

# Aplicación de la genética en la identificación de enfermedades infecciosas bucodentales

X. Martí Bosch, E. Chimenos Küstner

## RESUMEN

La genética ha supuesto una gran revolución en la identificación de seres vivos a través de análisis de ADN. Actualmente se investiga la posibilidad de aplicarla en el estudio de nuestros antepasados, desde el hombre prehistórico. En el ámbito de la odontología se vislumbran nuevas perspectivas en el estudio de la patología infecciosa, gracias a estos avances en biología molecular. El presente trabajo pretende repasar cuál ha sido esta patología infecciosa en el hombre del pasado y cuáles son los métodos de análisis genético que permiten estudiarla. Fundamentalmente, las infecciones bucodentales del hombre prehistórico se resumen en caries y patología periodontal. La RCP (reacción en cadena de la polimerasa) es la técnica que ha revolucionado la ingeniería genética, pues permite obtener copias del ADN para poder ser analizado y, con ello, ofrece un diagnóstico específico de la etiología de las enfermedades infecciosas, lográndose una identificación más precisa que con el cultivo o con la inmunohistoquímica de las bacterias, hongos y virus que conviven en el medio oral.

**Palabras clave:** ADN, RCP (reacción en cadena de la polimerasa), caries, patología periodontal, bacteria.

## SUMMARY

The genetics has supposed a great revolution in the identification of alive species through DNA analysis. Nowadays, it is investigated the possibility to apply it in the study of our ancestors, from the prehistoric people to our days. New tendencies in dentistry are possible, thanks to these advances in molecular biology. In this work, the authors review the infectious pathology in prehistoric people and the genetic analysis methods that possibilize its study. Basically, the oral infections in prehistoric people is summarized on caries and periodontal diseases. The PCR (polymerase chain reaction) is the technique that has revolutionized the genetic engineering, because it allows to get copies from DNA to be able to be analysed and, with that, a good diagnostic of infectious diseases' etiology with a more specific identification than culture or immunohistochemistry methods of bacteria, fungi and viri which live in the oral cavity.

**Key words:** DNA, PCR (polymerase chain reaction), caries, periodontal diseases, bacterium.

## Introducción

La genética constituye un campo muy importante en la identificación de seres vivos, pues permite hacer clasificaciones filogenéticas de todas las especies que existen.

Actualmente se está investigando si sería posible identificar mediante exámenes genéticos especies prehistóricas; es decir, la necroidentificación. Para ello es necesario que se conserve ADN en los restos fósiles.

En el campo sanitario de la odonto-estomatología, gracias a los análisis genéticos se ha podido estudiar más a fondo la placa dental y, fundamentalmente, sus componentes micro-

bianos. Pero no sólo esto; también ha permitido la identificación de cuáles de éstos están mayormente implicados en las enfermedades infecciosas orales, discerniendo incluso entre enfermedades en cuanto a gérmenes implicados (1-49).

La evolución de las enfermedades infecciosas bucodentales acompaña a la evolución filogenética de los humanos: del género *Australopithecus* (50), deriva el *Homo ergaster*, del que proceden el *Homo antecessor* y el *Homo erectus*. El primero parece ser que evoluciona hacia el *hombre de Neanderthal* (*Homo sapiens neanderthalensis*), mientras que del segundo parece que procedemos los *Homo sapiens sapiens* (51). Desde el Paleolítico, época extensa a la que pertenecen los anteriores, en la que apenas se encuentra patología dentoperiodontal, se llega a épocas en las que la evolución tecnológica y los recursos alimentarios favorecen la aparición de patología odontológica en la península ibérica: Neolítico (5000-2500 aC), Calcolítico (2500-1800 aC) y Edad del Bronce (1800-700 aC) (52).

En este trabajo se pretende revisar la patología dentoperiodontal más frecuente en la antigüedad, así como repasar qué métodos existen de identificación genética y sus aplicaciones, con una perspectiva paleopatológica.

## Identificación de enfermedades bucodentales

En un estudio de Chimenos y Martínez sobre individuos prehistóricos hallados en yacimientos catalanes se observa que la caries y la enfermedad periodontal afectaban a la población estudiada con unas frecuencias referidas en la Tabla 1 (52).

Según otro estudio de Chimenos et al., de un total de 49 individuos estudiados, 15 presentaban una pérdida de soporte periodontal menor que 3 mm, mientras que 28 la presentaban mayor que dicha cifra (53). El desgaste dentario también fue valorado en dicho trabajo y se vio que en 23 individuos era hasta 4 (en una escala de 12 valores), mientras que 21 lo presentaban mayor que esta cifra. En un total de 6, individuos no se pudo valorar la pérdida de soporte periodontal y en 5 de estos 6 tampoco se pudo diagnosticar el desgaste dental (53). En otro estudio del mismo autor, se observa la baja frecuencia de aparición de lesiones compatibles

**Tabla I**  
**Caries y enfermedad periodontal en la prehistoria, según Chimenos y Martínez (52)**

	Porcentaje de individuos con enfermedad periodontal	Porcentaje de individuos con caries	Porcentaje de dientes con caries
Neolítico	35,14%	33,78%	10,0%
Calcolítico	59,14%	30,99%	5,38%
Edad del Bronce	15,56%	15,56%	9,24%

con abscesos en individuos adultos (1,81%), que es más alta en maduros y seniles (20,4% y 20%, respectivamente), y se atribuye este hecho a una mayor prevalencia de enfermedad periodontal en estos últimos grupos (54).

En una breve comunicación de Ripamonti se afirma que, en épocas pretéritas, el patrón más común de pérdida de hueso alveolar es horizontal, con una moderada exposición de las furcas de los molares. Además, al analizar la distancia entre el límite amelocementario y la cresta de hueso alveolar se revela una importante pérdida de hueso (50).

Otro estudio de Ripamonti revela que hay fragmentos de maxilar que muestran la mayor pérdida de hueso alveolar alrededor de los molares temporales. Al valorar la relación oclusal, es posible que en el momento de la defunción hubiera individuos con sus primeros molares sin contacto oclusal (55).

## Métodos de análisis de ADN para la identificación genética

De todos los métodos de análisis de ADN que existen, el más conocido es el de la RCP (Reacción en Cadena de la Polimerasa) o PCR (del inglés: Polymerase Chain Reaction), que consiste en la replicación de moléculas de ADN mediante los recursos técnicos disponibles en el laboratorio. Merced al calentamiento hasta 94 grados centígrados, la doble hebra de ADN se abre en sus dos cadenas individuales y, en el enfriamiento, los cebadores o *primers* artificiales de laboratorio se unen y se emparejan en lugares o *locus* de la molécula inicial de ADN,

para entonces la polimerasa multiplicar los cebadores y, así, producir una cadena complementaria a la primera. La polimerasa empleada se extrae de una bacteria cuyo hábitat natural son las fuentes de agua hirviendo. Entre los muchos usos de la técnica están el de la identificación de criminales, la detección del germen causal en enfermedades infecciosas: VIH, infecciones por clamidias, tuberculosis con manifestaciones de neumonía bacteriana (56).

La técnica de la RCP para el análisis del ADN ha servido en ciencias forenses para la identificación de cadáveres (especie, individuo, sexo). Otras técnicas de identificación genética en seres humanos recurren al estudio de los grupos sanguíneos y de marcadores genéticos. Un lugar muy propicio para la extracción del ADN con fines necroidentificativos es la pulpa dentaria, pues los dientes son altamente resistentes a elevadas temperaturas, a agentes químicos, a fuertes impactos; son fáciles de manipular y conservar, y constituyen un perfecto reservorio para el análisis del ADN. No obstante, López et al. estudiaron la resistencia del material genético dental en dientes expuestos a altas temperaturas y la conservación del ADN en dientes de 10 años de antigüedad, y se vio que el ADN mejor conservado era el de dientes extraídos recientemente, en dientes sometidos a calor se degradaba más cuanto más alta era la temperatura de exposición y mayor el tiempo que se sometían al calor, y en dientes antiguos se conservaba ADN suficiente para la identificación mediante RCP, pero estaba algo degradado (57).

Yamamoto observó que mediante las células sanguíneas se puede identificar el sexo. El ADN se puede extraer de la pulpa dental, porque es un tejido altamente capilarizado. Para aislar ADN de un diente extraído, hay que hacerlo con la mayor prontitud posible, con el objetivo de garantizar una mayor eficacia. Dos técnicas se empleaban en dicho estudio: el marcador específico del cromosoma Y y la técnica RCP. Ambos métodos discriminaron varones de mujeres (58).

Para estudiar genéticamente la enfermedad periodontal, Yamazaki et al. usan un marcador genético que detecta los «V Beta» genes mayormente implicados en la misma, y lo comparan con los que hay en sangre periférica. El marcador genético es analizado en este estudio por RCP (59).

Beaty et al. en un estudio publicado acerca de un análisis genético de familias con periodontitis juvenil observaron el porqué de la herencia mendeliana en dicho proceso, viendo que había un gen dominante que favorecía la expresión de la enfermedad, pero ésta la presentaban más el sexo femenino (60).

## Identificación de bacterias, hongos y virus en la cavidad oral

González et al. hacen un estudio comparativo entre el cultivo enriquecido en lignina y los métodos genéticos para identificar bacterias de la placa dental, y observan la mayor especificidad de los métodos genéticos, pues el cultivo solamente permite visualizar formas, mientras que la genética logró identificar protobacterias (1). Resultados parecidos obtuvieron Van Steenberg et al. en su estudio, con el cual pretendían comparar el cultivo con las pruebas de análisis de ADN para la detección de bacterias periodontales, quienes observaron *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* (2).

Chen y Slots estudiaron mediante la RCP los gérmenes periodontopatógenos. De su estudio se extrae que las bacterias halladas son *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Bacteroides forsythus* (3). Parrish y Greenberg, por su parte, intentaron purificar ADN de la placa dental. De su estudio se puede decir que este material genético correspondía a espiroquetas (*Treponemadenticola*, *Treponema denticolorum*, *Treponema socranskii*, *Treponema strain* y *Treponema vincenti*), grampositivos (*Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus casei*, *Peptostreptococcus micros* y *Streptococcus mutans*) y gramnegativos (*Eubacterium alactolyticum*, *Fusobacterium nucleatum* y *Selenomonas sputigena*) (4). Slots et al. hallaron mediante la amplificación con la RCP del «ADN ribosómico 16s» de especímenes subgingivales periodontopatógenos: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Treponema denticola* (5).

Por su parte, Ashimoto et al. emplearon la RCP para la detección de ocho especies de periodontopatógenos de la placa subgingival en

lesiones de gingivitis y avanzadas periodontitis. De este estudio se desprende que en ambas enfermedades se detectaba *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* y *Treponema denticola* (6).

En el estudio de la composición microbiana merecen ser citados dos estudios: Por un lado, el de Sidaway a través del microscopio electrónico, del que se desprende que hay bacilos grampositivos (*Bacterionema matruchotti*, *Pothia dentocariosa*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces israelii* y *Eubacterium saburreum*), cocos grampositivos (*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitior*, *Streptococcus sanguis*, *Micrococcus varians* y *Staphylococcus epidermidis*), cocos gramnegativos (*Neisseria pharyngis* y *Veillonella alcalescens*) y bacilos gramnegativos (*Eikenella corrodens* y *Haemophilus spp*) (7); por otra parte, Brown et al. identificaron *Eikenella corrodens* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (8).

Según Hillman et al. en la placa subgingival hay bacterias hemolíticas, de entre las cuales menciona en su estudio: *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces viscosus*, *Staphylococcus capitis*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella denticola* y *Prevotella melaninogenica* (9).

Diversos autores emplean la técnica de detección genética de la RCP para hallar en la cavidad bucal numerosas especies bacterianas, entre las cuales cabe mencionar: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (10-12, 15-19), *Porphyromonas gingivalis* (10, 12, 24-26), *Treponema denticola* (11, 39-41), *Eikenella corrodens* (15, 28), *Bacteroides forsythus* (20-22), *Bacteroides heparinolyticus* (23), *Helicobacter pylori* (también localizado en mucosa gástrica) (29-34) y *Streptococcus spp* (35-39) sobre todo *Streptococcus mutans* (37, 38). Otros artículos, basados en estudios mediante inmunofluorescencia indirecta y otros métodos inmunohistoquímicos, han permitido la detección de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (13), *Porphyromonas gingivalis* (13, 14) y *treponema denticola* (14).

Mediante la técnica de RCP también se han detectado micobacterias en cavidad oral: Saglie et al. hallan *Mycoplasma pneumoniae* asociado

**Tabla II**  
**Virus hallados en especímenes subgingivales**

	Periodontitis (30)*	Gingivitis (26)*
Por lo menos una especie	23	8
Citomegalovirus	18	8
Epstein-Barr	9	0
Herpes simplex	6	0
Papilomavirus	5	0
VIH	2	0

\* Indica el número de individuos de la muestra estudiada

a gingivitis (42), mientras que Nachbar et al. diagnostican tuberculosis orificial en cavidad oral gracias a la identificación del *Mycobacterium tuberculosis* (43).

La RCP en micología ha permitido la detección de *Candida albicans* en sangre (44) y el aislamiento para identificación de la misma (45).

La detección de virus causales de procesos patológicos mediante a la RCP se hace patente gracias a Rodu, con su estudio acerca de infecciones virales de tejidos blandos orales (46); Ying-Tai Jin et al con el virus del herpes simple en el Sarcoma de Kaposi oral (47); Parra y Slots, en un estudio de virología mediante RCP aplicado a bolsas periodontales hallaron lo que se resume en la Tabla 2 (48), mientras que Hendrix et al. buscan la presencia de citomegalovirus en víctimas de traumatismos, y observan una mayor presencia de este virus en VIH positivos frente a VIH negativos (49).

## Comentario final

En base a lo expuesto con anterioridad, se observa que el descubrimiento de la RCP ha revolucionado el mundo de la ingeniería genética por sus múltiples aplicaciones en la medicina y odontología forense y otras ciencias policiales, así como en el estudio de la etiología de las infecciones. Además, ha sido empleado como método de necroidentificación. La pulpa dental constituye un material excelente para la identificación de ADN por la alta resistencia del diente al paso del tiempo y a otros muchos factores que favorecerían su destrucción. Por extensión, el recurso de la biología molecular ofrece también

nuevas posibilidades diagnósticas en los estudios de la paleopatología, ya que ésta es una ciencia satélite de las anteriormente citadas.

El análisis del ADN amplificado por RCP en los estudios de microbiología oral ha demostrado ser más efectivo para la identificación de bacterias que el cultivo o las técnicas inmunohistoquímicas. Este aspecto ofrece asimismo una perspectiva útil en el ámbito de la paleodontología, como ya ha demostrado el microbiólogo y odontólogo chileno Alfredo Linossier.

En cuanto a su aplicación actual, y aun cuando la biología molecular está en constante evolución, quedan varios aspectos por investigar, sobre todo en relación con la oncología oral, en el sentido de desarrollar nuevos quimioterápicos antineoplásicos más específicos, es decir, más selectivos, sobre células tumorales y con menos efectos secundarios adversos.

## Bibliografía

- GONZÁLEZ, J. M.; WHITMAN, W. B.; HODSON, R. E.; MORANS, M. A.: Identifying numerically abundant culturable bacteria from complex communities. Example from a lignin enrichment culture. *App Environ Microbiol.*, 1996; 62: 4433-40.
- VAN STEENBERGEN, T.J.M.; TIMMERMAN, M. F.; MIKX, F.H.M.; DE QUINCEY, G.; VAN DER WEIJDEN, G. A.; VAN DER VELDEN, V.; V. DE GRAAF, J.: Discrepancy between culture and DNA probe analysis for the detection of periodontal bacteria. *J. Clin. Periodontol.*, 1996; 23: 955-9.
- CHEN, C.; SLOTS, J.: Arbitrarily primed polymerase chain reaction analysis for the detection of periodontal pathogens: discriminative primers and genetic diversity. *Clin. Infect. Dis.*, 1995; 20: S301-3.
- PARRISH, K. D.; GREENBERG, E. P.: A rapid method for extraction and purification of dna from dental plaque. *App Environ Microbiol.*, 1995; 61: 4120-3.
- SLOTS, J.; ASIMOTO, A.; FLYNN, M. J.: Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16s ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin. Infect. Dis.*, 1995; 20: S304-7.
- ASHIMOTO, A.; CHEN, C.; BAKKER, Y.; SLOTS, J.: Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immunol.*, 1996; 11: 266-73.
- SIDAWAY, D. A.: A Microbiological study of dental calculus. IV: An electron microscopy study of in vitro calcified microorganisms. *J. Periodont. Res.*, 1980; 15: 240-54.
- BROWN, C. M.; HANCOCK, E. B.; O'LEARY, T. J.; MILLER, C. H.; SHELDRAKE, M. A.: A Microbiological comparison of young adults based on relative amounts of subgingival calculus. *J. Periodontol.*, 1991; 62: 591-7.
- HILLMAN, J. D.; MAIDEN, M.F.J.; PFALLER, S. P.; MARTIN, L.; DUNCAN, M. J.; SOCRANSKY, S. S.: Characterization of hemolytic bacteria in subgingival plaque. *J. Periodont. Res.*, 1993; 28: 173-9.
- RIGGIO, M. P.; MACFARLANE, T. W.; MACKENZIE, D.; LENNON, A.; SMITH, A. J.; KINANE, D.: Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J. Periodont Res.*, 1996; 31: 496-501.
- WATANABE, K.; FROMMEL, T. O.: *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* detection in oral plaque samples using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Periodontol.*, 1996; 23: 212-9.
- WAHLFORS, J.; MEURMAN, J. H.; VÄISÄNEN, P.; ALAKUIJALA, P.; KORHONEN, A.; TORKKO, H.; JÄNNE, J.: Simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* by a rapid PCR method. *J. Dent. Res.*, 1995; 74: 1796-801.
- SLOTS, J.; HAFSTRÖM, C.; ROSLING, B.; DAHLÉN, G.: Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival smears by the indirect fluorescent-antibody technique. *J. Periodont. Res.*, 1985; 20: 613-20.
- KIGURE, T.; SAITO, A.; SEIDA, K.; YAMADA, S.; ISHIHARA, K.; OKUDA, K.: Distribution of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. *J. Periodont. Res.*, 1995; 30: 332-41.
- FURCHT, C.; ESCHRICHT, K.; MERTE, K.: Detection of *Eikenella corrodens* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by use of the Polymerase Chain Reaction (PCR) in vitro and subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.*, 1996; 23: 891-7.
- LEYS, E. J.; GRIFFEN, A. L.; STRONG, S. J.; FUERST, P. A.: Detection and strain identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by nested PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1994; 32: 1288-94.
- FUJISE, O.; HAMACHI, T.; HIROFUJI, T.; MAEDA, K.: Colorimetric microtiter plate based assay for detection and quantification of amplified *Actinobacillus actinomycetemcomitans* DNA. *Oral Microbiol. Immunol.*, 1995; 10: 372-7.
- ASIKAINEN, S.; CHEN, C.; SLOTS, J.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genotypes in relation to serotypes and periodontal status. *Oral Microbiol. Immunol.*, 1995; 10: 65-8.
- FLEMMING, T. F.; RÜDIGER, S.; HOFMANN, U.; SCHMIDT, H.; PLASCHKE, B.; STRÄTZ, A.; KLAIBER, B.; KARCH, H.: Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1995; 33: 3102-5.
- BRAHAM, P. H.; MONCLA, B. J.: Rapid presumptive identification and further characterization of *Bacteroides forsythus*. *J. Clin. Microbiol.*, 1992; 30: 649-54.
- LOTUFO, R.F.M.; FLYNN, J.; CHEN, C.; SLOTS, J.: Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in human periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.*, 1994; 9: 154-60.

22. GERSDORF, H.; MEISSNER, A.; PELZ, K.; KREKELER, G.; GÖBEL, U. B.: Identification of *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque from patients with advanced periodontitis. *J. Clin. Microbiol.*, 1993; 31: 941-6.
23. ASHIMOTO, A.; FLYNN, M. J.; SLOTS, J.: Molecular detection of *Bacteroides heparinolyticus* in adult periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.*, 1995; 10: 284-7.
24. BODINKA, A.; SCHMIDT, H.; HENKEL, B.; FLEMMING, T. F.; KLAIBER, B.; KARCH, H.: Polymerase chain reaction for the identification of *Porphyromonas gingivalis* collagenase genes. *Oral Microbiol. Immunol.*, 1994; 9: 161-5.
25. BENKIRANE, R. M.; GUILLOT, E.; MOUTON, C.: Immunomagnetic PCR and PCR Probe for detection and identifications of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Clin. Microbiol.*, 1995; 33: 2908-12.
26. WATANABE, K.; FROMMEL, T. O.: Detection of *Porphyromonas gingivalis* in oral plaque samples by use of the polymerase chain reaction. *J. Dent. Res.*, 1993; 72: 1040-4.
27. MORITA, M.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, T.: Identification by biotinylated DNA probes of *Capnocytophaga* species isolated from supragingival calculus. *J. Dent. Res.*, 1991; 70: 1048-51.
28. CHEN, C.; ASHIMOTO, A.: Clonal diversity of oral *Eikenella corrodens* within individual subjects by arbitrarily primed PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1996; 34: 1837-9.
29. MADINIER, I. M.; FOSSE, T. M.; MONTEIL, R. A.: Oral Carriage of *Helicobacter pylori*: A Review. *J. Periodontol.*, 1997; 68: 2-6.
30. CHENG LHH.; WEBBERLEY, M.; EVANS, M.; HANSON, N.; BROWN, R.; *Helicobacter pylori* in dental plaque and gastric mucosa. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., Oral Radiol. Endod.*, 1996; 81: 421-3.
31. WAHLFORS, J.; MEURMAN, J. H.; TOSKALA, J.; KORHONEN, A.; ALAKUJALA, P.; JANATUINEN, E.; KÄRKKÄINEN, NUUTINEN, P.; JÄNNE, J.: Development of a rapid PCR method for identification of *Helicobacter pylori* in dental plaque and gastric biopsy specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1995; 14: 780-6.
32. MAPSTONE, M. P.; LYNCH, DAF; LEWIS, F.A.; AXON, ATR; TOMPKINS, D. S.; DIXON, M. F.; QUIRKE, P.: Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. *J. Clin. Pathol.*, 1993; 46: 540-3.
33. BICKLEY, J.; OWEN, R. J.; FRASER, A. G.; POUNDER, R. E.: Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the «urease C gene» of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. *J. Med. Microbiol.*, 1993; 39: 338-44.
34. PERKINS, S. E.; YAN, L. L.; SHEN, Z.; HAYWARD, A.; MURPHY, J. C.; FOX, J. G.: Use of PCR and culture to detect *Helicobacter pylori* in naturally infected cats following triple antimicrobial therapy. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 1996; 40: 1486-90.
35. COYKENDALL, A. L.: Classification and identification of the *Viridans streptococci*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1989; 2: 315-8.
36. HAMADA, S.; MASUDA, N.; OOSHIMA, T.; SOBUE, S.; KOTANI, S.: Epidemiological survey of *Streptococcus mutans* among Japanese children. *Japan J. Microbiol.*, 1976; 20: 33-44.
37. SEUPUKU, H.; LIZIMA, T.; KOGA, T.; NISIZAWA, T.: Identification of human antigenic epitopes in an alanine-rich repeating region using sera from hu-PBL-SCID mice immunized with a surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol. Immunol.*, 1996; 5: 343-9.
38. IGARASHI, T.; YAMAMOTO, A.; GOTO, N.: Direct detection of *Streptococcus mutans* in human dental plaque by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol. Immunol.*, 1996; 5: 294-8.
39. CHAI, B. K.; WYSS, C.; GÖBEL, U. B.: Phylogenetic Analysis of Pathogen-related oral spirochetes. *J. Clin. Microbiol.*, 1996; 34: 1922-5.
40. FIEHN, E. N.; BANGSBORG, J. M.; COLDING, H.: Ribotyping on small-sized spirochetes isolated from subgingival plaque. *Oral Microbiol. Immunol.*, 1995; 10: 13-8.
41. CHOI, B. K.; PASTER, B. J.; DEWHIRST, F. E.; GÖBEL, U. B.: Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis. *Infect. Immun.*, 1994; 62: 1889-95.
42. SAGLIE, R.; CHENG, L.; SADIGHI, R.: Detection of *Mycoplasma pneumoniae*-DNA within diseased gingiva by *in situ* hybridization using a biotin-labeled probe. *J. Periodontol.*, 1988; 59: 121-3.
43. NACHBAR, F.; CLASSEN, V.; NACHBAR, T.; MEURER, M.; SCHIRREN, C. G.; DEGITZ, K.: Orifacial tuberculosis: Detection by polymerase chain reaction. *Brit. J. Dermatol.*, 1996; 135: 106-9.
44. HOLMES, A. R.; CANNON, R. D.; SHEPHERD, M. G.; JENKINSON, H. F.: Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 1994; 32: 228-31.
45. WILLIAMS, D. W.; WILSON, M. J.; LEWIS, MAO; POTTS, J. C.: Identification of *Candida species* by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spaces regions of ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.*, 1995; 33: 2476-9.
46. RODU, B.: New approaches to the diagnosis of oral soft-tissue disease of viral origin. *Adv. Dent. Res.*, 1993; 7: 207-12.
47. JIN Y-T; TSAI, S-T; YAN J-J; CHEN, F-F; LEE W-Y; LI W-Y; CHIANG, H.; SU, S-J: Presence of human herpesvirus-like DNA sequence in oral Kaposi's sarcoma. A preliminary PCR study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 1996; 81: 442-4.
48. PARRA, B.; SLOTS, J.: Detection of human viruses in periodontal pockets using polymerase chain reaction. *Oral Microbiol. Immunol.*, 1996; 5: 289-93.
49. HENDRIX, RMG; WAGENAAR, M.; SLOBBE, R. L.; BRUGGERMAN, C. A.: Widespread presence of cytomegalovirus DNA in tissues of healthy trauma victims. *J. Clin. Pathol.*, 1997; 50: 59-63.
50. RIPAMONTI, U. The hard evidence of alveolar bone loss in early hominids of southern Africa. *J. Periodontol.*, 1989; 60: 118-20.
51. CARBONELL, E.; BERMÚDEZ, J. M.; ARSUAGA, J. L.: Atapuerca, cuna del primer europeo. *La Vanguardia*, 1997; 57: S7.
52. CHIMENOS, E.; MARTÍNEZ, A.: Prevalencia de paleopatología oral infecciosa y su relación con la dieta, en poblaciones prehistóricas catalanas. *Arch. Odontostomatol.*, 1993; 9: 139-45.

53. CHIMENOS, E.; JUNCÁ, S.; SENTÍS, J.; ECHEVERRÍA, J. J.: Estudio paleopatológico de la pérdida de soporte óseo y del desgaste oclusal en restos humanos de maxilares, mandíbulas y piezas dentarias. Arch. Odontoestomatol., 1990; 6: 3-9.
54. CHIMENOS, E.: Estudio paleoestomatológico de poblaciones prehistóricas de Catalunya. Zaragoza: Libros Pórtico, S. A., 1990: 194-5.
55. RIPAMONTI, U.: *Paleopathology in Australopithecus africanus*: A suggested case of a 3-million-year-old prepubertal periodontitis. Am J. Phys. Anthropol., 1988; 76: 197-210.
56. DÍAZ, F.; PCR: The Magic Acronym in Molecular Biology. Prev. Sanit. Nac., 1996; 118: 60.
57. LÓPEZ, J.; LÓPEZ, E.; PRIETO, L.; CERÓN, J. A.: Métodos actuales de necroidentificación dentaria: Extracción de ADN en pulpa. Gaceta Dental, 1995; 58: 70-8.
58. YAMAMOTO, K.: Molecular biological studies on teeth, and inquests. For Scie. Int., 1996; 80: 79-87.
59. YAMAZAKI, K.; NAKAJIMA, T.; GEMMELL, E.; KJELDSEN, M.; SEYMOUR, G. J.; HARA, K.: Biased expression of T-cell receptor «V-B» genes in periodontitis patients. Clin. Exp. Immunol., 1996; 106: 329-35.
60. BEATY, T. H.; BONGHMAN, J. A.; YANG, P.; ASTEMBORSKI, A.; SUZUKI, J. B.: Genetic analysis of juvenile periodontitis in families ascertained through an affected proband. Am J. Hum. Genet., 1987; 40: 443-52.
- 

*Correspondencia:*

Dr. Eduardo Chimenos Küstner  
Via Augusta, 124 1º 3ª  
08006 Barcelona