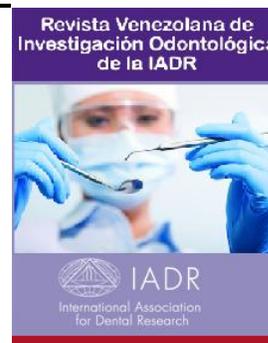




Depósito Legal: ppi201302ME4323  
ISSN: 2343-595X

# Revista Venezolana de Investigación Odontológica de la IADR

<http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/rvio>



## ARTÍCULO DE REVISIÓN

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) vs. métodos convencionales en el diagnóstico oportuno de la enfermedad periodontal. Revisión de la literatura

Lisbeth Cecilia Rojas Barón<sup>1</sup>, Rodolfo Javier Gutiérrez Flores<sup>2</sup>

1 Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX), Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida- Venezuela.

2 Cátedra de Periodoncia, Departamento de Medicina Oral, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela

## RESUMEN

**Introducción:** La enfermedad periodontal, considerada como un problema de salud pública, es una patología multifactorial asociada con inflamación y pérdida de piezas dentales cuyo inicio y progresión se atribuye a la presencia de bacterias periodontopatógenas. La base inicial para la prevención y tratamiento de esta patología es la identificación de microorganismos a través de técnicas bacteriológicas convencionales y/o ensayos inmunológicos y enzimáticos; sin embargo, existen herramientas moleculares con mayor valor predictivo y notables ventajas de costo y tiempo. No existe una revisión bibliográfica que exalte la relevancia del uso de técnicas moleculares en el diagnóstico periodontal, por lo que el objetivo de este artículo es describir la aplicabilidad, impacto y alcance de la PCR en la identificación y estudio de periodontopatógenos, facilitando una mayor comprensión en el diagnóstico y tratamiento periodontal. **Metodología:** Búsqueda electrónica en NCBI, BIREME/OPS y BVS. Búsqueda manual en Biblioteca Integrada (BIACI) y Biblioteca "Jacob Calanche" de la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes. **Resultados:** Se seleccionaron 54 estudios que describen los métodos de detección, convencionales y actuales, para la identificación de periodontopatógenos junto con sus alcances y limitaciones en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades periodontales. Los artículos cumplen con los criterios de inclusión. **Conclusión:** Conocer las ventajas que generan las ciencias aplicadas debería convertirse en un asunto de interés relevante para dar solución a problemas de salud pública, de manera que se puedan encontrar mecanismos viables para contrarrestar la progresión de distintas patologías y un enfoque terapéutico efectivo.

Autor de correspondencia: Lisbeth Rojas. E-mail: [liscrb@gmail.com](mailto:liscrb@gmail.com)

### Historial del artículo

**Recibo:** 06-06-2019

**Aceptado:** 16-09-19

**Disponible en línea:**  
01-12-2019

### Palabras clave:

Microbiología periodontal, enfermedad periodontal, herramientas moleculares, diagnóstico periodontal, reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

## **Polymerase chain reaction (PCR) vs. conventional methods in the timely diagnosis of periodontal disease. A systematic review**

---

### **ABSTRACT**

---

**Introduction:** Periodontal disease, considered as a public health problem, is a multifactorial pathology associated with inflammation and loss of teeth and its progression is attributed to the presence of periodontopathogenic bacteria. The initial basis for prevention and treatment of this pathology is the identification of microorganisms through conventional bacteriological techniques and/or immunological and enzymatic assays; however, there are molecular tools with greater predictive value and remarkable cost and time advantages. There is no bibliographic review that highlights the relevance of the use of molecular techniques in periodontal diagnosis, so the objective of this article is describing the applicability, impact, and scope of PCR in the identification and study of periodontopathogens, facilitating greater understanding in the diagnosis and periodontal treatment. **Methods:** Electronic search in NCBI, BIREME/OPS, and BVS. Manual search in the Integrated Library (BIACI) and "Jacob Calanche" Library of the Faculty of Dentistry of the University of Los Andes. **Results:** Fifty-four studies were selected that describe conventional and current detection methods for the identification of periodontopathogens with their scope and limitations in the diagnosis and treatment of periodontal diseases. The articles accomplish the inclusion criteria. **Conclusion:** Knowing the advantages generated by applied sciences should become a matter of relevant interest to solve public health problems so that viable mechanisms can be found to counteract the progression of different pathologies and an effective therapeutic approach.

**Keywords:** periodontal microbiology, periodontal disease, molecular tools, periodontal diagnosis, polymerase chain reaction (PCR).

---

### **INTRODUCCIÓN**

La enfermedad periodontal es el conjunto de trastornos que se asocian con la inflamación y la pérdida de estructuras de soporte de los dientes (1, 2). Es considerada como una patología multifactorial en la que la respuesta inmunológica desregulada de un hospedero susceptible, desencadena la destrucción progresiva e irreversible de los tejidos de soporte dentario (2). La susceptibilidad a la periodontitis se encuentra influenciada por determinantes genéticos y ambientales que generan un fenotipo individual de riesgo (3, 4); por lo tanto, es una de las enfermedades más difundidas en el mundo que puede afectar al 48% de la

población adulta, prevalencia que varía según condiciones culturales, sociales y económicas; por esta razón, se le considera un problema de salud pública (3, 4).

Las bacterias juegan un papel importante en el inicio y perpetuidad del proceso inflamatorio propio de la enfermedad periodontal. A pesar de que más de 700 especies de bacterias pueden colonizar la cavidad bucal, sólo hay un puñado que está altamente implicado en la enfermedad periodontal y son catalogadas como periodontopatógenos potenciales que pueden invadir directamente células y tejidos: *Porphyromonas gingivalis*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* y *Tanarella forsythia* (4, 5). Los patógenos periodontales, sus toxinas y la respuesta inmunoinflamatoria que desencadenan tienen consecuencias orgánicas que van más allá de la destrucción tisular local, aunque actualmente cualquier microorganismo que presente criterios de patogenicidad es considerado periodontopatógeno (5).

Durante años, el diagnóstico de la enfermedad periodontal se ha basado en las mediciones clínicas y radiográficas, además de la identificación de microorganismos periodontales a través de métodos bacteriológicos (6). Aunque la identificación bacteriana es necesaria para diseñar un plan de tratamiento personalizado, su uso en el diagnóstico, tratamiento y prevención es limitante y presenta ciertas desventajas, puesto que la presencia de microorganismos patógenos son esenciales para el desarrollo de la periodontitis (7); pero solo un pequeño número está relacionado con la etiología y progresión de la infección por medio de la disbiosis de los mismos. Los métodos microbiológicos tradicionales junto a otras pruebas de inmunodiagnóstico y ensayos clínicos tienen ventajas inherentes, pero, a su vez, presentan deficiencias que necesariamente deben ser compensadas con métodos biotecnológicos más avanzados (1, 2).

La tecnología basada en la manipulación de ADN ha superado con creces las expectativas en el campo de investigación odontológica puesto que representa la comprensión de eventos moleculares y cascadas de regulación a nivel genético, además de la versatilidad, sensibilidad, especificidad y precisión que ofrecen sus técnicas. Dado que la base inicial para el tratamiento de la periodontitis es la identificación de patógenos bucales a través de técnicas microbiológicas, inmunológicas y enzimáticas conocidas como convencionales, se sabe con base en lo reportado por la bibliografía científica que tienen limitantes que pueden influir en la respuesta inmediata para el tratamiento del paciente. No obstante, existen herramientas moleculares disponibles con mayor valor predictivo y notables ventajas de costo y tiempo.

Sin embargo, hasta la fecha, no existe una revisión de la literatura que relate la importancia del uso de estas técnicas en el diagnóstico periodontal en contraste con las convencionales. Por todo esto, se ha planteado como objetivo de este estudio describir la aplicabilidad, impacto y alcance de la PCR como herramienta molecular capaz de identificar periodontopatógenos y, en consecuencia, permitir el análisis de estos microorganismos para la comprensión del estado clínico del paciente e implementación de un diagnóstico eficiente y un tratamiento periodontal efectivo.

## **METODOLOGÍA**

### **1. Estrategias de Búsqueda**

#### **A. Fuentes de Información**

Se realizó una exploración electrónica para la selección de información científica detallada en los siguientes buscadores: PubMed a través del NCBI (por sus siglas en inglés; Centro Nacional para la Información Biotecnológica o National Center for Biotechnology Information), Biblioteca Virtual en Salud (BVS) coordinada por BIREME/OPS (Centro Latinoamericano y del Caribe de Información en Ciencias de la Salud/ Organización Panamericana de la Salud) a través de las siguientes bases de datos: MEDLINE, LILACS, BBO-ODONTOLOGÍA, BINACIS, CUMED, IBECS y ADOLEC. Las búsquedas manuales fueron realizadas en la Biblioteca Integrada de Arquitectura, Ciencias e Ingeniería (BIACI), y Biblioteca “Jacob Calanche” de la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes.

#### **B. Palabras clave, descriptores y operadores lógicos**

Las palabras clave empleadas para la búsqueda en español fueron: microbiología periodontal, enfermedad periodontal, herramientas moleculares, diagnóstico periodontal, reacción en cadena de la polimerasa (PCR); y en inglés: periodontal microbiology, periodontal disease, molecular tools, periodontal diagnosis, polymerase chain reaction (PCR). Los descriptores usados en español (Descriptores en Ciencias de la Salud, DeCS) fueron: periodontitis, gingivitis, PCR; en inglés (*Medical Subjects Headings, MeSH*) fueron: periodontal diseases, gingivitis, periodontitis, PCR. En ambos casos se usó el operador lógico *AND* o “y” para delimitar la búsqueda.

#### **C. Filtros**

Los filtros utilizados estuvieron enfocados en seis aspectos básicos: 1) Año de publicación de las fuentes de información. 2) Disponibilidad de la información. 3)

Bases de datos. 4) Tipo de estudio. 5) Tipo de documento. 6) Idioma (Ver tablas 1 y 2).

## **2. Estrategias de Selección**

### **A. Criterios de Inclusión**

La selección de información estuvo basada en los siguientes criterios de inclusión: 1) Información publicada desde el año 1990 a 2019. 2) Tipos de estudio: revisiones sistemáticas, estudios de cohorte, ensayos clínicos controlados, informe de casos, estudios de casos y controles. 3) Tipo de documento: tesis, monografías, libros y artículos. 4) Disponibilidad de la información: a texto completo. 5) Información en idioma inglés y español. 6) Bases de datos electrónicas de índices relevantes y gran cobertura de la literatura científica y técnica en salud con información de libre acceso y calidad. 7) Colección de bases de datos nacionales. 8) Estudios aplicados en humanos. 9) Estudios que contemplen el uso de PCR, ensayos enzimáticos, inmunológicos y microbiológicos en periodoncia específicamente, y que su uso esté limitado al diagnóstico, tratamiento o pronóstico de gingivitis y periodontitis.

### **B. Criterios de Exclusión**

Fueron excluidos artículos con las siguientes características: 1) Estudios relacionados con PCR y su intervención, empleado en otras ramas de la odontología como endodoncia, cirugía, ortodoncia y rehabilitación oral. 2) Artículos donde sean consideradas otras patologías como cardiopatías, herpes, alteraciones neurológicas, genéticas, sistémicas o sociales y su relación con enfermedad periodontal. 3) Estudios con aplicación en animales y/o plantas como modelos experimentales. 4) Estudios que contemplen técnicas moleculares distintas a la PCR. 5) Artículos con disponibilidad limitada (solo título y abstract). 6) Artículos relacionados con recursos educacionales. 7) Evaluación de tecnologías sanitarias.

## **3. Estrategia de Análisis**

Una vez seleccionada la información, se procedió a verificar el contenido. Cada artículo fue revisado por primera vez por el título y el abstract por dos investigadores relacionados directamente con las áreas. Aquellos artículos que no cumplieran rigurosamente con los criterios de inclusión fueron descartados inmediatamente lo que permitió reducir drásticamente la cantidad de información. Posteriormente, se leyó detallada y exhaustivamente la metodología. Luego, se realizó una lista de las técnicas mayormente usadas. Y finalmente se evaluó el

alcance, ventajas y limitaciones que éstas ofrecían y que se reflejaron en los resultados, para determinar el impacto de los procedimientos descritos.

## RESULTADOS

### 1. Descripción de los Estudios

La búsqueda de información electrónica y manual realizada en las fuentes de información mencionadas arrojó un total de 1.652.824 artículos en inglés y español. De estos, 105 eran duplicados y 1.652.665 no cumplían con los criterios de inclusión establecidos; por lo tanto, quedó un total de 54 artículos que comprendían: 8 revisiones sistemáticas, 10 estudios de cohorte, 22 ensayos clínicos controlados, 2 informes de casos y 12 estudios de casos y controles. Las tablas 1 y 2 describen los hallazgos encontrados según el uso de las palabras clave, operadores lógicos y filtros especificados.

**Tabla 1.** Hallazgos de la búsqueda electrónica realizada en fuentes de información en español.

Palabras clave y operadores lógicos	Fuentes de Información	
	BIREMI/OPS: LILACS y ADOLEC	BVS: MEDLINE LILACS BBO-Odontología BINACIS CUMED IBECS
Enfermedad periodontal	3700	16349
Microbiología periodontal	10	8763
Diagnóstico periodontal	8	10610
Reacción en Cadena de la Polimerasa	10	417065
Enfermedad periodontal Y herramientas moleculares	3	7
Enfermedad periodontal Y PCR	18	337
Diagnóstico periodontal Y técnicas moleculares	-	5
<b>Subtotal</b>	3749	453136
<b>TOTAL</b>		<b>456885</b>

**Tabla 2.** Hallazgos de la búsqueda electrónica realizada en fuentes de información en idioma inglés.

Fuentes de Información	Base de Datos	Palabras clave y operadores lógicos	Artículos encontrados
NCBI	PubMed	Periodontal disease	93268
		Periodontal microbiology	10831
		Periodontal diagnosis	32293
		Polymerase chain reaction	1.041.418
		Periodontal disease AND pcr	2218
		Periodontal diagnosis AND molecular techniques	704
		Periodontal disease AND molecular techniques	1124
		Periodontal diagnosis AND molecular biology	295
		Periodontal diagnosis AND pcr	1014
		Periodontal diagnosis AND periodontal microbiology	5672
		Molecular biology AND dentistry	6498
		Molecular biology AND periodontology	604
<b>Total</b>			<b>1.195.939</b>
<b>Total artículos encontrados en inglés y español</b>			<b>1.652.824</b>

## 2. Intervención de la Biología Molecular en las Ciencias Odontológicas. Un bosquejo inicial

Esencialmente, la biología molecular es una ciencia que permite la comprensión de los mecanismos responsables de la transmisión y expresión de la información genética, es decir, concierne principalmente al entendimiento de las interacciones de los diferentes sistemas de una célula. Esto incluye muchísimas relaciones que determinan la estructura, función y metabolismo celular con el objeto de garantizar una óptima regulación.

Al estudiar el comportamiento biológico de un sistema vivo, la biología molecular integra otras ciencias que abordan aspectos similares de interés particular. De esta manera, las ciencias odontológicas no escapan de esta asociación, puesto que en la cavidad bucal ocurren infinitos escenarios moleculares que van desde el remodelado óseo (4), hasta los movimientos ortodónticos, sin olvidar los patrones de reconocimiento entre bacterias comensales de la flora bucal y las células de la mucosa (8), lo que conlleva a entender cuan útil es conocer y comprender fundamentos básicos de la biología molecular como ciencia multidisciplinaria.

A nivel bucal, ocurre la activación de cascadas de señalización intracelular iniciada por el reconocimiento de una molécula por parte de un receptor de membrana (8). Esta unión estimulará una vía de señalización para producir una respuesta celular, ya sea de proliferación, diferenciación, apoptosis, defensa o inflamación. Un cambio o alteración en este sistema equilibrado conduce a una hipo o hiperestimulación de la vía de señalización que se traduce en manifestaciones clínicas tales como úlceras bucales, tumores bucales, periodontitis y otras patologías bucales inducidas por virus (9) [EBV (Virus de Epstein-Barr), CMV (Citomegalovirus), Virus de la Hepatitis C, Virus Linfotrópico Humano de Células T tipo I, VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana), Virus del Herpes, VPH (Virus de Papiloma Humano)].

En este caso, es importante señalar, por ejemplo, (a) las mutaciones en el extremo carboxilo terminal del gen SOSI relacionado a una Fibromatosis Gingival Hereditaria (10, 11); (b) la inhibición de la vía NF- $\kappa$ B que como ya es bien conocido, es el mecanismo de acción del plasma rico en plaquetas (PRP) para disminuir la inflamación de los tejidos y a su vez regenerar el daño tisular (12); (c) la mutación en el sitio de *splicing* (maduración por corte y empalme del ARN) del gen de la sialofosfoproteína de la dentina (DSPP) que ocasiona la Dentinogénesis Imperfecta Tipo II (13, 14). Asimismo, las metaloproteinasas de la matriz y sus inhibidores actúan de forma coordinada para remodelar el colágeno del ligamento periodontal (15, 16) mientras que otros factores moleculares afectan el remodelado óseo, proceso que también es observado en la erupción bucal, de modo que, como puede entenderse, el desarrollo y activación de eventos moleculares que inducen respuestas celulares, es completamente proporcional a la aparición de distintas patologías a nivel bucal.

### **3. Colonización gradual de la flora bacteriana bucal**

Se sabe con certeza que dentro del útero, el feto humano vive y se desarrolla en condiciones completamente estériles, pero después de atravesar el canal de parto, el feto adquiere microorganismos que constituirán una microbiota madura a partir de las dos semanas de nacimiento (17, 18). La colonización bacteriana de la cavidad bucal empieza casi en el momento del nacimiento gracias a la aparición de una pequeña cantidad de bacterias principalmente facultativas y aeróbicas (19). A partir del segundo día, es posible detectar bacterias anaeróbicas en la boca sin dientes del infante (20, 21). El número de bacterias bucales aumenta gradualmente como resultado de la exposición a fuentes externas de microorganismos ambientales (22, 21).

#### 4. Interrelación microbiológica periodontal

Cuando se habla de una bacteria, ésta casi inmediatamente se asocia con diferentes patologías. Sin embargo, la mayoría de las bacterias bucales son comensales inofensivos bajo condiciones normales de eubiosis natural. Esto significa que esta microbiota vive en armonía con el hospedero, pero bajo circunstancias especiales (mayor masa o patogenicidad, supresión de bacterias comensales o beneficiosas y/o menor respuesta del huésped) puede presentarse una enfermedad (23). Es evidente que la flora microbiana periodontal es extremadamente compleja ya que afecta al huésped, el ambiente bucal y el tratamiento periodontal y debido a que es afectada por el huésped, el ambiente bucal y el tratamiento periodontal, se necesita un profundo conocimiento de microbiología periodontal (24). Ejemplo de esta complejidad se ilustra claramente en el desarrollo de infecciones por levaduras cuando se reduce la flora bucal normal, como en el caso del uso prolongado de antibióticos sistémicos, o como en el caso de la periodontitis agresiva donde se ha demostrado que está asociada con una pérdida de colonización de *Streptococcus.Sanguinis* (25).

En general, todas las bacterias se mantienen dentro de su hospedero adhiriéndose a su superficie. Este principio también se aplica a la cavidad bucal. La capacidad de una bacteria para adherirse a su hospedero es crucial para la inducción de enfermedades infecciosas, tales como gingivitis o periodontitis (26). Las bacterias bucales y en especial las bacterias patógenas como *Porphyromonas gingivalis* y *Actinobacillus aggregatibacter*, entre otras, tienen una amplia batería de factores de virulencia, uno de los cuales es la capacidad de adherirse a las superficies duras intraorales (dientes, materiales de restauración y de prótesis y el área perimucosa del implante) y/o a la mucosa bucal, la cual tiene una importante variedad de características epiteliales (27, 28).

Existen muchos estudios que describen la frecuencia de detección de periodontopatógenos en estos diferentes nichos (29, 30, 31, 32, 33, 34). Casi todas las especies son capaces de colonizar todos los nichos, por lo que es importante destacar que el equilibrio entre bacterias periodontales y tejido periodontal puede verse afectado por exceso o deficiencia de reconocimiento generando la activación de interleucinas involucradas en procesos inflamatorios que se evidencian en cavidad bucal como una enfermedad periodontal (24).

## 5. Detección e Identificación de Patógenos Periodontales desde el inicio hasta la actualidad

Con el surgimiento de técnicas bacteriológicas en la década de los 80 que permitían el aislamiento e identificación de muchas especies que residían en las lesiones periodontales, surgió la necesidad de crear nuevos y más confiables métodos de recolección de muestras de sacos periodontales, y fue así como se relacionó a ciertas bacterias con patologías específicas, renaciendo la teoría de la enfermedad periodontal, ya que se ha probado que en ciertas patologías predomina una o varias bacterias y en otras lesiones, estas mismas bacterias son escasas; y el mejor hecho probatorio de esto es que la eliminación de las bacterias con antimicrobianos locales, logra una remisión de la enfermedad, tal como se logra con la eliminación total de la placa dental o la inhibición de su formación con medicamentos como la Bisguanidina (Clorhidrato de Clorhexidina).

Sin embargo, permanecía la controversia sobre la especificidad bacteriana en la etiología de estas afecciones. Lo único que permanecía claro es que la presencia de bacterias conducía a la destrucción tisular y desataba la defensa orgánica. Era lógico entonces que se requirieran métodos para dilucidar si alguna especie bacteriana, o varias de ellas de manera sinérgica, predominantes en un tipo de lesión, fuesen la causa del problema o simplemente fuesen comensales que aprovechaban las condiciones del medio ambiente para multiplicarse con rapidez y aparecer de manera abundante en este tipo de lesión, por ello surgieron los estudios de los parámetros bioquímicos bacterianos (factores de virulencia) y el cumplimiento de los postulados de Socransky (6).

En relación a esto último, 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 (35).

El progreso científico que comenzó desde finales del siglo XX, principalmente en el campo de la biología molecular, dio lugar a avances significativos en la comprensión de la microbiología periodontal. El uso de estas herramientas moleculares basadas en el ADN para la detección e identificación de bacterias y virus específicos presentes en cavidad bucal, ofrece notables ventajas de tiempo y costos en comparación con otras técnicas como las de cultivo. Asikainen y colaboradores así lo comprendieron, cuando demostraron la transmisión y translocación bacteriana entre humanos a través del método de identificación genética denominado Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), encontrando genotipos idénticos de *A. actinomycetemcomitans* en 12 comunidades, lo que

sugirió la transmisión de este microorganismo entre los miembros de una misma familia (29). Esta demostración constituyó un importante hallazgo puesto que la transmisión de patógenos de un locus a otro, es un aspecto importante de las enfermedades infecciosas debido a que este tipo de transmisión puede poner en peligro el resultado de la terapia periodontal pero también la transmisión de patógenos de una persona a otra podría ser importante en cuanto a la transmisión de la enfermedad. En dado caso, la relevancia de dicha transmisión intraoral o de una vertical u horizontal es, sin embargo, difícil de probar y/o cuantificar (24).

En la actualidad solo una proporción de bacterias gram-negativas anaerobias puede cultivarse de los sacos periodontales, lo que conlleva a no poder identificar muchas especies potencialmente patógenas. Esto limita la utilidad de las pruebas de cultivo para el diagnóstico (36). Es necesario entonces el uso de procedimientos más sofisticados para la identificación de especies bacterianas que incluyan al ADN antes de obtener una verificación clara del papel de la microbiología periodontal en la enfermedad periodontal humana. Incluso estas herramientas pueden dar solución a las dificultades inmersas en la aplicación de los criterios para la identificación de periodontopatógenos, desarrollados por Robert Koch en 1870, cuya aplicabilidad se ha convertido en un mayor desafío en años recientes (37). Resulta que en el caso de la periodontitis, la incapacidad para cultivar todos los organismos que se han relacionado con la enfermedad, las dificultades inherentes en la definición y los sitios de cultivo de la enfermedad activa aunado a la falta de un buen sistema de modelos animales para el estudio de la periodontitis, se han convertido en limitantes para juzgar si un microorganismo periodontal es un posible patógeno (24). Por todo esto, es necesario resaltar la importancia de implementar de manera más formal la instrucción de la biología molecular como un instrumento que permita comprender los aspectos fisiopatológicos de las enfermedades de cavidad bucal así como los principios de las nuevas terapias de regeneración ósea y tisular guiada.

### **A. Métodos de Diagnóstico Microbiológico en la Enfermedad Periodontal**

El inicio y progresión de la enfermedad periodontal se atribuye a la presencia de niveles elevados de bacterias periodontopatógenas que habitan en el surco gingival organizadas en forma de biopelícula subgingival. La microflora responsable de estas enfermedades es compleja debido a que se han detectado más de 700 especies bacterianas diferentes cuya presencia son un factor de riesgo para futura pérdida de inserción periodontal (38). Aunque la acumulación bacteriana y la organización en la biopelícula es el iniciador de la enfermedad

periodontal, la respuesta inmunitaria desencadenada en el hospedero es la responsable de la destrucción de los tejidos periodontales (39, 40).

Los métodos de diagnóstico para la detección de patógenos tienen tres diversos orígenes. El primero de ellos consistió en pruebas microbiológicas utilizadas para demostrar la correlación entre bacterias y las modificaciones de los parámetros clínicos, fundamentalmente a nivel de inserción. En este grupo se incluyen los métodos de cultivo y los métodos inmunológicos. El segundo origen denota los métodos desarrollados para la detección de bacterias en la medicina y modificados para la identificación de patógenos periodontales; en este grupo se incluyen las sondas de ADN. Por último, las pruebas desarrolladas específicamente para patógenos periodontales, basadas en propiedades características de los mismos (test BANA) (36). A continuación, se describen brevemente distintos métodos microbiológicos e inmunológicos usados frecuentemente para la detección de patógenos periodontales, así como su aplicabilidad y limitaciones para el diagnóstico periodontal.

- **Microscopía de Contraste de Fase y de Campo Oscuro**

Ambas técnicas se han utilizado durante varias décadas para valorar la composición de la placa. Las bacterias se identifican en base a su forma, tamaño y movilidad. Este método a nivel de diagnóstico se ha venido empleando para definir la distribución de los morfotipos bacterianos en la placa subgingival y así se ha establecido una correlación entre el número de bacilos móviles y el grado de inflamación gingival, así como entre el número de espiroquetas y la profundidad de bolsa. La mayor limitación de este método es su capacidad para identificar especies, no es posible dar nombre a una bacteria sólo por su morfología. Aunque con este método se pueden apreciar modificaciones en la estructura de la placa tras el tratamiento, su utilidad puede quedar limitada a la motivación del paciente para mejorar su higiene bucal, ya que su uso en consulta no justifica el gasto en tiempo y en dinero que hay que realizar frente al benéfico diagnóstico obtenido. En cuanto a su utilización para monitorizar pacientes periodontales tratados, se sabe que con este método no se puede predecir la progresión de la enfermedad cuando se emplea para dicho fin.

- **Cultivo Bacteriano**

El cultivo bacteriano es el método por excelencia a partir del cual se comparan y se validan otras técnicas de análisis microbiológico. Una vez tomada la muestra de placa subgingival del paciente, se subcultivan las especies individuales y se identifican en función de una serie de propiedades como son la morfología,

afinidad por las tinciones, reacciones bioquímicas, patrones de fermentación, productos metabólicos, etc., expresando el resultado en unidades absolutas o en proporciones de especies dentro del conjunto de la placa. La sensibilidad de los métodos de cultivo frente a bacterias estudiadas es de  $10^4$ -  $10^5$  células, cuando se utilizan medios no selectivos. Una de las limitaciones importantes de esta técnica la constituyen los organismos no detectables, bien por imposibilidad de la técnica (caso de algunas espiroquetas) o bien porque las bacterias hayan muerto durante alguna de las fases del cultivo o durante el transporte, lo cual puede conducir a resultados de falsos negativos. La desventaja general de este método es la dificultad, lentitud y costo de los mismos, es por ello que hoy en día se da importancia a otras técnicas de biología molecular como la PCR, más rápida y específica para la identificación de bacterias.

## **B. Pruebas Inmunológicas en el Diagnóstico Periodontal**

- **Microscopía de Inmunofluorescencia**

Mediante esta técnica se ha estudiado la asociación entre bacterias como *P. gingivalis* y *B. forsythus*, y la profundidad del saco periodontal. Esta prueba consiste en tomar una muestra de la biopelícula subgingival e incubarla con anticuerpos monoclonales, suero anti IgG y fluoresceína para la formación de complejos antígeno-anticuerpo, los cuales se detectan como positivos o negativos para las bacterias estudiadas mediante microscopía y un fluorómetro, cuantificando las especies individuales y consiguiendo niveles de detección bacteriana de  $10^4$ . Uno de los mayores problemas de esta técnica son las reacciones cruzadas entre bacterias específicas con bacterias no cultivables de los sacos periodontales o con bacterias no orales.

- **Aglutinación por Látex**

Un prototipo de este sistema es la detección de antígenos de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *B. forsythus* en muestras de biopelícula dental. Esta técnica consiste en mezclar muestras de biopelícula subgingival en una suspensión de partículas de látex recubiertas con anticuerpos específicos. Esto provoca una reacción con los antígenos bacterianos que resulta en una aglutinación evaluada visualmente en 2-5 minutos.

- **Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas o ELISA por sus siglas en inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay**

Esta técnica depende de la disponibilidad de anticuerpos específicos que reaccionan con los antígenos seleccionados y que se detectan mediante un

anticuerpo primario directamente con un marcador fluorescente (Inmunofluorescencia directa) o con un anticuerpo fluorescente secundario (Inmunofluorescencia indirecta). El anticuerpo primario es detectado a través de una reacción colorimétrica catalizada por una enzima que usualmente es la peroxidasa de rábano o la fosfatasa alcalina unida al anticuerpo secundario. Este método puede ser muy específico si se realizan los controles adecuados para evitar las reacciones colorimétricas o fluorescentes inespecíficas. El principal problema es que sólo pueden detectarse aquellas especies para las que existen anticuerpos disponibles. El ELISA es una prueba válida para reflejar tanto exposiciones pasadas como niveles bacterianos presentes, pero tiene muy poco valor predictivo (36).

- **Inmunoensayo a través de Fluorescencia de Concentración de Partículas**

Con gránulos de Poliestireno: Utiliza gránulos de poliestireno como sustrato, recubiertos por anticuerpos específicos y que reaccionan con la muestra de placa seleccionada. Mediante un fluorímetro se detecta una señal fluorescente que detecta el número relativo de bacterias presentes en la muestra.

Con células bacterianas: una modificación del método anterior. Los gránulos de poliestireno son sustituidos por células bacterianas unida a los diferentes anticuerpos monoclonales específicos frente a los lipopolisacáridos de las especies periodontales en estudio. Esta técnica presenta una sensibilidad del 97-100% y una especificidad del 57-92% dependiendo de la especificidad en estudio y un límite de detección de 104 células bacterianas en cultivos mixtos (37).

- **Inmunoensayo de Membranas**

Este es un método disponible de forma comercial (Evalusite®) cuyo objetivo es la detección clínica de tres patógenos periodontales: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *P. intermedia*. La muestra del paciente se enfrenta contra los anticuerpos específicos de estas tres especies. Los complejos antígeno-anticuerpo formados sobre la membrana, se detectan por adición de un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente, junto con un sustrato enzimático coloreado. Los punteados separados indican la presencia de las tres especies, mientras que la intensidad del color indica el número relativo de bacterias. El test indica resultados positivos o negativos y se puede realizar en 10 minutos. El límite de detección para las tres especies varía entre 104 y 105 células bacterianas (41).

- **Marcadores de sangre periférica de patógenos periodontales**

Esta técnica intenta detectar la respuesta que producen las bacterias en el organismo. Tiene un valor tanto para implicar a ciertas especies de patógenos como para determinar clínicamente su estatus infeccioso. Mediante este método se detectan anticuerpos en suero frente a *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, revelando fluctuaciones en los niveles de anticuerpos en respuesta al tratamiento periodontal. Hoy en día parecen ser más confiables otras técnicas microbiológicas pero no se descarta la posibilidad de poder identificar mediante pruebas serológicas a individuos con susceptibilidad a padecer algún tipo de enfermedad periodontal (27).

### **C. Test desarrollados específicamente para Patógenos Periodontales**

Existen métodos enzimáticos para la detección de patógenos. En general estos métodos no detectan especies específicas de bacterias sino que indican la presencia de enzimas con potencial destructivo del tejido periodontal producidas por un grupo de bacterias periodontopatógenas. Las enzimas utilizadas incluyen colagenasas, peptidasas, enzimas tripsínicas, proteasas y elastasas.

Las colagenasas, por ejemplo, la producen una gran variedad de bacterias además del hospedero. En aplicación periodontal, las colagenasas bacterianas pueden diferenciarse de las colagenasas originadas por las células del hospedero mediante electroforesis, aunque su aplicación clínica es limitada. Para la detección de la actividad de enzimas tripsínicas se comercializó un test, el *Perioscan*®, con capacidad para medir actividad proteolítica de enzimas similares a la tripsina para degradar un sustrato sintético conocido como BANA (N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida), actividad aparentemente específica para tres microorganismos: *P. gingivalis*, *B. forsythus* y *T. denticola*.

Esta degradación se puede medir por un método colorimétrico mediante la reacción de la  $\beta$ -naftilamida con el negro de Evans, los diferentes tonos de azul indican la presencia bacteriana en la muestra. La intensidad de la reacción colorimétrica es proporcional a la concentración de esas especies bacterianas en la muestra. Este método ha demostrado una concordancia en 55-73% con el *ELISA* para *P. gingivalis* y *T. denticola* y el 51-70% de concordancia con mediciones clínicas de enfermedad periodontal tales como sangrado al sondaje o profundidad de sondaje (41).

Entre las ventajas de este test figura el ser una prueba rápida, sencilla y de bajo costo. Como inconveniente destaca el que no se puede hacer un diagnóstico

microbiológico específico. Por otra parte, cabe la posibilidad de que el test arroje resultados positivos en localizaciones sanas si éstas albergan alguna especie BANA positiva en número suficiente, además sólo detecta un número limitado de patógenos periodontales y no da información acerca de la sensibilidad de la flora frente a antibióticos. Este test resulta más interesante para detectar la presencia de bacterias más que para interpretar marcadores de virulencia (36).

#### **D. Métodos de Análisis del ADN Bacteriano**

El diagnóstico de la enfermedad periodontal se realiza midiendo la pérdida de la unión del tejido conjuntivo en la superficie de la raíz (pérdida de inserción clínica) y la pérdida del hueso alveolar (pérdida ósea radiográfica). Lastimosamente, esta evaluación clínica no indica la causa, patogénesis, curso clínico, progreso y pronóstico de la enfermedad (42). Por otra parte, los métodos microbiológicos tradicionales tienen ventajas inherentes pero a su vez, tienen deficiencias que incluyen la necesidad de preservar la viabilidad bacteriana, la incapacidad de detectar bajo número de microorganismos, mano de obra calificada, muestreo estricto, condiciones óptimas de transporte y períodos prolongados de tiempo antes de los resultados. Simultáneamente, otras pruebas microbiológicas y de inmunodiagnóstico así como los ensayos enzimáticos, pueden dar lugar a falsos positivos y/o reacciones cruzadas (36).

Las herramientas de biología molecular permiten hacer más sencillo el proceso, puesto que analizan el ADN obtenido a partir de muestras bucales del paciente de una manera más directa a través de métodos con una alta sensibilidad y especificidad. En principio, fueron utilizadas distintas variantes de estas herramientas como fue el caso del RFLP (Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción), las sondas de ADN y la tecnología de hibridación de ADN que, aunque arrojaron resultados coherentes, implicaban el uso de equipos muy sofisticados y resultaba ser un proceso laborioso, lento y costoso (43).

Afortunadamente, surgió una técnica extraordinaria que destacó por su sencillez y rapidez que fue denominada como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); esta técnica supera las limitaciones anteriores y es capaz de generar millones de copias de ADN a partir de una muy pequeña cantidad de material biológico. De hecho, la literatura reporta que es el método usado por excelencia no sólo en Periodontología, sino también en investigación biomédica debido a su versatilidad, sensibilidad y precisión.

La PCR, inventada hace varias décadas, tuvo su primera participación en odontología en 1992 cuando se logró identificar ADN de tejido de pulpa dental

humana para uso en odontología forense. Un año después se usó para la identificación de *P. gingivalis* en muestras de placa oral. Diversas variantes de la PCR convencional, incluida la PCR anidada (PCR-nested), PCR multiplex, RT-PCR (transcriptasa inversa), PCR-Alelo específica y q-PCR (en tiempo real), evolucionaron posteriormente desempeñando un papel importante en el campo de la Periodontología, destacando el mapeo genómico de todo el espectro bacteriano en muestras de placa dental, el desarrollo de una base de datos de microbiomas orales humanos y la base de datos CORE para catalogar todas las especies bacterianas encontradas en la cavidad oral. Más recientemente, se utilizó la PCR en el análisis de micromatrices de ADN para la determinación semicuantitativa de aproximadamente 10 patógenos periodontales (44, 45).

## 6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR, técnica *in vitro*, permite la amplificación y el estudio de los genes y sus transcritos de ARN obtenidos de varias fuentes biológicas como sangre periférica, piel, saliva, líquido crevicular gingival, semen, cabello (46, 44). Cada análisis molecular que lleve por herramienta esta técnica, requiere la presencia de un molde o plantilla de ADN que contenga el fragmento que se va a amplificar; un par de oligonucleótidos o cebadores complementarios a una de las dos hebras de ADN, que corresponden a los nucleótidos que definen los extremos de la secuencia que se quiere replicar y que permiten que la polimerasa inicie la reacción; cuatro desoxirribonucleótidos- trifosfato (dNTPs) que funcionan como sustratos para polimerizar nuevo ADN; iones divalentes como el magnesio ( $Mg^{+2}$ ) agregado comúnmente como cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), que actúan como cofactores de la polimerasa; una solución tampón o buffer que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa y por supuesto ADN Polimerasa (46).

Este último componente es la protagonista de este procedimiento, debido a que la técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN. Para tal efecto, se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién sintetizadas entre sí tras cada fase de replicación y a continuación, dejar que las hebras de ADN vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente.

La PCR fue perfeccionada por Kary Mullis en la década de 1980 (47). Inicialmente la técnica era lenta puesto que la exposición a altas temperaturas ( $95^{\circ}C$ ) supone la inmediata desnaturalización de toda proteína, razón por la cual se implementó el uso de polimerasas termoestables extraídas de microorganismos adaptados a vivir a temperaturas extremas. Hoy en día, todo este proceso está automatizado

mediante el uso de un aparato llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria en cada etapa de la reacción. Este mecanismo es conocido como Efecto Peltier, que permite la alternancia de temperaturas simplemente invirtiendo la corriente eléctrica. Los tubos usados para PCR tienen una pared muy fina, favoreciendo así una buena conductividad térmica y por tanto, un rápido equilibrio térmico (48).

Generalmente, el proceso de PCR consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos de amplificación, cada ciclo suele contener 2 a 3 pasos a diferentes temperaturas. Las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo dependen de una gran variedad de parámetros que incluyen principalmente la enzima usada y la temperatura de unión de los oligonucleótidos, así como la longitud de la secuencia de ADN que se desea amplificar. Los pasos básicos implican (49):

- Desnaturalización inicial: la reacción es llevada a 95°C, necesario para polimerasas que requieran activación por calor.
- Desnaturalización: ocurre la separación de las dos cadenas que conforman al ADN.
- Alineamiento o unión de oligonucleótidos: se produce la hibridación del cebador, es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde, para ello es necesario bajar la temperatura a 40-68°C según sea el caso, permitiendo así el alineamiento. La polimerasa une el híbrido de la cadena molde y el cebador, y empieza a sintetizar ADN.
- Extensión o elongación: actúa la polimerasa tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del oligonucleótido como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN, para ello añade los dNTPs complementarios en dirección 5'→3', uniendo el grupo 5'-fosfato de los dNTPs con el grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente que se extiende. Comúnmente la temperatura empleada en este paso es de 72°C.
- Extensión final: se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente amplificado. Esta etapa se lleva a cabo a una temperatura de 70-74°C tras el último ciclo de PCR.

Para verificar que la PCR ha generado el fragmento de ADN previsto, se emplean técnicas de electroforesis que separan los fragmentos de ADN generados (conocidos como amplicones o productos de PCR) de acuerdo a su carga, en una matriz de agarosa para fragmentos grandes en términos de longitud, o poliacrilamida para fragmentos más pequeños. La visualización de estos

fragmentos es posible gracias a la tinción con Bromuro de Etidio que es un agente intercalante de ADN y fluoresce con luz ultravioleta, lo que posibilita la observación de bandas. En otras variantes de PCR, la verificación se realiza a través de electroforesis capilar u otros mecanismos de interpretación con métodos de análisis ya estandarizados y bien conocidos (50).

Por todas las bondades, cualidades y ventajas que posee esta herramienta con respecto a las microbiológicas, la PCR se ha convertido en una técnica popular de diagnóstico e investigación en odontología y normalmente indispensable en investigación médica y biológica para una gran variedad de aplicaciones como las que se han descrito hasta ahora (43).

### **A. Variantes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa**

- **PCR Cuantitativa:** La Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (qPCR) es una variante de la PCR destinada a detectar y cuantificar una molécula de ADN dirigida mediante la adición de sondas marcadas que emiten fluorescencia dentro de cada ciclo de amplificación, lo que resulta en valores de fluorescencia proporcionales a la cantidad de producto acumulado de PCR (51). Las sondas fluorescentes pueden ser aquellas que involucran la unión no específica de una molécula fluorescente a ADN de doble cadena, por ejemplo, SYBER® Green I, o que se unen específicamente al objetivo de interés, por ejemplo, TaqMan® (52). Estas sondas producen un cambio en la señal fluorescente después de su interacción directa o hibridación con el amplicón que se mide por el sistema óptico para capturar la fluorescencia y un software capaz de recibir y procesar los datos. Los valores de fluorescencia se registran durante cada ciclo y representan la cantidad del producto amplificado (44).

- **PCR anidada o nested-PCR:** implica el uso secuencial de dos conjuntos de oligonucleótidos; el primer conjunto se usa para amplificar una secuencia objetivo y el producto de PCR obtenido se usa luego como la secuencia objetivo para una segunda amplificación utilizando oligonucleótidos internos a los del primer amplicón (45).

- **PCR en Tiempo Real:** Amplifica una diana de ARN. Este proceso implica dos pasos: el primer ARN se transcribe en forma inversa en el ADNc utilizando una RT (Transcriptasa Reversa) y luego el ADNc resultante se usa como plantilla para la posterior amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para uno o más genes (53, 54).

- **PCR Multiplex:** esta variante se basa en el mismo principio de la PCR clásica pero utiliza múltiples pares de oligonucleótidos contenidos en una sola mezcla de reacción a fin de producir amplicones de diferentes tamaños que son

específicos a diferentes secuencias de ADN, por lo tanto, tiene la capacidad de identificar y multiplicar distintos genes o secuencias de ADN, evitando el uso de múltiples reacciones y minimizando el gasto de insumos y reactivos (44).

- PCR alelo-específica: es una técnica de diagnóstico o clonación para identificar o utilizar polimorfismos de un solo nucleótido (*SNP*: Single Nucleotide Polymorphism, por sus siglas en inglés). Utiliza oligonucleótidos cuyos extremos 3' abarcan el SNP y sólo se reasociarán a las secuencias que coincidan completamente, siendo suficiente una sola falta de coincidencia para evitar la hibridación en las condiciones apropiadas (43).

- PCR-Colony o PCR-Colonia: en esta técnica, las muestras usadas para PCR se toman directamente de las colonias bacterianas, de allí su nombre. El propósito es identificar bacterias mediante la amplificación del gen 16S ribosomas (ARNr 16S) (37).

- PCR Hot-Start o de arranque en caliente: algunas polimerasas como la Taq Platinum (Platinum taq) por ejemplo, tienen adherido un anticuerpo que se degrada únicamente cuando el proceso de PCR alcanza la temperatura inicial de desnaturalización (95°C) y por lo tanto el funcionamiento de la enzima comienza sólo hasta ese momento, la ventaja intrínseca de esto es que, garantiza la no amplificación de productos inespecíficos o artefactos de reacción visualizados como supuestas bandas de ADN luego de la electroforesis. Este es el caso de la PCR Hot-Start, mejora la especificidad y el rendimiento de ADN al reducir la amplificación no específica en la etapa de configuración inicial e inhibe la actividad de la polimerasa a temperatura ambiente (45).

- PCR digital: esta técnica es usada principalmente en investigaciones dedicadas al cáncer y en el diagnóstico prenatal. Separa las muestras individuales de ácido nucleico en regiones o gotas separadas y cuantifica las dianas iniciales raras de ADN (43).

## **B. Ventajas y Limitaciones de la PCR**

Evidentemente, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) aporta de distintas maneras y desde cada una de sus variantes, grandes atributos que determinan su aplicabilidad, uso y manejo en distintos campos de estudio. La facilidad de cuantificación, la mayor sensibilidad, el rápido análisis, la precisión, la reproducibilidad, el análisis de una gran cantidad de muestras al mismo tiempo, el control de calidad y la menor contaminación son las principales ventajas de la PCR. Además de esto, dado que la viabilidad celular no es un factor disuasivo para esta herramienta, es ventajosa en el estudio de infecciones estrictamente anaeróbicas como en el caso de la mayoría de periodontopatógenos de gran relevancia, donde la muerte celular podría ocurrir durante el muestreo y transporte.

Como es sabido, la PCR permite amplificaciones de ADN o ARN varios millones de veces, lo que hace posible el uso de tan solo 1 a 100 células y 0,1 µl de sangre o células extraídas de la mucosa bucal para su posterior análisis; exhibe excelentes límites de detección con una precisión mayor al 95% según la sensibilidad de la variante. La qPCR cuantifica el número de objetivos presentes en la muestra clínica en tiempo real. La PCR-Multiplex busca e identifica diferentes organismos o genes en una misma reacción. La PCR-nested facilita la detección de ADN bacteriano presente en niveles muy bajos (44).

Sin embargo, el costo de la técnica de PCR es algunas veces el impedimento para su aplicación en procedimientos de diagnóstico de rutina así como un alto nivel de experiencia para procesar muestras y realizar análisis de datos. Algunas veces, la ADN polimerasa utilizada en la PCR es propensa a errores que pueden conducir a mutaciones en el fragmento generado. En el caso de la PCR cuantitativa, la señal fluorescente no puede discriminar productos amplificados específicos contra inespecíficos, mientras que la PCR-Colony, no puede distinguir entre especies estrechamente relacionadas y también altamente recombinantes, por ejemplo *Neisseria* y ciertos estreptococos. Salvo estas excepciones, la PCR sigue siendo una herramienta molecular de alto impacto que ha revolucionado distintos campos médicos, dentro de ellos la odontología (46).

## DISCUSIÓN

La etiología de la enfermedad periodontal obedece a la presencia de microorganismos que forman una biopelícula bacteriana e inducen cambios inflamatorios localizados en la encía que constituyen la etapa inicial de la infección (gingivitis) (4, 6). Si esta alteración no es tratada, puede extenderse a estructuras más profundas del periodonto formando sacos periodontales que favorecen un medio propicio para la colonización bacteriana, provocando la reabsorción ósea y pérdida de inserción que finalmente se traduce en pérdida de estructuras de soporte de los dientes (2, 3). Esta patología es considerada un evento multifactorial influenciado por higiene bucal inadecuada, tabaquismo y condiciones sistémicas, cuya susceptibilidad generan un fenotipo individual de riesgo, en el mayor de los casos, periodontitis (2, 4).

El objetivo de esta revisión fue describir la aplicabilidad, alcance y reproducibilidad de las herramientas de biología molecular, en este caso la PCR en cualquiera de sus variantes, en contraste con métodos convencionales de detección e identificación de microorganismos patógenos bucales como las pruebas microbiológicas que comprenden los métodos de cultivo e inmunológicos (marcadores de sangre periférica, inmunensayo de membranas, ELISA,

concentración de partículas, microscopía y aglutinación), y ensayos enzimáticos encontrados como test comerciales (el test BANA). Como puede observarse en las tablas 1 y 2, existe gran cantidad de información referente a herramientas moleculares, diagnóstico periodontal y enfermedad periodontal propiamente dicha pero no hay ninguna revisión de la literatura que describa y relate la intervención de la PCR en el diagnóstico de la enfermedad periodontal.

La mayoría de los estudios coinciden en que las bacterias tienen un papel protagónico en el inicio y longevidad del proceso inflamatorio y pese a la cantidad de especies bacterianas colonizadoras que coexisten normalmente en cavidad bucal, solo algunas pocas han sido catalogadas como patógenas o periodontopatógenas (1, 4-7, 20-22, 25, 26, 32, 37, 39, 40). De allí deriva el hecho de que diversos autores reconozcan que el principal enfoque para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad periodontal, subyace primeramente en la detección e identificación de los microorganismos presentes, basándose en evidencia fenotípica de la infección y frecuencia de detección de periodontopatógenos en distintos nichos, capaces de activar interleucinas involucradas en procesos inflamatorios (29-34). Aunado a ello, algunas publicaciones sugieren que aunque no está demostrada una relación causa-efecto directa entre bacterias específicas y enfermedad, su identificación se hace necesaria para definir la etiología e instaurar el tratamiento adecuado (37, 36).

Los estudios que describen el uso de métodos tradicionales tales como pruebas microbiológicas y ensayos enzimáticos denotan que éstos han marcado la pauta desde sus inicios por ser pioneros en la caracterización de patógenos periodontales, pues a partir de ellos es posible valorar la composición de la placa bacteriana (cantidad y morfología) y su distribución e interacción con otros patógenos (39), sin embargo, presentan ciertas deficiencias, lo que obviamente refleja resultados no concluyentes. Estas limitantes están representadas esencialmente por el tiempo que debe transcurrir para obtener un resultado (procedimientos largos), condiciones de transporte que afectan la viabilidad de las especies bacterianas (cultivos bacterianos), costos, contaminación por reacciones cruzadas (microscopía de inmunofluorescencia), bajo rango de detección celular en cuanto a cantidad de especies reconocidas o identificadas (inmunoensayo a través de fluorescencia de concentración de partículas), límite de detección bacteriana (aglutinación por látex, inmunoensayo de membranas, marcadores de sangre periférica, test BANA), muestreo estricto, detección de especies según disponibilidad de anticuerpos (ELISA), manejo y ejecución de protocolos con mano de obra calificada; y en los casos de microscopía de contraste de fase y de campo

oscuro, no es posible tipificar una bacteria sólo por su morfología y por lo tanto, no se puede predecir la progresión de la enfermedad (36, 40).

Recientemente, distintos artículos resaltan el alcance de los métodos de biología molecular que permiten simplificar el proceso y a su vez obtener información más completa (43, 44, 50). En primer lugar, la mayor ventaja de este tipo de herramientas es que no utiliza microorganismos vivos sino que aprovecha la existencia de muestras biológicas a partir del cual se obtiene material genético (ADN) (36, 37). Este sencillo hecho resuelve en gran medida las limitaciones de las técnicas convencionales. Los resultados obtenidos en ensayos clínicos y estudios de casos analizados muestran que la técnica de PCR reduce las limitaciones detalladas puesto que a partir de una muy pequeña cantidad de ADN se pueden generar millones de copias más, esto gracias a la sensibilidad y especificidad intrínseca del método (43), permitiendo resumir el proceso. La PCR, descrita como herramienta molecular, destaca por su sencillez, rapidez, precisión y reproducibilidad al momento de generar resultados lo que la convierte en un método usado por excelencia en cualquier área de la investigación biomédica (46).

No es intención del presente artículo desestimar el alcance y la importancia de los resultados que se obtienen a través de los métodos convencionales pero bien es sabido que siempre hay una marcada necesidad de innovar en el procedimiento clínico. Está claro que la aplicación de métodos moleculares para la identificación de patógenos periodontales resulta bastante influyente en el diagnóstico moderno principalmente porque permite optimizar el tiempo de respuesta entre el diagnóstico clínico y la aplicación de un tratamiento.

Por todo esto, es importante fomentar la creación de equipos multidisciplinarios donde haya intervención de las ciencias aplicadas en áreas clínicas, de modo que se puedan potenciar y complementar los resultados a fin de obtener un tratamiento satisfactorio y propicio. La aplicación de tecnología molecular siempre en estrecha relación con otros métodos empleados para el diagnóstico de la enfermedad, posibilitará en consecuencia un mejor manejo y seguimiento de los pacientes, de esta manera, se tratará de lograr una estabilidad clínica prolongada con tratamientos específicos dirigidos a especies directamente involucradas en los procesos infecciosos.

El diagnóstico molecular ha demostrado ser seguro, rápido, reproducible y discriminatorio, siempre que las técnicas o herramientas utilizadas hayan sido estandarizadas y controladas.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

La identificación de patógenos microbianos asociados a la etiología de la periodontitis es el primer paso hacia el desarrollo de un enfoque terapéutico periodontal eficaz. La PCR se ha convertido en el método de detección ideal debido a su capacidad de detección e identificación, sensibilidad, especificidad y rapidez. Todo esto combinado con el estudio de polimorfismos hereditarios con perfiles microbianos orales y la inclusión de ensayos de expresión génica y datos proteómicos en saliva u otros tejidos orales, permitirán establecer parámetros eficientes en el tratamiento y manejo de la enfermedad periodontal con soluciones prácticas y viables.

## **CONCLUSIÓN**

Conocer las ventajas y alcances que generan la mezcla de las ciencias aplicadas con áreas de la biomedicina, en este caso la Periodontología, debería ser el principal propósito de los profesionales involucrados, con el fin de dar solución a problemas de salud pública. De esta manera se podrán encontrar mecanismos viables para contrarrestar la progresión de distintas patologías, en este caso, la enfermedad periodontal. La PCR se ha transformado en una herramienta estándar de diagnóstico e investigación. Es gracias al avance y uso de biotecnologías que se ha logrado una mayor comprensión de la patogenia periodontal, seguramente la ejecución de terapias y formas efectivas de prevención y tratamiento surgirán en corto plazo por lo que sería recomendable la formación de equipos multidisciplinarios que trabajen en conjunto a fin de garantizar un mayor impacto en beneficio del paciente y la formación de las futuras generaciones.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Gutiérrez R, Salas E. Cepas de bacterias probióticas como terapia coadyuvante en el tratamiento de la enfermedad periodontal. Revisión de la literatura. Revista Odontológica de Los Andes. 2018; 13 (1): 62–78. Disponible en: <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/odontoula/article/view/10364/0>
2. Arteaga S, Dávila L, Gutiérrez R, Sosa L, Albarrán G, Isla M, Díaz N. Efectividad del gel de manzanilla y llantén como terapia coadyuvante en el tratamiento de la periodontitis crónica. Acta Bioclínica. 2017. Vol. 7 (13): 6–25. Disponible en: <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/actabioclinica/article/view/8081>

3. Mukurami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque – induced gingival conditions. *J Clin Periodontal*. 2018; 45 (20): 17–27. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29926958>
4. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging y grading of periodontitis: framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018; 45 (20): 149-161. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29926952>
5. Cavalla F, Claudino M, Silveira E, Espindola A, Repeke C, Martins Jr W, Garlet G. La modulación de la expresión de IL-10 por el polimorfismo IL-10-592C/A (rs1800872) es independiente de la presencia y carga bacteriana de los periodontopatógenos clásicos. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*. 2015; 8 (2): 124-132. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0718539115000348>
6. Farias F. Enfermedad periodontal y microorganismos periodontopatógenos. *ODOUS Científica*. 2015. Universidad de Carabobo. Disponible en: <http://servicio.bc.uc.edu.ve/odontologia/revista/v4n1/4-1-2>
7. Gutiérrez R, Salas E, Gil A. Efecto antimicrobiano del gel de manzanilla y llantén sobre la microbiota subgingival en el tratamiento de la periodontitis. Estudio preliminar. *Acta Bioclínica*. 2019; 9 (17): 8–21. Disponible en: <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/odontoula/article/view/10364/0>
8. Mogensen T. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22(2): 240-273. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366914>
9. Suresh R, Mosser D. Pattern recognition receptor in innate immunity, host defense, and immunopathology. *Adv Physiol Educ*. 2013; 37(4): 284-91. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24292903>
10. Almiñana-Pastor P, Buitrago-Vera P, Alpiste-Illueca F, Catalá-Pizarro M. Hereditary gingival fibromatosis: characteristics and treatment approach. *J Clin Exp Dent*. 2017; 9(4): e599-e602. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5410686/>
11. Hart TC, Zhang Y, Gorry MC, Hart PS, Cooper M, Marazita ML, Marks JM, Cortelli JR, Pallos D. A mutation in the SOS1 gene causes hereditary gingival fibromatosis type 1. *Am J Hum Genet* 2002; 70(4): 943-54. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11868160>

12. Wenjing Y, Haitao X, Jiagen S, Zhengliang X, Xuetao X, Changqing Z. Comparative evaluation of the effects of platelet-rich plasma formulations on extracellular matrix formation and the NF- $\kappa$ B signaling pathway in human articular chondrocytes. *Mol Med Rep.* 2017; 15(5): 2940-2948. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5428536/>
13. Sook-Kyung L, Kyung-Eun L, Su Jeong S, Hong-Keun H, Sang-Hoon L, Jung-Wook K. A DSPP Mutation causing dentinogenesis imperfecta and characterization of the mutational effect. *BioMed Research International.* 2013. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/948181/> o DOI: 10.1155/2013/948181
14. Taleb K, Lauridsen E, Daugaard-Jensen J, Nieminen P, Kreiborg S. Dentinogenesis imperfecta type II-genotype and phenotype analyses in three Danish families. *Mol Genet Genomic Med.* 2018; 6(3): 339-349. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29512331>
15. Gómez-Sandoval J, Mariaud-Schmidt R. Metaloproteinasas de la matriz en pacientes con periodontitis y diabetes mellitus. *Rev Mex de Periodontol.* 2016; 7(2): 55-60. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=67482>
16. Droghetti R, Cruzat F, Ferrer S, Droguett O. Participación de MT1-MMP en la remodelación del ligamento periodontal durante la movilización dentaria. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral* 2010; Vol. 3(3); 113-117. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0718539110700513>
17. Moore WE, Holdeman LV. Special problems associated with the isolation and identification of intestinal bacteria in fecal flora studies. *Am J Clin Nutr.* 1974; 27(12): 1450-5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4215311>
18. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995; 125(6): 1401-12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7782892>
19. Socransky SS, Manganiello SD. The oral microbiota of man from birth to senility. *J Periodontol.* 1971; 42(8): 485-96. Disponible en: <https://www.docphin.com/research/article-detail/14708045/PubMedID-4998039/The-oral-microbiota-of-man-from-birth-to-senility>

20. Evaldson G, Heimdahl A, Kager L. The normal human anaerobic microflora. *Scand J Infect Dis Suppl* 1982; 35:9-15. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6762655>
21. Rotimi VO, Duerden BI. The development of the bacterial floral in normal neonates. *J Med Microbiol.* 1981; 14(1): 51-62. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7463467>
22. Kononen E, Asikanein S, Jousimies-Somer H. The early colonization of gram-negative anaerobic bacteria in edentulous infants. *Oral Microbiol Immunol.* 1992; 7(1): 28-31. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1528621>
23. Walker C. Selected antimicrobial agents: mechanism of action, side effects and drugs interactions. *Periodontology 2000.* 1996; Vol 10: 12-28. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0757.1996.tb00066.x>
24. Newman M, Takei H, Klokkevold P, Fermín C. *Periodontología Clínica de Carranza. AMOLCA.* 2014. Onceava Edición.
25. Stingu CS, Eschrich K, Rodloff AC, Schaumann R, Jentsch H. Periodontitis is associated with a loss of colonization by *Streptococcus sanguinis*. *J Med Microbiol.* 2008; 57: 495-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18349371>
26. Hurtado A, Bojórquez Y, Montaña M, López J. Bacterias asociadas a enfermedades periodontales. *Oral.* 2016; 17(54): 1374-1378. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/oral/ora-2016/ora1654f>
27. Peña M, Calzado M, González M, Cordero S, Azahares H. Patógenos periodontales y sus relaciones con enfermedades sistémicas. *MEDISAN.* 2012. ISSN 1029-3019.
28. Slots J, Gibbons RJ. Attachment of bacteroides melaninogenicus subsp. *Asaccarolyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and of periodontal pockets. *Infect Immun.* 1978; 19(1): 254-64. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24002>
29. Asikainen S, Chen C, Slots J. Likelihood of transmitting *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in families with periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1996; 11 (6): 387-94. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9467371>

30. Danser MM, van Winkelhoff AJ, de Graaff J, Loss BG, van der Velden U. Short-term effect of full-mouth extraction on periodontal pathogens colonizing the oral mucous membranes. *J Clin Periodontol*. 1994; 21(7): 484-9. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/15269098\\_Short-term\\_effect\\_of\\_full-mouth\\_extraction\\_on\\_periodontal\\_pathogens\\_colonizing\\_oral\\_mucous\\_membranes](https://www.researchgate.net/publication/15269098_Short-term_effect_of_full-mouth_extraction_on_periodontal_pathogens_colonizing_oral_mucous_membranes)
31. Danser MM, Timmerman MF, van Winkelhoff AJ, van Velden U. The effect of periodontal treatment on periodontal bacteria on the oral mucous membranes. *J Periodontol* 1996; 67(5): 478-85. Disponible en: <https://aap.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1902/jop.1996.67.5.478>
32. Pontarolo C, Galli F, Bontá H, Molgatini SL, Caride F, Gliosca L. Detección molecular de periodontopatógenos en pacientes con periodontitis agresiva. Estudio Preliminar. 2017. Universidad de Buenos Aires. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/323175216\\_Deteccion\\_molecular\\_de\\_periodontopatogenos\\_en\\_pacientes\\_con\\_periodontitis\\_agresiva\\_Estudio\\_Preliminar](https://www.researchgate.net/publication/323175216_Deteccion_molecular_de_periodontopatogenos_en_pacientes_con_periodontitis_agresiva_Estudio_Preliminar)
33. Socransky, SS., Haffajee, AD. Microbial mechanism in the pathogenesis of destructive periodontal disease: a critical assessment. *J Periodontol Res*. 1991; 26: 195-212. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1831843>
34. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*. 1992; 63: 322-31. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1573546>
35. Negroni M. Microbiología estomatológica. Editorial Panamericana. 1999. Argentina.
36. Frías M., Urla V, Carasol M. Métodos de diagnóstico microbiológico en la enfermedad periodontal. *Cient. Dent*, 2009; Vol. 6, Num. 2, 93-101. Disponible en: <http://www.coem.org.es/sites/default/files/revista/cientifica/vol6-n2/17-25>
37. Medina M, Medina M, Merino L. Identificación de bacterias periodontopatógenas mediante métodos diagnósticos moleculares. *Enf Inf Microbiol*. 2010; 30(3): 83-90. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=27328>
38. Socransky SS, Haffajee AD. The nature of periodontal diseases. *Ann Periodontol*. 1997; 2(1): 3-10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9151538>

39. Elejalde N. Detección y cuantificación de bacterias asociadas a enfermedades periodontales en bacteremias relacionadas con manipulaciones bucales no profesionales. Estudio piloto. 2013. Trabajo de Investigación. Universidad Complutense de Madrid.
40. Guilarte C, Perrone M. Bacterias periodontopatógenas: bacilos anaerobios gram negativos como agentes etiológicos de la enfermedad periodontal. Acta Odontológica Venezolana. 2005; Vol. 43, Nro. 2. Disponible en: [https://www.actaodontologica.com/ediciones/2005/2/bacterias\\_periodontopatogenas\\_enfermedad\\_periodontal.asp](https://www.actaodontologica.com/ediciones/2005/2/bacterias_periodontopatogenas_enfermedad_periodontal.asp)
41. Untch M, Schlagenhauf U. Inter- and intra-test agreement of three commercially available molecular diagnostic tests for the identification of periodontal pathogens. Clin Oral Invest. 2015; 19(8): 2045-52. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25680706>
42. Botero J, Bedoya E. Determinantes del diagnóstico periodontal. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral. 2010. Vol. 3(2): 94-99. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0719-01072010000200007](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-01072010000200007)
43. Shadi S, Vahed S, Fathi N, Sharifi S. Polymerase chain reaction (PCR)-based methods: Promising molecular tools in dentistry. Int J Biol Macromol. 2018; 117: 983-992. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29778881>
44. Maheaswari R, Kshirsagar JT, Lavanya N. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. J Indian Soc Periodontol. 2016; 20 (2): 128-135. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27143822>
45. Rodríguez L. Detección y cuantificación de patógenos periodontales en pacientes con gingivitis mediante el uso de técnicas moleculares. Trabajo de Investigación. 2016. Universidad Complutense de Madrid.
46. Garibyan L, Avashia N. Research techniques made simple: Polymerase chain reaction (PCR). J Invest Dermatol 2014; 133(3): e6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102308/>
47. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci Am. 1990; 262(4): 56-61. 64-5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2315679>

48. Weier HU, Gray JW. A programmable system to perform the polymerase chain reaction. *DNA*. 1988; 7(6): 441-7. Disponible en: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/dna.1.1988.7.441?journalCode=dna.1>
49. Innis M, Gelfand D, Sninsky J. *PCR Applications. Protocols for functional genomics*. Academic Press. 1999. Chapter 14. ISBN 0-12-372186-5.
50. Sambrook J, Russel D. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd edition. Cold spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. ISBN 0-87969-576-5.
51. Marin MJ, Figuero E, Herrera D, Sanz M. Quantitative analysis of periodontal pathogens using Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR). *Oral Biology: Molecular Techniques and Applications*. 2017; 191-202. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/311484347\\_Quantitative\\_Analysis\\_of\\_Periodontal\\_Pathogens\\_Using\\_Real-Time\\_Polymerase\\_Chain\\_Reaction\\_PCR](https://www.researchgate.net/publication/311484347_Quantitative_Analysis_of_Periodontal_Pathogens_Using_Real-Time_Polymerase_Chain_Reaction_PCR)
52. Coffey J, Choudhry M, Shlossman M, Makin I, Singh V. Multiplex real-time PCR detection and relative quantification of periodontal pathogens. *Clin Exp Den Res*. 2016; 2(3): 185-192. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5839218/>
53. Smith C, Osborn M. Advantages and limitations of quantitative PCR (qPCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*. 2009; 67(1): 6-20. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120456>
54. Choi H, Kim E, Kang J, Kim H, Lee J, Choi J, Joo. Real-time PCR quantification of 9 periodontal pathogens in saliva samples from periodontally healthy Korean young adults. *J Periodontal Implant Sci* 2018; 48(4): 261-271. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6125667/>