en 2009, detectaron VHS-1 y 2, VEB y CMVH en sacos periodontales de 33 pacientes hindúes, 19 con PC y 14 con PA. En los casos de PC se detectó la presencia de VHS-1, VHS-2, VEB y CMVH en un 100%, 15,7%, 78,9% y 26,31%, respectivamente. En cuanto a las muestras de pacientes con PA se detectó la presencia de VHS-1, VEB y CMVH en un 57,14%, 28,57% y 7,14%, respectivamente. Los autores destacan que dentro de la población estudiada, encontraron la presencia de Herpesvirus asociado con mayor frecuencia a la PC, sugiriendo que su prevalencia puede variar según la edad y el grupo étnico del paciente <sup>(49)</sup>.

Sharma y col., en el 2012, detectaron la presencia de CMVH y VEB, en muestras de biopelícula dental, de 60 pacientes, divididos en 3 grupos de 20, para PA, PC y grupo control, cada uno. Reportaron una frecuencia de positividad para CMVH y VEB de un 45% en el grupo de PA, y de un 20 y 25%, respectivamente, en el grupo de PC. Para el grupo control, reportaron una frecuencia de 10% para CMVH y de 0% para VEB <sup>(50)</sup>. En otro estudio, Das y col., evaluaron la relación entre la periodontitis y la presencia de CMVH, VEB, VHS-1 y VHS-2, en 10 pacientes, entre los 18 y 55 años. Reportaron una frecuencia de positividad para VHS-1, VEB y CMVH de 80%, 32% y 12%,

respectivamente, en los casos de PA; y de 76%, 32% y 28%, respectivamente, para los casos de PC <sup>(51)</sup>.

Al evaluar la presencia de infección mixta, dentro de nuestra población estudiada, reportamos un 18,18% para CMVH y VHS-1, en los casos de PA, y de un 9,09% para VHS-1 y VEB, en los casos de PC. La agrupación de los 3 virus no se encontró en ninguna de las muestras de los pacientes con PA y PC.

Mientras que Bilichodmath y col; encontraron en pacientes con PC un 78,9% de infección mixta entre VHS-1 y VEB, y un 31,5% entre VHS-1 y CMVH. En el grupo de PA detectaron 28,5% de combinación viral entre VHS-1 y VEB, y un 7.1% entre VHS-1 y CMVH <sup>(49)</sup>.

Al evaluar la relación de los parámetros clínicos con la presencia del grupo de los Herpesvirus observamos como los valores en la periodontitis agresiva, para el S y PNI, fueron más elevados con respecto a la periodontitis crónica y el grupo control. El SGS y el IBD se mantuvieron dentro de un mismo rango, entre los grupos.

Según el grupo de estudio, se observó que para el caso de CMVH los promedios estuvieron levemente elevados en aquellos pacientes positivos para la infección viral, con respecto a la periodontitis agresiva, a excepción del SGS, pudiendo sugerir que la presencia de CMVH afecta los parámetros clínicos.

Botero y col., encontraron que el IBD y SGS, en sujetos con PC, fue mayor que en el grupo PA y GC. Los pacientes con PA, presentaron mayor PNI (7.5 mm) que el grupo PC y GC. Al análisis de los parámetros clínicos de acuerdo a la detección de CMVH, observaron que sujetos con periodontitis positivos para

este virus presentaron mayor PNI en los sitios infectados. Incluso, sujetos periodontalmente sanos presentaron una tendencia a mayor PNI en sitios infectados. De igual forma, el SGS fue mayor en pacientes con periodontitis positivos para CMVH, en comparación con los sujetos CMVH negativos <sup>(36)</sup>.

Imbronito y col. 2008a; obtuvieron que el IBD y PNI de los grupos de PA y de PC fueron significativamente más altos que del control. Al realizar comparaciones entre los grupos PA y PC, encontraron que IBD y PNI fueron significativamente mayores en el grupo de PA, en comparación al grupo del PC <sup>(37)</sup>.

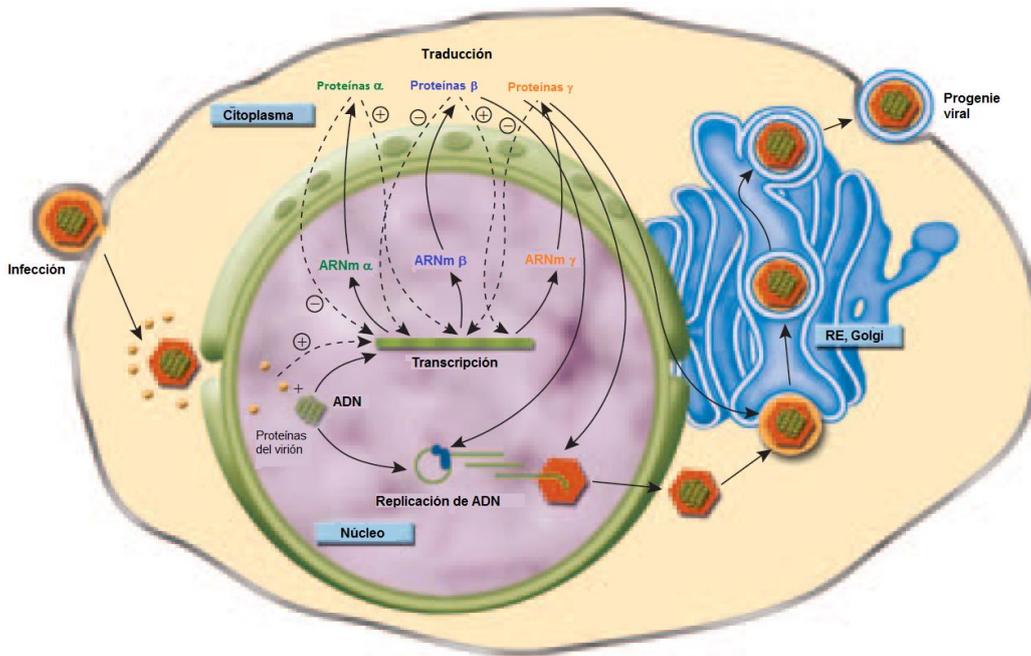
Das y col., en el 2012, reportan que los valores para S y PNI estuvieron incrementados, en aquellos sitios positivos para la presencia de VHS-1, en pacientes con PA, en comparación con aquellos sitios negativos <sup>(51)</sup>.

Según lo revisado en la literatura internacional, muchos son los reportes acerca de la infección viral asociada con la enfermedad periodontal. Si bien es cierto que algunos de estos trabajos presentan variación entre ellos, esta podría deberse al número de muestras y tipo de estudio realizado, a la sensibilidad y especificidad de las técnicas diagnósticas, y finalmente, a la distribución geográfica de estos virus en la población mundial, al nivel socioeconómico de los pacientes y a la predisposición genética, según el origen de la población.

En el modelo propuesto por Slots y Contreras <sup>(43)</sup>, la infección con Herpesvirus en los tejidos periodontales puede ser importante en la patogénesis de la periodontitis, gracias a la alteración de la respuesta local del hospedero, combinado con la presencia de otros patógenos periodontales. Contreras y col.,

en 1999, demostraron la asociación entre CMVH y EBV-1, con varias bacterias patógenas periodontales <sup>(28)</sup>.

Los herpes virus pueden incrementar la patología periodontal mediante dos vías, la primera mediante la infección viral directa y la replicación (Figura 8), la cual está organizada en fases temporales, identificadas con las letras  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , que corresponden a la fase inmediatamente temprana, temprana y tardía, respectivamente. Los genes  $\alpha$  codifican varios reguladores de la expresión genética, los  $\beta$  codifican para proteínas requeridas durante la replicación del ADN y los genes  $\gamma$  producen las proteínas estructurales para la formación de la cápside viral. La expresión de los genes es regulada por una cascada de señalización, donde el producto genético de la primera fase activa la transcripción de los genes de la segunda fase y a su vez, estos inhiben a los genes de la primera. La segunda vía involucra daños virales a las defensas del hospedero y por evasión del sistema inmune. Ambas vías pueden ocasionar la disminución de la capacidad de reparación tisular por los efectos citopáticos, ocasionados directamente sobre las células inflamatorias y estructurales. Todo esto puede conllevar a una sobreinfección bacteriana. Por otro lado, las proteínas virales expresadas en las membranas de las células eucariotas pueden actuar como receptores bacterianos y generar nuevos sitios de unión, que puede favorecer a la progresión de la patología periodontal <sup>(52,53)</sup>.



**Figura 8.- Ciclo de vida del Virus Herpes Simple 1.** Las 3 fases sucesivas de expresión genética se identifican con las letras  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , correspondiente a los genes inmediatamente tempranos (IE), tempranos (E) y tardíos (L). Las flechas sólidas indican el flujo del material, las flechas punteadas indican los efectos reguladores sobre la expresión genética, el signo + indica activación, y el signo - represión. Modificado de <sup>(53)</sup>.

El número de bacterias subgingivales peridontopatógenas en la periodontitis probablemente está elevado debido a la infección viral activa, la cual disminuye las defensas inmunológicas del tejido periodontal. La presencia del virus en los tejidos periodontales podría explicar varias características de la enfermedad periodontal, como:

- La naturaleza progresiva circunstancial de la enfermedad periodontal, gracias a la inmunosupresión local transitoria dependiendo de la infección viral activa o latente.
- La presencia de patrones localizados de destrucción tisular, por el tropismo viral

- Individuos que son portadores de bacterias periodontopatógenas y que aun así, son periodontalmente sanos debido a la ausencia de infección viral <sup>(52)</sup>.

En los últimos 15 años, se ha propuesto que CMVH puede ser un participante en la patogénesis de la enfermedad periodontal, ha sido encontrado como uno de los virus más frecuentemente detectados en pacientes con periodontitis, en comparación con sujetos sanos, debido a que este virus ha desarrollado varias estrategias para evadir la respuesta inmune del hospedero, así como para aprovechar dicha respuesta y lograr su reactivación <sup>(36)</sup>.

Todos estos trabajos que indican que los Herpesvirus están asociados con el inicio y progresión de la enfermedad periodontal, ofrecen una hipótesis que explica los efectos periodontopáticos de estos virus. Con esta información esperamos incorporar nuestros conocimientos clínicos acerca de las consecuencias de la periodontitis, con los conocimientos moleculares asociados a los mecanismos de destrucción tisular por parte de los virus, necesitándose el desarrollo de nuevos estudios para establecer el papel de la familia *Herpesviridae* en la periodontitis.

## 9. CONCLUSIONES

- El promedio de edad de la población total seleccionada fue de  $36,06 \pm 12,98$  años, con un rango entre los 14 y 61 años.
- Para el grupo de periodontitis agresiva, el porcentaje de infección viral fue similar para la infección por CMVH y VHS-1, mientras que no se observó infección por VEB.
- Para el grupo de periodontitis crónica, el porcentaje de infección viral fue más alto para VHS-1, menor para VEB y no se observó infección por CMVH.
- Para el grupo control, no se observó infección por CMVH y valores bajos similares se detectaron para VHS-1 y VEB.
- Se detectó coinfección viral entre CMVH y VHS-1, dentro del grupo de la periodontitis agresiva.
- Se detectó la presencia de coinfección viral entre VHS-1 y VEB, dentro del grupo de la periodontitis crónica.
- Los parámetros clínicos se observaron incrementados en aquellos pacientes positivos para la infección viral, en el grupo de periodontitis agresiva.

## 10. RECOMENDACIONES

Al detectar Citomegalovirus, Virus Herpes Simple I y Virus Epstein Barr en fluido gingival se plantean las siguientes recomendaciones para la formación de residentes en periodoncia y la atención de pacientes con periodontitis crónica y agresiva:

- ✓ Los odontólogos-Periodoncistas deben tener en cuenta a estos virus en la etiopatogenia de la enfermedad periodontal y darle la importancia que se merece en el diagnóstico clínico periodontal.
- ✓ Hacer uso de los medios diagnósticos moleculares disponibles para la detección de Virus Herpes Simple I, Citomegalovirus y Virus Epstein Barr en enfermedad periodontal, especialmente en los casos de periodontitis refractaria para un completo diagnóstico, pronóstico y plan de tratamiento.
- ✓ Incluir en la historia clínica periodontal la pregunta de antecedentes de VHS y mononucleosis, y dar las indicaciones pertinentes al paciente que se le detecta estos virus de evitar contactos directos bucales y/o salivales con las personas cercanas, especialmente con niños.
- ✓ Continuar los estudios e investigaciones de la relación etiológica de la enfermedad periodontal con los virus, utilizando los medios diagnósticos como RCP convencional y en tiempo real, disponibles hoy en día en el área de biología molecular, a fin de optimizar el diagnóstico de esta patología.
- ✓ Incluir en el pensum del Postgrado de Periodoncia el área de Biología Molecular, teórico-práctica, relacionado con los distintos métodos utilizados para detección e identificación de agentes virales, para ampliar el conocimiento de la relación de la enfermedad periodontal con los virus (CMVH, VHS, VEB).

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Echeverría A, Vignoletti F, Fabrizi S, Matesanz P. Papel etiológico de los virus en la enfermedad periodontal. *Av Periodon Implantol.* 2007; 19(2): 91-99.
2. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J. Periodontol.* 1965; 35:177-187
3. Loesche W. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev.* 1976; 9: 65.
4. Marsh P, Martin M. Oral Microbiology Wright. England. Fourth edition. 2000.
5. Kinane D, Lindhe J. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica, Editorial Médica Panamericana. México. Cuarta edición. Cap 8, P220-221. 2005.
6. Kirkwood K. Periodontología Clínica Carranza, Mc. Graw- Hill. México. Décima edición, Cap 12, P209. 2010.
7. Cruz L. Impacto de la infección por Herpes Virus en la etiología de la Enfermedad Periodontal, Caracas Venezuela, 2008, 94P. Trabajo Especial de Grado, Especialista en Periodoncia Universidad Central de Venezuela, Facultad de Odontología.
8. 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.
9. Lindhe J, Ranney R, Lamster I, Charles A, Chung C, Flemmig T, et al. Consensus Report: Chronic Periodontitis. *A Periodontol.* 1999; 4(1): 38.
10. Olarte C, Ortega C. Enfermedad periodontal: una nueva clasificación. *Rev Fed Odontol Colomb.* 2002; 202: 10 – 30.

11. Lang N, Bartold P, Cullinan M, Jeffcoat M, Mombelli A, Murakami S, et al. Consensus Report: Aggressive Periodontitis. *A Periodontol.* 1999; 4(1): 53.
12. Contreras A, Slots J. Herpesviruses in human periodontal disease. *J Periodontol Res.* 2000; 35:3-16.
13. Bascones-Martínez A, Pousa-Castro X. Herpesvirus. *Avances en Odontoestomatol.* 2011; 27: 11-24.
14. Sapp P, Eversole L, Wysocky G. Patología Oral y Maxilofacial Contemporánea. Harcourt Brace. Madrid. Primera edición. 1998.
15. Carmona O, Gómez M, Montes T, Mercano C, Mariño R. Microbiología Médica de Divo. Mc. Graw- Hill. Santafé de Bogotá. Quinta Edición. 1997.
16. Regezi J, Sciubba J. Patología Bucal. Mc. Graw- Hill. México. 1999.
17. Zakay-Rones Z, Ehrlich J, Hochman N, Levy R. The sulcular epithelium as a reservoir for Herpes Simplex Virus in man. *J Periodontol.* 1973; 44:779-781.
18. Gordon G, Uhlenhof C, Baer P, Baron S. Studies of Herpes Simplex Virus and Interferon in human gingival cell cultures. *J Periodontol.* 1974; 46:86-89.
19. McLennan J, Darby G. Herpes Simplex Virus latency: the cellular location of virus in dorsal root ganglia and the fate of the infected cell following virus activation. *J Gen Virol.* 1980; 51: 233-243.
20. Zakay-Rones Z, Hochman N, Rones Y. Immunological response to Herpes Simplex Virus in human gingival fluid. *J Periodontol.* 1981; 53:42-45.
21. Hochman N, Rones Y, Ehrlich J, Levy R, Zakay-Rones Z. Antibodies to Herpes Simplex Virus in human gingival fluid. *J Periodontol.* 1981; 52: 324-326.
22. Rones Y, Hochman N, Ehrlich J, Zakay-Rones Z. Sensitivity of oral tissues to Herpes Simplex Virus-in vitro. *J Periodontol.* 1982; 54: 91-95.

23. Honess R. Herpes Simplex and "the Herpes complex" Diverse Observations and a unifying hypothesis. *J Gen Virol.* 1984; 65: 2077-2107.
24. Kameyama T, Sujaku C, Yamamoto S, Hwang C, Shillitoe E. Shedding of Herpes Simplex Virus type 1 into saliva. *J Oral Pathol.* 1988; 17: 478-481.
25. Ehrlich J, Cohen G, Hochman N. Specific Herpes Simplex Virus antigen in human gingival. *J Periodontol.* 1982; 54: 357-359.
26. Contreras A, Slots J. Mammalian viruses in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1996; 11: 381-386.
27. Contreras A, Flakler W, Enwonwu C, Idigbe E, Savage K, Afolabi M, et al. Human Herpesviridae in acute necrotizing ulcerative gingivitis in children in Nigeria. *Oral Microbiol Immunol.* 1997; 12: 259-265.
28. Contreras A, Umeda M, Chen C, Bakker I, Morrison J, Slots J. Relationship between Herpesviruses and adult periodontitis and periodontopathic bacteria. *J Periodontol.* 1999; 70: 478-484.
29. Contreras A, Slots J. Herpesviruses in human periodontal diseases. *J Periodont Res.* 1999; 35: 3-16.
30. Contreras A, Zadeh H, Nowzari H, Slots J. Herpesviruses infection of inflammatory cells in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2000; 14: 206-212.
31. Parra B, Slots J. Detections of human viruses in periodontal pockets using polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol.* 1996; 5: 289-93.
32. Ting M, Contreras A, Slots J. Herpesviruses in localized juvenile periodontitis. *J Periodont Res.* 2000; 35: 17-25.
33. Saygun I, Sahin S, Ozdemir A, Kurtis B, Yapar M, Kubar A, et al. Deteccion of human viruses in patients with chronic periodontitis and the relationship

- between viruses and clinical parameters. *J Periodontol.* 2002; 73(12): 1437-1443.
34. Yapar M, Saygun I, Ozdemir A, Kubar A, Sahin S. Prevalence of human herpesviruses in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2003; 74(11):1634-1640.
35. Saygun I, Kubar A, Ozdemir A, Slots J. Periodontitis lesions are a source of salivary Cytomegalovirus and Epstein–Barr virus. *J Periodont Res.* 2005; 40: 187–191.
36. Botero J, Parra B, Contreras A. Citomegalovirus y microorganismos periodontopáticos subgingivales en periodontitis crónica y agresiva. *Rev Odon Mex.* 2008; 12: 70-75.
37. Imbronito A, Okuda O, De Freitas N, Fraga R y Daumas F. Detection of Herpesviruses and periodontal pathogens in subgingival plaque of patients with chronic periodontitis, generalized aggressive periodontitis, or gingivitis. *J Periodontol.* 2008; 79: 2313-2321.
38. Slots J, Slots H. Bacterial and viral pathogens in saliva: disease relationship and infectious risk. *Periodontol 2000.* 2011. 55: 48–69.
39. Eres G, Altıok E, Ozkul A, Açikel C. Subgingival Epstein Barr and Cytomegalovirus occurrence in pregnancy gingivitis. *J Periodontol.* 2011; 82(12): 1676 – 1684.
40. Van Dongen J, Langerak A, Brüggemann M, Evans P, Hummel M, Lavender F, et al. Design and standardization of RCP iniciadores and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4 CT98-3936. *Leukemia.* 2003, 17: 2257–2317.

41. Hilders I. Relación entre el grupo de virus de la familia *Herpesviridae* y la Enfermedad Periodontal, Caracas Venezuela, 2002, 85-94P. Trabajo Especial de Grado, Especialista en Periodoncia Universidad Central de Venezuela, Facultad de Odontología.
42. León M, Radovan M. Relación entre los Herpes Virus y la Periodontitis. *Form Odontol.* 2004, 2(2): 210-215.
43. Slots J, Contreras A. Herpesviruses: a unifying causative factor in periodontitis?. *Oral Microbiol Immunol.* 2000, 15: 277–280.
44. Mardirossian A, Contreras A, Navazesh M, Nowzari H, Slots J. Herpesviruses 6, 7 and 8 in HIV and non-HIV associated periodontitis. *J Periodont Res.* 2000; 35:278-284.
45. Watanabe S, Correia J, Rebello M, Da costa J, Gomez R. EBV 1 and HCMV in aggressive periodontitis in Brazilian patients. *Braz Oral Res.* 2007; 21(4):336-341
46. Rotola A, Cassai E, Farina R, Caselli E, Gentili V, Lazzarotto T, et al. Human herpesvirus 7, Epstein–Barr virus and human cytomegalovirus in periodontal tissues of periodontally diseased and healthy subjects. *J Clin Periodontol.* 2008; 35: 831–837.
47. Stein J, Said S, Kleines M, Ok D, Kasaj A, Reichert S, et al. Failure to detect an association between aggressive periodontitis and the prevalence of herpesviruses. *J Clin Periodontol* 2013; 40: 1–7.
48. Kamma J, Contreras A, Slots J. Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset forms of periodontal disease. *J Periodontol Res.* 2004, 39: 81-86.

49. Bilichodmath S, Mangalekar S, Sharma D, Prabhakar A, Reddy S, Kalburgi N, et al. Herpesviruses in chronic and aggressive periodontitis patients in an indian population. *J Oral Sci.* 2009; 51: 79-86.
50. Sharma R, Padmalatha O, Kaarthikeyan G, Jayakumar N, Varghese S, Sherif K. Comparative analysis of presence of Cytomegalovirus (CMV) and Epsteinbarr virus -1 (EBV-1) in cases of chronic periodontitis and aggressive periodontitis with controls. *Indian J Dent Res.* 2012; 23:454-458.
51. Das S, Prakash S, Gopalakrishnan S. Detection of Human Herpes Viruses in patients with chronic periodontitis and relationship between viruses and clinical parameters. *J Oral Maxillofac Path.* 2012; 16(2): 203 – 209.
52. Bader N, Ivić-Kardum M. The role of Cytomegalovirus infection in the pathogenesis of periodontal diseases. *Acta Clin Croat.* 2011; 50:61-66.
53. Dimmock N, Easton A, Leppard K. Introduction to Modern Virology. Blackwell Publishing. UK. 6ta edición. 2007.