

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

En vista de la obtención del grado de
LICENCIATURA EN ODONTOLOGÍA

Otorgado por
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Presentado y defendido por

Lucía Ortiz Acuña
Alexa Mora González
Rosibel del Carmen Rodríguez Masís

El día

16 de diciembre del 2021

Título

**ESTADO GINGIVAL Y PRESENCIA DE BACTERIAS
DEL COMPLEJO ROJO EN NIÑOS DE 12 AÑOS DE LA
ESCUELA CARMEN LYRA**

Comité Asesor

Karol Gabriela Ramírez Chan
Alberto Vega Chin
Adrián Gómez Fernández
Sandra Silva de la Fuente

HOJA DE APROBACIÓN DE LA MEMORIA PARA LA DEFENSA PÚBLICA

SEMINARIO DE GRADUACIÓN

Nombre del proyecto:

Estado gingival y presencia de bacterias del complejo rojo en niños de 12 años de la Escuela

Carmen Lyra

Sustentantes

Nombre	Número de carné
Lucía Ortiz Acuña	B55208
Alexa Mora González	B44557
Rosibel del Carmen Rodríguez Masis	B45931

Miembros del Comité Asesor

Nombre
Dra. Karol Gabriela Ramírez Chan
Dr. Alberto Vega Chin
Dr. Adrián Gómez Fernández
Dra. Sandra Silva de la Fuente

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SEDE RODRIGO FACIO BRENES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Acta de Defensa Pública, modalidad Seminario de Graduación


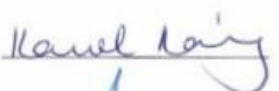




Se informa que la estudiante **Ortíz Acuña Lucía**, carné No. **B55208**, postulante a obtener el grado de Licenciatura en Odontología, ha realizado la Defensa Pública de su Trabajo Final de Investigación titulado: *"Estado gingival y presencia de bacterias del complejo rojo en niños de 12 años de la Escuela Carmen Lyra"* el día 16 de diciembre de 2021.

El resultado de dicha defensa fue:

Aprobado _____

No aprobado _____

Se le concede aprobación con distinción _____

Nombre	Firma	No. Cédula
Ortíz Acuña Lucía Sustentante		<u>116900648.</u>
TRIBUNAL EXAMINADOR		
Dra. Karol Ramírez Chan Directora		<u>109870022</u>
Dr. Adrián Gómez Fernández Asesor		<u>110720581</u>
Dra. Sandra Silva de la Fuente Asesora		<u>104610613</u>
Dra. Gina Murillo Knudsen Representante Externa		<u>108100332</u>
Dr. Carlos Filloy Esna Decano		<u>103901020</u>



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SEDE RODRIGO FACIO BRENES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Acta de Defensa Pública, modalidad Seminario de Graduación

Se informa que la estudiante **Mora González Alexa**, carné No. **B44557**, postulante a obtener el grado de Licenciatura en Odontología, ha realizado la Defensa Pública de su Trabajo Final de Investigación titulado: *“Estado gingival y presencia de bacterias del complejo rojo en niños de 12 años de la Escuela Carmen Lyra”* el día 16 de diciembre de 2021.

El resultado de dicha defensa fue:

Aprobado X

No aprobado _____

Se le concede aprobación con distinción _____

Nombre

Firma

No. Cédula

Mora González Alexa

Sustentante

402270417

TRIBUNAL EXAMINADOR

Dra. Karol Ramírez Chan

Directora

109870022

Dr. Adrián Gómez Fernández

Asesor

110720581

Dra. Sandra Silva de la Fuente

Asesora

104610613

Dra. Gina Murillo Knudsen

Representante Externa

108100332

Dr. Carlos Filloy Esna

Decano

103901020



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

FOd Facultad de
Odontología

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SEDE RODRIGO FACIO BRENES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Acta de Defensa Pública, modalidad Seminario de Graduación

Se informa que la estudiante **Rodríguez Masís Rosibel del Carmen**, carné No. **B45931**, postulante a obtener el grado de Licenciatura en Odontología, ha realizado la Defensa Pública de su Trabajo Final de Investigación titulado: **"Estado gingival y presencia de bacterias del complejo rojo en niños de 12 años de la Escuela Carmen Lyra"** el día **16 de diciembre de 2021**.

El resultado de dicha defensa fue:

Aprobado

No aprobado

Se le concede aprobación con distinción

Nombre	Firma	No. Cédula
Rodríguez Masís Rosibel del Carmen Sustentante		7 0235 0244
TRIBUNAL EXAMINADOR		
Dra. Karol Ramírez Chan Directora		10 987 0022
Dr. Adrián Gómez Fernández Asesor		110 720 521
Dra. Sandra Silva de la Fuente Asesor a		104610613
Dra. Gina Murillo Knudsen Representante Externa		105100332
Dr. Carlos Filloy Esna Decano		103901020

DEDICATORIA

Este trabajo final de graduación está dedicado a mis padres, Anabelle y Luis, quienes con su amor, paciencia y presencia me han ayudado a concluir esta etapa. Gracias por inculcarme con su ejemplo el significado de esfuerzo y perseverancia. A mi hermana, Marcela, por su apoyo y cariño durante todo el proceso, a mi hermano, Esteban, por su confianza y a toda mi familia que siempre tuvo palabras de aliento. A mis amigos y amigas que serán colegas, este camino no habría sido el mismo sin su compañía, ni mis recuerdos serían tan preciados. Agradezco a todas las personas que de alguna manera ayudaron a forjar la profesional en la que me convertí, los llevo en mi mente y corazón. Finalmente, agradezco a Dios por ser el pilar de este logro.

Lucía Ortiz Acuña

A mis padres, quienes han sido mi apoyo incondicional desde el día en que llegué a este mundo y espero poder un día ser el suyo. A mis hermanas, Andrea y Natalia, por ser mis otras madres, amigas, confidentes, pero, sobre todo, mi ejemplo a seguir. Espero un día estar a la altura de sus logros. A mi familia le agradezco creer en mí, aun cuando ni yo misma encuentro cómo. A los amigos que encontré a lo largo de estos años, a los que ya no están y a los que siguen en mi vida, agradezco cada lágrima y risa compartida, por poder crecer juntos y hacer de los tiempos más difíciles, los recuerdos más preciados. A mis profesores e instructores de clínica, quienes con su dedicación y amor, me han enseñado a ejercer con amor y excelencia el arte de la odontología. A cada uno de mis pacientes, por depositar en mí su confianza. Agradezco especialmente a Dios, que ha guiado, cuidado y bendecido enormemente cada uno de mis pasos y en quien he hallado la fuerza para crecer cada día.

Alexa Mora González

En el cierre de esta etapa de mi vida que culmina con la realización del presente trabajo de graduación, agradezco primeramente a Dios por darme salud, sabiduría y capacidad necesarias para llegar hasta aquí. A mis padres porque desde el primer momento me han apoyado de todas las maneras posibles y sin ellos no podría haber realizado este sueño, todo lo que soy ahora se lo debo a ellos. Gracias, por cada uno de los esfuerzos y las innumerables muestras de amor que me entregaron, por cada viaje a San José, por cada llamada, por cada detalle que sumaban a mi bienestar integral, siempre guardaré sus muestras de amor en mi corazón. A mis hermanos, que me ofrecieron su mano para que me sirviera de apoyo, compañía y en ocasiones hasta agilizadora de procesos; con esto he percibido una vez más su gran amor. A mi novio, por estar siempre en absolutamente todos los retos, dificultades, disgustos, alegrías, pequeños y grandes triunfos, decisiones, planeaciones; gracias por su amor, motivación y consejos que me dio cada día. A mi abuelita, Sara, por dejar su hogar para acompañarme durante los primeros años de universidad, por estar fielmente a mi lado y entregarme todo el amor a manos abiertas; su compañía fue esencial en esos primeros años cuando el cambio de vida juega un papel importante e influye directamente en lo académico. No podría enlistar un orden de prioridad para las personas anteriormente mencionadas, pues todas juntas construyeron la base de la profesional que soy ahora.

Rosibel Rodríguez Masís

HOJA DE REVISIÓN POR EL (LA) FILÓLOGO(A)

7 de diciembre de 2021

Señores
Facultad de Odontología
Universidad de Costa Rica

Estimados señores:

Les informo que, en mi condición de graduada en Filología Española de la Universidad de Costa Rica, he revisado con base en la normativa que rige el español actual el trabajo final de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Odontología de las estudiantes Lucía Ortiz Acuña, Alexa Mora González y Rosibel Rodríguez Masís, el cual se titula Estado gingival y presencia de bacterias del complejo rojo en niños de 12 años de la Escuela Carmen Lyra.

El trabajo de revisión filológica se ha efectuado para mejorar la calidad, coherencia y fluidez del texto, para lograrlo se han tomado en cuenta aspectos relacionados con la ortografía, la sintaxis y la gramática de manera que se minimicen las imprecisiones y la presentación del texto escrito sea la más adecuada para un trabajo final de graduación.

Atentamente,


Ana María Fournier Vargas

ÍNDICE GENERAL

TABLA DE CONTENIDO

Hoja de aprobación de la memoria para la defensa pública.....	ii
Actas de Defensa Pública.....	iii
Dedicatoria.....	vi
Hoja de revisión por la filóloga.....	viii
Índice.....	ix
Lista de tablas.....	xi
Lista de figuras.....	xii
Lista de abreviaturas.....	xiii
Resumen.....	xv
Abstract.....	xvi
Prefacio.....	xvii

I PARTE: MARCO CONCEPTUAL

Capítulo I: Epidemiología de la gingivitis en niños y adolescentes.....	2
Índices más utilizados para determinar la prevalencia de gingivitis	3
Epidemiología de la gingivitis	6
Capítulo II: Presencia de microorganismos periodontopatógenos en niños y adolescentes.....	9
Microorganismos periodontopatógenos del complejo rojo	10
1. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	10
2. <i>Tannerella forsythia</i>	13
3. <i>Treponema denticola</i>	15
Capítulo III: Características que influyen en la susceptibilidad a la enfermedad periodontal en niños y adolescentes	20

Factores de riesgo intrínsecos	20
Factores de riesgo extrínsecos	24
II PARTE: ARTÍCULO CIENTÍFICO	
Resumen.....	27
Introducción.....	28
Metodología.....	33
Resultados.....	40
Discusión.....	46
Conclusión	51
Referencias.....	53
Apéndices.....	58
Anexos.....	69

LISTA DE TABLAS

1. Componentes y volúmenes de la reacción de amplificación.
2. Programa de amplificación llevado a cabo para el análisis de las muestras.
3. Nomenclatura, composición y temperatura de hibridación de los pares de *primers* utilizados en la amplificación de ADN.
4. PCR de las bacterias del complejo rojo: *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Treponema denticola* (*Td*) y *Tannerella forsythia* (*Tf*), en las muestras de saliva de los niños de 12 años de la Escuela Carmen Lyra.

LISTA DE FIGURAS

1. Clasificación de las condiciones y enfermedades periodontales y periimplantares.
Fuente: Caton J., et al. (2018) (5).
2. Resultados de muestras para *Porphyromonas gingivalis* de 1-13.
3. Resultados de muestras para *Porphyromonas gingivalis* de 14-26.
4. Resultados de muestras para *Porphyromonas gingivalis* de 27-38.
5. Resultados de muestras para *Porphyromonas gingivalis* de 40-52.
6. Resultados de muestras para *Porphyromonas gingivalis* de 53-62.
7. Resultados de muestras para *Treponema denticola* de 1-12.
8. Resultados de muestras para *Treponema denticola* de 13-25.
9. Resultados de muestras para *Treponema denticola* de 26-37.
10. Resultados de muestras para *Treponema denticola* de 38-50.
11. Resultados de muestras para *Treponema denticola* de 51-62.
12. Resultados de las muestras para *Tannerella forsythia* utilizando el gel de electroforesis.

LISTA DE ABREVIATURAS

IB – Índice de biofilme

IHOS – Índice de higiene oral simplificado

OMS – Organización Mundial de la Salud

FV – Factor de virulencia

PMN's – Polimorfonucleares

LPS – Lipopolisacáridos

P.g – *Porphyromonas gingivalis*

T.f – *Tannerella forsythia*

T. d – *Treponema denticola*

OMV (por sus siglas en inglés) – Vesículas de la membrana externa

LrrA – Proteínas de repetición ricas en leucina

IL – Interleuquina

CCL2 (por sus siglas en inglés) – Ligando quimioatrayente 2

PF (por sus siglas en inglés) – Flagelos periplásmicos

LFT – Lactoferrina

hBD-1 – β -defensin 1 humana

VIH – Virus de la inmunodeficiencia humana

TSH (por sus siglas en inglés) – Hormona estimuladora de tiroides

PCR (por sus siglas en inglés) – Reacción en cadena de la polimerasa

UV – Ultravioleta

RESUMEN

Objetivo. Determinar el estado gingival y la presencia de bacterias del complejo rojo en muestras de saliva de niños de 12 años de la Escuela Carmen Lyra.

Metodología. Una periodoncista calibrada evaluó en 62 estudiantes de 12 años de la Escuela Carmen Lyra, el índice de biofilme (IB) (Silness y Løe, 1964), la presencia de cálculo y el índice gingival (IG) (Silness y Løe, 1967). Se recolectaron muestras de saliva de cada estudiante. El ADN de cada muestra fue extraído y amplificado utilizando la prueba PCR, empleando *primers* específicos, para así determinar la presencia de bacterias del complejo rojo.

Resultados: El IB fue de 1.18. El cálculo estuvo presente en el 40.40% de la muestra, se encontró 19.4% de cálculo en supragingival y 21% tanto en supragingival como en subgingival. El IG fue de 0.97, que según Silness y Løe corresponde a una gingivitis leve. La gingivitis estuvo presente en el 96.8% de los niños examinados. Con respecto a las pruebas PCR, 18 de las muestras (31.58%) no presentaron ninguna de las bacterias analizadas y los 39 restantes (68.42%) resultaron positivas, con la presencia de al menos una de las bacterias del complejo rojo.

Conclusión. Entre las limitaciones de este estudio, se concluye que la prevalencia de gingivitis y cálculo es alta en la población examinada y el estado gingival observado puede estar relacionado con la presencia de bacterias del complejo rojo.

Palabras clave: complejo rojo, ADN, PCR, índice de biofilme, índice gingival, cálculo, gingivitis, salud gingival

ABSTRACT

Objective: Determine the gingival state and presence of red complex bacteria present in saliva samples of 12-year-old children from Carmen Lyra School.

Methods: A calibrated periodontist evaluated in 62 (12-year-old) students from Carmen Lyra School the Biofilm Index (IB) (Silness and Løe, 1964), the presence of calculus and the Gingival Index (GI) (Silness and Løe, 1967). Saliva samples were collected from each student. DNA of each sample was extracted and amplified, using PCR test, using specific primers, to determine the presence of red complex bacteria.

Results: The BI was 1.18. The calculus was present in 40.40% of the sample, 19.4% of supragingival calculus was found, and 21% both supragingival and subgingival calculus. The GI was 0.97, according to Silness and Løe, mild gingivitis. Gingivitis was present in 96.8% of the children examined. Regarding the PCR tests, 18 of the samples (31.58%) did not present any of the red complex bacteria, and the 39 remaining samples (68.42%) were positive to the presence of at least one of the bacteria analyzed.

Conclusions: Within the limitations of this study, it is concluded that the prevalence of gingivitis and calculus is high in the examined sample, and this gingival status may be related to the presence of red complex bacteria.

Keywords: red complex, DNA, PCR, biofilm index, gingival index, calculus, gingivitis, gingival health

PREFACIO

La Escuela Carmen Lyra se encuentra en el cantón de Alajuelita en la provincia de San José, Costa Rica. Los alumnos que recibe la institución presentan una condición de riesgo social alta. Desde el 2013, la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica brinda atención clínica en odontología a los estudiantes de esa escuela y realiza actividades de educación, protección y promoción de la salud bucal, así como de prevención de las enfermedades orales, tanto a los alumnos como a padres y administrativos, por medio de estudiantes de Odontología que realizan su rotación en el curso de Externado Clínico y del Posgrado en Odontopediatría.

Para este estudio, se tomó como muestra la población estudiantil de la escuela que se encontraba en sexto grado durante el 2019, con el objetivo de determinar el estado gingival de los participantes y la presencia de bacterias del complejo rojo en sus muestras de saliva. Se realizó un estudio transversal, en el cual se evaluó el IB (Silness y Løe, 1964), la presencia de cálculo y el IG (Silness y Løe, 1967) en 62 niños de 12 años. Se recolectaron muestras salivales de los 62 estudiantes, con ese fin cada participante debió efectuar un enjuague. Esas muestras recolectadas se analizaron utilizando la extracción orgánica de ADN y amplificación por PCR, empleando *primers* específicos, para determinar la presencia de las bacterias del complejo rojo en el medio ambiente oral de los escolares estudiados.

Adicionalmente, se realizó una revisión bibliográfica sobre la epidemiología de gingivitis en niños y adolescentes, así como de bacterias del complejo rojo y su relación en el desarrollo temprano de la enfermedad periodontal y de los factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad en niños. El fin de esta revisión bibliográfica fue comprender el contexto epidemiológico reportado hasta el momento y así relacionar la presencia de las bacterias y los factores de riesgo como indicadores del desarrollo de gingivitis en la población estudiada.

PARTE I

MARCO CONCEPTUAL

CAPÍTULO I

Epidemiología de la gingivitis en niños y adolescentes

Según Chapple *et al.* (2018), la salud gingival clínica se define como el sangrado al sondaje en menos del 10% de los sitios, eritema y edema, además de ausencia de pérdida de inserción y pérdida ósea (1). En caso de que exista ausencia de salud gingival, se está en presencia de gingivitis, la cual se puede producir por distintos factores, entre los cuales están los siguientes:

Gingivitis inducida por biofilme. Se define esta enfermedad como una inflamación local inducida por el acúmulo de biofilme que se encuentra dentro del tejido gingival. La enfermedad es reversible si se reducen los niveles de biofilme (1).

Alteraciones gingivales no inducidas por biofilme. Son un grupo de diferentes trastornos no inducidos por la acumulación biofilme en los márgenes gingivales y que no se resuelven por completo cuando el biofilme se elimina. Estas lesiones pueden estar localizadas en los tejidos gingivales o ser manifestaciones de ciertas enfermedades sistémicas (2).

Si la gingivitis no se controla, es probable que la enfermedad avance a periodontitis, la cual se convierte en una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial, cuya causa más común se debe a un biofilme disbiótico que se caracteriza por la destrucción progresiva del aparato de sostén del diente, presencia de bolsas periodontales y sangrado gingival (3).

Las enfermedades periodontales, de acuerdo con Mohanty *et al.* (2019), son infecciones multifactoriales provocadas por un complejo de especies bacterianas que interactúan con los tejidos y las células del hospedador y provocan la liberación de una amplia gama de citoquinas inflamatorias, quimiocinas y mediadores inmunológicos, algunos de los cuales provocan la

destrucción de las estructuras periodontales, incluido el diente y los tejidos de soporte dental, hueso alveolar y el ligamento periodontal (4).

En el 2018, la Academia Americana de Periodoncia y la Federación Europea de Periodoncia presentaron una nueva clasificación de la enfermedad y de las condiciones periodontales (una actualización con respecto a la definida en 1999), incluyendo enfermedades y condiciones sistémicas que afectan los tejidos de soporte periodontal. En el siguiente cuadro se presenta la clasificación de la enfermedad periodontal y las condiciones periodontales.

CLASIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES PERIODONTALES Y PERIIMPLANTARIAS 2017										
Condiciones y Enfermedades Periodontales										
Salud periodontal y enfermedades gingivales			Periodontitis			Otras condiciones que afectan el periodonto				
Salud gingival y periodontal	Gingivitis inducida por biofilme dental	Enfermedades gingivales no inducidas por biofilme dental	Enfermedades periodontales necrosantes	Periodontitis	Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas	Condiciones o enfermedades sistémicas afectando los tejidos de soporte periodontal	Abscesos periodontales y lesiones endo-periodontales	Condiciones y deformidades mucogingivales	Factores relacionados con los dientes y las prótesis	
Condiciones y enfermedades periimplantarias										
Salud periimplantaria		Mucositis periimplantaria			Periimplantitis		Deficiencia de los tejidos duros y blandos periimplantarios			

Figura 1. Clasificación de las condiciones y enfermedades periodontales y periimplantares.

Fuente: Caton J., et al. (2018) (5).

Índices más utilizados para determinar la prevalencia de gingivitis

La salud y el estado gingival pueden ser determinados por medio de índices ideados específicamente para este fin, los cuales permiten diagnosticar la enfermedad periodontal, comprender su grado de severidad y, también, brindan información esencial al profesional en odontología con respecto al nivel de educación y compromiso que posee cada paciente en relación con su higiene oral.

El índice de sangrado al sondaje es uno de esos medios para establecer el estado de salud periodontal, el cual representa la proporción de zonas sangrantes al sondaje utilizando una sonda periodontal estandarizada y con una fuerza controlada en seis puntos (mesiovestibular, centrovestibular, distovestibular, mesiolingual, centrolingual, distolingual) de todos los dientes presentes. Se expresa en porcentaje y se debe sumar de la cantidad total de puntos sangrantes, después dividirlo entre la cantidad total de puntos medidos y multiplicar el resultado por 100 (6).

Otro de los índices más utilizados para determinar la salud oral es el índice de higiene oral simplificado (IHOS) descrito por Greene y Vermillion (1964). Este índice toma en cuenta el grado de materia alba y el cálculo que cubre la superficie dentaria de dientes permanentes completamente erupcionados (7), y se puntúa de la siguiente manera:

Grados de materia alba: 0= libre de materia alba, 1= hasta 1/3 de la superficie cubierta por materia alba (las manchas extrínsecas se consideraron como grado 1), 2= no más de 2/3 de la superficie cubierta, 3= más de 2/3 de la superficie cubierta por materia alba.

Grados de cálculo: 0= no existe cálculo, 1= cálculo supragingival que alcanza hasta 1/3 de la superficie examinada, 2= cálculo supragingival que cubre más de 1/3 de la superficie examinada, pero no más de 2/3 de la superficie, o áreas individuales de cálculo subgingival alrededor de la porción cervical del diente, 3= cálculo supragingival que cubre más de 2/3 de la superficie examinada o un área extensa de cálculo subgingival alrededor de la porción cervical del diente.

Este índice utiliza seis piezas trazadoras: 16, 11, 26, 46, 31, 36 o sus sustituyentes, 27, 21, 27, 47, 41, 37. Los valores obtenidos se suman en vestibular maxilar y el resultado se divide entre el número de piezas maxilares; lo mismo se hace en palatino, en vestibular mandibular y se divide entre el número de piezas mandibulares, lo mismo en lingual. Con lo cual se obtendrán

cuatro subíndices que se suman y se dividen entre cuatro para obtener el índice final. El índice se clasifica en alto, moderado o bajo riesgo de acuerdo con los siguientes rangos: [0 – 0.6]: Bajo riesgo. [0.7 -1.8]: Moderado riesgo. [1.9 – 3]: Alto riesgo (7).

El índice gingival de Silness y Løe (1967) evalúa dos características importantes de la gingivitis: edema y sangrado, por lo que se limita al registro de gingivitis, no considera signos de periodontitis y utiliza los siguientes criterios: 0= encía normal, 1= inflamación leve (ligero cambio en color, ligero edema y sin sangrado en sondeo), 2= inflamación moderada (enrojecimiento, edema. sangrado al sondaje), 3= inflamación severa (enrojecimiento marcado y edema, ulceración y tendencia a sangrado espontáneo). Los sujetos con inflamación leve tienen una puntuación de 0.1-1.0, aquellos con inflamación moderada de 1.1-2.0, y una puntuación entre 2.1-3.0 significa inflamación severa (8).

El índice de biofilme de Silness y Løe (1964) examina por vestibular y palatino/lingual toda la dentición o dientes seleccionados (piezas trazadoras) y se utilizan los siguientes criterios: 0= no hay presencia de placa, 1= una capa de biofilme adherida al margen gingival y adyacente al diente (no es detectado a simple vista, solamente posterior a la aplicación de tinción para biofilme), 2= acumulación moderada de biofilme a la vista en bolsa gingival, en el diente y/o margen gingival, 3= acumulación abundante de biofilme en la bolsa gingival y/o en el diente y margen gingival (9).

El Índice Periodontal Comunitario se estableció con el fin de evaluar mediante un método simple, rápido y objetivo las necesidades de tratamiento periodontal en diferentes poblaciones. Los parámetros registrados son sangrado al sondaje, profundidad de la bolsa, presencia de cálculo y factores retentivos de biofilme, con el propósito de determinar el tratamiento que necesitan los individuos de la población estudiada. Este índice no fue diseñado para determinar la prevalencia ni la severidad de la enfermedad (10).

Epidemiología de la gingivitis

A lo largo del tiempo se han realizado estudios en diferentes partes del mundo que muestran cifras alarmantes con respecto a la prevalencia de gingivitis en niños y adolescentes.

En Asia, Ballouk y Dashash en el 2018, publicaron: *The gingival health status of 8–12 year-old children in Damascus city in Syria during the Syrian Crisis: a cross-sectional epidemiological oral health survey*, en donde, después de analizar a 1500 niños y niñas mediante el índice de Silness y Løe, se obtuvo una media de 1.12, que demostró una prevalencia de gingivitis en el 97.93% (11) de la población estudiada.

En Puerto Rico, se efectuó un estudio con una muestra de 1586 niños de 12 años y se obtuvo una prevalencia de gingivitis del 80.41%. Es importante mencionar que se excluyó a los niños con graves condiciones sistémicas o necesidades especiales de atención médica, debido a que este grupo es propenso a la inflamación gingival por los tratamientos que reciben. El resultado lo determinaron mediante la presencia de sangrado gingival al sondaje, la sonda fue insertada no más de 2 mm en el surco gingival comenzando desde distal, hacia el punto medio de la superficie vestibular y luego se movió suavemente hacia el área interproximal mesial (12).

En un estudio realizado en el 2018 por Murillo *et al.*, se analizaron poblaciones mayores de 18 años (edad promedio de 41.4 años) en tres zonas latinoamericanas, la Gran Área Metropolitana-Costa Rica, Bogotá-Colombia y Ciudad de México-México, utilizando el IG y el índice de biofilme de Silness y Loe. En este estudio se determinó que la gingivitis moderada predominó en las tres zonas, siendo la Gran Área Metropolitana de Costa Rica la que presentó el porcentaje más alto de gingivitis (96%), siguiendo Bogotá (94.7%) y, por último, Ciudad de México (61.5%) (13).

Además, en un estudio epidemiológico de la Salud Oral del Adolescente que se realizó en Caja Costarricense del Seguro Social de Costa Rica en el 2017 con la participación de 624 adolescentes, se demostró que un 25 % de los participantes presentaban enfermedad periodontal. En ese estudio, los examinadores utilizaron el índice periodontal comunitario. La prevalencia para la condición higiénica fue de 74.44 %, el sangrado gingival de 16.61 % y cálculo dental fue 8.23 % (14).

En el 2020, en un artículo publicado por Ramírez *et al.*, se evidenció que 96.8 % de la población estudiada de la Escuela Carmen Lyra presentó gingivitis. En promedio, los niños tenían un índice gingival de 0.97, según los criterios establecidos por Silness y Løe, lo que significa que predominó la gingivitis leve. Todo esto pese a la constante educación que reciben estos niños del centro de enseñanza, puesto que la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica les da atención odontológica durante todo su periodo escolar (15).

El acoso entre niños de edad escolar ha aumentado significativamente, con una prevalencia que supera el 58 % y los datos demuestran que quienes lo sufren tienen la edad, el nivel socioeconómico y factores psicosociales como características comunes, que coinciden con factores que favorecen la presencia de gingivitis en los niños. Esta situación conduce a reflexionar sobre la posible relación entre factores emocionales presentes en los adolescentes y la gingivitis. Además, esa correspondencia se evidenció de manera clínica mediante la presencia de sangrado al sondaje (16).

Con respecto al nivel educativo de los padres, la calidad de vida y el nivel socioeconómico en Europa, Funieru *et al.* (2017), concluyeron que cuando los padres de los infantes no han completado sus estudios académicos el promedio de vida es pobre y las escuelas no brindan servicios dentales. Entonces, puede decirse que durante la infancia es cuando se

presenta mayor prevalencia de gingivitis. Esta información se obtuvo por medio del índice gingival de Silness y Løe (17).

En África, los estudios demuestran que los niños estudiantes que padecen de gingivitis experimentan mayor cantidad de caries con respecto a los que no presentan gingivitis. Esta situación se debe a que ambas enfermedades presentan acumulación de biofilme. Owino *et al.* (2010), al utilizar el índice de dientes cariados, perdidos y obturados (CPO-D) y el índice periodontal comunitario en un grupo de 292 estudiantes del municipio de Kitale, Kenia, encontraron que la prevalencia de caries dental en dentición mixta era de 50.3 %, que la prevalencia de caries dental en dentición permanente era de 44.5% y la prevalencia de gingivitis de 77.7 % (18).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la edad promedio de ingreso a la educación primaria es de 5 a 6 años y se relaciona con la mayor prevalencia de la enfermedad caries dental en dentición primaria y, también, muestra mayor avance en un periodo más corto que en la dentición permanente. Por otra parte, a los 12 años los niños, ppor lo general, finalizan la escuela primaria, ese es el momento propicio para obtener datos de quienes cursan el sistema escolar, además, es a esa edad que se alcanza la mayor parte de la dentición permanente. Adicionalmente, de los 15 a los 19 años, las piezas dentales ya han estado expuestas al ambiente bucal por lo menos durante 3 años, entonces, la información que se pueda obtener es de gran relevancia; además, es el inicio del estudio de la enfermedad periodontal en adolescentes. Por esas razones, esta revisión se enfoca en niños y adolescentes (19).

De esta manera, se concluye que los niños y adolescentes a nivel mundial presentan alta prevalencia de gingivitis, existiendo una relación entre factores emocionales, el nivel académico de los padres, la calidad de vida y el nivel socioeconómico en el que viven; también, la experiencia de caries dental se relaciona con la prevalencia de gingivitis.

CAPÍTULO II

Presencia de microorganismos periodontopatógenos en niños y adolescentes

Las bacterias para lograr proliferar y persistir en la cavidad bucal tienden a vivir en biopelículas dentales (biofilme) que son comunidades polimicrobianas altamente complejas y dinámicas. Este biofilme brinda protección contra las fuerzas de corte y las respuestas inmunitarias del huésped. En un individuo sano, las bacterias orales existen en un equilibrio natural con el huésped (simbiosis), pero diferentes factores pueden contribuir a que esta comunidad se convierta en disbiótica, permitiendo así que las bacterias potencialmente patógenas aumenten en número y provoquen infecciones persistentes como la periodontitis (20).

Con respecto al equilibrio homeostático entre el huésped y su contenido microbiano, se ha determinado que la microbiota comensal juega un papel esencial en el mantenimiento de la salud y la alteración de este balance se conoce como disbiosis, la cual se determina como perturbaciones en la composición de las comunidades comensales. La disbiosis puede ocurrir como resultado de un cambio en la microbiota o en la habilidad del huésped de responder a ella. Este delicado equilibrio entre homeostasis y disbiosis se considera en parte como un entrenamiento temprano de la regulación inmunitaria local y sistémica (tanto reguladores innatos y adquiridos) (21).

La comunidad periodontal disbiótica se enfrenta a la supervivencia: por un lado, las bacterias necesitan evadir la matanza mediada por el sistema inmune y, por otro lado, dependen de la inflamación para obtener nutrientes de la degradación de los tejidos. La inmunosupresión no es una opción viable para las bacterias inflamatorias; las bacterias periodontales pueden

manipular la interacción con las respuestas inmunitarias del huésped (como los neutrófilos y el complemento) para mejorar la aptitud bacteriana (20).

Se han identificado varios patógenos potenciales que promueven la aparición de la enfermedad periodontal. Se conocen distintos complejos microbianos subgingivales, los cuales se han dividido por colores. La enfermedad periodontal se ha relacionado específicamente con el anaranjado y el rojo. El anaranjado consiste en especies como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros* (especies asociadas incluidas), *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Streptococcus constellatus*, *Campylobacter gracilis*. Con el progreso de la enfermedad, se genera un desplazamiento hacia el complejo rojo el cual consiste en *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Porphyromonas gingivalis* (4).

Microorganismos periodontopatógenos del complejo rojo

1. Porphyromonas gingivalis

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) se considera un miembro importante de la microbiota periodontopatógena involucrada en la progresión de la enfermedad periodontal y la destrucción de tejido y de hueso. Es un microorganismo cocobacilo anaerobio, gram-negativo. Su interacción con otros miembros de la microbiota oral como *Streptococcus spp.* y *F. nucleatum* resulta en una coagregación específica, la cual contribuye a la capacidad de este microorganismo para colonizar eficazmente el surco subgingival. Así, la interacción (adherencia) a la cavidad oral inicia la patogenicidad de *P. gingivalis* por medio de varios componentes bacterianos como fimbrias, proteinasas, hemaglutininas y lipopolisacáridos (4).

La virulencia bacteriana es altamente dinámica y depende del contexto; por esta razón, es difícil predecir cómo los cambios moleculares afectan el crecimiento de un patógeno en su

huésped y su propagación; esta es la capacidad relativa de un microorganismo para causar daño al huésped. De acuerdo con Diard y Wolf-Dietrich (2017), un factor de virulencia (FV) es cualquier atributo genético que aumenta la posibilidad de causar una enfermedad en un huésped, que puede ser un gen o rasgo que se expresa por cepas patógenas. La eliminación/delección del FV reduce el riesgo o extensión del daño al anfitrión (22).

1.1 Factores de virulencia de *P. gingivalis*

Los factores de virulencia de la *P. gingivalis* juegan un papel importante en la coagregación, formación de biofilme y disbiosis microbiana, pues pueden actuar directamente sobre otras bacterias o inducir un entorno óptimo (23). Esos factores incluyen: cápsula, membrana exterior con su lipopolisacárido, fimbrias, proteinasas y enzimas seleccionadas.

La cápsula suele estar conformada por polisacáridos y contiene agua para evitar que las bacterias se sequen. La cápsula de *P. gingivalis* antagoniza estímulos fuertes y promueve la evasión de las respuestas inmunitarias del huésped; de ese modo, promueve la supervivencia bacteriana en los hospedadores (23). Es un factor importante de virulencia antifagocítico, ya que, asegura mayor resistencia ante la fagocitosis, resistencia sérica y disminución de la quimiotaxis de los polimorfonucleares (PMN's) (4).

P. gingivalis desarrolla fimbrias o pili, las cuales son apéndices filamentosos delgados y superficiales que sobresalen de la membrana externa; mejoran la formación de biofilme, la motilidad bacteriana, y la adhesión bacteriana e invasión a las células del huésped. Las fimbrias se unen a los tejidos del huésped y a las células a través de una amplia variedad de moléculas del huésped y sustratos orales, que incluyen proteínas y glicoproteínas ricas en prolina, estaterinas, fibrinógeno, fibronectina y lactoferrina. Además de su función adhesiva, las fimbrias también son importantes para la interacción de *P. gingivalis* con otras bacterias orales, lo cual es esencial para la formación de biofilme (23).

Una característica importante de las fimbrias de las *P. gingivalis* es su quimiotaxis, esta capacidad de percibir los estímulos del huésped puede tener un efecto significativo en la formación de una lesión inflamatoria progresiva en el tejido periodontal y la destrucción de hueso (4).

P. gingivalis contiene en su membrana alrededor de 20 proteínas principales, las cuales varían de tamaño (4). Los lipopolisacáridos (LPS) son componentes importantes de la pared celular (membrana externa) de bacterias gram-negativas y son bien conocidos por su toxicidad y capacidad de causar inflamación no deseada en el huésped, de ahí su nombre de endotoxinas (23).

Los LPS de *P. gingivalis* están compuestos de lípido A, un oligosacárido que forma la columna vertebral y un polisacárido O-específico. Los LPS de diferentes especies bacterianas son estructuralmente distintos dependiendo de la composición de la cadena de acilo del ácido graso del lípido A; las propiedades de virulencia de los LPS de *P. gingivalis* están determinadas por su componente de lípido A. Las células del huésped responden al lípido A del LPS de *P. gingivalis* y producen respuestas inflamatorias en los tejidos gingivales, creando así un entorno favorable para que los patógenos se mantengan y se genere la progresión de la enfermedad periodontal (4).

Una de las características de virulencia potencialmente significativas de *P. gingivalis* es el alto número de enzimas hidrolíticas, proteolíticas y lipolíticas que producen todas sus cepas conocidas. Las proteasas asociadas (proteinasas capaces de hidrolizar enlaces peptídicos) son tripsina, tiol, proteinasas caseinolíticas y dos peptidasas (4).

Las gingipaínas es una familia de cisteínas proteinasas y se conocen también como enzimas “similares a la tripsina”. Las gingipaínas son responsable del 85 % de las actividades proteolíticas extracelulares de *P. gingivalis* y son significativas en la patogénesis de la

periodontitis, pues causan respuestas inmunes irregulares e inflamación por su participación en la activación de las metaloproteinasas de la matriz del huésped, así como inactivación de inhibidores inmunes, degradación de factores inmunes y escisión de receptores de células inmunes. Los inhibidores de gingipaínas pueden suprimir eficazmente la patogenicidad de *P. gingivalis* (23).

2. *Tannerella forsythia*

Es un microorganismo anaerobio, gram-negativo, miembro de la familia de los Citofago-Bacteroides. Inicialmente, se llamó *Bacteroides forsythus*. *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) y ha sido asociado con frecuencia o en un nivel más alto a varias formas de la enfermedad periodontal en comparación con individuos sanos. Se encontró que *T. forsythia* forma biofilme sinérgico con *F. nucleatum*, considerada una bacteria “puente” por su capacidad para coagregarse con bacterias colonizadoras tempranas y tardías, lo que facilita la formación de biofilme. La infección por *T. forsythia* causa periodontitis con mayor probabilidad en mujeres con sobrepeso que en mujeres con peso normal, ya que, las personas con sobrepeso u obesidad presentan un crecimiento excesivo de *T. forsythia*, lo que les aumenta el riesgo de desarrollar enfermedad periodontal (4).

2.1 Factores de virulencia de *T. forsythia*

Se han identificado pocos factores de virulencia específicos relacionados con *T. forsythia*, entre los conocidos se incluyen proteasas similares de tripsina y PrtH, sialidasas SiaHI y NanH, proteína BspA de repetición rica en leucina asociada a la superficie celular, α -D-glucosidasa y N-acetil- β -glucosaminidasa (4), una capa S de superficie y actividad para la inducción de apoptosis (24).

Las sialidasas son glicohidrolasas que liberan los residuos de ácido siálico terminales de los sialoglicoconjugados; los ácidos siálicos se presentan comúnmente en azúcares terminales en glicoproteínas y glicolípidos en la superficie de una amplia variedad de células eucariotas y glicoproteínas secretadas. Las sialidasas expresadas en bacterias proporcionan ventajas patógenas, pues contrarrestan respuestas inmunitarias innatas y adaptativas del huésped al inducir la liberación de quimiocinas de las células epiteliales, desenmascarando los epítomos enmascarados con ácido siálico para la adhesión y, así, promueven la formación de biofilme y degradan las glicoproteínas del hospedador para obtener nutrientes (24).

T. forsythia muestra dos sialidasas diferentes codificadas por genes *siaHI* y *nanH*, además, se ha demostrado que el ácido siálico liberado de los glicoconjugados sialilados por la acción de NanH pueden servir como factor de crecimiento para el biofilme. En la cavidad oral, *T. forsythia* entra en contacto directo con glicoproteínas sialiladas presentes en saliva, barreras recubiertas de mucina formadas en los dientes y mucosa, y en superficies de células epiteliales gingivales. *T. forsythia* codifica otras glicosidasas como α -D-glucosidasa y N-acetil- β -glucosaminidasa, β -glucosidasa, α -fucosidasa, α -arabinofuranosidasa, β -galactosidasa y α -1,2-manosidasa. Estas glicosidasas junto con NanH y SiaHI pueden hidrolizar enlaces glicosídicos terminales de oligosacáridos complejos, proteoglicanos y oligosacáridos asociados a las glicoproteínas del huésped. De este modo, afecta la integridad funcional, promueve la progresión de la enfermedad y ayuda a proporcionar fuentes de nutrientes para la coexistencia de bacterias que residen en la cavidad oral (24).

La capa S está presente como la capa de envoltura celular más externa de muchas bacterias, las cuales poseen un aspecto físico “enrejado” con periodicidad a escala nanométrica. Cubre células bacterianas durante todas las etapas del ciclo de crecimiento en forma de una monocapa cerrada. Las capas en S proporcionan a las bacterias una protección con propiedades

de tamiz molecular y una función general para el mantenimiento de la integridad bacteriana, exhibición de componentes bacterianos e interacción con las células inmunes y no inmunes del huésped (20).

Se obtuvo evidencia de que *T. forsythia* podría utilizar un medio muy potente “de guerra biológica” para respaldar su patogenicidad, que serían las vesículas de la membrana externa (OMV, por sus siglas en inglés) para el transporte de carga virulenta. Las OMV son partículas nanoscópicas y esféricas que se producen ubicuamente por bacterias gram-negativas y se ha demostrado que contribuyen a la patogenicidad de muchas bacterias al enriquecer los factores de virulencia y entregándolos a largas distancias, reemplazando así el contacto directo con el hospedador. Los OMV de *T. forsythia* contienen una serie de factores de virulencia y glicoproteínas reconocidas, que favorece el papel de la glicosilación en la patogenicidad de *T. forsythia* (20).

3. *Treponema denticola*

Son bacterias gram-negativas, espiroquetas (largas y delgadas, en forma de sacacorchos) detectadas en las lesiones periodontales. Las células de *T. denticola* en forma de espiral están cubiertas con una vaina exterior que consta de una estructura frágil en forma de envoltura. Los flagelos periplasmáticos se encuentran en la membrana citoplasmática y están cubiertos con la vaina externa. La *T. denticola* típicamente produce cuatro flagelos que se entrelazan alrededor del cilindro citoplasmático. La proteína principal de la vaina externa (Msp) predomina en esta zona.

La principal razón de interés en este grupo de microorganismos (espiroquetas) es porque se concentra mayormente en sitios con más profundidad de bolsa, ya que, en los sitios sanos rara vez se determina su presencia. *T. denticola* interactúa con otras especies bacterianas orales,

en particular con *P. gingivalis* y *F. nucleatum* y esa coagregación probablemente juega un papel importante en la progresión de la enfermedad periodontal (en la formación de biofilme) (4).

T. denticola tiende a habitar las bolsas periodontales más profundas y no es un colonizador temprano de biofilme subgingival; se une a las fusobacterias en una interacción mediada por el resto de carbohidratos de la Msp y el receptor de lectina de unión a galactosa de las fusobacterias. Se ha demostrado que *T. denticola* se une específicamente a *P. gingivalis* y *T. forsythia* con avidez similar, lo que explica su estrecha asociación (25).

3. 1 Factores de virulencia de *T. denticola*

Entre los factores de virulencia conocidos de *T. denticola* se encuentra principalmente la producción de enzimas hidrolíticas como las hialuronidasas, colagenasas, proteasas, fosfolipasas y fosfatasas; también se consideran Msp, OppA, proteína de unión similar a FH, dentilisina y proteínas de repetición ricas en leucina (LrrA) (4). Se ha demostrado que las LrrA de *T. denticola* desempeñan un papel en la unión a *T. forsythia*, pero no de *P. gingivalis* o *F. nucleatum*. Las proteínas LrrA también son importantes en la invasión de células epiteliales y la formación de biofilme por *P. gingivalis*. Hay un mayor potencial de movilidad genética en *T. denticola* cuando crece como una biopelícula dental y, por lo tanto, es importante para su virulencia (25).

Los componentes de la superficie celular, especialmente las proteínas, actúan como sensores y efectores de interacciones con el huésped y otras bacterias, que en gran parte son los blancos de la respuesta inmune adaptativa del huésped. Una de las características unificadoras de las bacterias del complejo rojo son sus altos niveles de actividad proteolítica extracelular, mediada por proteasas localizadas en la superficie celular. La membrana exterior de *T. denticola* es significativamente diferente a la de las bacterias gram-negativas, entonces, se le conoce como vaina externa (25).

Se ha propuesto a la dentilisina como uno de los factores de virulencia principales de *T. denticola*, ya que es una proteasa activa ubicada en la superficie celular que se divide en los enlaces fenilalanil / alanil y prolil / alanil. La dentilisina contribuye a la progresión de la enfermedad al interrumpir o modular las vías de señalización intercelular del huésped y degrada las proteínas de su matriz celular. También permite potencialmente la penetración de las capas de células epiteliales por *T. denticola* mediante la degradación de las proteínas de adhesión intercelular y modula la inmunidad de la célula huésped por degradación de IL-1 β , IL-6, TNF- α y el ligando quimioatrayente 2 (CCL2, por sus siglas en inglés) (25).

Consecuentemente, la dentilisina es una proteasa de superficie involucrada en la absorción de nutrientes, coagregación bacteriana, activación del complemento, evasión del sistema inmunológico del huésped, inhibición del sistema de hemostasia e invasión celular, además de su función de proteólisis (26). Las lipoproteínas son las proteínas asociadas a la membrana más abundantes en las espiroquetas. OppA es una lipoproteína asociada a membrana de superficie celular, la cual puede unirse a proteínas solubles del huésped como el plasminógeno y el fibrinógeno, pero no a proteínas insolubles inmovilizadas del huésped o células epiteliales (25).

La motilidad y la quimiotaxis no se consideran factores de virulencia clásicos de las bacterias; sin embargo, con *T. denticola* y su papel en la progresión de la enfermedad probablemente sean esenciales para la virulencia de la bacteria. Los flagelos de las espiroquetas se encuentran dentro del espacio periplásmico, entre la vaina externa y la membrana citoplasmática; los flagelos periplásmicos (PF, por sus siglas en inglés) facilitan la translocación en entornos muy viscosos que normalmente retrasarían o inmovilizarían a la mayoría de las bacterias flageladas. Los PF están protegidos de los efectos de inmovilización

de los anticuerpos específicos de flagelos producidos por la respuesta del huésped a la infección (25).

La quimiotaxis permite que las bacterias móviles respondan a los estímulos ambientales de una manera positiva o negativa, y los estímulos ambientales se detectan a través de proteínas de quimiotaxis que aceptan metilo (MCP, por sus siglas en inglés) que atraviesan la membrana interna. Los quimioatrayentes para *T. denticola* incluyen glucosa, suero y albúmina, que son posibles indicadores de tejidos dañados del huésped (25).

Los treponemas, incluido el *T. denticola*, pueden suprimir las respuestas del huésped al LPS, lo que permite la persistencia de los consorcios bacterianos que se encuentran asociados a la enfermedad periodontal. *T. denticola* ha demostrado estimular la osteoclastogénesis y la expresión de metaloproteinasas de matriz; la quimiotaxis y motilidad permiten a la bacteria colonizar nuevos sitios, penetrar bolsas periodontales profundas y las capas epiteliales. Además, le brindan la capacidad para interactuar sinérgicamente con otros patógenos periodontales en varios niveles, producir metabolitos citotóxicos, formar biofilme y una variedad de proteínas de la superficie celular para desregular la defensa del huésped y, de esa manera, ayudar a proteger el biofilme subgingival y causar destrucción del tejido del huésped (25).

Es ampliamente aceptado que *T. denticola*, *P. gingivalis* y *T. forsythia* forman un consorcio bacteriano conocido como “complejo rojo”, el cual está fuertemente asociado con la progresión de la enfermedad periodontal. Las características que unifican a las bacterias del complejo rojo son sus actividades proteolíticas extracelulares, la compleja fermentación anaeróbica de aminoácidos, la producción de metabolitos tóxicos y sus vesículas de membrana externa. Del consorcio bacteriano, solamente *T. denticola* es móvil y posee la capacidad de responder quimiotácticamente a los estímulos ambientales (4).

En conclusión, el complejo rojo es un consorcio de bacterias que interactúan entre sí, a pesar de que cada una posee factores de virulencia específicos para lograr sobrevivir y proliferar de manera independiente, también poseen características virulentas comunes con las cuales logran aumentar su efectividad y supervivencia. *P. gingivalis*, *T. denticola* y *T. forsythia* se encuentran rutinariamente en el biofilme subgingival y han sido asociadas a la progresión de la enfermedad periodontal, siendo su interacción un factor que se presenta como común denominador en la destrucción de tejidos periodontales y hueso; con lo que, su alta capacidad de virulencia dificulta combatir la enfermedad de manera exitosa.

CAPÍTULO III

Características que influyen en la susceptibilidad a la enfermedad periodontal en niños y adolescentes

De acuerdo con Genco y Borgnakke (2013), la susceptibilidad es una condición del huésped, influenciada por una serie de factores ambientales e intrínsecos al huésped que aumentan las probabilidades de que desarrolle la enfermedad periodontal. La prevalencia de las enfermedades periodontales se ve directamente afectada tanto por condiciones propias del huésped como por factores externos que inciden en la velocidad, la extensión y el tratamiento de las diferentes enfermedades periodontales, tanto en adultos, como en niños y adolescentes (27).

Factores de Riesgo Intrínsecos

Según Fardal *et al.* (2020), la genética ha demostrado ser un factor de riesgo para el desarrollo de las enfermedades periodontales con una variabilidad hasta de un 1/3 en una población. Los pacientes que desarrollan una enfermedad periodontal tempranamente en sus vidas presentan comúnmente alelos genéticos de riesgo. Sin embargo, no hay suficiente evidencia para determinar el grado de influencia de la predisposición genética como un factor determinante en el resultado de la terapia periodontal (28).

Los pacientes que presentan enfermedades periodontales a temprana edad usualmente presentan alelos genéticos de riesgo, según Heikkinen *et al.* (2016). Los pacientes con enfermedades periodontales que se presentan a una edad más tardía poseen alelos de riesgo, pero se ha observado que factores ambientales, estilo de vida y un sistema inmune envejecido tienen mayor influencia en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, es difícil separar el

factor genético de la educación en el hogar para poder determinar la causa de una tendencia familiar a la enfermedad periodontal. Se ha observado que niños, cuyos padres presentan enfermedad periodontal, poseen mayor susceptibilidad a desarrollar la enfermedad a temprana edad. La razón es debatible entre malos hábitos compartidos por la familia y enseñados de generación en generación, y la presencia o alteración de uno o más genes que aumentan la susceptibilidad a la enfermedad (29).

Los factores genéticos asociados a enfermedades multifactoriales se deben usualmente a múltiples polimorfismos en lugar de una sola o pocas mutaciones genéticas. Los principales genes estudiados son aquellos encargados de la regularización del sistema inmune como las citoquinas, receptores de superficie celular, enzimas y proteínas relacionadas con el reconocimiento de antígenos (30).

Las citoquinas en su papel de regulación celular inducen la activación de receptores de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas. Han sido estudiadas con respecto a la enfermedad periodontal por su función fundamental de regular el mecanismo de inflamación (tanto proinflamatorias como antiinflamatorias) (30).

Las principales citoquinas asociadas a la periodontitis son las interleuquinas (IL, por sus siglas en español), IL-1 (proinflamatoria), IL-6 (proinflamatoria-antiinflamatoria) y IL-10 (moduladores de secreción de anticuerpos por linfocitos B o células plasmáticas). Citoquinas como IL-1 α , IL-1 β , IL-10, y IL-6 son claves en la regularización inflamatoria durante la enfermedad periodontal. El rol de las células B consiste en la activación, proliferación y diferenciación, y, generalmente, son las encargadas de infiltrar células en lesiones periodontales avanzadas. Scapoli *et al.* (2012) indican que se ha demostrado una asociación directa entre variantes de alelos IL-6 y IL-10 y la periodontitis. En la enfermedad periodontal, polimorfismos

de las citoquinas IL-6 y IL-10 han sido reportados como factores de riesgo para periodontitis crónica y agresiva. Esta última, se ha propuesto como atenuador de la destrucción de tejidos periodontales por la inducción de inhibidores de tejidos de metaloproteinasas y el inhibidor de osteoclastogenesis osteoprotegerina (30).

Para Zupin *et al.* (2017), no solo la presencia de alelos genéticos específicos ha mostrado incidir en la prevalencia de las enfermedades periodontales en niños y adolescentes, pues alteraciones en el sistema inmune como polimorfismos de Lactoferrina (LFT) y β -defensin 1 humana (hBD-1) juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad periodontal. Estas proteínas se manifiestan en la mucosa oral y poseen potencial de acción contra patógenos involucrados en la susceptibilidad a la enfermedad periodontal (31).

hBD-1 es un péptido rico en cisteína que posee actividad antimicrobiana contra virus, hongos y bacterias gram-positivas y gram-negativas. Se expresa constitutivamente en la mucosa oral, sin embargo, puede también ser inducido por estímulos como infección microbiana. Por otro lado, la LTF es otra molécula antimicrobiana con actividad bacteriostática y bactericida activa contra virus y hongos. Se produce en las superficies mucosas de la cavidad oral y está presente en la saliva y en el líquido crevicular (31).

A pesar de su actividad antimicrobiana, los polimorfismos para hBD-1 estudiados revelaron que su relación con la periodontitis está posiblemente ligada a su actividad inmunorreguladora que resulta en una respuesta inmune aumentada y, por ende, en un aumento del proceso inflamatorio y, consecuentemente, en daño tisular. Por el contrario, se ha reportado un aumento de los niveles de LTF en pacientes con periodontitis, lo que sugiere que su relación corresponde a su actividad antimicrobiana (31).

Heikkinen *et al.* (2016) exponen que las metaloproteinasas de matriz son enzimas que producen proteólisis, capaces de descomponer el colágeno encontrado entre las células de los

tejidos (tipo I y III). La progresión de la periodontitis se ha visto asociada a la activación y aumento excesivo y patológico de la metaloproteinasa-8 en fluidos orales. El otro factor genético estudiado como un determinante en la progresión de la enfermedad periodontal son los niveles de metaloproteinasa-8 en la saliva. La presencia de microbiota periopatogénica activa cascadas de inflamación que involucran las metaloproteinasas de matriz. Estos niveles son detectables en estadios tempranos de la enfermedad periodontal, por lo que la detección temprana podría ser un indicador de la susceptibilidad a la enfermedad periodontal en pacientes con esta predisposición genética (29).

El estrés se ha propuesto como uno de los factores de riesgo que aumenta la susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad periodontal. Los altos niveles de hormonas presentes en situaciones de estrés podrían estar asociados a una pobre respuesta inmune del huésped y a una respuesta inflamatoria aumentada. Por otro lado, las enfermedades crónicas como la diabetes, la hipertensión arterial y enfermedades autoinmunes como el VIH, son factores de riesgo en la aparición, desarrollo, tipo y rapidez de la evolución de las enfermedades periodontales (32).

Se ha observado una relación directa entre la presión diastólica aumentada y la presencia de bolsas periodontales como lo describen Zeigler *et al.* (2015), y no se ve afectada por otros indicadores de riesgo para distintas enfermedades cardiovasculares o enfermedades periodontales (33).

Esa relación entre presión diastólica alta y las bolsas periodontales puede ser consecuencia de los elevados niveles de IL-6, hormona estimuladora de tiroides (TSH, por sus siglas en inglés) y leptina, observados en los pacientes con presión diastólica elevada, los cuales inciden directamente en la respuesta inflamatoria del huésped (33).

La diabetes en niños y adolescentes ha sido propuesta como un factor de riesgo para la mayor prevalencia de enfermedades periodontales en esta población; no se han observado diferencias entre los tipos de bacterias presentes en pacientes con diabetes tipo 1 y pacientes control, por lo que la susceptibilidad a las enfermedades periodontales se asocia a la pobre cicatrización, que favorece la mayor destrucción de tejidos (33).

Factores de Riesgo Extrínsecos

Por último, factores externos como la dieta, higiene oral y acceso a servicios de salud oral son determinantes fundamentales para el desarrollo de enfermedades periodontales. Una dieta baja en carbohidratos, por ejemplo, se considera ideal en cuanto a la prevención de la formación de enfermedades como caries dental y la enfermedad periodontal, así como la desorganización mecánica del biofilme (34).

La relación de la dieta con el desarrollo y el progreso de la periodontitis es compleja, ya que, a diferencia de la formación de la caries dental, no hay modificaciones en el consumo de macro y micronutrientes que pueda evitar o detener por completo el progreso de la periodontitis. Se ha observado que las deficiencias en la dieta tienen mayor relación con la presencia de periodontitis y pérdida dental que el aumento de la ingesta de un grupo específico de macronutrientes como los carbohidratos. La deficiencia de vitamina B12 se asocia al empeoramiento del estado periodontal y la pérdida dental. Sin embargo, se ha reportado un elevado riesgo de sangrado gingival asociado al consumo de azúcares y carbohidratos (34).

El acúmulo de biofilme y cálculo dental es causado por una remoción mecánica deficiente de las superficies dentales libres e interproximales y visitas al odontólogo poco regulares o nulas. Esta acumulación de biofilme resulta en una inflamación gingival predecible y una gingivitis persistente es un factor de riesgo clave para la pérdida de inserción periodontal. Un apropiado cepillado dental y visitas regulares al odontólogo reducen en 34 % y 32 %

respectivamente el riesgo a desarrollar periodontitis. El efecto de una pobre higiene oral sobre el desarrollo de la periodontitis es mayor que otros factores de riesgo como la diabetes mellitus, el fumado y la obesidad (35).

El acceso a servicios odontológicos es fundamental para la prevención y el tratamiento de la periodontitis. Es en el consultorio dental donde se realiza una limpieza profesional, se educa al paciente y se monitorean los hábitos de higiene oral. Se debe educar al paciente no solo para una limpieza eficiente, sino que también sobre la duración del cepillado dental que ha demostrado ser determinante en la desorganización del biofilme y es a través del acceso a los servicios odontológicos que esta información logra llegar al paciente por medio de los profesionales en odontología. Adicionalmente, es preciso que el paciente sea instruido en habilidades específicas individualizadas para mejorar la eficiencia de la higiene oral. En consecuencia, la falta de acceso regular a servicios odontológicos resulta en una pobre higiene oral y, por ende, el riesgo a desarrollar periodontitis aumenta de dos a cinco veces más en comparación con una buena higiene oral (35).

PARTE II

ARTÍCULO CIENTÍFICO

ESTADO GINGIVAL Y PRESENCIA DE BACTERIAS DEL COMPLEJO ROJO EN NIÑOS DE 12 AÑOS DE LA ESCUELA CARMEN LYRA

RESUMEN

Objetivo: Determinar el estado gingival y la presencia de bacterias del complejo rojo en muestras de saliva de niños de 12 años de la Escuela Carmen Lyra.

Metodología. Una periodoncista calibrada evaluó en 62 estudiantes de 12 años de la Escuela Carmen Lyra el índice de biofilme (IB) (Silness y Løe, 1964), la presencia de cálculo y el índice gingival (IG) (Silness y Løe, 1967). Se recolectaron muestras de saliva de cada estudiante. El ADN de cada muestra fue extraído y amplificado por medio de la prueba PCR, empleando *primers* específicos, para determinar la presencia de bacterias del complejo rojo.

Resultados: El IB fue de 1.18. El cálculo estuvo presente en el 40.40% de la muestra, se encontró 19.4% de cálculo en supragingival y 21% tanto en supragingival como en subgingival. El IG fue de 0.97, que de acuerdo con Silness y Løe es una gingivitis leve. La gingivitis estuvo presente en el 96.8 % de los niños examinados. Con respecto a las pruebas PCR: 18 de las muestras (31.58 %) no presentaron ninguna de las bacterias analizadas y las 39 muestras restantes (68.42 %) fueron positivas por lo menos a la presencia de las bacterias del complejo rojo.

Conclusión. Dentro de las limitaciones de este estudio, se concluye que la prevalencia de gingivitis y cálculo es alta en la muestra examinada y el estado gingival observado puede estar relacionado con la presencia de bacterias del complejo rojo.

Palabras clave: complejo rojo, ADN, PCR, índice de biofilme, índice gingival, cálculo, gingivitis, salud gingival

INTRODUCCIÓN

La salud gingival se define como la ausencia de sangrado al sondaje, eritema y edema, también como la ausencia pérdida de inserción y pérdida ósea; en caso de que exista ausencia de salud gingival, se presenta la enfermedad periodontal (1). Si la gingivitis no se controla, es probable que la enfermedad avance a periodontitis, la cual se convierte en una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial, su causa más común es debido a un biofilme disbiótico, y la enfermedad se caracteriza por la destrucción progresiva del aparato de sostén del diente, presencia de bolsas periodontales y sangrado gingival (3).

Las enfermedades periodontales son infecciones multifactoriales provocadas por un complejo de especies bacterianas que interactúan con los tejidos y las células del hospedador, provocando la liberación de una amplia gama de citocinas inflamatorias, quimiocinas y mediadores, que en algunos casos, conducen a la destrucción de las estructuras periodontales, incluido el diente – tejidos de soporte dental, hueso alveolar y el ligamento periodontal (4).

A lo largo del tiempo, se han realizado estudios en diferentes partes del mundo que arrojan cifras alarmantes con respecto a la prevalencia de gingivitis en niños y adolescentes. En un estudio de Ballouk y Dashash (2018), en Asia, se analizaron 1500 niños y niñas utilizando

el índice gingival de Silness y Løe, y se demostró una prevalencia de 97.93 % de gingivitis (11). En Puerto Rico, una investigación efectuada por Boneta *et al.* (2018) con una muestra de 1586 niños de 12 años obtuvo una prevalencia de gingivitis del 80.41 % (12). Un análisis epidemiológico, en Costa Rica, sobre la salud oral del adolescente realizado en el 2017 con 624 adolescentes demostró que 25 % de los participantes presentaba enfermedad periodontal (14); también, en un estudio del 2019 realizado a niños de 12 años de la Escuela Carmen Lyra, evidenció que el 96.8 % de la población presentaba gingivitis (15). Owino *et al.* (2010) analizaron con base en el índice CPOD y el Índice Periodontal Comunitario a un grupo de 292 estudiantes de Kitale, Kenia y determinaron que la prevalencia de gingivitis era de 77.7 % (18). Por su parte, Funieru *et al.* (2017) concluyeron que los padres de niños y niñas en Europa que no completan sus estudios académicos, en promedio, mantienen un estilo de vida económicamente escaso, que les limita a sus hijos el acceso a servicios dentales y, por lo tanto, la prevalencia de gingivitis es significativa (17).

Por otro lado, las bacterias para lograr proliferar y persistir en la cavidad bucal tienden a vivir en biopelículas dentales (biofilme) como comunidades polimicrobianas altamente complejas y dinámicas. Este biofilme brinda protección contra las fuerzas de corte y las respuestas inmunitarias del huésped. En un individuo sano las bacterias orales conservan un equilibrio natural con el huésped (simbiosis), pero diferentes factores pueden contribuir a que esa comunidad se convierta en disbiótica; permitiendo así que las bacterias potencialmente patógenas aumenten en número y provoquen infecciones persistentes como lo es la periodontitis (20).

La disbiosis se explica como perturbaciones en la composición de las comunidades comensales relativa a la presente en salud y puede ocurrir como resultado de un cambio en la microbiota o en la habilidad del huésped para responder a la alteración. Este delicado equilibrio

entre homeostasis y disbiosis se considera en parte como un entrenamiento temprano de la regulación inmunitaria local y sistémica (reguladores innatos y adquiridos) (21).

Se han identificado varios patógenos potenciales que promueven la aparición de la enfermedad periodontal. Así, se conocen distintos complejos microbianos subgingivales, los cuales se han dividido por colores de acuerdo con el estado de desarrollo de la placa microbiana y la gravedad de la enfermedad periodontal.

La enfermedad periodontal se ha relacionado específicamente con los colores anaranjado y rojo. Así, primero es anaranjado cuando están presentes especies como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros* (especies asociadas incluídas), *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Streptococcus constellatus*, *Campylobacter gracilis* y, con el progreso de la enfermedad hay un desplazamiento hacia el complejo rojo el cual consiste en la presencia de *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Porphyromonas gingivalis*. Este consorcio bacteriano está fuertemente asociado con la progresión de la enfermedad periodontal y las características que unifican a las bacterias que lo componen son sus actividades proteolíticas extracelulares, compleja fermentación anaeróbica de aminoácidos, producción de metabolitos tóxicos y sus vesículas de membrana externa (4).

La virulencia bacteriana es muy dinámica y depende del contexto, por esta razón, es difícil predecir cómo los cambios moleculares afectan el crecimiento de un patógeno en su huésped y su propagación. Según Diard y Wolf-Dietrich (2017), un factor de virulencia (FV) es cualquier atributo genético que aumenta la posibilidad de causar una enfermedad en un huésped; puede ser un gen o un rasgo que se expresa por cepas patógenas. Por lo tanto, la eliminación/delección del FV reduce el riesgo o extensión del daño al anfitrión (22).

Con respecto a las bacterias del complejo rojo se conoce que los factores de virulencia relacionados a *P. gingivalis* juegan un papel importante en la coagregación, formación de biofilme y disbiosis microbiana, que pueden actuar directamente sobre otras bacterias o inducir un entorno óptimo, que incluyen: cápsula, membrana exterior con su lipopolisacárido, fimbrias, proteinasas y enzimas seleccionadas (23). Se han identificado pocos factores de virulencia específicos relacionados a *Tannerella forsythia*, entre los conocidos se mencionan: proteasas similares de tripsina y PrtH, sialidasas SiaH1 y NanH, proteína BspA de repetición rica en leucina asociada a la superficie celular, α -D-glucosidasa y N-acetil- β -glucosaminidasa (4), una capa S de superficie y actividad para la inducción de apoptosis (24). De los factores de virulencia conocidos de *T. denticola* se menciona principalmente la producción de enzimas hidrolíticas como las hialuronidasas, colagenasas, proteasas, fosfolipasas y fosfatasas; también se consideran Msp, OppA, proteína de unión similar a FH, dentilisina y proteínas de repetición ricas en leucina (LrrA) (4).

La susceptibilidad es una condición del huésped, influenciada por una serie de factores ambientales e intrínsecos del huésped que aumentan sus probabilidades para desarrollar la enfermedad periodontal.- La prevalencia de las enfermedades periodontales se ve directamente afectada tanto por condiciones propias del huésped como POR factores externos que inciden en la velocidad, la extensión y el tratamiento de las diferentes enfermedades periodontales tanto en adultos como en niños y adolescentes (27).

La genética ha demostrado ser un factor de riesgo para el desarrollo de las enfermedades periodontales con variabilidad hasta de un 1/3 en una población. los pacientes que desarrollan una enfermedad periodontal tempranamente en sus vidas presentan comúnmente alelos genéticos de riesgo (28). También alteraciones en el sistema inmune han mostrado incidir en la prevalencia de enfermedades periodontales en niños y adolescentes, como polimorfismos de

LFT y β -defensin 1 humana (hBD-1) (31). El estrés se ha propuesto como otro de los factores de riesgo, ya que los altos niveles de hormonas presentes en situaciones de estrés podrían estar asociados a una pobre respuesta inmune del huésped y a una respuesta inflamatoria aumentada (32). Factores externos como la dieta, la higiene oral y el acceso a servicios de salud oral son determinantes fundamentales en el desarrollo de las enfermedades periodontales (34).

La enfermedad periodontal afecta a gran parte de la población, se presenta tanto en niños y adolescentes, como en adultos y adultos mayores; en la actualidad, se efectúan estudios más específicos para conocer mejor la enfermedad y así poder abordarla de manera eficaz, eficiente y lograr que sea lo menos invasiva posible. Muchas veces el tratamiento clínico, quirúrgico y medicamentoso no es suficiente para detener el avance de la enfermedad, por lo cual es esencial conocer los factores intrínsecos y extrínsecos que pueden propiciar su aparición, grado y extensión, al igual que conocer cuáles de ellos afectan mayoritariamente en ciertas etapas del desarrollo de la enfermedad.

En Costa Rica existe poca evidencia científica con respecto a la salud gingival de los niños y adolescentes, razón por la que el objetivo de esta investigación se enfoca en evaluar el estado gingival y la presencia de bacterias del complejo rojo en niños de 12 años de la Escuela Carmen Lyra en Alajuelita, Costa Rica, por medio de un examen clínico y un análisis de PCR de las muestras salivales de 62 niños y niñas de esa escuela.

Es importante estudiar a este grupo poblacional, puesto que es la edad promedio que marca el inicio de la adolescencia y es cuando se presenta la mayor parte de la dentición permanente; por eso, conocer el estado gingival de esta población contribuirá para que la intervención del profesional en Odontología se enfoque más en educación, promoción de la salud y prevención, de manera que se pueda reducir la intervención clínica en un futuro.

METODOLOGÍA

Este proyecto fue aprobado por el Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica.

Recolección de datos

Este es un estudio transversal. La recolección de datos se realizó entre junio y julio del 2019 de una muestra de 62 participantes con 12 años de edad (31 hombres y 31 mujeres), estudiantes de la escuela Carmen Lyra, ubicada en Concepción Arriba de Alajuelita, San José, Costa Rica.

Previo a la recolección de datos, se solicitó el consentimiento informado a los padres de familia y el día cuando se presentaron los participantes, se solicitó el asentimiento informado a cada uno, y se les explicó de manera individualizada por parte de la persona investigadora acerca del propósito del estudio.

El examen clínico para determinar el estado gingival de los participantes se realizó en la clínica dental de la escuela Carmen Lyra, por una sola operadora calibrada especialista en Periodoncia (Dra. Karol Ramírez Chan); cada uno de los participantes se sentó en la silla dental, y usó como fuente de iluminación la lámpara de ángulo incorporada a la silla.

Para determinar el índice de biofilme, la referencia fue el “Índice de Silness y Løe” de 1964 (9); con este índice se evalúa la superficie vestibular y palatina/lingual de seis piezas trazadoras, las cuales fueron 16, 11, 26, 46, 41, y 36. Debido a la edad de los participantes, se utilizaron las primeras molares de los cuatros cuadrantes en lugar de las premolares, pues estas piezas evaluadas ya llevaban en boca del participante como mínimo 6 años.

Se definió la gingivitis como la presencia de sangrado al sondaje en al menos un sitio, y la extensión se clasificó según el porcentaje de dientes, cuya encía presentaba sangrado al sondaje; así se calificó como gingivitis limitada tenía presencia de 25 %-49 % de sangrado y la gingivitis extensa en 50 % o más de los dientes evaluados que presentaban sangrado.

Después de la evaluación se le otorgó a cada uno de los participantes un cepillo de dientes, pasta dental e instrucciones de higiene oral para la correcta técnica de uso de hilo dental y la técnica de cepillado de Stillman Modificado. Cada uno practicó la técnica previamente explicada y cepillaron sus dientes solamente con agua.

Posteriormente, se evaluó a cada participante con el fin de determinar la presencia de cálculo dental (supragingival, subgingival o ambos) en todos los dientes presentes en su boca. La salud gingival se determinó aplicando el “Índice de Silness y Løe” de 1967 mediante el uso de la sonda periodontal OMS (Organización Mundial de la Salud), la cual posee una bolita de 0,5 mm de diámetro en su parte activa; realizando así el análisis sobre las piezas 16, 11, 26, 46, 41 y 36 en las seis superficies dentales (mesial, medial, distal, vestibular, lingual/palatino) para evaluar la presencia de sangrado gingival (8).

Las 62 muestras de saliva fueron tomadas en tubos de polipropileno de 50ml, por medio de un enjuague que realizó cada participante; se utilizó Listerine® con agua (20 ml de Listerine + 20 ml de agua doblemente destilada estéril para cada muestra), después de este enjuague, cada niño y niña se enjuagó dos veces más, ambos con 20 ml del Listerine® 1:2 y cada enjuague duró aproximadamente un minuto. Se diluyó el Listerine® para evitar ocasionar ardor en la boca de los participantes; y, además, la dilución de este disminuye la concentración de alcohol en aproximadamente 10%, ya que, un alto porcentaje de alcohol podría ayudar a reducir el crecimiento bacteriano de las muestras cuando se almacenan.

Posterior al enjuague, se procedió al procesamiento de las muestras para la extracción de ADN, siguiendo una modificación del autor de la publicación (36).

Proceso de aislamiento de ADN de las muestras de los estudiantes de sexto grado de la Escuela Carmen Lyra del año 2019

Día 1. Se inicia la toma de las primeras 61 muestras el jueves 5 de diciembre del 2019, y el lunes 16 de diciembre del 2019, se toma la muestra número 62. Las muestras se centrifugan a 1800 g a 4°C por 30 minutos (en el equipo Centrifuge 5810 R (297880)).

Se decanta y el sobrenadante de cada muestra y se resuspende en 10 ml-15 ml de PBS estéril y cada una se mezcla levemente con un agitador (Vortex Mixer VM-300 número de serie 908777, Gemmy Industrial Corp.). Las muestras se centrifugan a 1800 g a 4°C por 30 minutos. Seguidamente, se decanta cada muestra en el beaker con hipoclorito de sodio (3.5 %) y cada una se resuspende con buffer lisis + high TE:

- Se les agrega 500 µl de buffer lisis + high TE a las muestras: 6, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 24, 25, 27, 30, 31, 32, 34, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 45, 48, 50, 53, 54, 55 y 62.
- Se les agrega 1000 µl de buffer lisis + high TE a las muestras: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 17, 21, 22, 23, 26, 28, 29, 33, 35, 38, 43, 44, 46, 47, 49, 51, 52, 56, 57, 58, 59, 60 y 61.

Las concentraciones de buffer dependen del tamaño del botón de células que se forma al inicio de la extracción; por ejemplo, si el botón es de gran tamaño se utilizan 1000 µl de buffer lisis + high TE, pero si es pequeño, se utilizan 500 µl de buffer lisis + high TE.

A cada muestra se le agregan 25 µl de proteinasa K (20mg/ml) y se incuban las muestras toda la noche en baño maría a 57°C (Precisión Water Bath, GCA Corporation (37383)).

Día 2. Se retiran las muestras del baño maría y a cada una se le agrega el mismo volumen de NaCl 3M, que se usó de solución total de lisis:

- Se les agrega 1000 µl de NaCl 3M a las muestras: 6, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 24, 25, 27, 30, 31, 32, 34, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 45, 48, 50, 53, 54, 55 y 62.
- Se les agrega 2000 ul de NaCl 3M a las muestras: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 17, 21, 22, 23, 26, 28, 29, 33, 35, 38, 43, 44, 46, 47, 49, 51, 52, 56, 57, 58, 59, 60 y 61.

Posteriormente, a cada muestra se le agrega igual volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Se mezclan las muestras en una incubadora con agitación (211DS Shaking Incubator, Labnet (341275)) a 235 rpm por 1 hora. Cada una de las muestras se traslada a un tubo de polipropileno de 15 ml y se centrifuga a 1800 g, 4° C por 5 minutos.

A continuación, se transfiere la fase acuosa de cada muestra, a un tubo nuevo de 15 ml y se agregan 2.5 volúmenes de etanol absoluto a la fase acuosa respectiva de cada muestra (µl de cada muestra x 2,5 volúmenes de etanol). Cada tubo fue rotulado y cuidadosamente verificado para evitar confusión de muestras.

El tubo se invierte suavemente hasta que aparezca los hilos de ADN. En el proceso no apareció un botón en ninguna de las muestras, por lo que las muestras se mantuvieron a -20° C por 14 días y una vez transcurridos los 14 días, se centrifugaron a 1800 g por 30 minutos, se decantaron y se les agregó 1 ml de etanol 70°. De esta manera, las muestras se mantienen a temperatura ambiente durante toda la noche.

Día 3. Las muestras se centrifugan a 1800 g a temperatura ambiente durante 10 minutos y se sacan de la microcentrífuga; se decantan en la pila y se colocan en una gradilla con la tapa abierta y se dejan secar durante 1-3 días a temperatura ambiente con un papel toalla encima.

Día 4. Las muestras se resuspenden en 375 μ l de TE buffer bajo en EDTA (Invitrogen, No. de catálogo: 12090-015). Luego, las muestras se incuban toda la noche en baño maría a 37° C.

Día 5. Se utiliza el espectrofotómetro NanoDrop 2000C (Thermo Scientific (332045) para evaluar la calidad y cuantificación de las muestras; por último, se almacenan a 4° C.

PCR: ensayo del gen *16S*

Se diluyen las muestras a una concentración de 25 ng/ μ l y se realiza el ensayo con los primers del gen *16S*, como control positivo de la extracción de la muestra. Todas las bacterias tienen el gen *16S*.

A cada muestra se le agregan los reactivos indicados en la Tabla 1, como se muestra a continuación.

Tabla 1. Componentes y volúmenes de la reacción de amplificación

Reactivos	Volumen de una reacción (μl)
MM2X	7.5
Agua	3.5
Primers	2
Template (ADN) o agua (control negativo)	2

Fuente: Elaboración propia.

A cada una de las muestras se les efectúa el proceso que se expone en la Tabla 2.

Tabla 2. Programa de amplificación llevado a cabo para el análisis de las muestras

Activación de Taq Polimerasa	Desnaturalización	Hibridación (TA)	Polimerización	Extensión	Conservación
95°C	95°C	54°C	72°C	72°C	4°C
2 minutos	30 segundos	1 minuto	1 minuto	5 minutos	∞
	40 ciclos				

Fuente: Choi D, et al., modificado (37).

Las muestras 2, 4, 7, 8, 18, 19, 20, 21, 22, 28, 31, 32, 36, 39, 41, 43, 48, 53, 60 61 dieron negativas con los primers del gen *I6S* en el primer ensayo; por lo cual, se repite el ensayo con las mismas muestras sin diluir (es decir, con la concentración original de la extracción de ADN).

En el segundo ensayo, las muestras 2, 4, 8, 31, 32, 39 y 41 volvieron a ser negativas con los primers del gen *I6S*; por lo que, se repitió de nuevo el ensayo de PCR con estas muestras y de igual manera con la concentración original.

En el tercer ensayo, la muestra 4 fue la única en dar negativo al ensayo con los primers del gen *I6S*.

Posteriormente, se decide que las muestras 4, 8, 18, 39 y 41 se retirarán del proyecto al ser negativas a los primers del gen *I6S*.

PCR: ensayos con *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola* (se repite el procedimiento realizado con el gen *I6S*).

Tabla 3. Nomenclatura, secuencia y temperatura de hibridación de los pares de primers utilizados en la amplificación de ADN

Bacteria	Oligonucleótidos 5'- 3'	TA (°C)	Amplicon (pb)
<i>16S</i> (38)	F – 5' – AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG – 3'	54	1.500
	R – 5' – GGT TAC CTT GTT ACG ACT T – 3'		
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (37)	F – 5' – AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG – 3'	56	404
	R – 5' – ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT – 3'		
<i>Tanerella forsythia</i> (37)	F – 5' – GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA – 3'	56	641
	R – 5' – TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T – 3'		
<i>Treponema denticola</i> (37)	F – 5' – TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T – 3'	56	316
	R – 5' – TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA – 3'		

Gel de electroforesis

El gel se confecciona con una concentración de 1.5% agarosa en TBE 0.5X. Se utiliza un volumen de 5 µl de producto de amplificación con 1 µl de tinción de carga GelRed, se utiliza 4 µl de la escalera GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) y el gel se somete a una corriente eléctrica de 100 voltios constantes durante 45 minutos. Por último, por medio del transiluminador UV se visualizan las bandas para los resultados del aislamiento de ADN para *T. forsythia*.

Análisis descriptivo de los resultados

El análisis descriptivo se realizó utilizando el calibrador QIAxel, con este se obtuvieron los resultados del aislamiento de ADN para *P. gingivalis* y *T. denticola*. Se confirmó la normalidad y homogeneidad de los datos.

Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico se realizó utilizando IBM SPSS STATISTICS versión 22 para analizar variables sobre la salud gingival. Se confirmó la normalidad y homogeneidad de los datos y se obtuvieron frecuencias y medidas de tendencia central.

RESULTADOS

Índice de biofilme

El índice de biofilme medio según Silness y Løe de 1964 (9) fue de 1.18, esto significa que la presencia de biofilme no es detectable a simple vista, pero sí se puede observar al pasar la sonda periodontal sobre la superficie dental. No se encontró evidencia estadísticamente significativa entre el resultado de las niñas y el de los niños en el promedio ($p=0.322$) del índice de biofilme; sin embargo, se logró observar que los niños obtuvieron un resultado más alto (1.24) en comparación con las niñas (1.12).

Cálculo dental

La prevalencia de cálculo fue de 40.40 %. El cálculo supragingival se encontró en un 19.4% de los participantes y el 21 % tenían cálculo tanto supragingival como subgingival. No

se determinaron evidencias estadísticamente significativas ($p=0.160$) entre el promedio de dientes con cálculo entre los niños (1.30) y las niñas (1.41).

En cuanto a la presencia de cálculo, al considerar el número de dientes con cálculo y el número de superficies sangrantes ($p=0.0009$) se estableció una relación significativa con la presencia de sangrado al sondaje.

Estado gingival

Al evaluar el estado gingival, se comprobó que el 96.8% de los participantes padecía gingivitis; el 11.5% de los escolares presentó gingivitis limitada y el 88.5% gingivitis extensa. Según el Índice Gingival de Silness y Løe (8), los niños obtuvieron un índice promedio de 0.97, eso significa que había predominio de gingivitis leve; de acuerdo con este criterio, un resultado de 0.1-1.0 se califica como gingivitis leve, 1.1-2.0 como gingivitis moderada y 2.1-3.0, gingivitis severa.

No se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p=0.639$) entre el promedio de dientes que mostró sangrado gingival en los niños (1) y en las niñas (0.94).

Presencia de bacterias del complejo rojo

Tabla 4. PCR de las bacterias del complejo rojo: *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Treponema denticola* (*Td*) y *Tannerella forsythia* (*Tf*) en las muestras de saliva de niños de 12 años de la Escuela Carmen Lyra

Muestra	<i>P.g</i>		<i>T.d</i>		<i>T.f</i>	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
1		X	X			X

2	X		X		X	
3		X	X		X	
5		X	X		X	
6		X	X			X
7		X		X		X
9		X	X			X
10		X	X			X
11		X		X		X
12		X		X		X
13		X		X		X
14		X	X		X	
15	X		X		X	
16		X	X			X
17		X	X			X
19		X	X		X	
20		X	X		X	
21		X	X			X
22		X	X		X	
23		X		X	X	
24		X	X			X
25		X	X			X

26		X	X			X
27		X	X			X
28	X		X		X	
29		X	X		X	
30		X		X		X
31		X	X			X
32		X	X			X
33	X		X			X
34		X		X	X	
35		X		X		X
36		X		X		X
37		X	X			X
38	X		X		X	
40		X	X			X
42		X		X		X
43		X		X	X	
44		X	X		X	
45		X		X		X
46		X	X			X
47		X		X	X	
48		X		X		X

49		X		X		X
50		X		X		X
51		X		X	X	
52		X		X		X
53		X		X		X
54		X		X		X
55		X		X		X
56		X	X			X
57		X		X		X
58		X		X		X
59		X		X	X	
60	X		X			X
61	X			X		X
62		X	X			X

Fuente: Elaboración propia

Mediante el gel de electroforesis y el uso de la escalera de GeneRuler, se recogieron los resultados presentados en la Tabla 4 para determinar la presencia de las bacterias *T. denticola*, *P. gingivalis* y *T. forsythia* en 57 de las muestras recolectadas, porque se decidió que las muestras 4, 8, 18, 39 y 41 se retirarían del proyecto al resultar negativas a los primers del gen *16S*.

Según los resultados obtenidos, 32 muestras (56.14%) mostraron un resultado positivo a la presencia de *T. denticola*, 18 muestras (31.58%) fueron positivas para *T. forsythia* y 7 muestras (12.28%) resultaron positivas para *P. gingivalis*.

La Tabla 4 registra que la bacteria hallada con mayor frecuencia en las muestras fue *T. denticola*, mientras que la bacteria con menor presencia fue *P. gingivalis*. Entre el total de participantes, 18 de las muestras (31.58 %) no presentaron ninguna de las bacterias analizadas y las 39 muestras restantes (68.42 %) presentaron un resultado positivo a la presencia de al menos una de las bacterias del complejo rojo.

Por lo tanto, 25 muestras (43.86 %) fueron positivas a la presencia de solamente una de las bacterias del complejo rojo, 10 muestras (17.54 %) se mostraron positivas a la presencia de al menos dos bacterias y 4 muestras (7.02 %) se encontraron positivas a la presencia de las tres bacterias analizadas.

De las 10 muestras en las que se hallaron dos de las tres bacterias presentes, 8 de ellas (80 %) resultaron positivas para *T. denticola* y *T. forsythia*, 2 de las muestras (20 %) fueron positivas para *P. gingivalis* y *T. denticola*. En ninguna de las muestras analizadas se halló una combinación con la presencia de *P. gingivalis* y *T. forsythia*.

Y por último, de las 25 muestras que fueron positivas a solamente una de las bacterias, 18 de ellas (72 %) fueron positivas para *T. denticola*, 6 (24 %) se mostraron positivas para *T. forsythia* y 1 de las muestras (4 %) dio positiva para *P.gingivalis*.

DISCUSIÓN

En las 62 muestras recolectadas a los estudiantes de la Escuela Carmen Lyra, se encontró que presentaban biofilme (no visible a la vista, pero detectable en el examen con sonda); el 40.40 % presentaba cálculo (21 % tanto subgingival como supragingival); el 96.8 % de los participantes presentaron gingivitis (11.5 % de los escolares presentó gingivitis limitada y el 88.5 % gingivitis extensa) y predominó la gingivitis leve.

Entre el total de participantes y según las pruebas de PCR para bacterias del complejo rojo, 18 de las muestras (31.58 %) no presentaron ninguna de las bacterias analizadas y las 39 muestras restantes (68.42 %) presentaron un resultado positivo a la presencia de al menos una de las bacterias del complejo rojo y de las muestras que presentaron alguna de las bacterias analizadas, 32 muestras (56.14 %) fueron positivas a la presencia de *T. denticola*, 18 (31.58 %) fueron positivas para *T. forsythia*, 7 (12.28 %) se mostraron positivas para *P. gingivalis* y 18 de las muestras (31.58 %) no presentaron ninguna de las bacterias analizadas.

También, 25 muestras (43.86 %) fueron positivas a la presencia de solamente una de las bacterias del complejo rojo; 10 muestras (17.54 %) se mostraron positivas a la presencia de al menos dos bacterias y 4 muestras (7.02 %) fueron positivas a la presencia de las tres bacterias analizadas.

Los resultados confirman la presencia de las bacterias del complejo rojo entre la población estudiada, cuya salud gingival también está afectada, siendo un indicador del efecto de la disbiosis provocada por las bacterias del complejo rojo analizadas y encontradas en las muestras. Esta alteración del ambiente oral producida por un cambio en la microbiota o en la habilidad del huésped para responder a este desequilibrio, propicia la proliferación de bacterias (21).

Las bacterias del complejo rojo se caracterizan por promover la progresión de la enfermedad periodontal (4) y son colonizadores tardíos; de ahí que, su presencia es indicadora de una disbiosis ya establecida que afecta la salud gingival del hospedero (39). Con base en el estado de la salud gingival de los sujetos, se confirma que existe una relación al encontrar la presencia de *T. denticola*, *T. forsythia*, y *P. gingivalis* y un diagnóstico de gingivitis con indicadores de enfermedad periodontal como inflamación, sangrado gingival y presencia de cálculo.

De acuerdo con los resultados obtenidos relacionados con el índice de biofilme, se puede deducir que los sujetos poseen higiene oral deficiente y que la causa principal para la gingivitis (con 96.8 % de incidencia) es la acumulación de biofilme (1); a su vez, esta acumulación es proporcional a la prevalencia de cálculo dental. Una relación similar fue reportada por Ballouk y Dashash en el 2018, quienes informaron haber encontrado un índice de biofilme 1.12 y una prevalencia de gingivitis de 97.93 % (11).

Con respecto a la relación entre el índice de biofilme, cálculo dental y la incidencia de gingivitis con la presencia de bacterias del complejo rojo en las muestras de saliva, se sabe que si el individuo cuenta con un ambiente oral simbiótico, las bacterias se mantienen en equilibrio; pero si este ambiente se ve alterado por factores como el biofilme y la acumulación de cálculo, el entorno oral se vuelve disbiótico y las bacterias patógenas proliferan, por lo que se pueden presentar enfermedades periodontales (20).

La presencia de estas bacterias se ha relacionado con factores extrínsecos estudiados en la población elegida para el análisis realizado; tal es el caso de la dieta, el nivel de educación de los padres y el acceso a los servicios de salud, que influyen en la mayor presencia de biofilme, cálculo dental y afectación de las encías.

El índice de biofilme, la presencia de cálculo, signos de gingivitis, la presencia elevada de al menos una de las bacterias analizadas entre las muestras tomadas y la existencia de sangrado gingival son indicativos de un ambiente microbiológico propiciado por el consumo de alimentos con alto contenido de carbohidratos como se ha relacionado en estudios previos (34).

Por otro lado, la situación socioeconómica y el nivel de educación de los padres y, sobre todo, el acceso regular a servicios de salud son factores importantes por tomar en cuenta sobre el estado de salud gingival y dental de los niños (35). La Escuela Carmen Lyra en asociación con la Facultad de Odontología de la Universidad de Costa Rica brinda servicios odontológicos gratuitos a sus estudiantes; no obstante, la intervención restaurativa resulta no ser suficiente para controlar la enfermedad periodontal y la presencia de bacterias del complejo rojo que se le asocian.

Por esta razón, la educación en promoción de la salud y prevención de la enfermedad, como las indicaciones individualizadas para una correcta higiene oral, tanto a los estudiantes como a los padres/encargados, son importantes para prevenir la enfermedad periodontal, además del acceso a los servicios de salud odontológica.

La zona de alcance de la Escuela Carmen Lyra se caracteriza por la existencia significativa de hogares disfuncionales y de escasos recursos y, aunque la presencia de hormonas liberadas por el estrés no fue analizada, esa condición socioeconómica podría propiciar en los niños, que se atienden en la clínica del centro educativo, un ambiente de estrés favorable al desarrollo de la enfermedad periodontal.

Con respecto a la interacción que se encontró entre dos de las bacterias del complejo rojo en las muestras, el 80 % fue positivo para *T. denticola* y *T. forsythia* y el 20 %, para *T.*

denticola y *P.gingivalis*; se ha demostrado que *T. denticola* se une específicamente a *P. gingivalis* y *T. forsythia* con avidéz similar (25), lo que explica la estrecha asociación que presentó con las otras dos bacterias del complejo rojo, reiterando así esta teoría. También se ha demostrado que las LrrA de *T. denticola* intervienen en la unión con *T. forsythia*, pero no con *P. gingivalis*; adicionalmente, las proteínas LrrA son importantes en la invasión de células epiteliales y en la formación de biofilme por *P. gingivalis* (25). Debido a este factor de virulencia que posee *T. denticola* se podría explicar la asociación predominante, que presentaron los resultados, de esta bacteria con *T. forsythia* y *P. gingivalis*.

T. denticola se encuentra usualmente en los sitios con mayor profundidad de bolsa y, en los sanos, rara vez se comprueba su presencia, pues no es un colonizador temprano de biofilme subgingival (4). En relación con esta característica, se entiende que, en la mayor parte de los participantes, se presenta una enfermedad periodontal activa con bolsas periodontales profundas, ya que *T. denticola* fue la bacteria más prevalente en las muestras.

Al comparar su presencia en individuos sanos, *T. forsythia* se ha asociado frecuentemente con varias formas de la enfermedad periodontal, pues se encontró que *T. forsythia* forma mezclas de biofilme sinérgico con *F. nucleatum* (considerada como bacteria “puente” por su capacidad de coagregarse con bacterias colonizadoras tempranas y tardías), lo que facilita la formación de biofilme (4); *P. gingivalis* también juega un papel importante en la coagregación, formación de biofilme y disbiosis microbiana, porque pueden actuar directamente sobre otras bacterias o inducir un entorno óptimo para el desarrollo de la enfermedad periodontal (23).

P. gingivalis y *T. denticola* fue la segunda interacción con más prevalencia en las muestras, estas bacterias se encuentran con frecuencia en lesiones periodontales; *T. denticola* (espiroqueta oral) se haya en las capas superficiales del biofilme subgingival y *P. gingivalis*

predominantemente se observa debajo de una capa de espiroquetas, lo que demuestra la relación simbiótica que existe entre ambas bacterias (40).

Una tercera interacción es la que ocurre entre *T. forsythia* y *P. gingivalis* especialmente en un estado activo de periodontitis y se ha sugerido que se produce una simbiosis nutricional entre ellas (40); en este estudio las muestras no presentaron ninguna interacción de este tipo, lo cual permite inferir que la enfermedad periodontal de los niños participantes no se encuentra en un estado activo, o más bien, está en etapas iniciales.

Los índices y parámetros clínicos utilizados en este estudio se relacionan con la prevalencia de gingivitis; sin embargo, los análisis de laboratorio realizados a las muestras de saliva determinaron la presencia de bacterias del complejo rojo, las cuales se relacionan directamente con la periodontitis.

La determinación de la profundidad de la bolsa periodontal es un elemento importante para determinar y clasificar la periodontitis, no obstante, este factor no se consideró en este trabajo, de modo que se evidencia una limitante del estudio y se considera una oportunidad de mejora para futuras investigaciones. Los factores intrínsecos relacionados con la enfermedad periodontal como alteraciones genéticas, estrés, enfermedades autoinmunes, presión diastólica y diabetes en niños y adolescentes (28) son factores que no se consideraron en este estudio; tampoco se tomó en cuenta el nivel de educación de los padres ni sus hábitos de higiene, cuya influencia en la salud bucodental de los menores es determinante.

El tamaño reducido de la población reclutada permitió que los parámetros clínicos e inclusive la recolección de las muestras de saliva de los participantes los efectuara una sola operadora calibrada, especialista en Periodoncia, de ese modo, se disminuyeron las probabilidades de sesgo y se brindó mayor especificidad. Otra de las fortalezas del estudio fue la población analizada, en sí, ya que, de cierta manera fue controlada: niños y niñas de la misma

zona geográfica, la misma edad, igual nivel escolar, semejante acceso a servicios de salud oral similares (brindados en la misma escuela) y pertenecientes al mismo centro educativo; todo esto proporciona cierta homogeneidad a la población, permite cierto control y brinda información con respecto al entorno en el que viven los sujetos participantes, y se disminuye la posibilidad de que exista desventaja socioeconómica entre ellos.

Con la información mencionada es de interés e importancia el efectuar estudios futuros que analicen otros factores que podrían influir en la enfermedad periodontal, tanto extrínsecos como intrínsecos, y relacionarlos con los resultados obtenidos; de manera que se determine si la presencia de bacterias del complejo rojo junto con un diagnóstico adecuado de periodontitis, presentan mayor prevalencia en sujetos que se encuentran expuestos a esas variables.

CONCLUSIÓN

La enfermedad periodontal es un problema de salud pública y debe ser intervenida particularmente en etapas tempranas. Es escasa la evidencia científica sobre este tema en la población juvenil, por lo que se requiere más investigación para lograr un mejor control con el fin de evitar el avance y severidad de la enfermedad. Al encontrar un porcentaje sustancial de bacterias del complejo rojo en las muestras de saliva y un diagnóstico de gingivitis generalizada en los estudiantes, se puede deducir que es muy probable que exista una relación entre la presencia de estas bacterias con respecto a una salud gingival afectada.

El índice de biofilme obtenido y la presencia de cálculo demuestran una higiene deficiente en los participantes, que es uno de los factores primordiales para el desarrollo de la enfermedad periodontal. La presencia de sangrado también es un indicativo de inflamación y

acúmulo de biofilme, lo que reafirma el diagnóstico obtenido en los sujetos participantes. A pesar de ser una población con acceso gratuito y regular a servicios odontológicos, se demuestra que esto no es suficiente para garantizar un buen estado de salud gingival. Es recomendable hacer énfasis en educación en promoción de la salud oral y prevención de la enfermedad dirigida específicamente a los padres y encargados de los estudiantes de la Escuela Carmen Lyra y así lograr un control adecuado de la formación del biofilme.

Para alcanzar mayor preponderancia en un estudio semejante, resultaría beneficioso considerar la presencia y profundidad de bolsa periodontal como parámetros por estudiar; ya que ayudaría a determinar la severidad de la enfermedad periodontal presente en los sujetos participantes y su resultado generaría mayor impacto.

REFERENCIAS

1. Chapple ILC, Mealey BL, van Dyke TE y cols. Consensus report: Periodontal health and gingival diseases/conditions. *Journal of Clinical Periodontology*. 2018; 45, S68-S77.
2. Holmstrup P, Plemons J, Meyle J. Non-plaque induced gingival diseases. *Journal of Clinical Periodontology*. 2018; 45, S28-S43.
3. Sanz M, Tonetti M. Nueva clasificación de enfermedades periodontales y periimplantares. *European Federation of Periodontology*. 2019.
4. Mohanty R., Asopa SJ., MD J, et al. Red complex: Polymicrobial conglomerate in oral flora: A review. *J Family Med Prim Care*. 2019; 8:3480-6.
5. Caton J., Armitage G., Berglundh T., et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018; 45:45(Suppl 20); S1–S8.
6. Trombelli, L., Farina, R., Silva, C. O., & Tatakis, D. N. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *Journal of Clinical Periodontology*, 2018; 45(S20), S44–S67. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12939>.
7. Greene, Vermillon. The simplified oral hygiene index. *The Journal of the American Dental Association*. 1964; 68:7-13.
8. Løe H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. Department of Periodontology, The Royal Dental College, Aarhus, Denmark. 1967; 39.
9. Silness J., Loe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol Scand*. 1964; 22:121-35.
10. Chiappe V., et al. Diagnóstico de la necesidad de tratamiento periodontal en adultos de la República Argentina. *Estudio epidemiológico Nacional*. 2000; 2.

11. Ballouk y Dashash. The gingival health status of 8–12 year-old children in Damascus city in Syria during the Syrian Crisis: a cross-sectional epidemiological oral health survey. 2018; 11:887.
12. Boneta, et al. Prevalence of gingivitis and calculus in 12-year-old Puerto Ricans: a cross-sectional study. 2018; 18:13.
13. Murillo, et al. Prevalence and Severity of Plaque-Induced Gingivitis in Three Latin American Cities: Mexico City-Mexico, Great Metropolitan Area-Costa Rica and Bogota-Colombia.-ODOVTOS-Int. J. Dental Sc. 2018; 20-2: 91-102.
14. Lao W. Perfil Epidemiológico de la Salud Oral en los Adolescentes que consultan los servicios de Odontología de la Caja Costarricense de Seguro Social, en el período entre los meses Abril - junio 2017. Caja Costarricense del Seguro Social. 2018; 12-13.
15. Ramírez K., Gómez A., Rojas M., et al. Gingival Health Related to Intake of Different Types of Foods and Body Mass Index in 12-year-old Schoolchildren.-ODOVTOS-Int. J. Dental Sc. 2020; 165-177.
16. Machado T. Relationship between gingival bleeding and associated factors with reports of verbal bullying in adolescents. *Journal of periodontology*. 2020.
17. Funieru C., Klinger A., Baicuș C., et al. Epidemiology of gingivitis in schoolchildren in Bucharest, Romania: a crosssectional study. *J Periodont Res*. 2017; 52: 225–232.
18. R. O. Owino & Coll. Dental Caries, Gingivitis And The Treatment Needs Among 12-year-olds. *East African Medical Journal*. 2010.
19. Petersen P. E., Baez R. *Oral Health Surveys: Basic methods - 5th ed.* World Health Organization, France. 2013.
20. Bloch S., Tomek M., Friedrich V., et al. Nonulosonic acids contribute to the pathogenicity of the oral bacterium *Tannerella forsythia*. *Interface Focus*. 2019; 9: 20180064. <http://dx.doi.org/10.1098/rsfs.2018.0064>.

21. Cugini C., Ramasubbu N., Tsiagbe VK., Fine DH. Dysbiosis From a Microbial and Host Perspective Relative to Oral Health and Disease. *Front Microbiol.* 2021; 12.
22. Diard M., y Hardt W. Evolution of bacterial virulence. Department of Biology (D-BIOL). Federation of European Microbiological Societies Reviews. 2017. doi: 10.1093/femsre/fux023.
23. Xu W., Zhou W., Wang H., Liang S. Roles of *Porphyromonas gingivalis* and its virulence factors in periodontitis. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology.* 2020; volume 120. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.12.001>.
24. Honma K., Mishima E., y Sharma A. Role of *Tannerella forsythia* NanH Sialidase in Epithelial Cell Attachment. *American Society for Microbiology: Infection and Immunity.* 2011; p. 393–401. doi: :10.1128/IAI.00629-10.
25. Dashper SG, Seers CA, Tan KH, Reynolds EC. Virulence factors of the oral spirochete *Treponema denticola*. *J Dent Res.* 2011; 90(6):691-703. doi: 10.1177/0022034510385242. PMID: 20940357; PMCID: PMC3144123.
26. Kikuchi Y, Ishihara K. Characterization of the *Treponema denticola* Virulence Factor Dentilisin. *Methods Mol Biol.* 2021; 2210:173-184. doi: 10.1007/978-1-0716-0939-2_17. PMID: 32815138.
27. Genco RJ y Borgnakke, WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2013; 62(1):59-94. doi: 10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x. PMID: 23574464.
28. Fardal O., Skau I., Grytten J. Familial tendency as a determinant of tooth loss during longterm periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2020; 47:213–222. doi: 10.1111/jcpe.13219.
29. Heikkinen, Raivisto, Kettunen, et al. Pilot Study on the Genetic Background of an Active Matrix Metalloproteinase-8 Test in Finnish Adolescents. *J Periodontol.* 2016. doi: 10.1902/jop.2016.160441.

30. Scapoli L., Girardi A., Palmieri A. IL6 and IL10 are genetic susceptibility factors of periodontal disease. *Dental Research Journal*. 2012; vol 9, Issue 8 (Supplement Issue 2).
31. Zupin L., Robino A., Navarra C., Bevilacqua, L. LTF and DEFB1 polymorphisms are associated with susceptibility toward chronic periodontitis development. *Oral Diseases*. 2017; 23:1001–1008.
32. Sabbah, W., Gomaa, N., Gireesh, A. Stress, allostatic load, and periodontal diseases. *Periodontology 2000*. 2018; 78:154–161. doi: 10.1111/prd.12238.
33. Zeigler C., Wondimu1 B., Marcus C., Modéer T. Pathological periodontal pockets are associated with raised diastolic blood pressure in obese adolescents. *BMC Oral Health*. 2015. doi: 10.1186/s12903-015-0026-6.
34. Hujoel PP, Lingstrom P. Nutrition, dental caries and periodontal disease: a narrative review. *J Clin Periodontol*. 2017; 44 (Suppl. 18): S79–S84. doi: 10.1111/jcpe.12672.
35. Attawood L., Sasivimol R., Sakda A., et al. The association between oral hygiene and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *International Dental Journal*. 2017; 67: 332–343 doi: 10.1111/idj.12317.
36. Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, et al. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acid Res*. 1989 Oct 25; 17 (20): 8390. doi: 10.1093/nar/17.20.8390.
37. Choi D, Cha B, Jost-Brinkmann P, et al. Microbiologic Changes in Subgingival Plaque After Removal of Fixed Orthodontic Appliances. *Angle Orthodontist*. 2009; vol 79, No 6, 2009. doi: 10.2319/111808-593.1.
38. Chen, Y., Lee C, Lin Y, et al. Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples. *BMC Bioinformatics*. 2015; 16 (Suppl 18) <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/16/S18/S13>.

39. Colombo A, Tanner A. The role of bacterial biofilms in dental caries and periodontal and peri-implant diseases: a historical perspective. *J Dent Res.* 2019; 98(4): 373-385. <http://doi.org/10.1177/0022034519830686>.
40. Suzuki N, Yoneda M y Hirofuji T. Mixed Red-Complex Bacterial Infection in Periodontitis. *Int J Dent.* 2013; 587279. doi: 10.1155/2013/587279.

APÉNDICES

Resultados de aislamiento de ADN para *Porphyromonas gingivalis* de las muestras de los estudiantes de la escuela Carmen Lyra del año 2019 utilizando el calibrador QIAxcel.

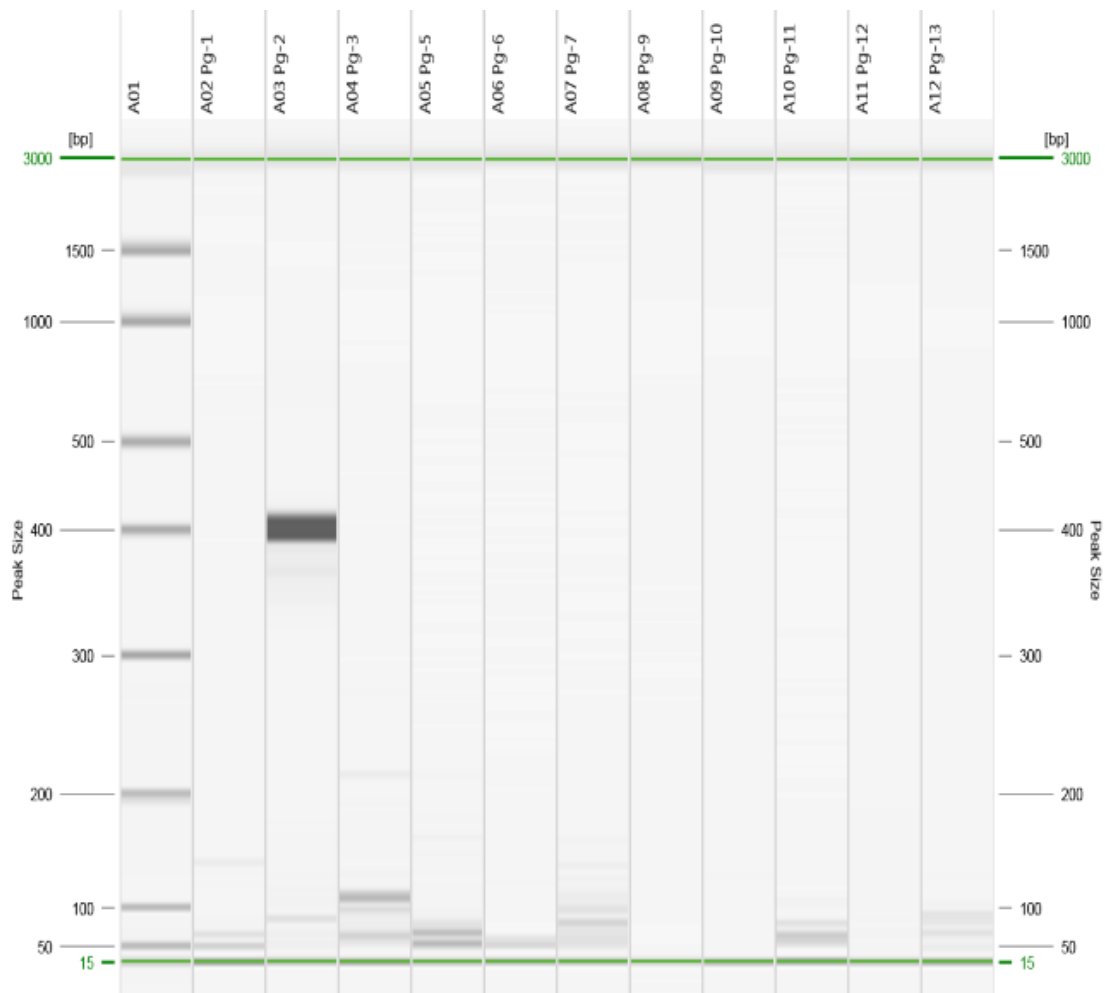


Figura 2. Resultados de muestras para *Porphyromonas gingivalis* de 1-13.

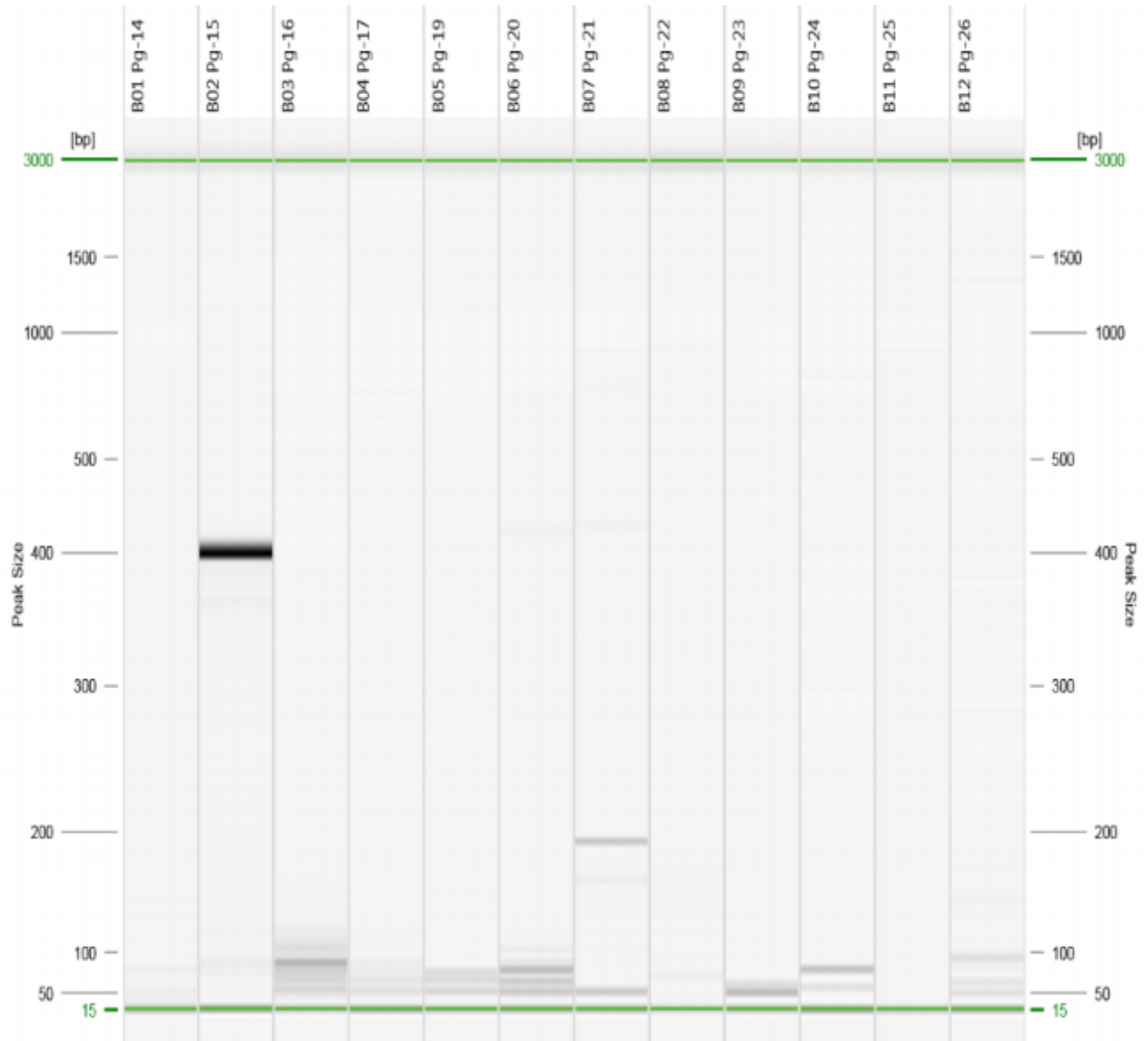


Figura 3. Resultados de muestras para *Porphyromonas gingivalis* de 14-26.

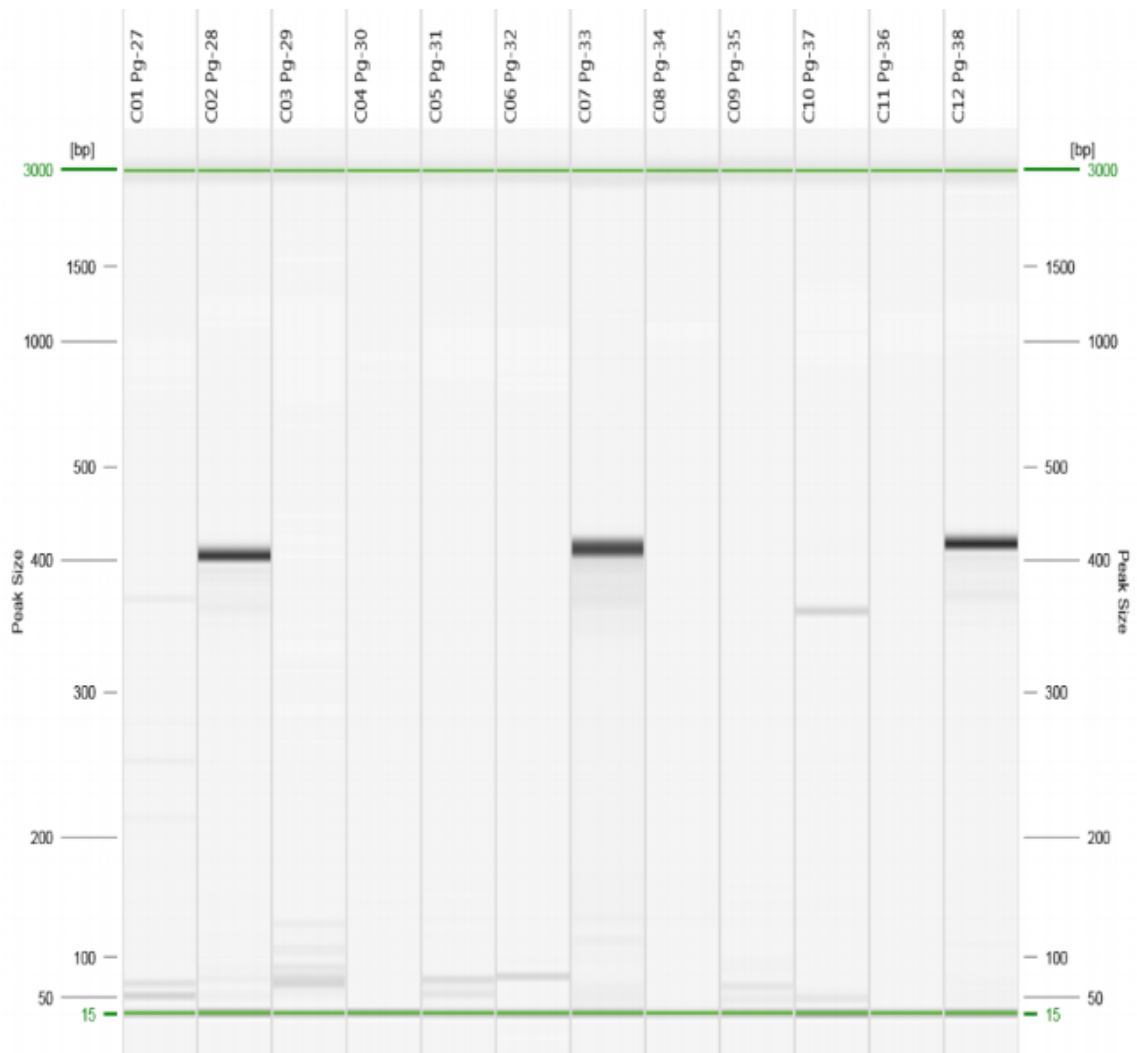


Figura 4. Resultados de muestras para *Porphyromonas gingivalis* de 27-38.

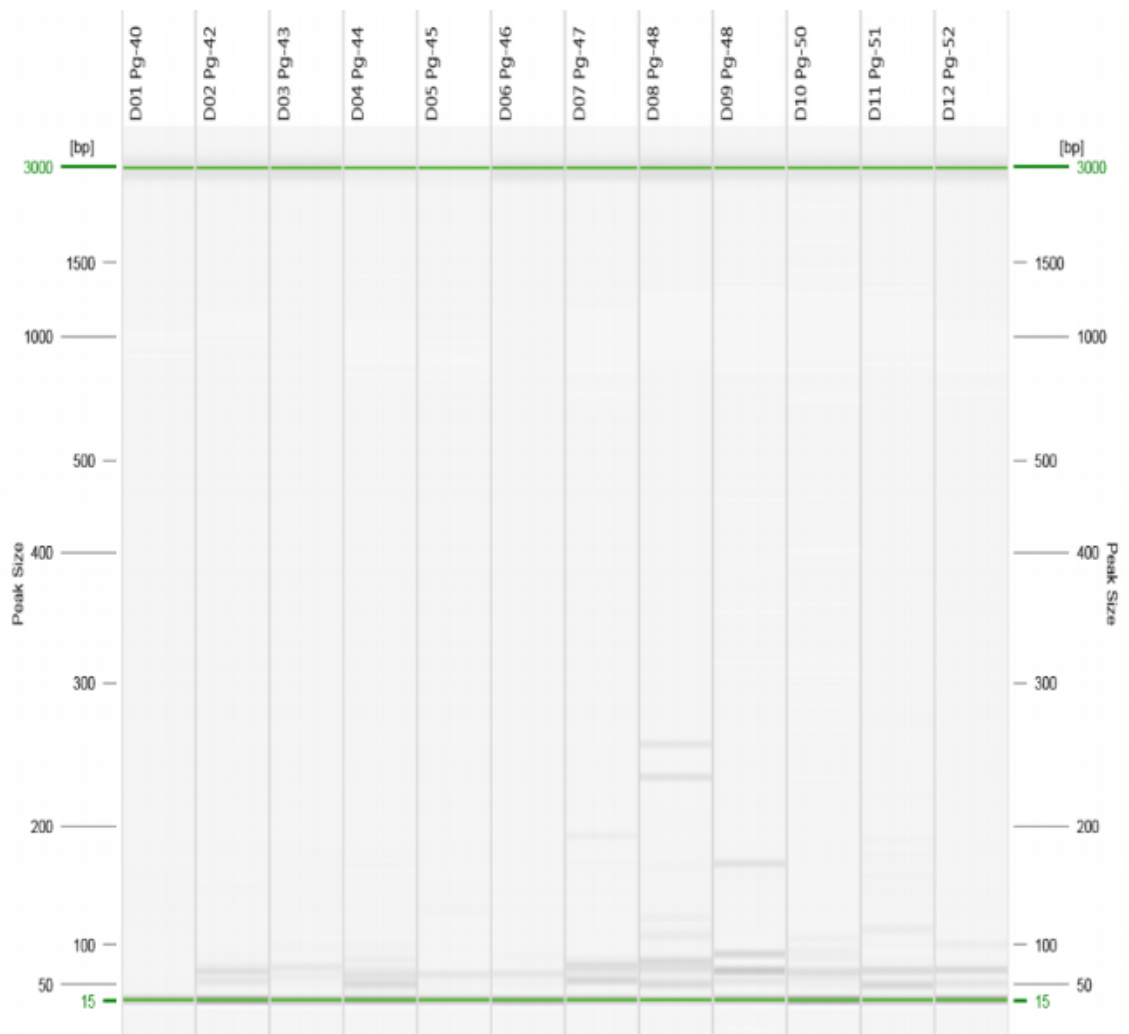


Figura 5. Resultados de muestras para *Porphyromonas gingivalis* de 40-52.

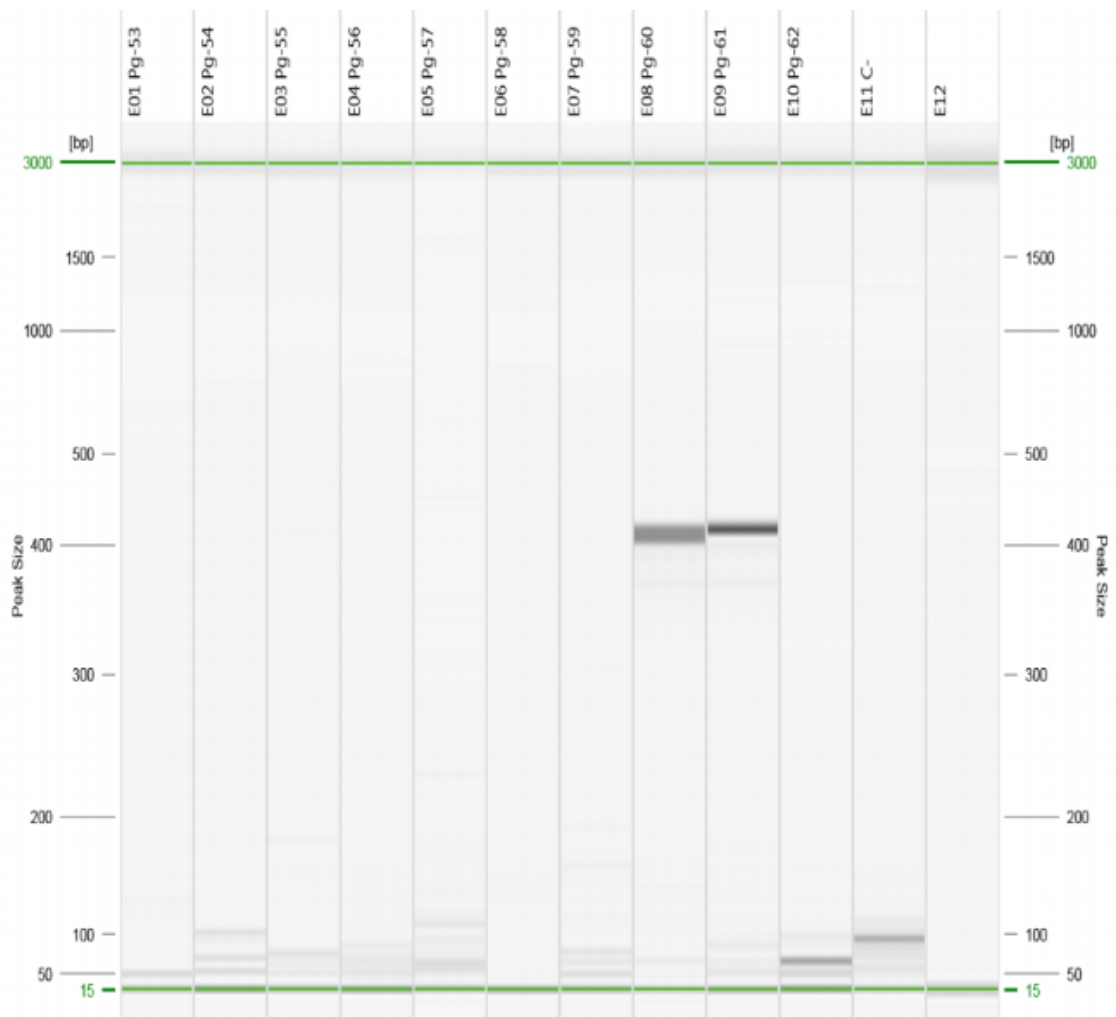


Figura 6. Resultados de muestras para *Porphyromonas gingivalis* de 53-62.

Resultados de aislamiento de ADN para *Treponema denticola* de las muestras de los estudiantes de la escuela Carmen Lyra del año 2019 utilizando el calibrador QIAxcel.

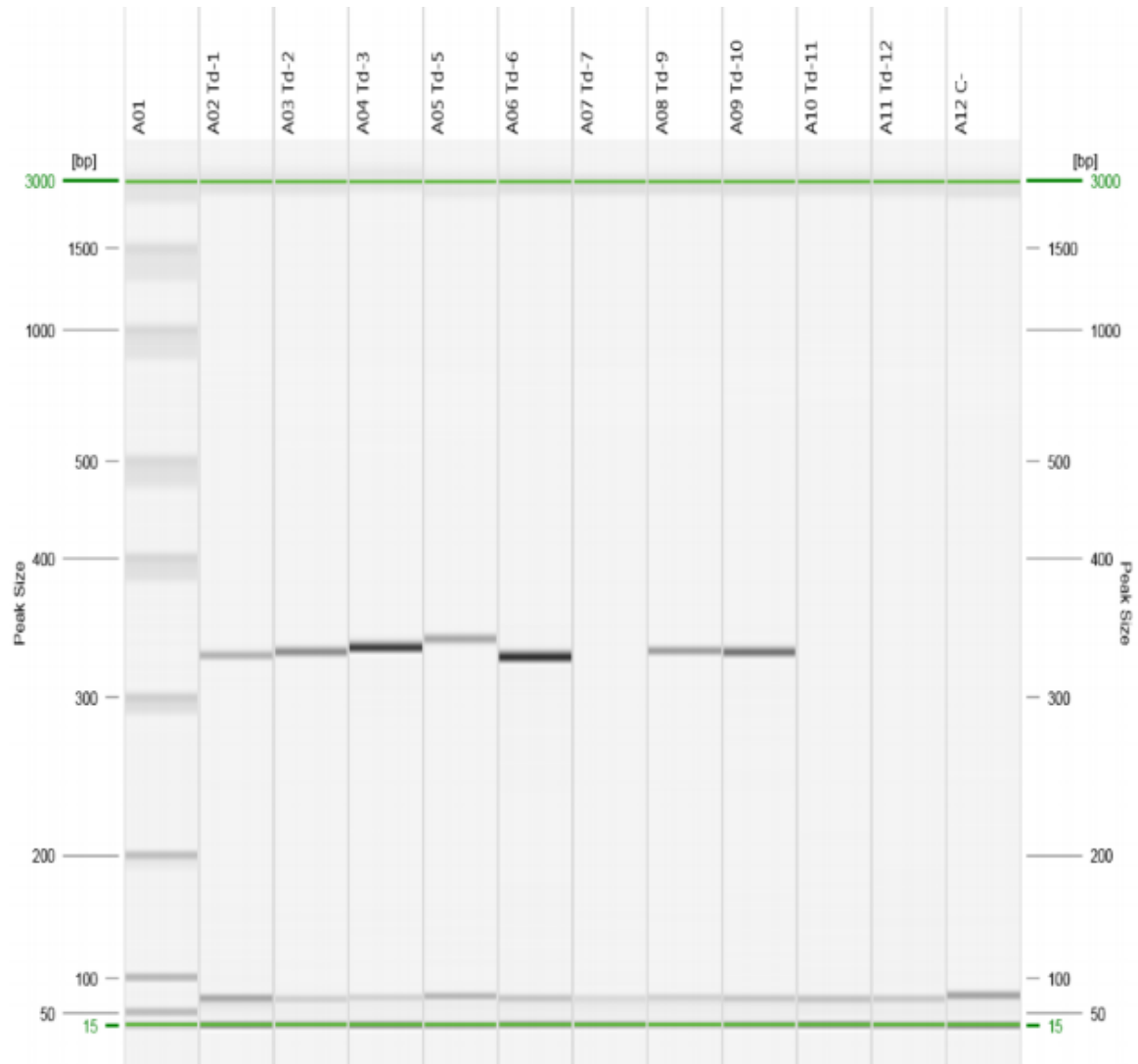


Figura 7. Resultados de muestras para *Treponema denticola* de 1-12.

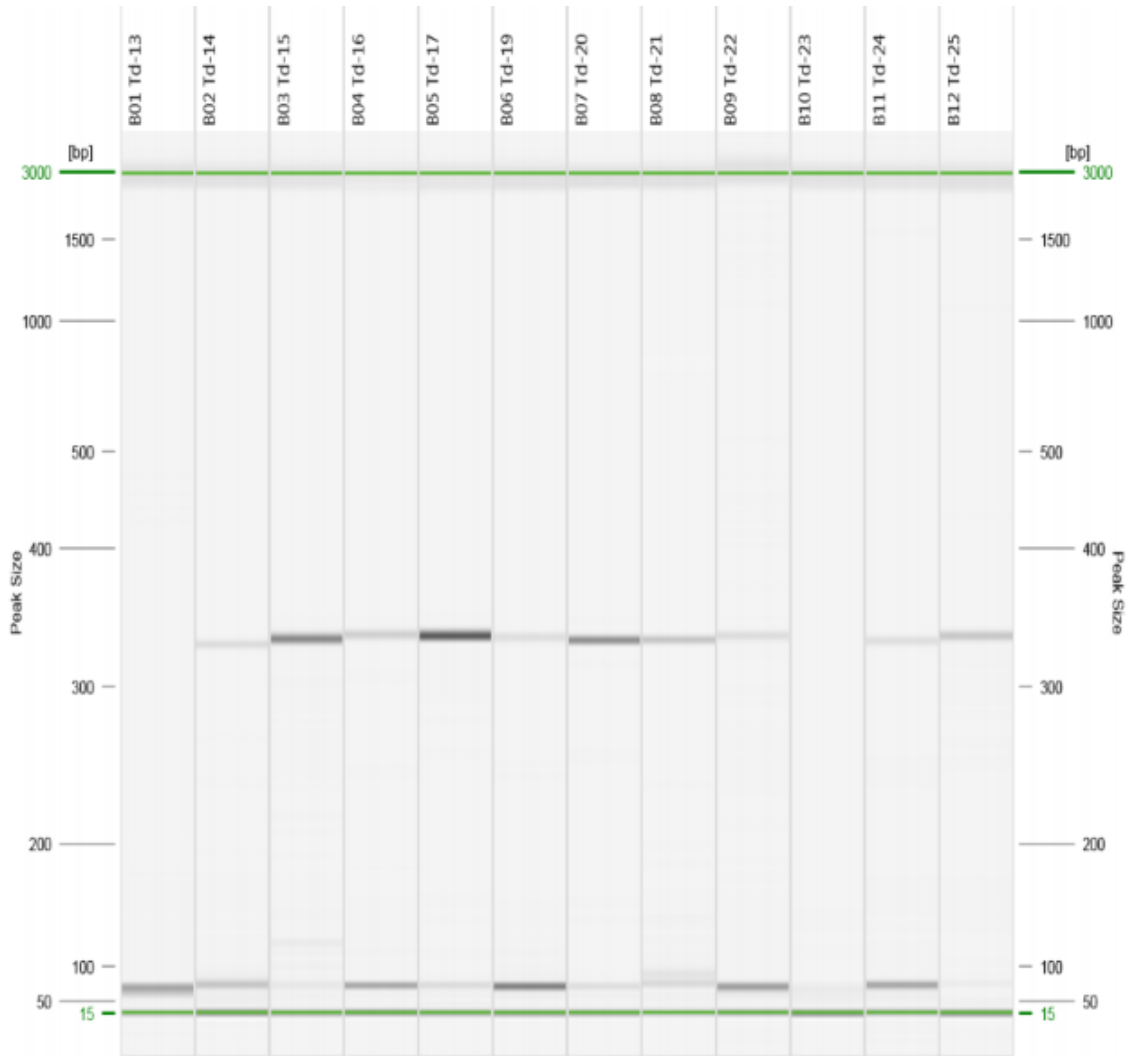


Figura 8. Resultados de muestras para *Treponema denticola* de 13-25.

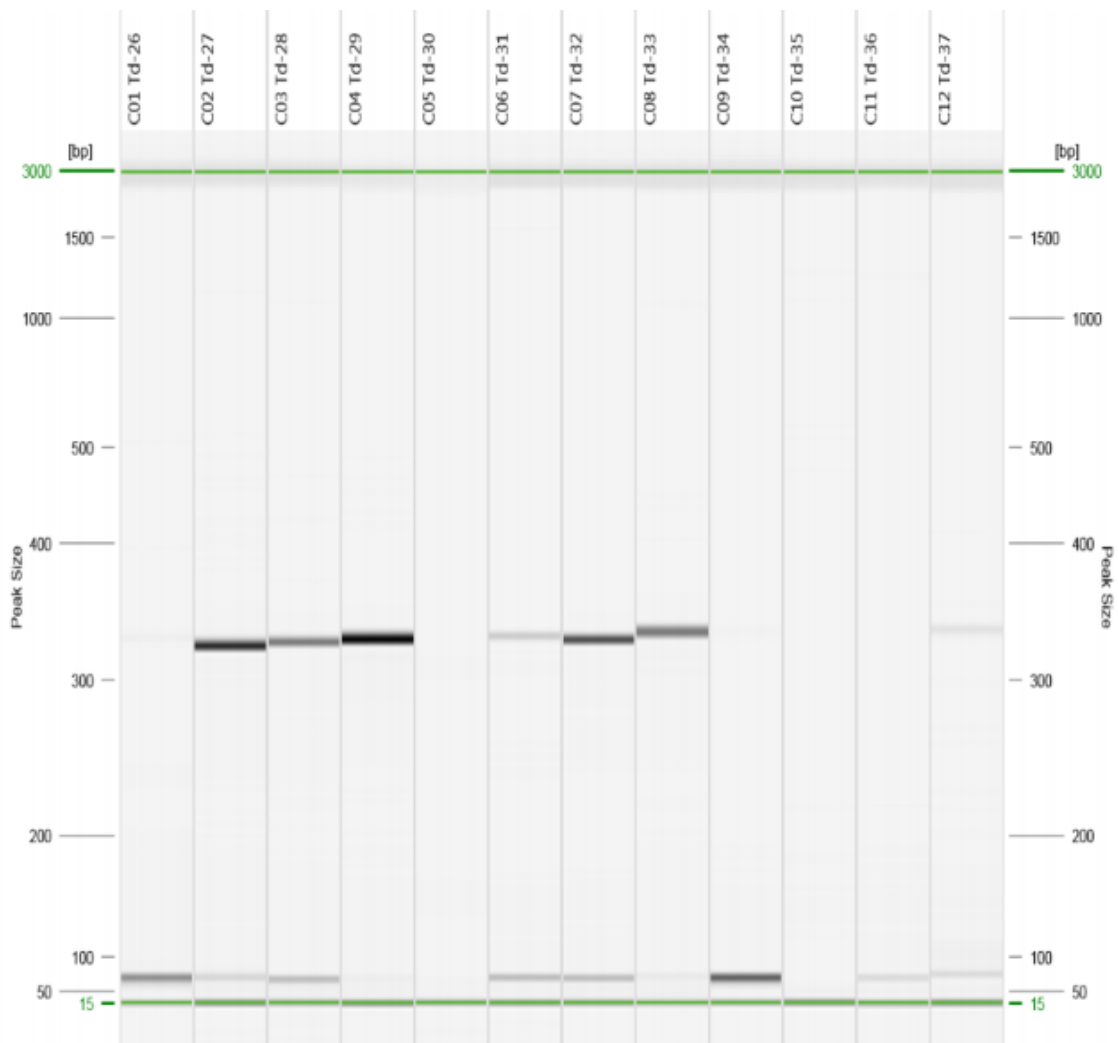


Figura 9. Resultados de muestras para *Treponema denticola* de 26-37.

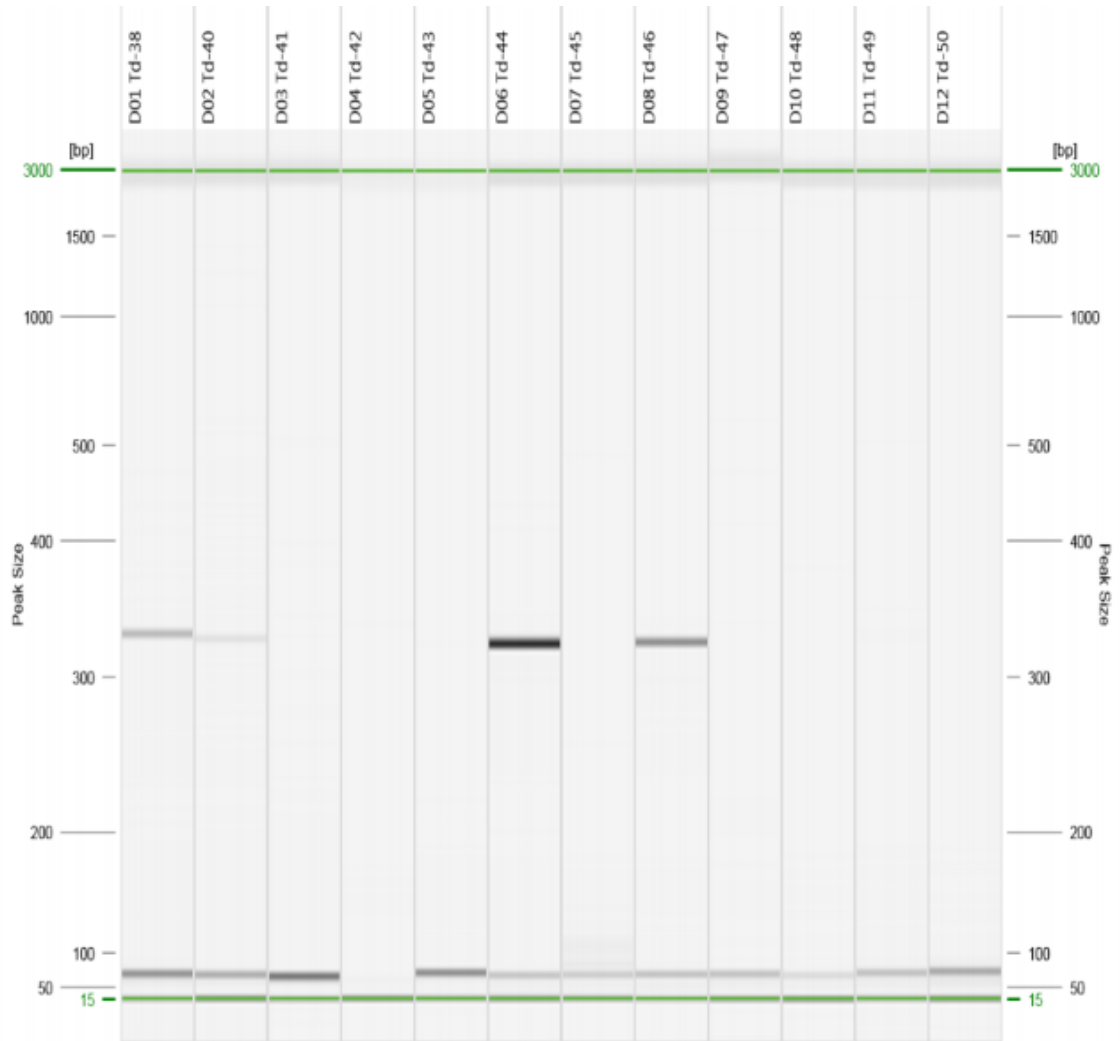


Figura 10. Resultados de muestras para *Treponema denticola* de 38-50.

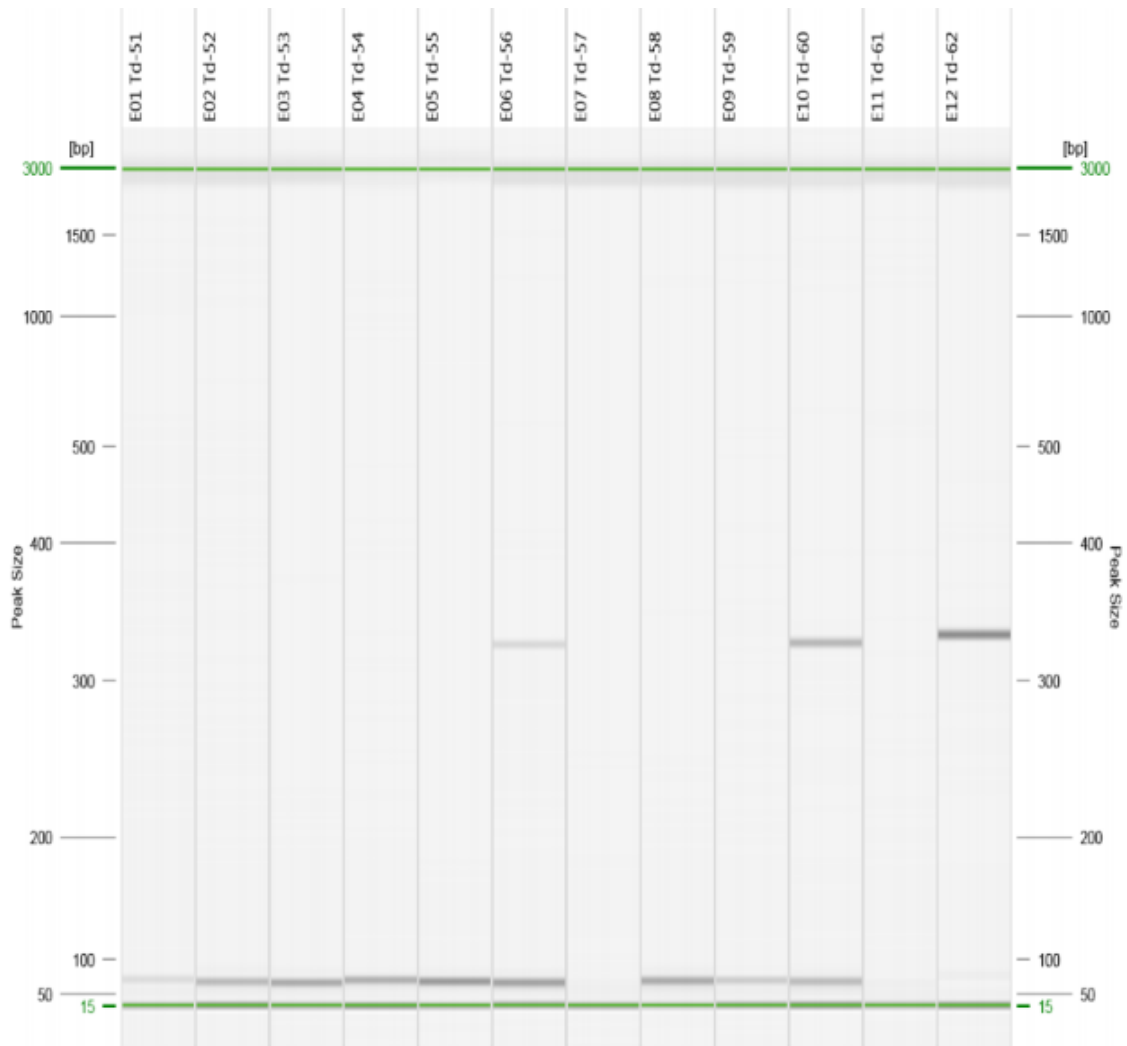


Figura 11. Resultados de muestras para *Treponema denticola* de 51-62.

Resultados de aislamiento de ADN para *Tannerella forsythia* de las muestras de los estudiantes de la escuela Carmen Lyra del año 2019 utilizando el gel de electroforesis.

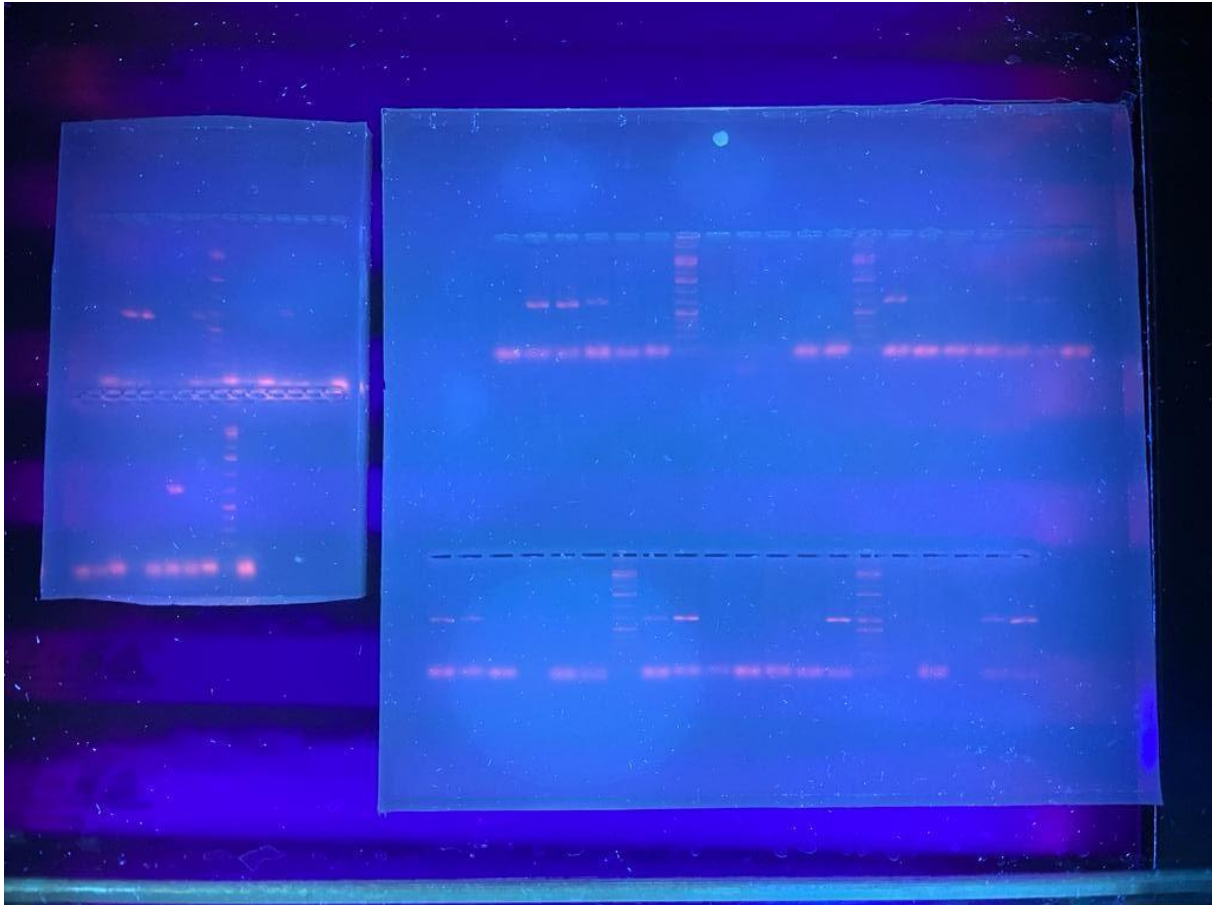


Figura 12. Resultados de las muestras para *Tannerella forsythia* utilizando el gel de electroforesis.

ANEXOS

Ramírez K., Gómez A., Rojas M., et al. Gingival Health Related to Intake of Different Types of Foods and Body Mass Index in 12-year-old Schoolchildren.-ODOVTOS-Int. J. Dental Sc. 2020; 165-177.