

Descripción de la microbiota subgingival de sujetos mexicanos con periodontitis crónica

Argelia Almaguer-Flores,* Velia Jacobo-Soto,** Luis Octavio Sánchez-Vargas,* Mónica Lara-Córdoba,[§]
Eulalio Alcántara-Maruri,^{||} Laurie Ann Ximénez-Fyvie[¶]

RESUMEN

Introducción: Las enfermedades periodontales son infecciones causadas por microorganismos que colonizan la cavidad oral en una estructura compleja llamada biopelícula. **Objetivo:** Describir la microbiota subgingival de pacientes mexicanos con periodontitis crónica. **Metodología:** A 56 pacientes (33 con periodontitis crónica y 23 periodontalmente sanos) les fueron tomadas muestras de placa dentobacteriana subgingival. Las muestras fueron evaluadas microbiológicamente utilizando la técnica "checkerboard" para hibridaciones DNA-DNA. **Resultados:** Todas las especies evaluadas fueron detectadas tanto en sujetos periodontalmente sanos como con periodontitis crónica. El análisis de las muestras de los sujetos de estudio mostró que *P. gingivalis* ($p < 0.001$), *T. forsythensis* ($p < 0.01$), *T. denticola* y *A. actinomycetemcomitans* ($p < 0.05$) presentaron cuentas promedio significativamente mayores en la población de sujetos con periodontitis crónica. Los pacientes con periodontitis, mostraron además proporciones más elevadas de especies del complejo "rojo" y menores proporciones de especies de *Actinomyces* y de especies del complejo "amarillo" cuando fueron comparados con pacientes periodontalmente sanos. **Conclusiones:** Debido a la complejidad de la microbiota subgingival en sujetos mexicanos y a las diferencias con reportes provenientes de otras poblaciones, es necesario profundizar en el conocimiento y entendimiento del papel de las bacterias que intervienen en el proceso de la enfermedad periodontal en nuestro país. De esta manera, podremos ofrecer a los pacientes mexicanos, tratamientos basados en el conocimiento de las características microbiológicas propias de nuestra población.

ABSTRACT

Introduction: Periodontal diseases are infections, caused by microorganisms that colonize oral surfaces in a complex structure called biofilm. **Purpose:** To describe the microbial composition of subgingival plaque samples in Mexican subjects with chronic periodontitis. **Methods:** 56 patients (33 with chronic periodontitis and 23 periodontally healthy) were included in the study. Subgingival plaque samples were evaluated using the "checkerboard" DNA-DNA hybridization technique. **Results:** Mean DNA probe counts were significantly higher in chronic periodontitis subjects for *P. gingivalis* ($p < 0.001$), *T. forsythensis* ($p < 0.01$) and for *T. denticola* and *A. actinomycetemcomitans* ($p < 0.05$). Chronic periodontitis subjects also exhibited significantly higher proportions of "red" complex species and significantly lower proportions of *Actinomyces* species and microorganisms included in the "yellow" complex when compared with healthy subjects. **Conclusions:** Due to the complexity of the subgingival microbiota detected in Mexican subjects and the differences found with other subject populations, future studies are necessary to aid in the understanding of the role of specific bacterial species in the disease process in our country and the efficacy of periodontal therapies.

Palabras clave: Microbiota subgingival, pacientes mexicanos, periodontitis crónica.

Key words: Subgingival plaque, mexican subjects, chronic periodontitis.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades periodontales son infecciones^{20,41} causadas por microorganismos que colonizan la superficie dental y la bolsa periodontal, formando una estructura compleja llamada biopelícula.^{8,27,40}

El desarrollo altamente orquestado de la placa dentobacteriana ha sido ampliamente estudiado^{22,25,26,42,50} y se han realizado grandes esfuerzos en el campo de la microbiología periodontal para determinar la identidad de las especies bacterianas responsables de la iniciación y progreso de la enfermedad periodontal, así como los mecanismos bacterianos y del paciente que intervienen en los procesos de destrucción de los tejidos de soporte

del diente.^{19,28,30,31,44,47} Esto ha representado un reto en la odontología y particularmente en el campo de la periodoncia debido a la gran diversidad de especies bacterianas que forman parte de la flora bucal,^{31,32} la dificultad o

-
- * Alumnos del Doctorado del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, UNAM.
 - ** Ayudante de Profesor de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, UNAM.
 - § Egresada de Licenciatura de la Facultad de Odontología, UNAM.
 - || Técnico Laboratorista de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, UNAM.
 - ¶ Jefa de Laboratorio de Genética Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología.

imposibilidad técnica para obtener una muestra cultivable completa de placa dentobacteriana, y a la presencia de especies patógenas en pacientes periodontalmente sanos.^{17,19,47,49,51} Por tales motivos, continúa la búsqueda de la especie bacteriana o grupo de microorganismos responsables de causar la pérdida de los tejidos de soporte del diente.

Las especies más frecuentemente asociadas a estados de enfermedad periodontal, así como las más ampliamente estudiadas son *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y miembros de los complejos bacterianos "naranja y rojo" descritos por Socransky y cols. en 1998,⁴² tales como *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*), *Fusobacterium nucleatum*, *Micromonas micros* (*Peptostreptococcus micros*), *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Eikenella corrodens* y *Campylobacter rectus*, entre otros.^{14,24,29,33-35}

Estudios realizados en diversos países han descrito la composición microbiológica de muestras de placa dentobacteriana de sujetos con diferentes tipos de enfermedad periodontal así como en pacientes periodontalmente sanos.^{5,6,10,11,21,23,38,48} Dichos estudios, han reportado importantes diferencias en la microbiota subgingival en diferentes poblaciones del mundo y reflejan la preocupación que existe de obtener un panorama global de la ecología bacteriana periodontal, así como de las posibles implicaciones clínicas y terapéuticas de dichas diferencias.

El objetivo del presente estudio fue describir la microbiota subgingival de pacientes mexicanos con periodontitis crónica y periodontalmente sanos utilizando la técnica de "Checkerboard" para hibridaciones DNA-DNA.⁴⁵

MÉTODOS

Diseño experimental

Se realizó un estudio transversal en el que fueron evaluadas hasta 28 muestras de placa dentobacteriana subgingival de cada uno de 56 sujetos de estudio. Todas las muestras (n = 1,407) fueron analizadas para determinar las cuentas, prevalencia y proporción de 40 especies bacterianas.

Criterios de selección

La población de estudio consistió en 33 sujetos con periodontitis crónica y 23 sujetos periodontalmente sanos, mexicanos por nacimiento de 22 a 75 años de edad, no fumadores, con un mínimo de 20 dientes naturales en boca (excluyendo terceros molares), que

no tomaron antibióticos sistémicos en los 3 meses previos a la recolección de muestras y que no habían recibido tratamientos periodontales en el pasado. Clínicamente los sujetos con periodontitis crónica presentaron por lo menos 8 sitios con nivel de inserción (NI) ≥ 5 mm, y los sujetos periodontalmente sanos presentaron 4 sitios o menos con NI de 4 mm y 0 (cero) sitios con NI ≥ 5 mm. Aquellos sujetos que padecían enfermedades sistémicas tales como diabetes, VIH/SIDA y enfermedades autoinmunes, fueron excluidos del estudio. El *cuadro I* proporciona una descripción de las poblaciones que fueron incluidas en el estudio.

Evaluación clínica

El propósito y naturaleza del estudio fueron explicados a cada sujeto. A quienes posteriormente, se les pidió que firmaran una forma de consentimiento informado con lo cual se estableció el deseo voluntario de participar en el estudio. Cada sujeto de estudio recibió una evaluación periodontal completa realizada por clínicos calibrados para este propósito. Los siguientes parámetros clínicos fueron evaluados: profundidad de bolsa (PB) (mm), nivel de inserción (mm), sangrado al sondeo (0/1), enrojecimiento gingival (0/1), supuración (0/1) y acumulación de placa (0/1). Todas las mediciones fueron tomadas de un máximo de 168 sitios por sujetos (6 sitios por diente: mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesiolingual), de acuerdo con procedimientos previamente descritos.⁴³ La PB y el NI fueron registrados dos veces, y el promedio de ambas mediciones fue considerado para los análisis de datos.

Evaluación microbiológica

Las evaluaciones microbiológicas fueron realizadas mediante la técnica de "checkerboard" para hibridaciones DNA-DNA.⁴⁵

Especies bacterianas y condiciones de cultivo

La lista de las 40 especies bacterianas utilizadas para la elaboración de sondas de DNA se presenta en el *cuadro II*. Todas las cepas fueron adquiridas como cultivos liofilizados del American Type Culture Collection (ATCC). Las cepas fueron rehidratadas en caldo para *Mycoplasma* y cultivadas en agar CDC anaeróbico (BBL) a 35°C dentro de una cámara de anaerobiosis (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) (exceptuando *Neisseria mucosa*, cultivada aeróbicamente). Las cepas que se mencionan a continuación fueron sembradas en

medios suplementados: *Campylobacter sp.*: medio enriquecido superficialmente con 0.5 mL de formato (60 mg/mL)-fumarato (60 mg/mL); *Tannerella forsythensis*: medio enriquecido con ácido N-acetilmurámico (10 µg/mL); *Porphyromonas gingivalis* y *Porphyromonas endodontalis*: medio enriquecido con menadione (0.3 µg/mL) y hemina (5 µg/mL); *Treponema denticola*: caldo para *Mycoplasma* con glucosa (1 mg/mL), niacinamida (400 µg/mL), tetrahidrocloreuro

de esparmina (150 µg/mL), isobutirato de sodio (20 µg/mL), L-cisteína (1 mg/mL), pirofosfato de tiamina (5 µg/mL) y suero bovino (0.5%).

Purificación de DNA y preparación de sondas

Las cepas fueron cultivadas bajo condiciones anaeróbicas sobre la superficie de agar (exceptuando *T. denticola*, cultivada en caldo) durante 3 a 7 días. El crecimiento fue recolectado y colocado en tubos para microcentrifugación de 1.5 mL con 1 mL de buffer TE (Tris-HCl (10 mM), EDTA (0.1 mM), pH 7.6). Las células fueron lavadas dos veces en buffer TE mediante centrifugación a 3,500 rpm durante 10 min. Las especies Gram-negativas fueron lisadas con SDS (10%) y proteinasa K (20 mg/mL) y las Gram-positivas con lisozima (15 mg/mL) y achromopeptidasa (5 mg/mL). Las células fueron resuspendidas e incubadas a 37°C durante 1 h. El DNA fue aislado y purificado utilizando la técnica descrita por Smith y cols.³⁹ La concentración y pureza del DNA fueron determinadas utilizando mediciones espectrofotométricas. Las sondas de DNA fueron preparadas mediante el marcaje de 1 µg de DNA con digoxigenina utilizando la técnica de primers aleatorios (random primer technique).¹⁵

Cuadro I. Características clínicas de los grupos de estudio (media ± EEM*).

	Periodontitis crónica	Sanos
N	33	23
% Mujeres	30.3	47.8
Edad	45.9 ± 2.1	29.6 ± 1.6
No. de dientes faltantes	3.6 ± 0.4	1.4 ± 0.4
PB promedio (mm)	4.1 ± 0.2	2.0 ± 0.1
NI promedio (mm)	4.5 ± 0.2	2.0 ± 0.1
% Sitios con:		
Placa	48.0 ± 6.6	19.0 ± 5.5
Enrojecimiento	27.5 ± 5.8	3.6 ± 1.9
Sangrado al sondeo	47.6 ± 4.5	3.0 ± 1.0
Supuración	7.6 ± 1.7	0 ± 0

* Error estándar de la media.

Cuadro II. Cepas de referencia utilizadas para la elaboración de sondas de DNA.

Especie	Cepa a	Especie	Cepa a
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	b	<i>Micromonas micros</i>	33270
<i>Actinomyces georgiae</i>	49285	<i>Neisseria mucosa</i>	19696
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406
<i>Actinomyces naeslundii stp. 1</i>	12104	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929	<i>Prevotella intermedia</i>	25611
<i>Actinomyces viscosus</i>	43146	<i>Prevotella melaninogenica</i>	26845
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563
<i>Campylobacter rectus</i>	33238	<i>Propionibacterium acnes</i>	6919
<i>Campylobacter showae</i>	51146	<i>Selenomonas artemidis</i>	43528
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	<i>Selenomonas noxia</i>	43541
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	27872	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	14266	<i>Streptococcus gordonii</i>	10558
<i>Eikenella corrodens</i>	23834	<i>Streptococcus intermedius</i>	27335
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271	<i>Streptococcus mitis</i>	49456
<i>Eubacterium sulci</i>	35585	<i>Streptococcus oralis</i>	35037
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	c	<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693	<i>Tannerella forsythensis</i>	43037
<i>Gemella morbillorum</i>	27824	<i>Treponema denticola</i>	35405
<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201	<i>Veillonella parvula</i>	10790

a Cepas de referencia del American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA; bDNA de los serotipos a (43717) y b (43718) fue combinado para generar una sola sonda de DNA; cDNA de las subespecies nucleatum (25586), polymorphum (10953) y vincenti (49256) fue combinado para generar una sola sonda de DNA.

Recolección y procesamiento de muestras

Las muestras de placa dentobacteriana subgingival ($n = 1,407$) fueron tomadas de los 28 sitios mesioves-tibulares de cada sujeto de estudio. La placa supra-gingival fue eliminada del sitio de muestreo y la placa subgingival recolectada utilizando curetas estériles. Las muestras fueron colocadas en tubos para micro-centrifugación de 1.5 mL individuales con 150 μ L de buffer TE. Se agregaron 100 μ L de NaOH (0.5 M) a cada tubo y las muestras fueron dispersadas. Los tubos fueron hervidos durante 10 min. y el pH neutralizado con 800 μ L de acetato de amonio (5 M). El DNA de cada muestra fue colocado en uno de los canales abierto de un Minislot-30, concentrado en una membrana de nylon de carga positiva de 15 x 15 cm y fijado a la membrana mediante entrecruzamiento con luz ultravioleta seguido por incubación a 120°C durante 20 min. Dos canales de estándares microbiológicos fueron colocados en cada membrana. Dichos estándares consistieron de mezclas ajustadas a 10^5 y 10^6 células de cultivos puros de todas las cepas bacterianas que fueron analizadas.

Hibridaciones DNA-DNA

Las membranas fueron incubadas a 42°C durante 1 h. en solución de prehibridación (formamida (50%), citrato salino estándar (5 x) (SSC) (SSC (1 x) = NaCl (150 mM), citrato de sodio (15 mM), pH 7.0), caseína (1%), solución Denhardt (5 x), fosfato de sodio (25 mM) (pH 6.5), RNA de levadura (0.5 mg/mL)). La membrana fue rotada 90° y colocada en un Miniblotter-45. Las sondas de DNA fueron diluidas a una concentración de aproximadamente 20 ng/mL en solución de hibridación (formamida (45%), SSC (5 x), solución Denhardt (1 x), fosfato de sodio (20 mM) (pH 6.5), RNA de levadura (0.2 mg/mL), sulfato de dextrano (10 %), caseína (1%)), colocadas en uno de los carriles individuales del Miniblotter-45 e hibridizadas una noche a 42°C. La concentración fue ajustada para que todas las sondas detectaran un rango de células entre 10^4 y 10^7 . Las membranas fueron lavadas dos veces durante 20 min. a 68°C en buffer de fosfato (SSC (0.1 x), SDS (0.1%)).

Detección y cuantificación de microorganismos

Las membranas fueron bloqueadas durante 1 h en buffer bloqueador (caseína (1%), buffer de maleato (ácido maleico (100 mM), NaCl (150 mM), pH 7.5)). Los híbridos fueron detectados incubando las membranas en una dilución de 1:50,000 de anticuerpo con-

tra digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina utilizando la modificación descrita por Engler-Blum y cols.¹³ Las membranas fueron lavadas e incubadas en un agente quimioluminiscente de detección (CDP-star) a temperatura ambiente durante 30 min. Las señales fueron detectadas mediante exposición a películas autorradiográficas durante 30 min. Las películas fueron reveladas y las imágenes capturadas digitalmente con el sistema de documentación DigiDoc (Bio-Rad). Las señales fueron convertidas a cuentas absolutas ajustando los valores de las señales de cada sonda en cada muestra a una curva de regresión lineal construida a partir de los estándares a 10^5 y 10^6 células.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos microbiológicos fueron expresados como media $\pm$ error estándar de la media (EEM), mediante 3 parámetros: niveles (cuentas de las sondas de DNA), prevalencia (% de sitios colonizados) y proporción (% de las cuentas de las sondas de DNA) de cada especie evaluada. Cada uno de los tres parámetros fueron calculados para cada especie bacteriana en cada muestra, promediados entre cada sujeto de estudio y después entre los sujetos de cada grupo. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas utilizando las pruebas U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis ajustando para comparaciones múltiples de acuerdo con procedimientos previamente descritos.⁴³

RESULTADOS

Las cuentas bacterianas promedio ($\times 10^5$, $\pm$ EEM) en 33 sujetos con periodontitis crónica y 23 sujetos periodontalmente sanos se presentan en la *figura 1*. Todas las especies evaluadas fueron detectadas tanto en sujetos periodontalmente sanos como con periodontitis crónica. Los sujetos con periodontitis crónica mostraron un rango promedio de cuentas bacterianas de 9.51 ± 2.45 (*Actinomyces viscosus*) a 0.30 ± 0.13 (*Porphyromonas endodontalis*) ($\times 10^5$), y los sujetos periodontalmente sanos de 8.61 ± 2.91 (*Actinomyces naeslundii* 1) a 0.24 ± 0.13 (*P. endodontalis*) ($\times 10^5$). Treinta y seis de las 40 especies evaluadas mostraron cuentas promedio mayores en sujetos con periodontitis crónica. Únicamente, *A. naeslundii* 1, *Streptococcus intermedius*, *Capnocytophaga sputigena* y *Campylobacter gracilis* presentaron cuentas promedio mayores en sujetos periodontalmente sanos. Las diferencias para dichas especies entre sujetos con periodontitis crónica y periodontalmente sanos no fueron estadísticamente significativas (ns) utilizando la prueba de Mann-Whitney. *A. viscosus*, *Corynebacte-*

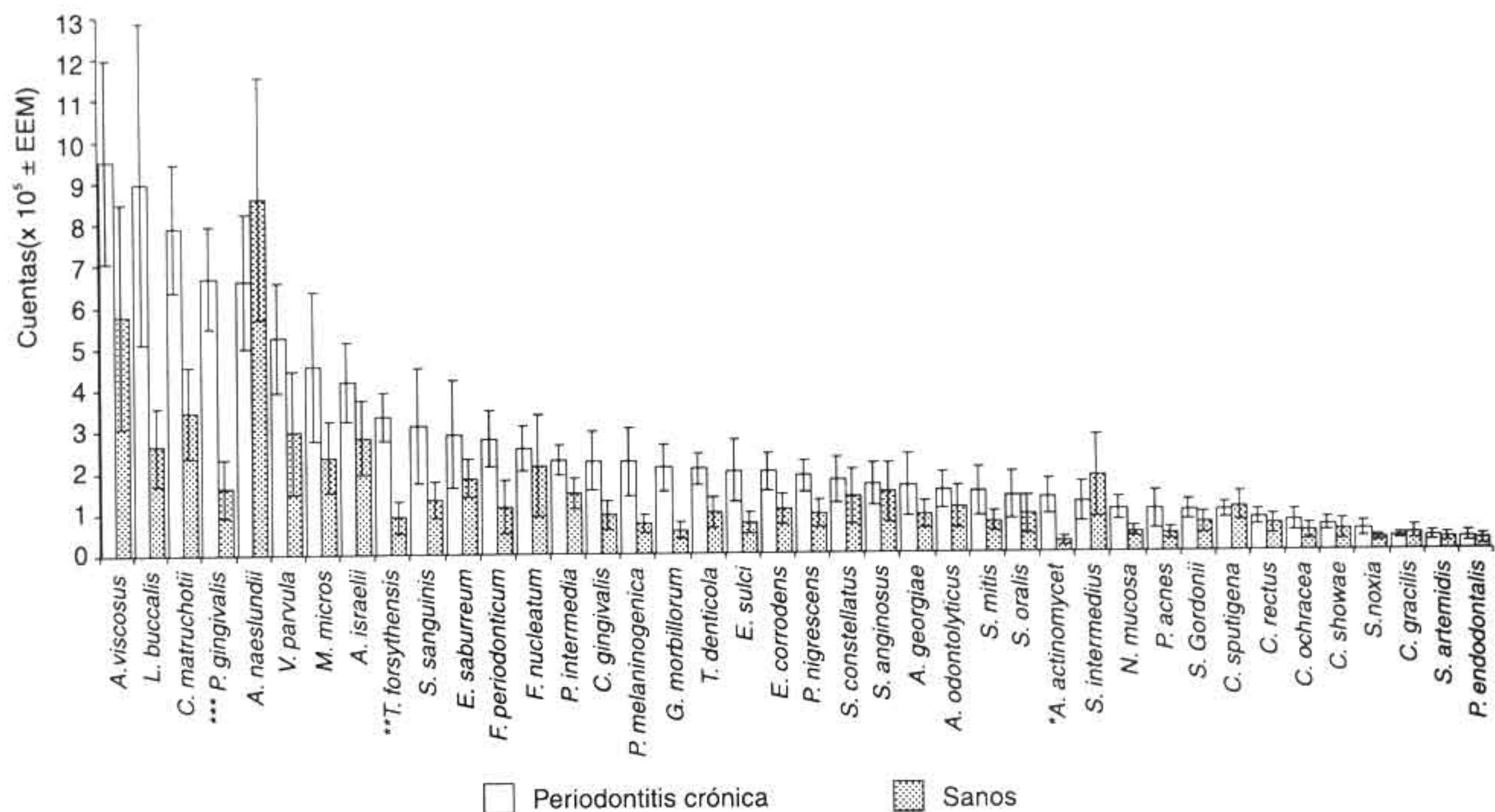


Figura 1. Cuentas bacterianas promedio (x10⁵ ± EEM) de 40 especies bacterianas en muestras tomadas de 56 sujetos de estudio (33 con periodontitis crónica y 23 periodontalmente sanos). Las cuentas de cada una de las 40 especies bacterianas fueron calculadas en cada una de las 28 muestras de cada sujeto de estudio, promediadas para cada sujeto y después entre los sujetos de cada una de las dos poblaciones de estudio. * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001 Prueba U de Mann-Whitney.

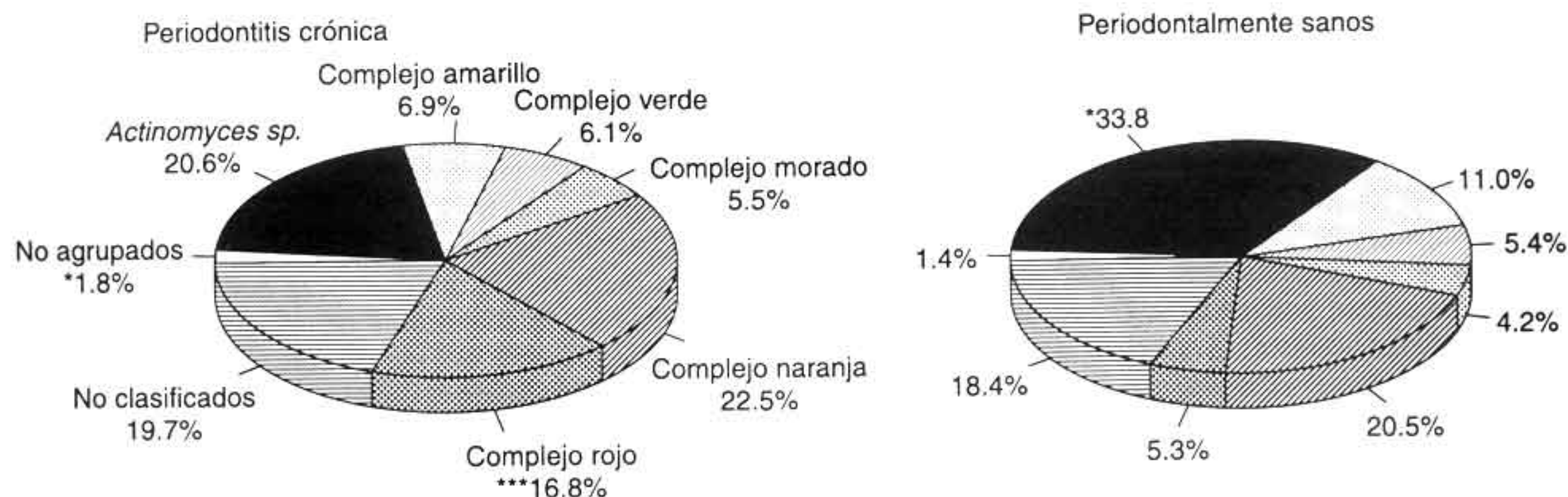


Figura 2. Proporción promedio (% de las cuentas totales de sondas de DNA) de complejos bacterianos en 33 sujetos con periodontitis crónica (izquierda) y 23 sujetos periodontalmente sanos (derecha). Las 40 especies bacterianas evaluadas fueron agrupadas de manera similar a la descripción de complejos bacterianos en la placa subgingival de Socransky y cols. 1998.³¹ Las siguientes excepciones fueron incluidas en la agrupación: *Actinomyces georgiae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* stp. 1 y *Actinomyces viscosus* se encuentran agrupados en el complejo azul (*Actinomyces* sp.); *Corynebacterium matruchotii*, *Gemella morbillorum*, *Leptotrichia buccalis*, *Neisseria mucosa*, *Propionibacterium acnes* y *Selenomonas artemidis* se encuentran agrupados en el complejo gris (No clasificados); *Streptococcus constellatus* fue incluido en el complejo amarillo; y *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas endodontalis*, *Eubacterium saburreum* y *Eubacterium sulci* fueron incluidos en el complejo naranja. La proporción de cada grupo de especies bacterianas fue calculada en cada una de las 28 muestras de cada sujeto de estudio, promediada para cada sujeto y después entre los sujetos de cada una de las dos poblaciones de estudio. * p < 0.05 y *** p < 0.001 Prueba U de Mann-Whitney.

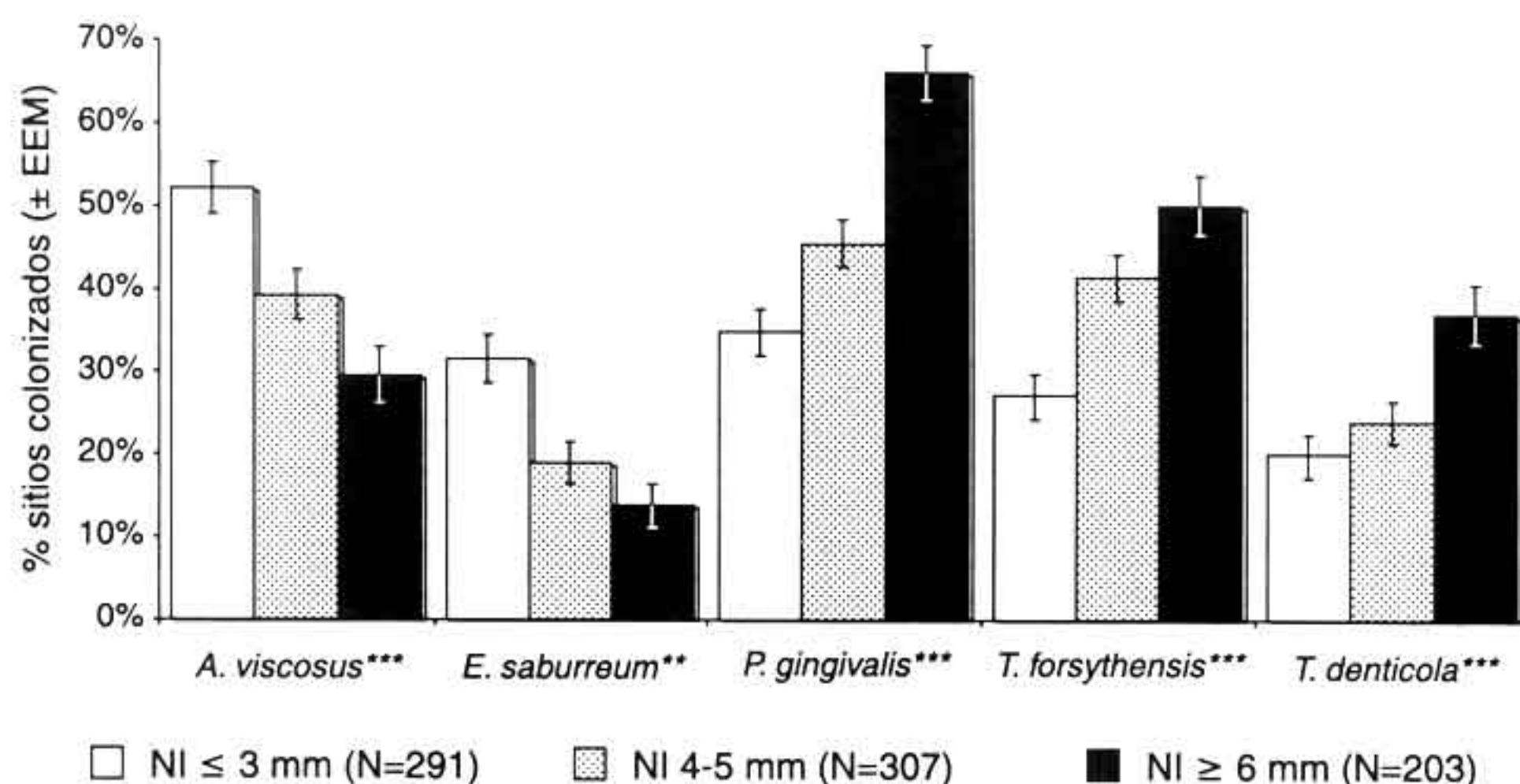


Figura 3. Prevalencia promedio (% de sitios colonizados $\pm$ EEM) de cuatro especies bacterianas en muestras de placa subgingival de 33 sujetos con periodontitis crónica tomadas de sitios con diferente nivel de inserción (NI). La prevalencia de cada especie bacteriana fue calculada mediante la determinación de su presencia o ausencia en cada una de las 28 muestras de cada sujeto de estudio. Los datos fueron promediados en sitios con NI ≤ 3 mm, de 4 a 5 mm y ≥ 6 mm de cada sujeto y después entre los sujetos de la población de estudio de acuerdo a los niveles de inserción especificados. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Prueba de Kruskal-Wallis.

rum matruchotii y *A. naeslundii* 1, estuvieron entre las 5 especies que presentaron las cuentas promedio más elevadas en las 2 poblaciones de estudio. Sin embargo, a diferencia del grupo periodontalmente sano en el que *Veillonella parvula* y *Actinomyces israelii* se incluyeron dentro de las especies con mayores cuentas promedio, en sujetos con periodontitis crónica *Leptotrichia buccalis* (ns) y *Porphyromonas gingivalis* ($p < 0.001$) se encontraron dentro de las 5 especies con mayores cuentas promedio. Tres especies, además de *P. gingivalis*, presentaron cuentas promedio significativamente mayores en la población de sujetos con periodontitis crónica: *Tannerella forsythensis* ($p < 0.01$), *Treponema denticola* ($p < 0.05$) y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ($p < 0.05$). En ambas poblaciones, *Campylobacter gracilis*, *Selenomonas artemidis*, *Selenomonas noxia* y *P. endodontalis* fueron las especies que presentaron las cuentas promedio más bajas.

En la figura 2 se presenta la proporción promedio de grupos de microorganismos en sujetos sanos y con periodontitis crónica. Las 40 especies bacterianas evaluadas fueron agrupadas de manera similar a la descripción de complejos bacterianos en la placa subgingival de Socransky y cols. 1998,⁴² las excepciones a dicha agrupación se describen al pie de la figura. Las diferencias más notables en la proporción de grupos de especies en las poblaciones de sujetos sanos y con periodontitis crónica consistieron en aumentos significativos en la proporción de especies del complejo "rojo" (*P. gingivalis*, *T. forsythensis* y *T. denticola*, $p <$

0.001), así como de especies "no agrupadas" (*S. noxia* y *A. actinomycetemcomitans*, $p < 0.05$) en sujetos con periodontitis crónica. Dichos aumentos parecieron estar relacionado con una disminución significativa de especies de *Actinomyces* ($p < 0.05$) en sujetos con periodontitis crónica. El resto de los grupos de especies no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las dos poblaciones de estudio.

En la figura 3 se muestra la prevalencia promedio (% de sitios colonizados, $\pm$ EEM) de cinco especies bacterianas en sitios con diferente nivel de inserción (≤ 3 mm, de 4 a 5 mm, y ≥ 6 mm) en pacientes con periodontitis crónica. Las 5 especies que se presentan en la figura fueron las únicas que presentaron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia detectada en sitios con diferente nivel de inserción (prueba de Kruskal-Wallis). *A. viscosus* ($p < 0.001$) y *E. saburreum* ($p < 0.01$) mostraron una prevalencia significativamente más elevada en sitios sanos (NI ≤ 3 mm) que en sitios con evidencia de pérdida de soporte (NI de 4 a 5 mm y ≥ 6 mm). Sin embargo, el porcentaje de sitios colonizados por *P. gingivalis*, *T. forsythensis* y *T. denticola* tendió a ser más elevado en sitios con mayor evidencia de pérdida de soporte que en sitios sanos ($p < 0.001$).

DISCUSIÓN

Las diferencias encontradas en el presente estudio entre la microbiota de muestras de placa dentobacte-

riana subgingival de sujetos mexicanos periodontalmente sanos y con periodontitis crónica confirman a grandes rasgos descripciones previas en la literatura. Los sujetos periodontalmente sanos presentaron altos niveles y proporciones de muchas especies consideradas como "benéficas", mientras que en contraste, los sujetos con enfermedad periodontal presentaron significativamente mayores niveles y proporciones de patógenos putativos.^{9,19,31,46,51} Sin embargo, al comparar la proporción de especies que forman el complejo "rojo" (*P. gingivalis*, *T. forsythensis* y *T. denticola*) en pacientes con periodontitis crónica, los sujetos mexicanos presentaron un porcentaje significativamente mayor que el reportado en otros estudios en los que fue utilizada la misma técnica de identificación, pero fueron evaluados sujetos norteamericanos. Ximénez-Fyvie y cols.⁵¹ reportaron una proporción de especies del complejo "rojo" de 7.0% y Haffajee y cols.¹⁷ del 6.8% en muestras de placa subgingival de sujetos con periodontitis crónica. Nuestros resultados mostraron una proporción semejante en sujetos sanos (5.3%), pero una proporción significativamente mayor de aproximadamente 17% en pacientes con periodontitis crónica. Este aumento tan significativo de la proporción de especies del complejo "rojo" en nuestra población de estudio podría deberse por un lado a que los sujetos con periodontitis crónica presentaban una severidad mayor de la enfermedad en términos clínicos a la reportada en otros estudios. Es razonable suponer que a mayor severidad de la enfermedad, mayor carga bacteriana, especialmente de especies patógenas, esta suposición ha sido sustentada con anterioridad en otros estudios.^{29,30,47} Otra posible causa de dicha diferencia podría deberse a que en la presente investigación se estudió una población que nunca había recibido tratamiento periodontal durante el curso de su vida.

Existe un número limitado de estudios hechos en poblaciones que no han recibido tratamiento periodontal,^{3,6,12,48} dichos estudios están, casi por completo realizados en poblaciones de países en vías de desarrollo en donde la atención básica odontológica es aún insuficiente. Estos estudios sin embargo, nos permiten observar las diferencias entre la flora bacteriana de sujetos que ya han recibido tratamiento periodontal y aquéllos en los que ésta nunca ha sido perturbada. Timmerman y cols.,⁴⁸ utilizando técnicas de cultivo tradicionales, estudiaron la microbiota subgingival de una población en Indonesia. Sus resultados mostraron una alta prevalencia de *P. gingivalis* (67%), *P. intermedia* (66%), *F. nucleatum* (79%) y *A. actinomycetemcomitans* (40%), todas mayores que las reportadas en nuestra población de estudio (52%, 30%, 37% y 26%

respectivamente). Mientras que Colombo y cols.⁶ utilizando la técnica de "checkerboard" estudiaron en Brasil un grupo de sujetos con periodontitis que nunca habían recibido tratamiento periodontal, sus resultados muestran una prevalencia para las especies anteriormente señaladas de aproximadamente el 58%, 55%, 56% y 41% respectivamente, estos hallazgos reflejan una discreta similitud con lo reportado en nuestro estudio. Esto podría interpretarse en el sentido de que la población de México es mucho más semejante a la brasileña, empezando por el hecho de ser poblaciones residentes del mismo continente. Sin embargo, un estudio hecho con la misma técnica de identificación realizado en una población de indígenas de Centroamérica¹² reporta hallazgos microbiológicos que cuestionan esta suposición, sus resultados muestran, independientemente del estado de salud periodontal y de la presencia extendida de cálculo y signos visibles de inflamación una prevalencia de especies patógenas como *P. gingivalis* (31%), *T. forsythensis* (11%) y *T. denticola* (2%), prevalencias significativamente más bajas que las reportadas en el presente estudio, además reportaron una prevalencia significativamente mayor de especies como *A. naeslundii* 1 (79%), *A. viscosus* (54%), *V. parvula* (60%) y *S. oralis* (64%), y no detectaron a *A. actinomycetemcomitans* en ninguna de las muestras analizadas. Estos hallazgos nos llevan inevitablemente a preguntarnos si las diferencias que existen entre la microbiota subgingival de sujetos en diversas partes del mundo son relevantes y más importante aún, si estas diferencias podrían significar cambios en las terapias periodontales que actualmente se llevan a cabo en nuestro país.

Aunque se considera que la situación geográfica de una población, puede repercutir en el medio ambiente y la ecología, y por consecuencia afectar la flora bucal,¹ el estudio de las diferencias en la composición de la placa dentobacteriana entre diversas poblaciones también ha sido limitado,^{5,6,10-12,21,23,38,48} Reportes con los que actualmente contamos reflejan claramente que existen diferencias. Dogan y cols.¹¹ hicieron un estudio en donde detectaron seis patógenos periodontales en una población de Turquía en sujetos con diferentes tipos de enfermedad periodontal (periodontitis agresiva localizada, periodontitis agresiva generalizada y periodontitis crónica) y concluyeron que en el grupo de periodontitis crónica generalizada, *P. gingivalis* y *T. forsythensis* presentaban una proporción mayor (18% y 7.7%) a la reportada en otras poblaciones, excepto cuando era comparada con poblaciones asiáticas.^{5,23} Hamlet y cols.²¹ reportaron la distribución natural de tres periodontopatógenos (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *P. in-*

termia) en una población en Australia formada por sujetos predominantemente sanos, concluyeron que estos tres microorganismos forman parte de la flora bucal normal en esa población. Sin embargo, un dato interesante fue reportado por Dowsett y cols.¹² en donde no fue detectada en ninguna muestra analizada *A. actinomycetemcomitans*, una bacteria que frecuentemente ha estado asociada a la enfermedad periodontal^{37,52} y que en los estudios antes mencionados fue reportada como parte de la flora normal de los sujetos de estudio. En un estudio hecho en Brasil⁶ además de haber detectado una presencia importante de patógenos periodontales frecuentemente encontrados en pacientes con periodontitis, también fue reportada la presencia de bacterias entéricas como *E. faecalis* y *E. coli*, lo cual corresponde a hallazgos hechos en otros estudios,^{10,38} en donde las poblaciones muestran una presencia importante de estas especies bacterianas raramente estudiadas.

Finalmente, es claro que aún tenemos un reto ante nosotros, aunque cada vez contamos con más información de la presencia y características de las enfermedades periodontales en poblaciones de diferentes países con características muy diversas (geográficas, étnicas, etc.),^{2,4,7,16,36} todavía tenemos la necesidad de responder una pregunta muy importante: la efectividad de diversas terapias periodontales en poblaciones como la nuestra, con características microbiológicas y clínicas diferentes a las comúnmente reportadas en países desarrollados.^{18,20,40}

CONCLUSIONES

- Debido a la complejidad de la microbiota subgingival encontrada en sujetos mexicanos independientemente de su estado periodontal, es claro, que necesitamos profundizar en el conocimiento y entendimiento del papel que desempeñan las bacterias que forman la placa dentobacteriana.
- Teniendo un panorama más claro de la ecología de esta microflora, podremos ofrecer a los pacientes mexicanos, tratamientos basados en el conocimiento de las características microbiológicas propias de nuestra población.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue financiado en parte por los proyectos J34909-M (CONACYT) e IN205402 (PA-PIIT, DGAPA, UNAM) de la Dra. Ximenez-Fyvie, y por la Facultad de Odontología, UNAM.

Los autores agradecen las facilidades y el apoyo clínico proporcionado por las Doctoras Magdalena

Paulín-Pérez y Guadalupe Marín-González del Departamento de Periodoncia de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, UNAM.

REFERENCIAS

1. Albandar J. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol 2000* 2002; 29: 177-206.
2. Albandar J. Periodontal diseases in North America. *Periodontol 2000* 2002; 29: 31-69.
3. Ali RW, Johannessen AC, Dahlen G, Socransky SS, Skaug N. Comparison of the subgingival microbiota of periodontally healthy and diseased adults in Northern Cameroon. *J Clin Periodontol* 1997; 24(11): 830-5.
4. Baelum V, Scheutz F. Periodontal diseases in Africa. *Periodontol 2000* 2002; 29: 79-103.
5. Choi B, Park S, Yoo Y, Choi S, Chai J, Cho K, Kim C. Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced adult periodontitis patients using a nucleic acid-based approach. *J Periodontol* 2000; 71(9): 1387-94.
6. Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Souto R, Rosalem WJ, Mendes MC, Uzeda M. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002; 73(4): 360-9.
7. Corbet E, Zee K, Lo E. Periodontal diseases in Asia and Oceania. *Periodontol 2000* 2002; 29: 122-52.
8. Costerton J, Cook G, Lamont R. The community architecture of biofilms: dynamic structures and mechanisms. In: Newman HN & Wilson M, ed. *Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease*. Eastman Dental Institute, University College London 1999; 5-14.
9. Dahlen G, Manji F, Baelum V, Fejerskov O. Putative periodontopathogens in "diseases" and "non-diseases" persons exhibiting poor oral hygiene. *J Clin Periodontol* 1992; 19(1): 35-42.
10. Dahlen G, Wikstrom M. Occurrence of enteric rods, staphylococci and *Candida* in subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol* 1995; 10(1): 42-6.
11. Dogan B, Antinheimo J, Cetiner D, Bodur A, Emingil G, Buduneli E, Uygur C, Firatli E, Lakio L, Asikainen S. Subgingival microflora in Turkish patients with periodontitis. *J Periodontol* 2003; 74(6): 803-14.
12. Dowsett SA, Kowolik MJ, Archila LA, Eckert GJ, LeBlanc DJ. Subgingival microbiota of indigenous Indians of Central America. *J Clin Periodontol* 2002; 29(2): 159-67.
13. Engler-Blum G, Meier M, Frank J, Muller GA. Reduction of background problems in nonradioactive Northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than 32P-based hybridizations. *Anal Biochem* 1993; 210(2): 235-44.
14. Ezzo P, Cutler C. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontol 2000* 2003; 32: 24-35.
15. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983; 132(1): 6-13.
16. Gjermo P, Rosing C, Susin C, Oppermann R. Periodontal diseases in Central and South America. *Periodontol 2000* 2002; 29: 70-8.
17. Haffajee A, Socransky S, Feres M, Ximenez-Fyvie L. Plaque microbiology in health and disease. In: Newman HN & Wilson M, ed. *Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease*. Eastman Dental Institute, University College London 1999; 255-82.

18. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL, Jr., Socransky SS. Clinical and microbiological features of subjects with adult periodontitis who responded poorly to scaling and root planing. *J Clin Periodontol* 1997; 24(10): 767-76.
19. Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL, Jr., Socransky SS. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 1998; 25(5): 346-53.
20. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5: 78-111.
21. Hamlet SM, Cullinan MP, Westerman B, Lindeman M, Bird PS, Palmer J, Seymour GJ. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in an Australian population. *J Clin Periodontol* 2001; 28(12): 1163-71.
22. Kolenbrander P, Andersen R, Clemans D, Whittaker C, Klier C. Potential role of functionally similar coaggregation mediators in bacterial succession. In: Newman HN & Wilson M, ed. Dental Plaque Revisited: *Oral Biofilms in Health and Disease*. Eastman Dental Institute, University College London 1999: 171-86.
23. Lee J, Choi B, Yoo Y, Choi S, Cho K, Chai J, Kim C. Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2003; 74(9): 1329-35.
24. Leys E, Lyons S, Moeschberger M, Rumpf R, Griffen A. Association of *Bacteroides forsythus* and a novel *Bacteroides* phylo-type with periodontitis. *J Clin Microbiol* 2002; 40(3): 821-5.
25. Listgarten M. Formation of dental plaque and other oral biofilms. In: Newman HN & Wilson M, ed. Dental Plaque Revisited: *Oral Biofilms in Health and Disease*. Eastman Dental Institute, University College London 1999: 187-210.
26. Listgarten MA. The structure of dental plaque. *Periodontol* 2000 1994; 5: 52-65.
27. Molin S. Microbial activity in biofilm communities. In: Newman HN & Wilson M, ed. Dental Plaque Revisited: *Oral Biofilms in Health and Disease*. Eastman Dental Institute, University College London 1999: 73-8.
28. Moore WE, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Palcanis KG, Ranney RR. Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infect Immun* 1985; 48(2): 507-19.
29. Moore WE, Holdeman LV, Smibert RM, Hash DE, Burmeister JA, Ranney RR. Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infect Immun* 1982; 38(3): 1137-48.
30. Moore WE, Moore LH, Ranney RR, Smibert RM, Burmeister JA, Schenkein HA. The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. *J Clin Periodontol* 1991; 18(10): 729-39.
31. Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5: 66-77.
32. Paster B, Boches S, Galvin J, Ericson R, Lau C, Levanos V, Sahasrabudhe A, Dewhirst F. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001; 183(12): 3770-83.
33. Riviere G, Smith K, Carranza N, Tzagaroulaki E, Kay S, Dock M. Subgingival distribution of *Treponema denticola*, *Treponema socranskii*, and pathogen-related oral spirochetes: prevalence and relationship to periodontal status of sampled sites. *J Periodontol* 1995; 66(10): 829-37.
34. Sakai Y, Shimauchi H, Ito H, Kitamura M, Okada H. Porphyromonas gingivalis-specific IgG subclass antibody levels as immunological risk indicators of periodontal bone loss. *J Clin Periodontol* 2001; 28(9): 853-9.
35. Sela M. Role of *Treponema denticola* in periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12(5): 399-413.
36. Sheiham A, Netuveli G. Periodontal diseases in Europe. *Periodontol* 2000 2002; 29: 104-21.
37. Slots J. Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. *J Clin Periodontol* 1986; 13(10): 912-7.
38. Slots J, Rams TE, Feik D, Taveras HD, Gillespie GM. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. *J Periodontol* 1991; 62(9): 543-7.
39. Smith GL, Socransky SS, Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 1989; 4(1): 47-51.
40. Socransky S, Haffajee A. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000 2002; 28: 12-55.
41. Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol* 2000 1994; 5: 7-25.
42. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25(2): 134-44.
43. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol* 1991; 18(10): 766-75.
44. Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2002; 29(3): 260-8.
45. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 1994; 17(4): 788-92.
46. Tanner A, Kent R, Maiden MF, Taubman MA. Clinical, microbiological and immunological profile of healthy, gingivitis and putative active periodontal subjects. *J Periodontol Res* 1996; 31(3): 195-204.
47. Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL, Jr. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998; 25(2): 85-98.
48. Timmerman MF, Van der Weijden GA, Arief EM, Armand S, Abbas F, Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U. Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents. Subgingival microbiota in relation to experienced progression of periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28(7): 617-27.
49. Willis S, Smith K, Dunn V, Gapter L, Riviere K, Riviere G. Identification of seven *Treponema* species in health- and disease-associated dental plaque by nested PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37(3): 867-9.
50. Xie H, Cook GS, Costerton JW, Bruce G, Rose TM, Lamont RJ. Intergeneric communication in dental plaque biofilms. *J Bacteriol* 2000; 182(24): 7067-9.
51. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27(9): 648-57.
52. Zambon J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1985; 12(1): 1-20.

Dirección para correspondencia:
Laurie Ann Ximénez Fyvie
 Laboratorio de Genética Molecular
 División de Estudios de Posgrado e Investigación
 Facultad de Odontología, UNAM
 Tel: 5622 5565
 Correo electrónico: lximenez@post.harvard.edu