



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

ÁREA DE LA SALUD HUMANA CARRERA DE ODONTOLOGÍA

Título

“DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE MICROORGANISMOS PERIODONTOPATÓGENOS EN PACIENTES ALCOHÓLICOS - FUMADORES CON PERIODONTITIS CRÓNICA, PERTENECIENTES A UN CENTRO DE REHABILITACIÓN DE LA CIUDAD DE LOJA, EN EL PERIODO MARZO – JULIO 2015”

Tesis previa a la obtención del Título de Odontóloga

Autora:

Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

Directora de tesis:

Odt. Esp. Susana Patricia **González** Eras

Docente investigadora:

Dra. Loidy Zamora Gutiérrez

Loja – Ecuador
2015

CERTIFICACIÓN

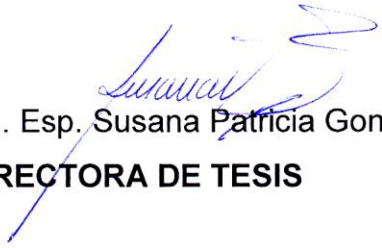
Od. Esp. Susana Patricia González Eras

**DOCENTE DE LA CARRERA DE ODONTOLOGÍA DE
LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Y DIRECTORA
DE TESIS**

Certifico:

Que la presente tesis titulada **“DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE MICROORGANISMOS PERIODONTOPATÓGENOS EN PACIENTES ALCOHÓLICOS - FUMADORES CON PERIODONTITIS CRÓNICA, PERTENECIENTES A UN CENTRO DE REHABILITACIÓN DE LA CIUDAD DE LOJA, EN EL PERIODO MARZO – JULIO 2015”**, realizada por la Srta. Alexandra Johanna Aguilar Betancourt, ha sido prolijamente dirigida y revisada, por lo tanto apruebo su estructura y contenido, la misma que reúne los requisitos que exige el reglamento de la Universidad Nacional de Loja, certificando su autenticidad y por lo tanto autorizo su presentación.

Loja, 04 de noviembre del 2015


Od. Esp. Susana Patricia González Eras
DIRECTORA DE TESIS

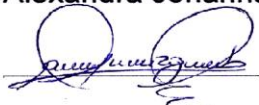
AUTORÍA

Yo, Alexandra Johanna Aguilar Betancourt, declaro ser autora del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio institucional – Biblioteca Virtual.

AUTORA: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

FIRMA:



CÉDULA: 1104433741

FECHA: 04 de noviembre del 2015

CARTA DE AUTORIZACIÓN

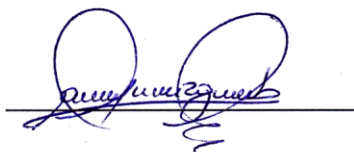
Yo, Alexandra Johanna Aguilar Betancourt, declaro ser autora de la tesis titulada **“DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE MICROORGANISMOS PERIODONTOPATÓGENOS EN PACIENTES ALCOHÓLICOS - FUMADORES CON PERIODONTITIS CRÓNICA, PERTENECIENTES A UN CENTRO DE REHABILITACIÓN DE LA CIUDAD DE LOJA, EN EL PERIODO MARZO – JULIO 2015”**, como requisito para optar al título de Odontóloga; autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la reproducción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en la redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por la copia o plagio de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los cuatro días del mes de noviembre del dos mil quince, firma la autora.

FIRMA:



AUTORA: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

CÉDULA: 1104433741

DIRECCIÓN: Loja, Ciudadela “La Esmeralda del Norte”

CORREO ELECTRÓNICO: johalexa88@gmail.com

TELÉFONO: 072540827 **CELULAR:** 0992308059

DATOS COMPLEMENTARIOS:

DIRECTORA DE TESIS: Od. Esp. Susana Patricia González Eras

TRIBUNAL DE GRADO: Dra. Deisy Patricia Saraguro Ortega

Odt. Esp. Andrea María Jiménez Ramírez

Dra. Ana María Granda Loaiza

DEDICATORIA

Desde el fondo de mi alma dedicó el presente trabajo de tesis a mis padres quienes me dieron la vida, educación, apoyo y consejos. A mi abuelito Juan Rodolfo que siempre me ha motivado con su ejemplo y su confianza incondicional. A mis familiares, pacientes, doctores, amigos y a mi novio que han sido motivadores de mi superación y me han ayudado a alcanzar con éxito mi más grande propósito, sin su ayuda nunca hubiera podido hacer esta tesis.

Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

AUTORA

AGRADECIMIENTO

Primeramente me gustaría agradecerle Dios, porque hiciste realidad este sueño anhelado. A mis padres que siempre han estado orgullosos y ahora sé que lo estarán aún más; ellos que han sido mi motor al inculcarme valores y demostrarme que todo esfuerzo tiene su recompensa con el fin de que culmine esta etapa de mi vida, han estado siempre junto a mí, en todo momento con aquella palabra de aliento cuando me sentía derrotada y sin ganas de seguir, gracias a ellos mi esfuerzo ahora es demostrado al estar a un paso de ser profesional.

Así mismo les doy las gracias a mis hermanos Juan, Julia y Daniela por apoyarme siempre en cada paso que daba, por cada consejo y cada gesto de cariño. Tampoco puedo dejar de agradecer a mi querida prima Evelyn que sin ella no hubiera sabido que después de cada tropiezo existe una luz al final del camino.

A la universidad, en cuyas aulas aprendí a crecer ética e intelectualmente; y como no a cada uno de los docentes que han colaborado con un granito de arena, con su amistad, apoyo y conocimiento logrando en mí, la perseverancia, para llevar a cabo mi meta y servir a la sociedad en cualquier situación y lugar.

De igual forma mi agradecimiento y gratitud para aquellas personas que contribuyeron de alguna u otra manera con sus conocimientos para poder salir adelante con el presente tema de investigación.

Y finalmente a Loidy Zamora y a mi directora de tesis, Susana González, que son las personas que más me han ayudado, al brindarme su apoyo incondicional en toda circunstancia.

LA AUTORA

a. TÍTULO

“DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE MICROORGANISMOS
PERIODONTOPATÓGENOS EN PACIENTES ALCOHÓLICOS -
FUMADORES CON PERIODONTITIS CRÓNICA, PERTENECIENTES A UN
CENTRO DE REHABILITACIÓN DE LA CIUDAD DE LOJA, EN EL PERIODO
MARZO – JULIO 2015”.

b. RESUMEN

El presente trabajo investigativo es de enfoque cuantitativo, de tipo exploratorio, descriptivo, de diseño no- experimental y corte transversal. Se determinó la presencia de los microorganismos periodontopatógenos: *Porphyromona gingivalis* (*Pg*), *Treponema denticola* (*Td*), *Tannerella forsythia* (*Tf*), *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) a través de la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en pacientes alcohólicos - fumadores que reciben atención en la Comunidad Terapéutica con diagnóstico de periodontitis crónica.

Así, se encontró que según el grado de alcoholismo y tabaquismo, los pacientes alcohólicos - fumadores de la Comunidad Terapéutica con periodontitis crónica, presentan con mayor frecuencia *Tannerella forsythia* (91,13%), seguida de *Treponema denticola* (56,5%) y en todos los pacientes *Fusobacterium nucleatum* (100%), los mismos que se encontraron en un 56,52% en el grupo de alcohólicos de riesgo, y en un 39,13% en el de fumadores leves. La presencia de *Aa* en un 21,7 %, y *Pg* en menor cantidad en un 13% son indicativos de una periodontitis netamente agresiva.

Concluyendo que los microorganismos periodontopatógenos en estudio están presentes, comprobados con la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Además se pudo evidenciar claramente que los pacientes diagnosticados con periodontitis crónica y bolsas iguales a 6mm, pueden o no presentar todos los microorganismos periodontopatógenos en estudio; así como también se puede aseverar que basta que sólo uno de los microorganismos este presente para que exista la inflamación del periodonto de inserción y de protección.

Palabras Claves: PCR - *Porphyromona gingivalis* - *Treponema denticola* - *Tannerella forsythia* - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* - *Fusobacterium nucleatum*

ABSTRACT

The main objective of this work is to determine the presence of periodontopathogens microorganisms: *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Treponema denticola* (*Td*), *Tannerella forsythia* (*Tf*), *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) through the polymerase chain reaction test (PCR) in alcoholic smokers patients diagnosed with chronic periodontitis, who are provided with special care at the therapeutic community of Loja city.

In this way, it was found that alcoholic smokers patients diagnosed with chronic periodontitis of the Therapeutic Community depending on the degree of alcohol and tobacco, frequently present *Tannerella forsythia* (91.13%), followed by *Treponema denticola* (56.5%) and in all patients *Fusobacterium nucleatum* (100%), these ones were found in a 56.52% inside the risk group of alcoholics, and in 39.13% in the light smokers group. The presence of *Aa* 21.7%, and a smaller quantity of *Pg* 13% it was noticed too. These percentages indicate us that it is present a purely aggressive periodontitis.

To conclude it can be mentioned that the periodontopathogens microorganisms in study appear at the moment that the polymerase chain reaction test (PCR) was made (PCR). Besides it could clearly demonstrate that patients diagnosed with chronic periodontitis and the ones who have bags equal to 6mm may or may not present all periodontopathogens microorganisms under study, as well as, it can be asserted that the presence of only one microorganisms is enough to allow inflammation of the protection and insertion periodontium.

Keywords: PCR - *Porphyromonas gingivalis* - *Treponema denticola* - *Tannerella forsythia* - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* - *Fusobacterium nucleatum*

c. INTRODUCCIÓN

El consumo de alcohol y el tabaquismo, es considerado en la actualidad como un problema de salud pública de creciente preocupación, hoy son más las personas que ingresan a este mundo ya que existe una gran facilidad para conseguirlas y su abuso es más común en hombres que en mujeres (Domínguez, et.al., 2001).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que 2000 millones de personas en todo el mundo consumen alcohol, siendo Ecuador una de las naciones que más alcohol ingiere con un índice de 7,2 %. El abuso del consumo de alcohol y de tabaco afecta al individuo a nivel social, económico, psíquico, intelectual y particularmente a nivel de la salud bucal (OMS, 2015).

En nuestro país mueren a causa del consumo del tabaco aproximadamente 11 personas cada día y existen miles de enfermos crónicos y con discapacidades a causa de ésta adicción. En la ciudad de Loja, el consumo del alcohol es del 20,86% y de tabaco es un 23%(WHO, 2014).

Las enfermedades periodontales en los alcohólicos se asocian con la falta de higiene oral y por la carencia de atención dental (Tezal *et al.*, 2001). Mientras que los fumadores tienen cinco veces más probabilidad de desarrollar enfermedad periodontal severa que los no fumadores (Bergström, 2004).

La enfermedad periodontal se caracteriza por la inflamación de los tejidos de soporte y protección de los dientes, la cual es provocada por el biofilm dental, produciendo que cada vez más exista un desequilibrio entre los microorganismos potencialmente patógenos y la eficacia de la respuesta de acogida (Donlan, 2002).

El alcohol tiene efectos en la cavidad bucal, produciendo cáncer en la orofaringe, caries, pérdida de dientes y mayor riesgo de problemas periodontales incluyendo gingivitis, aumento de profundidad de las bolsas periodontales y pérdida de inserción (Tezal, et. al., 2001).

Existe una relación en cuanto a dosis- efecto y tiempo de consumo de tabaco, es así que a partir de 10 cigarros/día, cada cigarrillo extra aumenta la recesión gingival en un 2,3%, la profundidad de bolsa en un 0,3%, los niveles de inserción en un 0,5%, así como la movilidad (Bergström, 2004).

El World Workshop del Clinical Periodontics describió que los colonizadores primarios son principalmente bacterias gram positivas unidos a antígenos de las proteínas de la saliva. Después de cuatro horas de una limpieza profesional, en la superficie dental del 60 al 90% se coloniza por bacterias del género *Streptococcus*, siendo en siete días predominantes y después a las dos semanas abundan los colonizadores secundarios (*Fusobacterium nucleatum*). Resultando que los agentes inductores de la enfermedad periodontal son las especies anaeróbicas (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) (Socransky, 2003).

Aunque el diagnóstico clínico y radiológico han sido durante mucho tiempo las técnicas rutinarias. La identificación microbiológica de las mismas cambia mucho el plan de tratamiento, por lo cual se hace necesario la incorporación de técnicas de diagnóstico microbiológico más sensibles y específicas que nos permitan identificar qué especies bacterianas están presentes realmente para un tratamiento certero (Escribano, 2005).

En los últimos tiempos se han desarrollado varios métodos para el diagnóstico microbiológico, siendo la Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR) una de las más importantes, cuya principio es amplificar secuencias específicas de ADN. Esta reacción se lleva a cabo a través de ciclos de temperatura con iniciadores específicos utilizando una enzima ADN polimerasa. Los productos de esta amplificación son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa utilizando luz azul o ultra violeta (Álvarez, 2011).

d. REVISIÓN DE LITERATURA

1 Capítulo: Periodontitis crónica

1.1 Periodonto sano

“La palabra periodonto etimológicamente proviene del latín peri (alrededor) y del griego odonto (diente), es decir son los tejidos que rodean y soportan los dientes el mismo está compuesto por encía, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar” (Lindhe, Karring , & Lang, 2009, pág. 3).

1.1.1 Encía.

Es una fibromucosa que cubre los procesos alveolares y rodea los dientes, se presenta de color rosáceo opaco, con contorno y forma bien definidos, consistencia firme y rugosidades superficiales punteadas; además es la parte de la mucosa masticatoria que rodea al cuello de los dientes cubriendo los rebordes alveolares, en dirección oclusal termina en el margen gingival o cuello clínico del diente y en dirección apical se continúa con la mucosa vestibular (Bottino, 2008, pág. 24).

Bottino (2008) distribuye en diferentes porciones a la encía las que se describen a continuación:

Encía Marginal: Es una superficie lobulada y lisa que corresponde a la encía no insertada que rodea a los dientes separada de la encía insertada, por el surco gingival, forma la pared externa del mismo.

Encía Insertada: Es la continuación de la encía marginal, la cual es firme, y fuertemente unida al cemento y hueso alveolar subyacentes; la encía insertada vestibular es punteada y se continúa con la mucosa alveolar, relativamente floja y móvil, de la que está separada por la línea mucogingival, mientras que el lado palatino o lingual ésta finaliza en su unión con la mucosa que tapiza el surco sublingual en el piso de la boca.

Surco gingival: Es una hendidura virtual situada entre el diente y la encía marginal con una profundidad de 1 a 2 mm en caras libres y de 1 a 3 mm en

caras proximales, clínicamente sólo es apreciable usando una sonda periodontal.

Encía o Papila interdental: Es la parte de la encía que encontramos en el espacio interdental, de forma piramidal y está formada por encía marginal e insertada en cantidades variables.

1.1.2 Ligamento periodontal.

Lindhe (2001) lo define como un conjunto de fibras que le brindan soporte al diente fijándose por un lado en el hueso alveolar y por el otro en el cemento del mismo, además forman, nutren e inervan al cemento y al hueso. Las fibras gingivales determinan la forma, consistencia y color, clasificándose de la siguiente manera:

Grupo I Cresto dentales: se insertan en el cemento apicalmente con respecto a la unión cemento – adamantina (cuello anatómico) y se dirigen a la cresta alveolar, cuya función es resistir los movimientos de tracción.

Grupo II Horizontales: parten del cemento al hueso perpendicularmente a la raíz del diente y su función es resistir las fuerzas laterales (estabilizadoras).

Grupo III Oblicuas: van del hueso, apicalmente al cemento en dirección contraria al grupo I y su función es resistir los movimientos de intrusión del diente generados mayormente por las fuerzas axiales de la masticación y la deglución.

Grupo IV Apicales: son los haces radiales alrededor del forámen apical siendo la función la protección del paquete vasculonervioso.

Grupo V Interradiculares: se disponen desde el centro de la zona interradicular a la cresta del septum paralelas al eje mayor del diente, se abren en abanico y su función es proteger la impactación de la cresta del septum en el espacio interradicular del elemento dentario en cada movimiento de intrusión que supone cada acto masticatorio.

1.1.3 Hueso alveolar.

El tejido óseo que contiene alvéolos o cavidades donde van alojadas las raíces de las piezas dentarias se denomina hueso alveolar, está conformado por dos clases de hueso: compacto (que corresponde a una lámina dura, densa o corteza ósea) y trabeculado (esponjoso, criboso o trabecular), éste tiene múltiples y pequeñas perforaciones por donde pasan los vasos sanguíneos, nervios y vasos linfáticos. Está compuesto por un 75% de hidroxapatita, fosfatos y calcio; y, un 25% de colágeno, el fragmento de hueso que queda entre un alvéolo y otro adyacente se denomina cresta o séptum interdental o interalveolar, mientras que las porciones óseas que cubren las superficies bucales y linguales son llamadas tablas óseas bucales y linguales respectivamente (Lindhe, et al., 2009, pág. 3).

1.1.4 Cemento radicular.

Es el tejido conectivo mineralizado formado por un 65% de hidroxapatita y fosfatos de calcio, un 23 % de fibras colágenas y un 12 % de agua, siendo el más externo de la superficie radicular y comparte con el hueso características similares como la composición química y la dureza, posee gran capacidad de regeneración por la presencia de células ubicadas en el ligamento periodontal, y recubre las superficies radiculares, sin inervación, ni reabsorción ni remodelación fisiológica pero si se va depositando durante toda la vida (Lindhe, et al., 2009, pág. 3).

1.2 Enfermedad periodontal

1.2.1 Concepto.

Las principales patologías periodontales son la gingivitis y la periodontitis, se caracterizan por ser infecciones que causan la pérdida progresiva de los tejidos de soporte y de protección del diente (encía, ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar), producidas por grupos específicos de microorganismos que colonizan la superficie dental y el espacio subgingival (Armitage G. , 1999). La periodontitis es una enfermedad inflamatoria de los tejidos soporte de los dientes causada por microorganismos específicos que

producen la destrucción progresiva del ligamento periodontal y el hueso alveolar con formación de bolsa, recesión o ambas (Carranza, Newman, & Takei, 2004, págs. 71-90).

1.2.2 Etiopatogénesis de la enfermedad periodontal.

Las periodontitis son una familia de patologías que difieren en su etiología, historia natural, progresión y respuesta al tratamiento, pero que tienen en común otros procesos, como las vías de destrucción tisular o las características histopatológicas o ultraestructurales. Siendo las causantes del inicio y perpetuación de la infección cierto grupo de bacterias gram-negativas, anaerobias o microaerófilas a través de sus antígenos, lipopolisacáridos y otros factores de virulencia provocan la respuesta inflamatoria inmediata e inmune, tanto innato como específico, del hospedador (Page & Kornman, 1997, págs. 9-11).

Los factores como el hospedador, la herencia genética, el tabaco y otros factores de riesgo determinan si la enfermedad ocurre, y en qué grado de severidad, obteniendo que menos del 20% de la variabilidad en la expresión de las periodontitis puede ser explicado por los niveles de bacterias específicas, por todo esto, se dice que las periodontitis son enfermedades multifactoriales, ya que el inicio, la manifestación y progresión de la infección va a estar influenciada por diferentes factores (Negroni, 1999, pág. 260).

Estudios (Kaur, et. al., 2010; Rodríguez, 2011; Sakki y cols. 2013) evidenciaron que la Organización Mundial de la Salud estima que 2000 millones de personas en todo el mundo consumen alcohol y 76.3 millones el tabaco, siendo el tabaco el principal factor de riesgo ambiental y el segundo factor modificable más importante, para el desarrollo de enfermedad periodontal, aumentando así el riesgo de padecerla entre 2,5 a 6 veces. Mientras que el consumo de bebidas alcohólicas diarias desde 3,5 a 10g, es un indicador de riesgo independiente y modificable, estando relacionado con la presencia de bolsas periodontales mayores a 4mm.

La acción de los anticuerpos y polimorfonucleares contra las bacterias, la producción de citoquinas, prostaglandinas, metaloproteinasas y la activación del complemento provocan la destrucción del tejido conectivo y óseo, destrucción que ocasiona cambios macroscópicos (signos clínicos), como la pérdida de inserción y el aumento de la profundidad al sondaje; modificando el ambiente, favoreciendo así las condiciones ideales para la supervivencia y mantenimiento del biofilm subgingival. Frente a esto resulta una respuesta inmune que controla a los microorganismos acumulados en el surco periodontal, de forma silenciosa y sin expresar signos clínicos inflamatorios evidentes a simple vista, conforme progresa el proceso inflamatorio éste se vuelve crónico y comienza la degradación de los tejidos de soporte (formación de bolsa periodontal, pérdida de inserción clínica y pérdida ósea). Tanto la respuesta inflamatoria, inmune y la destrucción tisular están influenciadas por factores de riesgo genéticos, ambientales y adquiridos (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2007).

1.2.3 Factores de riesgo.

“El factor de riesgo es un aspecto de la conducta o un estilo de vida, exposición ambiental o característica congénita o hereditaria, de la que se sabe, por la evidencia epidemiológica, que está asociada con la enfermedad” (Page & Kornman, 1997, pág. 10).

Dentro de los factores de riesgo para la enfermedad periodontal están:

Tabaco: El tabaco está relacionado con un riesgo 5 veces mayor de padecer periodontitis clínicamente detectable, los mecanismos por los que puede tener estos efectos es por la producción disminuida de los niveles plasmáticos de inmunoglobulina G2 y altera la función de los leucocitos polimorfonucleares, su uso produce alteraciones en la cicatrización, en el sistema inmune y en la respuesta inflamatoria (Borrell & Papapanou, 2005, pág. 133).

Diabetes mellitus: Aquellos sujetos con diabetes mellitus (tipo I y tipo II) mal controlada presentan un mayor riesgo de padecer enfermedad periodontal, con

una mayor prevalencia de bolsas periodontales profundas y mayor pérdida de hueso alveolar (Guzman, Karima, Wang, & Van Dyke, 2003, pág. 1185).

Estrés: Es considerado un indicador de riesgo, al igual que los individuos con depresión debido a su enfermedad presentan comportamientos con conductas no saludables (como hábitos de higiene oral inadecuados, dietas cariogénicas) (Heitz-Mayfield, 2005, pág. 200).

Factores de respuesta del huésped: Si la respuesta inmune del huésped se encuentra alterada, existe un mayor riesgo de desarrollar periodontitis, y ésta se presenta de forma más extendida y avanzada; en los individuos infectados con VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana), su sistema inmune es más deprimido, mostrando formas más avanzadas e inusuales de periodontitis y una velocidad en la pérdida de inserción (Borrell & Papapano, 2005, pág. 140).

Presencia de determinadas bacterias: Es el factor desencadenante y de progresión de las enfermedades periodontales, ciertas especies bacterianas se han asociado a una mayor prevalencia y a una mayor velocidad en la progresión de la periodontitis, entre estas especies bacterianas caben destacar: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromona gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia* (Borrell & Papapanou, 2005, pág. 143).

Nivel de higiene oral: La cantidad de biofilm que se encuentra sobre el diente está directamente relacionada con el nivel de higiene oral, por lo que es posible predecir que el nivel de higiene oral de una población está relacionada positivamente con la prevalencia y avance de las enfermedades periodontales en la misma (Albandar & Tinoco , 2002, pág. 177).

Edad: La prevalencia, extensión y grado de avance en la pérdida de inserción periodontal se incrementa según la edad de los sujetos; las periodontitis iniciales son más prevalentes en las personas jóvenes, mientras que las periodontitis moderadas y avanzadas aumentan su prevalencia en el grupo alrededor de los 65 años, permaneciendo estables hasta los 80 años (Albandar & Tinoco , 2002, pág. 182).

Sexo: Es mayor el riesgo en los hombres posiblemente por los malos hábitos de higiene oral, a factores asociados con el comportamiento, a factores psicológicos, hormonales, y otros (Paulander, Axelsson, Lindhe, & Wennstrom, 2004, pág. 204).

Nivel socioeconómico: El nivel socioeconómico, incluyendo ingresos, nivel de educación y estatus urbano, es un indicador de riesgo para la enfermedad periodontal, siendo los niveles más desfavorecidos los que presentan un mayor riesgo (Albandar & Tinoco , 2002, pág. 171).

Factores locales: La presencia de restauraciones con márgenes mal adaptados produce incrementos en los niveles de los biofilms dentales y cambios en la microflora, aumentando el riesgo de inflamación gingival y de pérdida de inserción (Albandar & Tinoco , 2002, pág. 173).

Consumo de alcohol: Se ha observado peor higiene oral en los consumidores de alcohol en exceso, y además existiría una plausibilidad biológica para la relación entre el consumo excesivo de alcohol y las enfermedades periodontales (Tezal et al., 2004).

1.2.4 Clasificación de enfermedades y lesiones periodontales

Bascones et al. (2004) mencionan la clasificación de enfermedades periodontales en base a las condiciones propuestas por el comité International Workshop (1999). (Apéndice 1)

1.2.4.1 Periodontitis crónica.

Bascones et al. (2004) manifiestan los signos clínicos característicos de la periodontitis, los cuales son la pérdida de inserción clínica, pérdida de hueso alveolar, formación de bolsas periodontales e inflamación gingival, sobrecrecimiento o recesión gingival, sangrado al sondaje, movilidad dentaria aumentada, supuración, pudiendo llegar a la pérdida dentaria; siendo que en los casos de periodontitis crónica la infección progresa de forma continua o en picos de actividad. Esta se clasifica según su extensión y severidad.

Según la **extensión** puede ser:

Localizada: si están afectadas menos de un 30% de las localizaciones.

Generalizada: si más del 30% de las localizaciones están afectadas.

Según la **severidad** se define:

Periodontitis suave: cuando las pérdidas de inserción clínica son de 1 a 2 mm.

Periodontitis moderada: si las pérdidas de inserción se encuentran entre 3 y 4 mm.

Periodontitis severa: ante pérdidas de inserciones clínicas mayores o iguales a 5 mm.

1.2.4.2 *Periodontitis agresiva.*

Los rasgos comunes de las formas de periodontitis agresiva son: pacientes que salvo por la presencia de la infección periodontal están clínicamente sanos, rápida pérdida de inserción y destrucción ósea y antecedentes familiares, cantidad de depósitos microbianos inconsistentes con la severidad de destrucción tisular presente, proporciones elevadas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* o *Porphyromonas gingivalis*; anomalías en los fagocitos; fenotipo de macrófagos con hiper-respuesta con niveles elevados de prostaglandina E2 e interleuquina-1 β ; la progresión de pérdida ósea y de inserción puede ser llamativa.

Existen dos formas de periodontitis agresivas:

Localizada: de inicio circumpuberal y con una respuesta elevada de anticuerpos frente a los agentes infecciosos, clínicamente se caracterizan por pérdidas de inserción interproximal en primeros molares e incisivos o al menos en dos dientes permanentes, uno de los cuales es un primer molar y no incluye más de dos dientes que no sean primeros molares e incisivos.

Generalizada: suele presentarse en pacientes menores de 30 años, pero puede aparecer en edades superiores, la respuesta de anticuerpos es pobre,

existen episodios de pérdida de inserción, que afecta a tres dientes permanentes diferentes de primeros molares e incisivos.

1.2.4.3 Enfermedades periodontales necrotizantes.

La gingivitis ulcerativa necrotizante (GUN) se diferencia del resto de enfermedades gingivales por presentar necrosis interdental gingival, con papilas ulceradas, sangrado gingival y dolor, este dolor es la principal característica de esta entidad y su elevada intensidad lleva al paciente a buscar tratamiento. Otros signos y síntomas también asociados a la GUN, aunque no patognomónicos, son la presencia de linfadenopatías, fiebre, halitosis y malestar general, los episodios se resuelven en unos días tras recibir el tratamiento adecuado; existiendo una serie de factores que predisponen la aparición de esta infección tales como el estrés, la inmunosupresión, la malnutrición, el tabaco, traumatismo, o la existencia de una gingivitis previa.

La periodontitis ulcerativa necrotizante (PUN) es una infección caracterizada por una necrosis del tejido gingival, del ligamento periodontal y del hueso alveolar; suele presentarse en sujetos con condiciones sistémicas que conduzcan a un estado de inmunosupresión. Puede ser que la GUN y la PUN sean dos estados diferentes de la misma infección y aún no existen suficientes datos para separar ambas entidades en dos categorías diferentes, siendo la única diferencia entre ambas se basa en que la GUN se limita a la encía, mientras que la PUN incluye todo el aparato de inserción.

1.2.4.4 Absceso periodontal.

El absceso periodontal consiste en una infección purulenta localizada en los tejidos periodontales que puede ser una manifestación clínica en pacientes con periodontitis moderada o severa; se caracterizan por inflamación, supuración, enrojecimiento, extrusión del diente implicado y diente sensible a la percusión, a veces aparece una ligera elevación de la temperatura (Bascones, 2004).

Los abscesos pueden ser clasificados en:

Absceso gingival: lesión localizada, dolorosa, rápidamente expansiva que afecta al margen gingival o a la papila interdental, suele ser una respuesta inflamatoria aguda de la encía a un cuerpo extraño introducido en la encía.

Absceso periodontal: acumulación localizada de pus en la pared gingival de una bolsa periodontal que origina la destrucción de la inserción de fibras colágenas y la pérdida del hueso alveolar adyacente; suele estar asociado a la existencia de bolsas periodontales tortuosas, furcas afectadas o defectos infraóseos.

Absceso pericoronar: acumulación localizada de pus sobre el tejido gingival que rodea la corona de un diente que no ha erupcionado completamente, generalmente en la zona del tercer molar inferior. El tejido gingival aparece rojo e inflamado y los pacientes pueden encontrar dificultades para tragar.

1.3 Diagnóstico de la enfermedad periodontal

El diagnóstico periodontal es la etiqueta que los profesionales colocan ante un proceso o enfermedad periodontal de un paciente, en la práctica habitual de la periodoncia, se deriva en primer lugar de la información obtenida mediante la historia clínica y dental en combinación con los resultados del examen oral, la totalidad de los signos y síntomas asociados con la enfermedad o proceso se toman en consideración antes de llegar al diagnóstico, en algunos casos la información adicional obtenida con las pruebas de laboratorio es útil en el proceso para la toma de decisiones (Armitage, 2005).

1.3.1 Diagnóstico clínico.

Consiste en la recolección de datos de forma sistematizada mediante: la anamnesis al evaluar el estado físico y anímico del paciente, historia clínica médica y odontológica, el examen clínico de la cavidad bucal y periodontal y los criterios clínicos descriptivos como color, contorno, consistencia, textura y posición gingival. Los últimos datos se los obtiene al aplicar el periodontograma para conocer la situación clínica del aparato de inserción y de protección, siendo el procedimiento más indicado en la mayor parte de los pacientes (Prichard, 1982).

Al realizar el examen clínico, los especialistas en periodoncia anotan registros obtenidos a partir del mismo. La posición dentaria, la cantidad de encía adherida, la profundidad de las bolsas, inflamación y sangrado gingival, la presencia de movilidad, el nivel de inserción clínico u otros factores locales predisponentes (caries, problemas periapicales, ausencia de puntos de contacto u obturaciones y coronas desbordantes) (Carranza, Newman, & Takei, 2004).

1.3.1.1 Sangrado al sondaje.

Genco et al. (1993) afirman que el sangrado al sondaje “es un predictor de enfermedad periodontal que se lo considera en conjunto con signos clínicos de inflamación, como un indicador de inflamación periodontal” (pág. 9).

El sangrado al ser inducido por la penetración de la sonda periodontal, se considera algunos aspectos del sondaje, como son la fuerza, diámetro de la sonda y grado de inflamación gingival, por ello, se debe controlar la fuerza en cada registro, por lo que la sonda puede penetrar más o menos dependiendo del grado de inflamación y diámetro de la sonda, la presencia del SS no es un indicativo absoluto de enfermedad (valor predictivo positivo 6%) mientras que su ausencia si es un indicador confiable de salud periodontal (valor predictivo negativo 98%), para efectos clínicos prácticos, se calcula como el porcentaje de sitios que sangraron al sondaje empleando fórmula: $SS = \frac{\text{sitios que sangran}}{\text{número de dientes} \times 6} \times 100$ (Botero, 2010, pág. 96).

1.3.1.2 Profundidad de sondaje.

Botero (2010) menciona que la profundidad al sondaje (PS) es el espacio que se forma alrededor de los dientes, entre la encía y la superficie radicular, este espacio puede ser considerado un “surco” o una “bolsa periodontal”, en ausencia de inflamación clínica: el espacio puede medir entre 1 - 3 mm, en cuanto a las caras libres 1 mm, en las caras proximales de 1-3 mm y se considera bolsa periodontal cuando esta es ≥ 4 mm; resultando que la PS es igual a la cantidad en mm desde la referencia (margen gingival) hasta el fondo del surco o bolsa.

1.3.1.3 Posición gingival.

Se refiere a la posición de la encía marginal respecto del límite amelocementario, puede estar a nivel de la línea amelocementaria (CEJ), coronal a la CEJ o apical a la CEJ, denominándose recesión; la posición del margen gingival es dependiente de un punto de referencia fijo (CEJ), es necesario tener una referencia cuando esta ha desaparecido; sea una restauración, el margen de una corona o incluso desde borde oclusal; en recesiones vestibulares que involucran abfracciones es posible trazar una línea imaginaria desde las superficies proximales.

El surco periodontal se define como el espacio alrededor de los dientes entre la encía marginal y la superficie del diente y que está limitado en su parte más apical por las células más coronales del epitelio de unión (EU). La PG es una medición lineal en mm desde el margen gingival a la CEJ, ya sea a nivel, coronal o apical a esta; o tomando una referencia dependiendo del caso (Botero, 2010).

1.3.1.4 Bolsas periodontales.

Es la profundización patológica del surco periodontal, debido a la pérdida ósea y a la inserción periodontal, es considerada a partir de 4 mm y deben presentar sangrado al sondaje, pérdida de inserción y pérdida ósea radiográfica, existen casos en donde la profundidad al sondaje incrementa en ausencia de pérdida de inserción y pérdida ósea, es por ello que se debe considerar el punto de referencia para esta medida al margen gingival, el cual puede variar en su dimensión dependiendo de grado de inflamación o agrandamiento gingival, cuando ocurre el desarrollo del edema gingival o engrosamiento de la encía marginal (agrandamiento gingival), el margen se desplaza en sentido coronal a la línea amelocementaria, a lo que se le denomina “pseudo bolsa periodontal” y aunque no hay pérdida de soporte periodontal, puede acumular altos niveles de placa bacteriana subgingival y con el tiempo desarrollar destrucción periodontal (Botero, 2010).

Carranza (2002) estipula que las bolsas periodontales se clasifican en:

Bolsa gingival “bolsa falsa” “pseudo bolsa”: se forma por agrandamiento gingival sin migración de la adherencia epitelial, a profundidad del surco es a expensas del aumento del tamaño de la encía y, por lo tanto no hay bolsa propiamente dicha.

Bolsa periodontal verdadera: se produce por la destrucción de los tejidos periodontales de protección y de soporte, la movilidad y la exfoliación de las piezas. Esta a su vez se divide en supraóseas (Supracrestales o Supralveolares) son aquellas donde el fondo de la bolsa es coronal al hueso alveolar subyacente, su patrón destructivo de hueso es horizontal; y las infraóseas (Intraóseas, Subcrestales o Intralveolar) en cambio el fondo de la bolsa se localiza en sentido apical a nivel del hueso alveolar vecino y su patrón destructivo de hueso es vertical.

1.3.1.5 Nivel de inserción clínica.

Botero (2010) menciona que son las fibras de tejido conectivo gingival que se insertan al cemento radicular a través de fibras de Sharpey, en el ámbito clínico se utiliza el NIC para referirse a la magnitud de la pérdida de soporte siendo analizado cuidadosamente en cada diente, ya que es dependiente de la longitud radicular, por lo tanto para calcular el NIC, se realiza como: si el margen gingival esta coronal a la línea amelocementaria (CEJ), se le resta la PS; si el margen coincide con la CEJ, el NIC es igual a la PS; pero si el margen esta apical a la CEJ, se suma la PS y la posición del margen gingival.

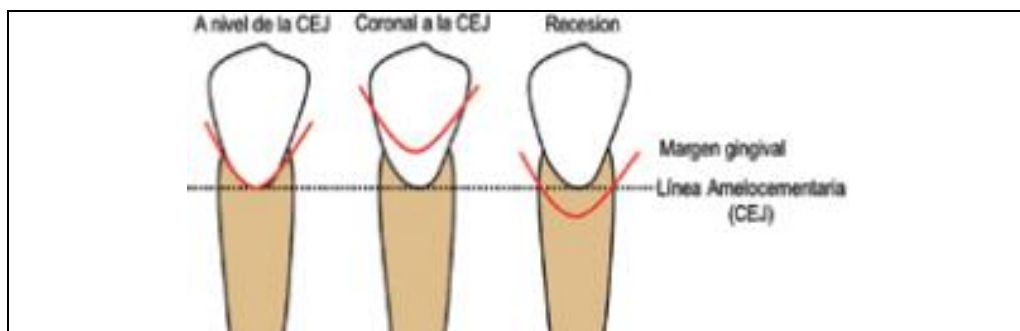


Figura 1. Esquema representativo de la posición del margen gingival en relación a la línea amelocementaria (CEJ).

Fuente: Botero JE, B. E. (2010). Determinantes del Diagnóstico Periodontal. Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación oral, 3(2), 94-99.

El nivel de inserción clínica (NIC) se calculó mediante la resta de la profundidad de sondaje y la posición gingival.

1. La recesión se anotó con signo negativo.
2. La fórmula utilizada es la profundidad de sondaje (PS) menos posición gingival (PG) igual al nivel de inserción clínica (NIC). Así:

$$PS - PG = NIC$$

1.3.1.6 Movilidad.

Los dientes no están en directo contacto con el hueso alveolar, estos presentan una movilidad fisiológica debido a la presencia del ligamento periodontal, por lo que el trauma por oclusión, ligamentitis y los movimientos ortodónticos, causan movilidad incrementada de los dientes, la movilidad dental se mide de la siguiente forma empleando dos instrumentos metálicos y aplicando presión en sentido vestibulolingual.

El grado de movilidad se registró como:

Grado 0: no existe movilidad detectable.

Grado 1: existe un desplazamiento menor de 1 mm.

Grado 2: existe un desplazamiento mayor de 1mm.

Grado 3: existe desplazamiento intrusivo o vertical

Es necesario poner especial atención a la movilidad dental patológica, que aumenta progresivamente con el tiempo. Después del tratamiento periodontal, la movilidad se reduce un poco, quedando movilidad residual que puede ser controlada por medio de férulas (Botero, 2010).

1.3.1.7 Supuración.

Botero (2010) manifiesta que la supuración es un proceso inflamatorio que conduce a la formación de pus (líquido espeso de color amarillento). En ocasiones, la encía puede supurar, o sea, a expulsar la materia infecciosa que contiene, de forma espontánea o tras el sondaje.

1.3.1.8 Índice de placa bacteriana.

Carranza et al. (2004) manifiestan que se utiliza para evaluar la higiene de las superficies lisas, se utiliza el índice de placa bacteriana - O'leary, el cual indica el porcentaje de superficies lisas teñidas sobre el total de superficies dentarias presentes, el paciente debe realizar un enjuague con el agua para eliminar el exceso de colorante; se recomienda utilizar el doble tono, dado que este revelador, puede constatar la placa bacteriana madura en color azul oscuro, la cual es considerada cariogénica y periodontopática; y la placa de menos de 24 horas, considerada placa bacteriana del día en color rosa, este índice se aplica en el momento inicial y a lo largo del tratamiento para determinar la capacidad de controlar la placa con el cepillado dental diario, antes y después de la enseñanza de la, higiene bucal, se lo obtiene aplicando la siguiente fórmula: superficies lisas teñidas por cien sobre el total de superficies dentarias presentes. Así:

$$\frac{\text{Superficies lisas teñidas x 100}}{\text{Total de superficies dentarias presentes}}$$

1.3.2 Diagnóstico imagenológico.

La radiografía dental es un agregado valioso, que contribuye a la elaboración del diagnóstico de la enfermedad periodontal, la determinación del pronóstico del paciente y la valoración del desenlace terapéutico, proporciona cierta información limitada, ya que nos presenta una imagen bidimensional de estructuras que realmente son tridimensionales, siendo la imagen radiográfica una superimposición del diente, hueso y tejidos blandos en el trayecto entre el cono del aparato y la película, representando así el contraste de blanco y negro de algo que es duro y suave, además es un auxiliar del examen clínico y no un sustituto de él, pero combinada con la información obtenida en la historia y examen clínico periodontal y dental, nos conducirá a un diagnóstico que, en su mayoría de veces, será acertado (Carranza, Newman, & Takei, 2002).

1.3.2.1 Radiografías periapicales.

Hernández (2014) aclara que las técnicas periapicales o retroalveolares, sirven para explorar el diente en su totalidad, desde la corona hasta el ápice, el espacio periodontal y el tejido óseo que lo rodea, se puede realizar mediante dos procedimientos: la técnica de bisección y la de paralelismo; esta aporta información importante durante el análisis periodontal como el resultado acumulativo de la enfermedad periodontal, la secuencia radiográfica en el tiempo es posible evaluar los cambios en el nivel óseos, recordando los signos más importantes de la periodontitis es la pérdida ósea, la cual debe ser demostrada durante el diagnóstico. El patrón de pérdida ósea puede ser horizontal o vertical, cuya severidad de la pérdida ósea puede ser estimada dividiendo en tercios la distancia desde la CEJ hasta el ápice del diente así: 1/3 cervical (leve), 1/3 medio (moderada) y 1/3 apical (severa). Sin embargo, los dientes pueden tener periodonto reducido y no tener lesiones por pérdida ósea, siendo la distancia desde la CEJ a la cresta ósea puede aumentar, pero mientras conserve las características radiográficas de salud ósea, será considerado como un periodonto reducido. Este hallazgo es común en pacientes tratados periodontalmente y sujetos de edad avanzada.

1.3.2.2 Scanner o tomografía axial computarizada (TAC).

La Tomografía Axial Computarizada (TAC), también conocida como Scanner, tiene una destacada participación en el área del diagnóstico ya que permite la obtención de una imagen referente a una sección o parte de una estructura o de un órgano el cual nos interesa evaluar, y se caracteriza por la ausencia de superposiciones de imágenes, por la posibilidad de identificar los tejidos blandos y por la ampliación selectiva de las áreas de interés, su gran ventaja que aporta el TAC frente a la radiografía convencional es que se puede obtener información volumétrica de todas las superficies (Hernández, 2014).

La radiografía convencional bidimensional presenta varias limitaciones a la hora de determinar los niveles de hueso en las zonas bucal y lingual así como la pérdida parcial del grosor de hueso interdental, con el TAC se resuelven los

problemas de proyección de las radiografías periapicales y de aletas de mordida, comportándose de manera muy superior en el análisis de los defectos periodontales artificiales bucales o linguales al compararlo con la radiografía convencional, es decir, supera a la radiografía convencional intraoral en precisión para la determinación del nivel de hueso periodontal después de la terapia de regeneración periodontal (Grimard, 2009).

1.3.3 Diagnóstico microbiológico.

En la actualidad parece estar clara la etiología infecciosa de las enfermedades periodontales, siguen los avances en las técnicas diagnósticas y en las consideraciones terapéuticas de esta enfermedad, estas técnicas diagnósticas microbiológicas permiten acotar cada vez más las bacterias implicadas en cada caso de periodontitis, sin embargo, todavía no se conoce la manera en que cada una de ellas interactúan con el hospedador para dar paso a la enfermedad y, al mismo tiempo, todavía hoy existen especies bacterianas que no pueden ser diagnosticadas por los métodos de rutina.

Aunque el diagnóstico clínico y radiológico han sido durante mucho tiempo las técnicas rutinarias para plantear el manejo de los pacientes con periodontitis, la posibilidad de que los tejidos periodontales estén colonizados por bacterias de origen exógeno cambia mucho el plan de tratamiento, ya que introduce la necesidad de combinar el tratamiento convencional con el tratamiento antibiótico, lo cual hace necesaria la incorporación de estas técnicas para así saber a qué especies bacterianas nos enfrentamos.

En los últimos tiempos se han desarrollado varios métodos para el diagnóstico microbiológico, sin embargo, el objetivo perseguido por ellos puede variar en algunos casos, ya que en ocasiones se emplean exclusivamente con finalidad investigadora mientras que, en otros casos, han sido modificados y adaptados a las necesidades clínicas, entre ellos se encuentra: el cultivo bacteriano, métodos de diagnóstico inmunológico (la inmunofluorescencia directa, la inmunofluorescencia indirecta, la citometría de flujo, la aglutinación

por látex y el test de E.L.I.S.A.), métodos de detección enzimática (BANA) y técnicas de biología molecular.

Las técnicas de biología molecular se basan en el análisis del ADN o el ARN, aislando la cadena de ADN de una muestra de placa y se amplifica, tras su extracción y purificación, pueden emplearse diferentes técnicas para su identificación (sondas, checkerboard DNA, Reacción de Cadena de la Polimerasa - PCR), dentro de estas técnicas, la más importante es la PCR, que permite amplificar las cadenas de ADN, aislarlo y posteriormente aplicarle calor para separar ambas cadenas, mediante la utilización de ADN polimerasa y un primer o una secuencia conocida de nucleótidos (Liébana, Castillo , & Álvarez, 2004, págs. 75-91).

1.3.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

En la actualidad, este método de diagnóstico bacteriológico, ha permitido identificar especies que eran raras o no detectables por métodos de cultivo, la PCR conocida así por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction) es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, rápida, precisa y sensible para la detección de secuencias específicas de ADN bacteriano in vitro en una muestra de manera similar a como la célula lo realiza in vivo (Bartlett & Stirling, 2003).

1.3.3.1.1 Conceptos de la PCR.

La PCR es un método enzimático que utiliza 2 oligonucleótidos complementarios a secuencias específicas del ADN de las distintas bacterias como cebadores; estos nucleótidos se añaden a una solución que contiene ADN de doble cadena de la muestra del paciente; mediante calentamiento a 90-95° se desnaturaliza el ADN de la muestra y se obtienen cadenas sencillas, al enfriar la mezcla se disminuye la temperatura a 40-60°, las cadenas sencillas se hibridan con los cebadores; luego se eleva de nuevo la temperatura a 70-75°, la polimerasa comienza a extender a los cebadores usando como molde la cadena sencilla de ADN original, obteniéndose al final una cadena complementaria a la inicial. Considerado uno de los métodos con mayor

sensibilidad, relativamente simple y rápido, capaz de detectar un solo microorganismo, siendo uno de los métodos más eficaces hoy en día en cuanto a diagnóstico periodontal (Nick, Saunders, & Martin, 2013).

1.3.3.1.2 *Fundamento e importancia.*

Inicialmente la técnica era lenta, ya que las polimerasas se desnaturalizaban al realizar los cambios de temperatura y era necesario agregar nuevas polimerasas en cada ciclo, debido a las temperaturas del ciclo al 95°C en las fases de desnaturalización del ADN suponen la inmediata desnaturalización de toda proteína, se emplean ADN polimerasas termoestables, extraídas de microorganismos adaptados a vivir a esas temperaturas, restrictivas para la mayoría de los seres vivos.

Hoy, todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción, por lo que los tubos usados tienen una pared muy fina, lo que favorece una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio térmico (Bartlett & Stirling, 2003).

1.3.3.1.3 *Reactivos.*

Según Bartlett (2003) para realizar la técnica de PCR se necesita las siguientes sustancias como:

4 desoxirribonucleótidos-trifosfato (dNTP): sustratos para polimerizar nuevo ADN.

Dos cebadores o iniciadores (en inglés, *primers*): oligonucleótidos complementarios a una de las dos hebras del ADN, con secuencias cortas, de entre seis y cuarenta nucleótidos, normalmente de dieciocho a veintidós, corresponden a los nucleótidos que definen los extremos de la secuencia que se desea replicar.

Iones divalentes: se suele usar magnesio (Mg^{2+}), agregado comúnmente como cloruro de magnesio ($MgCl_2$), o algún otro catión divalente. También se

puede emplear manganeso (Mn^{2+}), para mutagénesis de ADN mediante PCR, ya que altas concentraciones de Mn^{2+} incrementan la tasa de error durante la síntesis de ADN. Actúan como cofactores de la polimerasa.

Iones monovalentes: como el potasio.

Solución tampón o *buffer*: mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.

ADN polimerasa: mezcla de distintas polimerasas con temperatura óptima alrededor de $70^{\circ}C$ (la más común es la polimerasa Taq).

ADN molde: contiene la región de ADN que se va a amplificar.

Termociclador: aparato que mantiene la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo.

1.3.3.1.4 Ciclo de amplificación.

Tamay (2013) menciona que cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión.

Desnaturalización: las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de $95^{\circ}C$ durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el Termociclador aumenta la temperatura, y al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas.

Hibridación: los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria, para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre $50-60^{\circ}C$, si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.

Extensión: la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN, la extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3', la temperatura óptima para la reacción es de 72°C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional, formándose al final del ciclo, los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb).

1.3.3.1.5 Tipos de PCR.

PCR anidada: es una técnica muy sensible de PCR en la que el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada, es decir, cuando tenemos el primer amplicón se pueden unir los cebadores y se hace de nuevo una amplificación dentro del amplicón inicial.

PCR de extensión solapada (Mutagénesis): se introducen cambios de secuencia dentro de fragmentos (clonados) de ADN, requiriéndose de dos cebadores mutagénicos y otros dos, se amplifica un fragmento 5' y un fragmento 3' que se solapan portando ambos la mutación.

PCR in situ: consiste en una reacción de PCR en secciones histológicas o células, donde los productos generados pueden visualizarse en el sitio de amplificación.

PCR múltiple: se amplifica simultáneamente más de una secuencia, combinándose dos o más pares de cebadores en un mismo tubo, junto con el resto de los reactivos de la reacción en cantidades suficientes, para amplificar simultáneamente varios segmentos de ADN.

PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR): variante de la PCR en la que usamos ARN como molde inicial en vez de ADN, y emplea una transcriptasa inversa (como Tth) para realizar la síntesis de un ADN complementario al ARN (ADNc).

PCR en tiempo real o PCR cuantitativo (qPCR): es la reacción cuya principal característica permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN presente en la muestra original, o para identificar con una muy alta probabilidad, muestras de ADN específicas a partir de su temperatura de fusión.

1.3.3.1.6 Aplicaciones.

Butler (2005) ostenta que la técnica de la PCR tiene multitud de aplicaciones: ya en ciencia básica, como herramienta de detección y/o generación de fragmentos de ADN de interés; ya en ciencia aplicada, como elemento resolutivo en sí mismo, por ejemplo en el diagnóstico clínico; dentro de las ramas en las que se la utiliza están:

Investigación: clonación de un segmento de ADN.

Medicina: Como herramienta de análisis, para revisiones médicas rutinarias, como en los servicios de donantes de sangre, para test de rutina, detectar infecciones en el donante, detectar la existencia de mutaciones.

Paleontología, antropología biológica, y ciencias forenses: en paleontología y Antropología la PCR permite recuperar las escasas cantidades de ADN que aún no se han degradado; en estudios filogenéticos o etnográficos o de poblaciones mediante la comparación de secuencias de ADN, o el estudio de las causas de la separación evolutiva de dos especies; y en las ciencias forenses se emplea para establecer la filiación de una persona o para obtener pruebas a partir de muestras mínimas dejadas por el autor de un crimen como saliva, semen u otros restos de tejidos.

Agronomía y diversidad: permite producir huellas genéticas de individuos.

2 Capítulo: Microorganismos periodontopatógenos

2.1 Biofilm dental

2.1.1 Definición.

Costerton (2002) definió el biofilm como: “una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que se hallan unidas a un substrato o superficie, o unas a otras, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes” (pág. 172).

2.1.2 Estructura.

El biofilm está compuesto por bacterias que representan un 15 o 20% del volumen y una matriz o glicocálix, que representaría el 75 o 80%, esta matriz está compuesta por una mezcla de exopolisacáridos, proteínas, sales minerales y material celular; los exopolisacáridos representan el componente fundamental de la matriz y son producidos por las propias bacterias del biofilm, estos presentan algunas características como: participar de forma fundamental en el desarrollo del biofilm, tener carga neutra o carga polianiónica según el tipo de exopolisacárido, actuar como fuente de nutrientes para otras bacterias, reiterando desechos del medio que favorece el desarrollo bacteriano, determinar la capacidad de adhesión de las bacterias a las superficies, participar en funciones de protección de las bacterias evitando su desecación y pueden tamponar la acción de distintos antimicrobianos (Socransky SS, 2003).

2.1.3 Formación.

Xie (2010) afirma que la secuencia de colonización y formación de una biopelícula dental es un proceso altamente ordenado, esto ocurre por la adhesión bacteriana a los tejidos o superficies mediante mecanismos específicos, debido a componentes proteínicos como las adhesinas, lecitinas se unen a receptores sacáridos a través de la película adquirida (componentes

de la saliva y fluido crevicular así como productos bacterianos) a la superficie apatítica mineral (HA) del esmalte.

El grupo de proteínas llamadas PRPs (proline-rich proteins) son el principal componente de la saliva responsable de la adhesión, pocos minutos después de realizar una limpieza dental profesional, los primeros colonizadores, cocos y bacilos Gram-positivos principalmente de los géneros *Streptococcus* y *Actinomyces*, se adhieren a la superficie dental por medio de moléculas específicas de adhesión bacteriana, las cuales interactúan con moléculas adheridas a la superficie dental derivadas de componentes salivales y del fluido crevicular, estos juegan un papel muy importante en la formación de la placa dentobacteriana, ya que tienen receptores específicos para las diferentes especies bacterianas que posteriormente se coagregarán a la estructura inicialmente formada.

Los segundos colonizadores, también llamados colonizadores puente o secundarios, poseen mecanismos de adhesión tanto con los primeros colonizadores como con las especies que se coagregarán de forma tardía a la placa bacteriana, a este grupo de microorganismos pertenecen *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Veillonella*, *Fusobacterium* y *Prevotella*, entre otros.

Finalmente, si la secuencia de colonización del biofilm dental no se ve interrumpida, un tercer grupo de microorganismos principalmente especies anaeróbicas Gram-negativas como especies de los géneros *Treponema* y *Porphyromonas*, se unen a la biopelícula dental.

2.1.4 Clasificación.

2.1.4.1 Según su ubicación.

Supragingival: es adherente y predominantemente a bacterias Gram positivas.

Subgingival: es menos adherente y predominantemente a bacterias Gram negativas.

2.1.4.2 Según su actividad bioquímica.

Cariogénica

No cariogénica

2.1.4.3 Según su pH.

Cuenca et al. (2007) determinaron tres tipos de biofilm, según su efecto sobre la solubilidad de la apatita:

Normal: el pH salival oscila de 6,5 a 7, es un líquido de la placa ligeramente sobresaturada en iones calcio y fosfato.

Cariogénico: es un pH ácido cuando es inferior a 5,5, siendo aquellas concentraciones de iones calcio y fosfato inferiores al límite de saturación, cuyo efecto combinado de acidez e hiposaturación disuelve la hidroxiapatita carbonatada del esmalte.

Litogénico: cuando el pH está elevado sobre 6, es aquel líquido de la placa sobresaturado en iones calcio y fosfato produciendo un efecto combinado de hipersaturación y elevado pH provoca el depósito de fosfato cálcico.

2.1.5 Propiedades.

Manifiesta Socransky (2003) las siguientes propiedades a los biofilms dentales:

- a. La heterogeneidad fisiológica dentro del biofilm puede observarse un rango muy amplio de micronichos, separados unos de otros por mínimas distancias.
- b. Cuando las bacterias crecen en el biofilm, en forma sésil, manifiestan un fenotipo diferente respecto del que manifiestan cuando crecen en forma planctónica, estos fenotipos que crecen son más resistentes frente a diversos antimicrobianos.
- c. Las bacterias tienen capacidad para comunicarse entre ellas, ya sea por medio de señales químicas o incluso mediante transferencia de material genético.

- d. El biofilm tiene la capacidad adaptativa al mantener un equilibrio, por un lado, entre el crecimiento en condiciones favorables en cuanto a aporte de nutrientes y de medio ambiente, y por otro, el mantenimiento de su estructura.

2.1.6 Ventajas.

Socransky, (2003), señala las ventajas que presenta un biofilm dental:

- a. Protección frente a agresiones externas y mayor resistencia frente a los antimicrobianos.
- b. Ventajas nutricionales: aporte de nutrientes y eliminación de desechos.
- c. Proporciona un medio ambiente adecuado para el desarrollo bacteriano.
- d. Capacidad de intercomunicación entre las bacterias.

2.2 Microbiología de la enfermedad periodontal

2.2.1 Generalidades.

Las bacterias asociadas a la periodontitis residen tanto en biofilms que se encuentran por encima como por debajo del margen gingival. El biofilm supragingival está unido a la superficie dentaria y está formado predominantemente por *Actinomyces*. Sin embargo, la naturaleza del biofilm subgingival es más complicada, ya que existen dos biofilms diferentes, uno asociado a la superficie radicular y otro en íntima relación con la superficie epitelial de la pared blanda de la bolsa. Este último contiene, predominantemente, espiroquetas y especies gram negativas (*P. gingivalis*, *Treponema denticola* y otras). Entre estos dos biofilms existe una zona de baja densidad celular compuesta por bacterias débilmente unidas en estado plantónico.

Al hablar de la periodontitis como enfermedad infecciosa se parte de la premisa de que para darse, debe darse la presencia y multiplicación de organismos en el cuerpo. Hoy se sabe que para que aparezca esta infección, es necesario que intervengan una serie de bacterias, que se acumulan y

producen factores de virulencia, por medio de los cuales van dañando los tejidos (Ximenez et al., 2000).

2.2.2 Respuesta hospedador.

La respuesta del hospedador frente a la agresión bacteriana se va a traducir en una respuesta inmune e inflamatoria, aunque estas respuestas en los tejidos periodontales pueden parecer similares a las que ocurren en otros tejidos, existen diferencias significativas, sobre todo por la existencia del epitelio de unión con sus peculiares características, y el biofilm subgingival, con una gran cantidad de bacterias y de sus productos con potenciales inductores de respuestas diferentes (Negróni, 1999).

Frente a esto la respuesta inflamatoria e inmune según Negróni (1999) nos indica que los eventos moleculares y celulares que ocurren inicialmente se deben a una respuesta “rutinaria” del hospedador frente al biofilm subgingival, modificando el proceso los productos bacterianos específicos y las características individuales, distinguiéndose cuatro fases diferentes en la patogénesis de la periodontitis: la primera fase de alteración bacteriana aguda donde los elementos vasculares y epiteliales responden a los cambios bacterianos, como segunda fase a la respuesta inflamatoria aguda se incorpora el sistema de proteínas séricas y la activación de los macrófagos a los tejidos, seguido de la respuesta inmune (tercera fase) se activan las células mononucleares para formar la respuesta inmune local y sistémica y se produce un aumento de la actividad celular inflamatoria de los tejidos y cambios epiteliales asociados con la bolsa periodontal y finalmente, la cuarta fase de regulación y resolución representa la pérdida inicial de inserción, además de un aumento de la actividad de las células mononucleares en los tejidos.

Por tanto, las respuestas pueden ser exageradas y producir destrucción celular y tisular, involucrando al tejido conectivo y óseo.

2.2.3 Predisposición genética.

Los factores genéticos que modifican la respuesta del individuo frente a las agresiones microbiológicas son los determinantes de la susceptibilidad a las

periodontitis, afectan a la tasa de progresión y determinan la severidad de la enfermedad.

2.2.4 Factores ambientales y adquiridos.

La respuesta inmune del individuo puede verse modificada por factores ambientales o adquiridos, como el hábito tabáquico o el estrés.

El tabaco es un factor externo adquirido, asociado con periodontitis avanzadas, se modifica las características clínicas, al reducirse la tensión de oxígeno creando un ambiente favorable para la colonización y crecimiento de bacterias gram-negativas, teniendo además efectos importantes sobre el sistema inmune y reduciendo la producción de anticuerpos.

Mientras que el estrés se lo considera como factor psicoemocional por ocasionar una depresión de la respuesta inmune frente a la infección periodontal, siendo la gingivitis ulceronecrotizante la primera patología relacionada con el estrés, sin embargo hoy en día es corroborado en las periodontitis crónicas.

2.2.5 Determinación de los patógenos periodontales

Costerton (2002) indica que son más de 300 especies diferentes las que pueden ser cultivadas de la bolsa periodontal de diferentes individuos y 30-100 especies en una misma localización; a este número hay que sumarle todas las especies que no podemos cultivar o que son difíciles de identificar, siendo la cifra de especies bacterianas en la cavidad oral alrededor de 500 debido a tanta diversidad de bacterias, puede que nos enfrentemos con infecciones mixtas o polimicrobianas, con lo que se complica dilucidar la función de las especies individuales en la etiología de la enfermedad.

Koch menciona los criterios a cumplir una bacteria para ser considerada como patógeno periodontal son:

- a. Criterio de asociación donde la especie bacteriana debe encontrarse más frecuentemente y en mayor número.

- b. Criterio de eliminación de la bacteria al ir acompañada de la remisión de la enfermedad.
- c. Criterio de respuesta inmune por ser una bacteria capaz de producir infección, el organismo produce anticuerpos o una respuesta celular inmune específica.
- d. Criterio de factores de virulencia que determinan las características o propiedades de la bacteria durante el proceso de la infección.
- e. Criterio de estudios animales al ser inoculada la bacteria en animales debe provocar el desarrollo de la infección.
- f. Criterio de análisis de riesgo al evaluar la relación existente entre el valor de la presencia del agente etiológico (bacterias), y el riesgo de progresión de la enfermedad.

2.2.6 Postulados de Socransky.

Robert Koch, famoso bacteriólogo alemán del siglo XIX, marcó una serie de pautas para decidir la etiología bacteriana de alguna enfermedad (postulados de Koch), y Socransky adaptó esos postulados a la etiología de la enfermedad periodontal (Negroni, 1999), que en resumen son:

1. El microorganismo debe estar en grandes cantidades en los sitios activos de la afección, además deben aislarse en gran número y de manera constante en relación con una patología específica.
2. La eliminación del microorganismo, deberá producir la remisión de la afección.
3. Los microorganismos deben poseer suficientes factores de virulencia.
4. Debe existir respuesta inmune (celular o humoral) en la zona afectada.
5. La implantación experimental de esas bacterias en un surco gingival, debe inducir la enfermedad, tomándose en cuenta es el estado inmunológico del paciente o el animal de experimentación.

2.2.7 Complejos de Socransky.

Las bacterias causantes de la enfermedad periodontal se clasifican en cinco grupos, en función de las asociaciones que entre ellas se establecen a la hora de colonizar el surco periodontal.

Dentro del complejo amarillo están las especies del género *Streptococcus* como *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* y *Streptococcus intermedius*. En el complejo verde se encuentran la *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans serotipo a*. Mientras que en el morado constan la *Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus*. Al complejo naranja pertenecen las siguientes: *Fusobacterium sp* y subespecies, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter showae*, *Eubacterium nodatum* y *Streptococcus constellatus*.

Al hablar del complejo rojo encontramos a *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola*. Y también existe especies “no agrupadas” que corresponden a la *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

2.2.7.1 *Tannerella forsythia*.

Tannerella forsythia (Tf), es un miembro gram-negativos anaerobios de la familia *Cytophaga-Bacteroides* que se describió inicialmente como *Bacteroides forsythus*, posteriormente reclasificado como *Tannerella forsythia*, para luego pertenecer a un nuevo género *Tannerella*, esta pertenece a las bacterias rojas del complejo donde crecen y viven como superficie adjunta al biofilm subgingival, se encuentra asociada con más frecuencia y/o en los niveles más altos con las diversas formas de la enfermedad, incluyendo la gingivitis, la periodontitis crónica y agresiva.

2.2.7.2 *Porphyromonas gingivalis.*

Porphyromonas gingivalis (*Pg*) es un gram negativo, anaerobio estricto que aprovecha las condiciones que da el huésped para generar mayor daño, esta bacteria produce varios factores de virulencia, así como su capacidad de invadir células periodontales, dándose una protección contra el sistema de defensa del huésped, también se ha identificado como un factor de riesgo para infecciones pulmonares, parto pretérmino y bajo peso al nacer, su presencia en placas ateroscleróticas incrementan el riesgo de infarto del miocardio, aislándose también de abscesos dentoalveolares y trompas ováricas. Pertenece al género *Bacteroides*, agrupó en su primera clasificación, con características de ser anaerobios obligados, gram negativo, no esporulados y de forma bacilar, es un bacilo corto o cocobacilo, que produce múltiples enzimas con capacidad de degradar compuestos proteicos.

Predominante en la periodontitis crónica una de las patologías más comunes en la cavidad oral la cual presenta una etiología bacteriana, una vez que llega a su habitat, se condiciona al medio para vivir en condiciones de óxido-reducción negativa, así como por su diversidad de factores de virulencia.

2.2.7.3 *Treponema denticola.*

Treponema denticola, una espiroqueta con múltiples factores de virulencia, que la hacen una bacteria peligrosa, siendo identificada con cierta predominancia en lesiones como gingivitis, úlcera necrotizante y abscesos apicales agudos. Su aislamiento por cultivo es factible en medios altamente enriquecidos, aunque procedimientos a base de biología molecular como el PCR (reacción en cadena de la polimerasa), pueden determinar su presencia y cantidad.

2.2.7.4 *Fusobacterium nucleatum*

Fusobacterium nucleatum es una bacteria de Gram-negativos anaerobios no formadoras de esporas, y de la especie tipo del género *Fusobacterium*. Las células de *F. nucleatum* son barras en forma de huso o fusiformes de longitud variable. Es además considerado un aislado de placa dental humana común y

sobre la base de su capacidad de adherirse a una amplia gama de otros microorganismos del biofilm se propone desempeñar un papel crucial en el desarrollo, está asociado frecuentemente con enfermedades periodontales, así como infecciones en humanos invasivos de la cabeza y el cuello, el pecho, el pulmón, el hígado y el abdomen.

2.2.7.5 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans.*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A.a) patógeno oportunista, perteneciente a la familia *Pasteurellacea*, su forma es un cocobacilo, no móvil, no esporulado, capsulado, con fimbrias, es gram negativo y a las condiciones de óxido- reducción es un anaerobio facultativo, aunque puede desarrollarse mejor en condiciones de anaerobiosis, siendo un productor de una variedad de enzimas y toxinas.

Identificada a principios del siglo XX, fue aislado por primera vez por Klinger en 1912 (*Bacterium actinomycetum comitans*), para luego Lieske en 1921 (*Bacterium Comitans*), Son Topley y Wilson en 1929 (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) y ya para el 2006 Neils y Mogens, según estudios de ADN, conforman un nuevo género llamado *Aggregatibacter*, siendo el patógeno de mayor importancia en la periodontitis agresiva localizada.

3 Capitulo: Alcohólicos y fumadores

3.1 Alcoholismo – tabaquismo y su relación con la enfermedad periodontal

El consumo de alcohol y tabaco, se asocia con el origen, severidad y evolución de las enfermedades periodontales, por lo tanto, los individuos alcohólicos y que consumen tabaco presentan mayor probabilidad de padecer estas enfermedades que los individuos que no consumen; mientras una higiene bucal deficiente asociada con una disminución del flujo salival o xerostomía, trae como consecuencia la alteración morfológica y funcional de las glándulas salivales. Por otra parte el alcohol y tabaco producen atrofia epitelial de la mucosa bucal, con aumento de la permeabilidad y la solubilidad de las sustancias tóxicas como las derivadas del cigarrillo, cuando las adicciones coexisten (Novak, 2003).

3.1.1 El alcohol.

El alcohol tiene un efecto tóxico sobre el hígado, provocando alteraciones en los mecanismos de la coagulación, las personas adictas frecuentemente presentan desordenes nutricionales resultantes de deficiencias de proteínas y vitaminas, por tales razones va a existir una interferencia en los mecanismos de respuesta inflamatoria en la enfermedad periodontal, estando asociada al origen y la evolución de las enfermedades gingivales y periodontales.

Como consecuencia negativa, reseca la mucosa bucal, la hace más débil y genera una susceptibilidad más alta ante todo tipo de problemas bucales, esta sustancia es la principal causante de la atrofia epitelial de la mucosa bucal, haciéndonos más vulnerables a las enfermedades de la cavidad bucal, con mayor aparición de caries dentales (Johnson, 2007).

3.1.2 El tabaco.

El tabaco, una de las drogas de mayor consumo, factor ambiental que reduce la respuesta del huésped y facilita el desarrollo de enfermedad periodontal, parece ser la reducción de las defensas inmunológicas frente a los

patógenos periodontales que los fumadores suelen presentar un incremento de los monocitos en sangre periférica con alteraciones de funcionalidad, una actividad fagocítica alterada que conlleva al déficit en la eliminación de patógenos de la cavidad oral. (Novak, 2003).

3.1.3 Efectos periodontales.

La enfermedad periodontal es más prevalente en los individuos alcohólicos, fumadores, adictos, que en la población sin este inconveniente, se ha observado que la alta incidencia de las enfermedades periodontales con depósitos de cálculos y diagnosticada como periodontitis del adulto, se caracteriza por la pérdida de inserción.

En los alcohólicos se asocian con la falta de higiene oral y por la carencia de atención dental, existen diversos efectos en la cavidad bucal como el cáncer en la orofaringe, caries, pérdida de dientes y mayor riesgo de problemas periodontales incluyendo la infección gingival, el aumento de profundidad de las bolsas periodontales y la pérdida de inserción han sido identificados en los alcohólicos debido a la disminución de la resistencia a la infección por organismos Gram-negativos durante la intoxicación alcohólica aguda (Tezal, 2001).

El tabaco es el principal factor de riesgo ambiental y el segundo factor modificable más importante, después del control de placa, para el desarrollo de enfermedad periodontal. Siendo la característica típica de la enfermedad periodontal asociada al tabaco es la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes, con los signos derivados de la pérdida de hueso, formación de bolsas periodontales y finalmente la pérdida dental. Además la nicotina y el monóxido de carbono del humo del tabaco influyen de forma negativa en la curación de las heridas.

Los estudios realizados a largo plazo han demostrado que los fumadores tienen una mayor probabilidad de presentar recidivas de enfermedad periodontal durante los periodos de mantenimiento periodontal, siendo los fumadores de más de 10 cigarrillos al día los que tienen una peor progresión de

la enfermedad, incluso en algunos estudios se observa que los fumadores pasivos pueden tener mayor afectación periodontal, sin embargo los beneficios de dejar de fumar son enormes para la salud periodontal; siendo la progresión de la enfermedad menor en ex fumadores e incluso es posible detener por completo el avance de la enfermedad (Johnson, 2007)

e. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio es de enfoque cuantitativo, en el cual se contestó las preguntas al desarrollar un plan de demostración de las hipótesis al realizar una medición numérica y análisis estadístico, con la finalidad de determinar patrones precisos de los resultados y recomendaciones para la solución del problema.

TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Exploratorio porque examinó el tema de investigación que ha sido poco estudiado en nuestro medio, además la ampliación de la literatura en base a una revisión y sistematización de información por parte de la investigadora.

Descriptivo porque se especificó las propiedades, características y los perfiles más importantes de los microorganismos patógenos de las personas estudiadas, al medir con la mayor precisión posible la recolección de datos se estableció un análisis concreto.

Diseño no- experimental es un estudio en donde se analizó sin la manipulación deliberada de variables y solo se observó los fenómenos en su ambiente natural al ser analizados, por tratarse de una investigación natural basada en la realidad cotidiana.

De corte Transversal porque se recolectó datos en un solo momento, al estudiar un determinado fenómeno en un periodo específico de tiempo, mediante la descripción de variables y su análisis de incidencia e interrelación en un momento dado.

POBLACIÓN

En la Comunidad Terapéutica “Salvando al Adicto” estaban 31 adultos en rehabilitación de 18 a 62 años, los cuales permanecieron 3 meses. De ellos 23 pacientes de sexo masculino alcohólicos y fumadores con periodontitis crónica internos de la comunidad antes descrita, fueron el universo de estudio por presentar todas las condiciones planteadas por la investigadora.

Criterios de inclusión

Fueron considerados para el presente estudio, todos los pacientes que aceptaron ser partícipes previo al consentimiento informado, de 18 a 62 años de edad, de género masculino, alcohólicos y/o fumadores, con periodontitis crónica, con presencia de bolsas periodontales $\geq 6\text{mm}$.

Criterios de exclusión

Se excluyeron a los pacientes que no cumplieren los criterios de inclusión.

FASE CLÍNICA

Una vez obtenido la autorización de participación a través de la firma del consentimiento informado, a cada uno de los participantes se les realizó la apertura de Historia clínica Odontológica, la misma que constó de una anamnesis sobre los datos de identificación como nombres y apellidos, domicilio, teléfono, sexo, edad; enfermedad actual: para ampliar el motivo de consulta, evolución y tratamientos realizados; antecedentes personales: qué enfermedades ha sufrido, si es alérgico a algún medicamento, si ha tenido cirugías; antecedentes familiares: se destacan las enfermedades que hayan sufrido padre o madre que sean importantes; hábitos de vida en cuanto a la higiene bucal, alcoholismo y tabaquismo del paciente.



Fuente: Prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL

Seguidamente se realizó una exploración periodontal con la sonda de la OMS para obtener los valores establecidos en el "Peridontal Screening and Recording" (PSR) y de esta manera determinar si los pacientes presentaron o no Periodontitis crónica (PC). A los pacientes con PC se les realizó el

Periodontograma mediante la utilización de la sonda Carolina del Norte siguiendo el modelo de la UCLA (Universidad de California-Los Ángeles), para el registro de la movilidad dentaria, supuración, sangrado al sondaje, profundidad gingival, posición del surco, nivel de inserción clínica de cada diente.



Fuente: Prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL

También se ejecutó el índice de placa O'leary para evaluar la higiene de las superficies lisas, indicando el porcentaje de superficies lisas teñidas sobre el total de superficies dentarias presentes.



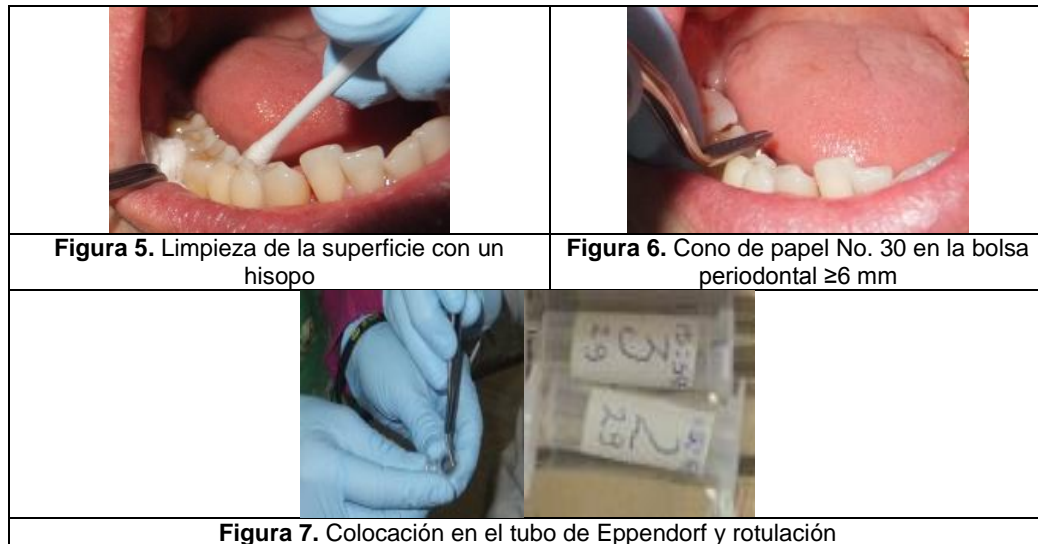
Fuente: Prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL

Es importante destacar que fueron participes del estudio todos los pacientes pertenecientes al centro de rehabilitación antes mencionado que cumplieran con los criterios de inclusión.

TOMA DE MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS

Previamente se realizó la remoción del biofilm supragingival con un hisopo. Para tomar la muestra de biofilm subgingival, se introdujo por 20 segundos un cono de papel estéril No. 30 (ZIPPERER - VDW) en dos sitios más profundos

de cada paciente, transcurrido el tiempo se colocó el cono inmediatamente en los tubo de Eppendorf estéril, sellándolo completamente, posteriormente se procedió a rotularlo con el número de historia clínica, número de pieza, fecha y hora de la toma de la muestra; repitiendo este procedimiento a cada participante.



Fuente: Prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL

Una vez obtenidas las muestras fueron transportadas en una hielera para mantenerlas a 4°C comprobando la temperatura con un termómetro digital LCD (BLUE-SV1315), para garantizar que estuvieran en condiciones óptimas durante su traslado al Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja. Durante las primeras 24 horas de almacenamiento; se procedió a la aplicación de la prueba de **PCR** previo entrenamiento de la investigadora por parte de la Dra. Loidy Zamora Gutiérrez, Técnico investigador, encargada del Laboratorio de Biología Molecular.



Fuente: Prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL

FASE DE LABORATORIO

Para la extracción de ADN, cada cono de papel se lavó con 100 μ L de agua destilada estéril con el fin de desprender las bacterias; para la liberación del material genético se efectuó por desnaturalización a la temperatura de 95°C durante el tiempo de 10 minutos, lográndose la suspensión bacteriana (Mujica, et.al., 2010).

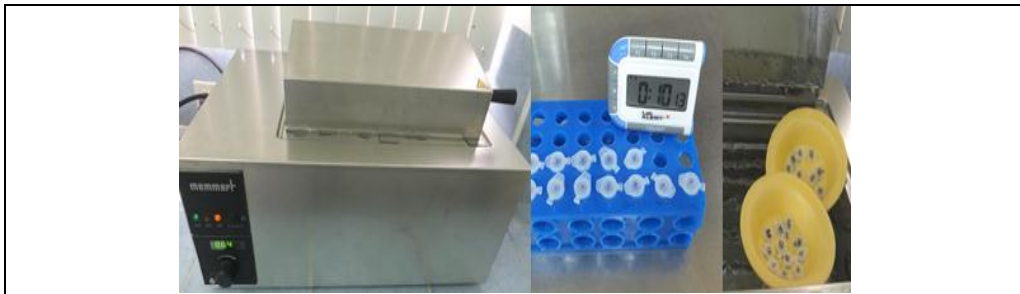


Figura 9. Extracción de ADN en el calentador de agua a 95°C durante el tiempo de 10 min

Fuente: Prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL

Se realizó la PCR para determinar la presencia de los patógenos periodontales *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans* y *F. nucleatum* de manera independiente. Para identificar cada bacteria se amplificó un fragmento del gen ADNr 16S utilizando los cebadores específicos descritos en la figura 11. En el gabinete de seguridad biológica II (LABCONCO) se realizó la mezcla de la reacción con un volumen final de 25 μ L, y las concentraciones de cada componente fueron: 18,15 μ L de agua, 2,5 μ L de 10X PCR Rxn Buffer (- MgCl₂) (Invitrogen), 0,75 μ L de 50mM MgCl₂ (Invitrogen), 0,5 μ L de mM dNTPs (dioxinucleosido trifosfato) (Invitrogen), 1 μ L de cada primer (Invitrogen), 0,1 μ L de Taq platinum DNA Polymerase (Invitrogen) y 1 μ L de ADN. En el termociclador MultiGene manejó el programa de PCR de: desnaturalización inicial por 10 min a 94°C; 35 ciclos de 94°C por 30 segs, 55°C por 30 segs y 72°C por 30 segs; y una extensión final a 72°C durante 10 min.



Figura 10. Muestras en el termociclador BIO – RAD (i Cycler) para la desnaturalización, anillamiento y enlogación del ADN

Fuente: Prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL

Bacteria	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Referencia
<i>Treponema denticola</i>	TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T	316	<u>Okada et al</u> 2001
	TAC AAG <u>AAG</u> CAT TCC CTC TTC <u>TTC</u> TTA		
	TAC AGG GGA ATA AAA TGA GAT ACG		
<i>Tannerella forsythia</i>	ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC	745	<u>Tran y Rudney,</u> 1999
	TGT AGA TGA CTG AAA ACC ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATTG GGG TTT AGC CCT GGT G	197	
	ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC		
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	GGA TTT ATT GGG CGT AAA GC	360	
	GGC ATT CCT ACA AAT ATC TAC GAA		
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	GGA TTT ATT GGG CGT AAA GC	167	Boutaga y cols, 2005
	GGC ATT CCT ACA AAT ATC TAC GAA		

Figura 11. Partidores utilizados en este estudio.

Fuente: Okada M, Hayashi F, Nagasaka N. PCR detection of 5 putative periodontal pathogens in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. *Journal of Clinical Periodontology*, 2001; 28: 576-582.

Posteriormente se ejecutó la electroforesis con el objetivo de visualizar las bandas de PCR amplificadas, para lo cual se pesó 1g de agarosa (UltraPure™ Agarose – Invitrogen) y se aforó hasta 100 ml con tampón TAE 1X (UltraPure™ 10X TAE Buffer - Invitrogen), se colocó en el microondas durante 90 segundos hasta obtener una solución homogénea, y se adicionó 7 µl de SYBR Safe DNA Gel Stain. Después se vertió en el molde hasta la gelificación del gel. Ya listo el gel se colocó en la cámara de electroforesis y se cubrió con tampón TAE 1X. Luego en un pedazo de papel PARAFILM se agregó 2 µl de Blue Juice™ Gel Loading Buffer y se mezcló con 8 µl del producto de PCR, y se procedió a colocar en cada pocillo del gel de agarosa. Para el marcador de peso

molecular se colocó 4 µl de agua, 2 µl Blue Juice™ Gel Loading y 2 µl del marcador (HIGH MASS DNA LADDER O 1KB PLUS DNA LADDER), se conectó a la fuente de poder durante 45 minutos a 100 V en la POWER PAC BASIC – BIO RAD.

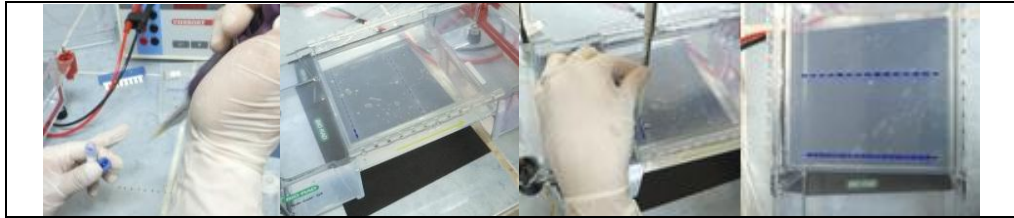


Figura 12. Preparación para la electroforesis

Fuente: Prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL

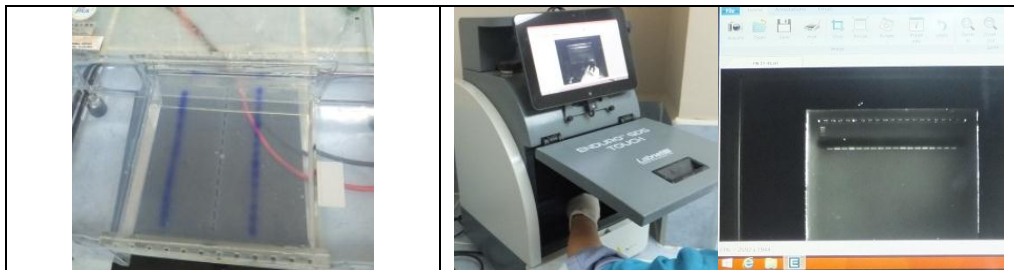


Figura 13. Electroforesis finalizada

Figura 14. Gel en el equipo ENDURO GDS TOUCH

Fuente: Prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL

Los resultados fueron constatados con las Historias clínicas y fichajes de cada uno de los pacientes, lo cual permitieron corroborar si los adultos presentaban o no síntomas clínicos de la enfermedad periodontal. A partir de estos datos se clasificó a cada uno de acuerdo a la periodontitis crónica y al nivel de consumo de alcohol y del tabaco. Para esto se tuvo en cuenta la lista de cotejo la cual valora la presencia de las bacterias como: A: *Porphyromona gingivalis*, B: *Treponema denticola*, C: *Tannerella forsythia*, D: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y E: *Fusobacterium nucleatum*; el tipo de alcoholico en: 1: Ligero, 2: Moderado, 3: Excesivo y 4: De riesgo de acuerdo a la cantidad de alcohol consumida diariamente y al tiempo; y finalmente al tipo de fumador en: a: No fumador, b: Leve, c: Moderado y d: Severo, según la cantidad de cigarrillo que consuma a diario.

PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS:

Mediante la comparación de los parámetros entre los distintos grupos y la prevalencia de los patógenos periodontales, a la información obtenida fue procesada, a través de programas de Microsoft Office, como son: Microsoft Word para la elaboración y diseño del informe correspondiente; Microsoft Excel hoja de cálculo que nos permitió presentar de forma gráfica y matemática los resultados; Microsoft Power Point para la socialización y disertación desde lo visual, del alcance del trabajo realizado.

ASPECTOS ÉTICOS

La investigación se sustentó en los principios de la ética hacia los paciente, se comunicó a todos los internos del centro de rehabilitación de lo planificado, mediante una hoja de información y el consentimiento informado previo de los mismos para participar, tomándose en cuenta todos los aspectos establecidos al respecto.

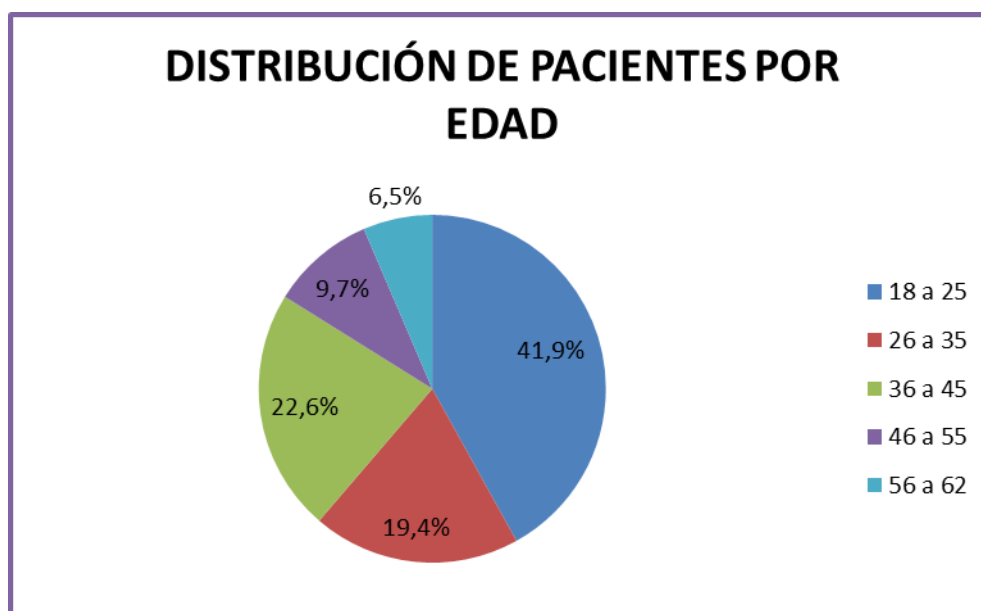
f. RESULTADOS

TABLA 1. Distribución de pacientes por edad

DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES POR EDAD						
Edad	18 a 25	26 a 35	36 a 45	46 a 55	56 a 62	TOTAL
Frecuencia	13	6	7	3	2	31
Porcentaje	41,9%	19,4%	22,6%	9,7%	6,5%	100,0%

FUENTE: Historia clínica periodontal
AUTOR: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

GRÁFICO 1



FUENTE: Historia clínica periodontal
AUTOR: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

INTERPRETACIÓN:

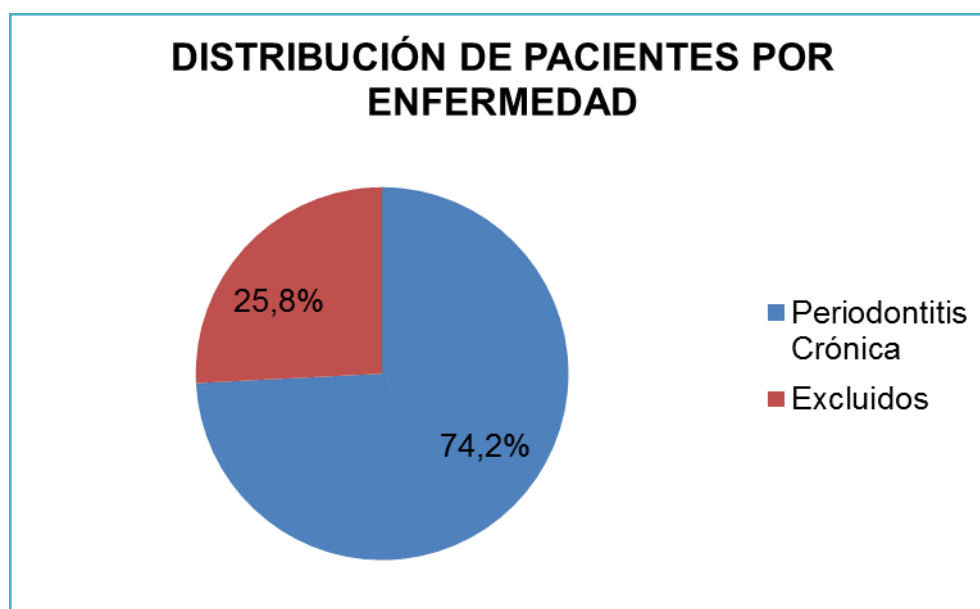
De 31 pacientes internos en la Comunidad Terapéutica “Salvando al Adicto”, al distribuirlos por edad observamos en la Tabla 1 que están entre los 18 a 25 años en un 41,9% siendo los de mayor porcentaje, seguidos por los de 36 a 45 años en un 22,6%, un 19,4% entre los 26 a 35 años, sólo de 46 a 55 años en un 9,7% y en el rango de 56 a 62 años representando el 6,5%.

TABLA 2. Distribución de pacientes por enfermedad

DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES POR ENFERMEDAD		
Pacientes	Número	Porcentaje
Periodontitis Crónica	23	74,2%
Excluidos	8	25,8%
Total	31	100,0%

FUENTE: Historia clínica periodontal
AUTOR: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

GRÁFICO 2



FUENTE: Historia clínica periodontal
AUTOR: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

INTERPRETACIÓN:

En este estudio la muestra fue de 31 pacientes internos en la Comunidad Terapéutica “Salvando al Adicto”, a los cuales previo la hoja de información y al consentimiento firmado, se les aplicó la historia clínica periodontal de los cuales el 74,2% fueron considerados por ser alcohólicos - fumadores con periodontitis crónica y bolsas ≥ 6 mm, y el 25,8% fueron excluidos por consumir drogas y aquellos que presentaban Gingivitis y bolsas < 6 mm. (Ver tabla 2)

TABLA 3. Parámetros clínicos para el diagnóstico periodontal

PARÁMETROS CLÍNICOS PARA EL DIAGNÓSTICO PERIODONTAL								
CÓDIGO	% Placa bacteriana	# dientes examinados	# de sitios examinados	Porcentaje SS	Promedio NIC	Promedio PS	Número de sitios ≥ 6	promedio ≥ 6
2	58,62	29	174	13,2	1,9	1,9	11	6,0
4	73,21	28	168	22,0	2,9	2,9	13	6,3
5	96,55	26	156	34,6	3,2	3,2	4	6,0
6	94,44	27	162	55,6	2,5	2,4	4	6,0
7	64,00	16	96	65,6	4,3	3,9	17	6,4
8	100,00	25	150	53,3	2,4	2,4	4	6,0
9	100,00	28	168	8,3	2,6	2,6	4	6,0
10	100,00	6	36	50,0	9,0	6,1	20	7,3
13	100,00	16	96	93,8	4,2	3,3	7	6,3
15	63,64	22	132	63,6	3,4	3,2	6	6,0
17	98,20	28	168	38,1	3,3	2,9	9	6,1
18	100,00	23	138	74,6	3,7	3,0	8	6,3
19	100,00	28	168	13,1	2,1	2,1	3	6,0
20	100,00	26	156	8,3	2,4	2,4	4	6,0
21	100,00	27	162	100,0	2,4	2,2	6	6,0
22	100,00	25	150	100,0	2,0	2,4	7	6,0
23	100,00	18	108	96,3	3,5	2,8	3	6,0
24	100,00	25	150	76,0	3,6	3,3	7	6,9
25	94,64	28	168	74,4	2,5	2,0	4	6,0
26	100,00	30	180	83,3	2,9	2,8	3	6,0
27	99,00	28	168	26,8	2,5	2,5	2	6,0
28	74,11	28	168	15,5	2,9	2,8	10	6,0
29	77,50	30	180	100,0	4,2	3,2	10	6,3
TOTAL	2093,90	567,00	3402,00	1266,52	74,44	66,37	166,00	141,80
PROMEDIO	91,04	24,65	147,91	55,07	3,24	2,89	7,22	6,17

FUENTE: Historia clínica periodontal
AUTOR: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

INTERPRETACIÓN:

A los 23 pacientes se les realizó el periodontograma completo observando en la Tabla 3 los siguientes resultados: con un promedio de 91,04% de placa bacteriana nos indica la falta de higiene personal por descuido y la presencia de la adicción al alcohol y tabaco. De los 3402 sitios examinados en 567 dientes evidenciamos que 166 de estos presentan bolsas periodontales ≥ 6 mm, siendo el promedio de estas bolsas de 6,17 mm. Otro parámetro que nos indica la presencia de enfermedad periodontal es el sangrado al sondaje (SS) en un 55,07% por la inflamación que se produce en el periodonto de inserción y de protección. El promedio del NIC es de 3,24 y de la PS es de 2,89, indicándonos la presencia de periodontitis crónica en estos pacientes.

TABLA 4. Grados de severidad en pacientes

GRADOS DE SEVERIDAD EN PACIENTES								
CÓDIGO	ALCOHÓLICOS				FUMADORES			
	Leve	Moderado	excesivo	De Riesgo	No Fumador	Leve	Moderado	Severo
2				x	x			
4				x		x		
5			x			x		
6				x	x			
7				x	x			
8			x			x		
9				x			x	
10			x			x		
13				x				x
15		x					x	
17				x			x	
18				x		x		
19	x					x		
20		x				x		
21				x				x
22		x			x			
23				x				x
24				x	x			
25				x	x			
26		x				x		
27		x					x	
28				x			x	
29			x			x		
SUBTOTAL	1	5	4	13	6	9	5	3
% PARCIA	4,35%	21,74%	17,39%	56,52%	26,09%	39,13%	21,74%	13,04%

FUENTE: Historia clínica periodontal
 AUTOR: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

INTERPRETACIÓN:

En cuanto al grado de severidad de los pacientes alcohólicos tenemos en la Tabla 4 que 56, 52% son alcohólicos de riesgo; seguidos de los alcohólicos moderados en un 21,74%; después los alcohólicos excesivos en un 17,39%; y, el 4,35% es un alcohólico leve. Mientras en lo que se refiere al grado de severidad de los fumadores tenemos que el 39,13% de fumadores leves; en un 26,09% son no fumadores; el 21,74% fumadores moderados; y sólo el 13, 04% son fumadores severos.

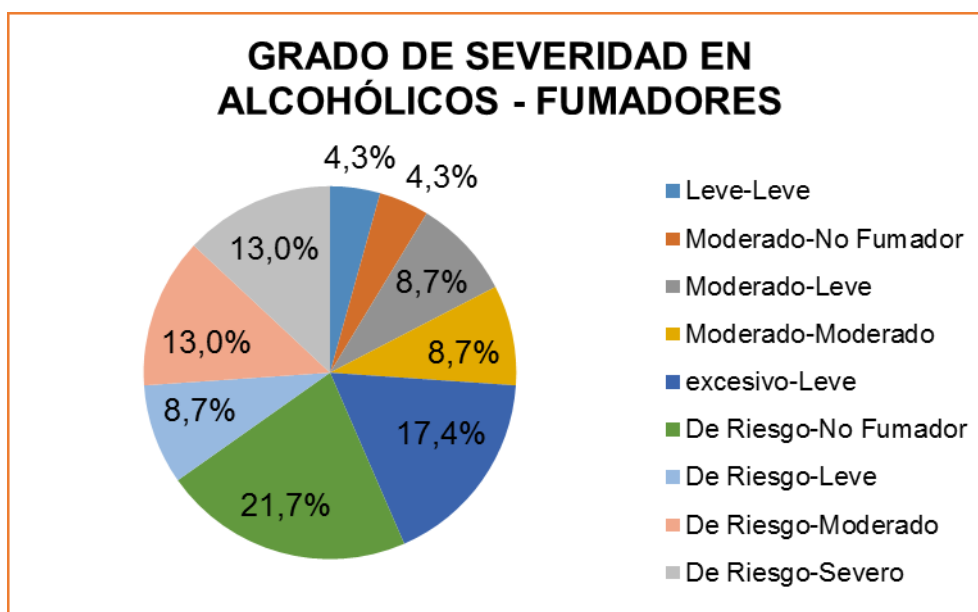
TABLA 5. Grados de severidad en alcohólicos – fumadores

GRADO DE SEVERIDAD EN ALCOHÓLICOS - FUMADORES		
Grado Alcohólico-Fumador	Frecuencia	Porcentaje
Leve-Leve	1	4,3%
Moderado-No Fumador	1	4,3%
Moderado-Leve	2	8,7%
Moderado-Moderado	2	8,7%
Excesivo-Leve	4	17,4%
De Riesgo-No Fumador	5	21,7%
De Riesgo-Leve	2	8,7%
De Riesgo-Moderado	3	13,0%
De Riesgo-Severo	3	13,0%
TOTAL	23	100,0%

FUENTE: Historia clínica periodontal y datos de las fichas de la Comunidad Terapéutica "Salvando al Adicto"

AUTOR: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

GRÁFICO 3



FUENTE: Historia clínica periodontal y datos de las fichas de la Comunidad Terapéutica "Salvando al Adicto"

AUTOR: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

INTERPRETACIÓN:

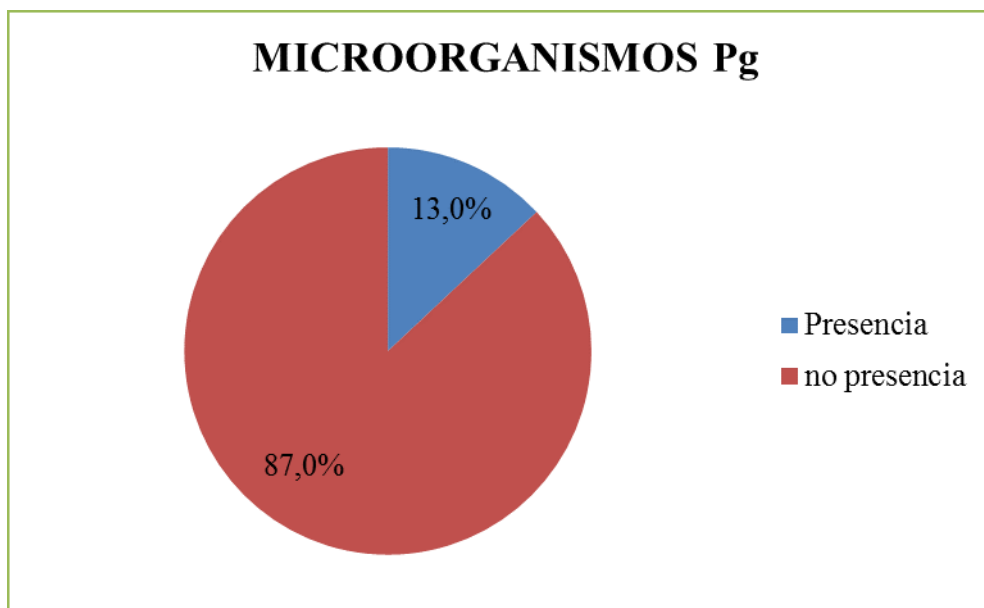
Al establecer una comparación del grado de severidad de los alcohólicos – fumadores observamos en la tabla 5 que se presenta que: el 21,7% son De riesgo – No fumadores; seguidos de los Excesivo – Leves en un 17,4%; después están los De riesgo – Moderados y De riesgo – Severos en un porcentaje del 13,0%. Los pacientes de riesgo – Leve, Moderado – Moderado y Moderado – Leve en un 8, 7% cada grupo. Y finalmente el 4,3% corresponde a un paciente Moderado – No fumador, y al Leve – Leve.

TABLA 6. Resumen de presencia de microorganismos

RESUMEN DE PRESENCIA DE MICROORGANISMOS				
MICROORGANISMOS	<i>f</i>		<i>%</i>	
	Presencia	no presencia	Presencia	no presencia
<i>Pg</i>	3	20	13,0%	87,0%
<i>Td</i>	13	10	56,5%	43,5%
<i>Tf</i>	21	2	91,3%	8,7%
<i>Aa</i>	5	18	21,7%	78,3%
<i>Fn</i>	23	0	100,0%	0,0%

FUENTE: Resultado de la prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL
AUTOR: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

GRÁFICO 4



FUENTE: Resultado de la prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL
AUTOR: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

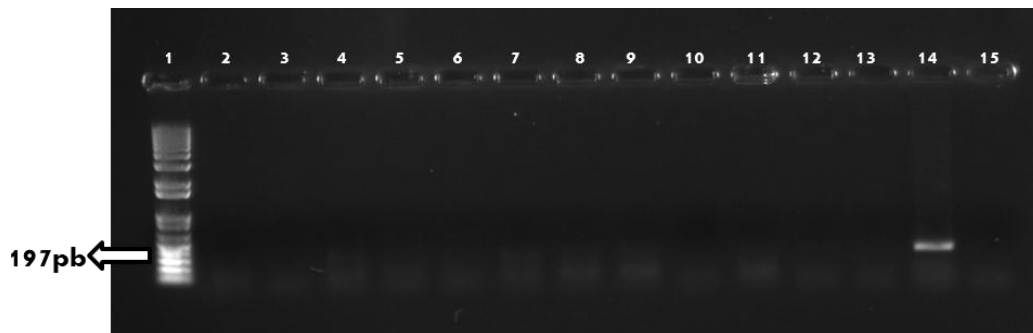


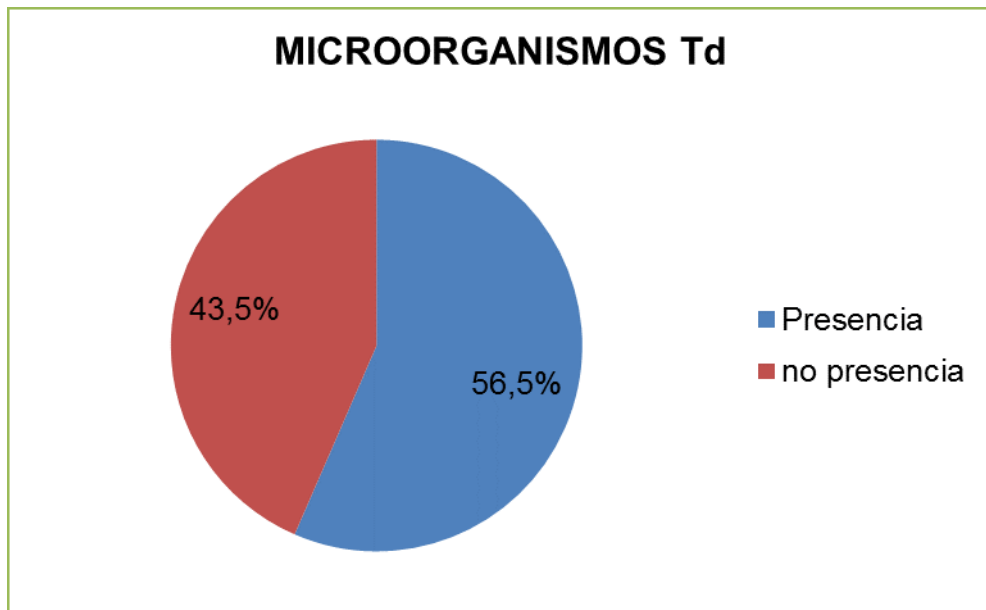
Figura 15. Verificación del producto de PCR en gel de agarosa de Pg de 197 pb detectados en pacientes alcohólicos – fumadores con periodontitis crónica. Línea 1: marcador de peso molecular (Mpm) 1 Kb (1KB PLUS DNA LADDER – Invitrogen). Línea 14: ADN de Pg de control de referencia. Línea 15: control negativo de PCR.

Fuente: Resultado de la prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL. Control de referencia de ADN de Pg donados por el Dr. Mauricio Bittner Ortega, Coordinador Académico de Microbiología del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Oral de la Universidad Andrés Bello de Chile.

INTERPRETACIÓN:

Este resultado se obtuvo al tomar la muestra del biofilm subgingival en dos sitios de las bolsas periodontales $\geq 6\text{mm}$ en cada uno de los 23 pacientes, de los cuales *Porphyromona gingivales* es un bacilo gram negativo que por sus múltiples factores de virulencia la hacen sumamente agresiva, siendo el surco gingival el lugar con condiciones para su crecimiento, interaccionando con el huésped produciendo una destrucción lenta pero constante de los tejidos del periodonto. Se la encontró presente solo en un 13%, esto se podría presentar por ser colonizadora terciaria y desarrollarse ya en periodontitis agresivas según estudios realizados con anterioridad (Ver tabla 6). Además observamos en la figura 15, los resultados de la PCR de Pg en pacientes alcohólicos- fumadores con periodontitis crónica.

GRÁFICO 5



FUENTE: Resultado de la prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL.
AUTOR: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

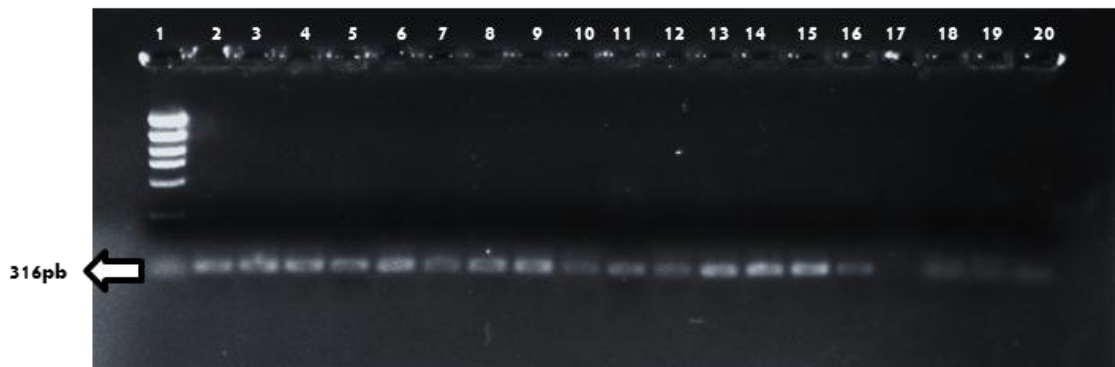


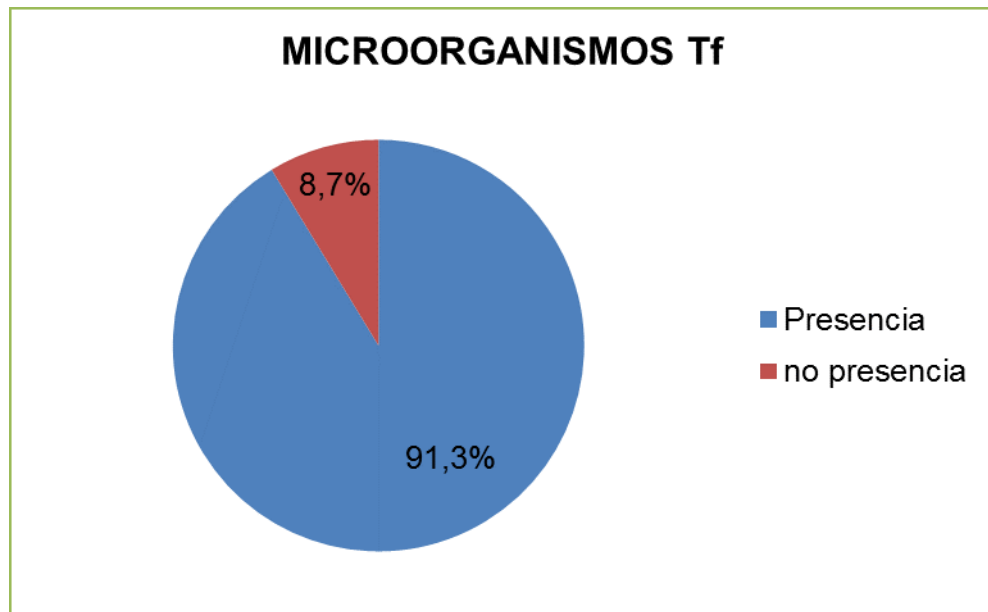
Figura 16 Verificación del producto de PCR en gel de agarosa de Td de 316 pb detectados en pacientes alcohólicos – fumadores con periodontitis crónica. Línea 1: marcador de peso molecular (MpM) 1 Kb (1KB PLUS DNA LADDER – Invitrogen). Línea 2 – 16 y 18 a 20: muestras positivas de Td.

Fuente: Resultado de la prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL. Control de referencia de ADN de *Td* donados por el Dr. Mauricio Bittner Ortega, Coordinador Académico de Microbiología del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Oral de la Universidad Andrés Bello de Chile.

INTERPRETACIÓN:

Treponema denticola es una de las bacterias periodontopatógenas que en la tabla 6 se la encontró presente en un 56,15%, es decir, en 13 de los 23 pacientes lo que nos indica que está en el periodonto provocando la inflamación y destrucción de estos tejidos, ha sido asociada con la progresión de la periodontitis crónica, en este caso en mayor cantidad en los adultos jóvenes que han consumido alcohol y tabaco en grandes cantidades, según algunos estudios ésta también se encuentra en grandes cantidades en bolsas periodontales >5mm. Además observamos en la figura 16, las muestras que resultaron positivas a Td en pacientes alcohólicos- fumadores con periodontitis crónica.

GRÁFICO 6



FUENTE: Resultado de la prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL
AUTOR: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

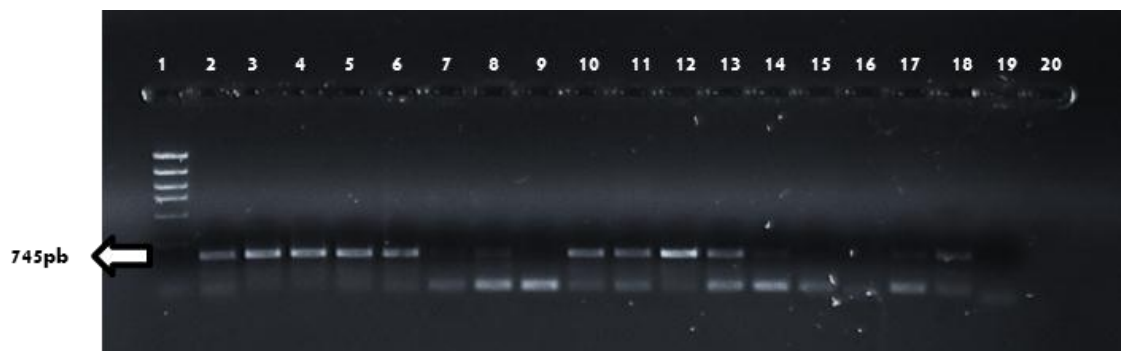


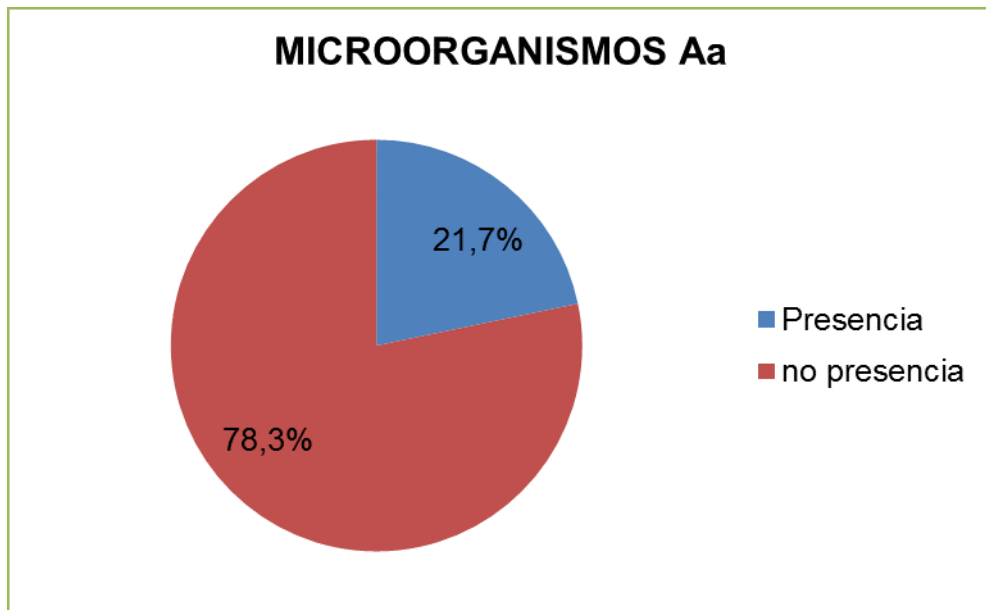
Figura 17. Verificación del producto de PCR en gel de agarosa de Tf de 745 pb detectados en pacientes alcohólicos – fumadores con periodontitis crónica. Línea 1: marcador de peso molecular (MpM) 1 Kb (1KB PLUS DNA LADDER – Invitrogen). Línea 2-8, 10-14, 17 y 18: muestras positivas de Aa. Línea 20: control negativo de PCR.

Fuente: Resultado de la prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL. Control de referencia de ADN de *Tf* donados por el Dr. Mauricio Bittner Ortega, Coordinador Académico de Microbiología del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Oral de la Universidad Andrés Bello de Chile.

INTERPRETACIÓN:

En lo que se refiere a *Tannerella forsythia* en un 91,3% se encuentra presente en 21 pacientes por lo que solo en 2 de ellos no se encuentra siendo una de la bacterias que se desarrolla en el medio que le proporcionan los consumidores de alcohol y cigarrillo, además por el descuido y la falta de interés de realizar una buena técnica de cepillado así como de visitar al odontólogo cada 4 o 6 meses. Este estudio se observó identificación frecuente de *T. forsythia* en pacientes con PC, microorganismo que se asoció con mayor profundidad de bolsa y gran pérdida de inserción periodontal, corroborando estudios previos. (Ver tabla 6). Además observamos en la figura 17, las muestras que resultaron positivas a Tf en pacientes alcohólicos- fumadores con periodontitis crónica.

GRÁFICO 7



FUENTE: Resultado de la prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL
AUTOR: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

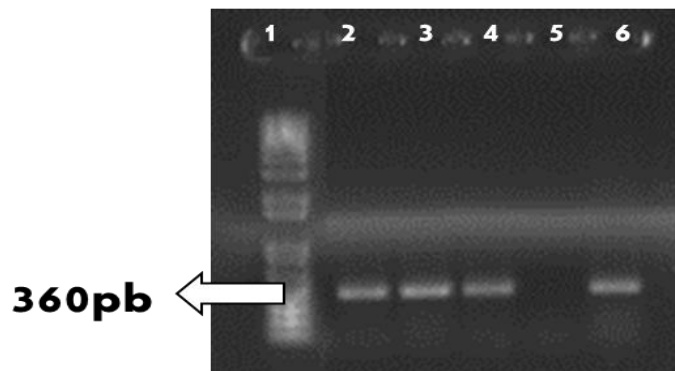


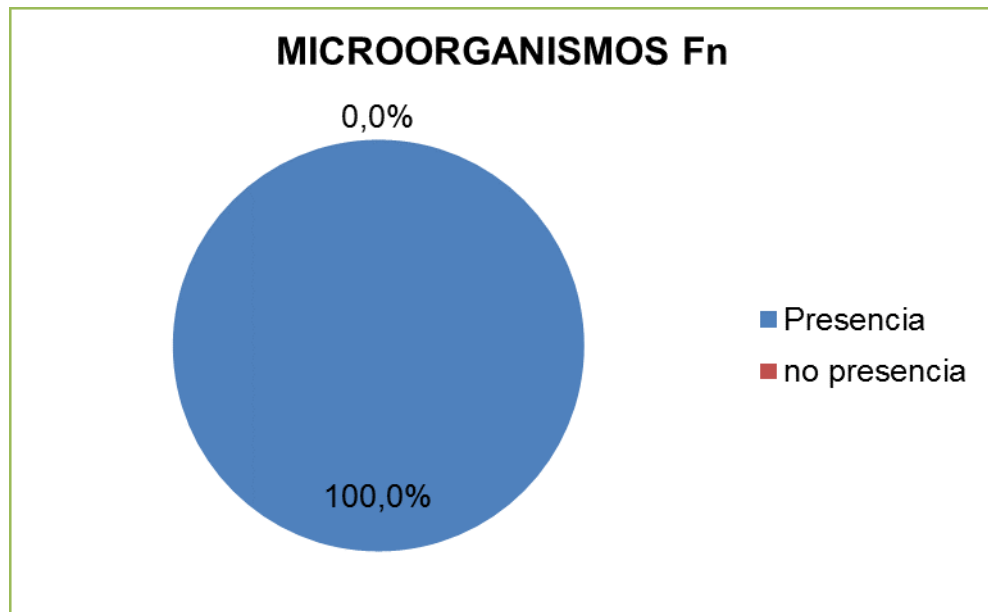
Figura 18. Verificación del producto de PCR en gel de agarosa de Aa de 360 detectados en pacientes alcohólicos – fumadores con periodontitis crónica. Línea 1: marcador de peso molecular (MpM) 1 Kb (1KB PLUS DNA LADDER – Invitrogen). Línea 2 y 4: muestras positivas de Aa. Línea 5: control negativo de PCR. Línea 6: ADN de Aa de control de referencia

Fuente: Resultado de la prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL. Control de referencia de ADN de Aa donados por el Dr. Mauricio Bittner Ortega, Coordinador Académico de Microbiología del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Oral de la Universidad Andrés Bello de Chile.

INTERPRETACIÓN:

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A.a) es un patógeno muy estudiado en los cuadros clínicos de periodontitis, por lo que se ha descubierto múltiples factores de virulencia que la hacen un patógeno importante en la enfermedad periodontal, especificado en la periodontitis agresiva localizada. Lo que corroboramos en la tabla 6 con este estudio por que solo se encuentra en 5 pacientes, es decir, en un 21,7% los cuales tienen ya una periodontitis mas agresiva muestras que el 78,3 % presentan propiamente una periodontitis crónica. Además observamos en la figura 18, las muestras que resultaron positivas a Aa en pacientes alcohólicos- fumadores con periodontitis crónica.

GRÁFICO 8



FUENTE: Resultado de la prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL
AUTOR: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt



Figura 19. Verificación del producto de PCR en gel de agarosa de Fn de 167 pb detectados en pacientes alcohólicos – fumadores con periodontitis crónica. Línea 1: marcador de peso molecular (MpM) 1 Kb (1KB PLUS DNA LADDER – Invitrogen). Línea 2 - 18: muestras positivas de Fn. Línea 19: ADN de Fn de control de referencia. Línea 20: control negativo de PCR.

Fuente: Resultado de la prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL. Control de referencia de ADN *de Fn* donados por el Dr. Mauricio Bittner Ortega, Coordinador Académico de Microbiología del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Oral de la Universidad Andrés Bello de Chile.

INTERPRETACIÓN:

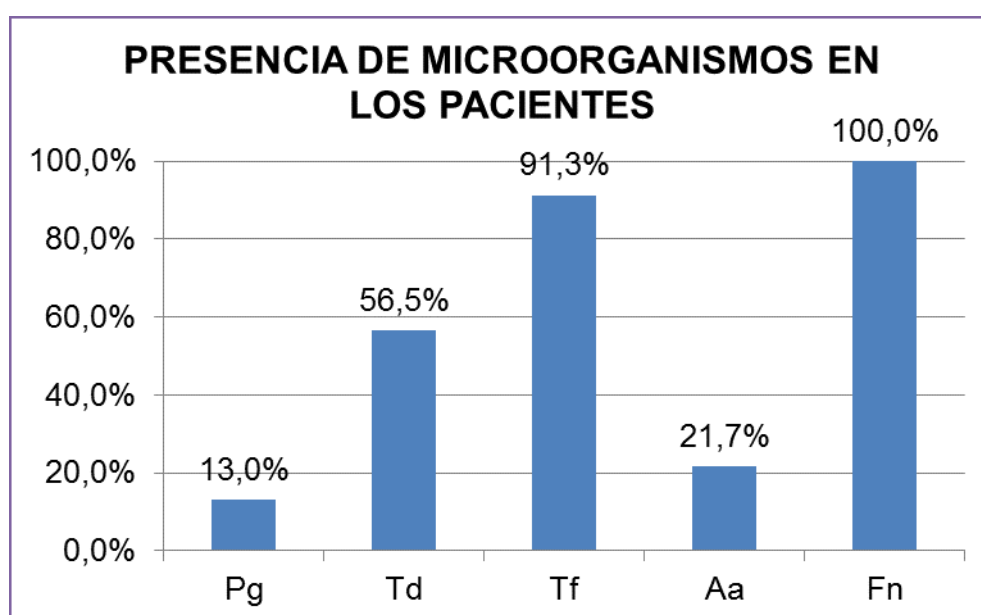
Otro microorganismo clave es *Fusobacterium nucleatum* en el progreso de la enfermedad periodontal, el cual tiene la capacidad de coagregarse con los otros periodontopatógenos y de esta manera facilitar su colonización. Es por ello que se encuentra en un 100%, en los 23 pacientes ocasionando la periodontitis crónica y permite corroborar a lo que se menciona en los diferentes estudios realizados con anterioridad. (Ver tabla 6). Además observamos en la figura 19, las muestras que resultaron positivas a Fn en pacientes alcohólicos- fumadores con periodontitis crónica.

TABLA 7. Presencia de los microorganismos en los pacientes

PRESENCIA DE MICROORGANISMOS EN LOS PACIENTES					
Microorganismo	Pg	Td	Tf	Aa	Fn
Frecuencia	3	13	21	5	23
Porcentaje	13,0%	56,5%	91,3%	21,7%	100,0%

FUENTE: Resultado de la prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL
AUTOR: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

GRÁFICO 9



FUENTE: Resultado de la prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL
AUTOR: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

INTERPRETACIÓN:

El microorganismo que está presente en primer lugar es *Fn* en un 100%, el segundo lugar es para *Tf* con el 91,3%, en tercer lugar está *Td* con un 56,5%, en cuarto lugar *Aa* con el 21,7% y finalmente en el quinto lugar *Pg* con el 13%. Estando presentes las 5 bacterias en pacientes con periodontitis crónica, solamente *Aa* y *Pg* en menores porcentajes ya que son comunes en casos agresivos. (Ver tabla 7)

TABLA 8. Grados de severidad y presencia de microorganismos en pacientes

GRADOS DE SEVERIDAD Y PRESENCIA DE MICROORGANISMOS EN PACIENTES														
CÓDIGO	ALCOHÓLICOS				FUMADORES				RESENCIA DE MICROORGANISMOS EN LOS PACIENTE					# de microorganismos
	Leve	Moderado	excesivo	De Riesgo	No Fumador	Leve	Moderado	Severo	Pg	Td	Tf	Aa	Fn	
2				x	x					+	+		+	3
4				x		x				+	+		+	3
5			x			x				+	+	+	+	4
6				x	x								+	1
7				x	x				+	+	+	+	+	5
8			x			x					+	+	+	3
9				x			x				+		+	2
10			x			x					+		+	2
13				x				x		+	+		+	3
15		x					x				+		+	2
17				x			x			+	+		+	3
18				x		x				+	+		+	3
19	x					x							+	1
20		x				x					+		+	2
21				x				x	+	+	+	+	+	5
22		x			x					+	+		+	3
23				x				x	+	+	+		+	4
24				x	x					+	+		+	3
25				x	x					+	+		+	3
26		x				x					+		+	2
27		x					x				+		+	2
28				x			x			+	+		+	3
29			x			x					+	+	+	3
SUBTOTAL	1	5	4	13	6	9	5	3	3	13	21	5	23	
% PARCIA	4,35%	21,74%	17,39%	56,52%	26,09%	39,13%	21,74%	13,04%	13,0%	56,5%	91,3%	21,7%	100,0%	

FUENTE: Historia clínica periodontal y Resultado de la prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL

AUTOR: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

INTERPRETACIÓN:

En la tabla 8 se analiza el grado de severidad de alcohólicos – fumadores y la presencia de los microorganismos, de lo que podemos evidenciar que el 56,52% son alcohólicos de riesgo y el 21, 74% son moderados; mientras que existe que el 39,13% de los fumadores son leves y el 26,09% son no fumadores. Resultando que en todos los pacientes está presente el *Fn* en un 100%, seguida de la *Tf* en un 91,3% y después la *Td* en un 56,5%, indicándonos que son los microorganismos periodontopatógenos clásicos en este tipo de pacientes. Además el promedio de microorganismos presentes es de 3, pero al menos uno se encuentra produciendo enfermedad periodontal en un alcohólico de riesgo y no fumador con 18 años de edad y el otro caso es en un alcohólico leve y fumador leve también con 18 años de edad en ellos pueden estar presentes otro microorganismos que se pueden coagregar gracias al *Fn* por ser pacientes jóvenes; y existen dos casos en los que se presentan las 5 bacterias en un paciente alcohólico de riesgo y no fumador y en un alcohólico de riesgo y fumador severo, por lo que se evidencia que en ellos la periodontitis en agresiva generalizada, además están en el rango de edad de los 55 a los 62 años y por el consumo de alcohol de forma excesiva, se descuidan y pierden los hábitos de higiene oral predisponiendo el habitat idóneo para estos microorganismos se desarrollen y se ve claramente que puede ser fumador o no para que estas estén ocasionando alteraciones en el periodonto.

TABLA 9. Cálculo del diagnóstico de periodontitis crónica

CÁLCULO DEL DIAGNÓSTICO DE PERIODONTITIS CRONICA										
CÓDIGO	Número de sitios >= 6	promedio >= 6	Pg	Td	Tf	Aa	Fn	# de micro organismos	Cumple	No Cumple
2	11	6,0		+	+		+	3		1
4	13	6,3		+	+		+	3		1
5	4	6,0		+	+	+	+	4		1
6	4	6,0					+	1		1
7	17	6,4	+	+	+	+	+	5	1	
8	4	6,0			+	+	+	3		1
9	4	6,0			+		+	2		1
10	20	7,3			+		+	2		1
13	7	6,3		+	+		+	3		1
15	6	6,0			+		+	2		1
17	9	6,1		+	+		+	3		1
18	8	6,3		+	+		+	3		1
19	3	6,0					+	1		1
20	4	6,0			+		+	2		1
21	6	6,0	+	+	+	+	+	5	1	
22	7	6,0		+	+		+	3		1
23	3	6,0	+	+	+		+	4		1
24	7	6,9		+	+		+	3		1
25	4	6,0		+	+		+	3		1
26	3	6,0			+		+	2		1
27	2	6,0			+		+	2		1
28	10	6,0		+	+		+	3		1
29	10	6,3			+	+	+	3		1
								SUMA	2	21
								Porcentaje	8,7%	91,3%
								PROMEDIO	2,826	

FUENTE: Historia clínica periodontal y Resultado de la prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL

AUTOR: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

INTERPRETACIÓN:

En la tabla 9 se evidencia claramente que en bolsas periodontales iguales a 6 mm no se presentan los 5 microorganismos en estudio, lo que no se cumple en el 91,3% de los casos que corresponde a 21 pacientes; sólo en 2 pacientes se cumple, es decir, en el 8,7%. Pero se evidencia claramente que el promedio de los microorganismos presentes es de 2,826 que equivale a 3 periodontopatógenos por sitio examinado en cada paciente.

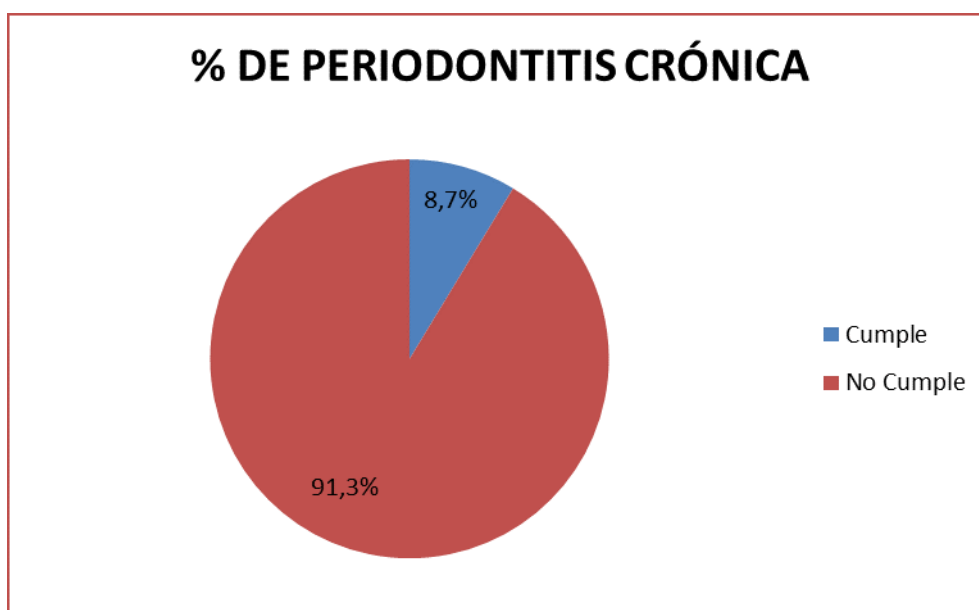
TABLA 10. Porcentaje de periodontitis crónica

% DE PERIODONTITIS CRÓNICA		
# de microorganismos	Cumple	No Cumple
SUMA	2	21
Porcentaje	8,7%	91,3%

FUENTE: Historia clínica periodontal y Resultado de la prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL

AUTOR: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

GRÁFICO 10



FUENTE: Historia clínica periodontal y Resultado de la prueba de Biología Molecular – PCR, en el Centro de Biotecnología UNL

AUTOR: Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

INTERPRETACIÓN:

Observamos en la Tabla 10 que el 8,7% de pacientes cumple que con la presencia de los 5 microorganismos, en cambio el 91,3% no cumple, debemos tomar en cuenta que no es necesario que estén presente los 5 microorganismos para que exista la enfermedad periodontal, con la presencia de 1 a 2 ya son indicativos de la inflamación en el periodonto y de la enfermedad infecciosa como es la periodontitis crónica.

g. DISCUSIÓN

En la actualidad se conoce claramente que la periodontitis es una enfermedad infecciosa y multifactorial, la cual produce alteración en los tejidos de soporte y protección de las piezas dentales del huésped. El sistema inmune de los pacientes con esta enfermedad es susceptible, lo que hace posible la presencia de periodontopatógenos, que dañan el tejido mediante diversos factores de virulencia como lipopolisacáridos, toxinas y proteasas extracelulares (Troncoso et al., 2010).

Sin embargo, la colonización es la clave de esta enfermedad periodontal infecciosa, en el cual las bacterias pueden adherirse firmemente y de manera específica a diferentes tipos celulares. Esto mediante un bacilo Gram negativo alargado y anaerobio llamado *Fusobacterium nucleatum*, el cual es la pieza principal del proceso de colonización de las bacterias descritas por Socransky en 1998 ya que permite la unión de los principales patógenos periodontales causantes de las periodontitis crónicas y agresivas, los cuales pertenecen al grupo rojo (*P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola*) y el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Además, estudios recientes demuestran una asociación compleja entre el hábito de fumar y la periodontitis, debido a que la nicotina induce la secreción de epinefrina, lo que conlleva una disminución de la microcirculación gingival, la alteración de la susceptibilidad tisular de los linfocitos T, la alteración de la quimiotaxis y la actividad fagocítica de los PMN que provoca el tabaco. Mientras que con el consumo de alcohol se asocia por la falta de higiene oral, la carencia de atención dental y aquellas alteraciones fisiológicas y psicológicas que se producen en los grandes bebedores y fumadores (Barbieri et al., 2005).

De lo descrito anteriormente se decidió analizar la presencia de *Porphyromona gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; para lo cual se examinó a 23 pacientes alcohólicos – fumadores con un diagnóstico de periodontitis crónica y en algunos casos con evidencia de una periodontitis

agresiva, los cuales fueron atendidos en la Comunidad Terapéutica “Salvando al Adicto” de la ciudad de Loja.

Los resultados para los diferentes parámetros clínicos en los pacientes indican promedios de 55,07% para el SS, de 2,89 mm para PS y 6,17mm para bolsas periodontales. El cálculo del promedio NIC es de 3,24 mm. Además el 91,04 %, de los pacientes diagnosticados presentan un mal hábito de higiene oral. Todos estos parámetros indican claramente la presencia de periodontitis crónica en estos pacientes, lo cual coincide con los porcentajes elevados de sangrado al sondaje y placa bacteriana; además los promedios similares de PS y NIC descritos en el estudio de Ardila et al., 2014.

Para la detección de las bacterias involucradas en la enfermedad periodontal de estos pacientes se realizó la técnica PCR. Esta técnica fue utilizada varios estudios anteriores realizados por Watanabe, 1993; Lin et al., 1995 y Meurman et al., 1997, quienes mencionan que este método es rápido, relativamente simple, detecta bacterias aunque estén en bajo número y no requiere células vivas lo cual es un índice de alta sensibilidad y especificidad.

Fueron empleados cinco parejas de cebadores descritos con anterioridad (Mujica et al., 2010), los cuales amplifican regiones específicas del ADNr 16S de *P gingivalis*, *T denticola*, *T forsythia*, *F nucleatum* y *A actinomycetemcomitans* de manera individual. La importancia de usar esta metodología es debido a que *T. denticola* y *T. forsythia* que son unas de las bacterias más frecuentes en la población de estudio son difíciles de cultivar (Darveau et al., 2012). Por lo que de esta manera el diagnóstico se hace más rápido y certero que de manera tradicional, aportando una nueva metodología a la comunidad odontológica ecuatoriana, ya que no existen estudios similares en el país.

Los resultados del diagnóstico molecular evidenciaron que un 91,13 % de los pacientes presentaron *Tf*, seguida de *Td* presente en un 56,5 % de los mismos, mientras que en un 100% presentaron *Fn*, la cual es más común por ser una bacteria secundaria o puente que permite la coagregación con otras especies.

De manera adicional cabe mencionar que *Aa* se halló en un 21,7 % y *Pg* en un 13,0 %. Datos similares fueron descritos en el estudio de Darby et al., 2000, en muestras provenientes de 24 pacientes, para los cuales se obtienen los siguientes resultados: *Tf* en un 97,1%, *Pg* 62,5%, *Td* 45,8% y *Aa* 3%, donde se observa de manera similar que *Tf* es una de las más frecuentes en cambio difiere ya que estos autores describen *Pg* como segunda bacteria más frecuente. En cambio *Aa* no fue encontrada por Darby et al., 2000 y en el presente estudio 3 de los pacientes resultaron positivos para este periodontopatogéno.

Mombelli et al., 2002 indican que el hecho de distinguir sujetos con enfermedad periodontal agresiva de sujetos con enfermedad periodontal crónica, se debe precisamente, al no detectar *Aa*, ya que esta bacteria es un claro parámetro de la enfermedad periodontal agresiva. El diagnóstico clínico periodontal de los tres pacientes positivos para *Aa* corrobora la presencia de una periodontitis agresiva.

Los estudios realizados por Zambon et al., en 1983, Haffajee et al., en 1984, Zambon en 1985, Van Winkehoff et al., 1989; Slots et al., 1990; Savitt y et al., 1991 y Kamma et al., 1995 demuestran que *Aa* es una bacteria típica de la enfermedad periodontal agresiva. Mientras que *Pg*, aun siendo más típica en la enfermedad periodontal crónica, se ha visto que se puede ver relacionada a pacientes con enfermedad periodontal agresiva.

En cuanto a *Tf* también puede estar relacionada a ambos tipos de enfermedad, tal como informaron Haffajee et al., 1997, y Kamma et al., 1995. Mientras que *Td*, según los estudios realizados por Riviere et al., 1992, se encuentra en aquellos pacientes con enfermedad periodontal crónica. Lo que concuerda con lo encontrado en este estudio, debido a que la mayoría de los pacientes resultaron positivos a *Td* presentaron periodontitis crónica.

Rojo et al., 2011 menciona que la frecuencia es mayor en los sujetos de 40 - 49 años, existiendo una relación en cuanto a la edad y la periodontitis crónica, lo que no concuerda con este estudio, siendo más frecuente en la edad de los

18 a 25 años. Además se indica que la mayoría de las personas de sexo masculino se encuentran en este centro de rehabilitación por tener problemas de consumo con respecto al alcohol en un alto porcentaje siendo ya un riesgo para su salud por consumir todos los días o cada fin de semana y muchos de ellos también fuman de una forma desmedida, en una cantidad de más de 10 cigarrillos al día.

Según lo descrito en la literatura dentro de los factores de riesgo que posee la periodontitis está el tabaquismo (Carranza et al., 2004), al relacionarlo con el grado de alcoholismo en el presente estudio se evidenció que existen diferencias en la detección de bacterias del grupo rojo, *Aa* y *Fn*. Sólo se observó la presencia de *Aa* en pacientes leves y no fumadores, pero que son alcohólicos excesivos y de riesgo, lo que indica que la bacteria esta directa o indirectamente relacionada con los efectos del tabaco en el periodonto, pero el medio bucal de pacientes alcohólicos le permite su desarrollo.

Los resultados de este trabajo sugieren que existe una diversa incidencia de los periodontopatógenos analizados según el grado de consumo de alcohol y de tabaco, lo que permite cuestionarnos más sobre las bacterias que se quieren detectar y la relación que estas tienen con los diferentes malos hábitos.

h. CONCLUSIONES

- El estudio se realizó bajo los criterios de inclusión, para ello se tomó en cuenta todo el universo, que corresponde a 23 pacientes alcohólicos – fumadores, diagnosticados a través de un examen clínico periodontal y mediante la técnica de PCR para la detección de microorganismos como *Porphyromona gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, evidenciando que existe la presencia de enfermedad periodontal crónica e incluso agresiva en esta población de estudio.
- Se comprobó que el 56,52% de los internos son alcohólicos de riesgo, y en un 39,13% fumadores leves, encontrando Fn, Tf y Td como los microorganismos más característicos en una periodontitis crónica. Mientras que Aa y Pg nos indican que están presentes en una periodontitis netamente agresiva.
- La presencia de los diferentes microorganismos fue detectada de acuerdo al grado de alcoholismo y tabaquismo de los pacientes alcohólicos - fumadores de la Comunidad Terapéutica “Salvando al Adicto” con periodontitis crónica, siendo de un 100% Fn, en un 91,13% Tf, seguida por un 56,5% Td, de Aa en un 21,7 %, y de Pg en menor cantidad en un 13%.
- Se demostró que en los pacientes con cualquier grado de severidad de alcoholismo o de tabaquismo está presente al menos un microorganismo periodontopatógenos, siendo aproximadamente de 2 a 3 bacterias y en casos de los alcohólicos de riesgo y fumadores moderados están presentes las 5 bacterias analizadas.

i. RECOMENDACIONES

- Es primordial difundir a los pacientes alcohólicos – fumadores, las enfermedades más recurrentes que se dan a nivel del periodonto de inserción y protección de los dientes y sus consecuencias.
- Informar a estos pacientes mediante campañas educativas periódicas, ya sea con charlas así como hojas informativas enseñándoles la técnica de cepillado adecuada con la finalidad de que controlen la enfermedad periodontal tempranamente y la pérdida de dientes por el descuido y su condición socioeconómica, con visitas al odontólogo cada 4 o 6 meses.
- Es necesario en nuestro país implementar en base a la Biología Molecular al PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), como una prueba complementaria valiosa para el diagnóstico, logrando de esta manera una mejor planificación de tratamiento y proporcionar un claro beneficio para el paciente por su alto porcentaje de especificidad y sensibilidad.
- Realizar otros estudios en nuestro país de diagnóstico molecular de microorganismos periodontopatógenos mediante el cultivo de estas cepas presentes en los pacientes alcohólicos – fumadores con periodontitis crónica y en aquellos individuos con características que confieren los factores de riesgo periodontales, con la finalidad de obtener nuevos resultados y aportar a la sociedad de acuerdo al Plan Nacional para el Buen Vivir 2013 – 2017, un diagnóstico periodontal certero y para que en futuras investigaciones logren un tratamiento periodontal idóneo manteniendo el buen estado de la salud oral.
- En el equipo médico de los centros de rehabilitación, con fines preventivos y terapéuticos, esté integrado por un odontólogo.
- Para poder brindar un adecuado tratamiento a la enfermedad periodontal, es importante la realización de cultivos de biofilm dental, identificando de

esta manera a los microorganismos y así poder administrar un antibiótico eficaz a más del tratamiento mecánico.

- Realizar estudios basados en hallazgos radiográficos para observar el grado de reabsorción alveolar que experimentan los pacientes alcohólicos - fumadores, teniendo en cuenta la acción destructiva que ejercen los microorganismos periodontopatógenos sobre el periodonto de inserción y de protección.

j. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2007). Effector mechanisms of cell mediated immunity. Cellular and molecular immunology (Sexta ed., Vol. 4). Philadelphia, Pensilvania: Saunders Elsevier.

Ainamo, J., & Ainamo, A. (1978). "Development of Oral Health during Dental studies in India and Finland". International Dental Journal, 28, 427-433.

Albandar , J. M., & Tinoco , M. B. (2002). Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. Periodontology 2000, 29, 153-176.

Armitage, G. (1999). "Development of a classification system for periodontal diseases and conditions." (Vol. 4). Annals of Periodontology.

Armitage, G. C. (2005). Diagnóstico y clasificación de las enfermedades periodontales. Periodontology 2000, 9, 9-21.

Bartlett, J. M., & Stirling, D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. Methods Mol Biol, 226, 3-6.

Bascones-Martínez A, F.-R. E. (2004). Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 9 , 92-107.

Bazzano, G., Parodi, R., Tabares, S., & Sembaj, A. (2012). Evaluación de la terapia mecánica periodontal en bolsas profundas: Respuesta clínica y bacteriológica. Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral, 5(3), 122-126.

Borrell , L. N., & Papapanou, P. N. (2005). Analytical epidemiology of periodontitis. J Clin Periodontology, 6, 132-158.

Borrell, L. N., & Papapano, P. N. (2005). Analytical epidemiology of periodontitis. Journal of Clinical Periodontology, 32(6), 132-158.

Botero JE, B. E. (2010). Determinantes del Diagnóstico Periodontal. Revista Clinica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación oral, 3(2), 94-99.

Bottino, M. A. (2008). Periodoncia. Nuevas tendencias (Vol. 4). Artes Medicas Latinoamérica.

Bustamante Ojeda M, (2013). Estudio microbiológico y efecto de la Cefalexina en bacterias de la placa dental en pacientes de los Centros de Rehabilitación Terapéutica: La Mano de Dios y Salvando al Adicto de la ciudad de Loja, durante el periodo mayo – octubre del 2012.). (Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Loja). Recuperado de <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/4052/1/BUSTAMANTE%20OJEDA%20MIGUEL%20SANTIAGO.pdf>

Butler, J. (2005). Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR. 63-84.

Carranza, F., Newman, M., & Takei, H. (2002). PERIODONTOLOGÍA CLÍNICA. (Novena ed.). México: McGraw-Hill Interamericana.

Carranza, Newman, & Takei. (2004). Periodontología clínica. (Novena ed.). Mexico: Mc Graw-Hill. Interamericana.

Costerton, J. W., & Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 167-193.

Cuenca , E., Cuenca , S., & Baca, P. (2007). Saliva y Placa Bacteriana. En: *Odontología Preventiva y Comunitaria*. Barcelona: Masson.

Escribano, C. (2007). *Aggregatibacter Actinomycetocomitans*: su susceptibilidad a los antimicrobianos. (Tesis doctoral, Universidad de Barcelona). Recuperado de http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2517/CEP_TESIS.pdf?sequence=1

Genco, R., Golman, H., & Cohen , G. (1993). Periodoncia. Mexico: Interamericana.

Gherzi Miranda, H. D. F., & Inga Peña, R. D. M. (2010). Identificación por Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) de microorganismos presentes en

las infecciones orofaciales odontogénicas. Rev. estomatologica. Hered, 20(1), 5-12.

Grimard BA, H. M. (2009). Comparison of clinical,periapical radiograph, and cone beam volume tomography measurement techniques for assessing bone level changes following regenerative periodontal therapy. 80, 48-55.

Guzman, S., Karima, M., Wang, H. Y., & Van Dyke, T. E. (2003). Association between interleukin-1 genotype and periodontal disease in a diabetic population. Journal of Periodontology, 74(8), 1183-1190.

Heitz-Mayfield. (2005). Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. J Clin Periodontology, 6, 196-209.

Hernández, A. (2014). Importancia de la Tomografía Axial Computarizada (TAC). Recuperado el 01 de abril de 2015, de <http://www.cleber.com.br/adalsa.html>

Johnson GK, G. M. (2007). Impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. 44, 178–194.

Lenguas Silva, A. L., Ortega Aranegui, R., Samara Shukeir, G., & López Bermejo, M. Á. (2010). Tomografía computerizada de haz cónico. Aplicaciones clínicas en odontología; comparación con otras técnicas. Científica Dental. Revista científica de formación continuada, 7(2), 67-79.

Liébana, J., Castillo , A. M., & Álvarez, M. (2004). Enfermedades periodontales: consideraciones microbiológicas. (Vol. 9). Medicina Oral, Patología Oral y Ciriugia Bucal.

Lindhe, J., Karring , T., & Lang, N. (2009). Periodontologia clinica e implantologia odontologica (quinta ed.). Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana.

Lindhe, J., Karring, T., & Lang, N. (2000). *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica* (Tercera Edición ed.). Madrid – España: Editorial Médica Panamericana S. A.

Mujica Troncoso, C., Castillo-Ruiz, M., Daille, L. K., Fuentesvilla, I. A., & Bittner, M. (2010). Co-detección de Patógenos Periodontales en Pacientes Chilenos con Periodontitis Crónica. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 3(3), 118-122.

Negróni, M. (1999). *Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica*. Buenos Aires, Argentina: Medica Panamerica.

Nick, A., Saunders, & Martin. (2013). *Real-Time PCR: Advanced Technologies and Applications* | Book. Porton Down: Health Protection Agency.

Novak MJ, N. K. (2003). El tabaquismo y la enfermedad periodontal. . 245.

Page , R. C., & Kornman, K. S. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology* 2000, 14, 9-11.

Paulander, J., Axelsson, P., Lindhe, J., & Wennstrom, J. L. (2004). Some characteristics of 50/55-year-old individuals with various experience of destructive periodontal disease: a cross-sectional study. *Acta Odontologica Scandinavica*(62), 199-206.

Perea, B. (2009) Métodos de diagnóstico microbiológico en la enfermedad periodontal. *Científica Dental*. 6 (2):29-37.

Prichard, J. F. (1982). *Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad periodontal en la práctica odontológica*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S. A.

Prichard, J. F. (1982). *Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad periodontal en la práctica odontológica*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S. A.

Ramos Perfecto, D., Moromi Nakata, H., Martínez Cadillo, E., & Mendoza Rojas, A. (2014). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans: Patógeno importante en la periodontitis*. *Odontología Sanmarquina*, 13(2), 42-45.

Ramos Perfecto, D., Moromi Nakata, H., & Martínez Cadillo, E. (2014). Porphyromonas gingivalis: patógeno predominante en la periodontitis crónica. *Odontología Sanmarquina*, 14(1), 34-38.

Rosales Loor, J (2012). Agrandamiento gingival por ingesta de fármacos. (Tesis de postgrado, Universidad de Guayaquil). Recuperado de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/2807/1/Jaime%20Luis%20Loor%20Rosales%205-3%20Odontologia%20Tesis.pdf>

Socransky SS, H. A. (2003). Biofilms dentales: objetivos terapéuticos difíciles. *Periodontol 2000*, 3, 12-55.

Tamay de Dios L, I. C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigacion en Discapacidad*, 2(2), 70-78.

Teles, R. P., Haffajee, A. D., & Socransky, S. S. (2007). Objetivos microbiológicos del tratamiento periodontal. *Periodontology 2000 (Ed Esp)*, 17, 180-218.

Tezal M, G. S. (2001). El efecto del consumo de alcohol sobre la enfermedad periodontal. *72*, 183-189.

Tezal, M., Grossi , S. G., Ho, A. W., Genco , R. J., Pitiphat , W., Merchan , A. T., . . . Joshipura, K. J. (2004). Alcohol consumption and periodontal disease. The Third National Health and Nutrition Examination Survey Alcohol consumption increases periodontitis risk. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(7), 484-488.

Xie, H. G. (2000). "Intergeneric communication in dental plaque biofilms.". *J Bacteriol*, 182(24), 7067-7069.

Ximenez-Fyvie, L. A., Haffjee, A., Som, S., Thompson, M. T., Socransky , S., & Torresyap, G. (2000). The effect of repeated professional supragingival removal on the composition of the supraand subgingival microbiota. *J Clin Periodontol*, 27, 637-647.

k. ANEXOS

INSTRUMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN

ANEXO 1. Carta de autorización al Director para realizar la investigación en la Comunidad Terapéutica “Salvando al Adicto”.



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE ODONTOLOGÍA**

Loja, de Marzo de 2015

Sr.

Eduardo Carpio

DIRECTOR DE LA COMUNIDAD TERAPÉUTICA “SALVANDO AL ADICTO”

Ciudad.-

De mi consideración:

Yo, Alexandra Johanna Aguilar Betancourt, estudiante de la Carrera de Odontología de la Universidad Nacional de Loja, me dirijo a usted primeramente para desearle éxitos en el desempeño de sus actividades; así mismo para pedirle comedidamente que me permita realizar mi investigación de Tesis de grado, con el tema de **DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE MICROORGANISMOS PERIODONTOPATÓGENOS EN PACIENTES ALCOHÓLICOS - FUMADORES CON PERIODONTITIS CRÓNICA, PERTENECIENTES A UN CENTRO DE REHABILITACIÓN DE LA CIUDAD DE LOJA, EN EL PERIODO MARZO - JULIO 2015.** La misma que he planteado realizar en la Comunidad Terapéutica “Salvando Al Adicto”, con el fin de conocer y dar a conocer las necesidades de los pacientes internos, durante el período comprendido desde marzo – junio del presente.

Cabe indicar que se ha designado un tutor de tesis, quien estará a cargo del monitoreo y evaluación de mi persona durante el periodo indicado, para lo que solicito a Ud., se le brinde las debidas facilidades para dicho monitoreo.

Por la favorable atención que se dé a la presente le reitero mis agradecimientos.

Atentamente,

Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

ESTUDIANTE DE LA CARRERA DE ODONTOLOGÍA

ANEXO 2. Carta de autorización al Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE ODONTOLOGÍA

Loja, de Marzo de 2015

Sr. Doctor

Tito Muñoz

COORDINADOR DEL CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

Ciudad.-

De mi consideración:

Yo, Alexandra Johanna Aguilar Betancourt, estudiante de la Carrera de Odontología de la Universidad Nacional de Loja, me dirijo a usted primeramente para desearle éxitos en el desempeño de sus actividades; así mismo para pedirle comedidamente que me permita realizar la prueba de Reacción de Cadena de la Polimerasa para mi investigación de Tesis de grado, con el tema de **DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE MICROORGANISMOS PERIODONTOPATÓGENOS EN PACIENTES ALCOHÓLICOS - FUMADORES CON PERIODONTITIS CRÓNICA, PERTENECIENTES A UN CENTRO DE REHABILITACIÓN DE LA CIUDAD DE LOJA, EN EL PERIODO MARZO - JULIO 2015**. La cual la quiero realizar en su Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, con el fin de realizar la prueba de Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR) de las muestras obtenidas, durante el período comprendido desde marzo – junio del presente.

Cabe indicar que se ha designado un tutor de tesis, quien estará a cargo del monitoreo y evaluación de mi persona durante el periodo indicado, para lo que solicito a Ud., se le brinde las debidas facilidades para dicho monitoreo.

Por la favorable atención que se dé a la presente le reitero mis agradecimientos.

Atentamente,

Alexandra Johanna Aguilar Betancourt

ESTUDIANTE DE LA CARRERA DE ODONTOLOGÍA

ANEXO 3. Historia clínica periodontal



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
 ÁREA DE LA SALUD HUMANA
 CARRERA DE ODONTOLOGÍA
 TESIS DE GRADO

HISTORIA CLÍNICA

No. Historia Clínica:.....
 Fecha:.....

ANAMNESIS

Identificación:

Nombres y Apellidos:.....

Domicilio:.....

Teléf:..... Sexo:..... Edad:.....

ANAMNESIS GENERAL

HABITOS

Higiene bucal

- Tipo de cepillo:.....
- Otros implementos:.....
- Técnica de cepillado:.....

Alcoholismo

- Consume alcohol: SI () o NO ()
- Cantidad:..... Tiempo:.....

Tabaquismo

- Fuma: SI () o NO ()
- No. De cigarrillos:..... Tiempo:.....

PERIODONTAL SCREENING & RECORDING (PSR)

S1	S2	S3
S4	S5	S6

INDICE DE O'LEARY

Indice						%						Fecha:			
1.8	1.7	1.8	1.6	1.4	1.3	1.2	1.1	2.1	2.2	2.3	2.4	2.6	2.8	2.7	2.8
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4.8	4.7	4.8	4.6	4.4	4.3	4.2	4.1	3.1	3.2	3.3	3.4	3.6	3.8	3.7	3.8

1-30%	Bueno- aceptable	
31-60%	Regular	
61-100%	Malo	

PRUEBA DE PCR

PRESENCIA	A	B	C	D
SI				
NO				

REFERENCIA:

BACTERIA

A: *Porphyromona gingivalis*

B: *Treponema denticola*

C: *Tannerella forsythia*

D: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

DIAGNÓSTICO

.....

NUMERO DE DIENTES EXAMINADOS		PROMEDIO NIC	
NUMERO DE SITIOS EXAMINADOS		PROMEDIO P8	
PORCENTAJE %		NUMERO DE SITIOS DE P8 ≥ 8 mm	
		PROMEDIO DE P8 ≥ 8 mm	

ANEXO 4. Resultados de la técnica del PCR.

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA ÁREA DE LA SALUD HUMANA CARRERA DE ODONTOLOGÍA TESIS DE GRADO</p>			
<p>NOMBRE DE LA TESISISTA:ALEXANDRA JOHANNA AGUILAR BETANCOURT FECHA: </p>				
<p>TITULO: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE MICROORGANISMOS PERIODONTOPATÓGENOS EN PACIENTES ALCOHÓLICOS - FUMADORES CON PERIODONTITIS CRÓNICA, PERTENECIENTES A UN CENTRO DE REHABILITACIÓN DE LA CIUDAD DE LOJA, EN EL PERIODO MARZO - JULIO 2015.</p>				
<p>OBJETIVOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diagnosticar clínicamente a los pacientes alcohólicos - fumadores de la Comunidad Terapéutica “Salvando al Adicto”, a través del examen periodontal completo. • Conocer la frecuencia de periodontitis crónica en los pacientes alcohólicos - fumadores de la Comunidad Terapéutica “Salvando al Adicto”. • Determinar según el grado de alcoholismo y tabaquismo en los pacientes alcohólicos fumadores con periodontitis crónica de la Comunidad Terapéutica “Salvando al Adicto”, la frecuencia de las bacterias periodontopatógenas. 				
<p>DATOS GENERALES:</p> <p>NOMBRE DEL PACIENTE:..... EDAD:..... FECHA DE NACIMIENTO:..... SEXO: TIPO DE BEBEDOR:..... TIPO DE FUMADOR:.....</p>				
<p>PRUEBA DIAGNÓSTICA: “REACCIÓN DE CADENA DE POLIMERASA (PCR)”</p>				
PRESENCIA	A	B	C	D
SI				
NO				
<p>REFERENCIA:</p> <p style="text-align: center;">BACTERIA A: <i>Porphyromona gingivalis</i> B: <i>Treponema denticola</i> C: <i>Tannerella forsythia</i> D: <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i></p>				

ANEXO 5. Lista de cotejo.

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA ÁREA DE LA SALUD HUMANA CARRERA DE ODONTOLOGÍA TESIS DE GRADO</p>							
<p>NOMBRE DE LA TESISTA:ALEXANDRA JOHANNA AGUILAR BETANCOURT FECHA:</p>								
<p>TITULO: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE MICROORGANISMOS PERIODONTOPATÓGENOS EN PACIENTES ALCOHÓLICOS - FUMADORES CON PERIODONTITIS CRÓNICA, PERTENECIENTES A UN CENTRO DE REHABILITACIÓN DE LA CIUDAD DE LOJA, EN EL PERIODO MARZO - JULIO 2015.</p>								
<p>OBJETIVOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diagnosticar clínicamente a los pacientes alcohólicos - fumadores de la Comunidad Terapéutica “Salvando al Adicto”, a través del examen periodontal completo. • Conocer la frecuencia de periodontitis crónica en los pacientes alcohólicos - fumadores de la Comunidad Terapéutica “Salvando al Adicto”. • Determinar según el grado de alcoholismo y tabaquismo en los pacientes alcohólicos fumadores con periodontitis crónica de la Comunidad Terapéutica “Salvando al Adicto”, la frecuencia de las bacterias periodontopatógenas. 								
<p>DATOS GENERALES: NOMBRE DEL PACIENTE:..... EDAD:..... FECHA DE NACIMIENTO:..... SEXO:</p>								
<p>CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES SEGÚN EL GRADO DE ALCOHOLISMO Y TABAQUISMO</p>								
BACTERIA DETECTADA EN PCR	ALCOHÓLICO				FUMADOR			
	1	2	3	4	a	b	C	d
A								
B								
C								
D								
<p>REFERENCIA:</p>								
<p>BACTERIA A: <i>Porphyromona gingivalis</i> B: <i>Treponema denticola</i> C: <i>Tannerella forsythia</i> D: <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i></p>				<p>ALCOHÓLICO: 1: Ligero 2: Moderado 3:Excesivo 4: De riesgo</p>		<p>FUMADOR: a: No fumador b: Leve c: Moderado d: Severo</p>		



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE ODONTOLOGÍA
TESIS DE GRADO

NOMBRE DE LA TESISTA:ALEXANDRA JOHANNA AGUILAR BETANCOURT

FECHA:.....

HOJA DE INFORMACIÓN

Investigación: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE MICROORGANISMOS PERIODONTOPATÓGENOS EN PACIENTES ALCOHÓLICOS - FUMADORES CON PERIODONTITIS CRÓNICA, PERTENECIENTES A UN CENTRO DE REHABILITACIÓN DE LA CIUDAD DE LOJA, EN EL PERIODO MARZO - JULIO 2015.

Centros de Investigación:

- Comunidad Terapéutica “Salvando al Adicto”.
- Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

INFORMACIÓN:

La enfermedad periodontal es un grupo de enfermedades de naturaleza infecciosa, caracterizadas por la destrucción del aparato de soporte del diente (periodonto). Siendo la de mayor prevalencia la periodontitis, con pérdida de dientes, causa dificultades funcionales y estéticas; sin embargo, en los últimos años también se han asociado a problemas de salud sistémico.

El factor etiológico primario en las periodontitis es la presencia de bacterias específicas organizadas en forma de biofilm bajo la encía (subgingival). La *Porphyromonas gingivalis* es el patógeno más frecuentemente asociado a periodontitis. Esto hace que, junto con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, que es una de las bacterias con mayor capacidad patogénica, cobren una relevancia fundamental en el estudio de las periodontitis.

Debido a las características de las lesiones periodontales, las bacterias presentes en el biofilm subgingival, incluidos los patógenos mencionados, pueden pasar a la circulación sanguínea sistémica (bacteriemia).

En pacientes con periodontitis, existe un riesgo aumentado de sufrir bacteriemias repetidas, espontáneamente o tras maniobras habituales en la vida diaria, como el cepillado dental, masticar o tragar, etc. El paso de estas bacterias a sangre puede ser el posible nexo de unión que explique la asociación encontrada entre pacientes con periodontitis y determinadas enfermedades sistémicas, tales como enfermedades cardiovasculares.

Se le pedirá a Ud. que asista a cada una de las consultas odontológicas que se realizarán con el fin de registrar las medidas clínicas y microbiológicas, al realizar la toma de muestras de la cavidad oral, además se darán las indicaciones pertinentes que usted debe seguir para tener una correcta higiene oral.

Le explicó que para la realización del presente estudio es imprescindible su colaboración, siendo así que su omisión puede provocar resultados distintos a los esperados. A su vez, Ud. no debe de tomar ningún antibiótico ni antiséptico que pueda influir en los resultados del estudio, a no ser que sea estrictamente necesario y prescrito por un facultativo. Cualquier duda que tenga, podrá ser resuelta por la investigadora.

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Loja,.....de.....de 20.....

Yo.....
..... (NOMBRES Y APELLIDOS), con cédula de identidad No.
.....he sido correctamente informado que el estudio será realizado por una alumna de la Carrera de Odontología de la Universidad Nacional de Loja, bajo la supervisión de un Docente Tutor. Además he recibido la información suficiente, he podido hacer preguntas y recibir respuestas satisfactorias a las mismas.

Por lo tanto, acepto y autorizo la ejecución de dicho estudio a la señorita..... (NOMBRE Y APELLIDOS DE LA INVESTIGADORA), estando consciente que mi participación es voluntaria e importante.

Firma Participante

Firma tesista

Anexo 7. Rótulo de las muestras aplicadas PCR

	No. de muestra
Fecha de recepción:	No. HC:
Hora de recepción:	No. De pieza:

Anexo 8. Resultados de la presencia de microorganismos en los pacientes.

RESULTADOS DE LA PRESENCIA DE MICROORGANISMOS EN LOS PACIENTES						
MUESTRAS	CÓDIGO	Pg	Td	Tf	Aa	Fn
1	7	+	+	+		+
2		+	+	+	+	+
3	22		+	+		+
4			+	+		+
5			+	+		+
6	5		+		+	+
7	17					+
8			+	+		+
9			+	+		+
10	4		+	+		+
11	18		+	+		+
12			+	+		+
13			+	+		+
14	2		+	+		+
15	13		+	+		+
16			+	+		
17						
18	19					+
19	10			+		+
20				+		+
21				+	+	
22	24		+	+		+
23	28		+	+		+
24				+		+
25				+		+
26	26					+
27	29			+	+	+
28				+	+	+
29				+	+	+
30	8			+		+
31	23	+	+	+		+
32		+	+	+		+
33		+	+	+	+	+
34	21		+	+		+
35	27			+		+
36				+		+
37				+		+
38	20			+		+
39	25		+	+		+
40			+	+		+
41				+		+
42	15			+		+
43	6					+
44						+
45					+	+
46	9			+		+

Anexo 9. Autorización para realizar las prácticas en la Comunidad Terapéutica “Salvando al Adicto”.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
AREA DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE ODONTOLÓGIA

Loja, 10 de Abril de 2015

Sr.
Eduardo Carpio
DIRECTOR DE LA COMUNIDAD TERAPÉUTICA SALVANDO AL ADICTO

Ciudad.-

De mi consideración:

Con un atento saludo me dirijo a usted primeramente para desearle éxitos en el desempeño de sus actividades; así mismo para pedirle comedidamente que autorice a Alexandra Johanna Aguilar Betancourt, con cédula de identidad No. 1104433741, estudiante de la Carrera de Odontología de la Universidad Nacional de Loja, a realizar su investigación de Tesis de grado, con el tema de “ESTUDIO DE LOS MICROORGANISMOS PERIODONTOPATÓGENOS EN PACIENTES ALCOHÓLICOS – FUMADORES CON PERIODONTITIS CRÓNICA, PERTENECIENTES A UN CENTRO DE REHABILITACIÓN DE LA CIUDAD DE LOJA, EN EL PERIODO MARZO–JULIO 2015”. La misma que se ha planteado realizar en la Comunidad Terapéutica Salvando al Adicto, con el fin de conocer y dar a conocer las necesidades de los pacientes internos, durante el período comprendido desde marzo – junio del presente.

Cabe indicar que se le ha designado un tutor de tesis, Odt. Esp. Susana González, quien estará a cargo del monitoreo y evaluación de la señorita, durante el periodo indicado, para lo que solicito a Ud., se le brinde las debidas facilidades para dicho monitoreo.

Por la favorable atención que se dé a la presente le reitero mis agradecimientos.

Atentamente,

EN LOS TESOROS DE LA SABIDURIA
ESTÁ LA GLORIFICACIÓN DE LA VIDA

Dr. Richard Jiménez, Mg. Sc.
COORDINADOR DE LA CARRERA DE ODONTOLÓGIA



Autoriza para sus prácticas
Recibido
10 de abril de 2015



DIRECCION: Av. Manuel L. Montalvo V.
TELEFAX: (593) (7) 2571 379 – 2589 223
LOJA – ECUADOR

Anexo 10. Autorización para la Recolección de Cadena de la Polimerasa en el Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
DIRECCION DE INVESTIGACIÓN
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA



Oficio No. 94-CB-UNL
Loja, 17 de abril del 2015

Doctor
Richard Orlando Jiménez Mg. Sc.
COORDINADOR DE CARRERA DE ODONTOLOGÍA ÁREA DE SALUD HUMANA, UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
Ciudad.-

De mi consideración:

Con un atento y cordial saludo tengo a bien poner a su conocimiento que esta Dirección autoriza para que la señorita estudiante ALEXANDRA JOHANNA AGUILAR BETANCOURT, realice la Recolección de Cadena de la Polimerasa para su investigación de Tesis de grado en el Centro de Biotecnología bajo la tutoría de la Dra. Susana González.

Hago propicia la ocasión para expresarle mis sentimientos de consideración y estima personales.

Muy Atentamente,

**EN LOS TESOROS DE LA SABIDURIA
ESTÁ LA GLORIFICACIÓN DE LA VIDA**

Dr. Tito Muñoz Guarnizo Mg. Sc.
DIRECTOR DEL CENTRO DE BIOTECNOLOGIA



TMG/maa.
C.c.- Archivo

Beltran
20-abr-2015

Anexo 11. Certificado de Análisis de los primers de Invitrogen.

Invitrogen Custom Primers

Certificate of Analysis

Alisa Aguilar

GUSTAVO VENEGAS	
Order Number:	80623918
Order Date:	06-Apr-2015

Line 52 - Cat No. 10336022 - - Manufactured: 4/6/2015		Primer Number:	285178G03
Primer Name:	TDF	Primer Length:	25
Researcher	A. AGUILAR	Scale of Synthesis:	50 N
Sequence (5' to 3'):	(DNA) - TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T		
Molecular Weight (µg/µmole):	7,616.0	µg per OD:	27.35
Millimolar Extinction Coeff.: (OD/µmol):	278.5	nmoles per OD:	3.59
Purity	Desalt	OD's	9.93
% GC Content:	32	µg's	271.55
T _m (1M Na+)	81	nmoles	35.6
T _m (50 mM Na+)	59		
Notes:			

T. denticoala

Line 53 - Cat No. 10336022 - - Manufactured: 4/6/2015		Primer Number:	285179D03
Primer Name:	TDR	Primer Length:	27
Researcher	A. AGUILAR	Scale of Synthesis:	50 N
Sequence (5' to 3'):	(DNA) - TAC AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA		
Molecular Weight (µg/µmole):	8,145.4	µg per OD:	28.79
Millimolar Extinction Coeff.: (OD/µmol):	282.9	nmoles per OD:	3.53
Purity	Desalt	OD's	11.38
% GC Content:	37	µg's	327.66
T _m (1M Na+)	84	nmoles	40.2
T _m (50 mM Na+)	62		
Notes:			

T. denticoala

Line 54 - Cat No. 10336022 - - Manufactured: 4/6/2015		Primer Number:	285179D04
Primer Name:	TFF	Primer Length:	24
Researcher	A. AGUILAR	Scale of Synthesis:	50 N
Sequence (5' to 3'):	(DNA) - TAC AGG GGA ATA AAA TGA GAT ACG		
Molecular Weight (µg/µmole):	7,483.8	µg per OD:	24.71
Millimolar Extinction Coeff.: (OD/µmol):	302.9	nmoles per OD:	3.30
Purity	Desalt	OD's	11.36
% GC Content:	38	µg's	280.58
T _m (1M Na+)	80	nmoles	37.5
T _m (50 mM Na+)	59		
Notes:			

T. forsythii



Invitrogen Custom Primers

Certificate of Analysis

GUSTAVO VENEGAS	
Order Number:	80623918
Order Date:	06-Apr-2015

Line 58 - Cat No. 10336022 - - Manufactured: 4/6/2015

Primer Name: AAF
 Researcher: A. AGUILAR
 Sequence (5' to 3'): (DNA) - ATT GGG GTT TAG CCC TGG TG

Primer Number: **285179D08**
 Primer Length: 20
 Scale of Synthesis: 50 N

Molecular Weight (µg/µmole): 6,196.0
 Millimolar Extinction Coeff.: (OD/µmol): 212.3

µg per OD: 29.19
 nmoles per OD: 4.71

Purity **Desalt**
 % GC Content: **55**
 T_m (1M Na+): **85**
 T_m (50 mM Na+): **63**

OD's **8.84**
 µg's **257.90**
 nmoles **41.6**

Notes:

A. Actinomy

Line 59 - Cat No. 10336022 - - Manufactured: 4/6/2015

Primer Name: AAR
 Researcher: A. AGUILAR
 Sequence (5' to 3'): (DNA) - ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC

Primer Number: **285179D09**
 Primer Length: 20
 Scale of Synthesis: 50 N

Molecular Weight (µg/µmole): 5,910.0
 Millimolar Extinction Coeff.: (OD/µmol): 185.6

µg per OD: 31.84
 nmoles per OD: 5.39

Purity **Desalt**
 % GC Content: **60**
 T_m (1M Na+): **85**
 T_m (50 mM Na+): **64**

OD's **11.05**
 µg's **351.78**
 nmoles **59.6**

Notes:

A. Actinomy

Line 60 - Cat No. 10336022 - - Manufactured: 4/6/2015

Primer Name: FNF
 Researcher: A. AGUILAR
 Sequence (5' to 3'): (DNA) - GGA TTT ATT GGG CGT AAA GC

Primer Number: **285179D10**
 Primer Length: 20
 Scale of Synthesis: 50 N

Molecular Weight (µg/µmole): 6,213.0
 Millimolar Extinction Coeff.: (OD/µmol): 229.7

µg per OD: 27.05
 nmoles per OD: 4.35

Purity **Desalt**
 % GC Content: **45**
 T_m (1M Na+): **80**
 T_m (50 mM Na+): **59**

OD's **12.15**
 µg's **328.70**
 nmoles **52.9**

Notes:

F. mucleatum



Invitrogen Custom Primers

Certificate of Analysis

GUSTAVO VENEGAS	
Order Number:	80623918
Order Date:	06-Apr-2015

Line 55 - Cat No. 10336022 - - Manufactured: 4/6/2015

Primer Name: TFR
 Researcher: A. AGUILAR
 Sequence (5' to 3'): (DNA) - ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC

Primer Number: **285179D05**
 Primer Length: 20
 Scale of Synthesis: 50 N

Molecular Weight ($\mu\text{g}/\mu\text{mole}$): 5.910.0
 Millimolar Extinction Coeff.: (OD/ μmol): 185.6

μg per OD: 31.84
 nmoles per OD: 5.39

Purity **Desalt**
 % GC Content: 60
 T_m (1M Na+): 85
 T_m (50 mM Na+): 64

OD's 9.51
 $\mu\text{g}'\text{s}$ 302.73
nmoles 51.3

Notes:

T. forsythia

Line 56 - Cat No. 10336022 - - Manufactured: 4/6/2015

Primer Name: PGF
 Researcher: A. AGUILAR
 Sequence (5' to 3'): (DNA) - TGT AGA TGA CTG AAA ACC

Primer Number: **285179D06**
 Primer Length: 18
 Scale of Synthesis: 50 N

Molecular Weight ($\mu\text{g}/\mu\text{mole}$): 5.532.6
 Millimolar Extinction Coeff.: (OD/ μmol): 213.7

μg per OD: 25.89
 nmoles per OD: 4.68

Purity **Desalt**
 % GC Content: 39
 T_m (1M Na+): 67
 T_m (50 mM Na+): 46

OD's 10.60
 $\mu\text{g}'\text{s}$ 274.46
nmoles 49.6

Notes:

P. gingivalis

Line 57 - Cat No. 10336022 - - Manufactured: 4/6/2015

Primer Name: PFR
 Researcher: A. AGUILAR
 Sequence (5' to 3'): (DNA) - ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC

Primer Number: **285179D07**
 Primer Length: 20
 Scale of Synthesis: 50 N

Molecular Weight ($\mu\text{g}/\mu\text{mole}$): 5.910.0
 Millimolar Extinction Coeff.: (OD/ μmol): 185.6

μg per OD: 31.84
 nmoles per OD: 5.39

Purity **Desalt**
 % GC Content: 60
 T_m (1M Na+): 85
 T_m (50 mM Na+): 64

OD's 10.71
 $\mu\text{g}'\text{s}$ 340.86
nmoles 57.7

Notes:

P. gingivalis



Invitrogen Custom Primers

Certificate of Analysis

GUSTAVO VENEGAS	
Order Number:	80623918
Order Date:	06-Apr-2015

Line 61 - Cat No. 10336022 - - Manufactured: 4/6/2015		Primer Number:	285179D11
Primer Name:	FNR	Primer Length:	24
Researcher	A. AGUILAR	Scale of Synthesis:	50 N
Sequence (5' to 3'):	(DNA) - GGC ATT CCT ACA AAT ATC TAC GAA		
Molecular Weight ($\mu\text{g}/\mu\text{mole}$):	7,305.8	μg per OD:	26.73
Millimolar Extinction Coeff.: ($\text{OD}/\mu\text{mol}$):	273.3	nmoles per OD:	3.66
Purity	Desalt	OD's	11.87
% GC Content:	38	μg's	317.22
T_m (1M Na+)	80	nmoles	43.4
T_m (50 mM Na+)	59		
Notes:			

F. m. lekatom



Anexo 12. Certificado de la traducción de español a ingles del resumen.



Washington
ENGLISH INSTITUTE

WEIL - Nº 0000218

Más práctica por minuto... menor tiempo de aprendizaje.....

Loja, August 14th, 2015.

I, DUNIA JANETH VIVANCO VELEZ, hereby certify that I translated the attached document, an overview of "DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE MICROORGANISMOS PERIODONTOPATÓGENOS EN PACIENTES ALCOHÓLICOS - FUMADORES CON PERIODONTITIS CRÓNICA, PERTENECIENTES A UN CENTRO DE REHABILITACIÓN DE LA CIUDAD DE LOJA, EN EL PERIODO MARZO - JULIO 2015" from Spanish into English and that to the best of my ability, it is a true and correct translation.

I further certify that I am competent in both Spanish and English to render and certify such translation.


Mrs. Dunia Janeth Vivanco V.
ESL Teacher


Anexo 13. Material didáctico de las charlas de presentación, educación y motivación.


07/05/2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE ODONTOLÓGIA


EDUCACIÓN Y MOTIVACIÓN DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

AUTORIA:
ALEXANDRA AGUILAR BETANCOURT


AÑO LECTIVO
2015




INTRODUCCIÓN



La salud buco-dental es el cuidado adecuado de los dientes, encías y boca para promover la salud y prevenir las enfermedades bucales. Incluye cepillarse, usar hilo dental y tener cuidado dental profesional regularmente.



La boca contiene muchas bacterias por lo que es necesario tener una buena higiene, un cepillado dental eficaz para la eliminación mecánica de la placa dental supragingival y subgingival, la cual es llevada a cabo en el ámbito doméstico por el propio individuo.



1



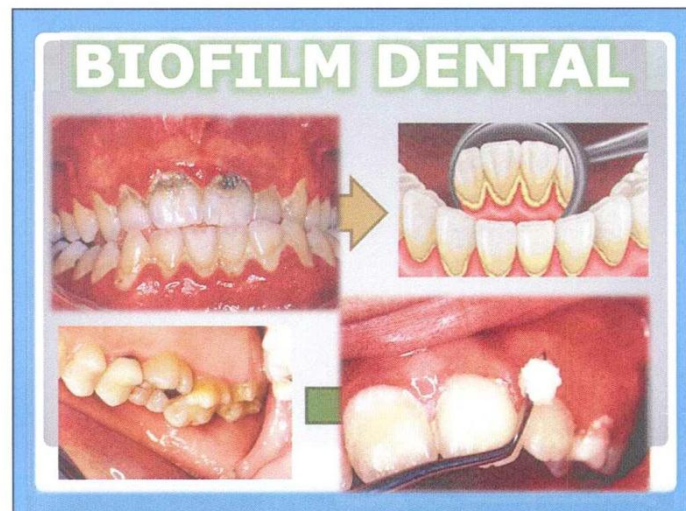
El hábito de la higiene bucal debe empezar desde bebés, al principio es responsabilidad de los padres inculcarles a los niños un buen hábito de higiene, para que una vez mayores ellos continúen con este sea un hábito cotidiano.

CEPILLADO DENTAL

Es el método de higiene que permite remover la placa bacteriana de los dientes para prevenir problemas de caries dentales o de encías.

El método más eficaz, sencillo y cómodo para eliminar placa bacteriana a nivel individual es el cepillado, con ello hacemos prevención evitamos las enfermedades más frecuentes causadas por la placa: caries y enfermedad periodontal.

The infographic features a blue border and contains several elements: a photo of a woman brushing a child's teeth, a photo of a woman brushing her own teeth, a diagram of a toothbrush cleaning a tooth, and two anatomical diagrams comparing a healthy tooth with one affected by periodontal disease. Arrows connect the text blocks to their respective images.



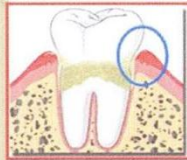
BIOFILM DENTAL

The infographic is titled 'BIOFILM DENTAL' in large green letters. It contains four photographs: a close-up of teeth with yellowish-brown plaque, a close-up of a tooth with a dental mirror, a close-up of a tooth with a white substance being applied, and a close-up of a tooth with a dental probe. Arrows indicate the progression from plaque formation to its removal and treatment.

PLACA DENTAL

Proceso

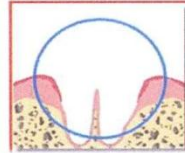
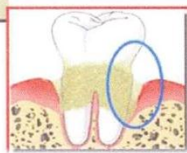
Aumenta flora destructora del tejido de inserción



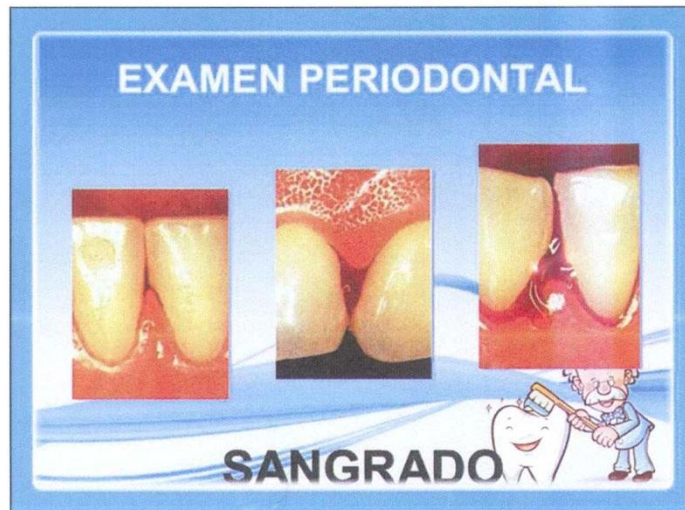
Pérdida de inserción ósea

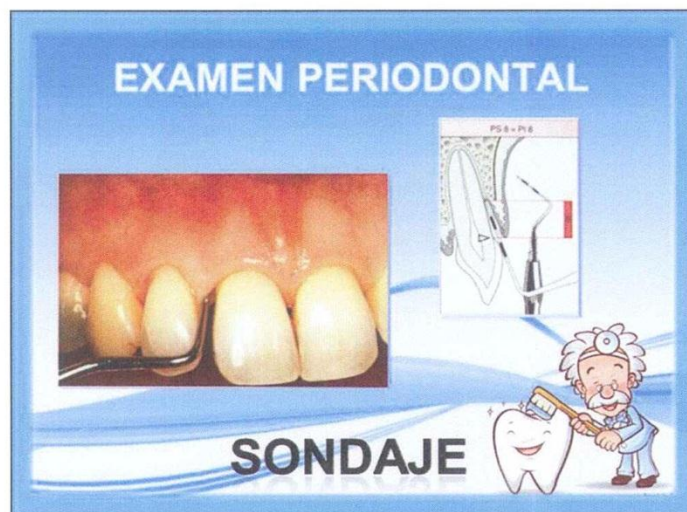
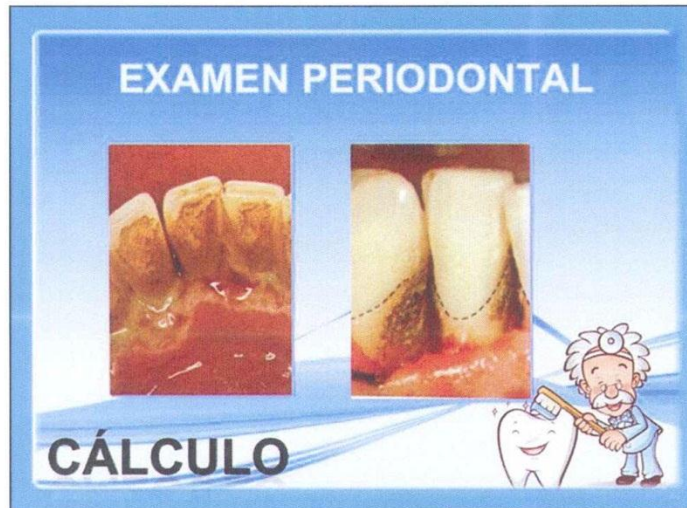


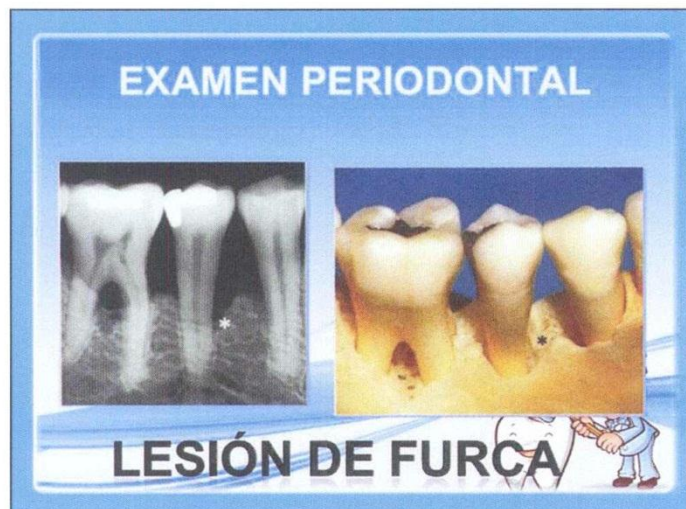
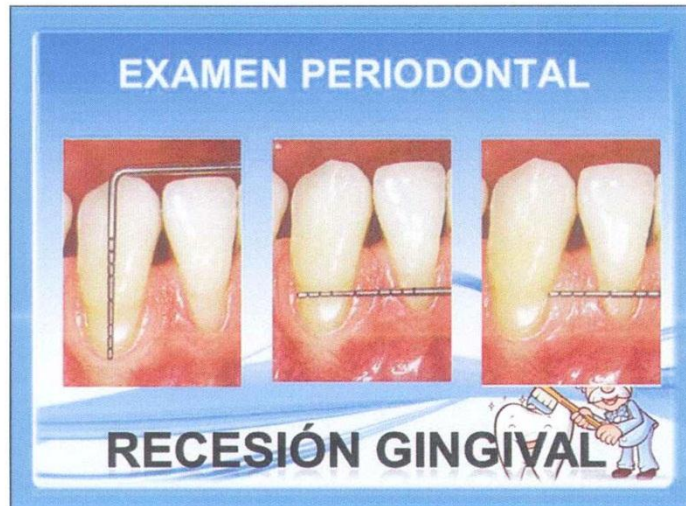
Flora se multiplica y se va haciendo más agresiva

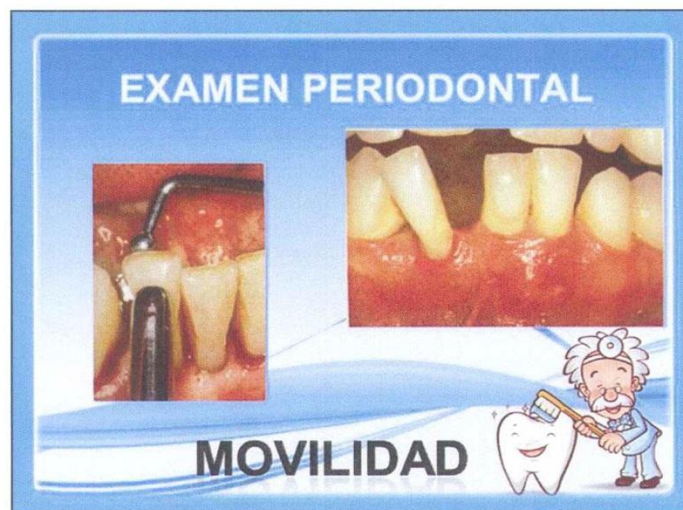
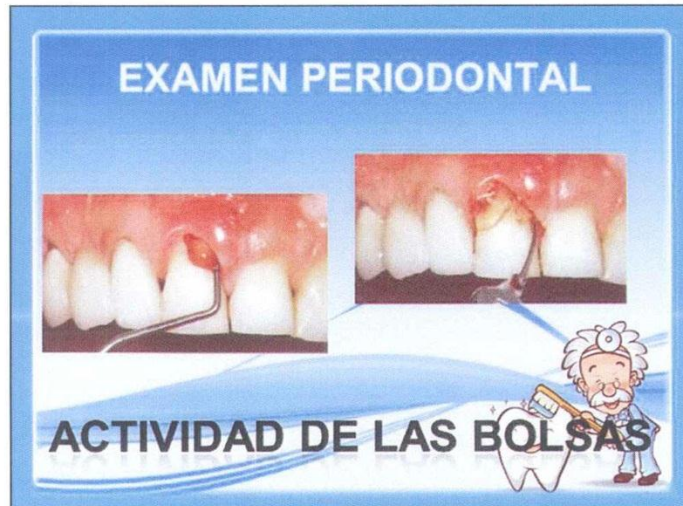






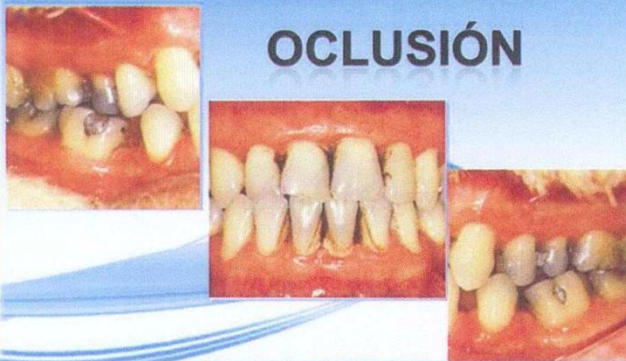




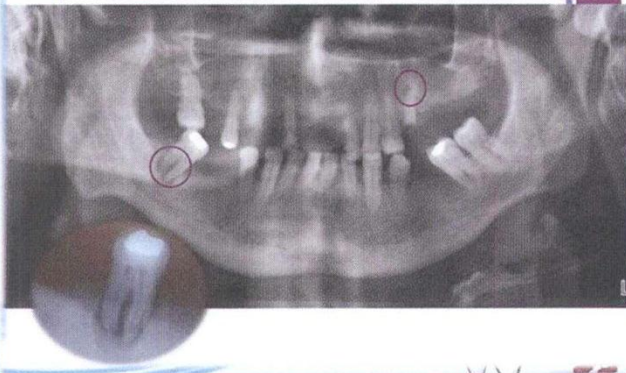


EXAMEN PERIODONTAL

OCLUSIÓN



+ Examen radiográfico (Imagenológico)



EXAMEN COMPLEMENTARIO



MICROSCOPIA





FOTOGRAFÍAS

Anexo 14. Charlas de presentación, educación y motivación



Anexo 15. Apertura de historias clínicas, diagnóstico, periodontograma, limpieza dental.

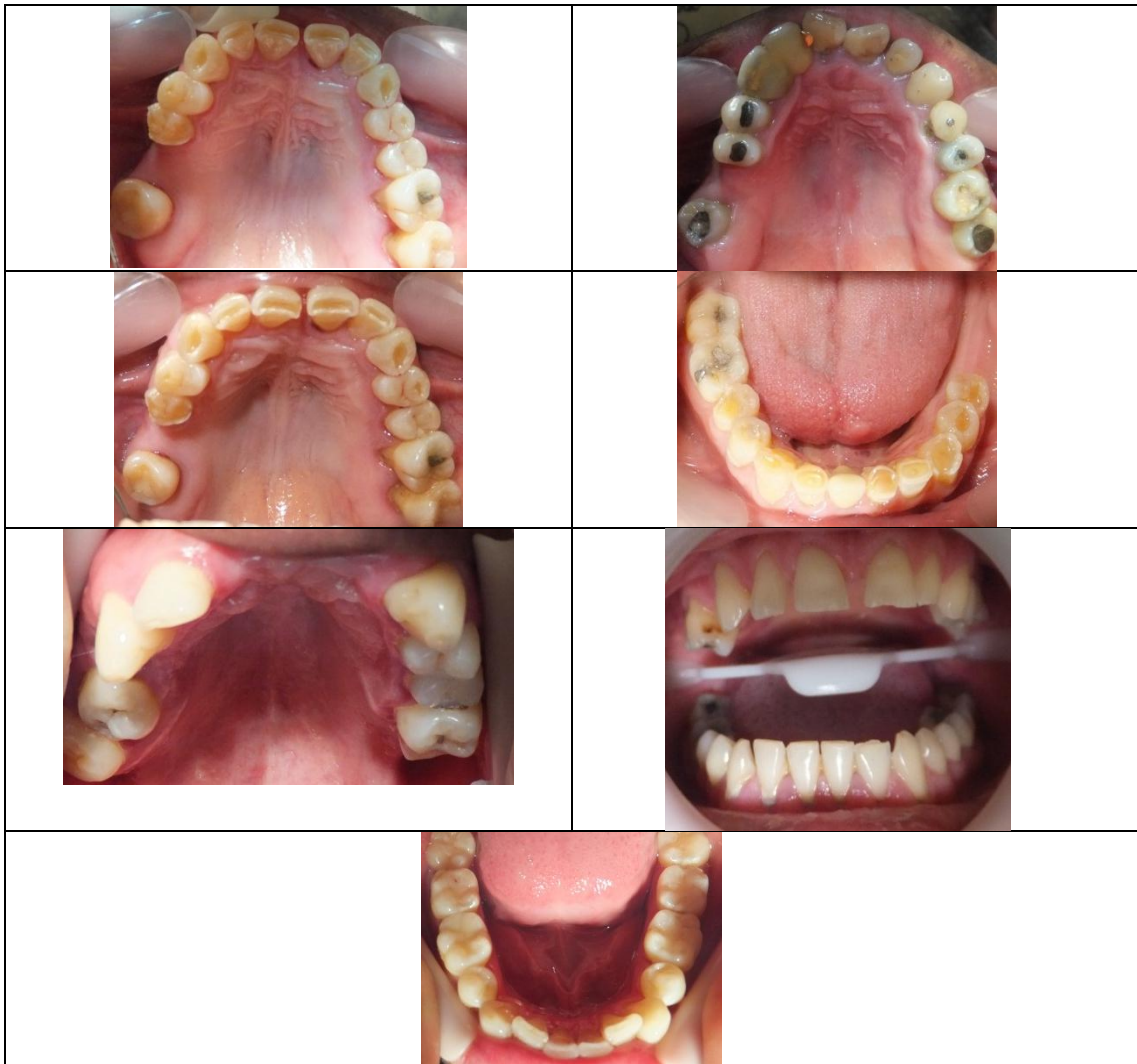


Anexo 16. Toma de muestras para el PCR a cada uno de los pacientes.

	
<p>LIMPIEZA DE LA SUPERFICIE CON UN HISOPO</p>	<p>COLOCACIÓN DEL CONO DE PAPEL EN LA BOLSA PERIODONTAL</p>
	
<p>SE DEJA CONO DE PAPEL 20 SEGUNDOS</p>	<p>COLOCACIÓN DE CONO DE PAPEL EN EL TUBO DE EPPENDORF</p>
	
<p>INTRODUCIRLO INMEDIATAMENTE Y TAPAR EL TUBO</p>	<p>ROTULAR A LOS TUBOS DE EPPENDORF</p>

Anexo 17. Fotografías de casos de periodontitis crónica de pacientes alcohólicos – fumadores.






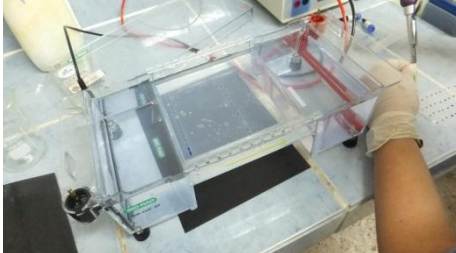
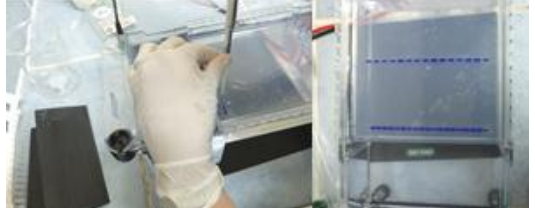

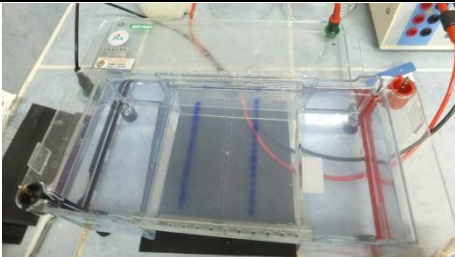





Anexo 18. Procesamiento de las muestras y obtención de los resultados.

<p>PRIMERS DE INVITROGEN</p>	<p>CONTROLES POSITIVO DE ADN DE Pg, Td, Tf, Aa y Fh DONADOS POR DR. MAURICIO BITTNER ORTEGA, COORDINADOR ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA ORAL DE LA UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO DE CHILE.</p>

	
<p>CABINA PURIFICADORA DE AIRE CLASE II – LABCONCO</p>	<p>PREPARACIÓN DE LOS PRIMERS PARA CADA BACTERIA</p>
	
<p>CONGELADORES A 4 Y 20°C</p>	<p>REACTIVOS Y MUESTRAS EN SU MEDIO ADECUADO</p>
	
<p>EXTRACCIÓN DE ADN EN EL CALENTADOR DE AGUA A 95°C DURANTE EL TIEMPO DE 10 MIN</p>	<p>REACTIVOS PARA EL PCR</p>
	
<p>PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA DETECTAR CADA BACTERIA</p>	
	
<p>COLOCACIÓN DE MUESTRAS EN EL TERMOCICLADOR BIO – RAD (iCycler) PARA LA DESNATURALIZACIÓN, ANILLAMIENTO Y ENLOGACIÓN DEL ADN</p>	<p>TERMOCICLADOR BIO – RAD (iCycler) EN CICLOS DURANTE DOS HORAS</p>

	
<p>SE PESA EN LA BALANZA TRAVEREL 1g DE AGAROSA PARA EL GEL</p>	<p>PREPARACION DEL TAE BUFFER AL 1X EN 1000ml DE H₂O PURIFICADA</p>
	
<p>PREPARACION DEL GEL CON 1g DE AGAROSA + 100 ml de TAE BUFFER AL 1X Y SE COLOCA EN EL MICROONDAS 90 SEGUNDOS</p>	<p>SE COLOCA EL GEL EN LA CAMARA BIO – RAD SUBCELL GT Y SE DEJA ENFRIAR HASTA QUE SE GELIFIQUE</p>
	
<p>SE COLOCA EL BLUE JUICE GEL LOADING BUFFER EN PAPEL PARAFILM</p>	<p>SE PIPTEA LAS MUESTRAS PREPARADAS CON EL BLUE JUICE</p>
	
<p>SE COLOCA UNA MUESTRA EN CADA AGUJERO DEL GEL PREPARADO Y EN EL PRIMER AGUJERO SE COLOCA EL MARCADOR DE PESO MOLECULAR</p>	<p>SE REALIZA EL PROCESO DE ELECTROFORESIS ACTIVANDO EL EQUIPO POWER PAC BASIC A 100 V DURANTE 45 MINUTOS</p>
	
<p>UNA VEZ LISTA LA ELECTROFORESIS OBSERVAMOS CORRER LAS CADENAS DE ADN DEL POLO NEGATIVO AL POSITIVO</p>	<p>FINALMENTE EL GEL SE COLOCA EN EL EQUIPO ENDURO GDS TOUCH PARA OBSERVAR LAS MUESTRAS POSITIVAS Y NEGATIVAS</p>

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar la presencia de los microorganismos como la *Porphyromona gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a través de la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en pacientes alcohólicos - fumadores que reciben atención en la Comunidad Terapéutica “Salvando al Adicto” con diagnóstico de periodontitis crónica, durante el periodo marzo - julio del 2015, en la ciudad de Loja.

Objetivos específicos:

- Diagnosticar clínicamente a los pacientes alcohólicos - fumadores de la Comunidad Terapéutica “Salvando al Adicto”, a través del examen periodontal completo.
- Conocer la frecuencia de periodontitis crónica en los pacientes alcohólicos - fumadores de la Comunidad Terapéutica “Salvando al Adicto”.
- Determinar según el grado de alcoholismo y tabaquismo en los pacientes alcohólicos fumadores con periodontitis crónica de la Comunidad Terapéutica “Salvando al Adicto”, la frecuencia de las bacterias periodontopatógenas

HIPÓTESIS

- Los microorganismos como la *Porphyromona gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* están presentes en pacientes alcohólicos – fumadores con periodontitis crónica.
- Existe la presencia de 1 a 2 microorganismos en estudio en los pacientes con nivel alcoholismo excesivo y nivel de tabaquismo moderado.
- Los pacientes con periodontitis crónica al tener bolsas iguales a 6mm al medir la profundidad de sondaje, presentan todos los microorganismos periodontopatógenos en estudio.

APÉNDICES

APÉNDICE 1

<p>1) ENFERMEDADES GINGIVALES</p> <p>a) Inducidas por placa:</p> <p>i) Gingivitis asociada sólo con placa dental.</p> <p>(a) Sin otros factores locales asociados.</p> <p>(b) Asociada también a otros factores locales.</p> <p>ii) Modificadas por factores sistémicos</p> <p>(a) Asociadas con el sistema endocrino:</p> <p>1) Gingivitis asociada a la pubertad.</p> <p>2) Gingivitis asociada al ciclo menstrual.</p> <p>3) Asociadas al embarazo:</p> <p>(a) Gingivitis.</p> <p>(b) Granuloma piogénico.</p> <p>4) Gingivitis asociada a diabetes mellitus.</p>	<p>2) PERIODONTITIS CRÓNICA</p> <p>a) Localizada.</p> <p>b) Generalizada.</p> <p>3) PERIODONTITIS AGRESIVA</p> <p>a) Localizada.</p> <p>b) Generalizada.</p> <p>4) PERIODONTITIS COMO MANIFESTACIÓN DE ENFERMEDADES SISTÉMICAS</p> <p>a) Asociada a desórdenes hematológicos:</p> <p>1. Neutropenia adquirida.</p> <p>2. Leucemias.</p> <p>3. Otras.</p> <p>b) Asociada a desórdenes genéticos:</p> <p>1. Neutropenia familiar y cíclica.</p> <p>2. Síndrome de Down.</p> <p>3. Síndrome de déficit de adhesión leucocitaria.</p> <p>4. Síndrome de Papillon-Lefèvre.</p> <p>5. Síndrome de Chediak-Higashi.</p> <p>6. Síndrome de histiocitosis.</p> <p>7. Enfermedad de almacenamiento del glucógeno.</p> <p>8. Agranulocitosis infantil genética.</p>
--	--

<p>(b) Asociadas con discrasias sanguíneas:</p> <p>a. Gingivitis asociada a leucemia.</p> <p>b. Otras.</p> <p>iii) Modificadas por medicamentos</p> <p>(a) Agrandamientos gingivales.</p> <p>(b) Gingivitis asociada a medicamentos:</p> <p>1) Asociada a anticonceptivos orales.</p> <p>2) Otras.</p> <p>iv) Modificadas por malnutrición:</p> <p>(a) Déficit de ácido ascórbico.</p> <p>(b) Otras.</p> <p>b) No asociadas a placa bacteriana:</p> <p>i) De origen bacteriano específico:</p> <p>(a) Lesiones asociadas a <i>Neisseria gonorrhoeae</i>.</p> <p>(b) Lesiones asociadas a <i>Treponema pallidum</i>.</p>	<p>9. Síndrome de Cohen.</p> <p>10. Síndrome de Ehler-Danlos (tipos IV y VII).</p> <p>11. Hipofosfatasa.</p> <p>12. Otros</p> <p>13. No especificados.</p> <p>5) ENFERMEDADES PERIODONTALES NECROTIZANTES</p> <p>a) Gingivitis ulcerativa necrotizante (GUN).</p> <p>b) Periodontitis ulcerativa necrotizante (PUN).</p> <p>6) ABSCESOS DEL PERIODONTO</p> <p>a) Absceso gingival.</p> <p>b) Absceso periodontal.</p> <p>c) Absceso pericoronal.</p> <p>7) PERIODONTITIS ASOCIADA A LESIONES ENDODÓNTICAS</p> <p>a) Lesiones combinadas perio-endo.</p> <p>8) CONDICIONES Y DEFORMIDADES ADQUIRIDAS O DEL DESARROLLO</p> <p>a) Factores localizados relacionados con el diente que modifican predisponen a la presencia de enfermedades gingivales/periodontales inducidas por placa:</p>
---	---

<p>(c) Lesiones asociadas a especies de <i>Streptococcus</i>.</p> <p>(d) Otras.</p> <p>ii) De origen viral</p> <p>(a) Infecciones por herpes virus:</p> <p>a) Gingivostomatitis herpética primaria</p> <p>b) Herpes oral recidivante.</p> <p>c) Infecciones por varicela-zoster.</p> <p>(b) Otras.</p> <p>iii) De origen fúngico:</p> <p>(a) Infecciones por <i>Candida</i>:</p> <p>1) Candidiasis gingival generalizada.</p> <p>(b) Eritema gingival lineal.</p> <p>(c) Histoplasmosis.</p> <p>(d) Otras.</p> <p>iv) De origen genético:</p> <p>(a) Fibromatosis gingival hereditaria.</p> <p>(b) Otras.</p> <p>v) Manifestaciones gingivales de condiciones sistémicas:</p>	<p>(1) Factores anatómicos del diente.</p> <p>(2) Aparatos y restauraciones dentales.</p> <p>(3) Fracturas radiculares.</p> <p>(4) Reabsorción radicular cervical y lágrimas del cemento.</p> <p>b) Deformaciones y condiciones mucogingivales alrededor de los dientes:</p> <p>(1) Retracción gingival:</p> <p>a. Superficies vestibulares o linguales.</p> <p>b. Interproximal (papila).</p> <p>(2) Ausencia de encía queratinizada.</p> <p>(3) Profundidad del vestíbulo disminuida.</p> <p>(4) Frenillo aberrante/posición muscular.</p> <p>(5) Exceso gingival:</p> <p>a. Pseudobolsa.</p> <p>b. Margen gingival inconsistente.</p> <p>c. Apariencia gingival excesiva.</p>
---	--

<p>(a) Desórdenes mucocutáneos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Liquen plano. 2) Penfigoide. 3) Pénfigo vulgar. 4) Eritema multiforme. 5) Lupus eritematoso. 6) Inducidos por medicamentos. 7) Otros. <p>(b) Reacciones alérgicas:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Materiales dentales: <ol style="list-style-type: none"> i. Mercurio. ii. Níquel. iii. Acrílico. iv. Otros. 2) Atribuibles a: <ol style="list-style-type: none"> i. Pastas dentífricas. ii. Colutorios. iii. Aditivos de chicles. iv. Aditivos y comidas. b. Otros. <p>vi) Lesiones traumáticas (facticias, iatrogenias, accidentales)</p> <ol style="list-style-type: none"> (a) Lesión química. (b) Lesión física. (c) Lesión térmica. <p>vii) Reacciones de cuerpo extraño.</p> <p>viii) Otras no especificadas.</p>	<p>d. Agrandamiento gingival.</p> <p>(6) Color anormal.</p> <p>c) Condiciones y deformidades mucogingivales en crestas desdentadas:</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) Cresta vertical y/u horizontal deficiente. (2) Falta de encía o tejido queratinizado. (3) Agrandamiento gingival de tejido blando. (4) Frenillo aberrante/posición muscular. (5) Profundidad del vestíbulo disminuida. (6) Color anormal. <p>d) Trauma oclusal:</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) Trauma oclusal primario. (2) Trauma oclusal secundario
--	--

ÍNDICE

CERTIFICACIÓN.....	ii
AUTORÍA.....	iii
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
a. TÍTULO.....	1
b. RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
c. INTRODUCCIÓN.....	4
d. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
1 Capítulo: Periodontitis crónica.....	6
1.1 Periodonto sano.....	6
1.1.1 Encía.....	6
1.1.2 Ligamento periodontal.....	7
1.1.3 Hueso alveolar.....	8
1.1.4 Cemento radicular.....	8
1.2 Enfermedad periodontal.....	8
1.2.1 Concepto.....	8
1.2.2 Etiopatogénesis de la enfermedad periodontal.....	9
1.2.3 Factores de riesgo.....	10
1.2.4 Clasificación de enfermedades y lesiones periodontales.....	12
1.3 Diagnóstico de la enfermedad periodontal.....	15
1.3.1 Diagnóstico clínico.....	15
1.3.2 Diagnóstico imagenológico.....	20
1.3.3 Diagnóstico microbiológico.....	22
Agronomía y diversidad: permite producir huellas genéticas de individuos.....	27
2 Capítulo: Microorganismos periodontopatógenos.....	28
2.1 Biofilm dental.....	28

2.1.1	Definición.....	28
2.1.2	Estructura.....	28
2.1.3	Formación.....	28
2.1.4	Clasificación.....	29
2.1.5	Propiedades.....	30
2.1.6	Ventajas.....	31
2.2	Microbiología de la enfermedad periodontal.....	31
2.2.1	Generalidades.....	31
2.2.2	Respuesta hospedador.....	32
2.2.3	Predisposición genética.....	32
2.2.4	Factores ambientales y adquiridos.....	33
2.2.5	Determinación de los patógenos periodontales.....	33
2.2.6	Postulados de Socransky.....	34
2.2.7	Complejos de Socransky.....	35
3	Capítulo: Alcohólicos y fumadores.....	38
3.1	Alcoholismo – tabaquismo y su relación con la enfermedad periodontal.....	38
3.1.1	El alcohol.....	38
3.1.2	El tabaco.....	38
3.1.3	Efectos periodontales.....	39
e.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
f.	RESULTADOS.....	49
g.	DISCUSIÓN.....	70
h.	CONCLUSIONES.....	74
i.	RECOMENDACIONES.....	75
j.	BIBLIOGRAFÍA.....	77
k.	ANEXOS.....	82
	APÉNDICES.....	116
	<i>APÉNDICE</i>	116
	ÍNDICE.....	120
	ÍNDICE DE TABLAS.....	123

ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	124
ÍNDICE DE FIGURAS.....	125
ABREVIATURAS.....	126

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA1. Distribución de pacientes por edad.....	49
TABLA 2. Distribución de pacientes por enfermedad.....	50
TABLA 3. Parámetros clínicos para el diagnóstico periodontal.....	51
TABLA 4. Grados de severidad en pacientes	52
TABLA 5. Grados de severidad en alcohólicos – fumadores	53
TABLA 6. Resumen de presencia de microorganismos.....	55
TABLA7. Presencia de los microorganismos en los pacientes	65
TABLA8. Grados de severidad y presencia de microorganismos en pacientes	66
TABLA9. Cálculo del diagnóstico de periodontitis crónica	68
TABLA10. Porcentaje de periodontitis crónica.....	69

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1.....	49
GRÁFICO 2.....	50
GRÁFICO 3.....	53
GRÁFICO 4.....	55
GRÁFICO 5.....	57
GRÁFICO 6.....	59
GRÁFICO 7.....	61
GRÁFICO 8.....	63
GRÁFICO 9.....	65
GRÁFICO 10.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo de la posición del margen gingival en relación a la línea amelocementaria (CEJ).	18
Figura 2. Anamnesis a los pacientes internos.....	42
Figura 3. PSR y Periodontograma	43
Figura 4. Detección de la placa bacteriana	43
Figura 5. Limpieza de la superficie con un hisopo	44
Figura 6. Cono de papel No. 30 en la bolsa periodontal ≥ 6 mm	44
Figura 7. Colocación en el tubo de Eppendorf y rotulación.....	44
Figura 8. Aplicación de la prueba de PCR previo entrenamiento de la investigadora	44
Figura 9. Extracción de ADN en el calentador de agua a 95°C durante el tiempo de 10 min	45
Figura 10. Muestras en el termociclador BIO – RAD (i Cycler) para la desnaturalización, anillamiento y enlogación del ADN.....	46
Figura 11. Partidores utilizados en este estudio.....	46
Figura 12. Preparación para la electroforesis.....	47
Figura 13. Electroforesis finalizada	47
Figura 14. Gel en el equipo ENDURO GDS TOUCH	47
Figura 15. Verificación del producto de PCR en gel de agarosa de Pg de 197 pb detectados en pacientes alcohólicos – fumadores con periodontitis crónica. ..	56
Figura 16 Verificación del producto de PCR en gel de agarosa de Td de 316 pb detectados en pacientes alcohólicos – fumadores con periodontitis crónica. ..	57
Figura 17. Verificación del producto de PCR en gel de agarosa de Tf de 745 pb detectados en pacientes alcohólicos – fumadores con periodontitis crónica.. .	59
Figura 18. Verificación del producto de PCR en gel de agarosa de Aa de 360 detectados en pacientes alcohólicos – fumadores con periodontitis crónica.. .	61
Figura 19. Verificación del producto de PCR en gel de agarosa de Fn de 167 pb detectados en pacientes alcohólicos – fumadores con periodontitis crónica.. .	63

ABREVIATURAS

Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

ADN o DNA: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ARN O RNA: Ácido ribonucleico

BANA: N-&-bencil-DL-arginina-2-naftilamida

CEJ: Línea amelocementaria

D: Distal

dNTP: 4 desoxirribonucleótidos-trifosfato

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

EU: Epitelio de unión

GUN: Gingivitis ulcerativa necrotizante

HA: Superficie apatítica mineral

IL-1 α : Interleuquina-1 α

IL-8: Interleuquina-8

IP: Índice de placa

qPCR: PCR en tiempo real o PCR cuantitativo

L: Lingual

LPS: Lipopolisacáridos

M: Mesial

Mg²⁺: Magnesio

MgCl₂: Cloruro de magnesio

Mn²⁺: Manganeso

NIC: Nivel de inserción clínica

OMS: Organización Mundial de la Salud

P: Palatino

Pb: Pares de base

PC: Periodontitis crónica

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

PG: Posición gingival

PGE₂: Prostaglandina E₂

Pg: *Porphyromona gingivalis*

PMN: Polimorfonucleares

PRPs: Proline-rich proteins

PS: Profundidad de sondaje

PSR: Peridontal Screening and Recording

PUN: Periodontitis ulcerativa necrotizante

RT-PCR: PCR con transcriptasa inversa

SS: Sangrado al sondaje

TAC: Tomografía Axial Computarizada

Taq: *Thermus aquaticus*

Td: *Treponema denticola*

Tf: *Tannerella forsythia*

Th1: T-helper 1

Th2: T-helper-2

Tm: Temperatura melting

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

Tth: Transcriptasa inversa

V: Vestibular

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

