



**Universidad Autónoma de Sinaloa**  
**Facultad de Ciencias Químico Biológicas**  
Programa Regional de Posgrado en Biotecnología  
Maestría en Ciencias con Orientación en Biotecnología

**Identificación de Bacterias Periodontales Presentes en Placa Dental  
en Pacientes con Periodontitis e Individuos Sanos**

**T E S I S**

que presenta

**Biól. Xitlalic Geraldine Gastélum Rosales**

como requisito para obtener el grado de  
**Maestra En Ciencias con Orientación en  
Biotecnología de la Salud**

Directores de tesis

**Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina**

**Dr. Rosalío Ramos Payán**

Culiacán de Rosales, Sinaloa

07 de Junio 2016

Este proyecto se realizó en los laboratorios de Inmunología y Microbiología Molecular en la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa y en la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Sinaloa bajo la dirección de la Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina y el Dr. Rosalío Ramos Payán y la asesoría de los Dres. Leopoldo Flores, José Geovanni Romero Quintana, Erika Silva Benítez, Jesús Eduardo Soto Sainz.

## AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis la Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina y el Dr. Rosalío Ramos Payán por haberme facilitado el espacio y las condiciones para poder desarrollarme como maestro así como todas sus enseñanzas y consejos que el futuro próximo serán de crucial utilidad.

A los Dres. José Geovanni Romero Quintana, Erika de Lourdes Silva Benítez, Eduardo Soto Sainz y Alfredo Ayala por todo su apoyo tanto en las clínicas como en laboratorio y por todo el tiempo que gustosamente dedicaron a esta investigación, la paciencia que tuvieron conmigo y todas sus enseñanzas, sin su ayuda esto hubiera sido casi imposible.

A mis compañeros de los Laboratorios de Inmunología y Microbiología Molecular de la FCQB y familia académica Erik, Mariana, Nayeli, Raquel, Aida, Fernando, Carlos, Germán, Ruy, Emilo, Nora, María del Mar. Por estar siempre presentes apoyando y dando palabras de aliento cuando todo parece imposible. Son una gran familia, los quiero mucho a todos.

A mis padres por nunca dejar de creer en mí, por todo el apoyo y por darme siempre los mejores consejos y educación, gracias a ellos estoy culminando un proyecto más de vida. Los amo.

Finalmente y no menos importante, a Jesús A. González Escárcega por haberme brindado todo su apoyo y paciencia en los momentos más difíciles de desesperación, a su modo me hizo entrar en razón muchas veces. Te amo.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa y a la Facultad de Ciencias Químico Biológicas por permitirme fortalecer mi formación académica.

Al CONACyT por la beca otorgada para facilitarnos a todos los estudiantes de posgrado a llevar a cabo nuestros objetivos.

## ÍNDICE GENERAL

|   | Pág. |
|---|------|
| ÍNDICE DE FIGURAS                       | vii  |
| ÍNDICE DE CUADROS                       | viii |
| I RESUMEN                               | 1    |
| II INTRODUCCIÓN                         | 7    |
| III REVISIÓN DE LITERATURA              | 12   |
| A. TEJIDO PERIODONTAL                   | 12   |
| B. MICROBIOLOGÍA ORAL HUMANA            | 13   |
| 1 Placa dentobacteriana                 | 16   |
| B. ENFERMEDAD PERIODONTAL               | 19   |
| 1. Prevalencia                          | 21   |
| 2 Periodontitis                         | 24   |
| 3 Etiopatología                         | 25   |
| 4 Microbiología en periodontitis        | 27   |
| ■ Complejo rojo                         | 27   |
| ■ Porphyromonas gingivalis              | 28   |
| ■ Tannerella forsythia                  | 30   |
| ■ Treponema denticola                   | 31   |
| ■ Aggregatibacter actinomycetemcomitans | 32   |
| ■ Prevotella intermedia                 | 33   |
| ■ Streptococcus mutans                  | 33   |
| ■ Respuesta del hospedero               | 34   |

|      |  |    |
|------|--|----|
| 5    | Antecedentes   | 35 |
| IV   | HIPÓTESIS  | 39 |
| V    | JUSTIFICACIÓN  | 39 |
| VI   | OBJETIVOS  | 40 |
|      | B. OBJETIVO GENERAL                                    | 40 |
|      | C. OBJETIVOS ESPECÍFICOS                               | 40 |
| VII  | MATERIALES Y MÉTODOS                                   | 41 |
|      | D. MATERIAL  | 41 |
|      | 1 Criterios de inclusión                               | 41 |
|      | 2 Criterios de exclusión                               | 41 |
|      | 3 Criterios de eliminación                             | 41 |
|      | 4 Expedientes  | 42 |
|      | 5 Diagnóstico de los sujetos de estudio                | 42 |
|      | 6 Obtención de las muestras                            | 43 |
|      | 7 Consideraciones éticas                               | 43 |
|      | E. METODOLOGÍA   | 44 |
|      | 8 Estandarización                                      | 44 |
|      | 9 Identificación molecular de bacterias periodontales. | 44 |
|      | 10 Amplificación genética                              | 44 |
|      | 11 Análisis estadístico                                | 45 |
| VIII | RESULTADOS Y DISCUSIÓN                                 | 55 |
|      | F. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS                         | 55 |
|      | G. CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS                         | 64 |

|    |   |    |
|----|---|----|
| IX | CONCLUSIONES  | 69 |
| X  | BIBLIOGRAFÍA  | 70 |
| XI | ANÉXOS  | 76 |
|    | H. Cuestionario, consentimiento informado y periodontograma aplicados al sujeto de estudio. | 76 |
|    | I. Carta de aceptación del protocolo aprobado por el comité de ética.                       | 80 |
|    | J. Presentación en congresos  | 81 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | Descripción   | Página |
|--------|---|--------|
| 1.     | Tejido periodontal.   | 14     |
| 2.     | Estructura de placa bacteriana.   | 20     |
| 3.     | Prevalencia de enfermedad periodontal en México.  | 23     |
| 4.     | Integridad de ADN genómico bacteriano.  | 46     |
| 5.     | Verificación de amplificación bacteriana por PCR.   | 47     |
| 6.     | Curva de cuantificación <i>P. gingivalis</i>  | 48     |
| 7.     | Curva de cuantificación <i>S. mutans</i> .  | 49     |
| 8.     | Curva de cuantificación <i>P. intermedia</i>  | 50     |
| 9.     | Curva de cuantificación <i>T. denticola</i> .   | 51     |
| 10.    | Curva de cuantificación <i>T. forsythia</i> .   | 52     |
| 11.    | Curva cuantificación <i>A. actinomycetemcomitans</i> .  | 53     |
| 12.    | Frecuencia de género en individuos de estudio.  | 57     |
| 13.    | Frecuencia bacteriana en pacientes con periodontitis e sujetos sanos.   | 58     |
| 14.    | Frecuencia del número de bacterias por grupo.   | 59     |
| 15.    | Promedio de cargas bacteriana en regiones supragingival y subgingival en pacientes con periodontitis y sujetos sanos. | 66     |

## ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | Descripción                             | Página |
|--------|---|--------|
| 1.     | Géneros de bacterias en cavidad Oral.   | 17     |
| 2.     | Iniciadores específicos                 | 54     |
| 3.     | Frecuencias de bacterias periodontales. | 62     |
| 4.     | Carga bacteriana.                       | 65     |

## I RESUMEN

La enfermedad periodontal es la inflamación de la región marginal de la encía debido a la infección bacteriana inespecífica de ésta. La periodontitis es definida como una enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte del diente acompañada por formación de una bolsa periodontal cambiando la densidad y altura de hueso alveolar subyacente, en algunos casos, la recesión de la encía marginal puede estar acompañada de la pérdida de inserción, enmascarando así la progresión de la enfermedad. La periodontitis es causada por la colonización bacteriana y varias especies se han asociado fuertemente con la progresión de esta enfermedad.

La cavidad oral representa un nicho de fácil acceso para estudiar las dinámicas de la comunidad bacteriana y las interacciones entre la misma ya que han cobrado gran importancia por sus implicaciones a la salud, por ejemplo, las bacterias orales han sido implicados en la endocarditis bacteriana, neumonía por aspiración, la osteomielitis en niños prematuros de bajo peso al nacer, la enfermedad cardíaca coronaria y el infarto cerebral (o un derrame cerebral). La enfermedad periodontal es una de las dos más grandes enfermedades dentales que afectan a la población humana en todo el mundo en altos niveles de prevalencia. Es una enfermedad infecciosa, y la mayor parte de los patógenos ya han sido identificados, pero las bacterias si bien son conocidas como esenciales por causar la enfermedad periodontal, no son suficientes. Los factores propios del individuo así como factores ambientales, hereditarios y el fumar, son determinantes para la ocurrencia y severidad de la enfermedad resultante.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que del 10 al 15% de la población mundial sufre de algún tipo de enfermedad periodontal en sus diferentes niveles. En el año 2011 la Reviste Odontológica Mexicana reportó un trabajo que se realizó en la Facultad de Odontología de la UNAM, en el cual observaron una prevalencia en periodontitis crónica de 67.2% con un porcentaje de dientes afectados en promedio por individuo de 55.70%. Los rangos de edad más afectados fueron personas de entre 30 y 90 años. En cuanto a la distribución de géneros, de 394 individuos estudiados el 62.5% pertenecieron al género femenino y el 37.5% masculino.

En México existen 355,419 casos de gingivitis y enfermedades periodontales, lo cual se traduce a que el 30% de la población nacional padece de algún tipo de enfermedad periodontal. El

18% lo comprende el género femenino y 11% el masculino. El primero lugar a nivel nacional es del Distrito Federal con 2.63% de los casos, seguido por el Estado de México, Jalisco y Veracruz. Sinaloa ocupa el quinto lugar a nivel nacional en prevalencia de algún tipo de enfermedad periodontal con 1.45% de los casos (Fig. 2). En Sinaloa existen reportados 17,300 casos de enfermedades periodontales, teniendo un total de 58% de los habitantes del cuales 33% son mujeres y el 20% son hombres

En consecuencia, es importante saber qué microorganismos están presentes en la cavidad oral para el diagnóstico y el tratamiento racional. El objetivo del presente estudio fue Identificar y cuantificar las bacterias periodontales presentes en placa dental de pacientes con periodontitis individuos sanos. Las bacterias analizadas fueron *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Streptococcus mutans*.

Los objetivos se cumplieron mediante técnicas de extracción de ADN genómico bacteriano de la región subgingival de individuos sanos y pacientes con periodontitis utilizando un protocolo modificado para extracción de ADN genómico bacteriano. Acto seguido se llevó a cabo la amplificación genética con la técnica de PCR tiempo real usando los iniciadores correspondientes para cada bacteria de estudio.

Se tomaron muestras de placa dental de la región supra y subgingival de individuos sanos y pacientes con periodontitis y se extrajo el ADN genómico bacteriano. Posteriormente se detectaron y cuantificaron las bacterias estudiadas por PCR en tiempo real.

Al analizar el grupo de pacientes con periodontitis se observó una frecuencia general de 83% del cual el 52% de los pacientes presentaron al menos 1 bacteria, el 36% presentó 2 bacterias y el 12% presentó 3 bacterias, mientras que el grupo de individuos sanos mostró una frecuencia general de 50% donde el 47% presentó al menos 1 bacteria, 33% presentó 2 bacterias y el 20% presentó 3 bacterias. Los resultados mostraron que la presencia de ciertos grupos de especies de bacterias afecta a la progresión y agravamiento de la enfermedad periodontal. Unas de estas especies es *P. gingivalis* y *S. mutans* que se encuentra en mayor proporción en pacientes con enfermedad periodontal en regiones supragingivales y en prevalencias bajas en personas sanas o regiones

subgingivales. En cuanto a *T. denticola*, *T. forsythia* y *P. intermedia* se encuentran proporciones similares en pacientes con periodontitis e individuos sanos, así como en las regiones supragingival y subgingival. Prospectivamente se realizarán estudios con un mayor número de muestras para corroborar estos datos.

Finalmente *A. actinomycetemcomitans* no se encuentra tanto en individuos sanos como en pacientes con enfermedad periodontal inicial o crónica. En estudios posteriores se analizarán muestras de pacientes con enfermedad periodontal más severa y descartando el rango de edad máximo de 60 años para poder demostrar su relación con periodontitis agresiva ulcerativa.

## 1. ABSTRACT

Periodontal disease is the inflammation of marginal region of the gums due to an unspecific bacterial infection and it's regularly follow by periodontitis if not treated on time. Periodontitis is defined as an inflammatory illness of the tooth support tissues followed by the periodontal pocket formation changing the density and depth of the adjacent alveolar bone, in some cases, marginal gum's recession can be accompanied by the loss of insertion, masking the progression of the disease.

The oral cavity represents an easy access niche to study bacterial community dynamics and their interaction gathering great relevance for its health implications, for example, oral bacteria have been implicated in bacterial endocarditis, aspiration pneumonia, low weigh birth premature kids osteomyelitis, coronary cardiac disease and brain stroke (or brain seizure). Periodontal disease is one of the both biggest dental diseases affecting the human worldwide population at high prevalence levels. It is an infectious disease, and most pathogens have been identify, although bacteria are well known for their essential roll on periodontal disease, they are not enough. Individual own factors such as environmental and hereditary factor and smoking, are determinant for the severity and occurrence of the resulting disease.

The World Health Organization (WHO) reported that 10 – 15 % of the world's populations suffers some kind of periodontal disease at a different level. In 2011 the "Revista Odontológica Mexicana" published a work preform at the Odontology Faculty of the Mexico's National Autonomous University (UNAM) were they observe a prevalence of chronic periodontitis of 67.2% with an average of affected tooth by individual of 55.7%. Age range of the affected person were among 30 and 90 years. About gender distribution, of 394 studied individuals 62.5% were female and 37.5% male.

In Mexico their 355,419 cases of periodontal disease, which translate to 30% of the national population suffering of some kind of periodontal disease. 18% of them are female and 11% are male. The first place in the national ranking belong to Mexico City with 2.63% of the cases, follow by Mexico State, Jalisco and Veracruz. Sinaloa takes the fifth place in the national prevalence ranking of periodontal diseases with 1.45% of the cases. In Sinaloa there are reports of 17,300

cases of periodontal diseases, with a total of 58% of the population where 33% are female and 20% are male.

In consequence it is important to know which bacteria are present in the oral cavity for the diagnostic and rational treatment, as well as periodontal diseases. This is why the present work pretends to identify the periodontal bacteria present on dental plaque of patients with chronic periodontitis and healthy individuals; *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Streptococcus mutans*, such as its bacterial load on the different stages of the disease.

The aims were accomplish using a modified protocol for bacterial genomic DNA extraction of the subgingival region of healthy individuals and periodontitis patients. Follow by the genetic amplification of DNA using real time qPCR with the studied bacteria specific primers.

Dental plaque samples were taken from supra and subgingival regions of healthy individuals and periodontitis patients and bacterial genomic DNA was extracted. Afterwards studied bacteria were detected and quantified by real time qPCR.

Upon analysis periodontitis patients group presented a general frequency of positive bacteria was 83%, of which 52% of the patients presented at least one bacteria, 36% showed 2 bacteria and only 12% have 3 bacteria, meanwhile healthy individual group presented a general frequency of positive bacteria of 50%, were 47% have at least one bacteria, 33% showed 2 bacteria and only 20% have 3 bacteria.

Our results showed that the presence of certain bacteria species affects the progression and severity of the periodontal disease. One of these species is *P. gingivalis* and *S. mutans* presents in most of the periodontal disease patients on the supragingival region and in low prevalence of the healthy patients or subgingival region. As for *T. denticola*, *T forsythia* and *P. intermedia* have similar proportions on periodontal patients and healthy individuals, just like on supra and subgingival regions. Eventually will be performing studies on more samples to corroborate this findings.

Finally *A. actinomycetemcomitans* wasn't present on either healthy individual or early and chronic periodontal disease patients. Prior studies will analyzed samples from severe periodontal

disease patients and regard of those older than 60 years of age in order to prove the bacteria relation with ulcerative aggressive periodontitis.

## II INTRODUCCIÓN

La periodontitis, denominada comúnmente piorrea, es una enfermedad que inicialmente puede cursar como gingivitis y luego con una pérdida de inserción colágena, recesión gingival e incluso la pérdida de hueso, en el caso de no ser tratada, dejar sin soporte óseo al diente. La pérdida de dicho soporte implica la pérdida irreparable del diente mismo. La característica de la periodontitis que la distingue de la gingivitis es la presencia clínicamente detectable de pérdida de inserción. Frecuentemente es acompañada por formación de una bolsa periodontal cambiando la densidad y altura de hueso alveolar subyacente, en algunos casos, la recesión de la encía marginal puede estar acompañada de la pérdida de inserción, enmascarando así la progresión de la enfermedad (Chung WO y An JY, 2012).

La periodontitis es una enfermedad infecciosa la mayor parte de los patógenos ya han sido identificados, pero las bacterias si bien, son conocidas como causales de la enfermedad periodontal, no son suficientes. Los factores propios del individuo así como factores ambientales, hereditarios y el fumar, son determinantes para la ocurrencia y severidad de la enfermedad resultante. La interacción de estos factores está bien demostrada gracias a investigaciones resientes que dilucidaron la complejidad de las interacciones en enfermedades multifactoriales e incluyen roles para bacterias específicas y su genética por ejemplo, trabajos recientes han mostrado que individuos con periodontitis juvenil localizada tienen elevados niveles de inmunoglobulina G2 (IgG2), la cual esta genéticamente controlada. Otro factor importante es fumar, el cual se ha mostrado que después de un tiempo compromete al individuo con enfermedad generalizada mediante la reducción de la respuesta de IgG2 (Kolenbrander PE y col., 2002).

La cavidad oral es la puerta de entrada al cuerpo y representa uno de los más biológicamente complejos y significantes sitios en el cuerpo. Aquí es donde toma lugar una de las primeras etapas del proceso de digestión, consecuentemente, la boca está ricamente dotada con funciones sensoriales (gusto, olor, temperatura y textura). Un proceso clave en la sucesión microbiana y la formación de biopelículas es el de la coagregación o coadhesión, que es el reconocimiento de célula a célula de poblaciones celulares genéticamente diferentes, y esta coagregación se produce

entre la mayoría de los géneros bacterianos orales. La acumulación de placa temprana se ve facilitada por la coagregación entre especies del género *Streptococcus* y *Actinomyces spp.*

El desarrollo posterior de la placa dental implicará más coagregación entre otros géneros de bacterias y los colonizadores primarios resultando finalmente en un agrupamiento complejo de bacterias que hasta la fecha se sigue estudiando ya que el entendimiento del mismo proporciona información de interés para el tratamiento de las enfermedades periodontales (Marsh PD y col., 2009).

Los colonizadores iniciales en la superficie de los dientes son principalmente especies no patogénicas Gram positivos facultativos, la presencia y desarrollo de éstos, aunado a la pobre higiene que pudiera tener el hospedero permite el desarrollo de nichos favorable para las bacterias Gram negativas que son los principales agentes causales de la enfermedad por sus componentes moleculares, así mismo por los metabolitos que generan al tener contacto con las células del periodonto, tales como las células epiteliales, mastocitos, y queratinocitos entre otros (Kolenbrander PE y col., 2002).

A demás de la placa bacteriana o biofilm microbiano, existen otros factores locales y sistémicos que modifican la respuesta del huésped ante la invasión territorial, facilitando o por el contrario retardando el proceso infeccioso, por ejemplo tabaquismo, diabetes mellitus, déficits de neutrófilos (Síndrome de Down, de Papillon-Lefèvre o de Marfan). La periodontitis en su forma agresiva puede aparecer en edades tempranas, evolucionando de manera rápida, lo que provoca la pérdida de piezas dentales en personas jóvenes (Kulkarni C y Kinane DF, 2014).

La lesión inicial se da en respuesta a la interacción de los leucocitos residentes y a las células epiteliales contra el biofilm. En esta etapa, no existen signos clínicos de inflamación, pero los cambios en el tejido pueden ser observados histológicamente. Los metabolitos producidos por las bacterias repercuten directamente en las células epiteliales haciendo que estas produzcan citocinas y estimulen la producción de neuropéptidos, a consecuencia de ello se favorece la dilatación de los vasos sanguíneos locales. Los neutrófilos comienzan a migrar al sitio de la inflamación en respuesta a las quimiocinas. La lesión inicial continúa evolucionando, de tal manera

que el número de neutrófilos en el tejido conectivo incrementa e inicia la presencia de macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y mastocitos (Dale BA, 2002).

En México existen 355,419 casos de gingivitis y enfermedades periodontales, lo cual se traduce a que el 30% de la población nacional padece de algún tipo de enfermedad periodontal. El 18% lo comprende el género femenino y 11% el masculino. El primero lugar a nivel nacional es del Distrito Federal con 2.63% de los casos, seguido por el Estado de México, Jalisco y Veracruz. Sinaloa ocupa el quinto lugar a nivel nacional en prevalencia de algún tipo de enfermedad periodontal con 1.45% de los casos (Fig. 2). En Sinaloa existen reportados 17,300 casos de enfermedades periodontales, teniendo un total de 58% de los habitantes del cuales 33% son mujeres y el 20% son hombres (DGE, 2016).

La etiología bacteriana que afecta al periodonto (el tejido de sostén de los dientes, constituido por la encía, el hueso alveolar, el cemento radicular y el ligamento periodontal) se manifiesta más comúnmente en adultos mayores de 35 años, pero puede iniciarse en edades más tempranas. La mayoría de los casos de periodontitis son causados por un pequeño número de especies bacterianas. La flora subgingival puede albergar cientos de especies, serotipos y biotipos, los expertos están de acuerdo en que, excepto para periodontitis aguda necrosante, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, son las causantes de la mayoría de los casos de periodontitis (Page RC y col., 1997).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad periodontal resultan de la compleja interacción entre los agentes etiológicos, en este caso las bacterias específicas encontradas en la placa dental, y los tejidos del hospedero. La respuesta del hospedero contra la placa bacteriana está influenciada por el genotipo individual o estructura genética y las influencias del medio ambiente. Las variaciones genéticas o mutaciones que modulan la respuesta de cada individuo contra la agresión bacteriana han sido identificadas y en algunos casos han sido asociadas con formas severas de enfermedad periodontal. La asociación de bacterias dentro de la mezcla de la biopelícula no es al azar, es una asociación específica entre las especies bacterianas.

Los recientes avances en el campo de la investigación periodontal son consistentes con un nuevo modelo de la patogénesis de la enfermedad periodontal según la cual, la periodontitis es

iniciada por una comunidad microbiana sinérgica y disbiótica llamada el “complejo rojo”. La comodidad y el atractivo sobre el concepto del complejo rojo, o cualquier otro código de color conocido, han resultado en la adopción de estos términos como método de explicación para diversos procesos en la enfermedad periodontal. Los organismos del complejo rojo tales como *P. gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia* se pueden encontrar en la ausencia de enfermedad (Moffatt CE y col., 2011)

Varios mecanismos operan en el entorno del diente para defenderse ante la infección microbiana y prevenir el desarrollo de la periodontitis. Hay una fuerte evidencia de que en algunos individuos y bajo ciertas circunstancias, los patógenos periodontales pueden estar presentes y manifestarse clínicamente como enfermedad periodontal. La intacta barrera epitelial de la gingiva, surco gingival y epitelio de unión normalmente impiden la invasión bacteriana de los tejidos periodontales y normalmente son una barrera eficaz contra la penetración de los productos y componentes bacterianos. Secreciones salivales proporcionan un lavado continuo de la cavidad oral y proporcionan un suministro continuo de aglutininas y anticuerpos específicos que se pueden agregar y eliminar a las bacterias. El tejido crevicular constantemente inyecta el surco o bolsa periodontal con todos los componentes de la sangre y el suero incluyendo proteínas del complemento y antibióticos específicos los cuales hacen frente a la flora bacteriana subgingival. Una larga población de células B y plasma que se acumulan en la pared del surco o la bolsa periodontal producen anticuerpos que pueden ser específicos para antígenos bacterianos y pueden osonizarlas para ser fagocitadas y finalmente destruidas. El tejido conectivo gingival consiste de una alta cantidad de fibras de colágeno, prostaglandinas y suero derivado de ciertos componentes como la albumina. Algunas fibras de elastina también pueden estar presentes.

Si la gingiva está sana, las bacterias llamadas colonizadoras tempranas de la superficie del diente son usualmente encontradas en el margen gingival. La comunidad microbiana genera grandes cantidades de metabolitos que pueden difundir al epitelio de unión. Los metabolitos pueden ser lípidos tales como ácido butírico y ácido propionico que son tóxicos para el tejido. Estos y otros mediadores proinflamatorios sintetizados por el epitelio de unión tales como IL1, prostaglandina E<sub>2</sub> y metaloproteasas de matriz, pueden atravesar el epitelio de unión y entrar al tejido conectivo. El epitelio de unión es el primer tejido que se ve primeramente alterado por las

bacterias. Células a través del tejido en contacto con el epitelio de unión en el surco gingival, contienen lisosomas ácido-fosfato positivo y manifiesta evidencia de fagocitosis de los neutrófilos a bacterias(Kornman KS y col., 1997).

En consecuencia, es importante saber qué microorganismos están presentes en la cavidad oral para el diagnóstico y el tratamiento racional. El objetivo del presente estudio fue Identificar y cuantificar las bacterias periodontales presentes en placa dental de pacientes con periodontitis individuos sanos. Las bacterias analizadas fueron *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Streptococcus mutans*.

### III REVISIÓN DE LITERATURA

#### A. TEJIDO PERIODONTAL

El periodonto, definido como el tejido que da soporte al diente, está constituido por el cemento de la raíz, el ligamento periodontal, el hueso que recubre la cavidad del diente (hueso alveolar) y que parte de la encía hacia el diente (salida dentogingival). Cada uno de los componentes periodontales tiene una estructura muy especializada y estas características estructurales definen directamente su función. De hecho, el correcto funcionamiento del periodonto sólo se alcanza a través de la integridad estructural y la interacción entre sus componentes. La unión dentogingival (de la encía hacia el diente) es una adaptación de la mucosa oral que comprende los componentes del tejido epitelial y conectivo. El epitelio está dividido en tres compartimentos gingivales funcionales; sulcular, epitelio de unión y el tejido conectivo en compartimentos superficiales y profundos. El epitelio de unión juega un papel crucial, ya que esencialmente sella tejidos periodontales desde el entorno oral. Su integridad es esencial para mantener un periodonto sano (Page RC y col., 1997).

Por otro lado el epitelio de unión surge del epitelio del esmalte reducido por donde el diente sale en la cavidad oral. Se forma un collar alrededor de la parte cervical del diente que sigue a la unión cemento-esmalte. La superficie libre de este collar constituye el piso del surco gingival. Básicamente, el epitelio de unión es un epitelio escamoso estratificado no diferenciado con una muy alta tasa de recambio celular. Es más grueso en la parte inferior del surco gingival y se estrecha hasta un grosor de unas pocas células a medida que desciende apicalmente a lo largo de la superficie del diente. Este epitelio está compuesto por células aplanadas orientadas en paralelo al diente que se derivan de una capa de células basales cúbicas situadas lejos de la superficie del diente que descansan sobre una membrana basal, las células de dicha membrana tienen una ultraestructura similar entre sí. La capa de células frente a la de los dientes proporciona la fijación real de la encía a la superficie del diente por medio de un complejo estructural llamado "adherencia epitelial", el cual consta de una estructura de lámina basal adherente a la superficie del diente y a la capa de células superficial unido por hemidesmosomas (Popova C y Dosseva V).

En circunstancias clínicamente normales, se observa un infiltrado de células inflamatorias. El tejido conjuntivo gingival adyacente al epitelio de unión contiene un extenso plexo vascular. Las células inflamatorias tales como leucocitos polimorfonucleares y linfocitos T continuamente migran a través del epitelio de unión en el surco gingival y finalmente al fluido oral. Se considera que el epitelio de unión es un epitelio escamoso estratificado incompletamente desarrollado. Alternativamente, puede ser visto como una estructura que evoluciona a lo largo de una vía diferente y produce los componentes de la unión epitelial en vez de avanzar aún más en un epitelio queratinizado. La naturaleza especial del epitelio de unión refleja el hecho de que el tejido conectivo de soporte, que es funcionalmente diferente a la del epitelio del surco, una diferencia con importantes implicaciones para la comprensión de la progresión de la enfermedad periodontal y la regeneración de la unión dentogingival después de la cirugía periodontal. El tejido conectivo subepitelial (lámina propia) se cree que proporciona señales instructivas para la progresión normal de epitelio escamoso estratificado. Tal señalización presumiblemente está ausente en los tejidos conectivos más profundos para que el epitelio en contacto con él no alcance el mismo grado de diferenciación (Kornman KS y col., 1997) (Figura 1).

## B. MICROBIOLOGÍA ORAL HUMANA

La cavidad oral es una puerta de entrada al cuerpo y representa uno de los sitios del cuerpo más complejo y biológicamente significantes. Aquí es donde toma lugar una de las primeras etapas del proceso de digestión, consecuentemente, la boca está ricamente dotada con funciones sensoriales (gusto, olor, temperatura y textura). Se ha estimado que el cuerpo humano está constituido por alrededor de  $10^{14}$  células, de las cuales sólo alrededor del 10% son del mamífero. Las restantes son microorganismos que comprenden la flora residente del hospedero. Esta flora residente no tiene simplemente una relación pasiva con el hospedero, también contribuye de manera directa o indirecta con el desarrollo normal de la fisiología, nutrición y defensa del organismo. La boca es similar a otros sitios del cuerpo por tener flora bacteriana natural con una composición característica y existiendo en la mayoría, en una armoniosa relación con el hospedero (Paster BJ y col., 2001).

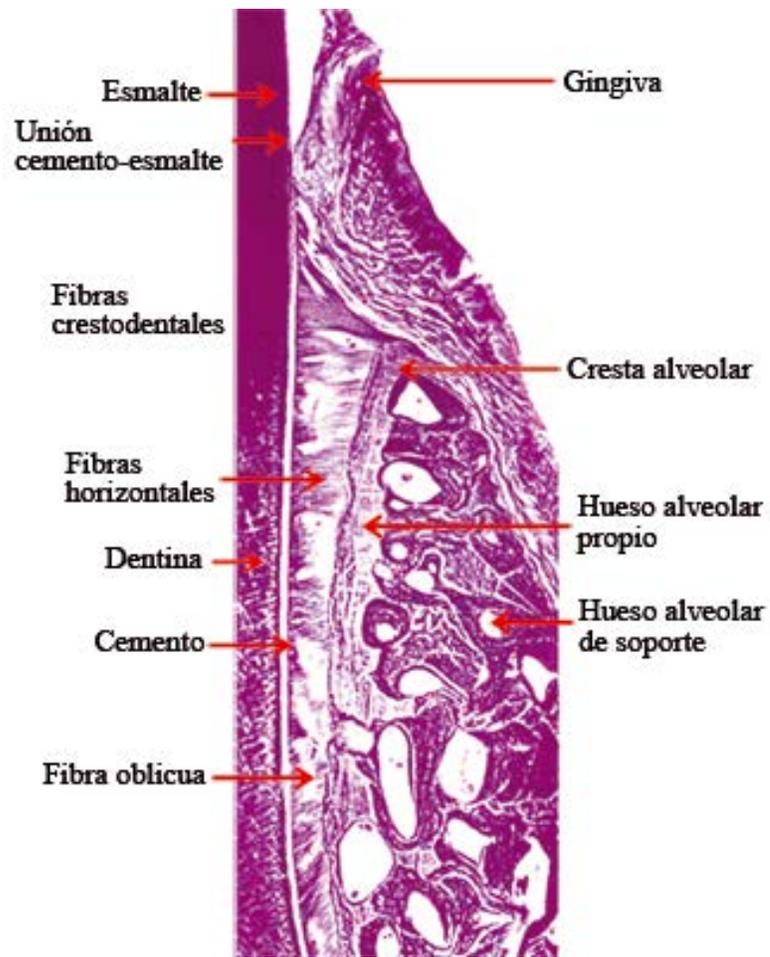


Figura 1. Tejido periodontal. Tomada de Kornman KS y col. (1997)

La microflora residente es diversa y consiste de un amplio rango de virus, mycoplasma, bacterias y levaduras e incluso, en ocasiones, protozoarios. Esta diversidad se debe al hecho de que la boca está compuesta de un número de hábitats diferentes suplementados con diversos nutrientes. Debido a que existen una gran variedad de condiciones, no sólo se encuentra una sola población bacteriana, en la cavidad oral pueden albergar numerosas especies coexistiendo (Marsh PD y col., 2009).

La mayoría de estos organismos son comensales, un subconjunto de esos son probablemente patógenos oportunistas que pueden causar enfermedad sistémica. Por ejemplo, las bacterias orales han sido implicadas en endocarditis, neumonía por aspiración, osteomielitis en niños, bajo peso al nacer y enfermedades de corazón e infarto cerebral. Consecuentemente es importante conocer qué microorganismos están presentes en la cavidad oral para el diagnóstico y tratamiento racional de enfermedades tanto orales como sistémicas (Paster BJ y col., 2001).

La microbiota oral necesita hacer frente a perturbaciones físicas y químicas diarias ocasionadas por la ingesta de comida y medidas de higiene personal. Éstas incluyen fluctuaciones en temperatura, pH, componentes antimicrobianos y dietarios así como la fuerza del cepillado de dientes y la masticación. Datos recientes proporcionados por el Proyecto del Microbioma Humano (NIH) revelaron que el Microbioma oral tiene el mayor núcleo de microbios compartidos entre individuos no relacionados comparado con otros hábitats como el intestino o la piel. Los estudios recientes ha sido limitados al estudio del bacterioma (conjunto de especies de bacterias), el cual ha sido enormemente estudiado con gran detalle y la información filogenética de bacterias orales se encuentran almacenadas en bases de datos dedicadas a la cavidad oral (Zaura E y col., 2014)

En las últimas cuatro décadas, los ecologistas microbianos que incluyen microbiólogos, taxónomos, biólogos moleculares, bioquímicos, epidemiólogos y científicos odontólogos, han acumulado información que ha permitido la identificación de posibles patógenos en caries dental humana y enfermedades periodontales. Gracias a los recientes avances en genética oral al estudio del ADN ribosomal 16s se ha obtenido una gran cantidad de información respecto a la diversidad de microorganismos a partir de un sin número de hábitats, incluyendo la boca. Los enfoques en ecología molecular han permitido la construcción de árboles filogenéticos que incluyen tanto a

bacterias cultivables como no cultivables, es así como en muchos casos, un género y un nombre pueden ser asignados (Mars PD, 2009).

Pruebas de oligonucleótidos tales como, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o hibridación *in situ* pueden demostrar la presencia de determinados organismos con relativa simplicidad. A través de los años, estudios microbiológicos basados en métodos de cultivo y moleculares han identificado alrededor de 700 especies de bacterias en la cavidad oral humana. Más de 400 de estas especies han sido detectadas en el surco periodontal y aproximadamente la mitad de los taxones no han podido ser aun cultivados. (Colombo AP y col., 2009). Especies conocidas como compatibles con un periodonto sano incluyen a los miembros de los géneros *Actinomyces*, *Streptococcus* y *Veillonella* así como especies Gram negativas tales como *Eubacterium* *Peotistreitococcus* y *Lactobacillus* (Ximénez-Fyvie LA y col., 2000).

#### 1 Placa dentobacteriana

El término biofilm o placa dentobacteriana se utiliza para describir las comunidades de microorganismos adheridos a una superficie; tales microbios se organizan generalmente en una estructura especial tridimensional y están encerrados en una matriz de material extracelular (a veces también llamada glucocálix) que deriva tanto de componentes celulares propios así como de su entorno. La investigación en los últimos años ha puesto de manifiesto que las células que crecen como biofilms tienen propiedades únicas, algunas de las cuales son de importancia clínica. (Marsh PD y col., 2009)

Cuadro 1. Géneros de bacterias en cavidad Oral. Tomado de Mars PD (2009).

| Cocci                     | Género                   | Cocci               | Genero                    |
|---------------------------|--------------------------|---------------------|---------------------------|
| <i>Abiotrophia</i>        | <i>Actinobaculum</i>     | <i>Anaeroglobus</i> | <i>Aggregatibacter</i>    |
| <i>Enterococcus</i>       | <i>Actinomyces</i>       | <i>Mega sphaera</i> | <i>Campylobacter</i>      |
| <i>Finegoldia</i>         | <i>Alloscardovia</i>     | <i>Moraxella</i>    | <i>Cantonella</i>         |
| <i>Gemella</i>            | <i>Arcanobacterium</i>   | <i>Neisseria</i>    |                           |
| <i>Granulicatella</i>     | <i>Atopobium</i>         | <i>Veillonella</i>  | <i>Capnocytophaga</i>     |
| <i>Peptostreptococcus</i> | <i>Bifidobacterium</i>   |                     | <i>Centipeda</i>          |
| <i>Streptococcus</i>      | <i>Corynebacterium</i>   |                     | <i>Desulfomicrobium</i>   |
|                           | <i>Cryptobacterium</i>   |                     | <i>Desulfovibrio</i>      |
|                           | <i>Cryptobacterium</i>   |                     | <i>Dialister</i>          |
|                           | <i>Eubacterium</i>       |                     | <i>Eikenella</i>          |
|                           | <i>Filifactor</i>        |                     | <i>Flavobacterium</i>     |
|                           | <i>Lactobacillus</i>     |                     | <i>Fusobacterium</i>      |
|                           | <i>Mogibacterium</i>     |                     | <i>Haemophilus</i>        |
|                           | <i>Olsenella</i>         |                     | <i>Johnsonii</i>          |
|                           | <i>Parascardovia</i>     |                     | <i>Kingella</i>           |
|                           | <i>Propionibacterium</i> |                     | <i>Leptotrichia</i>       |
|                           | <i>Pseudoramibacter</i>  |                     | <i>Methanobrevibacter</i> |
|                           | <i>Rothia</i>            |                     | <i>Porphyromonas</i>      |
|                           | <i>Scardovia</i>         |                     | <i>Prevotella</i>         |
|                           | <i>Shuttleworthia</i>    |                     | <i>Selenomonas</i>        |
|                           | <i>Slackia</i>           |                     | <i>Simonsiella</i>        |
|                           | <i>Solobacterium</i>     |                     | <i>Tannerella</i>         |
|                           |                          |                     | <i>Treponema</i>          |
|                           |                          |                     | <i>Wolinella</i>          |

La placa dental es uno de los Biofilms mejor estudiados, y muestra todos los rasgos característicos de un típica biopelícula. Las bacterias no suelen entrar en contacto con el esmalte limpio. Tan pronto como una superficie de diente se limpia, proteínas y glicoproteínas salivales son adsorbidas formando una película de acondicionamiento de superficie que se denomina película de esmalte adquirida. Los principales constituyentes de la biopelícula son glicoproteínas salivales, fosfoproteínas y lípidos, incluyendo estaterina, amilasa, péptidos ricos en prolina (PRP) y componentes de defensa del huésped. Cuando las moléculas salivales se unen a la superficie del diente, pueden sufrir cambios conformacionales. Esto puede dar lugar a la exposición de nuevos receptores para la adherencia bacteriana. Los microorganismos son generalmente transportados pasivamente a la superficie del diente por el flujo de saliva; algunas especies de bacterias orales son móviles (por ejemplo, poseen flagelos) y estos se encuentran principalmente debajo de la encía. Los microorganismos que son negativamente cargados debido a las moléculas en su superficie celular, se adhieren a los elementos del glucocálix positivamente cargado, formando así la primera capa de bacterias formadoras de placa dental también llamadas primeras colonizadoras (Marsh PD y col., 2009).

La unión estereoquímica irreversible de corto alcance de las células al diente implica las interacciones entre los componentes en la superficie celular microbiana (adhesinas) y los receptores complementarios en la película adquirida. Estas interacciones específicas contribuyen a las asociaciones observadas con frecuencia de ciertos organismos con una superficie o hábitat particular. Una vez unidas, estas poblaciones tempranas comienzan a dividirse y formar microcolonias; estos primeros colonizadores se incrustan en sitios extracelulares bacterianos y polisacáridos, junto con capas adicionales de proteínas y glicoproteínas salivales adsorbidas. Con el tiempo, la microflora de la placa se hace más diversa; hay un alejamiento de la preponderancia inicial de los estreptococos a una biopelícula con el aumento de las proporciones de los géneros *Actinomyces* y otros bacilos Gram positivos. Algunos organismos que eran incapaces de colonizar las superficies de los dientes con recubrimiento pelicular son capaces de unirse a las especies tempranas con interacciones tipo receptor-adhesina. Además, el metabolismo de las comunidades tempranas altera el medio ambiente local y hace que las condiciones se tornen más adecuadas

para el crecimiento de algunas bacterias demandan condiciones particulares (Hasan A y Palmer R, 2014).

Un proceso clave en la sucesión microbiana y la formación de biopelículas es el de la coagregación o coadhesión, que es el reconocimiento de célula a célula de poblaciones celulares genéticamente diferentes, y esta coagregación se produce entre la mayoría de los géneros bacterianos orales. La acumulación de placa temprana se ve facilitada por la coagregación entre especies del género *Streptococcus* y *Actinomyces spp.* El desarrollo posterior de la placa dental implicará más coagregación entre otros géneros de bacterias y los colonizadores primarios resultando finalmente en un agrupamiento complejo de bacterias que hasta la fecha se sigue estudiando ya que el entendimiento del mismo proporciona información de interés para el tratamiento de las enfermedades periodontales (Fig. 2). (Marsh PD y col., 2009).

#### B. ENFERMEDAD PERIODONTAL

El término infección se emplea para referirse a la presencia y multiplicación de microorganismos en el cuerpo. Las infecciones periodontales son un conjunto de enfermedades localizadas en la encía y las estructuras de soporte del diente (ligamento y hueso alveolar), están producidas por ciertas bacterias provenientes de la placa subgingival (Bascones Martinez A y Figuero Ruiz E, 2005).

La enfermedad periodontal es considerada una enfermedad infecciosa-inflamatoria, que de acuerdo al grado de compromiso puede llevar a la pérdida total de los tejidos de soporte del diente. Considerando que la etiología de la enfermedad es principalmente infecciosa, causado por placa bacteriana, el tratamiento se enfoca fundamentalmente en el control de la infección y reducción de la inflamación. Estas bacterias tienen un importante papel en el inicio y posterior desarrollo de la enfermedad periodontal, están involucradas en la aparición de la bolsa periodontal, destrucción del tejido conectivo y reabsorción del hueso alveolar a través de un mecanismo inmunopatogénico (Botero J y Bedoya E, 2010).

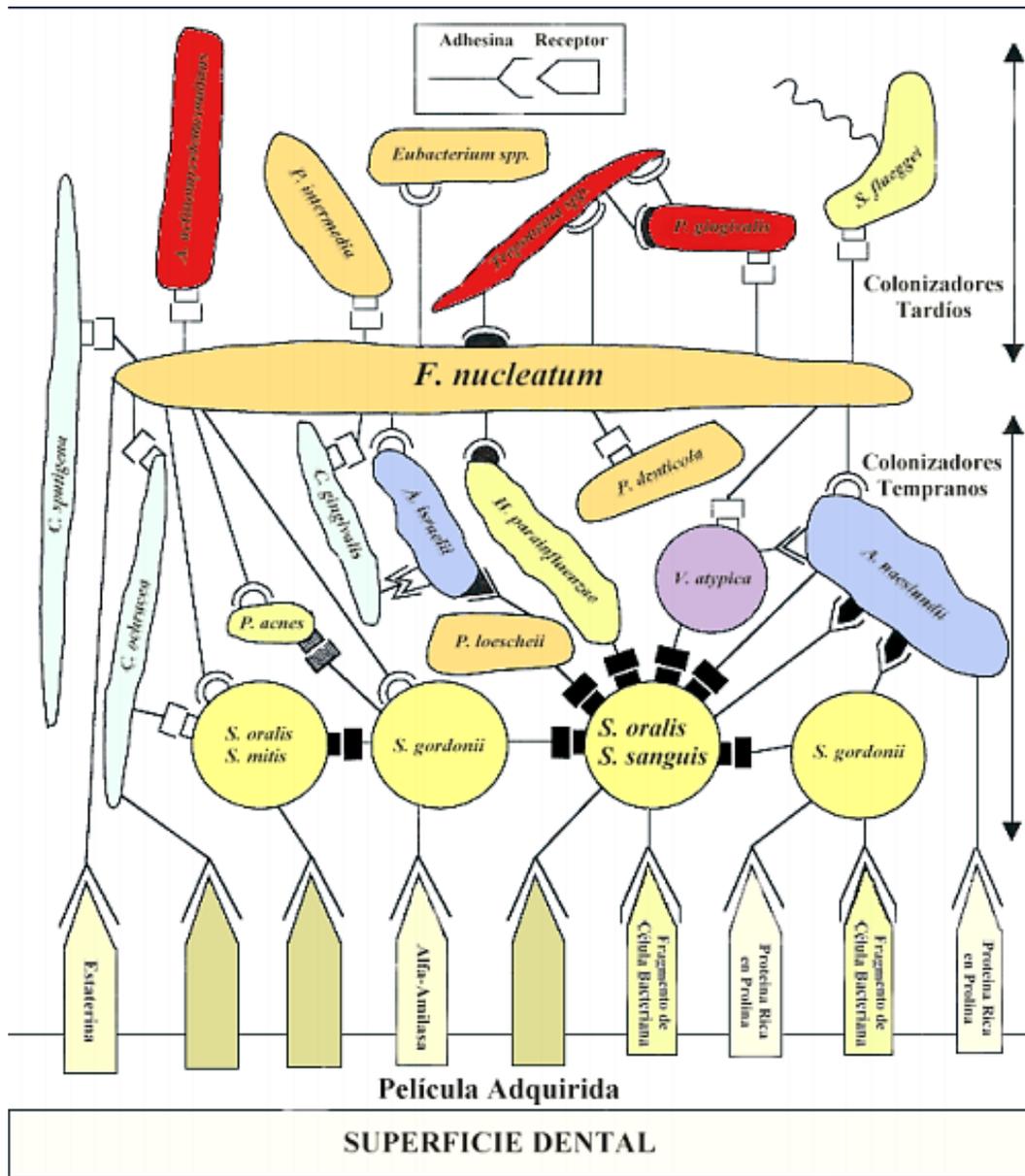


Figura 2. Estructura de placa bacteriana. Tomada de Marsh PD y col. (2009).

Las diversas formas de periodontitis con sus distintas manifestaciones clínicas así como las respuestas al tratamiento, son resultado de diferencias en la etiología microbiana (ya sea diferentes especies o combinación de especies), así como de los factores que modifican los mecanismos de la respuesta del hospedero. Estos últimos incluyen, aunque no están limitados, condiciones sistémicas como diabetes mellitus o un sistema inmunocomprometido, factores hereditarios y múltiples factores ambientales como humo de cigarro o estrés. Estos factores modificadores están dados por las diferencias observadas en varias condiciones periodontales y lo hacen al interferir con la regulación, activación o inhibición de varios componentes de la respuesta del hospedero, la homeostasis y reparación del tejido. Una parte integral y esencial de esta hipótesis y un aspecto bien sustentado por extensivas evidencias es que los componentes de la respuesta del hospedero que normalmente provee protección son justamente los que generan la destrucción del tejido (Page RC y col., 1997).

#### 1. Prevalencia

Las enfermedades periodontales afectan a una gran proporción de la de la población del mundo y se considera un importante problema de salud en los países desarrollados y en desarrollo. Su prevalencia es dependiente de la población estudiada y asume una gran importancia global ya que la población adulta de entre 30 y 70 años es la más afectada en la mayoría de los países. La prevalencia de la enfermedad periodontal estimada en una muestra representativa de población, depende de los criterios usados para el estudio de dicha población La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el uso del Índice de Comunidad Periodontal (ICP) para estudios de prevalencia de modo que los resultados puedan ser comparados en de diferentes poblaciones, por ejemplo, para periodontitis se toma un IPC = 3 cuando el IPC pruebe resultados de entre 3.5 mm y 5.5 mm en al menos uno de los dientes (Williams RC y col., 2008).

La enfermedad periodontal es una de las dos más grandes enfermedades dentales que afectan a la población humana en todo el mundo en altos niveles de prevalencia. La OMS reportó del 10 al 15% de la población mundial sufre de algún tipo de enfermedad periodontal en sus diferentes niveles. En poblaciones asiáticas por ejemplo, se ha observado una prevalencia de 42.5% en enfermedad periodontal siendo Japón el más afectado. Para el caso de norte américa y

en Estados Unidos se estimó una prevalencia del 5% mientras que para Canadá es del 73% para el caso de periodontitis. En países europeos y sur-asiáticos muestran los índices más bajos en enfermedad periodontal presentando prevalencias menores al 3% (Professor A, 2011).

En el año del 2011 la Reviste Odontológica Mexicana reportó un trabajo que se realizó en la Facultad de Odontología de la UNAM en el cual observaron una prevalencia en periodontitis crónica de 67.2% teniendo un porcentaje de dientes afectados en promedio por individuo 55.7%. Los rangos de edad más afectados fueron personas de entre 30 y 90 años. En cuanto a la distribución de géneros, de 394 individuos estudiados el 62.5% fueron del género femenino y el 37.5% masculino (Fives-Taylor PM y col., 1999).

En México existen 355,419 casos de gingivitis y enfermedades periodontales, lo cual se traduce a que el 30% de la población nacional padece de algún tipo de enfermedad periodontal. El 18% lo comprende el género femenino y 11% el masculino. El primero lugar a nivel nacional es del Distrito Federal con 2.63% de los casos, seguido por el Estado de México, Jalisco y Veracruz. Sinaloa ocupa el quinto lugar a nivel nacional en prevalencia de algún tipo de enfermedad periodontal con 1.45% de los casos (Fig. 2). En Sinaloa existen reportados 17,300 casos de enfermedades periodontales, teniendo un total de 58% de los habitantes del cuales 33% son mujeres y el 20% son hombres (Fig. 3)(DGE, 2016).

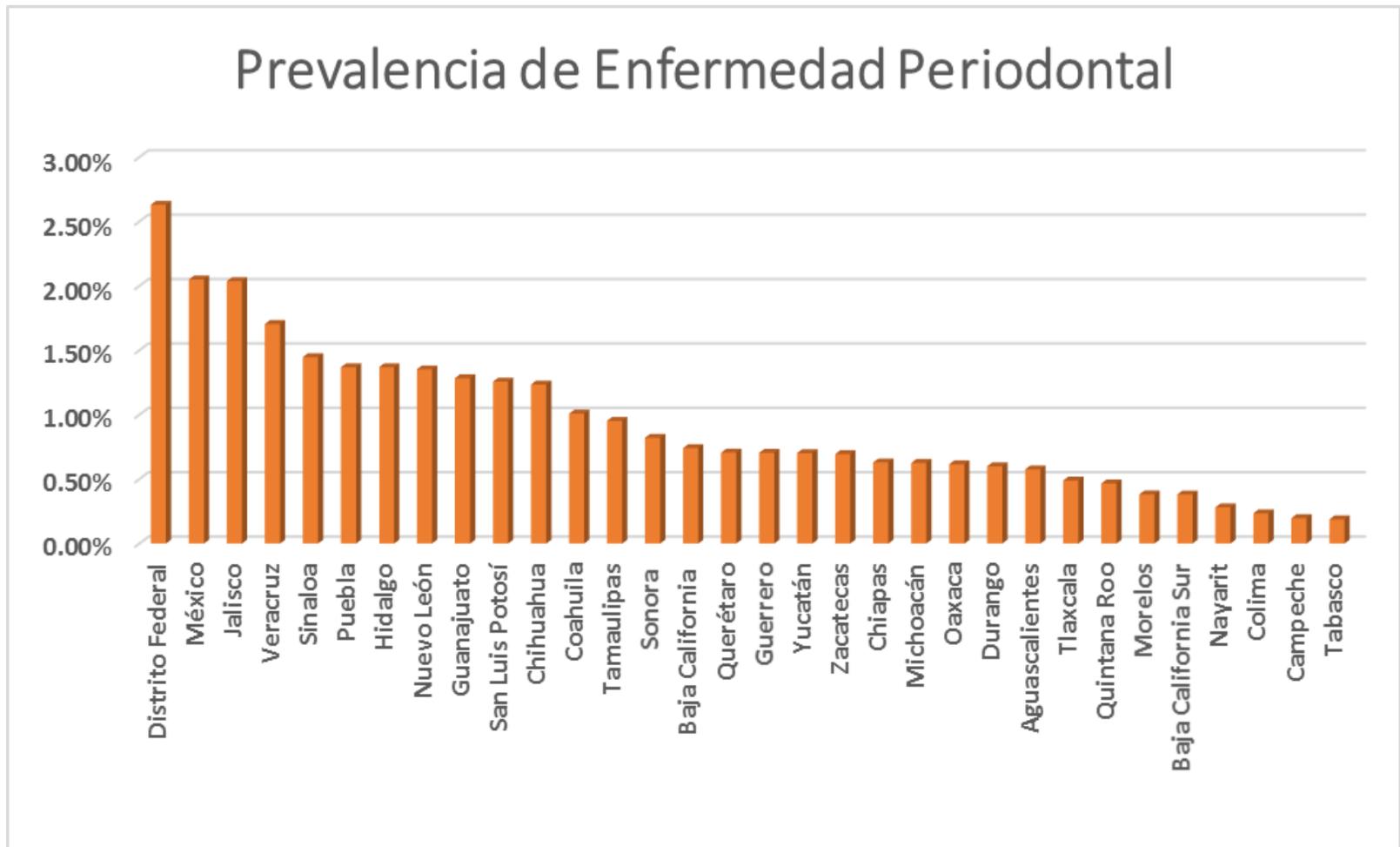


Figura 3. Prevalencia de enfermedad periodontal en México. Elaboración propia.

## 2 Periodontitis

Durante las últimas tres décadas ha habido muchos avances en el entendimiento de la etiología, patogénesis y perpetuación de lesiones inflamatorias desarrolladas en el periápice, dando lugar a periodontitis. La periodontitis es la inflamación de la encía y el periodonto de soporte, afectando de forma significativa el tejido conectivo gingival (TC), ligamento periodontal, cemento y hueso. Como resultado patognomónico observamos inflamación, sangrado al sondaje (SS), formación de la bolsa periodontal, pérdida de inserción y pérdida ósea radiográfica. Estos signos son imperativos para realizar el diagnóstico de periodontitis y marcan una diferencia clara con la gingivitis. Adicionalmente se pueden observar recesiones, supuración, movilidad del diente incrementada, migración dental patológica y dolor. La Federación Europea de Periodoncia (EFP, 2005) define un caso confirmatorio de periodontitis como:  $\geq 2$  sitios independientes con pérdida de inserción  $\geq 3$  mm proximal y formación de bolsa periodontal. Así mismo, la extensión puede ser clasificada como localizada ( $\leq 30\%$  de sitios afectados) y generalizada ( $> 30\%$  de sitios afectados). En cuanto a la severidad de la destrucción periodontal, el único parámetro que muestra la magnitud del daño, es el nivel de inserción clínico (NIC). Por lo tanto, la severidad de la enfermedad puede ser clasificada como leve, moderada y severa dependiendo del grado de pérdida de inserción en un diente en particular, teniendo como referencia la longitud radicular (Botero J y Bedoya E, 2010).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica la periodontitis en cinco principales categorías: periodontitis apical aguda de origen pulpar, periodontitis apical crónica, abscesos periapicales con seno, abscesos periapicales sin seno y quistes radiculares. Estudios basados en diversos criterios incluyendo la distribución de células inflamatorias dentro de la lesión, la presencia o ausencia de células epiteliales, si la lesión ha sido transformada en quiste y se lleva a cabo la relación entre el quiste y la cavidad oral del diente, se da pie a la progresión a periodontitis apical aguda. La periodontitis apical aguda es una inflamación en el tejido periapical y se le llama primaria cuando la duración es corta. Cuando la patogénesis es bacteriana, esta respuesta se puede desarrollar dentro de los abscesos. Es llamada secundaria cuando la respuesta aguda ocurre en una ya existente periodontitis crónica, usualmente presentada en forma de absceso. Por otra parte, la periodontitis crónica apical (granuloma apical) es la inflamación en el diente y es caracterizada

por presentar tejido con granulomas, predominantemente infiltrado con linfocitos, plasma y macrófagos. Estas lesiones pueden dividirse en no especializadas o especializadas (Nair P, 1997).

Los factores modificadores tales como la edad, uso de tabaco, presencia de enfermedades sistémicas, escasa higiene oral pueden afectar la edad de aparición de la enfermedad y la destrucción del hueso, los rangos de progresión de la enfermedad, la respuesta a varios tipos de terapia y la severidad y frecuencia de la recurrencia de la enfermedad. Dado que la periodontitis es una enfermedad infecciosa ocasionada por bacterias y la progresión de dicha enfermedad está determinada por una gran cantidad de factores, es de gran importancia se sigan generando nuevos conocimientos para su prevención, diagnóstico, tratamiento y pronóstico. La periodontitis es una enfermedad infecciosa, y si bien es cierto, las bacterias son esenciales para causar enfermedad periodontal, no son suficientes (Chung WO y An JY, 2012).

Los factores inherentes al hospedero así como los factores ambientales y hereditarios son determinantes para la ocurrencia y severidad de la enfermedad resultante. La interacción de estos factores está bien demostrada gracias a investigaciones recientes que dilucidaron la complejidad de las interacciones en enfermedades multifactoriales e incluyen participación tanto de bacterias específicas como la genética del individuo por ejemplo, trabajos recientes han mostrado que individuos con periodontitis juvenil localizada tienen elevados niveles de inmunoglobulina G2 (IgG2), la cual está genéticamente controlada. Otro factor importante es fumar, lo cual se ha mostrado que después de un tiempo compromete al individuo al desarrollo de enfermedad generalizada mediante la reducción de la respuesta de IgG2. La evidencia demuestra que la aparición y colonización de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* está dada por la combinación de factores genéticos y fumar.

### 3 Etiopatología

La mayoría de los casos de periodontitis son causados por un pequeño número de especies bacterianas. La flora subgingival puede albergar cientos de especies, serotipos y biotipos, los expertos están de acuerdo en que, excepto para periodontitis aguda necrosante, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, son las causantes de la mayoría de los casos de periodontitis (Marsh PD y col., 2009).

Los factores de virulencia bacterianos como liposacárido (LPS) y ácido lipoteicoico entran en contacto con las células epiteliales del surco gingival, (induciendo la producción de defensinas y citocinas proinflamatorias (Dale BA, 2002). Las defensinas son péptidos antimicrobianos que dañan la superficie de las bacterias, permitiendo su eliminación y son de gran importancia para la producción de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , que favorecen la diapédesis y la quimiotaxis. Adicionalmente, estas células producen IL-8, una citocina con actividad quimiotáctica para reclutar neutrófilos. De esta forma, los neutrófilos son atraídos al sitio de la infección, salen de los vasos sanguíneos y se acumulan en el tejido conectivo adyacente al surco alterando su estructura (Nanci A y Bosshardt DD, 2006).

Los neutrófilos se abren paso por los espacios intercelulares del EU y salen al surco donde se degranulan, liberando especies reactivas del oxígeno (ROS) y enzimas como catepsina G, lactoferrina, defensinas, mieloperoxidasas, metaloproteinasas (MMP) y serin proteasas, entre otras. Si bien todos estos mediadores químicos son nocivos para las bacterias, también lo pueden ser para los tejidos periodontales por lo que puede observarse algún daño tisular microscópico. No obstante, el agente infeccioso es controlado en la mayoría de casos, el estímulo disminuye y se establece un balance de la respuesta inmunológica. Después de estimulada la respuesta inmunológica innata, se desencadena la respuesta inmunológica adaptativa y aparecen en el tejido conectivo linfocitos T cooperadores (LT CD4<sup>+</sup>) y linfocitos B (LB), ayudando a resolver el proceso inflamatorio (Kornman KS y col., 2000).

La actuación de linfocitos toma entre cinco y siete días en alcanzar su máxima acción efectora. Por lo tanto, una buena respuesta innata es fundamental para mantener la salud periodontal. Los LT CD4<sup>+</sup> se pueden diferenciar en células efectoras Th1 o Th2. Los CTh1 producen citocinas proinflamatorias como IFN $\gamma$  e IL-2 que promueven una mejor actividad de macrófagos y co-estimulan a los linfocitos B a producir anticuerpos tipo IgG e IgA neutralizantes. El resultado es una respuesta inmunológica que controla los microorganismos que se están acumulando en el surco periodontal, de forma silenciosa y sin signos clínicos inflamatorios evidentes a simple vista. A medida que progresa el proceso de inflamación se vuelve crónico y comienza la degradación de los tejidos de soporte, dando como resultado la formación de la bolsa periodontal, pérdida de inserción y reabsorción ósea que da lugar a la periodontitis (Botero J y Bedoya E, 2010).

#### 4 Microbiología en periodontitis

La composición microbiana de la placa subgingival en sitios con enfermedad periodontal ha sido ampliamente estudiada. Estudios realizados a partir de cultivos tomados de placa subgingival de sujetos con diferentes formas de enfermedad periodontal y de sujetos sanos han reportado han sido claves para entender cómo la microbiota gingival en el periodonto progresan desde tejido sano hasta periodontitis. Estudios en placa subgingival han indicado que existen niveles significativamente elevados de *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* y *Selenomonas noxia* en sujetos con periodontitis. Otros estudios indican que especies similares pueden ser encontradas en placa subgingival de sujetos periodontalmente sanos y sujetos con enfermedad periodontal, pero las proporciones y niveles de especies específicas difieren marcadamente. Estos patógenos periodontales pueden ser encontrados usando estudios con anticuerpos monoclonales para detectar especies específicas en placa supragingival. Se ha observado que existe una tendencia de prevalencia para *A. actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter rectus* y *Prevotella nigrescens* de 33%, 48%, 43% y 100%, respectivamente (Ximénez-Fyvie LA y col., 2000).

#### ■ Complejo rojo

Los recientes avances en el campo de la investigación periodontal son consistentes con un nuevo modelo de la patogénesis de la enfermedad periodontal según la cual, la periodontitis es iniciada por una comunidad microbiana sinérgica y disbiótica llamada el "complejo rojo". La comodidad y el atractivo sobre el concepto del complejo rojo, o cualquier otro código de color conocido, han resultado en la adopción de estos términos como método de explicación para diversos procesos en la enfermedad periodontal. Los organismos del complejo rojo tales como *P. gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella forsythia* se pueden encontrar en la ausencia de enfermedad (Moffatt CE y col., 2011).

Aunque la creencia de que la mayoría de estos organismos patógenos recientemente reconocidos como causales de la enfermedad periodontal aún no han sido completamente estudiados, es evidente que el concepto de un complejo rojo de tres especies como la

representación de la unidad etiológica primaria en periodontitis requiere investigación adicional. No sólo existen más patógenos potenciales a tener en cuenta, pero estos organismos pueden exhibir sinergia polimicrobiana, sin embargo se ha visto que un cambio asociado en la composición de la microbiota periodontal podría tener explicaciones alternativas. Una alteración en la microbiota podría a su vez conducir a cambios en la diafonía huésped- microbio suficiente para iniciar la enfermedad crónica (Hajishengallis G y Lamont RJ, 2012).

La teoría del complejo rojo ha sido mayormente explicada a partir de la coagregación en la cual, se ha sugerido que una estrategia de colonización crítica de los microorganismos orales implica numerosos ligandos y receptores de superficie, lo cuales se ha sugerido instruyen a la construcción de las biopelículas y sus complejos. Se ha reportado principalmente por estudios *in vitro* que *P. gingivalis* produce una serie de moléculas de superficie de membrana así como las estructuras que le permiten interactuar con múltiples especies de la biopelícula, incluyendo los otros miembros de este consorcio, es decir, *T. denticola* y *T. forsythia*. Por lo tanto, *P. gingivalis*, en particular, ha desarrollado múltiples estrategias moleculares para mejorar la continua colonización del huésped a través de la población microbiana, lo que sugiere una selección evolutiva importante para esta especie que, probable tiene papel crítico de la biopelícula patógena (Holt SC y Ebersole JL, 2005).

### ■ Porphyromonas gingivalis

Entre los mayores patógenos periodontales encontramos a *P. gingivalis* que parece ser uno de los principales agentes etiológicos en la patogénesis y progresión de los eventos inflamatorios en la enfermedad periodontal. Esta bacteria ha sido encontrada hasta en un 85.75% en muestras de placa subgingival en pacientes con periodontitis crónica. Es un patógeno asacarolítico, no móvil, Gram negativo, anaerobio facultativo que crece como pequeñas colonias y redondas pigmentadas de negro o café oscuro en agar sangre. *P. gingivalis* está equipada con una amplia gama de características funcionales y estructurales que le permiten colonizar dentro de su nicho ecológico ya sea en el surco gingival o la bolsa periodontal. El hábitat óptimo para *P. gingivalis* es el surco subgingival en la cavidad oral humana lugar donde, se tienen altos niveles de fermentación de aminoácidos para la producción de energía, propiedad requerida para su supervivencia en lo

profundo del surco, donde la disponibilidad de azúcar es baja. Siendo un anaerobio obligado, *P. gingivalis* es un colonizador secundario de placa dental, frecuentemente adhiriéndose a colonizadores primarios como *Streptococcus gordonii* y *Prevotella intermedia*. La bacteria prospera en este entorno hostil evadiendo exitosamente las defensas antimicrobianas del hospedero usando factores de virulencia tales como fimbrias y lectinas tipo adhesinas, una cápsula de polisacáridos y lipopolisacáridos, actividad de hemaglutinación y hemólisis (KahYanHow1 y col., 2016).

*Porphyromonas gingivalis* se adhiere rápidamente a la superficie dental del hospedero seguido de la internalización vía balsas lipídicas e incorporación a fagosomas tempranos. *P. gingivalis* activa la autofagia celular para proveer un nicho replicativo mientras suprime apoptosis. El fagosoma contiene proteínas del hospedero obtenidas por autofagia que son usadas por este asacarolítico patógeno para sobrevivir y se replica dentro de la célula hospedera. Cuando la autofagia es suprimida por 3-metiladenina o wortmanina, la bacteria internalizada transita hacia el fagolisosoma donde es destruida y degradada. Por esa razón, la supervivencia de *P. gingivalis* depende de la activación de autofagia y supervivencia dentro de las células endoteliales del hospedero, pero el mecanismo por el cual *P. gingivalis* logra esto aún no es bien conocido (L. G. Henry y col., 2012).

La capacidad de *P. gingivalis* para causar periodontitis está determinada por su arsenal de factores de virulencia. La formación del biofilm y la enzima dipetidil peptidasa IV (DPPIV) contribuye con el potencial patogénico de *P. gingivalis*. Debido a la formación del biofilm puede potenciar la virulencia de *P. gingivalis* ya que se incrementa la actividad de DPPIV. *Porphyromonas gingivalis* contribuye con la patogénesis en periodontitis agresiva induciendo elevados niveles de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-6 por células T cooperadoras CD4<sup>+</sup>. La periodontitis destructiva está asociada con una respuesta Th1-Th17 y la activación de RANKL que induce osteoclastogénesis y una respuesta posterior de linfocito T de memoria. Por otra parte, concentraciones salivares de metaloproteinasa elevadas MMP-8, IL-1 $\beta$  y la presencia de *P. gingivalis* han sido asociados con bolsas periodontales y pérdida de hueso alveolar junto con sangrado al sondeo (KahYanHow1 y col., 2016).

## ■ Tannerella forsythia

*Tannerella forsythia* es otra especie ampliamente encontrada en enfermedad periodontal dada su asociación con *P. gingivalis*, ya que esta última presenta proteasas que *T. forsythia* carece, éstas proteasas promueven la generación de respuestas inmunológicas e inflamatorias y pueden degradar varias proteínas del tejido conectivo, lo cual ña bacteria lo utiliza para obtener energía y abrirse paso al interior de la bolsa periodontal (N. Suzuki y col., 2012). *T. forsythia* está clasificada dentro del grupo *Bacteroides*, presenta morfología cilíndrica fusiforme, anaerobia estricta y es una bacteria Gram negativa.

Dada su fisiología asacarolítica, *T. forsythia* requiere péptidos y aminoácidos libres para su crecimiento y para ello cuenta con al menos dos enzimas proteolíticas identificadas por desempeñar funciones en la degradación de las proteínas del huésped, obteniendo así los aminoácidos esenciales y péptidos para su crecimiento. Además, estas proteasas contribuyen a la virulencia bacteriana de múltiples maneras, tales como la degradación de los tejidos periodontales del huésped, la degradación de las enzimas así como modificando las proteínas de la célula huésped para exponer epítopes para la colonización bacteriana, escindir componentes involucrados en inmunidad innata (citocinas/quimiocinas y factores del complemento) y en la inmunidad adaptativa (inmunoglobulinas). Por ejemplo, la tripsina tipo proteasa se centra principalmente en la degradación de las proteínas del huésped en péptidos más pequeños y probablemente no juega ningún papel en la virulencia a diferencia de la proteasa PrtH que tiene la capacidad de escindir sustratos de proteína de mayor tamaño, así como para funcionar como un factor de desprendimiento (causando que las células adherentes se desprendan del sustrato) y posteriormente inducir la producción de quimiocina IL-8, quimiocina para neutrofilos forma importante de esta proteína se llama FDF (factor de desprendimiento de forsythia). Funciona en el desprendimiento de células y está implicado en la desintegración del tejido sub-gingival, aunque todavía queda mucho por estudiar sobre los mecanismos de cómo FDF interfiere con la adhesión celular (Sharma EMaA, 2011)

Otra proteína importante en la patogénesis de *T. forsythia* es BspA es una proteína que se encuentra en la superficie celular y es secretada posteriormente. Algunos estudios han mostrado

que esta proteína se une a los componentes extracelulares como fibronectina y fibrinógeno siendo así necesaria para la adherencia e invasión dentro de las células epiteliales del huésped. BspA también juega un papel importante en inflamación induciendo la producción de citocinas proinflamatorias por los monocitos y de quimicinas por las células epiteliales. La secreción de citocinas requiere la activación de receptores tipo Toll (TLR2) en las células del huésped. En adición, esta proteína ha demostrado ser mediadora de la adherencia bacteriana e invasión de las células epiteliales gingivales (Izard ACRTJ, 2006).

### ■ Treponema denticola

Múltiples investigaciones han demostrado la importancia de los treponemas bucales, incluido *T. denticola*, en la progresión de las enfermedades periodontales. Durante los períodos de salud bucal el número y la distribución de estos tipos de bacterias son bajos o casi indetectables. Sin embargo, durante la gingivitis y la progresión hacia la periodontitis existe un gran aumento en su número, proporción de la población total y diversidad de especies. Es una bacteria Gram negativa, anaerobia estricta de gran movilidad que interactúa con otras especies bacterianas bucodentales, especialmente *P. gingivalis* y *F. nucleatum* ayudándolas en su adhesión y la formación de la placa dental. Esta espiroqueta muestra numerosas propiedades que aumentan su capacidad para interactuar con el tejido del hospedero y contribuir en la modificación del entorno inflamatorio de las zonas periodontales infectadas. Esta especie tiene algunas propiedades fisiológicas que le permiten socavar las moléculas protectoras anfitrionas, y alterar las funciones celulares del hospedero proporcionando un micro entorno que podría considerarse mucho más hospitalario para la expansión de una microbiota anaerobia y fisiológicamente exigente menos hostil (Marcotte H y Lavoie MC).

El desarrollo de infecciones bacterianas en las mucosas depende de la capacidad del agente causal para adherirse a las células y tejidos de la mucosa. Por otra parte, si se produce la invasión bacteriana de la mucosa, la motilidad bacteriana resulta una importante herramienta para el patógeno. *T. denticola*, al igual que otras cepas de treponemas, ha demostrado que se adhiere a las células del huésped y las proteínas de la matriz a través de restos de proteínas y factores de virulencia tales como una peptidasa asociada a membrana externa, proteinasa de tipo

quimiotripsina y tripsina, actividad hemolítica y hemaglutinante, adhesinas que se unen a proteínas de la matriz extracelular y una proteína de envoltura externa con propiedades formadoras de poros (Sela MN, 2001).

### ■ *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) es un cocobacilo Gram negativo no móvil que crece normalmente en pares o en pequeños grumos y es frecuentemente descrita como anaerobia facultativa, microaerofílica y capnofílica. Es una bacteria no hemolítica, oxidasa y catalasa positiva con habilidad fermentativa, la cual utiliza galactosa, dextrina, maltosa, manitol y xilosa para producir energía, esta habilidad permite diferenciar este organismo de otras especies presentes en la flora oral. Aa crece óptimamente en presencia de 5% CO<sub>2</sub> y a 37°C tiene un rango de pH óptimo de 7.0 a 8.0 (Harano K y col., 1995).

Evidencia en la literatura apoya la hipótesis que Aa es uno de los organismos clave de la patogénesis en donde la periodontitis y ocasionalmente también es responsable de infecciones no orales incluyendo endocarditis, bacteremia, pericarditis, septicemia, neumonía, artritis infecciosa, osteomielitis, sinovitis, infecciones de la piel, infecciones en tracto urinario y abscesos. El hábitat natural para Aa es la cavidad oral humana y en otros mamíferos lugar donde se ha aislado desde un rango de sitios incluyendo placa supragingival, placa subgingival, saliva, mucosa papilar, mucosa oral, gingiva, lengua (superficies dorsales y laterales), paladar y amígdala, lugares donde logra colonizar gracias a que se adhiere a otras bacterias ya presentes, a la superficie del diente o bien a matrices extracelulares y las células del hospedero. Una característica importante de Aa es su ultra estructura de superficie la cual incluye fimbrias, vesículas y material amorfo extracelular y la expresión de estos componentes parece ser la forma en la que esta bacteria logra colonizar un gran rango de hábitats (Henderson B y col., 2003).

Al inicio de una infección en cavidad oral, Aa debe unirse a la matriz extracelular, la cual es una compleja red de proteínas y polisacáridos que son secretados por las células epiteliales y endoteliales adyacentes y que se encuentran alrededor del tejido conectivo. Una vez adherida al tejido, Aa junto con el complejo rojo microbiano generan progresivamente reabsorción del tejido conectivo y conjuntivo para posteriormente dar paso a pérdida de hueso del diente, la cual es una

de las características más notables en periodontitis. Se ha demostrado en estudios anteriores que Aa estimula la reabsorción de hueso por diferentes mecanismos por ejemplo; lipopolisacáridos, factores de proteólisis acarreados en microvesículas y material asociado a la superficie celular. Material asociado a superficie ha sido recientemente identificado como una chaperona molecular llamada GroEL (Fives-Taylor PM y col., 1999).

#### ■ *Prevotella intermedia*

*Prevotella intermedia* es una bacteria anaerobia estricta Gram negativa, inmóvil y anaerobia estricta. Cuenta con varios de factores de virulencia tales como proteasas que degradan inmunoglobulinas, fimbrias que participan en la agregación y coagregación bacteriana y metabolitos tóxicos, los cuales se cree degradan las células del hospedador por contacto (Haraldsson G, 2005).

*P. intermedia* es conocida como un microorganismo comensal presente en bajas proporciones en personas sanas, sin embargo cuando su cantidad se eleva puede dar pie a la formación de periodontitis, gingivitis, abscesos periodontales y periapicales. Además producen gingivitis en embarazadas debido a que estas bacterias degradan hormonas que se sintetizan en el embarazo, un ejemplo es la disbiosis de un ecosistema oral ya que las hormonas del embarazo inducen el crecimiento excesivo de algunas especies del ecosistema del surco gingival. La acción nociva de esas bacterias induce, a su vez, una respuesta inflamatoria (gingivitis de la embarazada) que cesa reversible cuando desaparece la causa (las hormonas del embarazo). Estas bacterias son de hábitat anaerobio, es por esto que regularmente se encuentran en el surco gingival, formando parte de la placa subgingival (Haraldsson G, 2005).

#### ■ *Streptococcus mutans*

*Streptococcus mutans* es una bacteria en forma de coco Gram positiva. Estos anaerobios facultativos se encuentran comúnmente en la cavidad oral humana, y es un importante contribuyente de la caries dental. Es un microorganismo cariogénico que descompone el azúcar, sobre todo manitol y sorbitol para obtener energía y produce un entorno ácido, que desmineraliza la estructura superficial del diente. El resultado es que se desintegra el recubrimiento del diente y

luego se disuelve la molécula de calcio creando un agujero. Posee tres factores de virulencia: glicanos insolubles en agua, la producción de ácido láctico y es ácido tolerante (Simon L, 2007).

Una forma importante de transmisión de *S. mutans* durante los primeros años de vida es la que se produce de madre a hijo por contacto directo (transmisión vertical), mientras que el contacto con otros familiares, incluidos el padre, los hermanos y demás cuidadores constituye otra vía de transmisión (transmisión horizontal) que cobra importancia durante edades posteriores. Una característica importante de *Streptococcus mutans* es la persistencia de sus genotipos en la cavidad oral de adultos, adolescentes y niños mayores de cinco años. Este fenómeno es conocido como persistencia "intraindividual" y revela la relativa estabilidad que éstos alcanzan en el hospedador y la relación con la expresión de características fenotípicas que les pueden dar ventajas para la supervivencia, como la capacidad de formar biopelículas, de adherirse y soportar fluctuaciones del pH. (Ojeda-Garcés JC y col., 2013)

a pared celular de *S. mutans* contiene cuatro polímeros antigénicos importantes: peptidoglicanos, polisacáridos específicos, proteínas ancladas y glicerol que forma parte de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos. La adherencia de *S. mutans* a la superficie del diente y la formación de placa dental son cruciales para el desarrollo de caries dental. Este complejo proceso involucra una variedad de componentes y bacterias del hospedero. El anclaje de la bacteria a la superficie del diente es usualmente seguido por la formación de una biopelícula formada por los componentes lipídicos y proteicos de la saliva. Una vez detectada la presencia de *S. mutans* la superficie del diente, se observan anticuerpos presentes en el suero y saliva con predominio de IgA. (Hamada S y Slade HD, 1980)

#### ■ Respuesta del hospedero

Varios mecanismos operan en el entorno del diente para defenderse ante la infección microbiana y prevenir el desarrollo de la periodontitis. Hay una fuerte evidencia de que en algunos individuos y bajo ciertas circunstancias, los patógenos periodontales pueden estar presentes y manifestarse clínicamente como enfermedad periodontal. La intacta barrera epitelial de la gingiva, surco gingival y epitelio de unión normalmente impiden la invasión bacteriana de los tejidos periodontales y normalmente son una barrera eficaz contra la penetración de los productos y

componentes bacterianos. Secreciones salivales proporcionan un lavado continuo de la cavidad oral y proporcionan un suministro continuo de aglutininas y anticuerpos específicos que se pueden agregar y eliminar a las bacterias. El tejido crevicular constantemente inyecta el surco o bolsa periodontal con todos los componentes de la sangre y el suero incluyendo proteínas del complemento y antibióticos específicos lo cuales hacen frente a la flora bacteriana subgingival. Una larga población de células B y plasma que se acumulan en la pared del surco o la bolsa periodontal producen anticuerpos que pueden ser específicos para antígenos bacterianos y pueden osonizarlas para ser fagocitadas y finalmente destruidas. El tejido conectivo gingival consiste de una alta cantidad de fibras de colágeno, prostaglandinas y suero derivado de ciertos componentes como la albumina. Algunas fibras de elastina también pueden estar presentes (Kornman KS y col., 1997).

Si la gingiva está sana, las bacterias llamadas colonizadoras tempranas de la superficie del diente son usualmente encontradas en el margen gingival. La comunidad microbiana genera grandes cantidades de metabolitos que pueden difundir al epitelio de unión. Los metabolitos pueden ser lípidos tales como ácido butírico y ácido propionico que son tóxicos para el tejido. Estos y otros mediadores proinflamatorios sintetizados por el epitelio de unión tales como IL1, prostaglandina E<sub>2</sub> y metaloproteasas de matriz, pueden atravesar el epitelio de unión y entrar al tejido conectivo. El epitelio de unión es el primer tejido que se ve primeramente alterado por las bacterias. Células a través del tejido en contacto con el epitelio de unión en el surco gingival, contienen lisosomas ácido-fosfato positivo y manifiesta evidencia de fagocitosis de los neutrófilos a bacterias.

## 5 Antecedentes

En Latinoamérica, Brasil es el país con mayor desarrollo científico sobre enfermedad periodontal. Para el año del 2015 reportaron que las bacterias del complejo rojo se encontraron en una proporción del 58% para el caso de periodontitis, 37% en gingivitis y un 15% en individuos sanos, siendo *Porphyromonas gingivalis* la bacteria que se observó más elevada en un 89% en pacientes con periodontitis, 30% en gingivitis y 8% en individuos sanos. (Contreras A y col., 2015)

En el año del 2011 la Reviste Odontológica Mexicana reportó un trabajo que se realizó en la Facultad de Odontología de la UNAM en el cual observaron una prevalencia en periodontitis crónica de 67.2% teniendo un porcentaje de dientes afectados en promedio por individuo 55.7%. Los rangos de edad más afectados fueron personas de entre 30 y 90 años. En cuanto a la distribución de géneros, de 394 individuos estudiados el 62.5% fueron del género femenino y el 37.5% masculino (Fives-Taylor PM y col., 1999).

Padilla y colaboradores en el 2006, aislaron e identificaron bacterias de las bolsas periodontales de diferentes pacientes para posteriormente compararlos con los microorganismos detectados en las placas de ateroma obtenidos de los mismos pacientes. De los 12 pacientes estudiados, nueve presentaron diferentes especies bacterianas periodontopáticas. En dos, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* se encontraba presente en las bolsas periodontales y las respectivas placas de ateroma. Se concluyó que la presencia de *A. actinomycetemcomitans* en placas de ateroma y las bolsas periodontales de los mismos pacientes podría indicar un papel importante para las bacterias patógenas periodontales en el proceso de la enfermedad (Padilla C y col., 2006).

Un estudio realizado por Botero y col. en 2007 en población colombiana, describió los parámetros clínicos y la composición de la microbiota subgingival en periodontitis crónica (CP) y periodontitis agresiva (AGP). Utilizando parámetros clínicos (profundidad de sondaje, nivel de inserción clínica, sangrado al sondaje y el índice de placa), cultivos de muestras de placa de 68 CP, 12 AGP, y 30 sujetos sanos demostraron que existe una alta prevalencia de *P. gingivalis*, *T. forsythensis* y *E. corrodens* en pacientes con AGP. También se observaron Bacilos gramnegativos entéricos frecuentes en pacientes AGP y CP. Se concluyó que las diferencias en la composición de la microbiota subgingival en pacientes con periodontitis deben tenerse en cuenta para proporcionar el mejor enfoque terapéutico para cada individuo, incluyendo el uso de antibióticos (Botero JE y col., 2007).

Por otra parte, Fine y col. en el 2013, realizaron un estudio para conocer si *A. actinomycetemcomitans*, *Parasanguinis Streptococcus* y *Filifactor alocis* estaban presentes durante el avance de la enfermedad en sitios subgingivales que desarrollan la enfermedad, ya que

se sabe que a *A. actinomycetemcomitans* (Aa) es necesaria pero no suficiente para el desarrollo de periodontitis agresiva localizada LAP (Fine DH y col., 2013). Específicamente, sus resultados indicaron que aquellos individuos que albergan *A. actinomycetemcomitans* en conjunto con *S. parasanguinis* y *F. alocis* son propensos a desarrollar la pérdida de hueso, mientras que los sujetos con los sitios que albergan *A. actinomycetemcomitans* son mucho menos propensos a desarrollar dicha pérdida (Fine DH y col., 2013).

En 2013 Kistler y col. realizaron un estudio experimental longitudinal en gingivitis, así como pirosecuenciación de alto rendimiento de 16S rRNA y métodos de cultivo no selectivos para caracterizar exhaustivamente las comunidades bacterianas en la placa durante la transición de la salud a la gingivitis inducida experimentalmente. Además, las muestras de placa de un grupo de pacientes con periodontitis severa fueron secuenciadas como una comparación transversal a la cohorte saludable. Con estos análisis intentaron identificar los taxones bacterianos específicos asociados a la salud periodontal y las etapas iniciales de la gingivitis (Kistler JO y col., 2013). Los resultados de este estudio demostraron que, en ausencia de higiene oral, la transición de la salud periodontal a la gingivitis se acompaña de un cambio en la estructura de la comunidad bacteriana de la placa y un aumento de la diversidad de la comunidad bacteriana. Además, los resultados demostraron diferencias significativas tanto en la composición y estructura del tejido sano y muestras de placa de individuos con periodontitis crónica.

Un estudio realizado por Xiuchun Ge en el 2013, se analizaron comunidades microbianas orales en pacientes con enfermedad periodontal. Se tomaron y secuenciaron muestras bacterianas de áreas con relativa salud periodontal (bolsas de 3 mm o menos) y de las zonas de afectación de (mayor que 5 mm) en pacientes adultos con periodontitis crónica. Las bacterias se caracterizaron y clasificaron usando pirosecuenciación de los genes 16S rRNA. Sus resultados arrojaron nuevos conocimientos sobre la relación entre el microbioma oral y la enfermedad periodontal y se observó que las bacterias dominantes fueron *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacterium*, *Bacteroidetes* y *Spirochaetes* en pacientes con periodontitis. Éste estudio también reveló que *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria* mostraron reducciones significativas en los individuos sanos mientras que *Bacteroidetes* y *Spirochaetes* se mantienen constante (Ge X y col., 2013).



#### IV HIPÓTESIS

Las bacterias más comúnmente encontradas en Periodontitis son *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans* y *Streptococcus mutans* e influyen directamente con la progresión de la enfermedad periodontal.

#### V JUSTIFICACIÓN

Con base en las características microbiológicas y etiopatológicas de la periodontitis, es evidente que se cuenta con bastante información en cuanto a población bacteriana bucal se refiere, sin embargo se tiene un escaso entendimiento de las bacterias relacionadas con periodontitis específicamente en las regiones supragingival y subgingival así como la carga bacteriana presente en los diferentes estadios de dicha patología. Es por esto que el presente estudio pretende identificar algunas las bacterias involucradas con la periodontitis así como su cuantificación.

## VI OBJETIVOS

### B. OBJETIVO GENERAL

Identificar las bacterias periodontales presentes en placa dental de pacientes con periodontitis e individuos sanos.

### C. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar y cuantificar a la bacteria *Porphyromonas gingivalis* en Periodontitis e individuos sanos.
2. Identificar y cuantificar a la bacteria *Tannerella forsythia* en Periodontitis e individuos sanos.
3. Identificar y cuantificar a la bacteria *Treponema denticola* en Periodontitis e individuos sanos.
4. Identificar y cuantificar a la bacteria *Prevotella intermedia* en Periodontitis e individuos sanos.
5. Identificar y cuantificar a la bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en Periodontitis e individuos sanos.
6. Identificar y cuantificar a la bacteria *Streptococcus mutans* en Periodontitis e individuos sanos.
7. Determinar la asociación entre carga bacteriana y severidad de la enfermedad periodontal.

## VII MATERIALES Y MÉTODOS

### D. MATERIAL

Se tomaron muestras de placa dental de las regiones supragingival y subgingival de cada grupo de estudio. El grupo 1 fueron personas sin enfermedad periodontal. El grupo 2 fueron pacientes con periodontitis crónica. Las muestras fueron recolectadas en la Clínica de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Sinaloa, posteriormente fueron procesadas en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas.

Se tomaron 30 muestras por cada grupo por medio de un muestreo no probabilístico consecutivo cuyos criterios de análisis fueron los siguientes:

#### 1 Criterios de inclusión

En el estudio fueron incluidas las muestras de individuos mexicanos sin importar el género con un rango de edad de 18 a 60 años, que hayan firmado la carta de consentimiento informado y que cumplieron con los siguiente criterios: 1) Sano (sujeto libre de enfermedad periodontal que haya acudido a realizarse alargamiento de corona o extracción molar); 2) Paciente con periodontitis crónica (sujeto diagnosticado por un periodontista).

#### 2 Criterios de exclusión

Se excluyeron las muestras de personas con diabetes, condiciones autoinmunes, tabaquismo, alcoholismo, anomalías de la glándula tiroides, enfermedades cardiovasculares, ciclo menstrual presente o embarazo; también fueron excluidos del estudio aquellas personas que tuvieron tratamiento antibiótico y/o antiinflamatorio tres días previos a la toma de la muestra, que hayan consumido alimentos 2 horas antes de la toma de muestra y los que no firmaron la carta de consentimiento informado.

#### 3 Criterios de eliminación

Fueron omitidas las muestras insuficientes, mal tomadas o con error en el procedimiento de laboratorio.

#### 4 Expedientes

Fueron elaborados expedientes de los sujetos de estudio, se realizó un cuestionario que contiene datos generales del paciente, por ejemplo si padecen o no de enfermedades sistémicas o si tienen algún tipo de tratamiento farmacéutico. La historia clínica detalla el estado de las piezas dentales, tratamiento odontológico previo, sangrado gingival, frecuencia de higiene oral y uso de auxiliares de la misma. Se realizaron exámenes bucales a los sujetos, los cuales constan de exploración de labios, piso de la boca, paladar, mucosa vestibular, glándulas salivales y lengua. También se efectuaron como el odontograma y el periodontograma.

#### 5 Diagnóstico de los sujetos de estudio

El diagnóstico fue realizado por periodoncistas certificados adscritos a la Clínica de la Facultad de Odontología, con base a la exploración oral, sondeo y profundidad de bolsa periodontal. La enfermedad fue diagnosticada con base en el índice gingival modificado con los siguientes criterios (Lobene RR, 1986): 0, ausencia de inflamación; 1, Inflamación leve (leve cambio de coloración, poco cambio en la textura de alguna porción pero no de toda la encía marginal y papilas gingivales); 2, Inflamación leve general (criterios como los anteriores pero abarca toda la encía marginal y papilas gingivales); 3, Inflamación moderada (encía brillante, con enrojecimiento, edema o hipertrofia de la encía marginal y papilas gingivales); 4, Inflamación severa (marcado enrojecimiento, edema, hipertrofia de la encía marginal y papilas gingivales, sangrado espontáneo, congestión y/o ulceración).

La salud gingival fue medida en 6 órganos dentales índices (16, 12, 24, 36, 32 y 44) usando el índice modificado de gingivitis se evaluaron 6 superficies de cada órgano dental (distal, centro y mesial de cara vestibular/bucal y distal, centro y mesial de la cara palatina/lingual), el cual se obtuvo sumando las escalas y dividiendo por el número de dientes examinados.

Los casos más severos fueron determinados por los índices de profundidad de bolsa periodontal y por el índice de pérdida de inserción (Armitage GC, 1999) con profundidad del surco >3 mm. Se clasificó con base en su extensión y severidad (Mittal V, Bhullar, R. P., Bansal, R., Singh, K., Bhalodi, A., Khinda, P. K., 2013): extensión incidental (un diente afectado), localizada (2-7 dientes afectados) y generalizada (más de 7 dientes afectados). Severidad media (pérdida ósea

<1/3 de superficie radicular), moderada (pérdida ósea >1/3 y < 2/3 de superficie radicular) y severo (pérdida ósea > 2/3 de superficie radicular).

La profundidad de bolsa se evaluó con una sonda periodontal de Michigan graduada en milímetros (0 a 10).

Se insertó la sonda de forma paralela al eje axial del diente desplazándola por toda la circunferencia de la superficie de los dientes midiendo la profundidad desde el borde marginal libre de la encía hasta el fondo del surco gingival. La pérdida de inserción clínica se obtuvo midiendo la distancia a partir de la unión epitelial hasta la unión cemento-esmalte. La cantidad de hueso alveolar reabsorbido se evaluó con radiografías.

## 6 Obtención de las muestras

La muestra de placa dental fue tomada con una cureta gracey (Hu friedy) tomando primeramente placa de la región supragingival haciendo un raspado ligero en la superficie de los dientes, posteriormente se limpiaba dicha superficie con una gasa para hacer la toma de placa subgingival la cual se extrae introduciendo la cureta entre la encía y el diente alrededor de 2 ml. Las muestras fueron colocadas en tubos Eppendorf 1.7 mL con PBS 1X estéril y transportadas al laboratorio para posteriormente ser procesadas.

## 7 Consideraciones éticas

El protocolo fue aprobado por el Comité de ética del Posgrado en Endodoncia de Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Sinaloa, en diciembre del 2013 (se anexa carta del comité).

Se dio información y explicación de forma verbal y por escrita a los pacientes, acerca del propósito, las ventajas y desventajas del estudio, y se pidió que firmaran la Carta de Consentimiento Informado si están de acuerdo a procedimiento.

Las evaluaciones periodontales, así como la toma de muestras de placa dentobacteriana y biopsia gingival se realizaron respetando las normas del Comité de Investigación y de acuerdo a las medidas de control de infecciones de la NOM-013-SSA2.

El historial clínico de los pacientes y los resultados obtenidos son confidenciales.

El desecho de las muestras se realizó por medio de una compañía especializada, contratada permanentemente por la Facultad de Ciencias Químico Biológicas.

## E. METODOLOGÍA

### 8 Estandarización

Se logró estandarizar la técnica de extracción de ADN genómico bacteriano a partir de un protocolo modificado (Imagen 4).

Se estandarizaron las condiciones de PCR y termociclado para cada una de las bacterias verificando una amplificación correcta con sus pesos moleculares específicos. (Figura 5).

Se realizaron curvas para cuantificación absoluta en PCR tiempo real para cada una de las bacterias resultando de la siguiente forma: *P. gingivalis* mostró una  $T_m = 85.5$  con una  $r^2 = 0.998$  (Imagen 6), *S. mutans* mostró una  $T_m = 83.0$  con una  $r^2 = 0.972$  (Figura 7), *P. intermedia* mostró una  $T_m = 87.5$  con una  $r^2 = 1$  (Figura 8), *T. denticola* con una  $T_m = 87.5$  con una  $r^2 = 0.985$  (Figura 9), *T. forsythia* mostró una  $T_m = 76.0$  con una  $r^2 = 0.996$  (Figura 10) y *A. actinomycetemcomitans* con una  $T_m = 80.5$  y una  $r^2 = 0.994$  (Figura 11).

### 9 Identificación molecular de bacterias periodontales.

Las muestras de placa dentobacteriana se emplearon para obtener ADN genómico a partir de un protocolo modificado para extracción de ADN genómico bacteriano. Las bacterias fueron lisadas con una solución que contiene Mutanolisina [0.1mg/ml], Proteinasa K [1u/mg] Buffer de lisis celular [1X] y Solución de Oho [1X]. Las proteínas se precipitan con acetato de amonio [3M] y el ADN con isopropanol. El ADN fue purificado con fenol cloroformo alcoholisopropílico, secado y resuspendido en Buffer TE. La concentración y la integridad del DNA fueron evaluadas por espectrofotometría (Thermo Electron) y electroforesis en geles de agarosa al 1.5% respectivamente.

### 10 Amplificación genética

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) con el método descrito anteriormente por nuestro grupo de investigación (Aguilar-Medina M y col., 2010). Los iniciadores específicos para las bacterias de estudio se enlistan en la tabla 2. Se usó una mezcla

de reacción con buffer de reacción 1X, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 μM de dNTP's, 0.1 μM de cada iniciador, una unidad de *Taq* polimerasa y 50 ng de DNA, y se sometieron al protocolo de amplificación conformado por 30 ciclos de un minuto a 95° C, un minuto a 56° C y un minuto y medio a 72° C en un termociclador MiniOpticon Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). La especificidad de la reacción se verificó al finalizar la PCR mediante una curva de disociación. Finalmente se realiza una cuantificación absoluta interpolando los Cts en una curva de cuantificación con 5 órdenes de magnitud (Aguilar-Medina M y col., 2010).

## 11 Análisis estadístico

Los datos de las variables cuantitativas fueron representados como su media  $\pm$  SD, y las diferencias entre los grupos fueron evaluadas mediante la prueba T student. Para los datos categóricos, los porcentajes se tabularon y graficaron y las diferencias se evaluaron mediante la prueba  $\chi^2$  o la exacta de Fisher (Aguilar-Medina M y col., 2010). Un valor de  $p \leq 0.05$  fue considerado como significativo para todas las pruebas. Para todos los análisis se utilizó el programa IBM SPSS v20.0 (IBM SPSS inc., Chicago, IL).

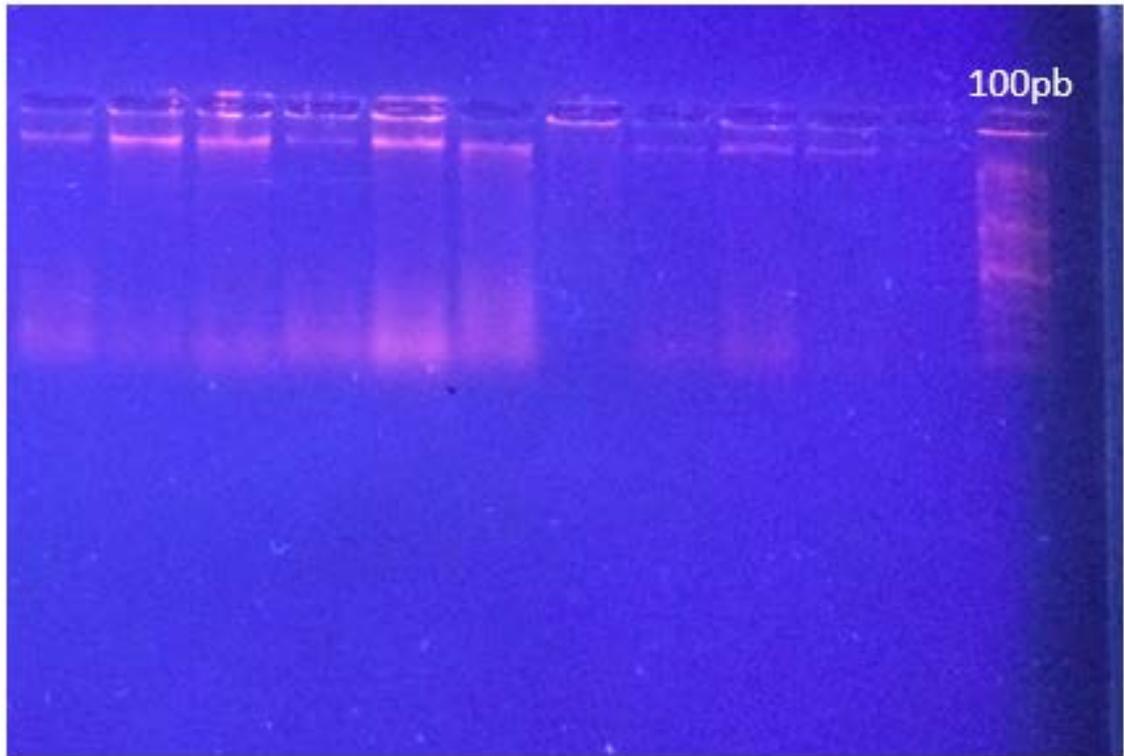


Figura 4. Integridad de ADN genómico bacteriano. Gel de agarosa 1.5%.

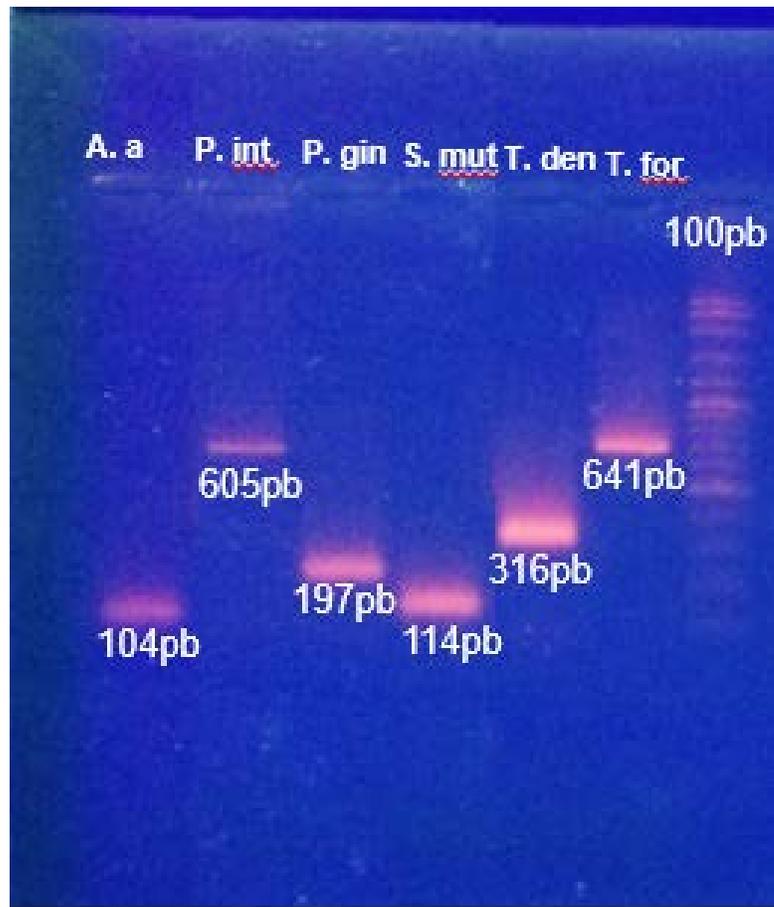


Figura 5. Verificación de amplificación bacteriana por PCR.

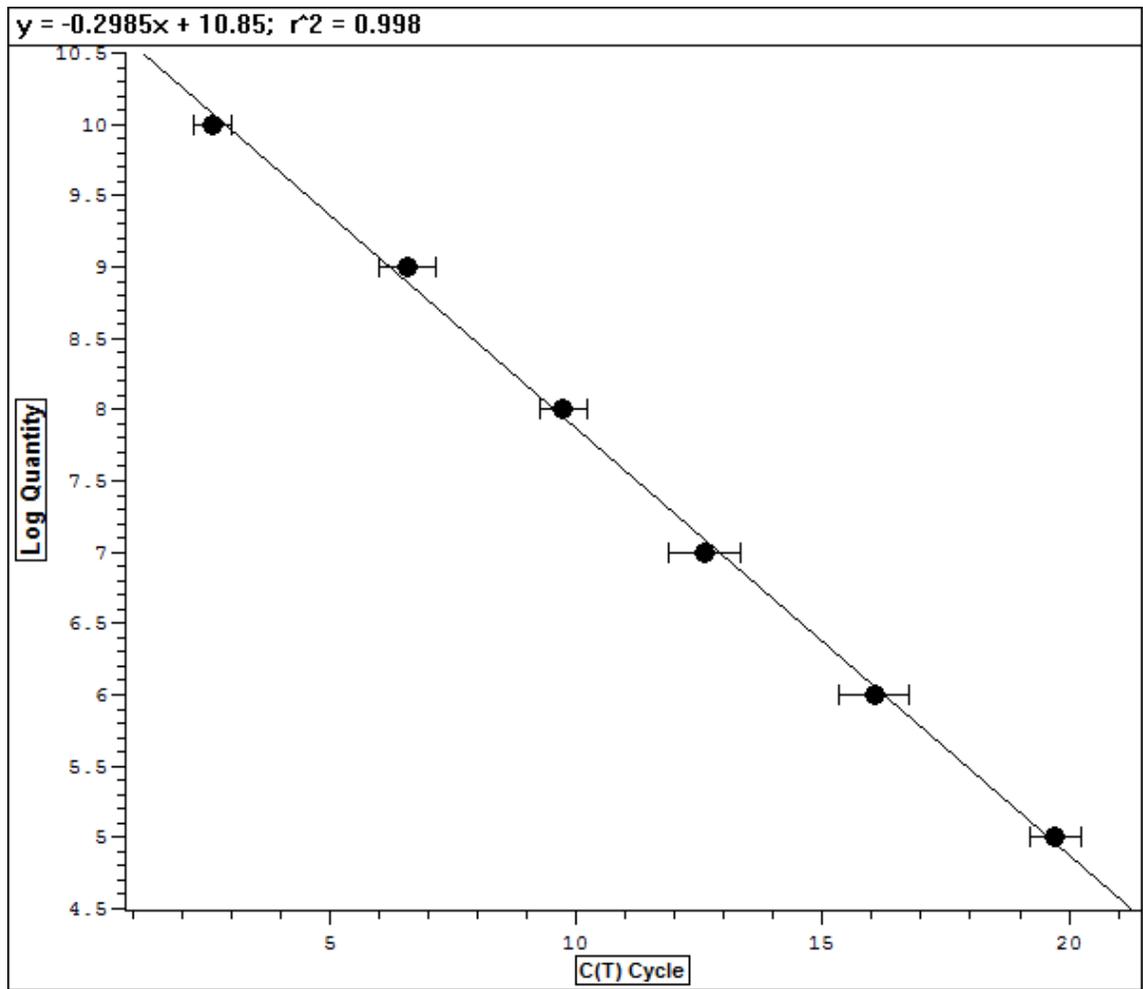


Figura 6. Curva de cuantificación *P. gingivalis*

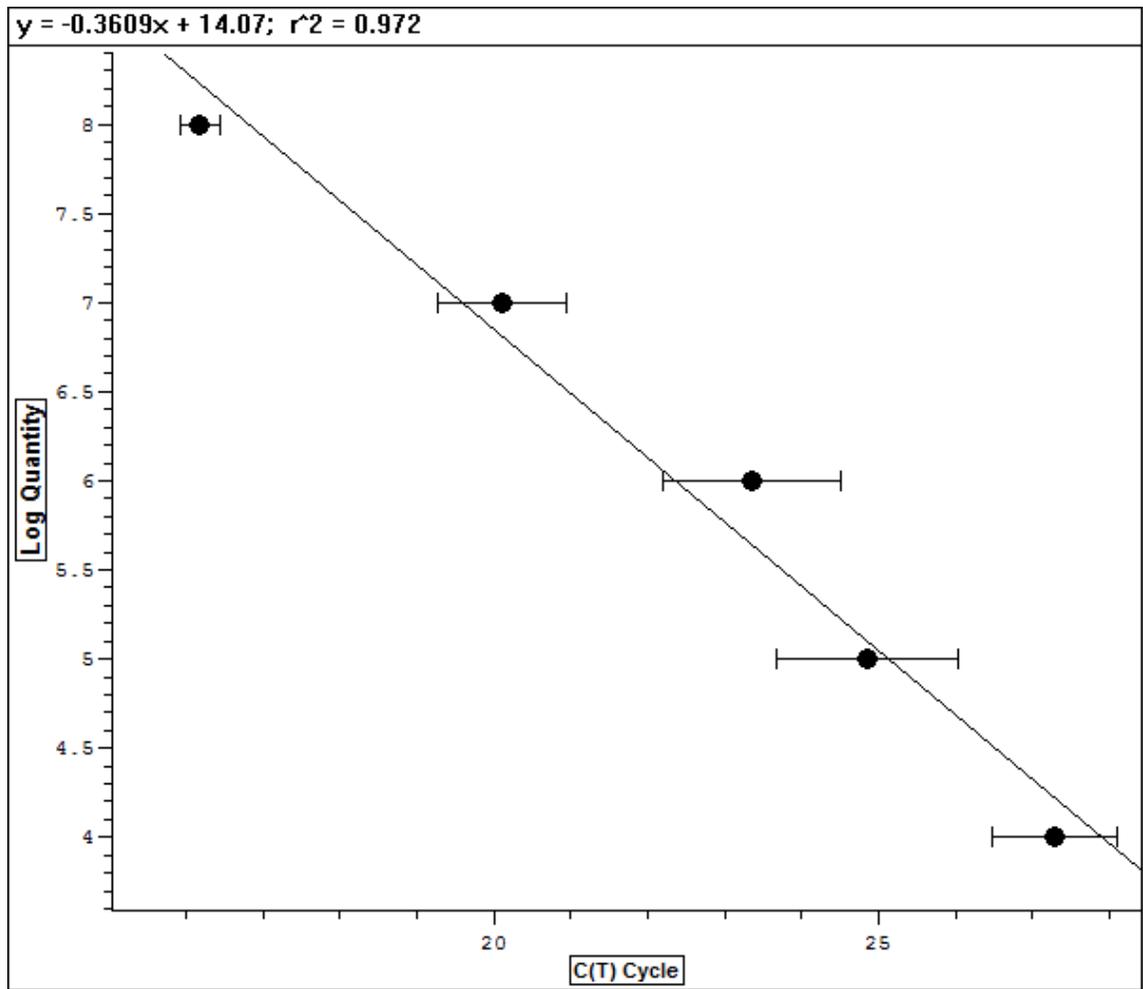


Figura 7. Curva de cuantificación *S. mutans*.

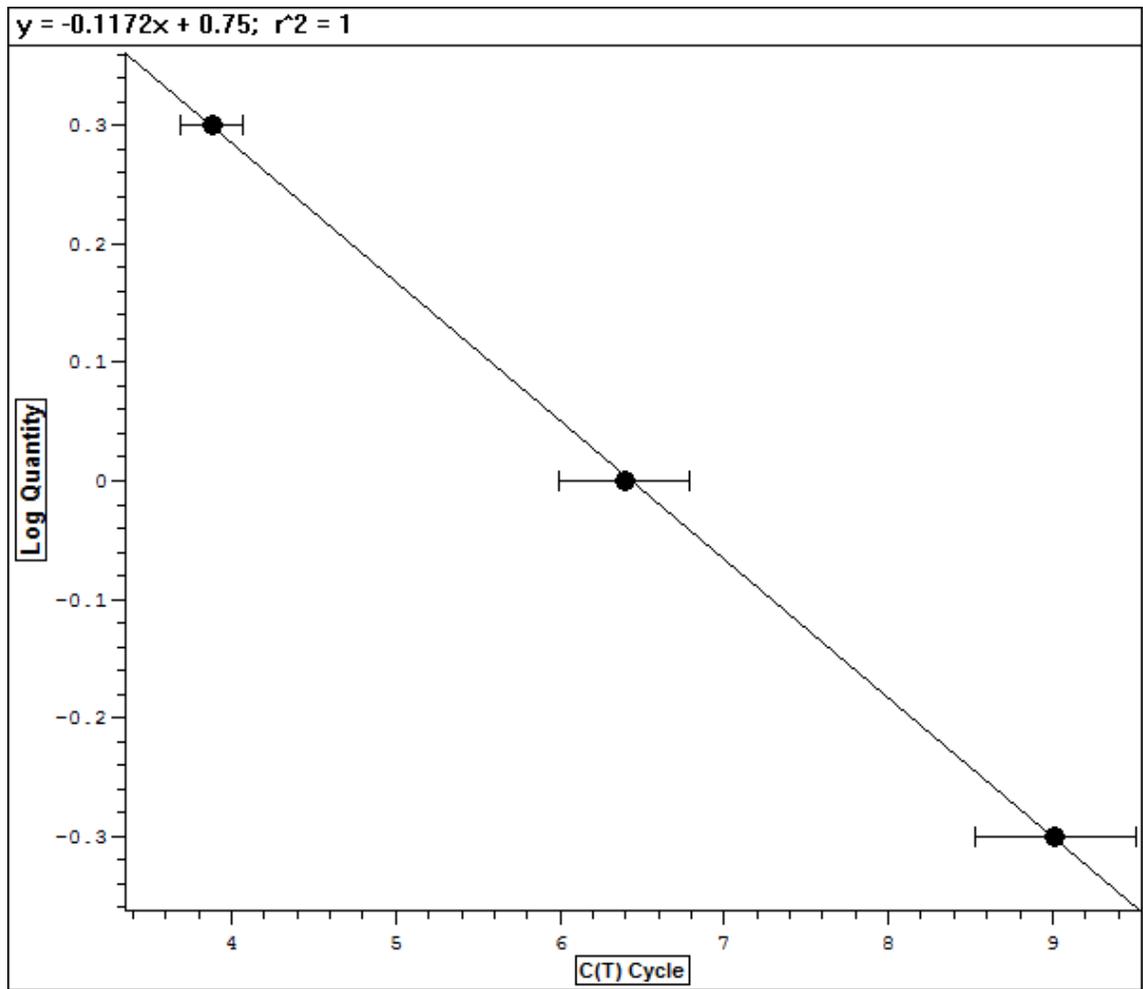


Figura 8. Curva de cuantificación *P. intermedia*

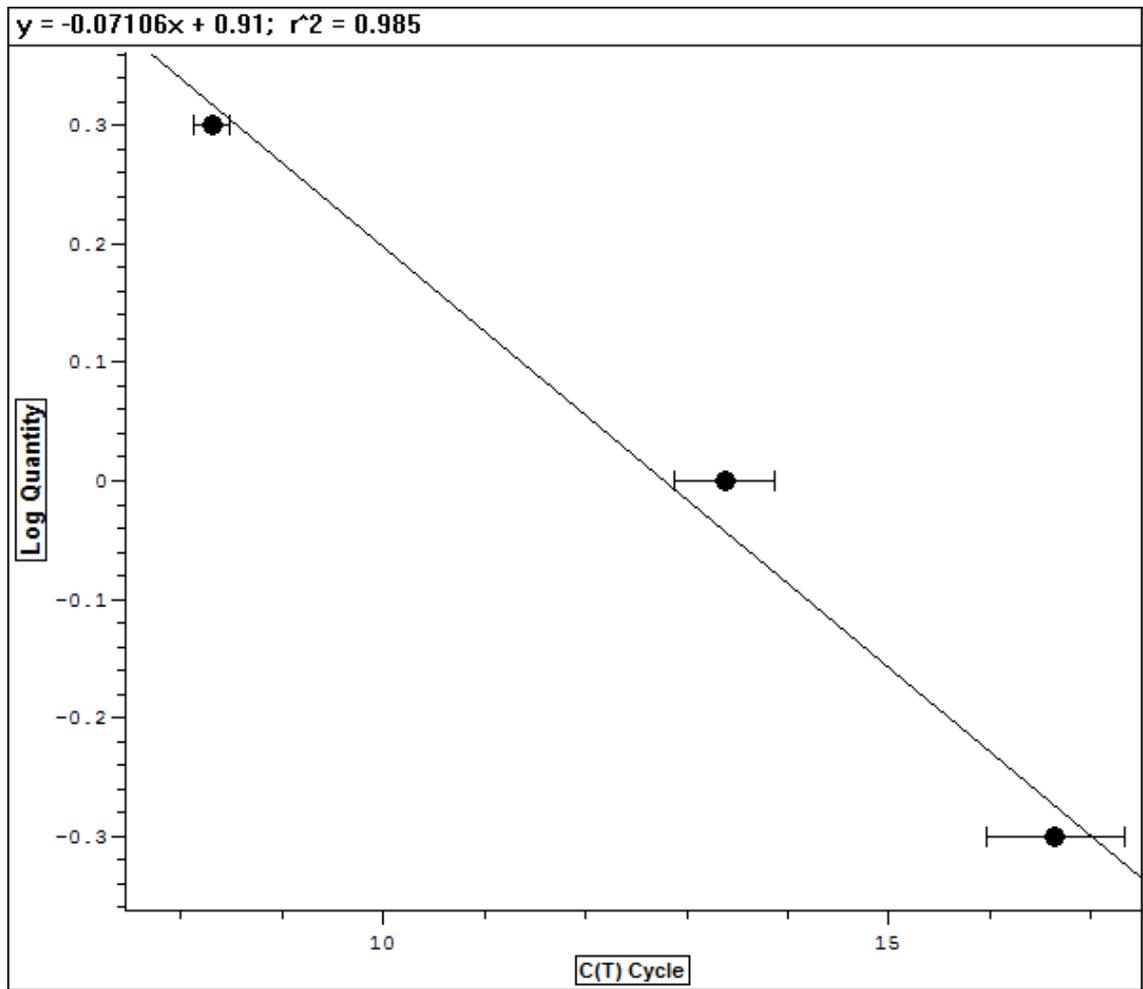


Figura 9. Curva de cuantificación *T. denticola*.

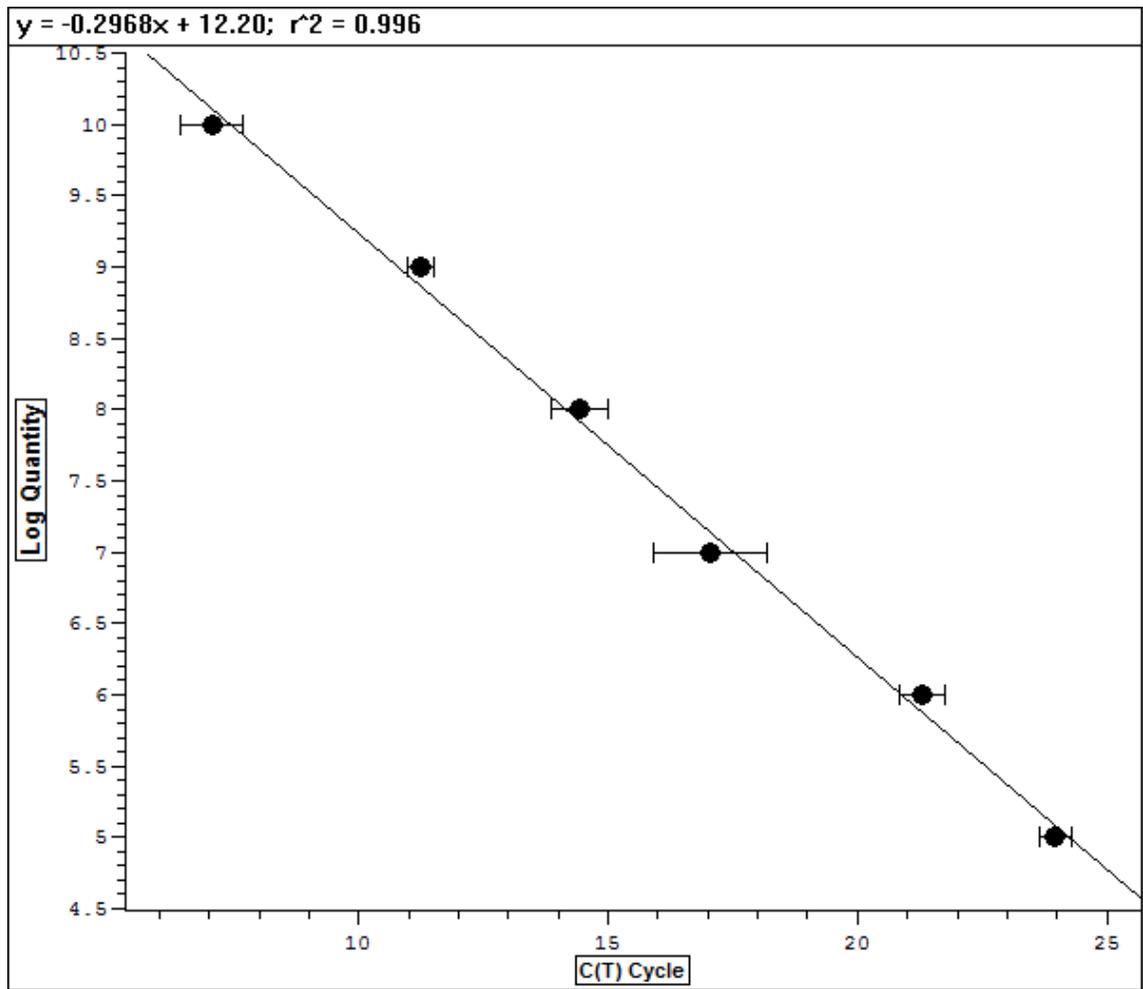


Figura 10. Curva de cuantificación *T. forsythia*.

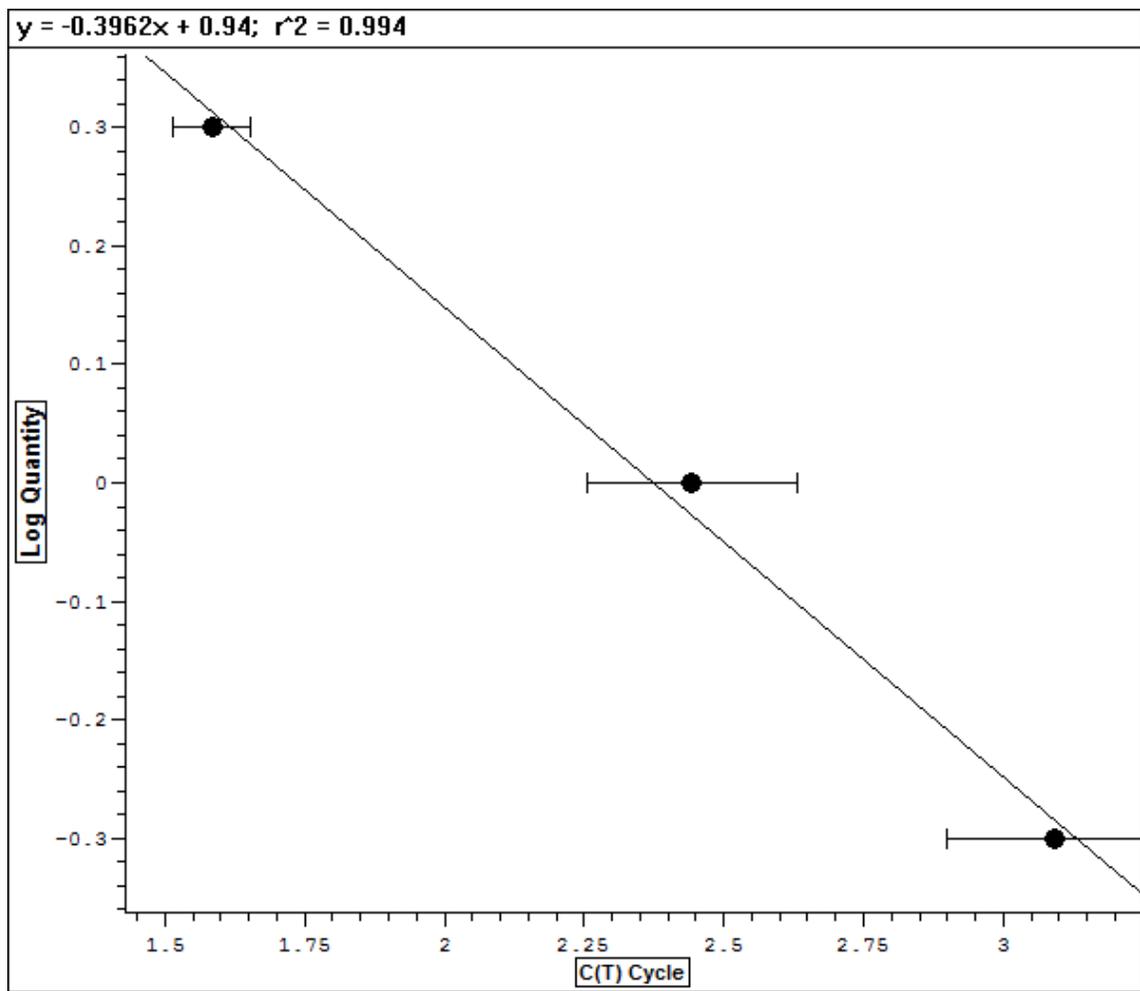


Figura 11. Curva cuantificación *A. actinomycetemcomitans*.

Cuadro 2. Iniciadores específicos

| Bacteria                        | Iniciadores (5' - 3')      | pb      | Tm       |
|---------------------------------|----------------------------|---------|----------|
| <i>P. gingivalis</i>            | TGTAGATGACTGATGGTGAAAACC   | 19<br>7 | 85.<br>5 |
|                                 | ACGTCATCCCCACCTTCCTC       |         |          |
| <i>T. forsythia</i>             | GCGTATGTAACCTGCCCGCA       | 64<br>1 | 76.<br>0 |
|                                 | TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT     |         |          |
| <i>T. denticola</i>             | TAATACCGAATGTGCTCATTTACAT  | 31<br>6 | 87.<br>5 |
|                                 | TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTT |         |          |
| <i>P. intermedia</i>            | TTTGTTGGGGAGTAAAGCGGG      | 30<br>7 | 87.<br>5 |
|                                 | TCAACATCTCTGTATCCTGCGT     |         |          |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | CTAGGTATTGCGAAACAATTTG     | 26<br>2 | 80.<br>5 |
|                                 | CCTGAAATTAAGCTGGTAATC      |         |          |
| <i>S. mutans</i>                | GGCACCACAACATTGGGAAGCTCA   | 43<br>3 | 83.<br>0 |
|                                 | GGAATGGCCGCTAAGTCAACAGGA   |         |          |

## VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### F. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

En este estudio se obtuvieron muestras de 30 individuos de cada uno de los grupos. El grupo de pacientes con periodontitis estuvo conformado por 16 mujeres y 14 hombres con una edad promedio de  $41.70 \pm 11.42$  años, mientras que en el individuos sanos 13 fueron hombres y 17 mujeres con un promedio de edad de  $32.10 \pm 8.78$  años.

Al analizar el grupo de pacientes con periodontitis se observó una frecuencia general de 83% del cual el 52% de los pacientes presentaron al menos 1 bacteria, el 36% presentó 2 bacterias y el 12% presentó 3 bacterias, mientras que el grupo de individuos sanos mostró una frecuencia general de 50% donde el 47% presentó al menos 1 bacteria, 33% presentó 2 bacterias y el 20% presentó 3 bacterias. (Figura 4 y 5)

Se observó una frecuencia de 43.3% en la región supragingival y de 10% en subgingival para *P. gingivalis* mientras que en los individuos sanos obtuvieron frecuencias de 13.3% y 26.7%, respectivamente, observándose una diferencia estadísticamente significativa entre las frecuencias en la región supragingival de pacientes y controles ( $p = 0.020$ ), sin embargo no se observó diferencia significativa en la región subgingival entre los dos grupos ( $p = 0.181$ ).

*Treponema denticola* en el grupo de pacientes con periodontitis, mostró con una frecuencia de 10% en la placa supragingival y en la región subgingival no estuvo presente, mientras que en los individuos sanos, en la región subgingival se observó con una frecuencia de 6.7% y en la supragingival no encontró presencia de la bacteria. La comparación entre ambos grupos de estudio demostró que no existe diferencia estadísticamente significativa en placa supragingival ( $p = 0.237$ ) y subgingival ( $p = 0.492$ ).

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* no se detectó en la región supragingival ni en subgingival en ninguno de los grupos.

En cuanto a *Tannerella forsythia* en pacientes con periodontitis, se observó una frecuencia de 3.3% en la región supragingival y 6.7% en individuos sanos, no observándose una diferencia significativa entre ambos grupos ( $p = 0.500$ ). En la región subgingival se observó un 10% en

pacientes con periodontitis mientras que en individuos sanos obtuvo frecuencia de 3.3% no observándose diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $p = 0.612$ ).

*Streptococcus mutans* en el grupo de periodontitis, presentó una frecuencia de 6.7% en la región supragingival mientras que los sujetos sanos mostraron una frecuencia de 16.7% no observándose una diferencia significativa ( $p = 0.492$ ). En cuanto a la región subgingival, el grupo de periodontitis mostró una frecuencia de 3.3% mientras que en individuos sanos se observó frecuencia de 10%, donde no se observó diferencia significativa entre los grupos ( $p = 0.97$ ).

Por último, *Prevotella intermedia* en pacientes con periodontitis tuvo una frecuencia de 30% en la región supragingival y los individuos sanos frecuencia de 10%, sin embargo no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $p = 0.052$ ) mientras que en la región subgingival se obtuvo una frecuencia de 50% para pacientes y 26.7% en controles sanos donde no se observó diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.055$ ). (Cuadro 4).

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por He J y cols, quienes encontraron mayor frecuencia de *P. gingivalis* en pacientes con periodontitis (58%) en comparación con controles sanos (11%) en la región supragingival. Sin embargo ellos reportaron una frecuencia mayor en la región subgingival en pacientes con periodontitis (57%), comparada con los sanos (10%) (He J y col., 2012). Esta discrepancia se puede deber a la diferencia en la toma de muestra subgingival de ese estudio (absorción en papel en el surco gingival). Si bien *P. gingivalis* está siempre relacionada con periodontitis, cabe resaltar que dicha bacteria es un colonizador tardío y se encuentra en la capa más superficial en la biopelícula débilmente anclada, lo que indica que si el paciente realizó un cepillado o limpieza previo a la toma de muestra, es posible se haya perdido cierta cantidad de bacteria.

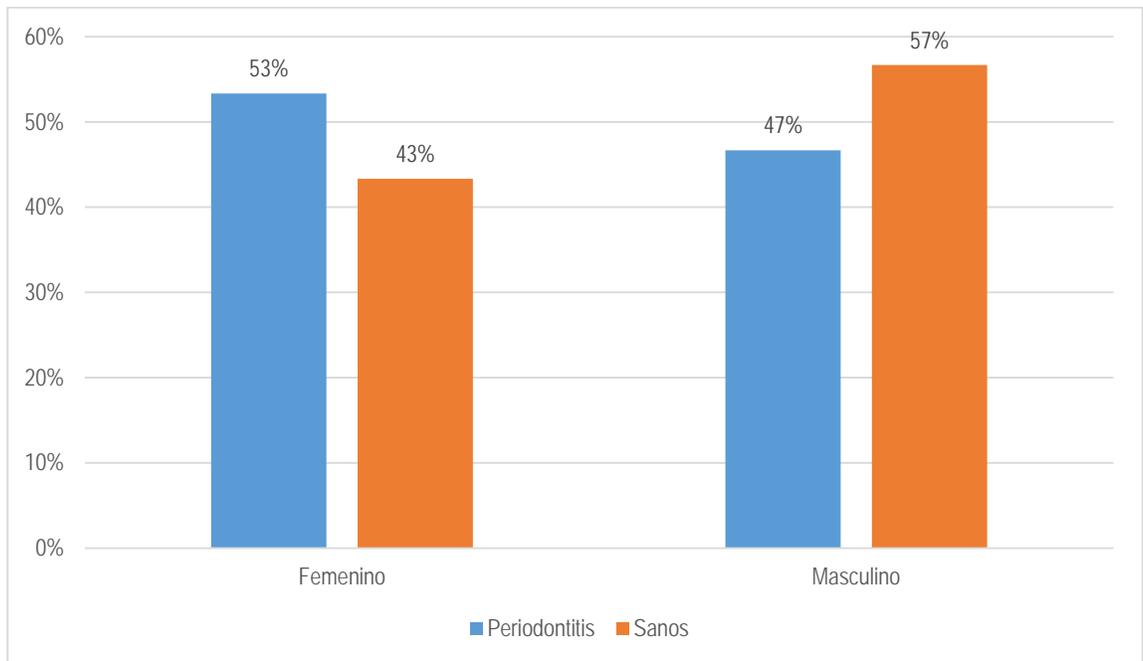


Figura 12. Frecuencia de género en individuos de estudio.

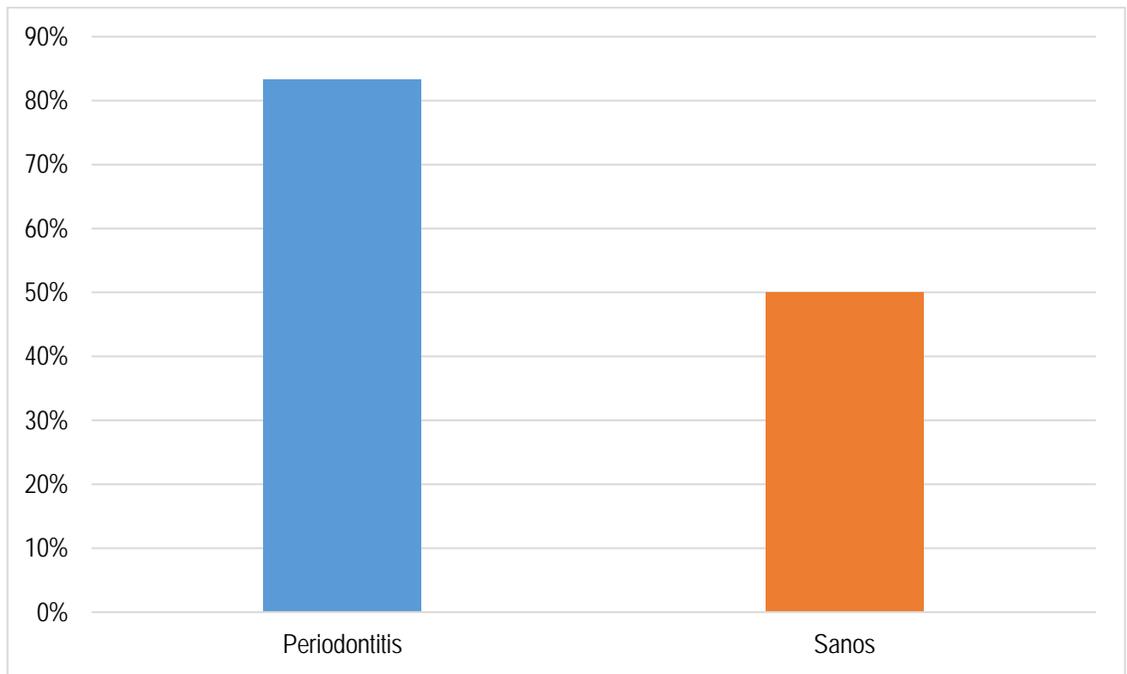


Figura 13. Frecuencia bacteriana en pacientes con periodontitis e sujetos sanos.

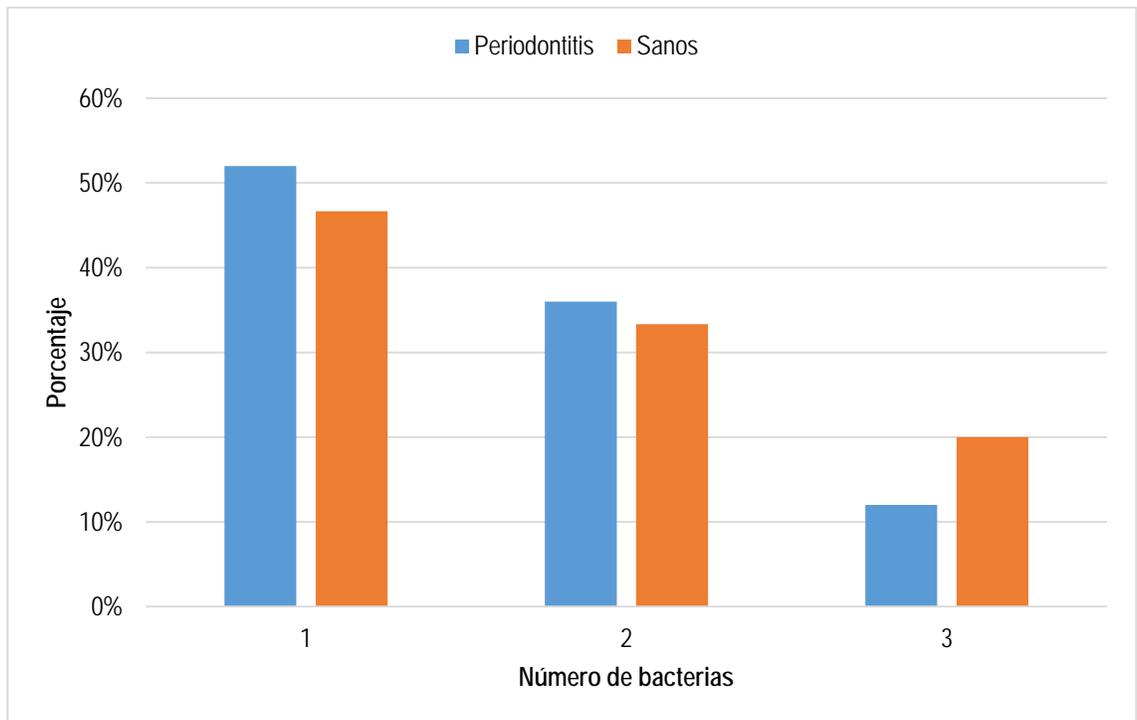


Figura 14. Frecuencia del número de bacterias por grupo.

En un reporte en población Tailandesa, se encontró una mayor frecuencia de *T. denticola* en pacientes con periodontitis severa comparado con la forma moderada (Torrunguang K y col., 2015), sin embargo, no incluyeron un grupo control (sanos). Nuestros resultados, demuestran una mayor frecuencia de *T. denticola* en el grupo de periodontitis con respecto al sano. Estas observaciones se pueden explicar ya que *T. denticola* es frecuentemente encontrada junto con *P. gingivalis* dentro de la capa superficial de la placa subgingival debido a que estas dos bacterias presentan características sinérgicas, debido a que para que *T. denticola* se pueda adherir a la placa primero debe haber colonizado *P. gingivalis*, pues las fimbrias que esta presenta le sirven de andamio a *T. denticola* para poder adherirse, por lo que es de esperarse que al encontrar una baja prevalencia de *P. gingivalis*, también exista una baja prevalencia en *T. denticola*.

En nuestro estudio no se detectó la presencia de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, en la región supragingival ni en subgingival lo que contrasta con un reporte realizado en el 2013 en población japonesa. En dicho estudio se realizó PCR cuantitativa a partir de placa dental subgingival observando pacientes con periodontitis crónica y de individuos sanos, observaron una frecuencia de 25% en el grupo de pacientes y ausencia de la bacteria de individuos sanos. (Tomita S y col., 2013). La diferencia observada en ambos estudios en el grupo de pacientes puede deberse a que *A. actinomycetemcomitans* es una bacteria de metabolismo complejo que se encuentra en pacientes con una enfermedad periodontal crónica agresiva donde el hueso alveolar está casi completamente degradado. Cabe recalcar que dadas las características de estudio, tomando en cuenta los criterios de inclusión, no nos fue posible incorporar ese tipo de pacientes, posiblemente esa es la razón por la cual no se observaron ningún paciente en la presencia de *A. a.*

En un estudio realizado en la Universidad de Helsinki, se evaluó la presencia de bacterias periodontales en muestras de saliva de sujetos con enfermedad cardiovascular observando elevadas frecuencias de *T. forsythia* (n = 29) en las zonas donde se obtuvo mayor profundidad de bolsa al momento del sondeo comparado con su control sano (n = 20) (Salminen A y col., 2015). Dichos resultados no concuerdan con nuestros, resultados donde se observó una mayor frecuencia de *T. forsythia* en nuestro grupo control, aunque el nuestro análisis estadístico no mostró una diferencia estadísticamente significativa. La diferencia en los resultados observados puede deberse al tipo de muestra que fue analizada en cada estudio.

En nuestro estudio, *S. mutans* presentó una frecuencia mayor para ambas regiones (supragingival y subgingival) en los pacientes con periodontitis comparado con el grupo de los sujetos sanos, sin embargo no se observó una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los controles. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado en un estudio donde se cuantificó la bacteria a partir de muestras de placa dental de 104 personas de zonas rurales en una comunidad Haitiana donde observaron una prevalencia de *S. mutans* del 63.7% (Psoter WJ y col., 2011).

Debido a *S. mutans* no es considerada una bacteria causal de enfermedad periodontal no suele evaluarse su presencia con dicha afección, sin embargo en otro estudio donde se caracterizó la presencia de bacterias periodontales comparando con un grupo de individuos sanos, evidenció presencia de *S. mutans* en una mayor proporción en pacientes con enfermedad periodontal comparado con individuos sanos, donde cabe resaltar los pacientes padecían enfermedades sistémicas, principalmente Lupus Sistémico Eritematoso (Sainz JES, 2011). Es normal encontrar esta bacteria en tan bajas proporciones en periodontitis y menores aun en la región subgingival ya que es un primer colonizador de placa y a medida que las condiciones del ambiente se ven modificadas por la actividad de los segundos y colonizadores tardíos, se le complica permanecer en la región inferior resultando así más abundante en la región supragingival.

Finalmente, algunos estudios han reportado que *P. intermedia* se encuentra en elevadas cantidades en células epiteliales en la cavidad oral en periodontitis crónica, empleando PCR cuantitativa y cultivos *in vitro* (Dorn BR y col., 1998). Dichos resultados muestran concordancia con lo observado en esta investigación ya que si bien nuestra comparación entre grupos no fue estadísticamente significativa, estuvo muy cerca de serlo ( $p = 0.052$  en supragingival y  $p = 0.055$  en subgingival). Otro factor a considerar es que *P. intermedia* puede presentarse como parte de la microflora normal en la mayoría de los individuos y a medida que aumenta la severidad de la enfermedad periodontal, esta bacteria es capaz de mantenerse e incluso colonizar con mayor facilidad pues que la cantidad de nutrientes disponibles también aumenta.

Cuadro 3. Frecuencias de bacterias periodontales.

| Bacteria                        | Localización  | Periodontitis |       | Sanos      |       | P     |
|---------------------------------|---------------|---------------|-------|------------|-------|-------|
|                                 |               | Frecuencia    | %     | Frecuencia | %     |       |
| <i>P. gingivalis</i>            | Supragingival | 12            | 40.0% | 4          | 13.3% | 0.039 |
|                                 | Subgingival   | 3             | 10.0% | 7          | 23.3% | 0.299 |
| <i>T. denticola</i>             | Supragingival | 3             | 10.0% | ND         | N/A   | 0.237 |
|                                 | Subgingival   | ND            | N/A   | 2          | 6.7%  | 0.492 |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | Supragingival | ND            | N/A   | ND         | N/A   |       |
|                                 | Subgingival   | ND            | N/A   | ND         | N/A   |       |
| <i>T. forsythia</i>             | Supragingival | 1             | 3.3%  | 2          | 6.7%  | 0.500 |
|                                 | Subgingival   | 2             | 6.7%  | 1          | 3.3%  | 0.500 |
| <i>S. mutans</i>                | Supragingival | 2             | 6.7%  | ND         | N/A   | 0.492 |
|                                 | Subgingival   | 1             | 3.3%  | 5          | 16.7% | 0.097 |
| <i>P. intermedia</i>            | Supragingival | 9             | 30.0% | 3          | 10.0% | 0.052 |
|                                 | Subgingival   | 14            | 46.7% | 8          | 26.7% | 0.090 |

A partir de pacientes con periodontitis e individuos sanos de las regiones supragingival y subgingival con una N=30. ND=No detectada.

## G. CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS

En el análisis de cuantificación de cargas bacterianas resultó de la siguiente forma: *P. gingivalis* presentó una media de  $8.2E+02 \pm 1.3E+03$  para pacientes mientras que los controles sanos resultó en  $1.5E+09 \pm 2.8E+09$  en región supragingival en la región supragingival y de  $4.6E+03 \pm 3.0E+03$  en pacientes mientras que los controles mostraron una media  $8.4E+07 \pm 1.7E+08$  en la región subgingival. *T. denticola* en región supragingival obtuvo una media de  $3.5E+06 \pm 3.8E+06$  mientras que los individuos sanos no se detectó, mientras que en la región subgingival la bacteria no fue detectada sin embargo los controles sanos presentaron una media de  $4.1E+12 \pm 9.5E+07$ . *T. forsythia* presentó una media de  $5.2E+10$  en supragingival y los controles sanos  $2.3E+08 \pm 9.5E+07$  en supragingival y una media de  $2.0E+05 \pm 2.2E+05$  en subgingival para el caso de pacientes mientras que los controles sanos  $2.4E+08$ . En cuanto a *S. mutans* mostró una media de  $4.9E+04 \pm 3.6E+04$  en la región supragingival y para los controles sanos  $9.5E+11 \pm 2.1E+12$ , mientras que la región subgingival mostro una media de  $1.1E+04$  en pacientes y de  $9.5E+11 \pm 2.1E+12$ . Por último *P. intermedia* mostro una media de  $5.6E+08 \pm 1.6E+09$  en la región supragingival y en controles sanos  $2.9E+10 \pm 5.1E+10$ , en el caso de la región subgingival  $2.3E+09 \pm 7.8E+09$  mientras que los individuos sanos  $1.3E+07 \pm 2.8E+07$  (Cuadro 4) (Figura 14).

En nuestro estudio, se obtuvo una carga bacteriana promedio mayor en individuos sanos comparado con el grupo de pacientes con periodontitis, resultados no concordantes con lo reportado en otro estudio realizado en mujeres en Brasil donde se tomaron muestras de placa supragingival específicamente de molares, cuantificaron bacterias odontopatógenas a partir de qPCR observando cantidades mayores en pacientes con periodontitis crónica ( $4.8E+10$ ) que en su grupo de sanos ( $4.2E+10$ ). Sin embargo ellos no muestran una diferencia estadísticamente significativa en dicha comparación (Braga RR y col., 2010). Una respuesta a esta diferencia se puede deber al hecho de que ellos tomaron placa específicamente de molares donde se sabe que la enfermedad periodontal es más grave y es más común encontrar a *P. gingivalis* en estas regiones a comparación de nuestro estudio donde la toma de placa dental se extrajo de forma diferente.

Cuadro 4. Carga bacteriana.

| Bacteria                        | Localización  | Periodontitis |         | Sanos   |         |
|---------------------------------|---------------|---------------|---------|---------|---------|
|                                 |               | Media         | SD      | Media   | SD      |
| <i>P. gingivalis</i>            | Supragingival | 8.2E+02       | 1.3E+03 | 1.5E+09 | 2.8E+09 |
|                                 | Subgingival   | 4.6E+03       | 3.0E+03 | 8.4E+07 | 1.7E+08 |
| <i>T. denticola</i>             | Supragingival | 3.5E+06       | 3.8E+06 | ND      | NA      |
|                                 | Subgingival   | ND            | NA      | 4.1E+12 | 5.2E+12 |
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | Supragingival | ND            | NA      | ND      | NA      |
|                                 | Subgingival   | ND            | NA      | ND      | NA      |
| <i>T. forsythia</i>             | Supragingival | 5.2E+10       | NA      | 2.3E+08 | 9.5E+07 |
|                                 | Subgingival   | 2.0E+05       | 2.2E+05 | 2.4E+08 | NA      |
| <i>S. mutans</i>                | Supragingival | 4.9E+04       | 3.6E+04 | ND      | NA      |
|                                 | Subgingival   | 1.1E+04       | NA      | 9.5E+11 | 2.1E+12 |
| <i>P. intermedia</i>            | Supragingival | 5.6E+08       | 1.6E+09 | 2.9E+10 | 5.1E+10 |
|                                 | Subgingival   | 2.3E+09       | 7.8E+09 | 1.3E+07 | 2.8E+07 |

Carga bacteriana observada en las regiones supragingivales y subgingivales de pacientes con periodontitis e individuos sanos. N=30, ND=No detectada, NA=No aplica.

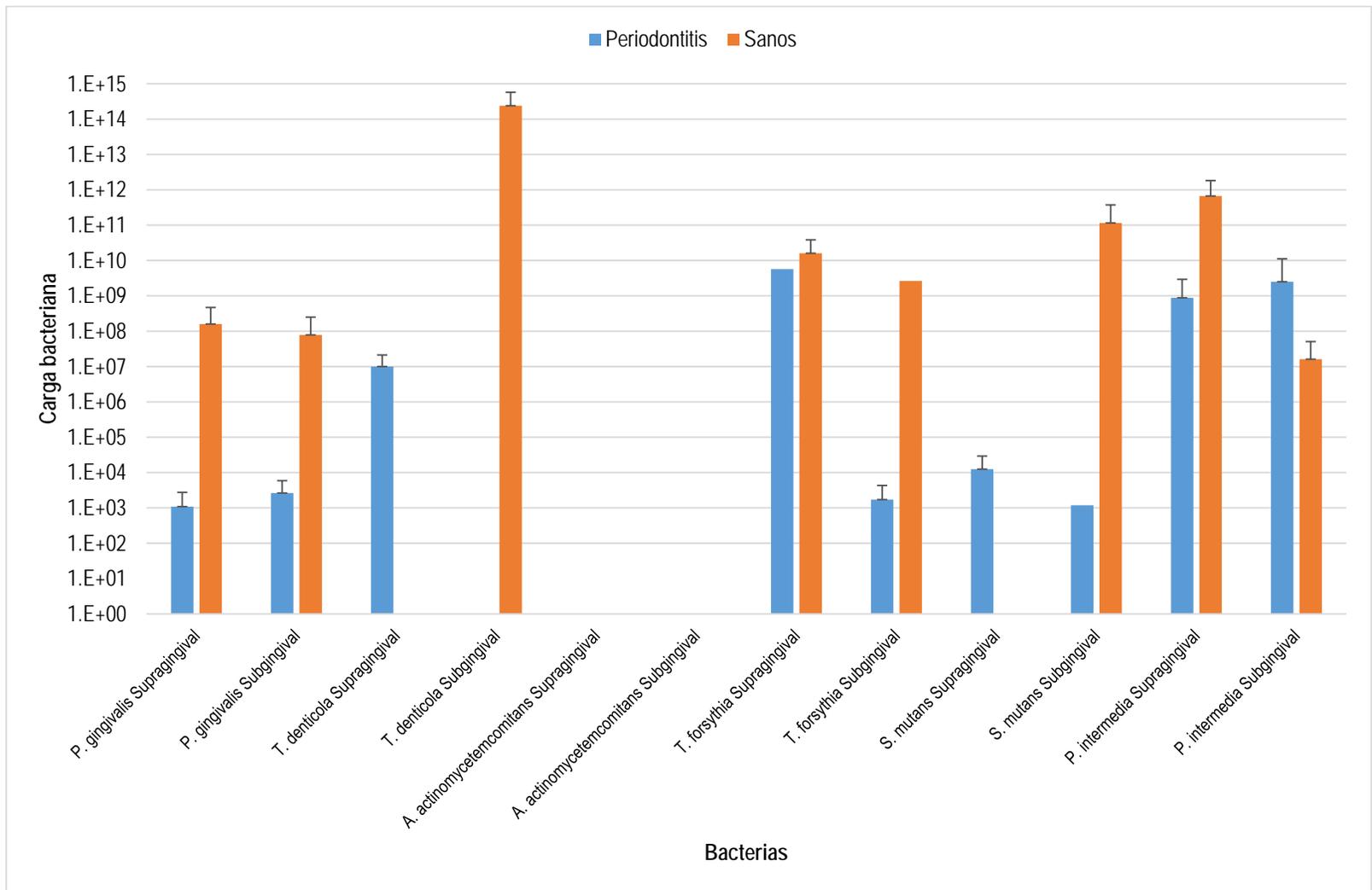


Figura 15. Promedio de cargas bacteriana en regiones supragingival y subgingival en pacientes con periodontitis y sujetos sanos.

En el 2011 en la Universidad de Nueva York se realizó un estudio de una población de adolescentes a partir de placa dental extraída de la bolsa periodontal haciendo una comparación entre la cantidad de *S. mutans* y *A. actinomycetemcomitans* encontradas en supragingival y subgingival. Para el caso de *S. mutans* encontraron una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.001$ ) entre la cantidad de bacteria encontrada en la región supragingival un 67.3% mayor en pacientes contra un 36.6% en individuos sanos. Por otro lado en *A. a* observaron un promedio mayor en la región supragingival de 59.2% en comparación de la región subgingival con un promedio de carga bacteriana de 44% encontrando diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.31$ ) (Psoter WJ y col., 2011). En nuestro estudio no fue detectada la presencia de *A. a* debido posiblemente a los criterios de exclusión de pacientes donde las variables no nos permitían muestrear pacientes con las características donde la bacteria se encuentra. Sin embargo en cuanto a *S. mutans* se observó una tendencia de carga mayor en la región supragingival comparada con la subgingival pero no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa, resultado acorde con el metabolismo de dicha bacteria de respiración aerobia cariogénica mayormente encontrada en las regiones superficiales del biofilm, difícilmente encontrada en una bolsa periodontal.

Un estudio realizado en el 2014 en una población de Italia se investigó la prevalencia de 6 bacterias periodontales entre ellas *P. intermedia* y *T. forsythia*, donde a partir de 352 pacientes con periodontitis crónica tomando muestra de placa subgingival utilizando papel filtro estéril encontrando una carga media de  $1.07E+05$  para *P. intermedia* y de  $12E+05$  para *T. forsythia*. *P. intermedia* resultó ser la bacteria que presentó menor carga entre las 6 analizadas mientras que *T. forsythia* obtuvo el mayor conteo de carga bacteriana. En nuestra investigación resultó lo contrario ya que *P. intermedia*, dicha bacteria se observó con elevadas concentraciones y *T. forsythia* en bajas concentraciones. Esto se puede explicar haciendo referencia a la forma en la que se hizo la extracción de placa dental, ya que en el estudio referenciado se utilizó papel filtro y en el nuestro se hizo extracción de placa con una cureta insertada hasta el fondo de la bolsa periodontal extrayendo mayores cantidades placa y por consecuente, de bacteria (Gatto MR y col., 2014).

Finalmente en un estudio en Boston, Estados Unidos, realizaron un estudio comparando la composición microbiana en pacientes con periodontitis e individuos sanos en las regiones

supragingival y subgingival a partir de placa dental donde observaron que *T. denticola* se encuentra en proporciones similares en ambas regiones ( $22.1 \pm 6.6$ ). En nuestro estudio no fue posible detectar la bacteria en la región subgingival en pacientes con periodontitis y en cuanto a individuos sanos no se detectó presencia de la bacteria (Tadokoro K y col., 2010).

## IX CONCLUSIONES

- Se lograron establecer las condiciones de amplificación y cuantificación de las bacterias de estudio a partir de placa dentobacteriana sub y supragingival.
- *P. gingivalis* se encontró en mayor proporción y cantidad en pacientes con enfermedad periodontal en la región supragingival, pero no subgingival, en comparación con personas sanas.
- En cuanto a *T. denticola*, *T. forsythia*, *P. intermedia* y *S. mutans* se encuentran proporciones y cantidades similares en pacientes con periodontitis e individuos sanos, tanto en la región supragingival como la subgingival.
- Finalmente *A. actinomycetemcomitans* no se encuentra en individuos sanos ni en pacientes con enfermedad periodontal inicial o crónica.
- De manera general concluimos que en los pacientes con periodontitis mostraron una mayor frecuencia y cantidad de las bacterias periodontopatógenas en placa dental que los individuos sanos.

## X BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Medina M, Ramos-Payan R, Arambula-Meraz E, Sanchez-Torres Ly Favila-Castillo L. 2010. Parasitaemia Levels in Plasmodium Chabaudi Infected-Mice Modify Ifn-Gamma and Il-10 Expression after a Homologous or Heterologous Challenge. *Parasite Immunology* 32(4):267-74.
- Armitage GC. 1999. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 4(1):1-6.
- Bascones Martinez Ay Figuero Ruiz E. 2005. Las Enfermedades Periodontales Como Infecciones Bacterianas. *Avances En Periodoncia e Implantología Oral* 17(3):111-8.
- Botero Jy Bedoya E. 2010. Determinantes Del Diagnóstico Periodontal. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral* 3(2):94-9.
- Botero JE, Contreras A, Lafaurie G, Jaramillo A, Betancourt My Arce RM. 2007. Occurrence of Periodontopathic and Superinfecting Bacteria in Chronic and Aggressive Periodontitis Subjects in a Colombian Population. *Journal of Periodontology* 78(4):696-704.
- Braga RR, Carvalho MAR, Bruña-Romero O, Teixeira RE, Costa JE, Mendes EN, Farias LMy Magalhães PP. 2010. Quantification of Five Putative Periodontal Pathogens in Female Patients with and without Chronic Periodontitis by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Anaerobe* 16(3):234-9.
- Colombo AP, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, Socransky SS, Hasturk H, Van Dyke TE, Dewhirst Fy Paster BJ. 2009. Comparisons of Subgingival Microbial Profiles of Refractory Periodontitis, Severe Periodontitis, and Periodontal Health Using the Human Oral Microbe Identification Microarray. *Journal of Periodontology* 80(9):1421-32.
- Contreras A, Moreno SM, Jaramillo A, Pelaez M, Duque A, Botero JEy Slots J. 2015. Periodontal Microbiology in Latin America. *Periodontology 2000* 67(58-86).
- Chung WO y An JY. 2012. Periodontal Disease and Gingival Innate Immunity-Who Has the Upper Hand?: Chapter.

- Dale BA. 2002. Periodontal Epithelium: A Newly Recognized Role in Health and Disease. *Periodontology 2000* 30(1):70-8.
- DGE. 2016. Boletín Epidemiológico. In: SSA, editor. México.
- Dorn BR, Leung K-Py Progulske-Fox A. 1998. Invasion of Human Oral Epithelial Cells By *Prevotella Intermedia*. *Infection And Immunity* 66(12):6054-7.
- Fine DH, Markowitz K, Fairlie K, Tischio-Bereski D, Ferrendiz J, Furgang D, Paster BJ, Dewhirst FE. 2013. A Consortium of *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, *Streptococcus Parasanguinis*, and *Filifactor Alocis* Is Present in Sites Prior to Bone Loss in a Longitudinal Study of Localized Aggressive Periodontitis. *Journal of Clinical Microbiology* 51(9):2850-61.
- Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KPy Brissette C. 1999. Virulence Factors of *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*. *Periodontology 2000* 20(1):136-67.
- Gatto MR, Montevecchi M, Paolucci M, Landini MP, Checchi L. 2014. Prevalence of Six Periodontal Pathogens in Subgingival Samples of Italian Patients with Chronic Periodontitis. *New Microbiology* 37(4):517-24.
- Ge X, Rodriguez R, Trinh M, Gunsolley Jy Xu P. 2013. Oral Microbiome of Deep and Shallow Dental Pockets in Chronic Periodontitis. *PLoS ONE* 8(6):e65520.
- Hajishengallis Gy Lamont RJ. 2012. Beyond the Red Complex and into More Complexity: The Polymicrobial Synergy and Dysbiosis (Psd) Model of Periodontal Disease Etiology. *Molecular Oral Microbiology* 27(6):409-19.
- Hamada Sy Slade HD. 1980. Biology, Immunology, and Cariogenicity of *Streptococcus Mutans*. *Microbiological Reviews* 44(2):331.
- Haraldsson G. 2005. Oral Commensal *Prevotella* Species and *Fusobacterium Nucleatum*: Identification and Potential Pathogenic Role. Citeseer.
- Harano K, Yamanaka Ay Okuda K. 1995. An Antiserum to a Synthetic Fimbrial Peptide of *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* Blocked Adhesion of the Microorganism. *FEMS Microbiology Letters* 130(2-3):279-85.

- Hasan Ay Palmer R. 2014. A Clinical Guide to Periodontology: Pathology of Periodontal Disease. *British Dental Journal* 216(8):457-61.
- He J, Huang W, Pan Z, Cui H, Qi G, Zhou Xy Chen H. 2012. Quantitative Analysis of Microbiota in Saliva, Supragingival, and Subgingival Plaque of Chinese Adults with Chronic Periodontitis. *Clinical Oral Investigations* 16(6):1579-88.
- Henderson B, Nair SP, Ward JMy Wilson M. 2003. Molecular Pathogenicity of the Oral Opportunistic Pathogen *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*. *Annual Review of Microbiology* 57:29-55.
- Holt SCy Ebersole JL. 2005. *Porphyromonas Gingivalis*, *Treponema Denticola*, and *Tannerella Forsythia*: The 'Red Complex', a Prototype Polybacterial Pathogenic Consortium in Periodontitis. *Periodontology 2000* 38(1):72-122.
- Izard ACRTJ. 2006. *Tannerella Forsythia*, a Periodontal Pathogen Entering the Genomic Era. *Periodontology 2000* 42.
- KahYanHow1, KeangPengSong2y KokGanChan1 a. 2016. *Porphyromonas Gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen Below the Gum Line. *Frontiers in Microbiology* 7:53.
- Kistler JO, Booth V, Bradshaw DJy Wade WG. 2013. Bacterial Community Development in Experimental Gingivitis. *PLoS ONE* 8(8):e71227.
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JSy Palmer RJ. 2002. Communication among Oral Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66(3):486-505.
- Kornman KS, Page RCy Tonetti MS. 1997. The Host Response to the Microbial Challenge in Periodontitis: Assembling the Players. *Periodontology 2000* 14(1):33-53.
- Kornman KS, Page RCy Tonetti MS. 2000. The Host Response to the Microbial Challenge in Periodontitis: Assembling the Players. *Periodontology* 14:33-53.
- Kulkarni Cy Kinane DF. 2014. Host Response in Aggressive Periodontitis. *Periodontology 2000* 65(1):79-91.

- L. G. Henry, R. M. E. McKenzie, A. Roblesy Fletcher HM. 2012. Oxidative Stress Resistance in *Porphyromonas Gingivalis*. *Future Microbiology* 7.
- Lobene RR. 1986. A Modified Gingival Index for Use in Clinical Trials. *Clinical Preventive Dentistry* 8(1):3-6.
- Marcotte Hy Lavoie MC. Oral Microbial Ecology and the Role of Salivary Immunoglobulin A: *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998 Mar;62(1):71-109.
- Mars PD. 2009. Oral Microbiology Fifth Edition.
- Marsh PD, Martin MV, Lewis MA, Williams D. 2009. Oral Microbiology: Elsevier Health Sciences UK.
- Mittal V, Bhullar, R. P., Bansal, R., Singh, K., Bhalodi, A., Khinda, P. K. 2013. A Practicable Approach for Periodontal Classification. *Dental Research Journal* 10(6):697-703.
- Moffatt CE, Whitmore SE, Griffen AL, Leys EJ, Lamont RJ. 2011. Filifactor Alocis Interactions with Gingival Epithelial Cells. *Molecular Oral Microbiology* 26(6):365-73.
- N. Suzuki, M. Yoneda, Hirofuji T. 2012. Mixed Red-Complex Bacterial Infection in Periodontitis. *International Journal of Dentistry*.
- Nair P. 1997. Apical Periodontitis: A Dynamic Encounter between Root Canal Infection and Host Response. *Periodontology 2000* 13(1):121-48.
- Nanci Ay Bosshardt DD. 2006. Structure of Periodontal Tissues in Health and Disease\*. *Periodontology 2000* 40(1):11-28.
- Ojeda-Garcés JC, Oviedo-García Ey Salas LA. 2013. Streptococcus Mutans and Dental Caries. *Ces Odontología* 26(1):44-56.
- Padilla C, Lobos O, Hubert E, González C, Matus S, Pereira M, S. Hy Descouvieres C. 2006. Periodontal Pathogens in Atheromatous Plaques Isolated from Patients with Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontal Research* 41 350-3.

- Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. 1997. Advances in the Pathogenesis of Periodontitis: Summary of Developments, Clinical Implications and Future Directions. *Periodontology 2000* 14(1):216-48.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe Ay Dewhirst FE. 2001. Bacterial Diversity in Human Subgingival Plaque. *Journal of Bacteriology* 183(12):3770-83.
- Popova Cy Dosseva V. Gingival Tissue Augmentation in Conjunction with Regenerative Periodontal Procedures.
- Professor A. 2011. Global Prevalence of Periodontitis: A Literature Review. *Periodontology*
- Psoter WJ, Ge Y, Russell SL, Chen Z, Katz RV, Jean-Charles Gy Li Y. 2011. Pcr Detection of Streptococcus Mutans and Aggregatibacter Actinomycetemcomitans in Dental Plaque Samples from Haitian Adolescents. *Clinical Oral Investigations* 15(4):461-9.
- Sainz JES. 2011. Distribución De Bacterias Periodontales En Placa Dentobacteriana (Pbd) De Pacientes Con Enfermedades Reumatológicas, Le Y Ar [Maestría en Ciencias Odontológicas en el Area de Odontología Integral Avanzada ]. San Luis Potosí, México: Universidad Autonoma de San Luis Potosí, Universidad Autonoma de Sinaloa
- Salminen A, Kopra KE, Hyvärinen K, Paju S, Mäntylä P, Buhlin K, Nieminen MS, Sinisalo Jy Pussinen PJ. 2015. Quantitative Pcr Analysis of Salivary Pathogen Burden in Periodontitis. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology* 5.
- Sela MN. 2001. Role of Treponema Denticola in Periodontal Diseases. *Critical Reviews In Oral Biology And Medicine : An Official Publication Of The American Association Of Oral Biologists* 12(5):399-413.
- Sharma EMaA. 2011. Tannerella Forsythia Invasion in Oral Epithelial Cells Requires Phosphoinositide 3-Kinase Activation and Clathrin-Mediated Endocytosis. *Microbiology* 157.
- Simon L. 2007. The Role of Streptococcus Mutans and Oral Ecology in the Formation of Dental Caries.

- Tadokoro K, Yamaguchi T, Kawamura K, Shimizu H, Egashira T, Minabe M, Yoshino Ty Oguchi H. 2010. Rapid Quantification of Periodontitis-Related Bacteria Using a Novel Modification of Invader Plus Technologies. *Microbiological Research* 165(1):43-9.
- Tomita S, Komiya-Ito A, Imamura K, Kita D, Ota K, Takayama S, Makino-Oi A, Kinumatsu T, Ota My Saito A. 2013. Prevalence of *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas Gingivalis* and *Tannerella Forsythia* in Japanese Patients with Generalized Chronic and Aggressive Periodontitis. *Microbial Pathogenesis* 61:11-5.
- Torrunguang K, Jitpakdeebordin S, Charatkulangkun Oy Gleebua Y. 2015. *Porphyromonas Gingivalis*, *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, and *Treponema Denticola/Prevotella Intermedia* Co-Infection Are Associated with Severe Periodontitis in a Thai Population. *PLoS One* 10(8):e0136646.
- Williams RC, Barnett A, Claffey N, Davis M, Gadsby R, Kellett M, Lip GYy Thackray S. 2008. The Potential Impact of Periodontal Disease on General Health: A Consensus View. *Current Medical Research And Opinion* 24(6):1635-43.
- Ximénez-Fyvie LA, Haffajee ADy Socransky SS. 2000. Comparison of the Microbiota of Supra-and Subgingival Plaque in Health and Periodontitis. *Journal Of Clinical Periodontology* 27(9):648-57.
- Zaura E, Nicu EA, Krom BPy Keijser B. 2014. Acquiring and Maintaining a Normal Oral Microbiome: Current Perspective.

## XI ANÉXOS

### H. Cuestionario, consentimiento informado y periodontograma aplicados al sujeto de estudio.



#### Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Sinaloa Instrumento de recolección de datos

Protocolo "Caracterización del estado de activación y maduración de células dendríticas de tejido gingival sano y con enfermedades periodontales".

**Estimado PACIENTE, favor de leer cuidadosamente y proporcionar la siguiente información:**

1. Nombre completo \_\_\_\_\_
2. Fecha de nacimiento \_\_\_\_\_
3. Edad \_\_\_\_\_
4. Sexo \_\_\_\_\_
5. Estado civil \_\_\_\_\_
6. Domicilio \_\_\_\_\_
7. Ciudad y Estado \_\_\_\_\_
8. Teléfonos \_\_\_\_\_
9. Nivel de estudios \_\_\_\_\_
10. Ocupación \_\_\_\_\_
11. ¿Cuál es su nivel socio económico? Alto \_\_\_\_\_ Medio \_\_\_\_\_ Bajo \_\_\_\_\_
12. ¿Suele visitar al odontólogo para realizarse una limpieza dental? Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_
13. ¿Cuántas veces al día cepilla sus dientes? \_\_\_\_\_
14. ¿Usa hilo dental? Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_
15. ¿Usa enjuague bucal? Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_
16. ¿Ha recibido terapia periodontal en los últimos tres meses? Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_
17. ¿Ha padecido o padece Artritis reumatoide? Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_
18. ¿Ha padecido o padece Diabetes? Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_
19. ¿Ha padecido o padece Enfermedades cardiovasculares? Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_
20. ¿Ha tomado antiinflamatorios por lo menos durante los últimos tres meses? Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_
21. ¿Ha tomado antibióticos por lo menos durante los últimos tres meses? Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_
22. ¿Toma bebidas alcohólicas o fuma en forma frecuente? Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_
23. ¿Se encuentra en su periodo menstrual? Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ No Aplica \_\_\_\_\_
24. ¿Está embarazada? Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ No Aplica \_\_\_\_\_

"Las respuestas dadas a estas preguntas son para nuestro archivo y serán consideradas confidenciales".

---

**Estimado INVESTIGADOR, favor de proporcionar la siguiente información:**

Consentimiento informado: Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_  
Diagnóstico: Sano \_\_\_\_\_ Gingivitis \_\_\_\_\_ periodontitis \_\_\_\_\_  
Clasificación de la lesión: \_\_\_\_\_  
Cumple con los criterios de inclusión: Sí \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_  
Código: \_\_\_\_\_

Este formulario de consentimiento informado está dirigido a hombres y mujeres que son atendidos en la Clínica de Odontología de la Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Sinaloa y que se les invita a participar en la investigación titulada "Caracterización del Estado de Activación y Maduración de Células Dendríticas de Tejido Gingival Sano y con Enfermedades Periodontales".

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted puede elegir participar o no hacerlo. Tanto si elige participar o no, continuarán todos los servicios que reciba en esta clínica y nada cambiará. Usted puede cambiar de idea más tarde y dejar de participar aun cuando haya aceptado antes. Aclaremos que no habrá beneficio para usted, pero es probable que su participación nos ayude a encontrar una respuesta a la pregunta de investigación. Puede que no haya beneficio para la sociedad en el presente estado de la investigación, pero es probable que generaciones futuras se beneficien. Si usted decide participar en esta investigación le aseguramos que no compartiremos la identidad de aquellos que participen en la investigación. La información que recojamos por este proyecto de investigación se mantendrá confidencial. La información acerca de usted que se recogerá durante la investigación será puesta fuera de alcance y nadie sino los investigadores tendrán acceso a verla. Cualquier información acerca de usted tendrá un número en vez de su nombre.

Esta propuesta ha sido revisada y aprobada por H. Comité Ética de la Facultad de Odontología, que es un comité cuya tarea es asegurarse de que se protege de daños a los participantes en la investigación. Si usted desea averiguar más sobre este comité, contacte responsable de la investigación: Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina (Laboratorio de Inmunología), Facultad de Ciencias Químico Biológicas y Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Sinaloa de la Clínica. Ciudad Universitaria, Avenida de las Américas y Universitarios, CP 80010. Teléfono 667-7137860 ext. 116. Culiacán, Sinaloa, México.

Yo soy \_\_\_\_\_, estudio en la Universidad Autónoma de Sinaloa en programa \_\_\_\_\_. Estamos investigando sobre las enfermedades periodontales, gingivitis y periodontitis, las cuales son muy comunes en el mundo y en nuestro país. Le voy a dar información e invitarle a participar de esta investigación. No tiene que decidir hoy si participar o no en esta investigación. Antes de decidirse, puede hablar con alguien que se sienta cómodo sobre la investigación. Puede que haya algunas palabras que no entienda. Por favor, me para según le informo para darle tiempo a explicarle. Si tiene preguntas más tarde, puede preguntarme a mí, al doctor que investiga o a miembros del equipo.

Se cree que la gingivitis y periodontitis se desarrollan por malos hábitos de higiene, pero principalmente a las bacterias que se adhieren a los dientes y de ahí pasan a la encía e invaden células que nos protegen alterando su comportamiento, y así evitando ser eliminados por estas. Lo anterior no solo repercute en la salud bucal sino también se cree que tener enfermedad periodontal puede desencadenar otros padecimientos como: artritis reumatoide, enfermedades cardio-vasculares y diabetes. Debido a esto nuestro equipo de investigación pretende conocer algunas de las alteraciones que sufren estas células para entender mejor estos padecimientos y abordarlos desde un nuevo punto de vista.

En esta investigación se tomaran una sola muestra de encía derivada de su tratamiento odontológico por el cual asistió a esta clínica. Cabe mencionar que el procedimiento lo hará un odontólogo y este procedimiento se llevara de manera habitual.



## Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Sinaloa Consentimiento informado

Nombre: \_\_\_\_\_  
Fecha: \_\_\_\_\_ Código: \_\_\_\_\_

He aceptado participar en el proyecto de investigación titulado “Caracterización del estado de activación y maduración de células dendríticas de tejido gingival sano y con enfermedades periodontales”, el cual, ha sido revisado y aprobado por el H. Comité Ética de la Facultad de Odontología. El objetivo de esta investigación pretende conocer algunas de las alteraciones que sufren estas células para entender mejor estos padecimientos y abordarlos desde un nuevo punto de vista.

Planeamos obtener tejido inflamado que rodea al diente (encía), en los cuales esté indicada su extracción debido al grado de enfermedad periodontal. Se le está solicitando donar su tejido periodontal porque usted cumple con los criterios de inclusión de este estudio, y de aceptar, no se afectará de manera absoluta el procedimiento para la extracción, el tratamiento médico post extracción que se le indique o la elección del Odontólogo que usted escogió. Si está de acuerdo, nosotros obtendremos de usted la siguiente información y la siguiente muestra biológica:

- Historia Clínica – Se le solicitará la siguiente información: Nombre completo, fecha y lugar de nacimiento, estado civil, ocupación, domicilio actual, padecimiento actual, antecedentes patológicos heredofamiliares y personales, toxicomanías (tabaco, alcohol, alguna otra droga), si está tomando algún medicamento actualmente, alergias, en caso de ser mujer si se encuentra embarazada.
- Muestra Biológica – Se recolectará el tejido periodontal inmediatamente después de tratamiento periodontal por el que acude esta clínica. La muestra se colocará en un medio de transporte para evitar contaminación o infección y se llevará al laboratorio para su análisis correspondiente.

Cualquier cosa que sepamos de usted en este estudio se mantendrá de manera estrictamente confidencial así como los datos de su historia clínica (archivos encriptados). Si publicamos los resultados del estudio en un artículo de una revista médica o en un libro, nosotros no lo identificaremos a usted de ninguna manera.

Sé que no habrá beneficios para mi persona y que no se me recompensará. Se me ha proporcionado el nombre de un investigador que puede ser fácilmente contactado usando el nombre y la dirección que se me ha dado de esa persona.

He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que me afecte en ninguna manera mi cuidado médico.

**Su firma indica que usted ha decidido tomar parte en este proyecto y que ha leído y entendido la información proporcionada y explicada personalmente.**

\_\_\_\_\_  
Firma de/la donador(a)

\_\_\_\_\_  
Firma del testigo

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de la persona que obtuvo el consentimiento informado.

FACULTAD DE ODONTOLÓGIA de la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA  
 INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nombre: \_\_\_\_\_  
 Sexo: \_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_ Ocupación: \_\_\_\_\_ Dirección: \_\_\_\_\_  
 Teléfono: \_\_\_\_\_ Alumno que lo atendió: \_\_\_\_\_

|            |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
|------------|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| Vestibular | M   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | M   |
|            | CPO |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | CPO |
|            | IG  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | IG  |
|            | II  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | II  |
|            | PB  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | PB  |
|            | OD  | 18 | 17 | 16 | 15 | 14 | 13 | 12 | 11 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | OD  |

|          |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
|----------|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| Palatino | OD  | 18 | 17 | 16 | 15 | 14 | 13 | 12 | 11 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | OD  |
|          | PB  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | PB  |
|          | II  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | II  |
|          | IG  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | IG  |
|          | CPO |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | CPO |
|          | M   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | M   |

|            |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
|------------|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| Vestibular | M   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | M   |
|            | CPO |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | CPO |
|            | IG  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | IG  |
|            | II  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | II  |
|            | PB  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | PB  |
|            | OD  | 48 | 47 | 46 | 45 | 44 | 43 | 42 | 41 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | OD  |

|         |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
|---------|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| Lingual | OD  | 48 | 47 | 46 | 45 | 44 | 43 | 42 | 41 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | OD  |
|         | PB  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | PB  |
|         | II  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | II  |
|         | IG  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | IG  |
|         | CPO |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | CPO |
|         | M   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | M   |

**INDICE GINGIVAL**

OD 16 12 24 44 42 36 si no estan 17 11 25 45 31 37

Se revisan cuatro zonas por OD: papila DV, margen vestibular, papila MV y margen palatino o lingual.

CPO

| ELEMENTOS | CONDICIÓN          |
|-----------|--------------------|
| 0         | Salud              |
| 1         | Obturado           |
| 2         | Perdido por caries |
| 3         | Extracción total   |
| 4         | aus                |
| 5         | No aplicable       |

**CODICIA**

- 0 Escala normal rosa pálida y textura de cilios de nariz
- 1 Inflamación leve con ligero ensanchamiento gingival de hemorragia al sondar
- 2 Inflamación moderada, color rojo con hemorragia al sondar
- 3 Inflamación severa, con ensanchamiento y sangrado espontáneo

I. Carta de aceptación del protocolo aprobado por el comité de ética.



**COMITÉ DE ÉTICA**  
**Facultad de Odontología.**

Con fecha del 04 de Febrero del 2015, se reunió el Comité de Ética de la Facultad de Odontología, para evaluar el protocolo de investigación "Estudio de células dendríticas y microbiota en individuos con enfermedad periodontal y establecimiento de un modelo experimental", el cual fue presentado por la Dra. Elsa Maribel Aguilar Medina con anterioridad a todos los integrantes del comité, y en la reunión se discutieron los aspectos éticos sobre confidencialidad, respeto a los derechos de los pacientes, posibles riesgos y la aportación del presente estudio al cuerpo del conocimiento de esta enfermedad.

El dictamen del comité fue: **APROBADO**

Presidente.  
Dra. Anabell Cárdenas Valdéz

Secretario.  
Dra. Carmen Flores Grajeda

Vocales  
Dra. María de Lourdes Verdugo Barraza  
Dra. Gloria Yolanda Castro Salazar  
Dr. Alfredo Uriarte Munguía



Culiacán, Sinaloa, México, a 05 de Febrero del 2015.

J. Presentación en congresos



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

A TRAVÉS DE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS , FACULTAD DE MEDICINA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA EN CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, FACULTAD DE AGRONOMÍA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN APLICADA PARA LA SALUD PÚBLICA



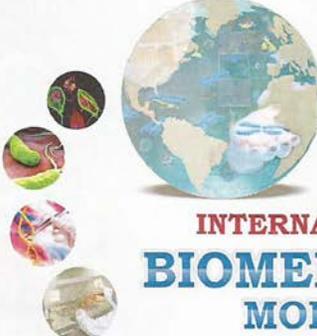
OTORGA LA PRESENTE

# Constancia

A

**XITLALIC GERALDINE GASTÉLUM ROSALES**

POR SU **ASISTENCIA** AL



**PRIMER  
CONGRESO  
INTERNACIONAL DE  
BIOMEDICINA  
MOLECULAR**

REALIZADO DEL 25 AL 28 DE NOVIEMBRE DE 2015, EN LA CIUDAD DE MAZATLÁN, SINALOA, MÉXICO.

ATENTAMENTE  
**"SURSUM VERSUS"**  
CULIACÁN ROSALES SINALOA, MÉXICO 28 DE NOVIEMBRE DE 2015



**DR. JUAN EULOGIO GUERRA LIERA**  
RECTOR DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA



**DRA. SYLVIA PAZ DÍAZ CAMACHO**  
PRESIDENTA DEL COMITÉ ORGANIZADOR





Consorcio de  
Universidades  
Mexicanas  
UNA ALIANZA DE CALIDAD POR LA EDUCACIÓN SUPERIOR

La **Universidad Autónoma de Sinaloa**  
a través de la **Facultad de Ciencias Químico Biológicas**  
y el **Consorcio de Universidades Mexicanas**

Otorgan la presente

# CONSTANCIA

a: **GASTÉLUM ROSALES XITLALIC GERALDINE**

Por su asistencia a la **2ª Sesión de la 9ª Cátedra Nacional de CUMex**, realizada del 27 al 28 de noviembre de 2014 en Culiacán, Rosales, Sinaloa, México.

9<sup>na</sup>

Cátedra Nacional  
de Química CUMex

"Dr. Mario Molina"

2ª Sesión

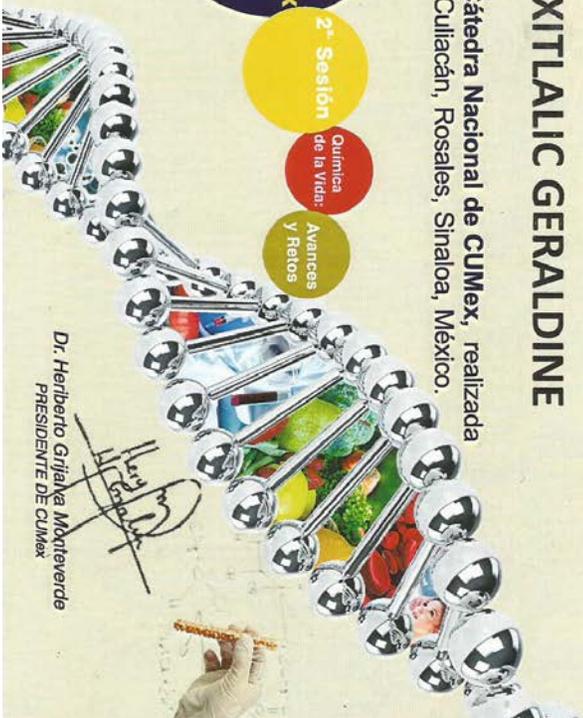
Química  
de la Vida

Avances  
y Retos

Dr. Juan Eugenio Guerra Liera  
RECTOR UAS

Dr. Jorge Millán Carrillo  
DIRECTOR FCQB

Dr. Heriberto Grijalva Moxteverde  
PRESIDENTE DE CUMEX





# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

A TRAVÉS DE LA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS, FACULTAD DE MEDICINA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA EN CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, FACULTAD DE AGRONOMÍA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN APLICADA PARA LA SALUD PÚBLICA



OTORGA LA PRESENTE

# Constancia

A

**GASTÉLUM ROSALES X.G., RAMOS PAYÁN R., ROMERO QUINTANA J. G.,  
AYALA HAM A. R., FLORES ROMO J. L., AGUILAR MEDINA E. M.**

POR SU PARTICIPACIÓN COMO **PONENTES** EN EL **TRABAJO LIBRE**

**Detección de bacterias periodontales presentes en placa dental  
en pacientes con gingivitis y periodontitis.**

PRESENTADO EN EL



REALIZADO DEL 25 AL 28 DE NOVIEMBRE DE 2015, EN LA CIUDAD DE MAZATLÁN, SINALOA, MÉXICO.

ATENTAMENTE

*"SURSUM VERSUS"*

CULIACÁN ROSALES SINALOA, MÉXICO, 28 DE NOVIEMBRE DE 2015

**DR. JUAN EULOGIO GUERRA LIERA**  
RECTOR DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

*Sylvia Paz Díaz Camacho*  
**DR.A. SYLVIA PAZ DÍAZ CAMACHO**  
PRESIDENTA DEL COMITÉ ORGANIZADOR

