

Prevalencia de los herpes virus en pacientes con enfermedad periodontal crónica y enfermedad periodontal agresiva

Herpes Virus Prevalence in Patients with Chronic Periodontal Disease and Aggressive Periodontal Disease

Sergio Ortiz Pérez DDS¹

1. Profesor-instructor, Facultad de Odontología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

Autor para correspondencia: Dr. Sergio Ortiz Pérez - sortiz@periodonciacr.com

Recibido: 28-VII-2016

Aceptado: 26-IX-2016

Publicado Online First: 7-X-2016

DOI: <http://dx.doi.org/10.15517/ijds.v0i0.26498>

RESUMEN

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte de los dientes causada por grupos de microorganismos específicos que producen la destrucción progresiva del ligamento periodontal y el hueso, resultado de una interconexión entre los agentes infecciosos y la respuesta inmune celular y humoral del huésped. El objetivo del presente estudio fue evaluar la prevalencia de los virus de herpes simple tipo 1 y 2 y del citomegalovirus en pacientes diagnosticados con enfermedad periodontal crónica, enfermedad periodontal agresiva y pacientes sanos. Se utilizaron biopsias de pacientes que se presentaron a la Universidad Autónoma de Nuevo León, las cuales fueron evaluadas por reacción en cadena de polimerasa para la detección de los virus. La evaluación de la presencia de los virus estudiados, herpes simple tipo 1, herpes simple tipo 2 y citomegalovirus en los grupos de periodontitis crónica, periodontitis agresiva y el grupo control, resultó negativa en este estudio.

PALABRAS CLAVE

Enfermedad periodontal crónica; Enfermedad periodontal agresiva; Herpes virus; Citomegalovirus; Biología molecular; Reacción en cadena de polimerasa.

ABSTRACT

Periodontitis is defined as an inflammatory disease of the supporting tissues of teeth caused by microorganisms or groups of specific microorganisms, which result in progressive destruction of the periodontal ligament and alveolar bone, caused by multiple infectious agents and is interconnected with the humoral and cellular immune responses of the host. This study aimed to determine the prevalence of herpes simplex virus type 1 and 2 and cytomegalovirus in patients with chronic and aggressive periodontitis and healthy subjects. Biopsies samples were taken from patients presenting to the clinic of the Universidad Autonoma de Nuevo Leon diagnosed with chronic periodontitis o aggressive periodontitis and control patients. The samples taken were submitted to polymerase chain reaction (PCR) to detect the presence of the virus. The presence of the different kinds of virus was negative in the evaluated subjects.

KEYWORDS

Chronic periodontal disease; Aggressive periodontitis; Herpes virus; Citomegalovirus; Molecular biology; Polymerase chain reaction.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal o periodontitis es una patología inflamatoria de los tejidos de soporte de los dientes causada por microorganismos o grupos de microorganismos específicos que producen la destrucción progresiva del ligamento periodontal y el hueso alveolar con formación de bolsa, recesión o ambas (1,2).

En los últimos años se ha reportado una relación entre los virus humanos y las bacterias periodonto-patógenas. Inclusive, se ha observado la presencia de los herpes virus humanos en bolsas periodontales compartiendo el mismo nicho con estas bacterias (3).

Investigaciones recientes documentaron un posible nexo entre la enfermedad periodontal crónica y el virus del herpes, particularmente el herpes virus tipo I y el citomegalovirus (2,4). Dichos virus se han encontrado en muestras de placa subgingival y en sitios de profundidad de bolsa mayores a cinco milímetros (5). El virus del herpes simple tipo I (HSV) presenta una menor prevalencia que el citomegalovirus (HCMV) y que el virus del Epstein-Barr (EBV). El HSV se ha

asociado con la enfermedad periodontal ya que su presencia abunda en pacientes con parámetros clínicos mayormente afectados (6-9). El HCMV se ha asociado con diversas manifestaciones de la enfermedad periodontal como el índice periodontal, índice gingival, niveles clínicos de inserción, entre otros (10). Kamma y col (11) demostraron que tanto el HSV como el HCMV tienen asociación estadística con la presencia de enfermedad periodontal activa. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar la presencia del herpes virus mediante pruebas de reacción de cadena polimerasa (PCR) en paciente con enfermedad periodontal crónica y agresiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio evaluó 24 pacientes que asistieron al posgrado de periodoncia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México El estudio fue aprobado por el comité de ética de la universidad y a cada paciente se le brindó una hoja de consentimiento informado, la cual fue voluntariamente aprobada y firmada.

Los participantes cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: Ausencia de

padecimientos sistémicos, exposición a tratamiento antibiótico en los últimos 3 meses, mujeres que no se encontraran embarazadas o en período de lactancia, ausencia de terapia periodontal por los últimos 6 meses, Pacientes no fumadores.

A cada participante se le evaluaron los parámetros clínicos de índice de placa de Quegley y Hein modificado por Turesky (12), el índice de sangrado por Loe y Silness (13), la profundidad de surco y los niveles de inserción. Los parámetros clínicos se realizaron en seis sitios de la superficie dental (mesial, medial, distal- vestibular y mesial, medial y disto-lingual) tanto para las zonas de muestreo como para los dientes control.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA Y PREPARACIÓN

Posterior a una fase higiénica completa, se realizó la obtención de las muestras en donde se tomaron biopsias de tejido adquiridas de las piezas dentales donde se encontró la mayor profundidad de bolsa a la hora de la intervención quirúrgica. En los casos de sitios

de control, se eligieron como muestras piezas de procedimientos de alargamiento de corona, donde el surco midiese igual o menor a 3mm. A cada espécimen, se le realizó la recolección de tejido de dientes adyacentes para obtener mayor cantidad de tejido a la hora de procesarlo. Las biopsias de tejido fueron colocadas en una solución buffer (ph=8).

EXTRACCIÓN DEL ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEÍCO (ADN)

La extracción del ADN de las biopsias previamente obtenidas se realizó utilizando el Kit GENTRA® (QIAGEN, E.E.U.U). Posterior a este paso se obtuvo el ADN puro de la biopsia que fue sometido a las pruebas de reacción de la cadena polimerasa (PCR) viral.

PRIMERS U OLIGOS

El diseño de los oligos que se utilizaron fue dado por la casa comercial Maxim Biotech. Inc.® (San Francisco, E.E.U.U.) con la siguiente secuencia para los virus estudiados:

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

PREPARACIÓN DEL ADN PARA LA REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR)

La preparación se realizó siguiendo los lineamientos establecidos por los kits de la casa comercial Maxim Biotech. Inc. (San Francisco, E.E.U.U). Se prepararon 20,2 μ L solución, utilizando 16 μ L de la mezcla del kit conteniendo el buffer para PCR (dNTP's, químicos, potenciador y los oligos del virus respectivo), 4 μ L del ADN de la muestra y 0,2 μ L de la Taq polimerasa. Cada muestra se almacenó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante hasta su análisis.

PARÁMETROS PARA LA PCR

Los siguientes parámetros fueron considerados para la PCR.

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

Una vez edificado el gel para la electroforesis, se colocó con una pipeta tipo Eppendorf 5 μ L del buffer de carga y 5 μ L de cada una de las muestras con las condiciones para PCR descritas. Las condiciones para la electroforesis se realizaron en una cubeta de electroforesis a un voltaje de 80 voltios durante una hora, para finalizar con

su interpretación. Para las pruebas que resultaran negativas para virus se realizó una prueba de electroforesis con controles endógenos a base de actina, para descartar la posibilidad de una mala obtención del ADN de la muestra.

RESULTADOS

Las características de la población que se estudió se muestran en la tabla 1.

La prevalencia de la enfermedad periodontal crónica fue mayor en mujeres que en hombres. El índice gingival muestra un promedio de 1.86 que implica una inflamación de tipo leve y el índice de placa fue de 2.4, correspondiente a presencia de placa en el tercio apical.

La distribución del diagnóstico periodontal se muestra en la tabla 2. La mayor distribución se encontró para la periodontitis crónica generalizada en un 42%, y los pacientes con periodontitis agresiva se presentaron en un 25% distribuido en un 12.5 % para pacientes con periodontitis agresiva localizada y el mismo porcentaje para pacientes con periodontitis agresiva generalizada. Se realizaron amplificaciones del gen de actina como control endógeno y se demostró la amplificación de ADN.

La evaluación de la presencia de los virus estudiados, herpes simple tipo 1, herpes simple tipo 2 y citomegalovirus en los grupos de periodontitis crónica, periodontitis agresiva y el grupo control, resultó negativa en este estudio.

Tabla 1. Características de la población de estudio.

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

Tabla 2. Distribución del diagnóstico de la población.

Sujetos (n)	%	Diagnóstico
10	42	Periodontitis Crónica generalizada
3	12.5	Periodontitis Agresiva Localizada
3	12.5	Periodontitis Agresiva Generalizada
8	33	Control
Total= 24	100	

DISCUSIÓN

Este estudio evaluó la presencia de los herpes virus tipo 1, 2 y citomegalovirus en pacientes con enfermedad periodontal crónica, enfermedad periodontal agresiva y pacientes control. Al igual que muchos estudios, esta investigación utilizó pruebas sensibles de PCR para la detección de los virus estudiados (14,15, 16). La progresión de la periodontitis está asociada con los aumentos en los niveles de ciertas bacterias principalmente de tipo anaeróbicas, y mas recientemente se ha asociado la presencia de ciertos virus (17-21).

Los herpes virus humanos pueden participar en el desarrollo y la progresión de la enfermedad periodontal, y existen varios estudios que han investigado este fenómeno. La detección de herpes virus mediante biopsias presenta mejores resultados que la detección mediante líquido del surco por absorción de puntas de papel o muestras de placa subgingival en la bolsa periodontal (3). En este estudio se utilizaron biopsias de pacientes con periodontitis crónica, periodontitis agresiva y pacientes control; sin embargo, no se encontró en ninguno de los grupos la presencia de los virus estudiados, por lo que dentro de los límites de esta investigación no se apoya una posible asociación.

La actividad de la enfermedad periodontal se estipula principalmente con parámetros clínicos como profundidad de bolsa, pérdida en los niveles de inserción, índice de placa e índice de sangrado. El sangrado al sondeo está asociado con la actividad de la enfermedad periodontal (23-25), y la ausencia de sangrado es considerada como un indicador de estabilidad periodontal (26). Ya que el estudio no detectó la presencia de ninguno de los distintos tipos de virus estudiados, se apoya una etiología principalmente bacteriana causante de los hallazgos clínicos observados. Algunas investigaciones vinculan a los herpes virus como agentes etiológicos de la enfermedad periodontal en sus formas de periodontitis marginal y periodontitis

apical (27,28); en otras investigaciones se han asociado a periodontitis agresivas y a periodontitis crónica (29-33).

En esta investigación se pudieron relacionar los parámetros clínicos entre sí, obteniendo resultados estadísticamente significativos entre NI, PB, IG y IP. Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con diversas investigaciones 30-33 en los que dichos parámetros presentan relación. Este dato estadístico es importante ya que la parte clínica es la que presenta mayor trascendencia a la hora del diagnóstico, pronóstico y tratamiento periodontal. Las otras ramas diagnósticas como la biología molecular son una ayuda para el clínico, sin embargo son técnicas que presentan cierto grado de complejidad y su costo es una desventaja para ser utilizado como herramienta diagnóstica de rutina; es por ello que la parte clínica es la que presenta una mayor importancia para la terapia periodontal.

En esta investigación se encontró que el grupo de pacientes sanos no presentó ninguno de los virus estudiados. Este dato coincide con previos estudios 9,30,33 en el que no se detectó la presencia de herpes virus simple tipo 1 y tipo 2, así como la ausencia de citomegalovirus. Contreras y Slots 31 no detectaron la presencia del herpes virus tipo 2 en pacientes con periodontitis, resultado que concuerda con los datos obtenidos en este estudio. La posible explicación de este fenómeno puede estar en la capacidad inmunológica de reconocimiento, ya que las moléculas virales del HSV1 y HSV 2 son similares por lo que el sistema inmune puede reconocer una molécula y desarrollar anticuerpos para el otro tipo de virus, sin embargo es una hipótesis que se encuentra en prueba.

Diversas investigaciones han detectado la presencia de los herpes virus tipo 1 y tipo 2 así como la presencia del citomegalovirus 6-10, a diferencia de nuestro estudio en el cual no se detectó ningún virus, en los distintos grupos

analizados. Es importante destacar que las posibles diferencias podrían radicar en que los primeros estudios se utilizaron los oligonucleótidos diseñados por Parra y Slots en 1996. Dichos oligonucleótidos presentan características diferentes a los oligonucleótidos utilizados en este estudio. Los oligonucleótidos que se utilizaron son de 24 pares de bases para el virus herpes tipo 1, 20 pares de bases para herpes virus tipo 2 y 25 pares de bases para el citomegalovirus, mientras que los utilizados por las investigaciones previamente mencionadas son de 46 pares para HSV-1 y HSV-2 y de 48 pares para citomegalovirus. Sin embargo, se recomienda un número aproximado de 18 a 22 nucleótidos, porque es la cantidad óptima para que hibride de forma específica con el ADN del virus a buscar. Otro de los posibles factores a considerar es que las zonas a amplificar de los genes blanco son distintas en nuestro estudio comparado con los estudios mencionados anteriormente en los cuales todos utilizan los mismos oligonucleótidos.

Yapar 33 investigó la presencia del citomegalovirus en 16 pacientes con periodontitis agresiva y 17 pacientes sanos. Encontró que ninguno de los pacientes sanos presentó el virus al igual que en nuestro estudio. También observó que pacientes que fueron tratados tanto con raspado y alisado como con cirugías periodontales y terapia antibiótica, no presentaron la presencia del citomegalovirus. En este estudio a todos los pacientes se les realizó una fase higiénica completa e instrucciones de control de placa previo a la obtención de la biopsia (que se adquirió al momento de la cirugía periodontal) posible razón por la cual se obtuvieron resultados negativos tanto para el CMV como para el HSV-1 y el HSV-2. Una de las posibles explicaciones es que esta fase del tratamiento periodontal pueda alterar la composición de la flora subgingival deteniendo la correlación entre los herpes virus y bacterias.

En otros estudios 36,37 realizados donde trataron pacientes con enfermedad periodontal

crónica y enfermedad periodontal agresiva en los que les realizaron raspado y alisado radicular, se encontró una disminución en las células plasmáticas, leucocitos y linfocitos, condición que disminuye la actividad de los herpes virus y citomegalovirus. Otra de las posibles razones por la cual este estudio no obtuvo resultados positivos ante los virus analizados pudo haber radicado en la edad de los pacientes ya que entre el 40% y el 70% adquieren anticuerpos contra el herpes simple desde el primer año de vida hasta la adolescencia lo que pudo haber afectado la muestra 15.

Con base en los resultados de este estudio, no fue posible comprobar la prevalencia de los virus de herpes simple tipo 1 y 2 y del citomegalovirus en pacientes diagnosticados con enfermedad periodontal crónica y enfermedad periodontal agresiva. Cabe resaltar, la enfermedad periodontal es una enfermedad inflamatoria inmunosupresora, el hecho de que no se haya encontrado virus en los pacientes con periodontitis no implica que el paciente no lo haya manifestado en algún momento, sino que el virus se encontrara en un periodo de latencia en el momento de la colecta. Por esto, se recomiendan estudios longitudinales, microbiológicos y clínicos para determinar las implicaciones patogénicas y terapéuticas de este estudio.

REFERENCIAS

1. Ranney, R. Classification of periodontal disease. *Periodontology* 2000; 1993; 2:13.
2. Carranza, F. Newman, M. Takei, H., (2004). *Periodontología Clínica*. Novena edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México D.F., México.
3. Contreras A., Nowzari H., Slots J. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 15–18.
4. Contreras A., Slots J. Typing of herpes simplex virus from human periodontium. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 63–64.

5. Ling, L. Ho, C. Wu, C. Chen, Y Hung, S. Association between human herpesviruses and the severity of periodontitis. *J Periodontol.* 2004; 75: 1479-1485.
6. Contreras, A. Umeda, M. Chen, C. Bakker, J. Morrison, J. Slots, J. Relationship between herpesviruses and adult periodontitis and periodontopathic bacteria. *Journal of periodontology.* 1999; 70:478-483.
7. Cassai, E. Galvan, M. Trombelli, L. Rotola, A. HHV-6, HHV-7, HHV-8 in gingival biopsies from chronic adult periodontitis patients. *Journal of clinical periodontology.* 2003; 30: 184-191.
8. Contreras A., Slots J. Typing of herpes simplex virus from human periodontium. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 63–64.
9. Saygun I., Kubar A., Ozdemir A., Yapar M., Slots J. Herpesviral–bacterial interrelationships in aggressive periodontitis. *J. Periodont Res* 2004; 39; 207–212.
10. Saygun I., Kubar A., Ozdemir A., Yapar M., Slots J. Herpesviral–bacterial interrelationships in aggressive periodontitis. *J. Periodont Res* 2004; 39; 207–212.
11. Kamma J. J., Contreras A., Slots J: Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. *J. Clin Periodontol* 2001; 28: 879–885.
12. Mandell Bennet-Dolin. Principles and practice of infectious disease. 8th edition. 2000. Editorial Churchill Livingstone.
13. Loe, H. The gingival Index and the retention index systems. *J. Periodontol.* 1967; 38: 610. (supplement).
14. Enzzo, P. Cutler, C. Microorganisms as risk indicators for periodontal diseases Paul J. Enzzo & Christopher W. Cutler. *Periodontology* 2000. 2003; 32: 24–35.
15. Robin, R. Gutell, N. Woese, C. Lesons from an evolving rRNA:16S and 23s rRNA Structures from a comparative perspective. *Microbiology review.* 1994; 58: 10-26.
16. Parameter on aggressive periodontitis. American academy of Periodontology, *J Periodontol.* 2000; 71:867-869 (Noiri, Y. y col. 2001).
17. Socransky, S. Haffajee, A. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000. 2005; 38: 135-187.
18. Dibart, S., Skobe, Z., Snapp, K. et al. Identification of bacterial species on or in crevicular epithelial cells from healthy and periodontally diseased patients using DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiol Immunol.* 1998; 13:30.
19. Dzink, J. Socransky, S. Haffajee, A. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal disease. *J. Clin Periodontol.* 1998; 15: 316.
20. Socransky, S. Haffajee, A. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000. 2005; 38: 135-187.
21. Enzzo, P. Cutler, C. Microorganisms as risk indicators for periodontal diseases Paul J. Enzzo & Christopher W. Cutler. *Periodontology* 2000. 2003; 32: 24–35.
22. Kaldahl, W., Kalkwarf, K., Patil, K. & Molvar, M. (1990) Relationship of gingival bleeding, gingival suppuration and supragingival plaque to attachment loss. *Journal of Periodontology* 61, 347–351.
23. Lang, N. P., Adler, R., Joss, A. & Nyman, S. (1990) Absence of bleeding on probing. An indicator of periodontal stability. *Journal of Clinical Periodontology* 17, 714–721.
24. Armitage, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *ANN Periodontol*, 1999; 4:1-6. Review.
25. Lang, N. P., Adler, R., Joss, A. & Nyman, S. (1990) Absence of bleeding on probing. An indicator of periodontal stability. *Journal of Clinical Periodontology* 17, 714–721.

26. Saygun I., Kubar A., S., ahin S., S., ener K, Slots J. Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. *J. Periodontal Res* 2008; 43: 352–359.
27. Slots, J. Herpes viruses in periodontal diseases. *Periodontology* 2000. 2005; 38: 33-62.
28. Bilichodmath, S. Mangalekar, S. Sharma, D. Prabhakar, A. Herpes viruses in chronic and aggressive periodontitis patients in an Indian population. *Journal of Oral Science*, 2009; 51: 79-86. *Journal of Oral Science*, 2009; 51: 79-86.
29. Botero JE, Vidal C, Contreras A, Parra B. Comparison of nested polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR and viral culture for the detection of cytomegalovirus in subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23: 239–244.
30. Botero, J. Parra, B. Jaramillo, A. Contreras, A. Subgingival human cytomegalovirus correlates with increases clinical periodontal parameters and bacterial coinfection in periodontitis. *Journal of periodontology*. 2007; 78: 2303-2310.
31. Botero J. E., Contreras A., Parra B. Effects of cytomegalovirus infection on the mRNA expression of collagens and matrix metalloproteinases in gingival fibroblasts. *J. Periodontal Res* 2008; 43: 649–657.
32. Ling, L. Ho, C. Wu, C. Chen, Y Hung, S. Association between human herpesviruses and the severity of periodontitis. *J. Periodontol*. 2004; 75: 1479-1485.
33. Yapar, M. et al. Prevalence of human herpes virus in patients with aggressive periodontitis. *J. Periodontol*. 2003; 74: 1634-1640.
34. Shivaprasad, B. et al. Herpes viruses in chronic and aggressive periodontitis in an Indian population. *Journal of Oral Science*. 2009; 1: 79-86.
35. Barrera Sadaña, A. López, R. Rojas, A. Reacción en cadena de la polimerasa. *Ciencia y Desarrollo*; 1993: 50-60.
36. Kleinfelder, J. Lange, D. Bocker, W. Some effects of non surgical therapy on gingival inflammatory cell sub-sets in patients with adult onset and early-onset periodontitis. *J. Periodontol*. 2000; 71: 1561-1566.
37. Kleinfelder, J. Lange, D. Some effects of non surgical therapy on gingival inflammatory cell sub-sets in patients with adult onset and early-onset periodontitis associated with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontol*. 2001; 72: 1713-1719.



Attribution (BY-NC) - (BY) You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggest the licensor endorses you or your use. (NC) You may not use the material for commercial purposes.