

Técnica de PCR Como Estrategia Biotecnológica Para Detección de *Helicobacter pylori* en Placa Dental.

Roba Izzeddin ^{1*}, Rubén Toro ², Rula Izzeddin³

^{1*} *Departamento de Prostodoncia y Oclusión. Facultad de Odontología. Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.*

E-mail: rubaizzeddin@gmail.com

² *Unidad de Investigaciones Morfopatológicas. Facultad de Odontología. Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.*

³ *Department of Bioscience Technologies, Jefferson School of Health Professions, Thomas Jefferson University. Philadelphia, PA 19107-5587*

RESUMEN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una herramienta biotecnológica muy útil para el diagnóstico de bacterias o virus de difícil cultivo *in vitro*. El objetivo del estudio es reafirmar la efectividad de dicha técnica en el diagnóstico de *Helicobacter pylori* (*Hp*), en este caso en placa dental y su relación específica con afecciones gástricas, además difundir los beneficios y futuras aplicaciones en el área de la odontología. En consecuencia, se realizó una investigación tipo descriptivo de diseño no experimental y transversal; para el cual se seleccionó una muestra de setenta (71) individuos que presentaban sintomatología a nivel gástrico. A cada paciente se le tomó muestra de placa dental de la región subgingival y se llevó a un tubo Eppendorf. Del ADN de las bacterias presentes en placa dental se amplificó el gen *ureC* para identificar el microorganismo a través de PCR. De las 71 muestras examinadas, 18

(25.35%) resultaron positivas para el ADN de *Hp*. Se evidencio la coincidencia entre los resultados positivos y los pacientes con reflujo gastroesofágico, y además se logró estandarizar la técnica de PCR en la detección de *H. pylori* en la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo.

Palabras clave: Reacción en Cadena de Polimerasa, *Helicobacter pylori*, placa dental

ABSTRACT

The polymerase chain reaction (PCR) is a useful biotechnological tool for the diagnosis of viruses or bacteria difficult to culture *in vitro*. The study's objective is to reaffirm the effectiveness of this technique in the diagnosis of *Helicobacter pylori* (*Hp*), in this case in dental plaque, and its specific relationship with

gastric symptoms, further spreading the benefits and future applications in the field of dentistry. Consequently, a descriptive, non-experimental and transversal investigation was conducted using a sample of seventy one (71) individuals who had symptoms at the gastric level. Each patient sample was taken from dental plaque in the subgingival region and put in an Eppendorf tube. The ureC gene was amplified via PCR from the bacterial DNA in dental plaque to identify the organism. Of the 71 samples examined, 18 (25.35%) were positive for Hp DNA. There was agreement between positive results and patients with gastroesophageal reflux, and the standardization of the PCR technique for detecting *H. pylori* in the Faculty of Dentistry, University of Carabobo was successful.

Keywords: PCR, *Helicobacter pylori*, dental plaque

INTRODUCCIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es considerada una técnica biotecnológica cuya finalidad es la amplificación o reproducción *in vitro* de un número de copias de una región específica de ADN, en este caso bacteriano, para su respectiva evaluación. La mencionada técnica es de gran utilidad en una variedad de campos, incluidas la biología molecular, la biotecnología, la genética, la epidemiología, las ciencias forestales, las ciencias forenses, la microbiología, el diagnóstico de enfermedades infecciosas, entre otras, es decir con múltiples ventajas que se mencionan a continuación:

- La técnica de PCR ha demostrado ser muy útil en el diagnóstico de virus, parásitos y bacterias de difícil cultivo; porque ofrece un diagnóstico confiable, más rápido y menos laborioso que los cultivos normales de este tipo de microorganismos.
- La secuencia específica de interés no necesita estar aislada del resto de su genoma, pero una vez completada su reproducción, esta puede ser separada

del resto del ADN por medio de electroforesis en geles de agarosa.

- La cantidad de material que hace falta para el inicio de la reacción es muy pequeña y solo es necesario la cantidad de ADN contenida en una sola célula, esto le ofrece una alta sensibilidad a la prueba.
- La reacción de PCR es llevada completamente *in vitro* y requiere para su desarrollo de los elementos siguientes: 2 oligonucleótidos sintéticos o cebadores (*primers*), que deben ser complementarios a la región de interés y generalmente únicos para el microorganismo de estudio, lo que proporciona la alta especificidad; una enzima termoestable, *Taq* polimerasa, proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus* y 4 desoxyribonucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- Este procedimiento, permite obtener una duplicación exponencial de la secuencia de interés por medio de 3 pasos fundamentales en un proceso cíclico; es decir, cada ciclo consta de un proceso

de desnaturalización (95°C) que permite la apertura de las dobles cadenas; luego viene seguido por un proceso de anillamiento (40-65°C), que consiste en la unión o el apareamiento de los oligonucleótidos o cebadores que se encuentran en la mezcla de reacción con los extremos 3' de la secuencia específica del ADN, formando una unión ayudada por enlaces iónicos (*primers* y hebra de ADN); en donde la enzima *Taq* polimerasa se pueda unir y comenzar en presencia de los 4 nucleótidos trifosfatos con la tercera etapa que es la fase de síntesis (72°C), la cual se refiere al copiado del templado que se van uniendo por enlaces iónicos dando como resultado una nueva molécula del fragmento de ADN de interés en este caso de *Helicobacter pilory* (*hp*) (Premoli *et al.*, 2004)

En este sentido, Leontiodys en el 2000 refiere que *Hp* es un bacilo Gram-negativo, de forma espiral y con gran motilidad conferida por sus flagelos, responsable del 90% de las gastritis crónicas, 85-90% de las úlceras duodenales, 70-75% de las úlceras gástricas; y por estar asociado con la evolución de metaplasia a cáncer gástrico. En 1994 fue clasificado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como carcinógeno tipo I. Adicionalmente, se ha asociado de manera concluyente a distintas formas de gastritis, úlcera péptica de estómago y duodeno, adenocarcinoma gástrico y linfoma gástrico de

bajo grado, originado en tejido linfoide asociado a la mucosa. Por ende, dicho microorganismo esta vinculado a la alta incidencia mundial de las patologías mencionadas con un promedio de *Hp* del 60%, siendo una de las infecciones humanas mas diseminadas a nivel mundial (Kabris, 2004); Así, dicho autor ha mencionado el posible contagio por vía oral, ya que la saliva representa una vía potencial de transmisión del microorganismo y por tanto pudiera ser encontrada también, en surco gingival o en placa dental (Dowsett *et al.*, 1999).

Bajo esta premisa, Manson & Eley (1993) afirman que la placa dental constituye un reservorio de reinfecciones postratamiento. Por tal motivo, diversos autores se han abocado a estudiar la presencia de dicho microorganismo en la cavidad bucal. Así, la presencia del *Hp* a nivel dental ocurre inmediatamente después de una limpieza dental, restauraciones y prótesis, donde se deposita una fina capa de glucoproteínas salivales sobre la superficie dental, adhiriéndose firmemente y posteriormente es colonizada por bacterias. En pocas horas, algunas especies de *Streptococcus* y, posteriormente, de *Actinomyces* se adhieren a la película, dando inicio así a la etapa de colonización microbiana y a la formación de la placa dental. Posteriormente, otros microorganismos se establecen sobre los que ya se encuentran, incrementando el espesor de la placa dental y del número de microorganismos, por multiplicación y por agregación bacteriana. Al mismo tiempo, surge la formación de la matriz de la placa, que ayuda a mantener estable la comunidad de microorganismos que conforman

en si la estructura de la misma entre los cuales se encuentra *Hp*. Debido a esto se han originado diversos estudios, con el objeto de aislar esta bacteria en restauraciones, prótesis y superficies dentales, utilizando metodologías tradicionales de cultivo o bien por el método de la PCR, la cual se basa en la amplificación de una secuencia de ADN bacteriano para constatar la presencia del microorganismo. Dicho aspecto es de suma relevancia para el desarrollo del presente estudio, cuyo objetivo es reafirmar la efectividad de dicha técnica en el diagnóstico de *Hp*, en este caso en placa dental y su relación específica con afecciones gástricas, además de difundir los beneficios y futuras aplicaciones en el área de la odontología

MATERIALES Y MÉTODOS

Se presenta un estudio enmarcado dentro de un diseño no experimental, transeccional y de campo, cuya muestra fue de setenta y un (71) pacientes seleccionados utilizando como criterios de inclusión utilizados pacientes mayores de 35 años, con síntomas gastrointestinales y sin tratamiento con antibióticos; al menos durante tres meses previos a la toma de muestra. Se informo a cada paciente el propósito del estudio y previo consentimiento para su participación en el mismo, todos estos aspectos en base a las normas de bioética que protegen a los seres humanos. Una vez finalizada esta fase se procedió de la siguiente forma:

Toma de la muestra.

Para la toma de muestra se utilizó una cureta de Gracey Hu-friedy removiendo la misma de la región subgingival e interdental de la placa dental. La muestra se llevó a un tubo Eppendorf conteniendo 50 μ l de solución salina al 0.9% y se congeló a -20°C , hasta la posterior extracción del ADN bacteriano.

Centrifugado.

Previo a la extracción de ADN, se descongelaron las muestras y se sometieron a centrifugación a 7000 rpm durante 10 min.

Extracción del ADN bacteriano de la placa dental

Se descartó el sobrenadante y se inició la extracción de ADN con el kit Wizard Genomic DNA Purification de Promega, para lo cual al pellet se le agregó 600 μ l de solución de lisis nuclear e incubó 5 min a 80°C ; se descartó el sobrenadante, se llevó a temperatura ambiente y se agregó 3 μ l de RNasa e incubó durante 40 min a 37°C . Seguidamente se añadió 50 μ l de solución precipitante de proteínas (proteinasasa K, a concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); y se incubó en hielo durante 5 min; se centrifugó 13000 rpm por 3 min; se transfirió el sobrenadante a otro tubo Eppendorf, se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se precipito el ADN añadiendo 600 μ l de etanol al 70%, después se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se rehidrató el ADN con 60 μ l de agua libre de nucleasas. Seguidamente, se determinó la concentración de ADN, colocando en un tubo Eppendorf 72 μ l de agua libre de nucleasas + 8 μL del ADN (dilución

1:10). Esta mezcla se llevó al espectrofotómetro Gene Quant y se obtuvo la concentración en ng/μl, y se ajustó a 110 ng/μl, a partir de absorbancias de 260 y 280.

Detección de Hp con Reacción en Cadena de la Polimerasa.

La preparación de la mezcla se realizó en campana de flujo laminar, previa limpieza con etanol al 70% y aplicación de UV durante 15 min, utilizando cebadores del gen *ureC*, cuyas secuencias son Forward: 5'-GGATAAGCTTTTAGGGGTGT TAGGGG- 3' y Reverse: 5'- GCTTACTTTC TAACACTAACGCGC-3', los cuales amplifican un fragmento de 294 pares de bases del gen. Es de hacer notar, que para la mezcla de reacción se usó el kit GoTaq Gren Master Mix de Promega, el cual es una solución que contiene: *taq* DNA polimerasa, desoxinucleótidos a una concentración de 400 μM, cloruro de magnesio a 3 mM de concentración y buffer a pH 8.5. Adicionalmente a esto, fue usada la cepa bacteriana de *Hp* 26695, como control positivo. En este sentido, para un protocolo de 25 μL de volumen final en cada tubo de reacción, se requirió de 12.5 μL de Gotaq Gren master Mix a una concentración final de 1X; 0.25 μL de primers positivo directo y 0.25 μL de primers reverso a una concentración final de 0.1 pmol/μl cada uno; 11.5 μL de agua libre de nucleasas y 0.5 μL de ADN que quedó a una concentración

final de 2.2 ng/μL. Luego, en el termociclador marca

MJ Research, se programó el equipo con un ciclo de: 95°C por 5 min; treinta y cinco ciclos de 95°C por 1 min, 56°C por 1 min y 72°C por 1 min. Obtenido el producto amplificado de PCR.

Electroforesis y captura de imagen.

Para observar la calidad del producto se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 90 min a 70 voltios y se expuso a luz ultravioleta para evidenciar las bandas cromosómicas amplificadas. Finalmente, se capturó y documentó la imagen para el análisis pertinente, utilizando el transiluminador UVP, modelo M-15, el cual está incorporado al sistema de fotodocumentación Photo Doc-It.

RESULTADOS Y DISCUSION.

Día a día, se hace evidente la discrepancia de resultados reflejados por diversos autores en lo que a *Hp* se refiere, ya que, existen estudios con una alta prevalencia de positividad a diferencia de otros que muestran escasos resultados positivos. En lo referente al presente estudio, de las setenta y un (71) muestras examinadas, 18 (25.35%) resultaron positivas para el gen *ureC* de *Hp*, tal como se observa en la Tabla 1, lo que corroboraría lo antes expuesto por otros autores en lo referente a las posibilidades de reinfección del microorganismo.

Tabla 1 Resultado de la expresión del gen *ureC* de *Hp* en placa dental

Pacientes	Cantidad	Porcentual
Positivos	18	25.35
Negativos	53	74.64
Total	71	100

Por ende, se evidencia la sensibilidad y especificidad del método de PCR en la identificación de esta bacteria en placa dental. Este aspecto concuerda con el reporte de Song *et al.* (2000), quienes lo consideran el método de elección para detectar ADN de *Hp* en la cavidad bucal; al igual que Brooks *et al.*, (2004) los cuales detectaron ADN de *Hp* partiendo de concentraciones mínimas de placa dental.

Además de esto, con el presente estudio se evidenció que 13 de los 18 pacientes positivos para *Hp*, también presentaban reflujo gastroesofágico. Confirmando estos resultados, Perrone & Berroteran (1999) afirman que la presencia de este microorganismo en la cavidad bucal surge como una consecuencia de dicho reflujo, es decir, como miembro de una microbiota transitoria, que se convierte en un microorganismo permanente de la cavidad bucal. Estos aspectos, confirman la estrecha relación existente entre la infección por *Hp* y el desarrollo de enfermedades gastrointestinales, este aspecto resalta la sugerencia de que la placa dental y la saliva pueden ser responsables para la transmisión de la bacteria y posiblemente funciona como vía de reinfección después de la terapia de erradicación. Dicho aspecto, fue mencionado por segunda vez por los mismos

autores en el año 2006. En este sentido, Martínez & Noa (2009), refieren que *Hp* es una bacteria que coloniza e infecta la mucosa del epitelio gástrico del hombre, condicionando la aparición de una gastritis que puede evolucionar hacia úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico o linfoma tipo MALT. En otros casos, la infección se presenta de forma silente. Dichos autores mencionan la presencia de *Hp* en pacientes con gastritis y en otros con mucosa sana que acudieron a la Consulta de Endoscopia, del Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras", por desórdenes en las vías del tracto digestivo superior. Así, Martínez & Noa (2009) estudiaron 50 pacientes, de ellos 30 tenían gastritis erosiva y 20 la mucosa sana, confirmado histológicamente. Se detectó *Hp* por amplificación de un fragmento del gen *Urec A* en el 90% de los casos con gastritis erosiva y el 75 % de los sujetos con mucosa sana mediante PCR. Por ende, llegan a la conclusión que la infección por *Hp* es tan elevada en los pacientes con gastritis como en aquellos con mucosa gástrica sana, lo cual pudiera tener relación con la colonización de dicho microorganismo en placa dental.

En este orden de ideas, Nguyen *et al.* (1995) agregan que la detección de *Hp* en placa dental

Artículos

indica que la colonización de esta bacteria no se limita a la mucosa gástrica y que el nicho bucal puede servir como una posible fuente de reinfeksi3n de la mucosa gástrica.

Bajo esta perspectiva, diversos autores se han abocado a estudiar la presencia de *Hp* en placa dental, entre ellos Perrone & Berroteran (1999) que exponen en su publicaci3n, que de las 69 muestras de placa dental evaluadas, solo una (1.4 %) fue positiva para la amplificaci3n del gen *ureC*; en discrepancia con este estudio. Mientras Jang-Jih *et al.* (1999) obtuvieron un 36% de resultados positivos utilizando cinco m3todos para la detecci3n de *Hp* por PCR. Profundizando en este tema, el mismo autor,

estudio la presencia de *Hp* en la placa dental supragingival de molares, premolares e incisivos de 20 pacientes. Dichos autores, evidenciaron que todas las muestras fueron positivas para el ADN de *Hp*, llegando as3 a la conclusi3n de que la placa dental realmente actúa como reservorio de esta bacteria y advierten que los ensayos con PCR demuestran ser un m3todo muy sensible y especifico. Por lo tanto, lo consideran el m3todo de elecci3n para detectar el ADN de *Hp* en la cavidad bucal. A diferencia de dichos autores, el presente estudio evidencia la presencia de dicho microorganismo en algunas muestras de placa dental lo cual se aprecia en las figuras 1 y 2.

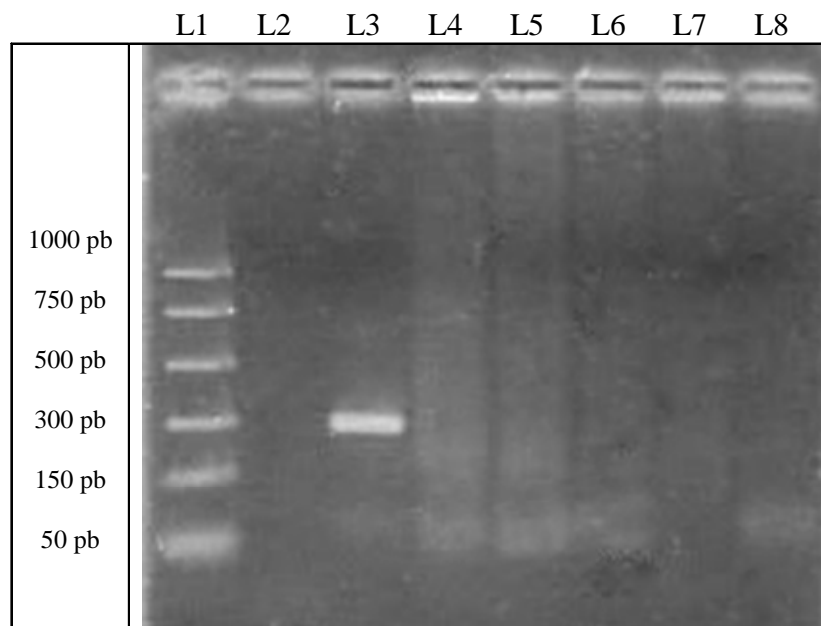


Figura 1 Imagen donde se aprecia el marcador de peso molecular (línea 1), el control negativo (línea 2), el control positivo (línea 3) y cinco muestras con resultado negativo (línea 4, 5, 6, 7 y 8).

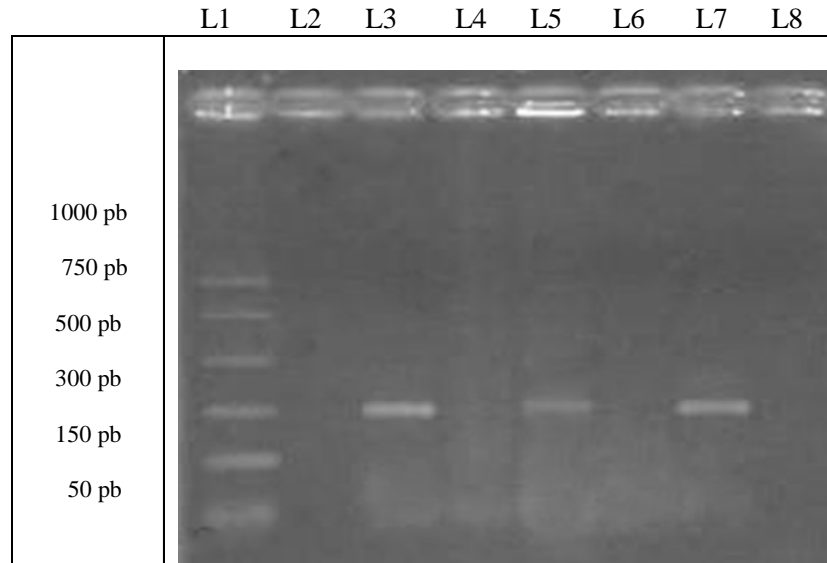


Figura 2. Imagen donde se aprecia el marcador de peso molecular (línea 1), control negativo (línea 2), control positivo (línea 3), dos resultados positivos (línea 5 y 7) y tres resultados negativos (línea 4, 6 y 8)

Cheng *et al.* (1996) refieren que aún cuando la placa dental presenta una microbiota bastante compleja, podría actuar como uno de los principales reservorios de *Hp* y posiblemente desempeña un papel importante en la instauración de la infección periodontal y gástrica. Por tal motivo, se han relacionado varias condiciones bucales que predisponen a la presencia del microorganismo en la placa dental.

Entre los más nombrados figuran el uso de prótesis dental y la frecuencia de tratamiento odontológico. Dicho aspecto fue estudiado en la presente investigación observándose que de los 71 pacientes estudiados y referidos en la Tabla 1, 9 eran portadores de prótesis dental y todos presentaron positividad para *Hp* (Fig. 3 y 4). Dicho aspecto fue confirmado por Hirchl *et al.* (1994) que refiere que pacientes que reciben

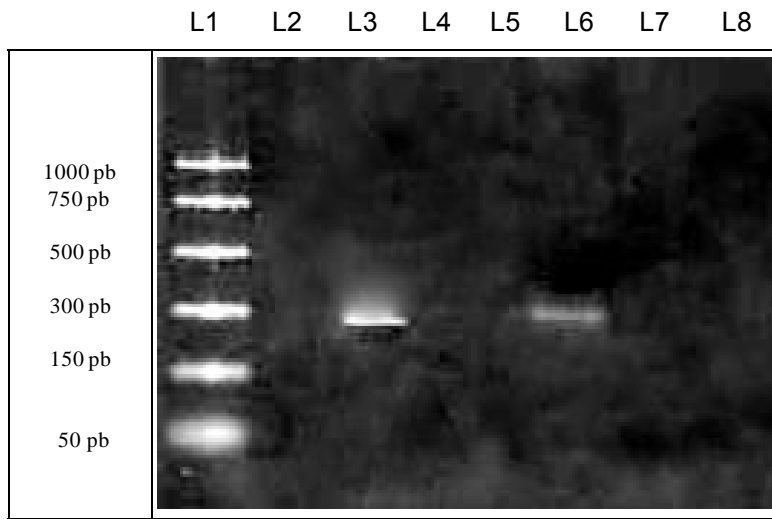


Fig. 3. Imagen donde se aprecia el marcador de peso molecular (línea 1), control negativo (línea 2), control positivo (línea 3), un resultado positivo (línea 6) los cuales son portadores de prótesis dental y tres resultados negativos (línea 4, 5 y 8)

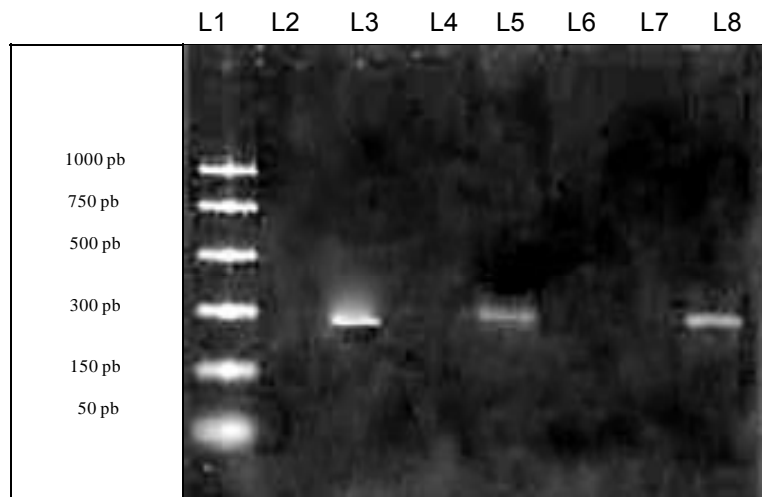


Fig. 4. Imagen donde se aprecia el marcador de peso molecular (línea 1), control negativo (línea 2), control positivo (línea 3), dos resultados positivos (paciente portador de prótesis dental, línea 5 y 8) y tres resultados negativos, pacientes no presentan prótesis dental (línea 4, 6 y 7)

tratamiento odontológico presentan niveles mas bajos de seropositividad para *Hp*, mientras aquellos portadores de prótesis dental permanente presentan niveles más altos demostrados por lo la técnica de PCR.

No obstante, debido a la gran variabilidad genética del *Hp* demostrada por estudios de genotipificación y secuenciación, la mayoría de las investigaciones basadas en PCR, se han dirigido hacia la identificación de algunos genes específicos, dentro del cual destacan *el vacA*, *el cagA* y *el ureC*; sin embargo, cabe destacar que el gen *ureC* que expresa para una fosfoglucoamin mutasa (GlmM), la cual es esencial y exclusiva en el genoma del *Hp* para su crecimiento constituye el gen más empleado para realizar el diagnóstico, reportándose buenos valores de sensibilidad y especificidad (Perrone *et al.*, 2006),. De esta manera, los referidos antecedentes marcaron las pautas fundamentales para realizar esta investigación, con la finalidad de determinar la presencia de *Hp* en placa dental a través de PCR con la utilización del gen *ureC* empleado para un buen diagnóstico.

Por otra parte, Scarano *et al.* (2005) en la Universidad Central de Venezuela, opinan que la presencia de lesión en la mucosa gástrica favorece la proliferación de *Hp* en el medio y consecuentemente aumenta la colonización de la mucosa gástrica por el patógeno y refiere además que la infección de la mucosa gástrica por *Hp* frecuentemente ocurre con presencia simultánea del patógeno en la placa dental. Dicha hipótesis llamó la atención, pues pudo confirmarse a través del presente estudio donde

el 100% de los pacientes con síntomas de reflujo gastroesofágico arrojaron resultados positivos en cuanto a *Hp* se refiere. En contraparte, en otro estudio el mismo año, resultó que 100% (n=48) de los pacientes presentaron positividad para *Hp* en placa dental, independientemente de la presencia de lesión en la mucosa gástrica (Jang-jih *et al.*, 1999).

CONCLUSIONES.

Los resultados presentados en este trabajo revelan la importancia de la aplicación del método de PCR en placa dental, el cual, podría servir como recurso auxiliar de diagnóstico en la infección por *Hp* en pacientes con gastropatías. En este sentido, diversos autores afirman que la detección de dicho microorganismo en placa dental, indica que la colonización del mismo no se limita a la mucosa gástrica y que el nicho bucal podría servir como posible fuente de re infección para la misma. Dicho aspecto se evidencia a nivel medico; por el fracaso de tratamientos erradicadores, lo cual es justificado con una posible resistencia bacteriana de *Hp* ante el antimicrobiano indicado. Por otro lado, cabe resaltar, que existe mayor predisposición de positividad de *Hp* en pacientes portadores de prótesis, en este caso prótesis fija, ya que las mismas pueden actuar como nicho para el microorganismo antes mencionado. A través del estudio se logró estandarizar y demostrar la eficiencia de la metodología de PCR en la detección de *Hp* en muestras proveniente de placa dental, en UNIMPA de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo.

RECOMENDACIONES.

Existe la necesidad de profundizar las investigaciones enfocadas en la detección del *Hp* en placa dental, para poder determinar así la aplicación de la técnica PCR como recurso auxiliar de diagnóstico de *Hp* en pacientes con gastropatías.

AGRADECIMIENTOS

Para la materialización del presente trabajo ha sido significativo el aporte del Fondo de Subvención de la Facultad de Odontología de la Universidad de Carabobo; además, el apoyo incondicional de la Profa. Flor Herrera y del TSU José Rivero, del Centro de Investigaciones Biomédicas (BIOMED-UC); de igual manera cabe resaltar, el cordial agradecimiento a la Dra Mónica Contreras, del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C).

REFERENCIAS

- Brooks HJ, Ahmed D, McConnell MA & Barbezat GO (2004) Diagnosis of helicobacter pylori infection by polymerase chain reaction: is it worth it? *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 50: 1-5.
- Cheng LHH, Webberley M, Hanson N & Brown R (1996) *Helicobacter pylori* in dental plaque and gastric mucosa. *Oral Sug. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 81: 421-423.
- Dowsett SA, Archiva L Segret VA & Gonzalez CR (1999) *Helicobacter pylori* Infection in Indigenous Families of central America: Serastatus and Oral Finger nail Carriage. *J. Clin Microbiol.* 37: 2456-2460
- Hirschl AM, Ritcher M, Makrithatis PM, Pruckl B, Willinger K, Schutze K & Rotter M (1994) Single and multiple strain colonization in patients with Helicobacter pylori-associated gastritis: detection by macrorestriction DNA analysis. *J. Infect. Dis.* 170: 473-475.
- Jang-Jih L, Cherg-Lih P, Rong-Yaun S, Chi-Hsiang C & Qinyuan L (1999) Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric Tisúes. *J. Clin. Microbiol.* 37: 772.
- Kabris S (2004) Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by Polimerase Chain Reaction: a review. *Helicobacter.* 9: 115- 123.
- Leontiadis GI, Sharma VK, Howden CW (2000) Infecção por *Helicobacter pylori* fora do Trato Gastrointestinal. *JAMA Brasil.* 4: 3413-28.
- Manson JD & Eley BM (1993). O Meio Bucal na Saúde e na Doença. Manual de Periodontia. São Paulo. .
- Martínez, M. & Noa G (2009) Infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con mucosa sana y con gastritis erosiva. *Rev Cubana de Med.* 48(2).
- Nguyen AMH, El-Zaatari FAK & Graham DY (1995) *Helicobacter pylori* in the oral cavity. A critical review of the literature. *Oral Sug Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 76: 705-709.
- Perrone M, & Berroteran A (1999) Detección de *Helicobacter pylori* en placa dental y saliva de pacientes con enfermedad de las vías digestivas superiores. *Acta Odontol Venezolana,* 36: 51-55.

Perrone, M, Gonzalez-Valencia, G & Camorlinga, M (2006) Identificación de genotipos de *Helicobacter pylori*, provenientes de muestras de placa dental en la población venezolana. 4ª ed. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/cielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652006000100012&lng=es&nrm=iso. ISSN 0001-6365.

Premoli G, Gonzalez A, Mendoza B & Percoco T (2004) Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Cubana Med Trop.* 56: 85-90

Scarano, G, Correia, A & Marques S (2005) Detección de *Helicobacter pylori* en placa dental y en mucosa gástrica de pacientes sometidos a endoscopia digestiva. *Acta Odontol. Venez* 2ª ed.. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652005000200003&lng=es&nrm=iso.

Song Q, Haller B, Ulrich D, Wichelhaus A, Adler G. & Bode G (2000) Quantitation of *Helicobacter pylori* in dental plaque samples by competitive Polymerase Chain Reaction. *J. Clin Pathol.* 53: 218-222.