



**UNIVERSIDAD VIÑA DEL MAR**

**RELACIÓN ENTRE VIRUS HERPES Y PERIODONTITIS  
CRÓNICA EN ADULTOS SISTÉMICAMENTE SANOS**

**Trabajo de Investigación para optar al Título de Cirujano Dentista**

**CAROLINA ARANCIBIA HERRERA - ALEJANDRA BRAVO LARA - PAOLA  
BUSTOS MERIÑO - KAREN CABRERA CANELO**

**Profesor guía Dr. Héctor Oñate Núñez Cirujano Dentista**

**Viña del Mar, Chile**

**2017**

## ÍNDICE

<b>I. AGRADECIMIENTOS</b> .....	v
<b>II. RESUMEN</b> .....	vi
<b>III. INTRODUCCIÓN</b> .....	ix
<b>IV. MARCO TEÓRICO</b> .....	xi
1. Periodontitis Crónica.....	xi
2. Virus Herpes.....	xii
2.1 Virus Herpes Simple tipo 1 (HSV-1).....	xiv
2.2 Virus Epstein Barr (EBV).....	xv
2.3 Citomegalovirus Humano (HCMV).....	xv
3. Relación entre HCMV, EBV, HSV y Periodontitis Crónica.....	xvi
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	xix
1. Objetivo general.....	xix
2. Objetivos específicos.....	xix
<b>VI. HIPÓTESIS</b> .....	xx
<b>VI. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO</b> .....	xx
<b>VII. MÉTODOS DE ESTUDIO</b> .....	xxi
1. Diseño de estudio.....	xxi
1.1 Estudios Descriptivos.....	xxi
1.2 Estudios de Casos y Controles.....	xxii
2. Sujetos de estudio.....	xxii
2.1 Criterios de inclusión:.....	xxii
2.2 Criterios de exclusión:.....	xxii
3. Variables.....	xxiii
3.1 Variable dependiente.....	xxiii
3.2 Variables independientes.....	xxiv
4. Tipos de intervenciones.....	xxx
4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	xxxii
4.1.1 Componentes del PCR.....	xxxii
4.1.2 Etapas del PCR.....	xxxii
4.1.3 Tipos de PCR.....	xxxiii
4.1.4 Limitaciones del PCR.....	xxxv
5. Análisis estadístico.....	xxxvi
6. Métodos de búsqueda para la identificación de estudios:.....	xxxix

6.1 Búsquedas electrónicas.....	xxxix
7. Extracción de datos y análisis.....	xlii
7.1 PautaSTROBE.....	xlii
7.2 Diagnóstico Periodontitis Crónica.....	xlviii
7.3 Tablas de frecuencia.....	xlx
<b>VIII.PLANIFICACIÓN: Carta gantt.....</b>	<b>xlx</b>
<b>IX.RESULTADOS.....</b>	<b>I</b>
1.Periodontitis Crónica, virus Herpes y su patogénesis correspondiente.....	I
1.1 Definición de Periodontitis Crónica.....	I
1.2 Definición y patogénesis de Herpes Simple tipo 1 (HSV-1).....	liii
1.3 Definición y patogénesis de Virus Epstein Barr (EBV).....	liv
1.4 Definición y patogénesis de Citomegalovirus Humano (HCMV).....	lv
2. Análisis de la respuesta del hospedero frente a la Periodontitis Crónica, los virus Herpes y la relación entre ambos.....	lvii
2.1Análisis de las muestras.....	lvii
2.2 Relación entreHCMV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos.....	lviii
2.3 Relación entreHSV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos.....	lx
2.4 Relaciónentre EBV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos.....	lxii
2.5 Relación entre EBV, HCMV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos.....	lxiv
2.6 Relación entre HSV, HCMV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos.....	lxvi
2.7 Relación HSV, EBV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos.....	lxvii
2.8 Relación entre EBV, HSV, CMV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos .....	lxix

3. Prevalencia de EBV, CMV y HSV en pacientes con periodontitis crónica presente en los estudios analizados.....	lxxi
3.1 Resumen estadístico.....	lxxi
3.2 Análisis estadístico de prevalencia de HCMV.....	lxxii
3.3 Análisis estadístico de prevalencia de HSV.....	lxxiii
3.4 Análisis estadístico de prevalencia de EBV.....	lxxiv
3.5 Análisis estadístico de prevalencia de EBV, HSV, HCMV simultáneamente.....	lxxvi
4. Desviación estándar de EBV, HSV y CMV.....	lxxvii
5. Correlación entre EBV, HSV y HCMV.....	lxxviii
<b>X.DISCUSIÓN</b> .....	lxxx
<b>XI.CONCLUSIONES</b> .....	lxxxi
Declaración de conflictos de interés.....	lxxxii
<b>XII.BIBLIOGRAFIA</b> .....	lxxxiii
<b>XIII.ANEXOS</b> .....	lxxxiv

## **I. AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos primeramente a Dios, ya que sin Él nada de esto hubiese sido posible; a nuestros padres y familias, quienes han permitido el término de esta linda etapa gracias a su esfuerzo, amor y apoyo incondicional brindado durante este largo camino; y, finalmente, a los docentes quienes contribuyeron a nuestra formación profesional.

## II. RESUMEN

**OBJETIVO:** El objetivo de esta investigación es analizar la bibliografía especializada existente sobre la asociación de los virus Herpes [Citomegalovirus (HCMV), virus Epstein Barr (EBV) y virus Herpes Simple (HSV)] y la periodontitis crónica; para poder aclarar así el posible rol de estos microorganismos en la progresión y severidad de la enfermedad.

**MATERIALES Y MÉTODOS:** Se llevó a cabo una búsqueda de artículos científicos en marzo de 2017 en los principales metabuscadores: PUBMED/MEDLINE, SCIELO, EBSCO y TRIP DATABASE con el fin de seleccionar artículos de acuerdo a los criterios de exclusión e inclusión. Se realizó el análisis de estos a través de una matriz de datos expresados en tablas de frecuencia utilizando estadística descriptiva con medidas de tendencia central, dispersión y correlación.

**RESULTADOS:** Los resultados de este estudio muestran que la presencia de HCMV, EBV y HSV en pacientes con periodontitis crónica se relaciona con un aumento de los parámetros clínicos como la profundidad de sondaje (PS), pérdida de inserción clínica (PIC) y sangrado gingival (SS), en el 96%, 60% y 40% de los estudios respectivamente para HCMV; 96.55% (PS), 51.72% (PIC) y 48.28% (SS) para EBV y de un 80% (PS), 90% (PIC) y 60% (SS) para HSV. El promedio de prevalencia de EBV, HCMV y HSV fue de 46.3%, 35.4% y 40.1%, respectivamente.

**CONCLUSIÓN:** EBV, HCMV y HSV podrían estar asociados a la progresión y severidad de la enfermedad periodontal al estar relacionados a una mayor profundidad de sondaje, mayor pérdida de inserción clínica y a un mayor

sangrado al sondaje. El EBV presentó una mayor prevalencia en la literatura analizada. Son necesarios más estudios clínicos para poder comprobar una directa relación entre EBV, HSV, HCMV y la enfermedad periodontal, que permitan corroborar las tendencias de las variables observadas en este trabajo.

## **ABSTRACT**

**OBJECTIVE:** The aim of this study was to analyze the available literature about the association between herpesviruses [Cytomegalovirus (HCMV), Epstein Barr (EBV) and Herpes Simplexvirus (HSV)] and chronic periodontitis, to asses the role of this microorganisms in the progression and severity of the periodontal disease.

**MATERIALS AND METHODS:** A structured review of the literature was conducted in march of 2017 in the main databases such as: PUBMED/MEDLINE, SCIELO, EBSCO and TRIP DATABASE, to identify specific articles according to inclusion and exclusion criteria. The analysis of these studies were performed through an array of data in frequency tables using descriptive statistics with measures of central tendency, dispersion and correlation.

**RESULTS:** The results of the present study showed tha the presence of HCMV, EBV and HSV in patients with chronic periodontitis, is related to an increase in clinical parametres such as pocket depth (PD); clinical attachment loss (CAL) and bleeding on probing (BOP) resulting in 96%, 60% and 40% of the studies respectively for HCMV; 96.55% (PD), 51.72% (CAL) and 48.28% (BOP) for EBV, and 80% (PD), 90% (CAL) and 60% (BOP) for HSV. The average prevalence of EBV, HCMV and HSV was 46.3%, 35.4% and 40.1% respectively.

**CONCLUSION:** EBV, HCMV and HSV may be associated with the progression and severity of chronic periodontitis as they are related to a greater pocket depth, greater clinical attachment loss and an increase bleeding on probing. EBV presented a higher prevalence in the analyzed literature. More clinical studies are required to verify a direct relationship between EBV, HSV, HCMV and chronic periodontitis, which can support the variable trends observed in this study.

### III. INTRODUCCIÓN

La periodontitis crónica ha sido descrita como una de las enfermedades microbianas inflamatorias más predominante a nivel mundial (Duque, 2016; Nanci & Bosshardt, 2006; Philstrom, Michalowicz, & Jhonson, 2005; Pinto, Silva, Peddey, Sillankorva, & Azeredo, 2016). En Chile se considera como la patología oral más prevalente en la población después de la caries dental (Ministerio de Salud, 2010). Se inicia por la presencia de placa bacteriana en la superficie dentaria (Kinane & Bartold, 2007; Moreno & Contreras, 2013; Papone, Veloro, Zaffaroni, Batlle, Capo, Bueno, Silva, & Soria, 2015; Pinto et al., 2016), llevando a la destrucción de los tejidos de soporte del diente, incluyendo el ligamento periodontal, el hueso alveolar, y los tejidos gingivales (Kinane & Bartold, 2007; Nunn, 2004; Pinto et al., 2016).

A pesar de que distintos estudios confirman que la presencia de microorganismos bacterianos es necesaria e indispensables para el inicio y progresión de esta enfermedad (Grenier G., Gagnon, & Grenier D., 2009; Nishihara & Koseki, 2004; Seymour & Taylor, 2004; Socransky & Haffajee, 2005; Slots, 2006), otros trabajos postulan que la sola presencia de bacterias periodontopatógenas en los tejidos orales no es suficiente para iniciar y perpetuar esta patología (Escalona & Limonchy, 2009; Grenier et al., 2009; Ishikawa, 2007; Kilian, Frantsen, Havek, & Poulsen, 2006; Nanci & Bosshardt, 2006; Nunn, 2004; Slots, 2006). Se describe que para el inicio y progresión de la periodontitis influyen múltiples factores (Nunn, 2004) y si bien ya se ha establecido que la enfermedad periodontal es multifactorial y de origen inmunoinflamatorio (Papone et al., 2015; Nunn, 2004), aún quedan muchas interrogantes por resolver respecto al rol de otros microorganismos -además de las bacterias- en la patogénesis de ésta misma.

Considerando lo expuesto anteriormente, es que en la última década se ha propuesto al virus Herpes como un posible agente patógeno putativo en la enfermedad periodontal (Bascones & Pousa, 2011; Contreras & Slots, 2000a; Hernández, Fernández, Escalona, & Correnti, 2016; Feller, Meyerov, & Lemmer, 2007; Foglio-Bonda et al., 2010; Moreno & Contreras, 2013; Parra & Slots, 1996; Saygun, Kubar, Ozdemir, Yapar, & Slots, 2004; Slots, 2002). Se sugiere así, que este microorganismo toma un rol activo en la progresión de esta patología, ya sea iniciándola o acelerando la destrucción periodontal a través de distintos mecanismos propios de estos virus (Ishikawa, 2007).

Es debido a esta incertidumbre respecto al rol de otros microorganismos involucrados en la patogénesis de la enfermedad periodontal, específicamente los virus Herpes, lo que motiva a investigar y analizar la bibliografía especializada existente sobre la posible participación activa de estos virus en la periodontitis crónica, enfocándose principalmente en el Citomegalovirus Humano (HCMV), virus Epstein Barr (EBV) y virus Herpes Simple (HVS).

## **IV. MARCO TEÓRICO**

### **1. Periodontitis crónica**

Se sabe que la periodontitis crónica es una enfermedad inmunoinflamatoria y multifactorial (Nunn, 2004; Papone et al., 2015), con formación de sacos periodontales, reabsorción ósea marginal y pérdida dentaria (Kinane & Bartold, 2007; Nunn, 2004). Su inicio se produce a partir del biofilm ubicado en el margen gingival (Kinane & Bartold, 2007; Papone et al., 2015; Pinto et al., 2016; Teng, 2006) y de periodontopatógenos específicos subgingivales (Nishihara & Koseki, 2004; Seymour & Taylor, 2004; Socransky & Haffajee, 2005; Teng, 2006). El sistema inmune del hospedero entrega una respuesta protectora para destruir a los periodontopatógenos, sin embargo, en ocasiones éste se ve afectado por el desafío bacteriano (Díaz et al., 2012), modificando así su normal funcionamiento durante el curso de las reacciones inmunes, llevando finalmente a una respuesta destructiva para el hospedero (Díaz et al., 2012).

Adicionalmente, se ha determinado que si bien la etiología de la enfermedad periodontal es bacteriana, éste no sería el único factor asociado para que ésta se desarrolle (Donlan & Costerton, 2002; Hernández et al., 2016; Ishikawa, 2007; Kilian et al., 2006; Nanci & Bosshardt, 2006; Nunn, 2004), también sería relevante la presencia de virus del tipo Herpes (Bascones & Pousa, 2011; Contreras & Slots, 2000a; Hernández et al., 2016; Feller et al., 2007; Foglio-Bonda et al., 2010; Moreno & Contreras, 2013; Parra & Slots, 1996; Slots, 2002).

## **2. Virus Herpes**

La infección de las células por el virus Herpes da como resultado la síntesis de 50 polipéptidos que se incorporan en la membrana celular y forman las envolturas del virión (Hung, Chiang, Wu, Hsu, & Chen, 2012).

Los virus Herpes poseen en común las siguientes características (Bascones & Pousa, 2011; Echeverría, Vignoletti, Fabrizi, & Matesanz, 2007; Perea, Campo, Escudero, & Bascones, 2006):

- a) Se encuentran envueltos por una capa proteica (nucleocápside) y otra cubierta membranosa (bicapas lipídicas y proteínas) que permite la transmisión del virus de una célula a otra (Bascones & Pousa, 2011; Echeverría et al., 2007; Perea et al., 2006).
- b) Su genoma está compuesto por una única molécula de ADN (Bascones & Pousa, 2011; Echeverría et al., 2007; Perea et al., 2006).
- c) La infección viral tiende al tropismo, presentando afinidad al tejido infectado (Bascones & Pousa, 2011; Echeverría et al., 2007; Perea et al., 2006).
- d) En la fase de infección viral se liberan múltiples proteínas virales, las que posteriormente permanecen en estado de latencia, dejando que el virus permanezca dentro de las células del hospedero durante toda la vida. Cuando el virus se encuentra en estado de latencia puede sufrir diversos períodos de reactivación provocando la liberación de proteínas virales y dando paso a la fase productiva (Bascones & Pousa, 2011; Echeverría et al., 2007; Perea et al., 2006).

- e) Dentro de la familia de los virus Herpes podemos encontrar 8 miembros capaces de infectar al hombre. Éstos se dividen en 3 subgrupos: Alfa, Beta y Gamma (Bascones & Pousa, 2011; Escalona & Limonchy, 2009; Echeverría et al., 2007; Perea et al., 2006; Slots, 2006).
- Subgrupo Alfa: Incluye los virus Herpes Simple tipo 1, virus Herpes Simple tipo 2 y Varicela Zóster (Bascones & Pousa, 2011; Escalona & Limonchy, 2009; Echeverría et al., 2007; Perea et al., 2006). Estos presentan un ciclo rápido de replicación, son neurotrópicos (Escalona & Limonchy, 2009; Echeverría et al., 2007), producen lisis de las células infectadas (Escalona & Limonchy, 2009) y permanecen en un estado de latencia en los ganglios de los nervios sensitivos y monocitos (Escalona & Limonchy, 2009; Milla & Troulis, 1994).
  - Subgrupo Beta: Incluye Citomegalovirus Humano, virus Herpes tipo 6 y virus Herpes tipo 7 (Bascones & Pousa, 2011; Escalona & Limonchy, 2009; Echeverría et al., 2007; Perea et al., 2006), los cuales se replican lentamente (Escalona & Limonchy, 2009) en las células linfáticas y glandulares (Echeverría et al., 2007). El virus Herpes tipo 6 permanece en estado de latencia en los linfocitos y epitelio ductal de las glándulas salivales, y el virus Herpes tipo 7 en los linfocitos y tejido glandular (Bascones & Pousa, 2011; Echeverría et al., 2007; Perea et al., 2006). La infección primaria con virus Herpes 6 y 7 es generalmente asintomática (Escalona & Limonchy, 2009).
  - Subgrupo Gamma: Incluye el virus Herpes tipo 8 y el virus Epstein Barr, el cual permanece de manera latente en los linfocitos B y tejido de glándulas salivales. (Bascones & Pousa, 2011; Escalona & Limonchy, 2009; Echeverría et al., 2007; Perea et al., 2006). Este subgrupo, al igual que el subgrupo Beta, tiene una lenta replicación en las células

glandulares y células linfáticas (linfocitos B y T) (Escalona & Limonchy, 2009; Echeverría et al., 2007). Este subgrupo también puede producir la lisis celular de fibroblastos y células epiteliales (Escalona & Limonchy, 2009).

El diagnóstico del virus Herpes se puede realizar a través de biopsia, citología exfoliativa, cultivo, microscopía electrónica, pruebas serológicas o bien por detección de antígenos virales como el test de ELISA, PCR, entre otros (Bascones & Pousa, 2011).

Dentro de los virus Herpes que participarían en el desarrollo de la enfermedad periodontal, se han reconocido tres tipos:

### **2.1 Virus Herpes Simple tipo 1 (HSV-1)**

Este virus pertenece a la subfamilia Alfa Herpesviridae (Bascones & Pousa, 2011; Escalona & Limonchy, 2009; Echeverría et al., 2007; Perea et al., 2006), el cual se caracteriza por ser de gran tamaño, neurotrópico y causar daño a través de la lisis celular (Bascones & Pousa, 2011; Perea et al., 2006), provocando principalmente infecciones orales (Bascones & Pousa, 2011).

El genoma del HSV-1 tiene ADN de doble cadena, ubicado en el núcleo y rodeado por una cápside icosaédrica, que a su vez, se encuentra envuelta por una capa lipídica con glicoproteínas virales (Newcomb, Thomsen, Homa, & Brown, 2003). Este virus es capaz de permanecer en estado de latencia en los ganglios de nervios sensitivos y monocitos, reactivándose frente a una inmunosupresión (Bascones & Pousa, 2011; Milla & Troulis, 1994).

## **2.2 Virus Epstein Barr (EBV)**

Este virus pertenece a la familia del subgrupo Gamma, el cual afecta a más del 90% de la población adulta a nivel mundial (Bascones & Pousa, 2011; Escalona & Limonchy, 2009; Echeverría et al., 2007; Perea et al., 2006). Es un tipo de virus Herpes encapsulado de gran tamaño de doble cadena de ADN (Escalona & Limonchy, 2009), que presenta una envoltura lipoproteica con glicoproteínas en su interior que se proyectan hacia el exterior (Rickinson & Kieff, 2007).

Se sabe que este virus se transmite a través de secreciones orales o sangre (Escalona & Limonchy, 2009; Perea et al., 2006).

## **2.3 Citomegalovirus Humano (HCMV)**

Otro de los posibles virus involucrados en el desarrollo de la enfermedad periodontal es el Citomegalovirus Humano (HCMV) (Contreras et al., 1999; Contreras, Nowazari, & Slots, 2000b; Kamma, Contreras, & Slots, 2001; Saygun et al., 2004); de gran tamaño (Staras et al., 2008) y perteneciente a la familia del subgrupo Beta (Bascones & Pousa, 2011; Escalona & Limonchy, 2009; Echeverría et al., 2007; Perea et al., 2006). Este virus afecta al 95% de los individuos adultos en los países en vías de desarrollo y entre un 60% y 80% en países desarrollados (Villalba & Valdés, 2000). Su morfología es similar al resto de los virus Herpes presentando una membrana lipoproteica en su parte más externa con proyección de glicoproteínas desde su interior (Bascones & Pousa, 2011; Staras et al., 2008; Villalba & Valdés, 2000).

Una vez que los individuos han sido infectados, éste permanece latente y difícilmente es eliminado del hospedero (Villalba & Valdés, 2000).

La transmisión de este virus se establece a través de la sangre o secreciones como saliva, semen o leche materna (Bascones & Pousa, 2011; Echeverría et al., 2007).

### **3. Relación entre HCMV, EBV, HSV y Periodontitis crónica**

Son diversas las investigaciones que se han dedicado a estudiar una posible relación entre la presencia de virus Herpes y la enfermedad periodontal (Botero, Parra, Jaramillo, & Contreras, 2007; Contreras et al., 1999; Contreras et al., 2000b; Chalabi et al., 2010; Escalona & Limonchy, 2009; Feller et al., 2007; Foglio-Bonda et al., 2010; Grenier et al., 2009; Imbronito, Okuda, Maria de Freitas, Moreira, & Nunes, 2008; Kamma et al., 2001; Kamma & Slots, 2003; Kazi, Bharadwaj, Bhat, & Happy, 2015; Pérez & Castillo, 2011; Rotola et al., 2008; Sahin, Saygun, Kubar, & Slots, 2009; Saygun, Kubar, Sahin, Sener, & Slots, 2008; Slots, 2010a; Sunde, Olsen, Enersen, & Grinde, 2008). La progresión de la periodontitis está asociada al incremento de bacterias anaerobias (Moreno & Contreras, 2013; Nishihara & Koseki, 2004; Seymour & Taylor, 2004; Socransky & Haffajee, 2005), y recientemente se ha asociado la presencia de ciertos virus (Socransky & Haffajee, 2005); dentro de los cuales destacan el HSV, HCMV y EBV (Contreras et al., 1999; Contreras et al., 2000b; Kamma et al., 2001; Saygun et al., 2004). Si bien se sabe que la presencia de HSV, HCMV y EBV no es el factor etiológico directo de la enfermedad periodontal, éstos podrían agravar su curso y pronóstico (Bilder, Elimelech, Szwarcwort-Cohen, Kra-Oz, & Machtei, 2003; Escalona & Limonchy, 2009; Slots, 2004).

Se sugiere que distintos virus tipo Herpes, incluyendo los mencionados anteriormente, podrían contribuir en el inicio y progresión de la enfermedad

(Escalona & Limonchy, 2009; Grenier et al., 2009; Kamma & Slots, 2003; Slots, 2004). Uno de los autores reconocido por sus numerosas investigaciones al respecto, Jorgen Slots (2015), ha identificado una alta prevalencia de los virus Citomegalovirus Humano, virus Herpes Simple y virus Epstein-Barr en la enfermedad periodontal crónica. Según Escalona & Limonchy (2009), los virus Herpes actúan de manera directa sobre fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales y células inflamatorias, incluyendo leucocitos polimorfonucleares (PMN), linfocitos B y T, macrófagos y posiblemente células óseas, modificando el recambio y reparación de los tejidos periodontales. Además, se ha demostrado que el surco gingival o saco periodontal actúa como un reservorio para las infecciones herpéticas dentro de los períodos de recurrencia de la misma (Slots, 2010b).

Se ha descrito que uno de los mecanismos de acción de estos virus es a través de la infección de los linfocitos B del periodonto, alterando la respuesta inmune periodontal y predisponiendo a la proliferación de bacterias periodontopatógenas (Escalona & Limonchy, 2009; Rotola et al., 2008; Slots, 2004). Asimismo, tienen la habilidad de multiplicarse en el tejido gingival proponiendo un posible efecto citopático en algunas células del periodonto como lo son los fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales y células proinflamatorias como los PMN, linfocitos y macrófagos (Tyler & Fields, 1996), reduciendo la capacidad de los tejidos periodontales de resistir una invasión bacteriana (Michalowicz, Ronderos, Cámara-Silva, Contreras, & Slots, 2000a; Teughels et al., 2007). Otro mecanismo de acción de estos virus sería por medio de receptores presentes en su superficie, que una vez activados promueven la colonización y agregación bacteriana de periodontopatógenos subgingivales (Mackowiak, Marling-Carson, Smith, & Luby, 1984).

Respecto a esta enfermedad y su interacción con las bacterias periodontopatógenas, diversos estudios indican una directa relación entre el virus Herpes y periodontopatógenos específicos (Contreras et al., 1999; Chalabi, Moghim, Mogharehabet, Najafi, & Rezaie, 2008; Hernández et al., 2016; Imbronito et al., 2008; Wu et al., 2007; Rotola et al., 2008; Saygun et al., 2008; Slots, 2010b). Se ha asociado la presencia del virus con un aumento en el número de bacterias asociadas a la enfermedad periodontal, tales como: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescus*, *Actinobacillus actinomycetecomitans*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia* (Escalona & Limonchy, 2009; Pérez & Castillo, 2011; Slots, 2002; Slots, 2006). La activación de estos virus resulta en la supresión del sistema inmune de los tejidos periodontales, el sobrecrecimiento de los microorganismos subgingivales y una mayor liberación de citoquinas y quimioquinas, iniciándose una cascada de eventos citotóxicos o inmunopatológicos, que producirían la destrucción de los tejidos periodontales (Escalona & Limonchy, 2009).

Debido a lo expuesto anteriormente es que distintos autores sugieren que la destrucción periodontal podría estar asociada a distintos factores, entre ellos la presencia de estos virus en el periodonto, la presencia de bacterias periodontopatógenas y a la alterada respuesta inmune del hospedero (Nishihara & Koseki, 2004; Slots, Kamma, & Sugar, 2003; Slots, 2010b).

Se puede entonces desprender de los estudios mencionados que existe una alta prevalencia del virus Herpes en la enfermedad periodontal (Feller et al., 2007; Foglio-Bonda et al., 2010; Ling, Ho, Wu, Chen, & Hung, 2003). Se ha demostrado que los pacientes que presentan coinfección de dos o tres tipos de virus Herpes manifestaron una destrucción periodontal significativamente mayor que los pacientes que contenían uno o ningún tipo de virus Herpes (Contreras

et al., 1999; Contreras, Botero, & Slots, 2013; Das, Krithiga, & Gopalakrishnan, 2012; Saygun et al., 2004; Wu, Yan, Chen, Sun, & Gu, 2006), por lo que se cree que este virus, más las bacterias mencionadas, pueden producir un efecto patogénico mayor que la suma individual de estos mismos, por lo que la coinfección puede aumentar la complejidad del estado clínico del paciente aumentando la profundidad de sondaje, pérdida de inserción clínica y sangrado gingival (Chalabi et al., 2010; Contreras et al., 1999; Imbronito et al., 2008; Kubar, Saygun, Ozdemir, Yapar, & Slots, 2005; Mackowiak et al., 1984; Slots, 2010b).

## **V. OBJETIVOS**

### **1. Objetivo general**

- Describir el rol del virus Herpes EBV, HCMV y HSV en la progresión y severidad de la enfermedad periodontal en pacientes adultos y sistémicamente sanos.

### **2. Objetivos específicos**

- I. Definir enfermedad periodontal y virus Herpes EBV, HCMV y HSV.
- II. Establecer la patogénesis de la enfermedad periodontal y virus Herpes en el hospedero.
- III. Analizar la repuesta del hospedero frente a la enfermedad periodontal y los distintos tipos de virus Herpes.
- IV. Evaluar la relación existente entre enfermedad periodontal y familia Herpesviridae, específicamente EBV, HCMV y HSV, en pacientes adultos sistémicamente sanos.

- V. Observar la prevalencia de EBV, HCMV y HSV en pacientes adultos con periodontitis crónica y sistémicamente sanos, según lo descrito en los estudios seleccionados.

## **VI. HIPÓTESIS**

La presencia del virus Herpes en los tejidos periodontales de pacientes adultos sistémicamente sanos con periodontitis crónica, influyen en la progresión y severidad de ésta.

## **VI. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

Si bien la etiopatogenia de la enfermedad periodontal está bien establecida, asegurando que las bacterias tienen protagonismo en el desarrollo de ésta (Grenier et al., 2009; Nishihara & Koseki, 2004; Nunn, 2004; Papone et al., 2015; Seymour & Taylor, 2004; Slots, 2006), aún no se esclarece la posible acción de otros microorganismos en la etiología y progresión de la enfermedad periodontal (Ambili, Preeja, Archana, Nisha, & Seba, 2014). Debido a esta incertidumbre es que en la década del 90 se llevaron a cabo diversos estudios que consideraban a los virus como posibles coadyuvantes de las bacterias en la etiología y progresión de la enfermedad periodontal (Ambili et al., 2014; Bilder et al., 2013; Contreras & Slots, 1996; Escalona & Limonchy, 2009; Grenier et al., 2009; Kamma & Slots, 2003; Parra & Slots, 1996; Slots, 2004; Slots, 2015).

Debido a lo anteriormente descrito, es que se determina realizar una investigación y análisis de la bibliografía especializada existente sobre la posible contribución de estos virus en la periodontitis crónica, enfocándose

principalmente en el Citomegalovirus (HCMV), virus Epstein Barr (EBV) y virus Herpes Simple (HSV) (Contreras et al., 1999; Contreras et al., 2000b; Saygun et al., 2004).

El tratamiento convencional de la periodontitis está enfocado en la eliminación del factor etiológico a través de la terapia mecánica no quirúrgica, el biofilm (Adriaens P. & Adriaens L., 2005; Oda, Nitta, Setoguchi, Izumi, & Ishikawa, 2004). Los resultados de esta investigación pueden llevar a proponer un nuevo enfoque en el tratamiento periodontal, apuntando no sólo a las bacterias sino también a los virus.

## **VII. MÉTODOS DE ESTUDIO**

Considerando que la presente tesis es un estudio estadístico descriptivo retrospectivo, tomará como base para desarrollar sus objetivos principalmente artículos científicos publicados en revistas especializadas en el área de la Odontología. Serán seleccionados aquellos artículos que consideren todos los puntos señalados a continuación, o la mayoría de ellos.

### **1. Diseño de estudio**

#### **1.1 Estudios Descriptivos**

Estudio epidemiológico observacional que busca especificar las propiedades, características y perfiles de personas, grupos, comunidades, procesos, objetos o cualquier otro fenómeno que se someta a un análisis, es decir, únicamente pretende recoger información de manera independiente o conjunta sobre los

conceptos o variables que se relacionan (Hernández, Fernández, & Baptista, 2010; Manterola & Otzen, 2014; Veiga de Cabo, Fuente, & Zimmermann, 2008).

## **1.2 Estudios de Casos y Controles**

Estudio epidemiológico observacional analítico no experimental y retrospectivo, que determina si existe asociación entre un desenlace conocido y la exposición a un determinado factor de riesgo, seleccionando a los individuos que padecen la enfermedad (casos) y a individuos libres del evento (controles). Se selecciona este tipo de estudio para determinar si la exposición está asociada a una aparición aumentada o disminuida del resultado de interés, en este caso el virus Herpes y la enfermedad periodontal (Hernández et al., 2010; Hernández, Garrido, & López, 2000; Manterola & Otzen, 2014; Veiga de Cabo, Fuente, & Zimmermann, 2008).

## **2. Sujetos de estudio**

### **2.1 Criterios de inclusión:**

1. Pacientes sistémicamente sanos.
2. Pacientes adultos, mayores de 18 años de edad.
2. Pacientes con diagnóstico de periodontitis crónica.

### **2.2 Criterios de exclusión:**

1. Pacientes sistémicamente comprometidos.
2. Mujeres embarazadas.

3. Fumadores.
4. Pacientes que hayan recibido tratamiento antiviral y/o con antibióticos los últimos 3 meses previos al estudio.
5. Pacientes que hayan recibido tratamiento periodontal en los últimos 3 meses previos al estudio.

### **3. Variables**

#### **3.1 Variable dependiente**

**Tabla 1. Variable dependiente, Periodontitis crónica**

<b>Periodontitis crónica</b>	
<b>Definición conceptual</b>	Enfermedad inmunoinflamatoria inducida por biofilm, caracterizada por la inflamación de los tejidos de soporte dentario (Moreno & Contreras, 2013; Nunn, 2004; Papone et al., 2015), la formación de sacos periodontales, reabsorción ósea marginal y consecuente pérdida dentaria (Kinane & Bartold, 2007; Nunn, 2004; Pinto et al., 2016).
<b>Definición operacional</b>	Medición de 6 sitios por diente con una sonda periodontal milimetrada (Carolina del Norte y/o Williams Goldman Fox), considerando los sitios que posean una profundidad de sondaje $\geq 4\text{mm}$ y pérdida de inserción clínica $\geq 1\text{mm}$ ; clasificando la enfermedad en generalizada ( $\geq 30\%$ de los sitios) y

	<p>localizada (&lt; 30% de los sitios) (Armitage, 2004; Botero &amp; Bedoya, 2010). La severidad de la enfermedad es clasificada en:</p> <p><b>Leve:</b> 1-2mm de pérdida de inserción clínica.</p> <p><b>Moderada:</b> 3-4mm de pérdida de inserción clínica.</p> <p><b>Severa:</b> ≥ 5mm de pérdida de inserción clínica (Armitage, 2004).</p>
Escala de medición	Cualitativa ordinal.

### 3.2 Variables independientes

**Tabla 2. Variable independiente, virus Herpes**

<b>Virus Herpes:</b>	Virus Herpes Simple tipo I (HSV), Citomegalovirus Humano (HCMV), virus Epstein Barr (EBV).
Definición conceptual	<p><b>HSV:</b> Virus perteneciente a la subfamilia Alfa (Bascones &amp; Pousa, 2011; Escalona &amp; Limonchy, 2009; Echeverría et al., 2007; Perea et al., 2006), de gran tamaño y neurotrópico. Actúa a través de la lisis celular (Bascones &amp; Pousa, 2011; Perea et al., 2006).</p> <p><b>EBV:</b> Virus de la familia del subgrupo Gamma (Bascones &amp; Pousa, 2011; Escalona &amp; Limonchy,</p>

	<p>2009, Echeverría et al., 2007; Perea et al., 2006). Es encapsulado, de doble cadena de ADN y presenta una envoltura lipoproteica con glicoproteínas en su interior que son proyectadas hacia el exterior (Rickinson &amp; Kieff, 2007).</p> <p><b>HCMV:</b> Virus de la familia del subgrupo Beta (Bascones &amp; Pousa, 2011; Escalona &amp; Limonchy, 2009; Echeverría et al., 2007; Perea et al., 2006). Posee una membrana lipoproteica en su parte más externa con proyección de glicoproteínas desde su interior (Bascones &amp; Pousa, 2011; Villalba &amp; Valdés, 2000; Staras et al., 2008).</p>
Definición operacional	Analizados a través de la técnica PCR: Técnica de laboratorio que permite obtener <i>in vitro</i> millones de copias de un fragmento corto de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula (Villegas, Sánchez, & Chuaire, 2009).
Escala de medición	Cualitativa nominal.

**Tabla 3. Variable independiente, periodontopatógenos**

<b>Periodontopatógenos:</b>	<i>Treponema denticola (Td)</i> , <i>Porphyromona gingivalis (Pg)</i> , <i>Tannerella forsythia (Tf)</i> , <i>Agreggatibacter actinomycetemcomitans (Aa)</i> , <i>Fusobacterium nucleatum (Fn)</i> , <i>Porphyromona</i>
-----------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

*nigrescens (Pn), Prevotella intermedia (Pi).*

Definición conceptual	Grupo de bacterias anaerobias Gram negativas presentes en los sacos periodontales relacionadas con el inicio y progresión de la enfermedad periodontal (Ishikawa, 2007; Killian et al., 2006; Medina My, Medina Ma, & Merino, 2010; Nunn, 2004).
Definición operacional	Medición a través de PCR tiempo real: Permite la cuantificación de ADN Y ARN mensajero de bacterias de manera rápida y efectiva (Medina et al., 2010; Tarasevich, Shaginyan & Mediannikov, 2003).
Escala de medición	Cuantitativa discreta.

**Tabla 4: Variable independiente, células proinflamatorias**

<b>Células proinflamatorias:</b>	Linfocitos B, linfocitos T, macrófagos, polimorfonucleares, osteoclastos, natural killer.
Definición conceptual	<b>Neutrófilos, macrófagos y natural killer:</b> Conjunto de células del sistema inmune innato capaces de reconocer componentes de microorganismos y participar en la eliminación de éstos y de células infectadas y/o dañadas (Bascones & González, 2003; García, 2008; Cotran, Kumar, Collins, & Robbins, 2010; Barbieri,

	<p>Flores, &amp; Vignoletti, 2005).</p> <p><b>Linfocitos B y T:</b> Conjunto de células del sistema inmune adaptativo capaces de reconocer un gran conjunto de sustancias extrañas, además de componentes de microorganismos (Bascones &amp; González, 2003; Cotran et al., 2010; Prieto, Barbaroja, Barcenilla, &amp; Díaz, 2013).</p> <p><b>Osteoclastos:</b> Células gigantes multinucleadas que tienen como función principal la degradación de la matriz ósea, liberación de factores de crecimiento, entre otros (Cotran et al., 2010; Fernández, Cordero, &amp; Córdoba, 2002; Moreno &amp; Contreras, 2013).</p>
Definición operacional	Estudios inmunohistoquímicos e histopatológicos de las distintas muestras (Cotran et al., 2010).
Escala de medición	Cuantitativa discreta.

**Tabla 5: Variable independiente, enzimas**

<b>Enzimas:</b>	Metaloproteinasas de la matriz (MMP).
Definición conceptual	Enzima perteneciente a una familia de endopeptidasas zinc-dependientes que intervienen en los procesos fisiológicos de cicatrización y diversas condiciones patológicas, como inflamación, enfermedades autoinmunes y

	carcinogénesis. Tiene como principal función la degradación de la matriz extracelular entre otras (Bascones & González, 2003; Cotran et al., 2010; Fernández et al., 2002).
Definición operacional	Estudios inmunohistoquímicos e histopatológicos de las distintas muestras (Cotran et al., 2010).
Escala de medición	Cuantitativa discreta.

**Tabla 6: Variable independiente, Citoquinas proinflamatorias**

<b>Citoquinas proinflamatorias:</b>	Interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 4 (IL-4), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 8 (IL-8), interleuquina 10 (IL-10) y factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).
Definición conceptual	Moléculas de bajo peso molecular que actúan como mediadores de acción corta para conducir la respuesta inmune específica hacia el sitio de la lesión (Barros de Oliveira, Kimiko, Machado, & Salomão, 2011; Nishihara & Koseki, 2004). Del punto de vista molecular, estas median la comunicación entre linfocitos (Bascones & González, 2003; Cotran et al., 2010; Fernández et al., 2002).
Definición operacional	Estudios inmunohistoquímicos e histopatológicos

	de las distintas muestras (Cotran et al., 2010).
Escala de medición	Cuantitativa discreta.

**Tabla 7: Variable independiente, Parámetros clínicos**

<b>Parámetros clínicos:</b>	Profundidad de sondaje (PS), pérdida de inserción clínica (PIC), sangrado al sondaje (SS).
Definición conceptual	<p><b>PS:</b> Distancia en milímetros desde la punta de la sonda periodontal hasta el margen gingival.</p> <p><b>PIC:</b> Distancia en milímetros desde la punta de la sonda hasta el límite amelocementario.</p> <p><b>SS:</b> Parámetro clínico considerado un indicador de inflamación gingival (Botero &amp; Bedoya, 2010; Escudero, Perea, &amp; Bascones, 2008).</p>
Definición operacional	<p><b>PS y PIC:</b> Medición de 6 sitios por diente con una sonda periodontal milimetrada (Carolina del Norte y/o Williams Goldman Fox), considerando los sitios que posean una profundidad de sondaje <math>\geq 4\text{mm}</math> y pérdida de inserción clínica <math>\geq 1\text{mm}</math>; clasificando la enfermedad en generalizada (<math>\geq 30\%</math> de los sitios), y localizada (<math>&lt; 30\%</math> de los sitios) (Armitage, 2004; Botero &amp; Bedoya, 2010). La severidad de la enfermedad es clasificada en:</p>

	<p><b>Leve:</b> 1-2mm de pérdida de inserción clínica.</p> <p><b>Moderada:</b> 3-4mm de pérdida de inserción clínica.</p> <p><b>Severa:</b> <math>\geq</math> 5mm de pérdida de inserción clínica (Armitage, 2004).</p> <p><b>SS:</b> Se realiza a través del sondaje de 6 sitios por diente, estableciendo cuáles de estos sangran al ser sondeados. Luego se realiza la suma total de los sitios sangrantes dividido por el total de sitios examinados, multiplicándolo por 100 para obtener el porcentaje de sangrado (Botero &amp; Bedoya, 2010; Escudero et al., 2008).</p>
Escala de medición	<p>PS y PIC: Cuantitativa continua.</p> <p>SS: Cualitativa nominal.</p>

#### **4. Tipos de intervenciones**

El principal método seleccionado para la extracción del virus Herpes es a través de tiras o cintas de papel, curetas y biopsias de tejido gingival. Las muestras analizadas para la detección del Herpesviridae son saliva, biofilm subgingival y fluido crevicular (Botero, Parra, Jaramillo, & Contreras, 2007; Bullón, 2004; Wu et al., 2006). El método de análisis de estas muestras se realiza en base a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes: PCR anidada o doble, PCR convencional, PCR cuantitativa en tiempo real y PCR

múltiple (Anexo II) (Dawson, Wang, Danaher, Lin, Kryscio, Jacob, & Miller, 2009a; Imbronito et al., 2008; Rotola et al., 2008; Soetens et al., 2016).

Esta técnica de análisis es generalmente seleccionada debido a su rapidez de ejecución y resultados, a su fidelidad evitando falsos positivos y/o negativos, a su alta sensibilidad requiriendo una cantidad mínima para la amplificación de la muestra de ADN, y a su especificidad (Arnhein & Erlich, 1992; Erlich, 1991; Harris, 1997; Mullis & Faloona, 1987), obteniendo un solo producto amplificado. Esto lo convierte en uno de los mejores métodos para la detección del virus Herpes (Dawson et al., 2009a; Imbronito et al., 2008; Rotola et al., 2008; Soetens et al., 2016).

#### **4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

El PCR convencional es una técnica de laboratorio que permite obtener *in vitro* millones de copias de un fragmento corto de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula. Está basada en la replicación celular en la que actúan varias proteínas (enzimas) para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde (Socransky & Haffajee, 2005; Villegas et al., 2009). Este proceso se realiza en un termociclador mediante ciclos alternados de temperaturas altas y bajas (Bartlett & Stirling, 2003; Saiki et al., 1988). El PCR consta de distintos componentes y etapas descritas a continuación (Bartlett & Stirling, 2003; Neumaier, Braun, & Wagener, 1998; Saiki et al., 1988; Socransky & Haffajee, 2005; Tamay de Dios, Ibarra, & Velasquillo, 2013; Villegas et al., 2009).

#### **4.1.1 Componentes del PCR**

- a) Desoxinucleótido trifosfato: Mezcla de desoxinucleótidos que sirven de sustrato para la síntesis del nuevo ADN (Bartlett & Stirling, 2003; Neumaier et al., 1998; Saiki et al., 1988; Tamay de Dios et al., 2013).
- b) Iniciadores o primers: Oligonucleótidos con una secuencia conocida y corta que son complementarios a una de las dos hebras del ADN. Estos son reconocidos por la polimerasa permitiendo iniciar la reacción (Bartlett & Stirling, 2003; Neumaier et al., 1998; Saiki et al., 1988; Tamay de Dios et al., 2013).
- c) ADN polimerasa: Enzima encargada de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco. En el caso del PCR la polimerasa adecuada es la TAQ ADN polimerasa, enzima bacteriana termófila utilizada por soportar altas temperaturas, permitiendo que esta siga activa incluso después de la desnaturalización del ADN. (Bartlett & Stirling, 2003; Neumaier et al., 1998; Saiki et al., 1988; Tamay de Dios et al., 2013).
- d) ADN molde: Secuencia de ADN que se utiliza como sustrato para la amplificación (Bartlett & Stirling, 2003; Neumaier et al., 1998; Saiki et al., 1988; Tamay de Dios et al., 2013).

#### **4.1.2 Etapas del PCR**

- a) Desnaturalización: En esta etapa las hebras de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95° C durante 20-30 segundos (Bartlett & Stirling, 2003; Saiki et al., 1988; Tamay de Dios et al., 2013).

- b) Hibridación: Los iniciadores o primers se unen a una de las hebras de ADN previamente separadas e hibridan con su secuencia complementaria. En esta etapa, la temperatura baja a 50-60° C durante 20-40 segundos (Bartlett & Stirling, 2003; Saiki et al., 1988; Tamay de Dios et al., 2013).
- c) Extensión: La Taq polimerasa actúa sobre el complejo del primer con su hebra complementaria generando la extensión de éste (Poggi, Guzmán, García, & Lagos, 2009; Slots, 2006). Esto se realiza a una temperatura de 74° C (Bartlett & Stirling, 2003; Saiki et al., 1988; Tamay de Dios et al., 2013).

A través de estas etapas se logra una amplificación exponencial que permite identificar con una alta probabilidad el virus en cuestión (Villegas et al., 2009; Slots, 2006).

La reacción de cadena polimerasa (PCR) permite la detección del virus Herpes en muestras tales como: Saliva, fluido crevicular gingival, biofilm bacteriano subgingival, tejidos gingivales, orina, sangre y líquido cefaloraquídeo (Botero et al., 2007; Odumade, Hogquist, & Balfour, 2011; Slots, 2006). Esta técnica al ser cualitativa sólo detecta lo que se requiere estudiar, lo que hace el proceso más rápido y eficiente (Imbronito et al., 2008; Slots, 2006).

#### **4.1.3 Tipos de PCR**

Dentro de esta técnica se describen distintos tipos: PCR anidado o doble, PCR convencional, PCR en tiempo real y PCR múltiple (Dawson et al., 2009a; Imbronito et al., 2008; Rotola et al., 2008).

### **a) PCR convencional**

Es el PCR estándar descrito anteriormente. Su objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular a través de medios enzimáticos para detectar una secuencia específica de ADN y luego realizar un análisis detallado (Tarasevic et al., 2003; Slots, 2006).

### **b) PCR anidado o doble**

Esta técnica implica realizar dos ciclos de amplificaciones. El primer ciclo se lleva a cabo de manera similar a un PCR convencional y el segundo ciclo utiliza un par de iniciadores que amplifican una parte del fragmento amplificado anteriormente (Botero et al., 2007; Rotola et al., 2008). Dentro de las ventajas de esta técnica destaca el que es altamente sensible y específica, por lo que con un pequeño tamaño muestral se logra obtener un solo producto amplificado lo que puede servir de molde para futuras amplificaciones (Botero et al., 2007; Imbronito et al., 2008; Rotola et al., 2008).

### **c) PCR en tiempo real**

Es una variante del PCR que involucra detección de fluorescencia dentro de los termocicladores. La señal de fluorescencia permite visualizar directamente el ADN amplificado (Kubista et al., 2006; Slots, 2006). Por lo tanto, esta técnica acopla la amplificación de ADN y la detección en un solo ensayo (Crockett & Wittwer, 2001; Espy et al., 2006) permitiendo la cuantificación de los productos amplificados (Kubista et al., 2006; Slots, 2006). Dentro de las ventajas de esta técnica es que no es necesario el análisis post PCR como en el PCR

convencional. Además, al realizarse en un sistema cerrado disminuye el riesgo de contaminación previniendo falsos positivos. Es una técnica rápida, debido a que los resultados se obtienen a los 30-40 minutos. Otra de las ventajas es que la capacidad de los equipos que realizan la técnica permite rentabilizar las muestras, aumentando el flujo de éstas (Espy et al., 2006; Kubista et al., 2006).

#### **d) PCR múltiple**

Esta variante permite detectar varios virus al mismo tiempo, debido a que se pueden amplificar distintas regiones, incorporando todos los primers necesarios en una sola reacción, utilizando menor cantidad de ADN molde para el análisis (Das et al., 2012; Elnifro, Ashshi, Cooper, & Klapper, 2000; Santangelo et al., 2004; Tanaka et al., 2009).

#### **4.1.4 Limitaciones del PCR**

La principal desventaja de esta técnica es el manejo de posibles contaminantes, exigiendo condiciones de asepsia estrictas (Gibbs, 1990; Slots, 2006). El bajo control de contaminantes puede causar efectos no concluyentes, lo cual deriva, por ejemplo, en resultados falsos positivos. Las muestras clínicas directas, en las cuales la cantidad de ADN es pequeña en comparación con otros tipos de muestras, requiere una alta prioridad en el manejo de contaminantes (Poggi et al., 2009; Slots, 2006). El delicado procedimiento genera un estándar para cada uno de los organismos de interés a muestrear, causando un alto costo, además de una gran dificultad de realización (Villegas et al., 2009; Slots, 2006).

## 5. Análisis estadístico

Las variables consideradas en la matriz de datos (Anexo I) serán analizadas cualitativa y cuantitativamente, según corresponda. No obstante en algunas de ellas se utilizará la triangulación que mezcla datos cualitativos y cuantitativos (Hernández et al., 2006, Hernández et al., 2010; Okuda & Gómez, 2005). Se realizará un análisis estadístico descriptivo mediante las siguientes medidas de tendencia central, dispersión y correlación:

**Tabla 8. Análisis Estadístico Descriptivo**

<b>Media</b>	Número obtenido al dividir la suma de todos los valores de la variable entre el número total de observaciones (Hernández et al., 2010; Espejo, Fernández, López, Muñoz, Rodríguez, Sánchez, & Valero, 2009; Fernández et al., 2002; Madrid & Martínez, 2014).
<b>Mediana</b>	Distribución de frecuencias con los valores ordenados de menor a mayor; la mediana corresponde al valor central (Hernández et al., 2010; Espejo et al., 2009; Fernández et al., 2002; Madrid & Martínez, 2014).
<b>Moda</b>	Valor de la variable que más veces se repite, por lo tanto, la mayor frecuencia

absoluta en la distribución (Hernández et al., 2010; Espejo et al., 2009; Fernández et al., 2002; Madrid & Martínez, 2014).

**Desviación estándar**

Medida de dispersión que se define como la raíz cuadrada de la varianza (Hernández et al., 2010; Espejo et al., 2009; Fernández et al., 2002; Madrid & Martínez, 2014).

**Varianza de la muestra**

El cuadrado de la desviación estándar (Hernández et al., 2010; Espejo et al., 2009; Fernández et al., 2002; Madrid & Martínez, 2014).

**Coefficiente de variación**

Medida de dispersión relativa que indica la relación existente entre la desviación estándar de una muestra y su media (Hernández et al., 2010; Espejo et al., 2009; Fernández et al., 2002; Madrid & Martínez, 2014).

**Amplitud**

Diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo observado (Hernández et al., 2010; Espejo et al., 2009; Fernández et al., 2002; Madrid & Martínez, 2014).

---

**Mínimo** Valor mínimo encontrado (Hernández, et al., 2010; Espejo et al., 2009; Fernández et al., 2002; Madrid & Martínez, 2014)

**Máximo** Valor máximo encontrado (Hernández et al., 2010; Espejo et al., 2009; Fernández et al., 2002; Madrid & Martínez, 2014).

**BoxPlot** Gráfico asociado a los cuartiles. Consiste en un eje en donde se ubican: mínimo, cuartil 1, mediana, cuartil 3, máximo (Hernández et al., 2010; Espejo et al., 2009; Fernández et al., 2002; Madrid & Martínez, 2014).

**Summary** Tabla resumen mediante la cual se muestra el dato mínimo, primer cuartil, mediana, media, tercer cuartil y dato máximo (Hernández et al., 2010; Espejo et al., 2009; Fernández et al., 2002; Madrid & Martínez, 2014).

**Correlación** Determina la relación o dependencia que existe entre las dos variables que intervienen en una distribución bidimensional (Hernández et al., 2010;

---

---

Espejo et al., 2009; Fernández et al., 2002; Madrid & Martínez, 2014).

---

## **6. Métodos de búsqueda para la identificación de estudios:**

### **6.1 Búsquedas electrónicas**

La presente investigación es realizada en base a estudios encontrados en:

- Metabuscadores: PUBMED/MEDLINE, SCIELO, EBSCO, y TRIP DATABASE.
- Utilizando los términos descriptores MeSH y frases de búsquedas descritas a continuación.
  - Herpes virus AND periodontitis
  - Herpes virus AND chronic periodontitis NOT aggressive
  - EBV AND chronic periodontitis
  - HCMV AND chronic periodontitis
  - HVS AND chronic periodontitis

Los criterios de discriminación entre estudios, para efectos de vigencia y relevancia de la investigación, fueron los siguientes:

- Estudios realizados a partir del año 2000, debido al cambio efectuado en la clasificación de las enfermedades periodontales en el *Workshop* del año 1999.

- Estudios realizados en humanos adultos.

El flujograma de la metodología de búsqueda en cada metabuscador se expone en la Figura 1, 2, 3 y 4.

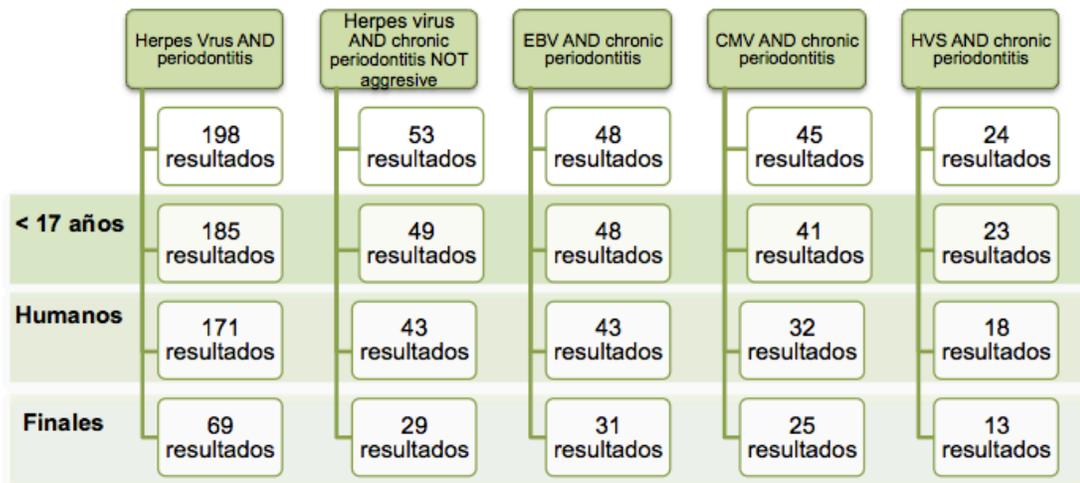


Figura 1. Flujograma búsqueda PubMed

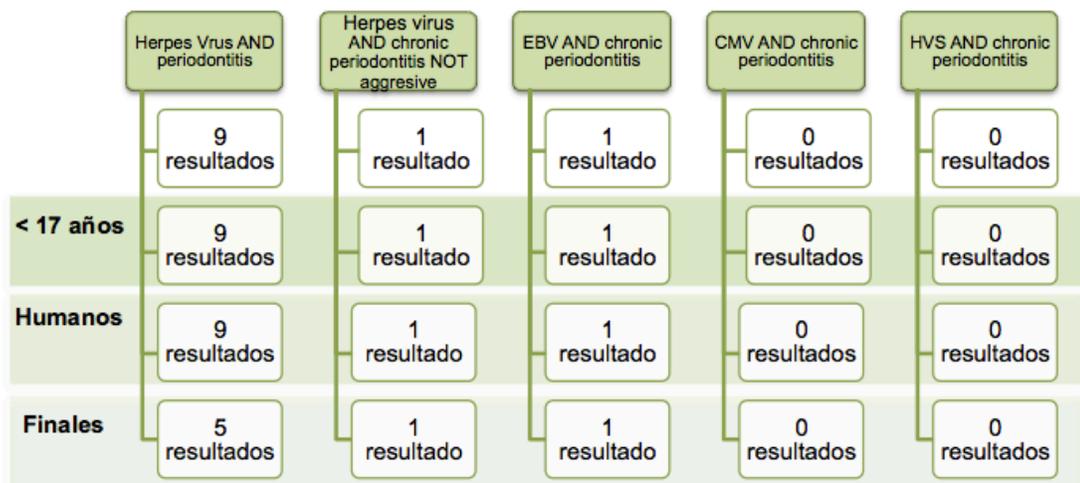


Figura 2. Flujograma búsqueda Scielo

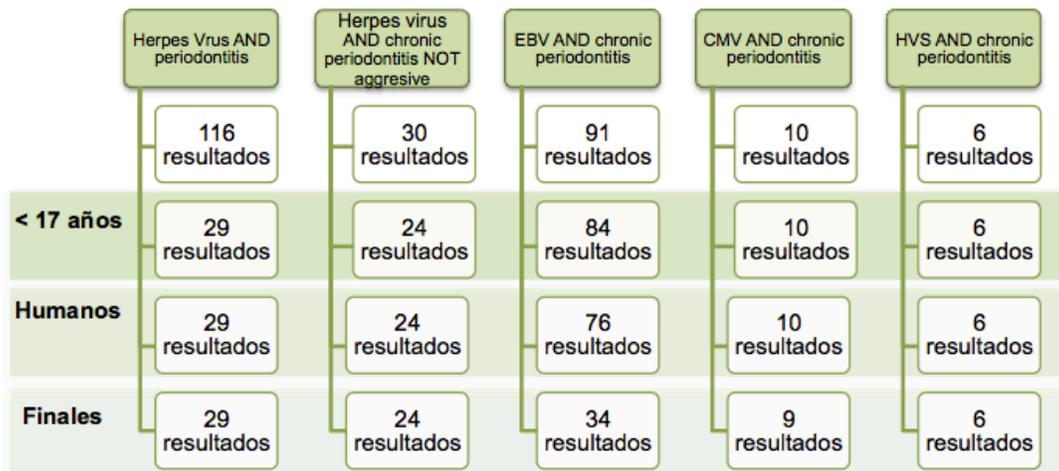


Figura 3. Flujoograma búsqueda EBSCO

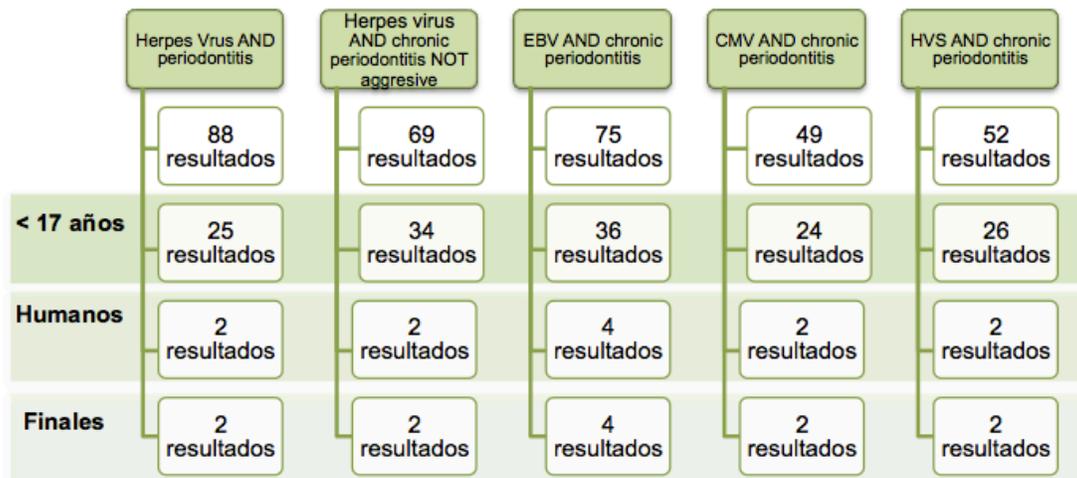


Figura 4. Flujoograma búsqueda TRIP DATABASE

## 7. Extracción de datos y análisis

### 7.1 Pauta STROBE

Para evaluar la calidad de los artículos seleccionados se utiliza la pauta STROBE (Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology). Esta consiste en una lista compuesta por 22 puntos que se consideran esenciales para una comunicación adecuada de estos estudios. Estos puntos se refieren a diversos aspectos de los artículos, como el título y el resumen, la introducción, la metodología, los resultados y la discusión, así como otros apartados relevantes (Von Elm, Douglas, Altmanb, Stuart, & Jan, 2007).

**Tabla 9. Declaración STROBE: lista de puntos esenciales que deben describirse en la publicación de estudios observacionales**

Título y resumen	Punto	Recomendación.
	1	(a) Indique, en el título o en el resumen, el diseño del estudio con un término habitual.  (b) Proporcione en el resumen una sinopsis informativa y equilibrada de lo que se ha hecho y lo que se ha encontrado.
<b>Introducción</b> Contexto/fundamentos	2	Explique las razones y el fundamento científicos de la investigación que se comunica.

Objetivos	3	Indique los objetivos específicos, incluida cualquier hipótesis pre-especificada.
<b>Métodos</b>		
Diseño del estudio	4	Presente al principio del documento los elementos clave del diseño del estudio.
Contexto	5	Describa el marco, los lugares y las fechas relevantes, incluido los períodos de reclutamiento, exposición, seguimiento y recogida de datos.
Participantes	6	<p>(a) Estudios de cohortes: Proporcione los criterios de elegibilidad, así como las fuentes y el método de selección de los participantes. Especifique los métodos de seguimiento. Estudios de casos y controles: Proporcione los criterios de elegibilidad, así como las fuentes y el proceso diagnóstico de los casos y el de selección de los controles. Proporcione las razones para la elección de casos y controles. Estudios transversales: Proporcione los criterios de elegibilidad y las fuentes y métodos de selección de los participantes.</p> <p>(b) Estudios de cohortes: En los estudios apareados, proporcione los criterios para la formación de parejas y el número de participantes con y sin exposición.</p>

		Estudios de casos y controles: En los estudios apareados, proporcione los criterios para la formación de las parejas y el número de controles por cada caso.
<b>Variabes</b>	7	Defina claramente todas las variables: De respuesta, exposiciones, predictoras, confusoras y modificadoras del efecto. Si procede, proporcione los criterios diagnósticos.
<b>Fuentes de datos/medidas</b>	8	Para cada variable de interés, proporcione las fuentes de datos y los detalles de los métodos de valoración (medida). Si hubiera más de un grupo, especifique la comparabilidad de los procesos de medida.
<b>Sesgos</b>	9	Especifique todas las medidas adoptadas para afrontar fuentes potenciales de sesgo.
<b>Tamaño muestral</b>	10	Explique cómo se determinó el tamaño muestral.
<b>Variabes cuantitativas</b>	11	Explique cómo se trataron las variables cuantitativas en el análisis. Si procede, explique qué grupos se definieron y por qué.
<b>Métodos estadísticos</b>	12	(a) Especifique todos los métodos estadísticos, incluidos los empleados para controlar los factores de confusión.  (b) Especifique todos los métodos utilizados

		<p>para analizar subgrupos e interacciones.</p> <p>(c) Explique el tratamiento de los datos ausentes (missing data).</p> <p>(d) Estudio de cohortes: Si procede, explique cómo se afrontan las pérdidas en el seguimiento.</p> <p>Estudios de casos y controles: Si procede, explique cómo se aparearon casos y controles.</p> <p>Estudios transversales: Si procede, especifique cómo se tiene en cuenta en el análisis la estrategia de muestreo.</p> <p>(e) Describa los análisis de sensibilidad.</p>
<p><b>Resultados</b></p> <p>Participantes</p>	<p>13*</p>	<p>(a) Describa el número de participantes en cada fase del estudio; por ejemplo: Cifras de los participantes potencialmente elegibles, los analizados para ser incluidos, los confirmados elegibles, los incluidos en el estudio, los que tuvieron un seguimiento completo y los analizados.</p> <p>(b) Describa las razones de la pérdida de participantes en cada fase.</p>

<p>Datos descriptivos</p>	<p>14*</p>	<p>(c) Considere el uso de un diagrama de flujo.</p> <p>(a) Describa las características de los participantes en el estudio (p. ej., demográficas, clínicas, sociales) y la información sobre las exposiciones y los posibles factores de confusión.</p> <p>(b) Indique el número de participantes con datos ausentes en cada variable de interés.</p> <p>(c) Estudios de cohortes: Resuma el período de seguimiento (p. ej., promedio y total).</p>
<p>Datos de las variables de resultado</p>	<p>15*</p>	<p>Estudios de cohortes: Describa el número de eventos resultado, o bien proporcione medidas resumen a lo largo del tiempo.</p> <p>Estudios de casos y controles: Describa el número de participantes en cada categoría de exposición, o bien proporcione medidas resumen de exposición.</p> <p>Estudios transversales: Describa el número de eventos resultado, o bien proporcione medidas resumen.</p> <p>Estudios transversales: Describa el número de eventos resultado, o bien proporcione medidas resumen.</p>

<b>Resultados principales</b>	16	<p>(a) Proporcione estimaciones no ajustadas y, si procede, ajustadas por factores de confusión, así como su precisión (p. ej., intervalos de confianza del 95%). Especifique los factores de confusión por los que se ajusta y las razones para incluirlos.</p> <p>(b) Si categoriza variables continuas, describa los límites de los intervalos.</p> <p>(c) Si fuera pertinente, valore acompañar las estimaciones del riesgo relativo con estimaciones del riesgo absoluto para un período de tiempo relevante.</p>
<b>Otros análisis</b>	17	Describa otros análisis efectuados (de subgrupos, interacciones o sensibilidad).
<b>Discusión</b>		
Resultados clave	18	Resuma los resultados principales de los objetivos del estudio.
Limitaciones	19	Discuta las limitaciones del estudio, teniendo en cuenta posibles fuentes de sesgo o de imprecisión. Razone tanto sobre la dirección como sobre la magnitud de cualquier posible sesgo.
Interpretación	20	Proporcione una interpretación global prudente de los resultados considerando objetivos,

Generabilidad	21	<p>limitaciones, multiplicidad de análisis, resultados de estudios similares y otras pruebas empíricas relevantes.</p> <p>Discuta la posibilidad de generalizar los resultados (validez externa).</p>
<b>Otra información</b> Financiación	22	<p>Especifique la financiación y el papel de los patrocinadores del estudio y, si procede, del estudio previo en el que se basa el presente artículo.</p>

## 7.2 Diagnóstico Periodontitis crónica

Para el análisis de datos, se considera el diagnóstico de Periodontitis crónica contemplando la medición de 6 sitios por diente, profundidad de sondaje  $\geq$  4mm, una pérdida de inserción clínica  $\geq$  1mm, clasificándose en generalizada si afecta a más del 30% de los sitios, y localizada si afecta a menos del 30% de los sitios (Armitage, 2004; Botero & Bedoya, 2010). Además, para evaluar la severidad se utiliza la clasificación de leve, moderada y severa descrita a continuación (Armitage, 2004).

**Leve:** 1-2mm de pérdida de inserción clínica (Armitage, 2004).

**Moderada:** 3-4mm de pérdida de inserción clínica (Armitage, 2004).

**Severa:**  $\geq$  5mm de pérdida de inserción clínica (Armitage, 2004).

### 7.3 Tablas de frecuencia

El método utilizado para la extracción de datos de los estudios seleccionados es mediante tablas de frecuencia, con el objetivo de realizar un análisis estadístico descriptivo.

#### 7.3.1 Tabla de frecuencia (ANEXO I)

#### 7.3.2 Tabla de materiales y métodos (ANEXO II)

#### 7.3.3 Tabla de prevalencia de los virus EBV, HCMV y HSV en pacientes con Periodontitis crónica (ANEXO III)

## VIII. PLANIFICACIÓN: Carta gantt

Para lograr los objetivos de esta investigación, considerando la planificación del tiempo y los lugares donde ésta se desarrolla, se realiza una carta gantt con las fechas y lugares estipulados de trabajo. Ésta se describe en la Figura 5.

<b>RELACIÓN ENTRE VIRUS HERPES Y PERIODONTITIS CRÓNICA EN ADULTOS SITÉMICAMENTE SANOS</b>																
Carolina Arancibia Herrera - Alejandra Bravo Lara - Paola Bustos Meriño - Karen Cabrera Canelo																
Meses	Marzo				Abril				Mayo				Junio			
Actividades / Semanas	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Búsqueda de artículos / Universidad Viña del Mar																
Selección de artículos/Universidad Viña del Mar																

Revisión de artículos/Universidad Viña del Mar		
Desarrollo Marco teórico/Universidad Viña del Mar		
Extracción de datos y análisis/Universidad Viña del Mar		
Término y presentación proyecto Tesis		

**Figura 5. Carta gantt**

## IX. RESULTADOS

### **1. Periodontitis crónica, virus Herpes y su patogénesis correspondiente**

#### **1.1 Definición de Periodontitis crónica**

De acuerdo a la literatura especializada, la enfermedad periodontal crónica se define como una enfermedad inmunoinflamatoria y multifactorial (Nunn, 2004; Papone et al., 2015) caracterizada por ser de evolución lenta (Papone et al., 2015), con formación de sacos periodontales, reabsorción ósea marginal y pérdida dentaria (Kinane & Bartold, 2007; Papone et al., 2015; Pinto et al., 2016). Ésta se inicia a partir del biofilm ubicado en el margen gingival (Kinane & Bartold, 2007; Moreno & Contreras, 2013; Papone et al., 2015; Pinto et al., 2016) y de periodontopatógenos específicos subgingivales (Moreno & Contreras, 2013; Nishihara & Koseki, 2004; Seymour & Taylor, 2004; Socransky & Haffajee, 2006). El sistema inmune del hospedero entrega una respuesta protectora para destruir a los periodontopatógenos, sin embargo, en ocasiones éste se ve afectado por el desafío bacteriano (Teng, 2006), modificando así su normal funcionamiento durante el curso de las reacciones inmunes, llevando finalmente a una respuesta destructiva para el hospedero (Teng, 2006). Clínicamente, este proceso se manifiesta en inflamación gingival, sangrado al

sondaje, pérdida de inserción clínica, aumento de la profundidad de sondaje, recesiones gingivales, formación de sacos periodontales y pérdida ósea a nivel radiográfico (Díaz et al., 2012; Moreno & Contreras, 2013).

### **1.1.1 Etiología y patogénesis de Periodontitis crónica**

Dentro de la etiología bacteriana clásica, se reconocen bacterias específicas, predominantemente Gram negativas y anaerobias estrictas, que juegan un rol fundamental en el inicio y progresión de esta enfermedad (Grenier et al., 2009; Papone et al., 2015). Según Pinto et al. (2016), existe una cantidad aproximada de 700 especies bacterianas en la cavidad oral, y aproximadamente 500 de éstas son capaces de formar el biofilm, que se define como una comunidad microbiana diversa embebida en una matriz de polímeros de origen bacteriano y salival ubicados en la superficie dentaria (Donlan & Costerton, 2002; Escalona & Limonchy, 2009; Haussler & Fuqua, 2013; Pinto et al., 2016). Entre otros factores, su presencia se hace indispensable para que la enfermedad periodontal crónica se inicie y permanezca en el tiempo (Donlan & Costerton, 2002; Slots, Kamma, & Sugar, 2003). Se sugiere que el biofilm cuenta con mecanismos específicos que podrían iniciar el progreso de la enfermedad periodontal y aumentar la resistencia de las bacterias frente al sistema inmune (Donlan & Costerton, 2002; Grenier et al., 2009; Nishihara & Koseki, 2004). Dentro de estos mecanismos estaría la producción de endotoxinas, agregación bacteriana, y el proveer un nicho para la creación de bacterias y microorganismos resistentes a los mecanismos de defensa del hospedero (Donlan & Costerton, 2002; Slots, Kamma, & Sugar, 2003; Slots, 2010).

Dentro de las bacterias específicas que jugarían un papel fundamental en esta enfermedad, es posible mencionar a *Treponema denticola* (*Td*), *Porphyromonas*

*gingivalis* (*Pg*) y *Tannerella forsythia* (*Tf*) (Escalona & Limonchy, 2009; Pérez et al., 2011; Socransky & Haffajee, 2006; Slots, 2002), además de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) y *Prevotella intermedia* (*Pi*), causando una respuesta inflamatoria por parte del hospedero (Escalona & Limonchy, 2009; Murakami, 2016; Pérez & Castillo, 2011; Slots, 2002; Slots, 2006).

Preshaw & Taylor (2011), describen la existencia de una infiltración de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias provenientes de las células epiteliales gingivales y fibroblastos, lo que genera una respuesta inflamatoria inicial que tiene como objetivo limitar la actividad bacteriana por medio de la llegada de macrófagos y neutrófilos al sitio afectado. Esta afirmación es corroborada por Murakami (2016), quien señala que dentro de la patogénesis de la enfermedad, la inflamación crónica promueve la infiltración de macrófagos (Murakami, 2016) que junto con los productos microbianos (Moreno & Contreras, 2013) inducen la formación continua de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  y IL-1, además de otros mediadores pro-inflamatorios como prostaglandinas E2 (PGE2), RANKL y metaloproteinasas (MMP) de la matriz encargadas de degradar la estructura del colágeno, especialmente la MMP-3, MMP-8 (Kirkwood, Cirelli, Rogers, & Giannobile, 2008; Moreno & Contreras, 2013; Murakami, 2016). Esto lleva a un aumento en la diferenciación y actividad de los osteoclastos, células involucradas en la destrucción del hueso alveolar (Murakami, 2016). Se ha descrito que las bacterias anteriormente mencionadas poseen mediadores osteolíticos que actúan directa o indirectamente en las células del hueso y que son responsables de un desequilibrio en el proceso de remodelación ósea (Moreno & Contreras, 2013; Slots, 2002).

Estudios recientes han asociado la presencia de Th17 en pacientes con periodontitis crónica (Chaudhari, Warad, Ashok, Baroudi, & Tarakji, 2016; Cheng et al., 2016). Además, estos demostraron un aumento de citoquinas e IL-

17 en muestras de fluido crevicular gingival, cuyo rol sería aumentar la inflamación de los tejidos periodontales (Chaudhari et al., 2016; Liukkonen, Gúrsoy, Suominen, & Kononen, 2012). Paralelamente, Cheng et al. (2016) realizaron un estudio en el cual se vinculó a los linfocitos Th17 con la patogénesis de la enfermedad periodontal; señalando que su participación sería a través de la vía Th17/IL17.

Al respecto, Chaudhari et al. (2016) realizaron un estudio integrado por 105 sujetos, de los cuales 35 pacientes presentaban periodontitis localizada, otros 35 periodontitis crónica, y 35 restantes como grupo control. Este estudio concluyó que la IL-17 se encuentra vinculada a la periodontitis crónica, ya que su presencia aumenta la inflamación y, por lo tanto, la progresión de la enfermedad.

Si bien se ha establecido que la etiología de la enfermedad periodontal es bacteriana, éste no sería el único factor asociado para que ésta se desarrolle (Escalona & Limonchy, 2009; Ishikawa, 2007; Kilian et al., 2006; Nanci & Bosshardt, 2006; Nunn, 2004; Slots, 2006). Se ha sugerido que otro factor que colabora en el desarrollo de la enfermedad es la presencia de virus, específicamente del tipo Herpes (Contreras & Slots, 2004; Escalona & Limonchy, 2009; Feller et al., 2007; Foglio-Bonda et al., 2010; Hung, Chiang, Wu, Hsu, & Chen, 2012; Parra & Slots, 1996; Saygun et al., 2004; Slots, 2002). Dentro de ellos se han definido los siguientes:

## **1.2 Definición y patogénesis de virus Herpes Simple tipo 1 (HSV-1)**

Este virus pertenece a la subfamilia Alfa Herpesviridae (Bascones & Pousa, 2011; Escalona & Limonchy, 2009, Echeverría et al., 2007; Perea et al., 2006),

el cual se caracteriza por ser de gran tamaño, neurotrópico y causar daño a través de la lisis celular (Bascones & Pousa, 2011; Perea et al., 2006), provocando principalmente infecciones orales (Bascones & Pousa, 2011).

En los primeros años de vida se produce la primoinfección por HSV-1, por lo que, a los 40 años, cerca del 70% de las personas presentan el anticuerpo contra este virus (Haarr & Skulstad, 1994).

En edades tempranas, la infección más común es la gingivoestomatitis herpética primaria (Bascones & Pousa, 2011; Harr & Skulstad, 1994), afectando principalmente a niños de 6 meses y 5 años de edad y en forma ocasional a adolescentes o jóvenes (Bascones & Pousa, 2011). A partir de ésta, el virus llega a los terminales nerviosos sensoriales periféricos a través del axón, alcanzando los ganglios e infectando el sistema nervioso central, en donde permanece de forma latente (Bascones & Pousa, 2011; Harr & Skulstad, 1994).

### **1.3 Definición y patogénesis de Virus Epstein Barr (EBV)**

Pertenece a la familia del subgrupo Gamma, el cual afecta a más del 90% de la población adulta a nivel mundial (Bascones & Pousa, 2011; Escalona & Limonchy, 2009; Echeverría et al., 2007; Perea et al., 2006). Es un tipo de virus Herpes encapsulado de gran tamaño de doble cadena de ADN (Escalona & Limonchy, 2009), que presenta una envoltura lipoproteica con glicoproteínas en su interior que se proyecta hacia el exterior (Rickinson & Kieff, 2007). El EBV, es capaz de infectar a los linfocitos B (Slots, 2006), estableciéndose de manera latente en el lugar (Socransky & Haffajee, 2006), además de replicarse en el epitelio oral y orofaringe (Bascones & Pousa, 2011; Perea et al., 2006; Klein, 1989). Sin embargo, en el individuo inmunocompetente, esta infección es

benigna y autolimitada (Rickinson & Kieff, 2007), no obstante, frente a una noxa, éste se reactiva generando inmunosupresión del hospedero (Escalona & Limonchy, 2009; Socransky & Haffajee, 2006).

La infección por el EBV induce a la respuesta inmune innata y adquirida (Escalona & Limonchy, 2009). Esta respuesta es fundamental en el control de la infección, siendo modulada por linfocitos T y células natural killer (NK) (Bascones & González, 2003; Contreras et al., 2000; Prieto et al., 2013), que se encuentran restringidos por el complejo de histocompatibilidad clase I y II (MHC I y MHCII) (Escalona & Limonchy, 2009; Slots, 2004; Slots, 2006), siendo la función del MHC I localizar péptidos virales sobre las células infectadas (Odumade et al., 2011). El virus, codifica genes para eludir la respuesta inmunológica, interfiriendo en la activación de MHC I y II (Contreras et al., 2000; Moreno & Contreras, 2013; Slots, 2004). Además, este virus es capaz de alterar la función normal de las citoquinas y sus receptores, interactuando con los factores del complemento, regulando la transducción y transcripción, entre otras funciones celulares (Slots & Contreras, 2000; Slots, 2004).

#### **1.4 Definición y patogénesis de Citomegalovirus Humano (HCMV)**

El Citomegalovirus Humano (HCMV) es uno de los virus de mayor tamaño (Staras et al., 2008) y pertenece a la familia del subgrupo Beta (Bascones & Pousa, 2011; Escalona & Limonchy, 2009; Echeverría et al., 2007; Perea et al., 2006) el cual afecta al 95% de los individuos adultos en los países en vías de desarrollo y del 60% al 80% de países desarrollados (Villalba & Valdés, 2000). Su morfología es similar al resto de los virus Herpes, presentando una membrana lipoproteica en su parte más externa con proyección de

glicoproteínas desde su interior (Bascones & Pousa, 2011; Staras et al., 2008; Villalba & Valdés, 2000).

El HCMV afecta a macrófagos y células T (Slots, 2006), estimulando la liberación de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Escalona & Limonchy; Loewendorf & Benedict, 2010). Estas citoquinas son fundamentales para la respuesta del hospedero contra el virus, pero también pueden inducir la reabsorción ósea alveolar (Contreras et al., 2013).

La respuesta contra la invasión viral comienza con la respuesta inmune innata que incluye a diferentes citoquinas las cuales regulan la respuesta inmune (celular y humoral) antiviral y pueden tener efectos antivirales directos (Odumade et al., 2011). En cuanto a la inmunidad específica, los linfocitos T CD4+ y T CD8+ juegan un importante rol en la resolución de la infección primaria proporcionando una vigilancia inmune viral a largo plazo (Loewendorf & Benedict, 2010).

Este virus también provoca la liberación de factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) que actúan sobre las células infectadas, impidiendo la replicación viral (Odumade et al., 2011).

Se ha descrito que los fibroblastos afectados por HCMV disminuyen la producción de colágeno y aumentan la liberación de metaloproteinasas de la matriz (Contreras et al., 2013). Por otro lado, la PGE2, un mediador de la respuesta inflamatoria, aumenta frente al contacto con células infectadas por el virus y resiste la replicación de HCMV (Slots, 2011).

## **2. Análisis de la respuesta del hospedero frente a la Periodontitis crónica, los virus Herpes y la relación entre ambos**

### **2.1 Análisis de las muestras**

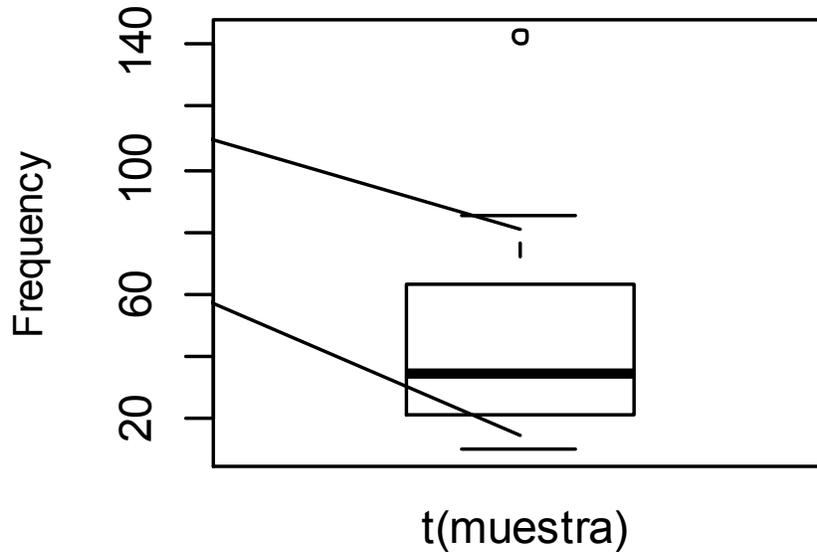
Inicialmente se identificaron 965 *papers* de las bases de datos anteriormente mencionadas. De estos, 655 fueron seleccionados al aplicar el primer filtro (17 años). Al emplear el segundo (estudios realizados en humanos), se obtuvo 475 *papers*. De estos últimos se analizó el título y *abstract*, seleccionando 288 estudios. Finalmente se seleccionaron 90 *papers* que cumplían a cabalidad con los criterios de inclusión y exclusión determinados anteriormente, seleccionando sólo 42. De estos se realizó un análisis de las muestras (cantidad de pacientes) expresados en la Tabla 10 y Figura 6.

**Tabla 10. Análisis estadístico de la muestra**

<b>Tamaño muestra</b>	<b>Pacientes</b>
Mínimo	10.00
1 st Qu	21.50
Mediana	34.50
Mean (Promedio)	42.88
3 rd Qu	62.75
Máximo	143.00
Desviación estándar (SD)	26.83

La Figura 6, correspondiente al gráfico Boxplot, analiza la cantidad de pacientes incluidos en los estudios seleccionados. Se observa que la muestra mínima analizada corresponde a 10 pacientes, el primer cuartil corresponde a 21.5; la mediana a 34.5; el promedio 42.88; el tercer cuartil a 62.75; un valor máximo muestral de 143 pacientes y una desviación estándar de 26.83. También se

logra observar un punto atípico, valor que se aleja del promedio de la muestra, y que está representado por los 143 pacientes incluidos en un estudio (Wu et al., 2007).



**Figura 6. Gráfico Boxplot de la muestra**

## **2.2 Relación entre HCMV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos**

De los 42 *papers* analizados (Tabla 11), 25 encontraron la presencia de HCMV en pacientes con periodontitis crónica, asociando el virus a un aumento en el número de *Pg* (28%), *Tf* (16%), linfocitos T (40%), macrófagos (44%), PMN (20%), IL-1 y TNF- $\alpha$  (16%). Además, se asoció con un incremento de los parámetros clínicos como la profundidad de sondaje, pérdida de inserción

clínica y sangrado gingival, en el 96%, 60% y 40% de los *papers*, respectivamente.

**Tabla 11. Relación entre la presencia de HCMV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos**

Nº Total de estudios	42		
Nº de estudios que analizaron el virus	25		
VIRUS		<b>CMV</b>	<b>% CMV</b>
<b>&gt; Periodontopatógenos</b>			
<i>Td</i>		0	0,00%
<i>Pg</i>		7	28,00%
<i>Tf</i>		4	16,00%
<i>Aa</i>		0	0,00%
<i>Fn</i>		0	0,00%
<i>Pn</i>		1	4,00%
<i>Pi</i>		2	8,00%
<b>&gt; Células</b>			
Linf B		2	8,00%
Linf T		10	40,00%
Macrófagos		11	44,00%
PMN		5	20,00%
Osteoclastos		1	4,00%
<b>&gt; Enzimas</b>			
MMP		1	4,00%

<b>&gt; Citoquinas proinflamatorias</b>		
IL-1	4	16,00%
IL-6	2	8,00%
IL-10	0	0,00%
IL-4	1	4,00%
TNF- $\alpha$	4	16,00%
<b>&gt; Parámetros clínicos</b>		
Profundidad de sondaje	24	96,00%
Pérdida de inserción clínica	15	60,00%
Sangrado gingival	10	40,00%

### **2.3 Relación entre HSV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos**

Respecto al HSV (Tabla 12), 10 estudios de la literatura analizada encontraron la presencia de este virus en los tejidos periodontales, asociándolo a un aumento de *Pg*, *Td* y *Tf* (10%); PMN (30%), linfocitos B (20%), linfocitos T y Macrófagos (50%). En cuanto a los parámetros clínicos se observó un aumento de éstos, siendo la pérdida de inserción clínica el parámetro mayoritariamente mencionado en la literatura en un 90%, luego la profundidad de sondaje en un 80% y, por último, el sangrado gingival en un 60% de los estudios analizados.

**Tabla 12. Relación entre la presencia de HSV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos**

Nº Total de estudios	42	
Nº de estudios que analizaron el virus	10	
<b>VIRUS</b>	<b>HSV</b>	<b>%HSV</b>
<b>&gt; Periodontopatógenos</b>		
<i>Td</i>	1	10,00%
<i>Pg</i>	1	10,00%
<i>Tf</i>	1	10,00%
<i>Aa</i>	0	0,00%
<i>Fn</i>	0	0,00%
<i>Pn</i>	0	0,00%
<i>Pi</i>	0	0,00%
<b>&gt; Células</b>		
Linf B	2	20,00%
Linf T	5	50,00%
Macrófagos	5	50,00%
PMN	3	30,00%
Osteoclastos	1	10,00%
<b>&gt; Enzimas</b>		
MMP	0	0,00%
<b>&gt; Citoquinas proinflamatorias</b>		
IL-1	0	0,00%
IL-6	0	0,00%
IL-10	0	0,00%

IL-4	0	0,00%
TNF- $\alpha$	0	0,00%
<b>&gt; Parámetros clínicos</b>		
Profundidad de sondaje	8	80,00%
Pérdida de inserción clínica	9	90,00%
Sangrado gingival	6	60,00%

#### **2.4 Relación entre EBV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos**

Para el EBV (Tabla 13), fueron 29 los estudios que mencionaron una relación entre este virus y la enfermedad periodontal. Respecto a los periodontopatógenos, el 24.14% de los artículos revisados vio relación entre la presencia de este virus y el aumento de *Pg*; y el 13.79% se asoció al aumento de *Tf*. En cuanto a los linfocitos B fue de un 51.72%, y para linfocitos T y PMN de un 13.79%. Para las citoquinas proinflamatorias IL-1, y TNF- $\alpha$ , 10.34% de los *papers* estudiados generaron una relación entre los dos parámetros. Respecto a la relación con el aumento en profundidad de sondaje, pérdida de inserción clínica y sangrado gingival, fue de un 96.55%, 51.72% y 48.28%, respectivamente.

**Tabla 13. Relación entre la presencia de EBV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos**

Nº Total de estudios	42		
Nº de estudios que analizaron el virus	29		
VIRUS		<b>EBV</b>	<b>%EBV</b>
<b>&gt; Periodontopatógenos</b>			
Td		1	3,45%
Pg		7	24,14%
Tf		4	13,79%
Aa		1	3,45%
Fn		2	6,90%
Pn		1	3,45%
Pi		2	6,90%
<b>&gt; Células</b>			
Linf B		15	51,72%
Linf T		4	13,79%
Macrófagos		3	10,34%
PMN		4	13,79%
Osteoclastos		1	3,45%
<b>&gt; Enzimas</b>			
MMP		0	0,00%
<b>&gt; Citoquinas proinflamatorias</b>			
IL-1		3	10,34%
IL-6		2	6,90%
IL-10		1	3,45%
IL-4		1	3,45%

TNF- $\alpha$	3	10,34%
<b>&gt; Parámetros clínicos</b>		
Profundidad de sondaje	28	96,55%
Pérdida de inserción clínica	15	51,72%
Sangrado gingival	14	48,28%

## **2.5 Relación entre EBV, HCMV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos**

En cuanto a la relación entre la presencia de EBV en conjunto con HCMV (Tabla 14), los mayores porcentajes se vieron asociados a *P. gingivalis*, *T. forsythia*, linfocitos B, linfocitos T, macrófagos, PMN, IL-1 y TNF- $\alpha$ , además de los parámetros clínicos.

**Tabla 14. Relación entre la presencia de EBV más HCMV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos**

Números de estudios con la presencia de ambos virus	16		16	
VIRUS	<b>CMV</b>	<b>%CMV</b>	<b>EBV</b>	<b>%EBV</b>
<b>&gt; Periodontopatógenos</b>				
<i>Td</i>	0	0,00%	0	0,00%
<i>Pg</i>	5	31,25%	3	18,75%
<i>Tf</i>	3	18,75%	3	18,75%

<i>Aa</i>	0	0,00%	0	0,00%
<i>Fn</i>	0	0,00%	0	0,00%
<i>Pn</i>	0	0,00%	0	0,00%
<i>Pi</i>	1	6,25%	1	6,25%
<b>&gt; Células</b>				
Linf B	1	6,25%	7	43,75%
Linf T	7	43,75%	2	12,50%
Macrófagos	7	43,75%	3	18,75%
PMN	3	18,75%	4	25,00%
Osteoclastos	1	6,25%	1	6,25%
<b>&gt; Enzimas</b>				
MMP	0	0,00%	0	0,00%
<b>&gt; Citoquinas proinflamatorias</b>				
IL-1	3	18,75%	3	18,75%
IL-6	2	12,50%	2	12,50%
IL-10	0	0,00%	0	0,00%
IL-4	0	0,00%	1	6,25%
TNF- $\alpha$	3	18,75%	3	18,75%
<b>&gt; Parámetros clínicos</b>				
Profundidad de sondaje	16	100,00%	16	100,00%
Pérdida de inserción clínica	10	62,50%	9	56,25%
Sangrado gingival	8	50,00%	7	43,75%

**2.6 Relación entre HSV, HCMV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos**

Respecto a la relación de HCMV en conjunto con HSV (Tabla 15), los resultados son negativos para la asociación con periodontopatógenos y citoquinas proinflamatorias; y positivos para las distintas células y parámetros clínicos, siendo estos últimos los más relevantes en porcentaje.

**Tabla 15. Relación entre la presencia de HSV en conjunto con HCMV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos**

Números de estudios con la presencia de ambos virus		6		6	
VIRUS		CMV	%CMV	HSV	%HSV
<b>&gt; Periodontopatógenos</b>					
<i>Td</i>		0	0,00%	0	0,00%
<i>Pg</i>		0	0,00%	0	0,00%
<i>Tf</i>		0	0,00%	0	0,00%
<i>Aa</i>		0	0,00%	0	0,00%
<i>Fn</i>		0	0,00%	0	0,00%
<i>Pn</i>		0	0,00%	0	0,00%
<i>Pi</i>		0	0,00%	0	0,00%
<b>&gt; Células</b>					
Linf B		1	16,67%	1	16,67%
Linf T		4	66,67%	4	66,67%
Macrófagos		4	66,67%	4	66,67%

PMN	3	50,00%	3	50,00%
Osteoclastos	1	16,67%	1	16,67%
<b>&gt; Enzimas</b>				
MMP	0	0,00%	0	0,00%
<b>&gt; Citoquinas proinflamatorias</b>				
IL-1	0	0,00%	0	0,00%
IL-6	0	0,00%	0	0,00%
IL-10	0	0,00%	0	0,00%
IL-4	0	0,00%	0	0,00%
TNF- $\alpha$	0	0,00%	0	0,00%
<b>&gt; Parámetros clínicos</b>				
Profundidad de sondaje	6	100,00%	6	100,00%
Pérdida de inserción clínica	6	100,00%	6	100,00%
Sangrado gingival	5	83,33%	5	83,33%

## **2.7 Relación HSV, EBV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos**

Fueron pocos los estudios que analizaron la presencia de HSV y EBV en conjunto (Tabla 16), generando como resultados un alto porcentaje para linfocitos B, asociados en un 60% a EBV, linfocitos T asociados en un 80% a HSV, macrófagos asociados en un 60% a HSV, PMN asociado en un 40% para ambos virus, y los parámetros clínicos, obteniendo un 100% para HSV.

**Tabla 16. Relación entre la presencia de HSV en conjunto con EBV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos**

Números de estudios con la presencia de ambos virus	5		5	
VIRUS	HSV	%HSV	EBV	%EBV
<b>&gt; Periodontopatógenos</b>				
<i>Td</i>	0	0,00%	0	0,00%
<i>Pg</i>	0	0,00%	0	0,00%
<i>Tf</i>	0	0,00%	0	0,00%
<i>Aa</i>	0	0,00%	0	0,00%
<i>Fn</i>	0	0,00%	0	0,00%
<i>Pn</i>	0	0,00%	0	0,00%
<i>Pi</i>	0	0,00%	0	0,00%
<b>&gt; Células</b>				
Linf B	1	20,00%	3	60,00%
Linf T	4	80,00%	1	20,00%
Macrófagos	3	60,00%	1	20,00%
PMN	2	40,00%	2	40,00%
Osteoclastos	1	20,00%	1	20,00%
<b>&gt; Enzimas</b>				
MMP	0	0,00%	0	0,00%
<b>&gt; Citoquinas proinflamatorias</b>				
IL-1	0	0,00%	0	0,00%
IL-6	0	0,00%	0	0,00%
IL-10	0	0,00%	0	0,00%

IL-4	0	0,00%	0	0,00%
TNF- $\alpha$	0	0,00%	0	0,00%
<b>&gt; Parámetros clínicos</b>				
Profundidad de sondaje	5	100,00%	5	100,00%
Pérdida de inserción clínica	5	100,00%	4	80,00%
Sangrado gingival	5	100,00%	4	80,00%

## **2.8 Relación entre EBV, HSV, HCMV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos**

También fueron pocos los estudios que analizaron los tres virus en conjunto (Tabla 17), dando resultados negativos para periodontopatógenos, citoquinas proinflamatorias y metaloproteinasas, pero asociados en un 100% al aumento en la profundidad de sondaje.

**Tabla 17. Relación entre la presencia de EBV en conjunto con HSV y HCMV y el aumento de periodontopatógenos, células proinflamatorias, enzimas (MMP), citoquinas proinflamatorias y parámetros clínicos**

Números de estudios	5		5		5	
con la presencia de los						
3 virus						
VIRUS	CMV	%CMV	HSV	%HSV	EBV	%EBV
<b>&gt;Periodontopatógenos</b>						
Td	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%

Pg	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Tf	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Aa	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Fn	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Pn	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Pi	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<b>&gt; Células</b>						
Linf B	1	20,00%	1	20,00%	3	60,00%
Linf T	3	60,00%	4	80,00%	1	20,00%
Macrófagos	3	60,00%	3	60,00%	1	20,00%
PMN	2	40,00%	2	40,00%	2	40,00%
Osteoclastos	1	20,00%	1	20,00%	1	20,00%
<b>&gt; Enzimas</b>						
MMP	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<b>&gt; Citoquinas proinflamatorias</b>						
IL-1	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
IL-6	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
IL-10	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
IL-4	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
TNF- $\alpha$	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<b>&gt; Parámetros clínicos</b>						
Profundidad de sondaje	5	100,00%	5	100,00%	5	100,00%
		%		%		%
Pérdida de inserción clínica	5	100,00%	5	100,00%	4	80,00%
		%		%		%
Sangrado gingival	5	100,00%	5	100,00%	4	80,00%
		%		%		%

### **3. Prevalencia de EBV, HCMV y HSV en pacientes con periodontitis crónica presente en los estudios analizados**

De acuerdo a la literatura revisada, se analizaron los datos de prevalencia de cada uno de los virus en cuestión, obteniendo los resultados expresados en las Tablas 18, Figuras 7, 8 y 9.

#### **3.1 Resumen estadístico**

La Tabla 18 corresponde al resumen estadístico de prevalencia de EBV, HSV y HCMV. El virus con las medidas de tendencia central más altas fue el EBV, obteniendo un promedio de 46.3%, mediana 46.7% y moda 66%. En cuanto a la Desviación estándar (SD), el valor más alto lo presenta el HSV con una SD de 31.29.

**Tabla 18. Resumen estadístico**

Número total de estudios	40			
Medida		EBV	HSV	CMV
Tamaño		35	13	27
Media (Promedio)		46.30	40.12	35.48
Mediana		46.7	28	30
Moda		66	28	50
Desviación estándar		21.57	31.29	26.69
Varianza de la muestra		465.43	979.15	712.87
Coefficiente de variación		0.46	0.77	0.75
Amplitud		82	95	82.5
Mínimo		0	5	0

Máximo	82	100	82,5
--------	----	-----	------

### 3.2 Análisis estadístico de prevalencia de HCMV

La Figura 7, correspondiente al gráfico Boxplot, analiza la prevalencia de HCMV en los artículos seleccionados que analizaban este virus, ya sea en solitario o junto con los otros dos virus. En la Tabla 19, se pueden observar los valores utilizados. En los estudios realizados por Hernández et al. 2016, Rotola et al. (2008) y Dawson et al. (2009), en los cuales se investigó la presencia de HCMV en pacientes con periodontitis crónica, generaron resultados negativos para éste, obteniendo una prevalencia del 0%. Esto se traduce en que el valor mínimo observado en el gráfico Boxplot (Figura 7) corresponda a 0%. El primer cuartil presenta un valor de 15%; la mediana de 30%; el promedio 35.48%; el tercer cuartil de 54.5%; y un valor máximo de 82.5%. Los datos de prevalencia de cada estudio se encuentran en el Anexo III.

**Tabla 19. Análisis estadístico de prevalencia de HCMV**

	Prevalencia (%)
Mínimo	00.00
1 st Qu	15.00
Mediana	30.00
Mean (Promedio)	35.48
3 rd Qu	54.50
Máximo	82.50

## CMV (27 paper)

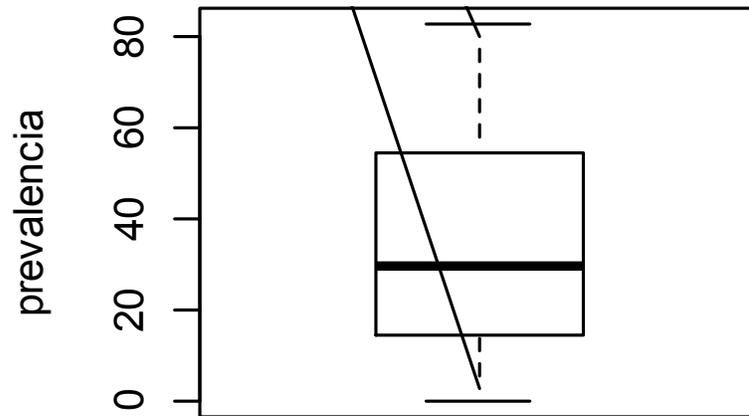


Figura 7. Gráfico Boxplot que representa la prevalencia del virus HSV en los artículos científicos revisados

### 3.3 Análisis estadístico de prevalencia de HSV

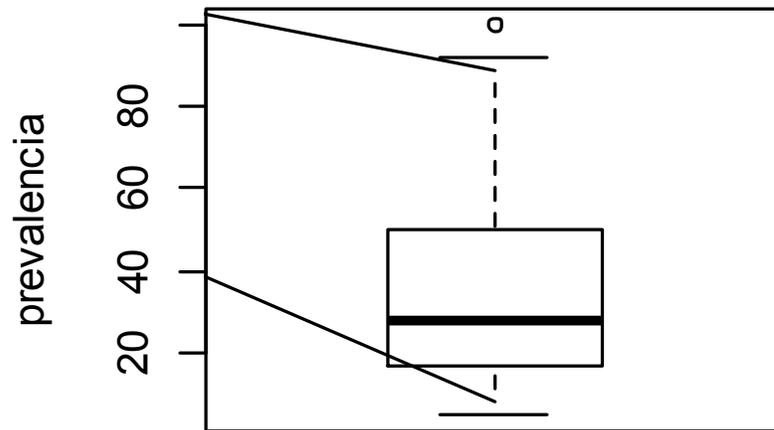
Respecto al HSV, la Figura 8 muestra la prevalencia de este virus en los *papers* seleccionados y la Tabla 20 muestra los valores observados. El valor mínimo observado es de 5%, primer cuartil un valor de 17%; la mediana de 28%; el promedio 40.12%; el tercer cuartil de 50%; y un valor máximo de 100%.

Tabla 20. Análisis estadístico de prevalencia de HSV en los trabajos analizados

	Prevalencia (%)
Mínimo	5.00
1 st Qu	17.00

Mediana	28.00
Mean (Promedio)	40.12
3 rd Qu	50.00
Máximo	100.00

### HSV (13 paper)



**Figura 8. Gráfico Boxplot de prevalencia del virus HSV en los estudios analizados**

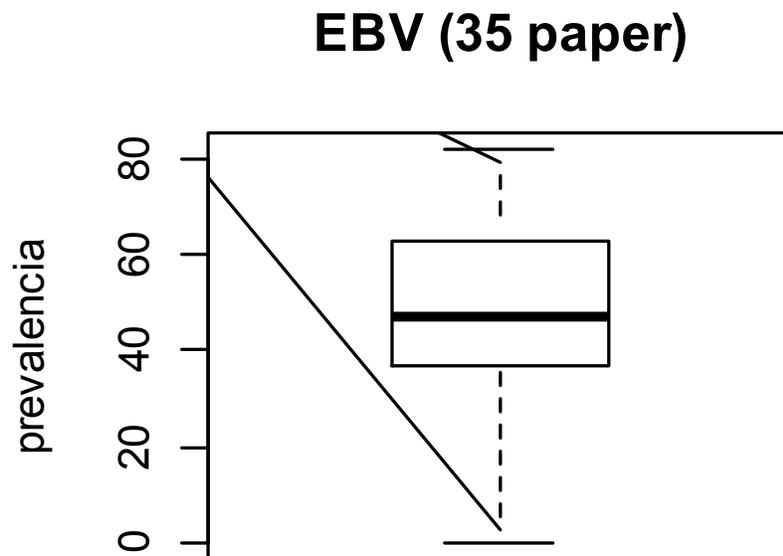
#### **3.4 Análisis estadístico de prevalencia de EBV**

En cuanto al EBV, se observa un valor mínimo de 0%, primer cuartil de 36.75%, la mediana de 46.7%, un promedio de 46.31%, el tercer cuartil de 62.8% y un máximo de 82% (Tabla 21). En un estudio realizado por Tantivanich et al. (2004), en el cual se investigó la presencia de EBV en pacientes con periodontitis crónica, generó resultados negativos para éste, obteniendo una

prevalencia del 0%. Esto se traduce en que el valor mínimo observado en el gráfico Boxplot (Figura 9) corresponda a 0%.

**Tabla 21. Análisis estadístico de prevalencia de EBV en los diversos estudios analizados**

	Prevalencia (%)
Mínimo	00.00
1 st Qu	36.75
Mediana	46.70
Mean (Promedio)	46.31
3 rd Qu	62.80
Máximo	82.00



**Figura 9. Gráfico Boxplot de prevalencia EBV en los estudios analizados**

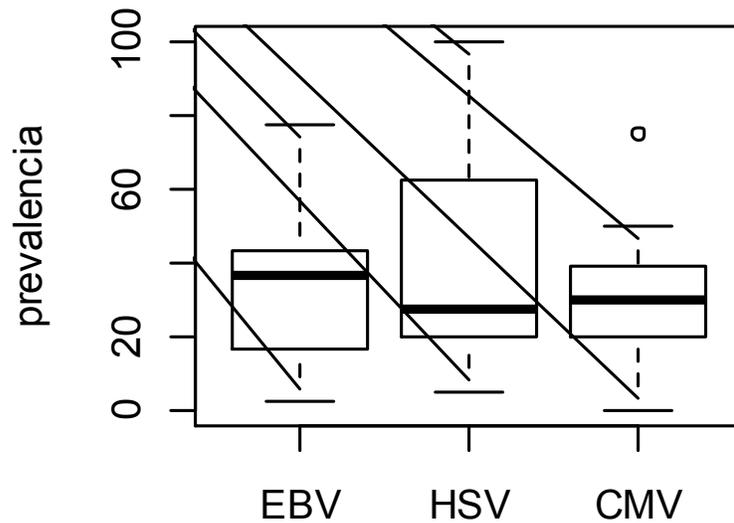
### **3.5 Análisis estadístico de prevalencia de EBV, HSV, HCMV simultáneamente**

En cuanto al EBV, HSV y HCMV, dieron un total de 11 estudios analizados, de los cuales el mínimo de pacientes para EBV fue de un valor de 5%, el primer cuartil de 20%, la mediana de 28%, promedio de 42.34%, tercer cuartil de 63% y un máximo de 100%. Mientras que para el HSV el promedio fue de 31.72, y para HCMV un promedio de 35.07 (Tabla 22), lo que se puede ver graficado en el Boxplot de prevalencia en la Figura 10.

**Tabla 22. Análisis estadístico de prevalencia de EBV, HSV y CMV simultáneamente**

	<b>Prevalencia EBV (%)</b>	<b>Prevalencia HSV (%)</b>	<b>Prevalencia CMV (%)</b>
Mínimo	3.00	5.00	0.00
1 st Qu	17.35	20.00	20.50
Mediana	37.00	28.00	30.00
Mean (Promedio)	35.07	42.34	31.72
3 rd Qu	43.35	63.00	39.65
Máximo	78.00	100.00	75.00

## EMV,HSV,CMV (11 paper)



**Figura 10. Gráfico Boxplot de prevalencia de CMV, HSV y EBV simultáneamente**

#### **4. Desviación estándar de EBV, HSV y CMV**

La desviación estándar más alta la obtuvo una vez más el HSV, presentando una SD de 33.40. Esta mayor dispersiónse puede deber al menor número de estudios que analizaron este virus, siendo sólo 13 artículos versus los 35 de EBV y 27 de HCMV (Tabla 23).

**Tabla 23. Desviación estándar de los distintos virus**

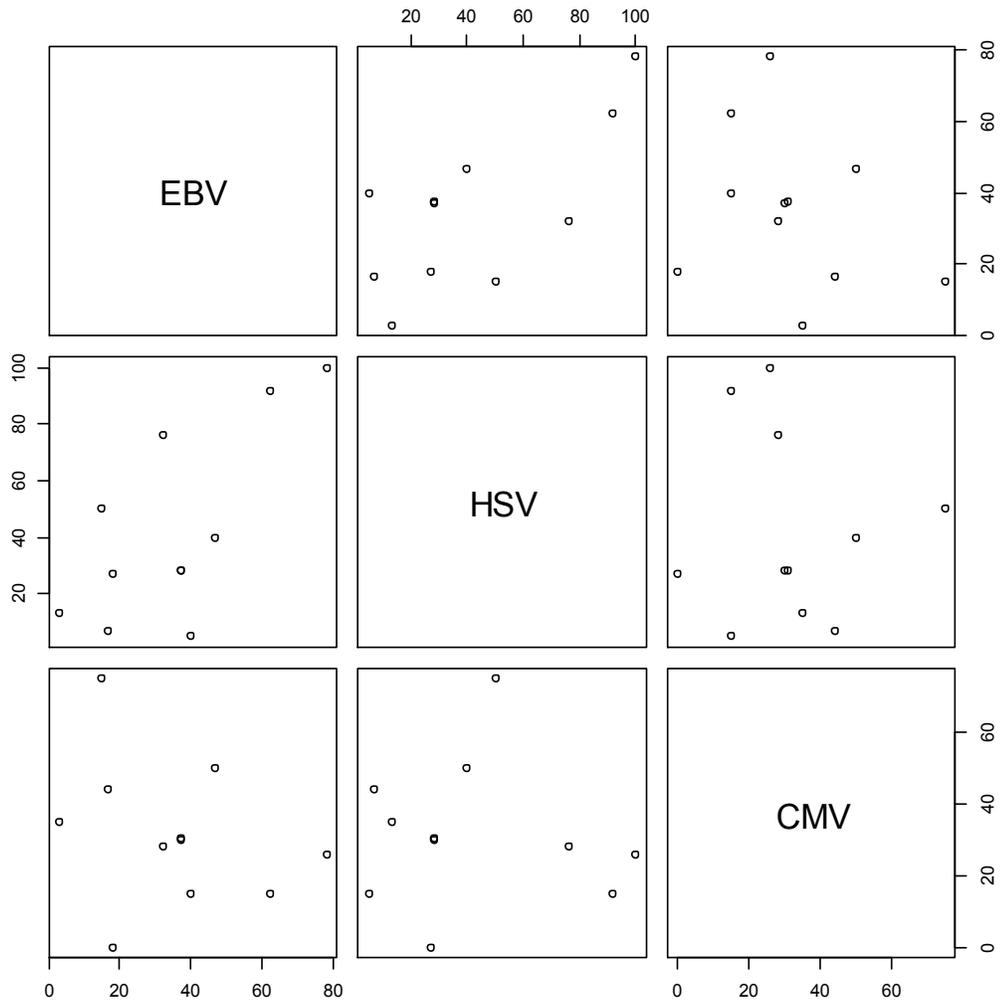
<b>VIRUS</b>	<b>Desviación estándar (SD)</b>
EBV	21.92
HSV	33.40

### 5. Correlación entre EBV, HSV y HCMV

De los estudios analizados, 11 observaron de manera simultánea la presencia de los virus EBV, HSV y HCMV. De estos 11 estudios se evaluó la correlación entre los virus, la que explica qué tan relacionadas están las variables entre la una y la otra. En la Tabla 24 se observa una relación entre EBV y HSV con un valor de correlación de 0,7 lo que indica que están directamente relacionadas. Entre EBV y HCMV existe una relación inversa, ya que la correlación es de -0.27, pero al ser más cercana a cero indica que esta relación inversa es débil. Entre HCMV y HSV prácticamente no existe correlación, ya que el indicador es muy cercano a cero. Dichas correlaciones también se pueden observar en el gráfico de correlación múltiple (Figura 11), lo cual corrobora de forma independiente los resultados obtenidos.

**Tabla 24. Correlación entre EBV, HSV Y HCMV**

>COR(X)	EBV	HSV	HCMV
EBV	1.00	0.70	-0.27
HSV	0.70	1.00	-0.05
HCMV	-0.27	-0.05	1.00



**Figura 11. Gráfico de correlación entre EBV, HSV y HCMV**

## X. DISCUSIÓN

Si bien la presencia bacteriana, específicamente especies Gram negativas, son esenciales para el inicio y progresión de la enfermedad periodontal, esta no logra explicar en su totalidad algunos de los signos que acompañan esta patología (Escalona & Limonchy, 2009; Ishikawa, 2007; Grenier et al., 2009; Killian et al., 2006; Nanci & Bosshardt, 2006; Nunn, 2004; Slots, 2006; Zhu et al., 2015). Debido a esto es que variados investigadores revisados en esta tesis sugieren la participación de otros microorganismos, específicamente virus Herpes, en la etiología y patogénesis de la enfermedad (Contreras & Slots, 2000; Echeverría et al., 2007; Escalona & Limonchy, 2009; Parra & Slots, 1996; Saygun et al., 2004; Slots, 2002). Al respecto, Shah & Mehta (2016), detectaron la presencia de este virus en el 96.7% de los pacientes diagnosticados con periodontitis crónica, porcentaje similar al descrito por Kazi et al. (2015), donde detectaron la presencia del virus Herpesen el 81.33% de los casos, atribuyéndole, en ambos estudios, un posible rol en la enfermedad periodontal. Hernández et al. (2016) concuerdan con lo señalado por estos autores y establece que, si bien la presencia de HSV, HCMV y EBV no es el factor etiológico directo de la enfermedad periodontal, éstos pueden agravar su curso y pronóstico.

Respecto a la etiología bacteriana y su relación con la presencia de los virus EBV, HCMV y HSV, se describe que, éstos por medio de receptores presentes en su superficie, promueven la colonización y agregación bacteriana de periodontopatógenos subgingivales (Mackowiak et al., 1984). Esta infección produce la expresión de mediadores de la inflamación como la interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), monocitos y macrófagos. La interleuquina-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , dentro de otras funciones, estimulan las metaloproteinasas de la matriz, afectando la síntesis de los inhibidores de las

metaloproteinasas y por lo tanto exacerbando la destrucción ósea periodontal (Ling, Lednicky, & Keitel, 2003; Saygun et al., 2008). Debido a lo expuesto anteriormente, algunos autores sugieren que estas bacterias asociadas a los distintos virus ya descritos podrían aumentar la progresión y severidad de la enfermedad periodontal (Chalabi et al., 2010; Idesawa, 2004; Imbronito et al., 2008; Saygun et al., 2008).

Al respecto, Chalabi et al. (2010) detectaron tanto bacterias periodontales como virus Herpes en los sitios afectados con periodontitis crónica. Por su parte, Kato et al. (2013) señalan que los pacientes que presentan una coinfección de EBV y *P. gingivalis* poseen un mayor riesgo de presentar un aumento en la destrucción ósea periodontal, en comparación con alguna aparición en solitario de EBV o *P. gingivalis* (Kato, Imai, Ochiai, & Ogata, 2013). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio, en el cual el 24.14% de los artículos analizados proponen una relación entre *P. gingivalis* y EBV, siendo esta la bacteria más asociada a este virus. Los resultados obtenidos en este estudio respecto a la presencia de EBV en pacientes con periodontitis crónica, muestran una mayor prevalencia en este respecto a HSV y HCMV, obteniendo un promedio de 46.3%, 40.1% y 35.5%, respectivamente. Estos porcentajes se condicen con los expuestos por Kazi et al. (2015), donde el virus Epstein Barr fue detectado en todos los tipos de periodontitis, ya fuese leve, moderada o severa, presentando una mayor prevalencia que los dos restantes. Los presentes resultados de esta investigación concuerdan con los expuestos por otros autores respecto a la presencia de EBV en pacientes con periodontitis crónica, donde los porcentajes fueron levemente superiores a los obtenidos en este estudio, siendo un 47.7% para EBV (Wu et al., 2006) y 37% para HCMV (Wu et al., 2007), relacionándolo, además, a un mayor porcentaje de índice hemorrágico en estos pacientes (Wu et al., 2006). Das et al. (2012) mostraron resultados similares, demostrando que el EBV también estuvo presente de una manera significativa en pacientes con

periodontitis crónica (32%), comparada con el 8% encontrado en el grupo control que estaban periodontalmente sanos (Das et al., 2012). Éste se pudo detectar con frecuencia también en muestras de fluido crevicular gingival, saliva, glándulas salivales, y en los tejidos gingivales de pacientes que padecen la enfermedad (Escalona & Limonchy, 2009), apuntando a que si bien el principal nicho para estos virus era el saco periodontal, también se podían detectar en otros sectores de la cavidad oral (Combs et al., 2008; Dawson et al., 2009a; Idesawa, 2004). Por otro lado, Saygun et al. (2002) encontraron la presencia de EBV en el 44.3% de pacientes con periodontitis crónica y sólo un 14.3% en los controles sanos, lo que avala lo expuesto en el presente estudio acerca de la mayor prevalencia de EBV en pacientes con enfermedad periodontal. Por el contrario, un estudio realizado el 2009 obtuvo resultados positivos para el EBV sólo en el 28% de los casos de pacientes con periodontitis crónica (Dawson, Wang, & Danaher, 2009b), lo que no se consideró estadísticamente significativo para poder asociar la presencia de este virus a la progresión de la enfermedad (Dawson et al., 2009b). Paralelamente, Saygun et al. (2004) encontraron que HCMV tuvo una mayor prevalencia que EBV y HSV en pacientes que presentaban la enfermedad, no concordando con lo expuesto en esta investigación. Esta discrepancia podría deberse, entre otras variables, al distinto número de muestras de ambas investigaciones. Otros estudios (Contreras & Slots, 2000; Contreras et al., 1999; Dawson et al., 2009b; Kato et al., 2013; Slots, 2006) pudieron asociar la presencia de este virus a un aumento en los parámetros clínicos, con especial relevancia en el aumento de la profundidad de sondaje. Así lo manifiestan Kato et al. (2013), señalando que el EBV junto con *P. gingivalis* fueron detectados mayoritariamente en los sacos periodontales con mayor profundidad de sondaje en pacientes que padecen la enfermedad, sugiriendo que podría existir una correlación entre la presencia de EBV y la existencia de una mayor profundidad de sondaje ( $PS \geq 5\text{mm}$ ).

Similares son los resultados obtenidos en este estudio, donde se puede observar que el 96% de los artículos que analizaron el EBV encontraron relación entre la presencia de este virus y el aumento de la profundidad de sondaje, siendo encontrado en los sitios más afectados por la periodontitis. Esta afirmación también es corroborada por Slots (2006), quien tuvo resultados estadísticamente significativos para la presencia de EBV en el fluido crevicular gingival de sitios con una profundidad de sondaje aumentada en pacientes que padecían la enfermedad. Respecto a los otros dos parámetros clínicos estudiados, sangrado al sondaje y pérdida de inserción clínica, los resultados fueron de 48.28% y 51.72%, porcentajes similares a los encontrados por distintos autores, sugiriendo que la presencia de este virus desencadena un aumento en los parámetros clínicos estudiados (Contreras et al., 1999; Contreras & Slots, 2000; Dawson et al., 2009b; Kato et al., 2013; Slots, 2006).

En cuanto a la presencia de HCMV en pacientes con enfermedad periodontal, Contreras & Slots (1996) verificaron la presencia de HCMV, EBV y otros tipos de virus Herpes en pacientes con periodontitis crónica. Botero et al. (2007) demostraron una alta prevalencia de HCMV en pacientes que padecían la enfermedad, siendo observado en el 53.3% de ellos, sugiriendo que un aumento en la profundidad de sondaje y pérdida de inserción clínica son una variable para la colonización bacteriana. A raíz de esto, diversos autores señalan que *P. gingivalis* y *P. intermedia* serían las bacterias asociadas a la presencia de HCMV (Botero et al., 2007; Contreras et al., 1999; Kamma et al., 2001), difiriendo de la presente investigación de tesis en donde los resultados obtenidos para *P. intermedia* en asociación con HCMV fue solo el 8% de la literatura analizada. Respecto al aumento en la profundidad de sondaje y pérdida de inserción clínica, estos estudios coinciden con los resultados obtenidos en esta investigación, donde el 96% de la literatura estudiada relacionaba el aumento en la profundidad de sondaje con la presencia de

HCMV, el 60% lo asociaban a una mayor pérdida de inserción clínica (porcentaje más alto que EBV) y un 40% de los estudios lo relaciona a mayor sangrado gingival. Estos artículos proponen que la infección simultánea con altos niveles de periodontopatógenos y HCMV podría aumentar la severidad de la periodontitis (Armitage, 1999; Botero et al., 2007; Contreras et al., 1999). Si bien el presente estudio no obtuvo resultados significativos para la presencia de *P. intermedia* junto a HCMV, encontrándose solo en un 8% de la literatura estudiada, sí se pueden destacar los mayores niveles de periodontopatógenos asociados al virus tales como *P. gingivalis* (28%) y *T. forsythia* (16%), en comparación a los obtenidos junto al HSV con sólo un 10% en ambos casos. Estos hallazgos concuerdan con lo expuesto por Imbronito et al. (2008) quienes proponen que la coinfección de HCMV y *T. Forsythia* son más frecuentes en pacientes con periodontitis crónica que en individuos periodontalmente sanos. Estos estudios coinciden también con el trabajo realizado por Chalabi et al. (2010) quienes detectaron tanto periodontopatógenos como virus Herpes en los sitios con periodontitis crónica, sin embargo, el análisis de las coinfecciones no se realizó en dicho estudio.

Respecto a HSV, Kazi et al. (2015) detectaron la presencia de HSV-1 y HSV-2 en pacientes con periodontitis crónica severa, obteniendo la presencia de HSV-1 en el 52% y el HSV-2 en el 56% de los casos. Nishiyama et al. (2008), Ling et al. (2003) y Contreras et al. (2000) determinaron una prevalencia de HSV-1 en el 46% (Nishiyama et al., 2008), 31% (Ling et al., 2003) y 21% (Contreras et al., 2000) de los casos con periodontitis crónica respectivamente. En el presente estudio, el HSV fue el virus menos analizado en los artículos estudiados, encontrándolo sólo en 10 artículos de toda la bibliografía analizada, aunque curiosamente obteniendo una prevalencia del 40%. Este alto porcentaje de prevalencia se puede deber a la diferencia en cantidad de estudios dedicados a

los distintos virus, ya que la cantidad de artículos para HCMV y EBV fueron mayores respecto al HSV, lo que explicaría el 40% obtenido.

El HSV ha sido asociado a sitios que presentan aumento de la profundidad de sondaje y pérdida de inserción clínica, implicando que estos virus podrían estar asociados con la severidad y progresión de la enfermedad periodontal (Kubar et al., 2005; Das et al., 2012). Así lo demostró Kubar et al. (2005) quienes observaron que el número de sitios detectados con HSV es mayor en pacientes con periodontitis crónica, en comparación con aquellos que no presentaron enfermedad periodontal. Das et al. (2012) corroboran esta idea, demostrando una asociación entre la presencia de este virus en sacos con una profundidad de sondaje aumentada; asociando lo observado con la progresión y severidad de la misma. Al respecto, las observaciones realizadas en este estudio exponen una relación entre este virus y el aumento en los parámetros clínicos de profundidad de sondaje, pérdida de inserción clínica y sangrado al sondaje, siendo de 80%, 90% y 60%, respectivamente. Cabe destacar nuevamente que si bien los porcentajes son altos, estos podrían estar afectados por el tamaño de la muestra, ya que sólo fueron 10 los estudios que relacionaron este virus con la enfermedad.

Kamma et al. 2001 demostraron que tanto el HSV como el HCMV tienen asociación estadísticamente significativa con la presencia de enfermedad periodontal activa. Otros estudios relatan una prevalencia mayor de estos virus en los pacientes con periodontitis crónica en comparación con los controles sanos (Bilder et al., 2013; Dawson et al., 2009b; Sahin et al., 2009; Shah & Mehta, 2016; Slots, 2006).

Respecto al HCMV, distintos estudios avalan la presencia e intervención de este virus en la enfermedad periodontal (Bilder et al., 2013; Echeverría et al., 2007; Sahin et al., 2009; Shah & Mehta, 2016). Éste infecta distintos tipos de

células y puede establecer una latencia en las células progenitoras de los macrófagos, monocitos y linfocitos T (Contreras et al., 2013; Shah & Mehta, 2016). Resultados similares a los obtenidos en este estudio, en el que los linfocitos T y macrófagos fueron las células que mayoritariamente estuvieron asociadas a la presencia de este virus, siendo de un 40% y 44% respectivamente. El virus HCMV demuestra un marcado tropismo por células del sistema inmune e interfiere con la respuesta inmune innata, adaptativa celular y humoral a través de la activación y silenciamiento de las células natural killer (NK), disminuyendo y alterando la presentación de antígenos de los complejos MHC I y II, perjudicando así la apoptosis (Zhu et al., 2015). Este virus también afecta a los PMN induciendo anormalidades en su adherencia, quimiotaxis, fagocitosis, procesos oxidativos, secretores y actividad bactericida (Slots, 2002). Además, es capaz de desviar la potente respuesta de citoquinas antivirales e incluso de interferir con la producción de estas mismas (Das et al., 2012). Al respecto, la presente investigación produjo resultados positivos para este virus y el aumento de PMN (20%) y de distintas citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  (16%), IL-1 (16%) e IL-6 (8%), concordando así con lo expuesto anteriormente.

El presente estudio describe una prevalencia promedio del virus HCMV de un 35.48%, porcentaje bajo comparado con lo observado por Kazi et al. (2015), donde se encontró una prevalencia promedio del HCMV en el 48% de pacientes con periodontitis crónica. Imbronito et al. (2008) lo detectaron en el 50% de los pacientes con la enfermedad, resultado muy similar a lo encontrado por Ling et al. (2003) con un 52%. Sin embargo, la presente investigación tuvo valores menores a los observados en estos estudios, obteniendo una prevalencia promedio de un 35.4% para HCMV. Este resultado es coincidente con lo obtenido por Grenier et al. (2009) donde se describe que el HCMV tiene una prevalencia del 35%. Un valor similar obtuvieron Tantivanich et al. (2004)

quienes determinaron la presencia de HCMV en un 34% de los pacientes afectados, no encontrando el virus en la saliva de pacientes periodontalmente sanos (Tantinavich, Laohapand, & Thaweeboon, 2004). Otros estudios que comparan la detección de los virus Herpes con parámetros clínicos, incluyendo profundidad de sondaje y pérdida de inserción clínica, avalan la presencia del HCMV en más del 50% de los sitios afectados en pacientes con periodontitis crónica, mostrando una menor frecuencia del virus en los sitios control de pacientes periodontalmente sanos (Chalabi et al., 2008; Imbronito et al., 2008; Kato et al., 2013; Rotola et al., 2008; Wu et al., 2007). Al respecto, este estudio pudo observar resultados similares, obteniendo un aumento en la profundidad de sondaje, pérdida de inserción clínica y sangrado al sondaje en la mayoría de los estudios analizados en relación al HCMV, obteniendo porcentajes de 96%, 60% y 40%, respectivamente.

En los estudios de Botero et al. (2007) y Armitage (1999), se determinó que las bacterias *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* y *Eikenella corrodens* aumentaron en pacientes con periodontitis crónica y HCMV positivo, sugiriendo que la infección simultánea con altos niveles de periodontopatógenos y HCMV puede aumentar la severidad de la periodontitis.

Lo mismo sucede con ciertos periodontopatógenos, siendo *P. gingivalis* y *T. forsythia* los que se vieron en mayor porcentaje junto a la presencia de EBV y HCMV en conjunto (Tabla 14). Estos resultados se condicen con lo encontrado en la literatura donde se sostiene que EBV en conjunto con HCMV están relacionados a un mayor número de periodontopatógenos subgingivales (Kazi et al., 2015; Saygun et al., 2008; Slots, 2006). Es debido a lo mencionado anteriormente que se ha involucrado al HCMV y EBV en la patogénesis de la enfermedad periodontal en humanos (Contreras et al., 2013; Saygun et al., 2008; Slots, 2010; Wu et al., 2006). Estos virus son capaces de infectar y alterar

los PMN, macrófagos y linfocitos pudiendo así jugar un rol en la patogénesis de la periodontitis crónica (Saygun et al., 2008; Yapar, Saygun, Osdemir, Kubar, & Sahin, 2003). Así, la reactivación de HCMV y EBV en la periodontitis podría estar asociada a la progresión de esta enfermedad (Contreras et al., 1999; Contreras et al., 2013; Saygun et al., 2008).

Un estudio realizado por Contreras et al. (1999) obtuvo resultados similares al concluir que una infección simultánea por EBV (linfocitos B) y HSV o HCMV (linfocitos T y macrófagos) puede ejercer un efecto patogénico adicional o bien sinérgico sobre los tejidos periodontales. Dicho estudio avala lo expuesto en la presente investigación, donde se encontró una alta frecuencia de asociación entre EBV y el aumento de los linfocitos B, al igual que el aumento de IL-1 y TNF- $\alpha$ , citoquinas proinflamatorias que serían colaboradoras en la progresión y severidad de la enfermedad (Contreras et al., 2013; Shah & Mehta, 2016; Slots, 2002; Slots, 2010).

Estos virus pueden causar daños a través de distintos mecanismos (Contreras et al., 2013). Los resultados obtenidos en este estudio exponen un aumento principalmente de los linfocitos B, linfocitos T, PMN, macrófagos, IL-1 y TNF- $\alpha$  en respuesta a la presencia de estos virus (Tabla 17), lo que explicaría parcialmente el aumento de los parámetros clínicos en la enfermedad. Diversos estudios están en total acuerdo con los resultados obtenidos, señalando que estos virus tienen un efecto directo sobre fibroblastos, queratinocitos y células inflamatorias (Bilder et al., 2013; Botero et al., 2007; Chalabi et al., 2010; Grenier et al., 2009; Imbronito et al., 2008; Kazi et al., 2015; Sunde, Olsen, Enersen & Grinde, 2008; Zhu et al., 2015) lo que explicaría el aumento de éstas en los estudios analizados. Zhu et al. (2015) sugieren que producto de la replicación de los linfocitos, PMN y macrófagos, los virus pueden ajustarse a los mecanismos de defensa del sistema inmune e influir la respuesta inmune

directa o indirectamente y a la vez podrían reducir la capacidad de los tejidos periodontales de resistir una invasión bacteriana a través de la infección o la alteración de células estructurales o de las células de defensa del periodonto del hospedero (Michalowicz et al., 2000; Teughels et al., 2007; Zhu et al., 2015). Esto propone, según Bertoldi et al. (2012), un posible mecanismo patogénico para explicar la destrucción periodontal. Así, la periodontitis podría ser exacerbada por la coinfección de virus Herpes-bacterias (Bertoldi et al., 2012; Kato et al., 2013; Michalowicz et al., 2000; Slots, 2010). Es por esto que se ha sugerido que la patogénesis de la periodontitis implica múltiples sucesos que involucran complejas interacciones entre virus Herpes, bacterias y factores del hospedero (Chalabi et al., 2010; Escalona & Limonchy, 2009; Slots, 2006).

En la presente investigación, se analizó la correlación existente entre los distintos virus, dando como resultado un valor de correlación de 0,7 para EBV y HSV, lo que indicaría que están directamente relacionados (Figura 11). Esto implicaría que cuando alguno de los dos virus mencionados sufra diversos periodos de activación y provoque la liberación de proteínas virales dando paso a la fase productiva y aumentando su número, también lo haría el otro virus asociado, aumentando también su cantidad; obteniendo así una relación directamente proporcional (Bascones & Pousa, 2011; Echeverría et al., 2007, Perea et al., 2006). Por otro lado, entre los virus HCMV y HSV, no se encontró correlación, siendo esta de -0,05, por lo que si alguno de estos virus por diversas razones se activa y aumenta, no necesariamente surja el mismo efecto en el virus restante (Tabla15). Este hallazgo es relevante a la hora de realizar estudios experimentales, ya que se debe tener presente que al encontrar la presencia de EBV y HSV en conjunto, podría tener mayor incidencia en la exacerbada respuesta del hospedero a estos virus, y en el aumento de los parámetros clínicos.

Es necesario señalar que esta investigación posee algunas limitaciones, como la falta de evidencia estadísticamente significativa que avale la relación entre la presencia de los distintos virus y la severidad y progresión de la enfermedad periodontal. En segundo lugar, las diferentes maneras de extracción de muestras de los estudios incluían fluido crevicular gingival, biopsias de tejido periodontal, placa subgingival y saliva. Pueden tener distintos sesgos, ya que no son tomados de la misma muestra lo que contaminaría los resultados finales. Tercero, los estudios tuvieron parte en distintas localidades del mundo, por lo tanto, se obtuvieron resultados distintos entre las diversas etnias. Debido a esto los presentes resultados deben ser tomados como descriptivos y deben ser analizados dentro del contexto arriba descrito. No obstante, a pesar de los aspectos señalados, destacan como relevante en este trabajo las tendencias observadas entre las variables consideradas en los objetivos IV y V, las que suelen repetirse en la mayor parte de los trabajos analizados, y que toman relativa fuerza, tomando en cuenta el alto número de estudios considerados.

Finalmente, la hipótesis de trabajo planteada en este estudio no se rechaza, por cuanto existen ciertas evidencias que permiten sostener la premisa que la presencia del virus Herpes en los tejidos periodontales de pacientes adultos sistémicamente sanos con periodontitis crónica influirían en la progresión y severidad de ésta.

## **XI. CONCLUSIONES**

1. La enfermedad periodontal presenta una etiología bacteriana establecida, sin embargo, esta no es suficiente para explicar algunas características clínicas.
2. Los resultados de este estudio sugieren que la posible exacerbación de la enfermedad periodontal en el hospedero podría estar asociada a la coinfección de virus Herpes-bacteria, además de factores propios del sistema inmune del hospedero.
3. Los virus EBV, HCMV y HSV podrían estar asociados a la progresión y severidad de la enfermedad periodontal al estar relacionados a una mayor profundidad de sondaje, mayor pérdida de inserción clínica y a un mayor sangrado al sondaje.
4. Existe una correlación directa entre los virus HSV y EBV.
5. El promedio de prevalencia para los virus EBV, HCMV y HSV, en el conjunto de investigaciones analizadas, fue de un 46.3%, 35.4% y 40%, respectivamente
6. Son necesarios más estudios de tipo ensayo clínico aleatorio para poder comprobar de forma más definitiva una relación entre EBV, HSV, HCMV y la enfermedad periodontal.
7. Se acepta la hipótesis de trabajo, por cuanto existen evidencias que permiten suponer que la presencia del virus Herpes en los tejidos periodontales de pacientes adultos sistémicamente sanos con periodontitis crónica, influirían en la progresión y severidad de ésta.

### **Declaración de conflictos de interés**

Los investigadores declaran no poseer ningún conflicto de interés respecto a los resultados presentados en la tesis.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

- Adriaens, P., & Adriaens, L. (2005). Effects of Nonsurgical Periodontal Therapy on Hard and Soft Tissues. *Periodontology 2000*, 36, 121-145.
- Ambili, R., Preeja, C., Archana, V., Nisha, K. J, & Seba, A., (2014). Reejamol MK. Viruses: Are they Really Culprits for Periodontal Disease? A Critical Review. *J Investig Clin Dent*, 5(3), 1-9.
- Armitage, G. C. (1999). Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol*; 4(1), 1-6.
- Armitage, G. C. (2004). Periodontal Diagnoses and Classification of Periodontal Diseases. *Periodontology 2000*, 34,9-21,
- Arnheim, N., & Erlich, H. (1992). Polymerase Chain Reaction Strategy. *Ann. Rev. Biochem*, 61,131-156.
- Barbieri, G., Flores, J., & Vignoletti, F. (2005). El neutrófilo y su importancia en la enfermedad periodontal. *Av Periodon Implantol.*; 17(1), 11-16.
- Barros de Oliveira, C. M., Kimiko, R., Machado, A. , Gerola, L. R., & Salomão, R. (2011). Citocinas y Dolor. *Rev Bras Anesthesiol* 61(2), 137-142.
- Bartlett, M. J., & Stirling, D. (2003). A Short Story of the Polymerase Chain Reaction. *Methods Mol Biol.*, 226, 3-6.
- Bascones, A., & González, M. A. (2003). Mecanismos inmunológicos de las enfermedades periodontales y periimplantarias. *Av Periodon Implantol.*; 15(3), 121-138.

- Bascones-Martínez, A, & Pousa-Castro, X. (2011). Herpesvirus. *Avances en Odontoestomatología*, 27(1), 11-24.
- Bertoldi, C., Pellacani, C., Lalla, M., Consolo, U., Pinti, M., Cortellini, P., & Cossarizza, A. (2012). Herpes Simplex I Virus Impairs Regenerative Outcomes of Periodontal Regenerative Therapy in Intrabony Defects. A Pilot Study. *J Clin Periodontol*, 39(4), 385–392.
- Bilder, L., Elimelech, R., Szwarcwort-Cohen, M., Kra-Oz, Z., & Machtei, E. (2003). The Prevalence of Human Herpes Viruses in the Saliva of Chronic Periodontitis Patients Compared to Oral Health Providers and Healthy Controls. *Arch Virol*, 158(6), 1221–1226.
- Bilichodmath, S., Mangalekar, S. B., Sharma, D. C., Prabhakar, A. K., Reddy, S. B., Kalburgi, N. B., Patil, S. R., & Bhat, K. (2009). Herpesviruses in Chronic and Aggressive Periodontitis Patients in an Indian Population. *Journal of Oral Science*, 51(1), 79-86.
- Botero, J. E., & Bedoya, E. (2010). Determinantes del Diagnóstico Periodontal. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral*, 3(2), 94-99.
- Botero, J. E., Parra, B., Jaramillo, A., & Contreras, A. (2007). Subgingival Human Cytomegalovirus Correlates with Increased Clinical Periodontal Parameters and Bacterial Coinfection in Periodontitis. *J Periodontol* 78(12), 2303–2310.
- Botero, J. E., Vidal, C., Contreras, A., & Parra, B. (2008). Comparison of Nested Polymerase Chain Reaction (PCR), Real-Time PCR and Viral Culture for the Detection of Cytomegalovirus in Subgingival Samples. *Oral Microbiol Immunol*, 23(3), 239–244.

- Bullón, P. (2004). Diagnóstico por el laboratorio de las enfermedades periodontales y periimplantarias: Diagnóstico de la periodontitis. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 16(1), 35-45.
- Chalabi, M., Moghim, S., Mogharehabet, A., Najafi, F., & Rezaie, F. (2008). EBV and CMV in Chronic Periodontitis: A Prevalence Study. *Arch Virol* 153(10), 1917–1919.
- Chalabi, M., Rezaie, F., Moghim, S., Mogharehabet, A., Rezaei, M., & Mehraban, B. (2010). Periodontopathic Bacteria and Herpesviruses in Chronic Periodontitis. *Mol Oral Microbiol*, 25(3), 236–240.
- Chaudhari, H. L., Warad, S., Ashok, N., Baroudi, K., & Tarakji, B., (2016). Association of Interleukin-17 Polymorphism in Chronic and Localized Aggressive Periodontitis, *Brazil Oral Research*, 30(1), 1-7.
- Cheng, W-C., Van Asten, S., Burns, L., Evans, H., Walter, G., Hashim, A., Hughes, F., & Taams, L. (2016). Periodontitis-Associated Pathogens *P. Gingivalis* and *A. Actinomycetemcomitans* Activate Human CD14<sup>+</sup> Monocytes Leading to Enhanced Th17/IL-17 Responses. *European Journal of Immunology* 46(9), 2211–2221.
- Combs D., Reilly, E., Dawson, D., Avdiushko, S., Danaher, R., & Miller, C. (2008). Detection of Human Cytomegalovirus in Dental Plaque from Individual Periodontal Sites by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Departament of microbiology, immunology and molecular genetics Kentuchy*. 106, 840-844.
- Contreras, A., Botero, J., & Slots, J. (2013) Biology and Pathogenesis of Cytomegalovirus in Periodontal Disease. *Periodontol 2000.*, 64(1), 40-56.

- Contreras, A., Nowazari, H., & Slot, J. (2000)b. Herpesvirus in Periodontal Pocket and Gingival Tissue Specimens. *Oral Microbial Immunol* 15:15-18.
- Contreras, A., & Slots, J. (1996). Mammalian Viruses in Human Periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*; 11(6),381-386.
- Contreras, A., & Slots, J. (2000)a. Herpesviruses in Human Periodontal Disease. *J Periodontal Res* 2000, 35(1), 3-16.
- Contreras, A., Umeda, M., Chen, C., Bakker, I., Morrison, J. L., Slots, J. (1999). Relationship Between Herpesviruses and Adult Periodontitis and Periodontopathic Bacteria. *J Periodontol*; 70(5),478-484.
- Cotran, R. S., Kumar, V., Collins, T., & Robbins A. (2010). *Patología estructural y funcional*. Barcelona: Elsevier
- Crockett, A. O., & Wittwer C. T. (2001). Fluorescence-Labeled of Nucleotides for Real Time PCR Using Inherent Quenching of the Deoxyguanosine Nucleotides, *Analytical biochemistry*, 290(1), 89-97.
- Das, Krithiga, Gopalakrishnan, (2012). Detection of Human Herpes Viruses in Patients with Chronic and Aggressive Periodontitis and Relationship Between Viruses and Clinical Parameters, *Journal of oral and maxillofacial pathology*, 16(2), 203-9.
- Dawson, D. R., Wang, C., & Danaher, R. J. (2009)b. Real-time Polymerase Chain Reaction to Determine the Prevalence and Copy Number of Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus DNA in Subgingival Plaque at Individual Healthy and Periodontal Disease Sites. *J Periodontol* 80(7),1133–1140.

- Dawson, D. R., Wang, C., Danaher, R. J., Lin, Y., Kryscio, R. J., Jacob, R.J., & Miller, C. S. (2009)a. Salivary Levels of Epstein-Barr Virus DNA Correlate with Subgingival Levels, not Severity of Periodontitis. *Oral Diseases*, 15(8), 554–559.
- Díaz, J., Yáñez, J., Melgar, S., Álvarez, C., Rojas, C., & Vernal, R. (2012). Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral*, 5(1), 40-45
- Donlan, R., M., & Costerton, J., W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev.*, 15(2),167-93.
- Duque, A. (2016) Prevalencia de periodontitis crónica en Iberoamérica, *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral*.9(2):208-215.
- Echeverría, A., Vignoletti, F., Fabrizi, S., & Matesanz, P. (2007). Papel etiológico de los virus en la enfermedad periodontal. *Avances en Periodoncia*,19(2), 91-99.
- Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., & Klapper, P. E. (2000) Multiplex PCR, Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clinical Microbiology Review*, 13(4), 559-570.
- Erlich, H. (1991). Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science*; 252,1643-1650.
- Escalona, L., A., & Limonchy, L., E. (2009). Asociación de virus Epstein Barr con la enfermedad periodontal. *Acta Odontológica Venezolana*, 47(3), 140-152.

- Escudero, N., Perea, M. A., Bascones, A. (2008). Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación clínica. *Av Periodon Implantol.* 20(1), 27-37.
- Espejo, I., Fernández, F., López, M., Muñoz, M., Rodríguez, A., Sánchez, A., & Valero, C. (2009). *Estadística Descriptiva y Probabilidad: Teoría y problemas*. Cádiz: Universidad de Cádiz, pp.19-30. Recuperado desde [http://knuth.uca.es/repos/l\\_edyp/pdf/febrero06/lib\\_edyp.c1.pdf](http://knuth.uca.es/repos/l_edyp/pdf/febrero06/lib_edyp.c1.pdf)
- Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D. C., Wengenack, N. L, Rosenblatt, J. E., Cockerill, F. R., & Smith, T. F. (2006) Real time PCR in Clinical Microbiology: Application for Rutine Laboratory Testing. *Clinical microbiology revision*, 19(1), 165-256.
- Feller, L., Meyerov, R., & Lemmer, J. (2007). The Association Between Human Herpesviruses and Periodontal Disease, part 2. *SADJ* 62(4): 170, 172, 174.
- Fernández, P. S. (1995). Epidemiología. Conceptos básicos. En: *Tratado de epidemiología clínica*. Madrid: DuPont Pharma.
- Fernández, S., Cordero, J. M., & Córdoba, A.(2002). *Estadística descriptiva*, Madrid: ESIC
- Foglio-Bonda, P. L., Gabriele, M., Granziani, F., De Andrea, M., Mondini, M., & Gariglio, M. (2010). High Prevalence of Human Cytomegalovirus in a Population of Periodontally Healthy Subjects. *Med Oral Pato Oral Cir* 1,15(2), 292-296.
- Garcia, P. (2008) Inflamación. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat.* 102(1),91-159.

- Gibbs, R. (1990). DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction. *Analytical chemistry*, 62(13):1202-1214.
- Grenier, G., Gagnon, G., & Grenier, D. (2009). Detection of Herpetic Viruses in Gingival Crevicular Fluid of Patients Suffering from Periodontal Diseases: Prevalence and Effect of Treatment. *Oral Microbiol Immunol*, 24(6), 506-509.
- Haarr, L., & Skultad, S. (1994). The Herpes Simplex Virus Particle: Structure and Molecular Functions. *Apmis* 102(5), 321-346.
- Harris, S. (1997). Optimisation of the Polymerase Chain Reaction. *Br J Biomed Sci.*, 54(3), 166-173.
- Haussler, S., & Fuqua, C. (2013). Biofilms 2012: New Discoveries and Significant Wrinkles in a Dynamic Field. *Journal of Bacteriology*, 195(13), 2947–2958.
- Hernández, M. A., & Alvarado, A. (2001). Interleucinas e inmunidad innata. *Rev Biomed* 12, 272-280.
- Hernández, H. H., Fernandes, A. S., Escalona, L. A., & Correnti, M. (2016). Herpes Simplex Virus 1, Cytomegalovirus and Epstein Barr Virus Detection in Patients with Chronic and Aggressive Periodontitis. *Open Access Library Journal*, 3(3), 1-9.
- Hernández, M., Garrido, F., & López, S. (2000). Diseño de estudios epidemiológicos. *Salud Pública de México*, 42(2), 144-154.
- Hernández, M., Lazcano, E., Fernández, E., & Salazar, E. (2000) Metodología, sesgo y aplicación. *Revista de Salud Pública de México*, 42(3), 2000.

- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2006). *Metodología de la Investigación* (4° ed.). México: McGraw-Hill.
- Hernández, R., Fernández C., & Baptista, P. (2010). *Metodología de la investigación*. México: McGraw-Hill.
- Hung, S-L., Chiang, H-H., Wu, C-Y., Hsu, M-J., & Chen, Y-T. (2012). Effects of Herpes Simplex Virus Type 1 Infection on Immune Functions of Human Neutrophils. *J Periodont Res*, 47(5),635–644.
- Idesawa, M., Sugano, N., Ikeda, K., Oshikawa, M., Takane, M., Seki, K., & Ito, K. (2004). Detection of Epstein Barr Virus in Saliva by Real Time PCR, *Oral Microbiology Inmunology*, 19(4), 230-232.
- Imbronito, A. V., Okuda, O. S., Maria de Freitas, N., Moreira, R. F., & Nunes, F. D. (2008) Detection of Herpesviruses and Periodontal Pathogens in Subgingival Plaque of Patients with Chronic Periodontitis, Generalized Aggressive Periodontitis, or Gingivitis. *J Periodontol*; 79(12),2313-2321.
- Ishikawa, I. (2007). Host Responses in Periodontal Disease: A Preview. *Periodontol 2000*.43,9-13
- Kamma, J. J., & Slots, J. (2003). Herpesviral–Bacterial Interactions in Aggressive Periodontitis. *J Clin Periodontol*, 30 (5), 420-426.
- Kamma, J., J., Contreras, A., & Slots, J. (2001). Herpes Viruses and Periodontopathic Bacteria in Early-Onset Periodontitis. *J. Clin Periodontol*, 28, 879–885.
- Kato, A., Imai K., Ochiai K., & Ogata Y. (2014). Prevalence and Quantitative Analysis of Epstein–Barr Virus DNA and Porphyromonas Gingivalis Associated with Japanese Chronic Periodontitis Patients. *Clin Oral Invest*

19(7), 1605–1610.

Kato, A., Imai, K., Ochiai, K., & Ogata, Y. (2013). Higher Prevalence of Epstein - Barr Virus DNA in Deeper Periodontal Pockets of Chronic Periodontitis in Japanese Patients. *Plos One*, 8(8), 1-5.

Kazi, M. M., Bharadwaj, R., Bhat, K., & Happy, D., (2015). Association of Herpes Viruses with Mild, Moderate and Severe Chronic Periodontitis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*.,9(7),5-8.

Khosropanah, H., Karandish, M., Ziaeyan, M., & Jamalidoust, M. (2015). Quantification of Epstein - Barr Virus and Human Cytomegalovirus in Chronic Periodontal Patients, *Jundishapur J Microbiol*, 8(6), e18691.

Kilian, M., Frandsen, E. V., Haubek, D., & Poulsen K. (2006). The Etiology of Periodontal Disease Revisited by Population Genetic Analysis. *Periodontology 2000*, 42,158-79.

Kinane, B. F., & Bartold, P. M. (2007) Clinical Relevance of the Host Responses of Periodontitis. *Periodontology 2000*, 43,278-293.

Kirkwood, K., Cirelli, J., Rogers, J., & Giannobile, W. (2008). Nuevos abordajes terapéuticos basados en la respuesta del hospedador para el tratamiento de las enfermedades periodontales, *Periodontology 2000*,18, 190-201.

Klein, G., (1989). Viral Latency and Transformation: The Strategy of Epstein Barr Virus. *58*(1), 5-8.

Klemenc, U., Skalerič, B., Artnik, P., Nograšek, J., Marin. (2005). Prevalence of Some Herpesviruses in Gingival Crevicular Fluid. *Journal of Clinical Virology*, 34(2), 147–152.

- Konstantinidis, A., Sakellari, D., Papa A., & Antoniadis, A. (2005). Real-Time Polymerase Chain Reaction Quantification of Epstein–Barr Virus in Chronic Periodontitis Patients. *J Periodont Res*, 40(4), 294–298.
- Kubar, A., Saygun, I., Ozdemir, A., Yapar, M., & Slots, J. (2005). Real-Time Polymerase Chain Reaction Quantification of Human Cytomegalovirus and Epstein Barr Virus in Periodontal Pockets and the Adjacent Gingiva of Periodontitis Lesions. *J Periodontal Res*, 40(2), 97-104.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjadack, R., Sjogreen, B., Strobom, L., Stahlberg, A., & Zoric, N. (2006). The Real Time Polymerase Chain Reaction. *Molecular aspects of Medicine*, 27(2-3), 95-125.
- Li, Y., Zhang, J. C., & Zhang, Y. H. (2004). The Association Between Infection of Epstein-Barr Virus and Chronic Periodontitis. *Chin J Stomat ol, March*, 39(2), 146-148.
- Lin, Y. L., & Li, M. (2009). Human Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus Inhibit Oral Bacteria-Induced Macrophage Activation and Phagocytosis. *Oral Microbiol Immunol*, 24(3), 243-8.
- Ling, L-J., Ho, C-C., Wu, C-Y., Chen, Y-T., Hung, S-L. (2004) Association Between Human Herpesvirus and the Severity of Periodontitis. *J Periodontol* ,75(11),1479-1485.
- Ling, P. D., Lednicky, J. A., & Keitel, W. A. (2003). The Dynamics of Herpesvirus and Polyomavirus Reactivation and Shedding in Healthy Adults: A 14-Month Longitudinal Study. *J Infect Dis* 187(10),1571–1580.

- Liukkonen, J., Gürsoy, U., Suominen, A., & Könönen, E. (2016). Salivary Levels of IL-1 $\beta$ , IL-17, and IL-23 in Localised and Generalized Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 87(12), 1484–1491.
- Loewendorf, A., & Benedict, C. A. (2010). Modulation of Host Innate and Adaptative Immune defenses by Cytomegalovirus: Timing is Everything. *Journal of Internal Medicine*, 267(5), 483-501.
- Mackowiak, P. A., Marling-Carson, M., Smith, J. W., & Luby, J. P. (1984). Antibody Mediated Bacterial Adhesion to Cytomegalovirus-induced Fc receptors. Potential Relationship to Secondary Infections Complicating Herpesvirus Infections. *J Clin Invest.* 73(4),987-991.
- Madrid, E., & Martínez, F., (2014). Statistics for the Faint of Heart – How to Interpret Confidence Intervals and p Values. *Medwave*, 14(1).
- Manterola C, & Otzen, T. (2015). Valoración Clínica del Riesgo, Interpretación y Utilidad Práctica, *Int. J. Morphology*, 33(3), 842-849.
- Manterola, C., & Otzen, T. (2014). Estudios Observacionales. Los Diseños Utilizados con Mayor Frecuencia en Investigación. *Clínica, Int. J. Morphol.*, 32(2), 634-645.
- Medina, M, Medina, M., & Merino, L. A., (2010). Identificación de Bacterias Periodontopatógenas Mediante Métodos Diagnósticos Moleculares. *Enf Inf microbiol* 30(3), 83-90.
- Michalowicz, B. S., Ronderos, M., Camara-Silva, R., Contreras, A., Slots, J. (2000). Human Herpesviruses and Porphyromonas Gingivalis are Associated with Juvenile Periodontitis. *J Periodontoly*, 71(6), 981–988.

- Milla, E. P., & Troulis, M. J. (1994). Herpes Zoster of the Trigeminal Nerve: the Dentist Role in Diagnosis and Managment. *Journal Canadian Dental Association*, 60(5),450-453.
- Ministerio de Salud. (2010) Guía Clínica Salud Oral Integral para Adultos de 60 años. Santiago: MINSAL. Recuperado desde <http://web.minsal.cl/portal/url/item/7221747c2c9484b7e04001011f0141a4.pdf>
- Moghim, S. H., Chalabi, M., Moghareh, A., Rezaei, F., & Tamizifar, H. (2007). Prevalence of Epstein - Barr virus Type 1 in Patients with Chronic Periodontitis by Nested-PCR. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(24), 4547-4550.
- Monzón, J., Acuña, M., Canga, E., & Ortega, S. (2011) Prevalencia de Herpes virus en bolsas periodontales de pacientes asistidos en la Cátedra de Periodoncia de la F.O.U.N.N.E., *Rev. Fundac. Juan Jose Carraro*,16(34), 36-49.
- Moreno, S., & Contreras, A. (2013).Mecanismos moleculares implicados en la destrucción ósea en la periodontitis. Revisión de la literatura. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 6(3), 142-147.
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987) Specific Synthesis of DNA in Vitro Via a Polymerase Catalysed Chain Reaction. *Meth. Enzymol.* 155,355-350.
- Murakami, T. (2016). Understanding and Treatment Strategy of the Pathogenesis of Periodontal Disease Based on Chronic Inflammation. *Clin Calcium*, 26(5), 766-772.

- Nanci, A., & Bosshardt, D. D. (2006). Structure of Periodontal Tissues in Health and Disease. *Periodontology 2000*, 40,11-28.
- Neumaier, M., Braun, A., & Wagener, S. (1998). Fundamentals of Quality Assessment of Molecular Amplification Methods in Clinical Diagnostic. International Federation of Clinical Chemistry Scientific Division Committee of Molecular and Biology techniques. *Clinical Chemistry*, 44(1), 12-26.
- Newcomb, W., Thomsen, D., Homa, F., & Brown, J. (2003). Assembly of the Herpes Simplex Virus Capsid: Identification of Soluble Scaffold-Portal Complexes and Their Role in Formation of Portal-Containing Capsids. *J Virol*, 77(18): 9862–9871.
- Nishihara, T., & Koseki, T. (2004). Microbial Etiology of Periodontitis. *Periodontology 2000*, 36,14-26.
- Nishiyama, S. A., Nakano, V., Vela'squez, G., & Avila-Campos, M. (2008). J. Occurrence of Herpes Simplex Virus 1 and Three Periodontal Bacteria in Patients with Chronic Periodontitis and Necrotic Pulp. *Canadian J Microbiology*, 54(4),326–330.
- Nunn, M. (2004). Interpretación de la etiología de la periodontitis: resumen de los factores de riesgo periodontales. *Periodontology 2000*, 7, 11-23.
- Oda, S., Nitta, H., Setoguchi, T., Izumi, Y., & Ishikawa, I. (2004). Conceptos actuales y avances de la instrumentación periodontal manual y mecánica. *Periodontology 2000*, 36(1), 45-58.

- Odumade, O., A., Hogquist, K., A., & Balfour, H., H. (2011) Progress and Problems in Understanding and Managing Primary Epstein-Barr Virus Infections. *Clin Microbiol Rev.*,24(1),193-209.
- Okuda, M., & Gómez. C. (2005). Método en investigación cualitativa: triangulación. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, XXXIV (1), 118-124.
- Papone, V., Verolo, C., Zaffaroni, L., Batlle, A., Capo, C., Bueno, L., Gamonal, J., Silva, N., & Soria, S. (2015). Detection and Prevalence of Periodontal Pathogens in a Uruguayan Population with Chronic Periodontitis Using Conventional Methodology and Metagenomics. *Odontoestomatología*, XVII(25).
- Parra, B., & Slots J. (1996). Detection of Human Viruses in Periodontal Pockets Using Polymerase Chain Reaction. *Oral Microbiol Immunol*,11(5),289–293.
- Perea, M., Campo, J., Escudero, N., & Bascones, A. (2006). Papel del Virus del Herpes Humano en la enfermedad periodontal. *CientDent*, 3(3),197-204.
- Pérez, C. D., & Castillo, A. (2011). Role of Herpes Virus in the Periodontal Disease. Consultation of literature. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 10(4), 458-464.
- Petrović, S. M., Zelić, K., Milasin, J., Popović, B., Pucar, A., & Zelić, O. (2014). Detection of Herpes Simplex Virus Type 1 in Gingival Crevicular Fluid of Gingival Sulcus/Periodontal Pocket Using Polymerase Chain Reaction. *Srp Arh Celok Lek.*,142(5-6),296-300.

- Pihlstrom, B.L., Michalowicz, B. S., & Johnson, N. W. (2005). Periodontal Diseases. *The Lancet* 366(9499),1809-1820.
- Pinto, G., Silva, M., Peddey, M., Sillankorva, S., & Azeredo, J. (2016). The Role of Bacteriophages in Periodontal Health and Disease. *Future microbiology*,11(10),1359-1369.
- Poggi, M., Guzmán, D., García, C., & Lagos, L. (2009). PCR universal o de amplio espectro": Un aporte a la detección e identificación de bacterias y hongos en la práctica clínica. *Revista Médica de Chile*, 137(8), 1122-1125.
- Preshaw, P., M., & Taylor, J., J. (2011). How Has Research into Cytokine Interactions and Their Role in Driving Immune Responses Impacted our Understanding of Periodontitis?, *Journal of Clin Periodontology.*; 38(11), 60-84..
- Prieto, A., Barbarroja, J., Barcenilla, H.,& Díaz, D. (2013). Funciones de los linfocitos B, *Medicine*,11(28),1752–1759.
- Rickinson, A. B., & Kieff, E. (2007). *Epstein Barr Virus. Fields virology.* Zurich:Springer
- Rotola, A., Cassai, E., Farina, R., Caselli, E., Gentili, V., Lazzarotto T., & Trombelli, L. (2008). Human Herpesvirus 7, Epstein-Barr Virus and Human Cytomegalovirus in Periodontal Tissues of Periodontally Diseased and Healthy Subjects. *J Clin Periodontol*, 35(10),831-837.
- Sahin, S., Saygun, I., Kubar, A., & Slots, J. (2009). Periodontitis Lesions are the Main Source of Salivary Cytomegalovirus. *Oral Microbiol Immunol.* 24(4), 340-342.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermo-stable DNA Polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- Santangelo, R., D'Ercole, S., Graffeo, R., Marchetti, S., Deli, G., Nacci, A., Piccolomini, R., Cattani, P., & Fadda, G. (2004). Bacterial and Viral DNA in Periodontal Disease: a Study Using Multiplex PCR, *New microbial* 27(2): 133-137
- Saygun, I., Kubar, A., Sahin, S., Sener, K., & Slots, J. (2008) Quantitative Analysis of Association Between Herpesviruses and Bacterial Pathogens in Periodontitis. *J Periodontal Res* 43(3), 352–359.
- Saygun, I., Kubar, A., Ozdemir, A., Yapar, M., & Slots, J. (2004). Herpesviral-Bacterial Interrelationships in Aggressive Periodontitis. *J Periodontal Res*.39(4), 207-212.
- Saygun, I., Sahin, S., Ozdemir, A., Kurtis, B., Yapar, M., Kubar, A, Ozcan G. (2002). Detection of Human Viruses in Patients with Chronic Periodontitis and the Relationship Between Viruses and Clinical Parameters. *J Periodontology*; 73(12),1437-1443.
- Seymour, G. J., & Taylor, J. J. (2004). Shouts and Whispers: An Introduction to Immunoregulation in Periodontal Disease. *Periodontology* 2000, 35, 9-13.
- Shah, R., Mehta, D., S. (2016). Prevalence of Herpesviruses in Gingivitis and Chronic Periodontitis: Relationship to Clinical Parameters and Effect of Treatment. *J Indian Soc Periodontol*, 20(3),279-85.
- Sharma, R., Padmalatha, O., Kaarthikeyan, G., Jayakumar, N. D., Varghese, S.,

- & Sherif, K. (2012). Comparative Analysis of Presence of Cytomegalovirus (CMV) and Epsteinbarr virus -1 (EBV-1) in Cases of Chronic Periodontitis and Aggressive Periodontitis with Controls. *Indian J Dent Res.* 23(4),454-458.
- Slots, J. (2002). Interactions between Herpesviruses and Bacteria in Human Periodontal Disease. En K. Brogden, J. Guthmiller (Eds.), *Polymicrobial diseases*. Washington (DC): ASM Press.
- Slots, J. (2004). Herpesviruses, the Missing Link Between Gingivitis and Periodontitis. *J Int Acad Periodontol* 6(4),113-119.
- Slots, J. (2006). Los Herpesvirus en las enfermedades periodontales. *Periodontology 2000*, 12, 33-62.
- Slots, J. (2010)a. Human Viruses in Periodontitis, *Periodontology 2000*. ; 53(1),89-110.
- Slots, J. (2010)b. Herpesviral-bacterial Interactions in Periodontal Diseases. *Periodontol 2000*, 52(1), 117–140.
- Slots, J. (2011). Herpesvirus Periodontitis: Infection Beyond Biofilm, *J Calif Dent Assoc.*, 39(6), 393-399.
- Slots, J. (2015). Periodontal Herpesviruses: Prevalence, Pathogenicity, Systemic Risk. *Periodontol 2000*. 69(1), 28-45.
- Slots, J., Kamma, J. J., & Sugar, C. (2003). The Herpesvirus-*Porphyromonas* *Gingivalis*-Periodontitis axis. *J Periodontal Res.*,38(3),318-323.
- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal Microbial Ecology. *Periodontology 2000*, 38, 135–187.

- Soetens, O., Vauloup-Fellous, C., Foulon, I., Dubreuil, P., De Saeger, B., Grangeot-Keros, L., & Naessens, A. (2016). Evaluation of Cytomegalovirus DNA PCR Protocols for Analysis of Dried Blood Spots from Consecutive Cases of Neonates with Congenital CMV Infections, *Journal of clinical microbiology*, 46(3), 943-946.
- Staras, S. A., Flanders, W. D., Dollard, S. C., Pass, R. F., McGowan, J. E., & Cannon, M. J. (2008). Cytomegalovirus Seroprevalence and Childhood Sources of Infection: A Population-based Study Among Pre-adolescents in the United States. *Journal of Clinical Virology*, 43(3), 266-271.
- Sugano, N., Ikeda, K., Oshikawa, M., Idesawa, M., Tanaka, H., Sato, S. & Ito, K. (2004). Relationship Between Porphyromonas Gingivalis, Epstein-Barr Virus Infection and Reactivation in Periodontitis. *Journal of oral science*, 46(4), 203-206.
- Sunde, P. T., Olsen, I., Enersen, M., & Grinde, B. (2008). Human Cytomegaloviruses and Epstein Barr Virus in Apical and Marginal Periodontitis: A Role of Pathology. *J Med Virol*. 80(6), 1007-1011.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en salud*, 2(2), 70-78.
- Tanaka, T., Cogawua, K., Sasa, H., Nonoyama, S., Furuya, K., & Sato, K. (2009) Rapid and Simultaneous Detection of 6 Types of Human Herpes Virus (Herpes Simplex Virus, Varicela Zoster Virus, Epstein Barr Virus, Cytomegalovirus, Human Herpes Virus (6/B and Human Herpes Virus 7) by Multiplex PCR Assay. *Biomedical research*, 30(5): 279-285.

- Tantivanich, S., Laohapand, P., & Thaweeboon, S. (2004). Prevalence of Cytomegalovirus, Human Herpesvirus-6, and Epstein-Barr Virus in Periodontitis Patients and Healthy Subjects in the Thai Population. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 35(3), 635–640.
- Tarasevich, I. V., Shaginyan, I. A., & Mediannikov, O. (2003). Problems ADN Perspectives of Molecular Epidemiology of Infectious Diseases, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990(1), 751-756.
- Teng, Y-T., A. (2006). Protective and Destructive Immunity in the Periodontium: Part 1—Innate and Humoral Immunity and the Periodontium. *Journal of Dental Research* 85(3),198-208.
- Teughels, W., Sliepen, I., Quirynen, M., Haake, S. K., Van Eldere, J., & Fives-Taylor, P (2007). Human Cytomegalovirus Enhances A. Actinomycetemcomitans Adherence to Cells. *J Dent Res*, 86(2), 175–180.
- Thomasini, R. L., Bonon, S. H., Durante, P., & Costa, S. C. B. (2012). Correlation of Cytomegalovirus and Human Herpesvirus 7 with CD3+ and CD3+CD4+ cells in Chronic Periodontitis Patients. *J Periodont Res*; 47 (1), 114–120.
- Tyler, K. L., & Fields, B. N. (1996). Pathogenesis of Viral Infections. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*, 3rd edn. (pp. 173-218). Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Veiga de Cabo, J., Fuente, E., & Zimmermann, M. (2008). Modelos de estudios en investigación aplicada: conceptos y criterios para el diseño. *Medicina y Seguridad del Trabajo*, 54(210), 81-88.

- Villalba, J., & Valdés, R. (2000). Las citocinas en la patogénesis por citomegalovirus. *Rev Biomed* 2000, 11(4), 293-300
- Villegas, V., Sánchez, M., & Chuaira, L. (2009). Reacción en cadena de la polimerasa y diagnóstico molecular. *Revista Colombia médica*, 40(3), 347-352.
- Vincent-Bugnas, S., Vitale, S., Mouline, C. C., Khaali, W., Charbit, Y., Mahler, P., Prêcheur, I., Hofman, P., Maryanski, J., & Doglio, A. (2013) EBV Infection Is Common in Gingival Epithelial Cells of the Periodontium and Worsens during Chronic Periodontitis. *PLoS ONE* 8(12), 1-5.
- Von Elma, S., Douglas, G., Altman, L., Stuart, P., & Jan, P. (2007). The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology [STROBE] Statement: Guidelines for Reporting Observational Studies, *Preventive Medicine*, 45(4), 247-251.
- Wu, Y., M., Yan, J., Chen, L., L., Sun, W., L., & Gu, Z., Y. (2006). Infection Frequency of Epstein–Barr Virus in Subgingival Samples from Patients with Different Periodontal Status and its Correlation with Clinical Parameters. *J Zhejiang Univ Sci B.*, 7(11), 876–883.
- Wu, Y. M., Yan, J., Ojcius, D. M., Chen, L. L., Gu, Z. Y., & Pan, J. P. (2007). Correlation Between Infections with Different Genotypes of Human Cytomegalovirus and Epstein–Barr Virus in Subgingival Samples and Periodontal Status of Patients. *J Clin Microbiol.* 45(11), 3665–3670.
- Yapar, M., Saygun, I., Ozdemir, A., Kubar, A., & Sahin, S. (2003). Prevalence of Human Herpesviruses in Patients with Aggressive Periodontitis. *J Periodontol* 74(11), 1634-1640.

Zhu, C., Li, F., Wong, M. C. M., Feng, X-P., Lu, H. X., & Xu, W. (2015). Association Between Herpesviruses and Chronic Periodontitis: A Meta-Analysis Based on Case-Control Studies. *Plos one* 10(12), 1-13.





**Anexo I. Continuación**

Klemenc, 2005			Botero, 2008			Nishiyama, 2008			Combs, 2008			Dawson, 2009			Das, 2012			Tantivanich, 2004			Rotola, 2008			Dawson, 2009			Sugano 2004		
66			37			50			13			65			10			50			24			65			33		
EBV	CMV	HSV	EBV	CMV	HSV	EBV	CMV	HSV	EBV	CMV	HSV	EBV	CMV	HSV	EBV	CMV	HSV	EBV	CMV	HSV	EBV	CMV	HSV	EBV	CMV	HSV	EBV	CMV	HSV
								1																					
								1																			1		
												1																	
1																											1		
																											1		
1				1						1								1		1		1				1		1	
				1													1										1		
												1															1		

## Anexo II. Materiales y Métodos

Publicación	Tamaño muestra	Tipo de muestras	Técnica de extracción de muestra	Tipo de PCR
Contreras, 2000	14	Biofilm subgingival	Puntas de papel	Anidado
Saygun, 2002	30	Biofilm subgingival	Punta de papel	Anidado
Li Ying, 2004	62	Biofilm subgingival	Puntas de papel	Anidado
Ling LJ, 2004	20	Biofilm subgingival	Puntas de papel	Anidado
Tantivanich, 2004	50	Fluido crevicular gingival	Puntas de papel	Anidada
Idesawa, 2004	33	Saliva estimulada	Tubos plásticos	Tiempo real
Klemenc, 2005	66	Fluido crevicular gingival	Puntas de papel	Anidada
Konstantinidis, 2005	22	Surco gingival	Puntas de papel	Tiempo real
Wu, 2006	65	Biofilm subgingival	Punta de papel	Anidada
Moghim, 2007	61	Biofilm subgingival	Curetas	Anidado
Wu, 2007	143	Biofilm subgingival	Puntas de papel	Anidado
Botero, 2007	20	Biofilm subgingival	Punta de papel	Anidado
Imbrono, 2008	30	Biofilm subgingival	Puntas de papel	Anidado
Saygun, 2008	15	Biofilm subgingival	Curetas	Tiempo real
Imbrono, Grande, 2008	40	Biofilm subgingival	Puntas de papel	Anidado
Botero, 2008	37	Fluido crevicular gingival	Puntas de papel	Anidada
Rotola, 2008	24	Tejido gingival	Biopsia	Anidada
Combs, 2008	13	Biofilm subgingival/Saliva	Cureta	Tiempo real
Chalabi, 2008	61	Biofilm subgingival	Cureta	Anidado
Nishiyama, 2008	50	Biofilm subgingival	Punta de papel	Anidado
Grenier, 2009	31	Fluido crevicular gingival	Puntas de papel	Anidado
Chalabi, 2009	40	Biofilm subgingival	Curetas	Anidado
Dawson, 2009	65	Saliva	Tubos de plásticos	Tiempo real
Dawson, 2009	65	Biofilm subgingival	Cureta	Tiempo real
Nibali, 2009	20	Biofilm subgingival	Cureta	Tiempo real
Bilichodmat, 2009	19	Biofilm subgingival	Cureta	Múltiple
Sahin, 2009	14	Saliva estimulada	Tubos plásticos	Tiempo real
Saigun, 2011	46	Biofilm subgingival	Cureta	Tiempo real
Monzon, 2011	30	Biofilm subgingival	Puntas de papel	Anidada
Sharma, 2012	20	Biofilm subgingival	Curetas	Anidado
Das, 2012	10	Biofilm subgingival	Cureta	Múltiple
Thomasini RL, 2012	20	Saco Periodontal	Biopsia	Anidada
Farias, 2013	28	Biofilm subgingival	Puntas de papel	PCR
Kato, 2013	85	Biofilm subgingival	Punta de papel	Anidado
Leon Bilder, 2013	59	Saliva estimulada	Tubos plásticos	Tiempo real
Vincent-Bugnas, 2013	20	Biofilm subgingival	Cureta	Tiempo real
Petrovic, 2014	36	Fluido crevicular gingival	Puntas de papel	Anidado
Kato, 2014	25	Biofilm subgingival	Puntas de papel	Tiempo real
Kazi MM, 2015	75	Biofilm subgingival	Curetas	Múltiple
Khosropanaha, 2015	75	Saliva/Tejido gingival	Punta de papel	Tiempo real
Mohammad, 2015	75	Biofilm subgingival	Cureta	Múltiple
Shah, 2016	40	Fluido crevicular gingival	Puntas de papel	Múltiple
Hernández, 2016	11	Fluido crevicular gingival	Puntas de papel	Anidada
Rucha Shah, 2016	40	Surco gingival	Puntas de papel	Múltiple
Sugano 2004	33	Saliva estimulada	Tubos plásticos	Tiempo real

### Anexo III. Tabla de prevalencia de los virus EBV, HSV y HCMV

Publicación	Bilichodmat, 2009	Rucha Shad, 2016	Imbronito, 2008	Ling LJ, 2004	Das, 2012	Kazi MM, 2015	Mohammad, 2015	Saygun, 2002	Leon Bilder, 2013	Grenler, 2009	Hernández, 2016	Wu, 2007	Chalabi, 2008	Sahin 2009	Imbronito, Grande, 2008	Chalabi, 2009	Contreras, 2000	Dawson, 2009	Khosropanaha 2015	Rotola, 2008	
Tamaño muestra	19	40	30	20	10	75	75	30	59	31	11	143	61	14	40	40	14	65	75	24	
VIRUS (%)																					
EBV	78	62	46,7	15	32	37,33	37	16,7	40	3	18	63,6	73,8	79	45	72,5	43	82	51,3	50	
HSV	100	92	40	50	76	28	28	6,7	5	13	27										
CMV	26	15	50	75	28	30,66	30	44,3	15	35	0	79	59	50	82,5	50	64	2	21,6	0	

Klemenc, 2005	Dawson, 2009	Sharma, 2012	Tantivanich, 2004	Botero, 2008	Kato, 2015	Kato, 2013	Wu, 2006	Moghim, 2007	Botero, 2007	Li Ying, 2004	Konstantinidis 2005	Idesawa, 2004	Li X, 2011	Petrovic, 2014	Wu, Chen, 2005	Thomasini 2012	Monzon, 2011	Vincent-Bugnas, 2013	Sugano 2004
66	65	20	50	37	25	85	65	61	20	62	22	33	24	36	65	20	30	20	33
44	44,6	25	0		68	66	66	60,7		58	54	49	41,7		36,5			13	48,5
3	0	20	8	80					60					38,9			17		
																30			