



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DESCRIPCIÓN DE LA MICROBIOTA SUBGINGIVAL EN
PACIENTES CON ORTODONCIA POR MEDIO DE LA
TÉCNICA DE CHECKERBOARD.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

WINNY LORELEI MEZA MARTÍNEZ

TUTORA: Mtra. ADRIANA PATRICIA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

ASESORA: Esp. FABIOLA TRUJILLO ESTEVES



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
2. ANTECEDENTES.....	7
2.1 Microbiota subgingival en salud periodontal.....	7
2.2 Gingivitis y periodontitis.....	10
2.3 Microbiota subgingival de sujetos mexicanos.....	14
2.4 Factores endógenos que alteran la microbiota subgingival	15
2.5 Factores exógenos que alteran la microbiota subgingival	17
2.6 Características microbiológicas periodontales en pacientes con tratamiento ortodóncico	20
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
4. JUSTIFICACIÓN.....	23
5. OBJETIVOS.....	24
5.1 General	24
5.2 Específicos.....	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1 Tipo de estudio.....	25
6.2 Población y muestras de estudio.....	25
6.3 Criterios de inclusión	26
6.4 Criterios de exclusión.....	26
7. VARIABLES DE ESTUDIO.....	27
7.1 Evaluación clínica	27
7.2 Evaluación microbiológica	28
7.2.1 Recolección y procesamiento de muestras.	28
7.2.2 Especies bacterianas y condiciones de cultivo	29
7.2.3 Purificación de DNA y preparación de sondas.....	30
7.2.4 Hibridaciones DNA-DNA.....	31
7.2.5 Detección y cuantificación de microorganismos.....	31

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS	33
8.1 Parámetros clínicos y periodontales.....	33
8.2 Análisis microbiológicos para checkerboard.....	33
9. RESULTADOS	34
10. DISCUSIÓN	38
11. CONCLUSIONES.....	41
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
TABLAS.....	46
FIGURAS.....	53
ANEXOS	60
Anexo 1. Formato de consentimiento informado.	60



Luis Enrique Meza, papá gracias por ser mi cómplice, mi amigo durante mi desarrollo intelectual, y por darme la chispa que inicio todos los proyectos, cada uno mis logros en realidad son tuyos.

Jacqueline Martínez, mamá, gracias por el amor infinito, por cada mañana que en silencio o en palabras muy asertivas me brindabas todo el apoyo, por enseñarme a ser una mujer fuerte, cada uno de mis logros en realidad son tuyos.

Yaira Meza, hermana, mi mejor amiga, mi cómplice, desde que tengo uso de memoria has sido mi guía en todos los aspectos, cada uno de los logros quiero compartirlos a tu lado.

Brandon Santoyo y Arantza Rea, gracias por coincidir, por siempre estar, ustedes son el gran amor de mi vida, crecimos juntos y ahora triunfaremos juntos.

Jorge Meza, tío gracias por su apoyo incondicional, no solo a mí sino a toda mi familia.

Mario Aranda, increíble la manera en la que coincidimos, y más aún como nos conectamos, mi confianza en ti siempre será infinita, gracias por la paciencia. Hoy compartimos proyectos, ideas y aprendizajes. Muchas gracias por creer en mí.

Daniel Macouzet, mi compañero de aventuras, gracias por la motivación, las risas, relajarme, por estar, protegerme, tú infinita paciencia, y elegirme a diario.

Oscar Martínez, Gabriela Pichardo, Maxwell Moran, Omar Díaz, amigos, futuros colegas, gracias por las risas, fuimos un gran equipo en la Universidad y sé que lo seguiremos siendo.

A cada uno de mis pacientes, especialmente a Gael. Por creer en mí y darme la oportunidad de aprender de ellos y con ellos cada día.



Mtra. Adriana Rodríguez, usted me ha enseñado desde disciplina, hasta manejar Excel, gracias porque sin usted era imposible iniciar y terminar este proyecto piloto, por ser mi jefa del servicio, mi guía, mi maestra y ahora mi amiga.

Dra. Laurie Ximénez, una gran mujer que admiro, siempre estaré infinitamente agradecida por abrirme las puertas de su laboratorio, apoyarme con este proyecto piloto y mostrarme el bello mundo de la investigación.

Esp. Fabiola Trujillo por dedicarme tiempo, procurarme durante el proyecto piloto, su disponibilidad y tiempo para cada una de mis dudas.

Esp. Isaac Maldonado, maravillosa persona, gracias por su apoyo como calibrador, por contagiarme de su entusiasmo, y su tiempo.

Equipo de Laboratorio de Genética Molecular, muchas gracias Alberto, Leticia, Jimena, Claudia, trabajar con ustedes siempre es muy divertido, por su apoyo en todos los pasos, ¡Somos un buen equipo!.

UNAM, mi amada Ciudad Universitaria gracias por brindarme la oportunidad de conocer gente maravillosa, darme acceso a las instalaciones tan increíbles y la oportunidad de seguir desarrollándome intelectualmente.



1. INTRODUCCIÓN

Estudios de pacientes con ortodoncia, han reportado la alteración en la composición de la microbiota subgingival, sin embargo, no hay reportes de un gran número bacterias encontradas en la placa subgingival. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue describir la microbiota subgingival de pacientes periodontalmente sanos y con gingivitis, que se encontraron bajo tratamiento ortodóncico con aparatología fija (brackets metálicos), por medio de la técnica de “Checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA.

Un total de 630 sitios periodontales fueron evaluados por un clínico calibrado para estudios de investigación periodontal. Se realizó la descripción de la prevalencia de 40 especies presentes en la microbiota subgingival de 105 muestras, provenientes de dos pacientes periodontalmente sanos y dos con gingivitis, que se encontraron bajo tratamiento ortodóncico, así como la descripción clínica periodontal de cada sitio evaluado.

En el presente estudio pudimos identificar la importancia de la realización de un periodontograma completo para el análisis de cada sitio evaluado, con el fin de presentar un estado real de los parámetros clínicos periodontales. Así mismo, nos permitió describir una alta prevalencia de especies relacionadas con periodontitis agresiva como: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Selenomonas noxia* y *Filifactor alocis*, en sujetos con gingivitis. Pudimos denotar el alcance del presente trabajo como estudio piloto, para el futuro analizar un mayor número de pacientes.

2. ANTECEDENTES

2.1 MICROBIOTA SUBGINGIVAL EN SALUD PERIODONTAL

La cavidad oral del ser humano representa un ecosistema que incluye más de 700 especies bacterianas que interactúan entre sí. Particularmente, más de 400 especies se han identificado en la bolsa periodontal ¹. Las interacciones bacterianas se dan gracias a la formación de una biopelícula adherida a la superficie del diente, la cual es una formación de coagregados bacterianos, que existen como comunidades cercanamente asociadas y se adhieren a una variedad de superficies naturales o artificiales, embebidas en un medio acuoso que contiene una concentración suficiente de nutrientes para sostener las necesidades metabólicas de la microbiota ². La coagregación bacteriana permite la formación de una comunidad de especies que producen factores de crecimiento, los cuales son requerimientos de otras para su supervivencia ^{2,3}.

Los complejos bacterianos de la placa subgingival son una representación de las asociaciones o coagregados entre especies que forman la placa dentobacteriana **(figura 1)**:

- Complejo azul: especies de *Actinomyces* exceptuando *Actinomyces odontolyticus*.
- Complejo amarillo: *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis*.
- Complejo morado: *A. odontolyticus* y *Veillonella parvula*.

- Complejo verde: *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stp. b y *Campylobacter concisus*.

- Complejo naranja: *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Fusobacterium periodonticum*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus constellatus* y *Eubacterium nodatum*.

- Complejo rojo: *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* y *Porphyromonas gingivalis*.

- Especies no agrupadas: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stp. a y *Selenomonas noxia*.

Las biopelículas dentales se forman por medio de una secuencia ordenada de mecanismos que establecen una estructura y funciones organizadas de especies bacterianas. La primer etapa de la formación de la placa dentobacteriana es la adsorción de proteínas, considerada como una película acondicionante, conocida también como película adquirida ⁴. Gracias a la adsorción de dichas proteínas, se puede dar la colonización primaria de bacterias facultativas, principalmente Gram positivas como las de complejos azul y amarillo, que son consideradas como periodonto-benéficas o especies compatibles con salud periodontal ^{3,5}.

La segunda etapa de la formación de la biopelícula es un mecanismo denominado coadhesión o coagregación, en el cuál la composición de la biopelícula

se diversifica debido a las adhesinas de la superficie celular de colonizadores que se unen a receptores bacterianos. Así es como se da inicio a la colonización de especies más complejas tanto Gram positivas como Gram negativas ⁶. Algunos ejemplos son las especies de los complejos morado y verde los cuáles se consideran colonizadores tempranos de la placa dentobacteriana. Mientras que no son considerados patógenos periodontales, algunas especies como *Capnocytophaga* sp. pueden jugar un papel de patogenicidad en pacientes inmunocomprometidos como es el caso de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 ⁷.

En la tercera etapa, de la génesis de la biopelícula tiene un papel importante los receptores superficiales de los microorganismos estos permiten la posterior coagregación de especies más exigentes anaerobias estrictas conocidas como colonizadores puente, predominantemente Gram negativos que tienen poca capacidad de adherirse directamente a la superficie dental como *Fusobacterium nucleatum*, *P. intermedia* y *Corynebacterium matruchotii* mismas que pueden coagregar con la mayoría de las bacterias bucales, actuando como colonizadores putativos. Refiriéndose el término putativo a que pueden tomar el papel de patogenicidad, aunque no sean los principales patógenos. Un ejemplo claro es el de pacientes con inmunosupresión y pacientes que no responden adecuadamente a terapias periodontales, conocidos con antelación como periodontitis refractaria, quienes presentan una microbiota subgingival predominante de patógenos putativos del complejo naranja. ^{1,5}

Posteriormente comienza la maduración de la biopelícula, la cual ocurre debido a la organización espacial y funcional de la placa dentobacteriana, aumentando la heterogeneidad con el tiempo, induciendo nuevos patrones de expresión genética bacteriana como son la conjugación y transformación, y la proximidad de diferentes especies lo cual provee la oportunidad de las interacciones. Gracias a esto, un mayor número de bacterias anaerobias estrictas Gram negativas tales como *T. forsythia*, *P. gingivalis* y *T. denticola* colonizan en estadios tardíos del desarrollo de la placa dentobacteriana, contribuyendo a la patogenicidad de la biopelícula, los cuales pertenecen al complejo rojo, son periodontopatógenas reconocidas, no presentan coagregación significativas con los colonizadores tempranos ^{3,4,8}.

Existen especies que no se encuentran agrupadas en ningún complejo bacteriano, las cuáles mediante técnicas moleculares se han identificado, dado que son especies no cultivables, pero que se han considerado como especies que presentan una participación relevante en la progresión de enfermedades periodontales ¹, una de ellas es *A. actinomycetemcomitans*, a quién se le ha encontrado en consorcio con especies fastidiosas como *F. alocis* y *Streptococcus parasanguinis* en periodontitis agresiva ⁹.

2.2 GINGIVITIS Y PERIODONTITIS

La gingivitis es la condición periodontal que presenta inflamación gingival sin pérdida de inserción del tejido conectivo. Su etiología en la mayoría de los casos es reconocida de origen bacteriano ¹⁰. Otras de las causas que son consideradas para su etiología son: traumas oclusales, malnutrición, consumo de drogas y tabaquismo,

factores genéticos, radiación, atrofas, neoplasias, descamación y respuesta inmune. Se ha demostrado que existe una relación directa entre la formación de la placa dental y el desarrollo de la gingivitis ¹¹, así mismo otros estudios demostraron que existe una variación en la respuesta inflamatoria, con los que algunos individuos presentan gingivitis en menor magnitud y en diferentes momentos que en otros individuos ¹². Mientras que individuos con periodontitis presentan en algún momento gingivitis, no todos los pacientes con gingivitis necesariamente avanzarán hasta convertirse en periodontitis ¹.

La clasificación del desarrollo de la gingivitis es: lesión inicial, temprana, establecida y avanzada. La lesión inicial comienza entre 2 y 4 días después de la acumulación de placa, se caracteriza por la formación de edema debido al aumento del exudado del surco gingival, ya que los microorganismos producen varias enzimas que aumentan la permeabilidad del epitelio de unión, lo que permite un ingreso de otros productos bacterianos y al mismo tiempo la salida de exudado del surco gingival. Así mismo, endotoxinas propias de la pared celular de los colonizadores tempranos, activan la vía alterna del sistema de complemento, generando la producción de anafilotoxinas, mismas que establecen un gradiente de concentración del surco a los tejidos ¹. A su vez, células del sistema inmunológico innato como neutrófilos y posteriormente del adaptativo como son mastocitos y macrófagos, liberan citocinas proinflamatorias como es factor de necrosis tumoral (TNF- α) que induce la expresión de moléculas de adhesión de las células endoteliales, siguiendo de la sucesiva adhesión y migración de neutrófilos polimorfonucleares hacia los tejidos gingivales,

mismos que descargan su contenido de enzimas lisosómicas en el surco gingival, pero no pueden fagocitar bacterias que están empezando a formar la biopelícula, y estas enzimas contribuyen a la destrucción local del tejido conectivo. Por lo tanto, se puede afirmar que los neutrófilos polimorfonucleares tienen un papel importante en la progresión intensa y rápida de la destrucción periodontal. Posterior a la lesión temprana o inicial (días 4-7) y la constante acumulación de placa, aumenta la permeabilidad vascular y aparecen infiltrados inflamatorios peri-vasculares. También existe un aumento del flujo del líquido del surco gingival hacia los tejidos gingivales afectados, el cual cambia de líquido intersticial a exudado inflamatorio como respuesta natural a un agente externo. ¹

El aumento de permeabilidad del epitelio del surco y de unión debido al ensanchamiento de los espacios entre células epiteliales, favorece el mayor ingreso de los productos bacterianos hacia los tejidos gingivales y la respuesta inflamatoria. La lesión inicial se presenta como infiltrados inflamatorios perivasculares que aumentan en cantidad en forma gradual, de modo que entre 12 y 21 días de iniciada la lesión, ésta se manifiesta clínicamente. Al día 21 los linfocitos y macrófagos componen el 70% del infiltrado y si bien la cantidad de leucocitos polimorfonucleares y plasmocitos llegan a cubrir el 10% del total del infiltrado (**figura 2**). ⁴

Las características universales de la gingivitis se encuentran descritas a detalle en la **tabla 1**. Además se deben considerar las siguientes características clínicas: ¹³

- Signos de inflamación gingival visible al sondeo periodontal;

- Presencia de placa dental, la cual exacerba inflamación gingival;
- Que sea de carácter reversible, es decir que regrese al estado de salud periodontal de la encía al eliminar la etiología;
- La pérdida de continuidad en la encía marginal.

Cuando la lesión inicial progresa a lesión establecida (**figura 2**), es cuando se da inicio a la periodontitis. Estas son infecciones endógenas mixtas de carácter irreversible, causadas por microorganismos que colonizan la superficie dental y bolsa periodontal, formando una estructura compleja llamada biopelícula ¹⁴. Los parámetros clínicos de la periodontitis es la pérdida de inserción, una profundidad de bolsa mayor a 3mm, en algunas ocasiones presencia de supuración y/o sangrado ¹.

La lesión establecida es también llamada progresiva. Se considera primariamente como una lesión linfoplasmocitaria cuya principal característica es el predominio de plasmocitos dentro de los tejidos conjuntivos periodontales. Dado que las lesiones con linfocitos B y plasmocitos progresan a la formación de la bolsa periodontal ¹⁵. La mayor permeabilidad y ulceración del epitelio de la bolsa permite el ingreso de productos microbianos, lo que lleva a la progresión del proceso inflamatorio que destruye el tejido conjuntivo y hueso ¹⁶. Por último, la lesión avanzada tiene las mismas características de la lesión establecida, además de que la pérdida de inserción es evidente desde el punto de vista clínico e histológico. En este estado, el mecanismo de destrucción de tejidos se produce por efectos de la respuesta inmunitaria (ver **figura 2**) ¹.

2.3 MICROBIOTA SUBGINGIVAL DE SUJETOS MEXICANOS

A pesar de que se han establecido de manera universal perfiles microbiológicos subgingivales para salud y periodontitis crónica, las diferencias en la microbiota subgingival entre poblaciones del mundo puede presentar ciertas particularidades. Las diferencias en la microbiota entre distintas poblaciones se han identificado con el propósito de establecer tratamientos periodontales más específicos.¹⁷

Particularmente, en condiciones de salud periodontal, en la población mexicana se ha reportado alta proporción de especies como: *Actinomyces naeslundii*, *S. intermedius*, *C. gracilis*, *C. sputigena*, comparado con sujetos con periodontitis crónica generalizada. Dichas especies son consideradas “periodo-benéficas” lo cual es concordante con otras poblaciones del mundo ¹⁴. Por otro lado, en periodontitis crónica y agresiva de sujetos mexicanos, se identificaron a las tres especies patógenas reconocidas *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. gingivalis* y a *A. actinomycetemcomitans*. Particularmente *P. gingivalis* con mayor prevalencia y proporción comparado con poblaciones de Chile, Suiza, Brasil, España y Holanda ^{15, 18}.

Tanto en salud periodontal como en periodontitis (crónica o agresiva), la población Mexicana presenta cuentas promedio más bajas de las siguientes especies: *C. gracilis*, *Selenomonas artemidis*, *S. noxia* y *Porphyromonas endodontalis* El resto de los grupos de especies, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las dos poblaciones de estudio (ver **figura 5**) ¹⁸.

2.4 FACTORES ENDÓGENOS QUE ALTERAN LA MICROBIOTA SUBGINGIVAL

Los factores endógenos que se han considerado como factores de predisposición de periodontitis y gingivitis, ya que interfieren en la alteración de la microbiota subgingival son los siguientes:

Factores genéticos:

Las predisposiciones genéticas son determinantes importantes del fenotipo de la periodontitis, pero existe una variabilidad considerable en diferentes poblaciones, grupos étnicos, así como en la forma de periodontitis en el adulto principalmente ¹. La literatura reporta sujetos con genotipos de variaciones polimórficas en IL-1, mismos que presentan una respuesta proinflamatoria alterada ¹⁹. En la actualidad, no existe evidencia epidemiológica suficiente que establezca que los polimorfismos precipitados sean factores de riesgo para todas las poblaciones del mundo ¹. La magnitud de los procesos inflamatorios se encuentra mediada principalmente por factores genéticos, donde un individuo que presente una variación genética en comparación con otro individuo que no presente variaciones, expuestos al mismo grado de patogenicidad de la placa dentobacteriana y a los mismos factores modificadores, presentará mayor severidad de enfermedad periodontal que si no presentara ninguna predisposición genética ²⁰.

Diabetes:

La enfermedad periodontal es considerada la sexta de las primeras complicaciones de la diabetes, así mismo se conoce que en presencia de este trastorno sistémico se incrementa la prevalencia, incidencia y severidad de las

enfermedades periodontales ²¹. Existen diversas teorías que establecen los posibles mecanismos para explicar la relación de la diabetes con la periodontitis, mismas que proponen los efectos de alteración metabólica que producen la hiperglucemia e hiperlipidemias de la diabetes, lo cual exacerba desafíos bacterianos que pueden instigar respuestas inmunológicas destructivas como la periodontitis ¹. Por lo tanto, varios estudios sugieren una relación bidireccional entre la diabetes y la periodontitis, se ha comprobado que se eleva en gran cantidad el género de *Streptococcus* en la microbiota subgingival de pacientes con esta afección ⁷.

VIH/SIDA

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) puede tener influencia a nivel periodontal ²², misma que depende de la competencia inmunitaria del hospedador y la respuesta inflamatoria local a la microbiota subgingival por una disminución de los linfocitos, lo cual puede comprometer las defensas del huésped a nivel sistémico por lo que aumenta la susceptibilidad a padecer diferentes patologías en la cavidad oral ²³.

Enfermedad de Crohn:

Es una enfermedad autoinmune intestinal inflamatoria granulomatosa que afecta cualquier sitio del tubo digestivo desde la boca hasta el ano de etiología desconocida. Las lesiones orales con mayor prevalencia en esta afección son los agrandamientos gingivales, estomatitis afosa recurrente, generalmente aparecen en el inicio de la enfermedad, pero también aparecen en colitis ²⁴, existe también lesiones específicas que aparecen en el pliegue mucovestibular de aspecto lobulado

hipertrófico, edematoso, fisurado con o sin ulceraciones lineales y en la zona retromolar y aumentos de volumen de forma polipoide, siendo granulomatosas y eritematosas más a nivel de encía insertada, llega a afectar la mucosa labial ²⁵.

Embarazo o lactancia:

El embarazo al ser un estado fisiológico modificado no implica una situación patológica, sin embargo, bajo dicha condición el organismo reacciona temporalmente con una serie de ajustes hormonales la cual se manifiesta como una respuesta inflamatoria intensa, presentando aumento en la permeabilidad vascular y favoreciendo la filtración de líquidos en los tejidos perivascuales. Algunos autores reportan que en el primer trimestre puede aparecer granulomas piógenos gingivales, que es una alteración gingival ante la presencia de irritantes locales ²⁶, así mismo el agrandamiento gingival tiene una prevalencia entre el 50% y 98.5%.

2.5 FACTORES EXÓGENOS QUE ALTERAN LA MICROBIOTA SUBGINGIVAL

Tabaquismo:

También considerada como una enfermedad crónica recidivante ¹, el hábito de fumar afecta la vascularidad, la respuestas inmunitaria celular y tisular ²⁷, así mismo contribuye a la formación de la biopelícula, esto afecta la adquisición, la colonización favoreciendo a que se eleven los niveles de colonización de los patógenos periodontales y agregación bacteriana ²⁸. La combustión de las diferentes sustancias genera la mayor parte de sus efectos nocivos, los cuáles son producto de la exposición sistémica después de la absorción en los pulmones, además de la absorción en la cavidad bucal ²⁹.

Mala higiene:

Hábito negativo generalmente ocasionando por la falta de conocimiento de las adecuadas técnicas de cepillado, o el acceso nulo al sector salud. Existen variaciones dentarias del desarrollo, patologías, alteraciones gingivales anatómicas y apiñamientos dentales que generan una dificultad para lograr una limpieza oral eficiente. Esas condiciones que favorecen la colonización subgingival de especies periodotopatógenas y patógenas putativas, las cuales ya son ampliamente conocidas por tener un papel importante en gingivitis y periodontitis ¹.

Estrés:

Los mecanismos por los cuáles el estrés psicosocial puede afectar la salud periodontal es variable. Una de las hipótesis más aceptadas es el cambio de conducta del individuo lo conducen al consumo de tabaco y mala higiene oral, por lo tanto, hay un cambio en la microbiota oral. Sin embargo, el estrés agudo es asociado como un estimulante del sistema inmune y por el contrario, en el crónico se disminuye la regulación del sistema inmunológico, pero existe una variabilidad individual en la respuesta inmune al estrés ³⁰. Por lo tanto, el estrés agudo es de importancia en odontología ya que es un destructor de la regulación de homeostasis entre microflora oral y el sistema inmune del hospedador ³¹.

Aparatología ortodóncica:

La aparatología ortodóncica requiere de aplicación de fuerzas sobre los dientes en un solo sentido, esto ocasiona cambios en el periodonto. Existen estudios que comprueban que cuando se expone un diente a fuerzas unilaterales a una magnitud,

frecuencia o duración, los tejidos periodontales no pueden resistir y distribuir la fuerza y no se logra mantener la estabilidad del o los dientes, sin embargo en el ligamento periodontal aparecen reacciones bien definidas cuyo resultado es la adaptación de las estructuras periodontales a la demanda funcional alterada ¹.

Si sobre la corona de un diente actúan fuerzas horizontales, el diente tiende a inclinarse en la dirección de la fuerza, mismas que generan zonas de presión y de tensión dentro de la zona marginal y apical periodontal. Por lo tanto, comienzan respuestas tisulares, éstas se desarrollan en las zonas de presión y se caracterizan de inflamación leve, si la magnitud de las fuerzas es menor a la necesaria para causar la inflamación y permite la conservación de la vitalidad de las células de ligamento periodontal y el hueso, permite que los osteoclastos reabsorban el hueso en la superficie del alvéolo donde se encuentra situada la zona de presión y comienza la resorción ósea directa. Pero por el contrario si la fuerza es de mayor magnitud, el tejido del ligamento periodontal en la zona de presión se necrosa y comienza la hialinización de los osteoclastos. En las zonas donde la concentración de las fuerzas es menor, en el ligamento periodontal se inicia un proceso de resorción ósea indirecta. Se ha reportado que las fuerzas ortodóncicas que producen movimientos de translocación pueden originar recesiones gingivales y pérdida de inserción del tejido conjuntivo está destrucción se produce en sitios con gingivitis a través de la tabla ósea de la apófisis alveolar en sitios donde se forman dehiscencias y si la cubierta de tejido blando es delgada se producen recesiones periodontales ¹.

2.6 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS PERIODONTALES EN PACIENTES CON TRATAMIENTO ORTODÓNCICO

Durante el tratamiento ortodóncico existe una respuesta tisular y con ello una inflamación gingival, la cual permite junto con los aditamentos propios del tratamiento ortodóncico y el apiñamiento dental, mayor susceptibilidad a la acumulación de placa dentobacteriana subgingival. Así mismo, se ha comprobado que el apiñamiento de los incisivos está directamente relacionado con la gingivitis independientemente de la higiene bucal ³². Específicamente los brackets y las bandas provocan cambios cualitativos en la microflora gingival y subgingival, mismo que puede comprometer la salud del tejido gingival y con ello la salud periodontal predisponiendo a padecer periodontitis ³³. Se ha propuesto que dependiendo de los aditamentos que se requieran durante el tratamiento ortodóncico, como el uso de brackets de autoligado, en comparación con brackets de ligado convencional, se tiene una mayor retención de placa dentobacteriana y un recambio de la flora microbiana, pero aún no existe un aumento estadísticamente de ello ³⁴.

Se tienen reportes de un aumento significativo en la microbiota subgingival donde se encuentra complejo naranja en pacientes que usan brackets metálicos. Con lo que los investigadores aseguran que especies patógenas putativas presentan la mayor proporción de la microflora subgingival junto con especies del complejo rojo, lo cual genera una mayor predisposición a presentar periodontitis. A diferencia de microorganismos relacionados con caries dental, quienes se encuentran en menor prevalencia, esto puede observarse en la **figura 5** ³⁵. Sin embargo, se ha reportado que

existe un cambio en cuanto a la prevalencia de especies como *T. forsythia*, *C. rectus*, *P. gingivalis*, *E. corrodens*, *T. denticola* en la placa dentobacteriana subgingival con un menor prevalencia después de 3 meses de la colocación de aparatología de ortodóncica ³⁶. La microbiota subgingival al inicio del tratamiento ortodóncico se encuentran en mayor prevalencia *A. odontolyticus*, *Streptococcus* spp, *A. israelii*, posteriormente existe un incremento de *A. actinomycetemcomitans*, *A. viscosus* y *C. gingivalis*, al final del tratamiento se mantienen esos niveles de *Actinomyces* sp. y de *Streptococcus* sp. ³⁷.

Existe un mayor índice de crecimiento de microorganismos patógenos putativos en la placa dentobacteriana, así como de bacterias anaerobias, el crecimiento está limitado por los brackets, éste no destruye el tejido periodontal ya que existe una transición y limitación debido a la duración del tiempo del tratamiento, pero eso no evita la existencia de la predisposición para desarrollar periodontitis (ver **figura 6**) ^{33,35}. Así mismo la literatura ha reportado que en presencia de gingivitis existe un aumento de *A. actinomycetemcomitans* y *P. intermedia*, en la placa dentobacteriana subgingival en pacientes con tratamiento ortodóncico (ver **tabla 2**) ³⁸.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La ecología microbiana presente en la biopelícula subgingival de individuos sanos periodontales y en estado de periodontitis y gingivitis, ha sido bien descrita en la literatura. Las diferencias particulares de cada estado periodontal, lo determina la cantidad de especies compatibles con salud, periodontopatógenas y patógenas putativas. Adicionalmente, la microbiota subgingival se puede definir en individuos con distinto estado de salud sistémico, o hasta inclusive diferir dependiendo de la zona geográfica donde se encuentren estos individuos, con lo cual, es de suma importancia describirla, dependiendo de los factores endógenos y exógenos en los que se encuentren involucrados. La aparatología fija en ortodoncia, como un factor exógeno, puede actuar como modificador de la microbiota subgingival.

4. JUSTIFICACIÓN

Estudios de pacientes con aparatología fija (brackets), reportan la alteración en la composición de la microbiota subgingival con aumento en la prevalencia de bacterias periodontopatógenas como: *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *C. rectus*, *C. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* y *E. corrodens*. Sin embargo, el número de especies evaluadas ha sido bajo, y no hay reportes de otras bacterias comúnmente encontradas en la placa subgingival. Por lo tanto, en el presente estudio, se realizó la descripción de las especies presentes en la microbiota subgingival de pacientes periodontalmente sanos y con gingivitis, que se encuentren bajo tratamiento ortodóncico con aparatología fija (brackets metálicos), con la finalidad de describir un mayor número de especies involucradas en pacientes con gingivitis, lo cual indica un alto riesgo para presentar periodontitis.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

El objetivo del presente estudio fue describir la microbiota subgingival de pacientes periodontalmente sanos y con gingivitis, que se encontraron bajo tratamiento ortodóncico con aparatología fija (brackets), por medio de la técnica de “Checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA.

5.2 ESPECÍFICOS

- Realizar una historia clínica general y periodontal, que incluyó los registros de las características clínicas y periodontales de cada sujeto de estudio evaluado, con la finalidad de poder clasificarlo periodontalmente.
- Tomar muestras de placa dentobacteriana subgingival de las zonas mesiovestibular de boca completa en pacientes con brackets metálicos y con tratamiento de ortodoncia mayor o igual a doce meses.
- Describir la prevalencia de 40 especies bacterianas, representativas de la microbiota subgingival de sujetos periodontalmente sanos y con gingivitis, bajo tratamiento ortodóncico o aparatología fija (brackets metálicos).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio transversal en el que fueron evaluadas hasta 28 muestras de placa dentobacteriana subgingival de 4 sujetos de estudio. Todas las muestras fueron analizadas para determinar las cuentas, prevalencia y proporción de 40 especies bacterianas.

Los procedimientos fueron realizados en una sola sesión, en la que se evaluó el estado de salud general y periodontal de los sujetos de estudio, se registraron los datos clínicos generales, se recolectaron datos clínicos periodontales, así como las muestras de placa dentobacteriana.

6.2 POBLACIÓN Y MUESTRAS DE ESTUDIO

La población de estudio para la recolección de muestras, de placa dentobacteriana subgingival, consistió en 4 sujetos mexicanos de nacimiento, con tratamiento ortodóncico fijo (brackets metálicos), de los cuáles 2 se encontraron con salud periodontal (SP) y 2 con gingivitis (G) (**figuras 3 y 4**).de acuerdo a la clasificación de Armitage de 1999 ³⁹.

El propósito y naturaleza del estudio, incluyendo los procedimientos clínicos para la recolección de muestras, fueron explicados a cada sujeto potencial de estudio. Los sujetos recibieron copia de la forma de consentimiento informado en la que se delineó explícitamente el protocolo del estudio. Se pidió a los sujetos que firmaran

dicha forma, con lo cual estableció su entendimiento sobre el estudio y el deseo voluntario de participar (ver **anexo 1**).

6.3 Criterios de inclusión

Todos los sujetos incluidos en el estudio fueron mexicanos por nacimiento con ascendencia de padres y por lo menos dos abuelos mexicanos. Además, todos los sujetos fueron individuos mayores de 20 años, en buen estado de salud general y presentaron por lo menos 20 dientes naturales en boca.

6.4 Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión comprendieron a todas aquellas mujeres que presentaron embarazo o lactancia, aquellos que hubieran tomado cualquier clase de antimicrobiano sistémico en los tres meses previos a su evaluación para el estudio, y que presentaron condiciones sistémicas que pudieran influir sobre el curso o severidad de la enfermedad periodontal tales como: VIH/SIDA, diabetes, hemofilia, enfermedades autoinmunes, etc. En la **tabla 3** se resumen los criterios que fueron considerados para la selección de los sujetos de estudio.

A los sujetos de estudio, se les solicitó información general que incluyó una historia clínica médica y datos como edad, género, estatus de fumador, tiempo de uso de aparatología ortodoncia fija “brackets”. Se consideró que no hubieran sido sometidos a ningún tratamiento periodontal como corticotomías y cirugía ortognática, así como haber sido tratado con mini implantes (**tabla 3**).

7. VARIABLES DE ESTUDIO

7.1 Evaluación clínica

Cada sujeto de estudio recibió una evaluación periodontal completa realizada por un clínico calibrado para este propósito.

Todas las mediciones clínicas fueron tomadas en una sola visita y registradas de 6 sitios por diente (mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesiolingual) de todos los dientes en la boca de cada sujeto de estudio excluyendo los terceros molares (máximo 168 sitios por sujeto dependiendo del número de dientes faltantes) de acuerdo con procedimientos previamente descritos en la literatura ⁴⁰.

Los parámetros clínicos y el orden de las mediciones se realizaron de la siguiente manera con medidas dicotómicas:

1. Acumulación de placa (PLA)
2. Enrojecimiento gingival (ENR)
3. Profundidad de bolsa (PB)
4. Nivel de inserción (NI)
5. Sangrado al sondeo (SS)
6. Supuración al sondeo (SUP)

La profundidad de bolsa y el nivel de inserción se registraron al mm más cercano utilizando una sonda periodontal “Carolina del Norte” (UNC) de 15mm de longitud con marcas en intervalos de 1mm y marcas distintivas en los intervalos de 5mm (Hufriedy, Chicago, IL). Estas medidas fueron registradas dos veces por el mismo clínico

y el promedio de las dos mediciones se utilizó para el análisis de datos. El resto de los parámetros clínicos se evaluaron en una sola ocasión con mediciones dicotómicas de presencia (1) o ausencia (0).

7.2 Evaluación microbiológica

7.2.1 Recolección y procesamiento de muestras.

Las evaluaciones microbiológicas mediante la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA ⁴¹ se realizaron con la recolección de un máximo de 28 muestras de placa dentobacteriana subgingival de los sitios mesiobucales de todos los dientes excluyendo los terceros molares en cada sujeto de estudio.

Después de secar y aislar el área de muestreo con rollos de algodón, la placa supragingival fue eliminada con una cureta Gracey 13/14 (Hu-Friedy). Las muestras de placa subgingival se tomaron utilizando curetas Gracey estériles y colocadas en tubos para microcentrifugación de 1.5ml que contenían 150µl de buffer TE pH 7.6 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA). Se agregaron 150µl de NaOH (0.5 M, Sigma) a cada tubo y las muestras fueron dispersadas. Los tubos se hirvieron durante 10min. y el pH neutralizado con 800µl de acetato de amonio (5M, Sigma). 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 20min. Dos canales de estándares microbiológicos fueron colocados en cada membrana.

Dichos estándares consistieron en mezclas ajustadas a 10^5 y 10^6 células de cultivos puros de todas las cepas bacterianas que fueron analizadas.

El empleo de la técnica de “checkerboard” permitió la identificación de 40 especies bacterianas en cada una de las muestras de placa dentobacteriana de cada sujeto de estudio en un mismo experimento. Asimismo, fue posible cuantificar la prevalencia de cada una de las 40 especies. De tal manera que los datos microbiológicos obtenidos de cada sujeto de estudio incluyeron 3 matrices de datos (niveles, prevalencia y proporción), cada una con un total de 1,120 posibles puntos de información (40 sondas de DNA x 28 muestras).

7.2.2 Especies bacterianas y condiciones de cultivo

La lista de las 40 cepas bacterianas de referencia que fueron utilizadas en el presente estudio para la preparación de sondas de DNA, comprende especies bacterianas representativas de cada complejo bacteriano ³. Todas las cepas fueron adquiridas como cultivos liofilizados del ATCC (American Type Culture Collection)(**tabla 4**) Las cepas fueron rehidratadas en caldo para *Mycoplasma* y cultivadas en agar enriquecido (17g *Mycoplasma* agar base, 5ml solución stock de Hemina, 500ml - agua destilada UV/UF, 5ml vitamina K, 25ml sangre de carnero desfibrinada) a 35°C de 3 a 7 días dentro de una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% N², 10% CO² y 10% H² (exceptuando *Neisseria mucosa*, cultivada aeróbicamente en agar base sin enriquecimiento). Las cepas que se mencionan a continuación fueron sembradas en medios suplementados: *Campylobacter* sp.: agar enriquecido suplementado en la superficie con 0.5ml de formato (60mg/ml) -

fumarato (60mg/ml); *T. denticola*: caldo para *Mycoplasma* suplementado con glucosa (1mg/ml), niacinamida (400µg/ml), tetrahidrocloreuro de esparmina (150µg/ml), isobutirato de sodio (20µg/ml), L-cisteina (1mg/ml), pirofosfato de tiamina (5µg/ml) y suero bovino (0.5%).

7.2.3 Purificación de DNA y preparación de sondas

El crecimiento después de 3 a 7 días de cultivo fue recolectado y colocado en tubos para microcentrifugación de 1.5ml que contenían 1ml de buffer TE pH 7.6. Las células fueron lavadas dos veces mediante centrifugación a 3,500rpm en buffer TE durante 10min. Posteriormente, fueron resuspendidas mediante sonicación durante 15seg. y lisadas a 37°C durante 1 hora ya sea con 10% SDS y proteinasa K (20mg/ml, Sigma) para las especies Gram negativas, o con una mezcla enzimática que contenía 15mg/ml de lisozima (Sigma) y 5mg/ml de Achromopeptidasa (Sigma) en buffer TE (pH 6.5) para las especies Gram positivas. El DNA fue aislado y purificado utilizando una técnica estándar previamente descrita ⁴². La concentración de DNA fue determinada mediante mediciones espectrofotométricas de la absorbancia a 260nm. La pureza de las preparaciones fue valorada mediante el cálculo de la relación entre las mediciones de las absorbancias a 260nm y 280nm. Las sondas de DNA genómicas fueron preparadas para las 40 especies bacterianas mediante el marcaje con digoxigenina (Roche) de 1µg de DNA purificado utilizando la técnica de primers aleatorios (random primer technique) previamente descrita ⁴³.

7.2.4 Hibridaciones DNA-DNA

Las membranas fueron prehibridizadas a 42°C durante 1 hora en solución de prehibridación que contenía 50% de formamida, 5x citrato salino estándar (SSC) (1x SSC = 150mM NaCl, 15mM citrato de sodio, pH 7.0), 1% caseína, 5x solución Denhardt, 25mM fosfato de sodio (pH 6.5) y 0.5mg/ml de RNA de levadura (Roche). La membrana con DNA fijado de las cepas aisladas fue colocada en un Miniblotter-45 (Immunetics) con los canales de las muestras rotados 90° en relación a los canales de hibridación. Esto produjo un patrón de tablero de ajedrez (checkerboard) de 30 x 45. Las sondas de DNA fueron diluidas a una concentración de aproximadamente 20ng/ml en solución de hibridación (45% formamida, 5x SSC, 1x solución Denhardt, 20mM fosfato de sodio (pH 6.5), 0.2mg/ml de RNA de levadura, 10% sulfato de dextrano y 1% caseína), colocadas en canales de hibridación individuales del Miniblotter-45 e hibridizadas una noche a 42°C con el aparato sellado dentro de una bolsa de plástico para evitar evaporación de las sondas de DNA. La concentración de cada sonda fue ajustada mediante pruebas preliminares de ensayo y error para que todas las sondas detectaran un rango de células entre 10^4 y 10^7 . Las membranas fueron lavadas dos veces a alta astringencia durante 20min, cada vez a 68°C en buffer de fosfato (0.1x SSC y 0.1% SDS) utilizando un baño con circulación.

7.2.5 Detección y cuantificación de microorganismos.

Las membranas fueron bloqueadas mediante su incubación durante 1 hora en buffer bloqueador que contiene 1% de caseína en buffer de maleato (100mM ácido maleico, 150mM NaCl, pH 7.5). Los híbridos fueron detectados incubando las

membranas en una dilución de 1:50,000 de anticuerpo contra digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Roche) utilizando la modificación previamente descrita ⁴⁴Después de ser lavadas, las membranas fueron incubadas en un agente quimioluminiscente de detección (CDP-Star, Roche) a 37°C durante 1 hora y las señales fueron detectadas mediante la exposición de las membranas a películas autoradiográficas dentro de cassettes a temperatura ambiente durante 35min. Las películas fueron reveladas siguiendo el procedimiento estándar y posteriormente fueron fotografiadas con cámara Digital (Kodak Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.). Con ayuda de un sistema digital de fotodocumentación (DigiDoc. BioRad) se enviaron a un programa (Quantity One. BioRad), en el cual se detectaron y analizaron las señales obtenidas en los checkerboards.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

8.1 Parámetros clínicos y periodontales

Se realizó un análisis descriptivo de los parámetros generales previamente descritos, así como de los parámetros clínicos periodontales tales como número de dientes faltantes, PLA, ENR, PB, NI, SS y SUP, los cuales se expresaron como media \pm error estándar de la media (EEM) del promedio de muestras totales de cada sujeto de estudio.

8.2 Análisis microbiológicos para checkerboard.

La composición de la placa dentobacteriana subgingival en cada sujeto de estudio fue determinada calculando la prevalencia de cada una de las 40 especies bacterianas evaluadas (ver **tabla 4**) en cada muestra de manera individual, en promedio de boca completa por especie de cada sujeto de estudio, y en promedio de todas las especies por diente muestreado de cada sujeto de estudio (**tabla 6**). En los análisis se describió la composición microbiológica entre sujetos de cada grupo de estudio (SP y G). Los datos microbiológicos fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (EEM) de la prevalencia (porcentaje de sitios colonizados) calculada para cada especie bacteriana en cada sitio muestreado y promediado en los sitios totales de boca completa. Por otro lado, se reportó la prevalencia promedio para el total de las especies identificadas en cada uno de los sitios muestreados.

9. RESULTADOS

Los sujetos de estudio fueron codificados como: Px 1 - Px 4. Dos pacientes presentaron salud periodontal (SP Px 1 y Px 2), de acuerdo con los criterios de selección (**tabla 3**) y dos presentaron Gingivitis (G Px 3 y Px 4).

Las características generales y periodontales de los sujetos de estudio se describen en las **tablas 5a y 5b**. Se reporta de cada parámetro clínico la media \pm el error estándar de la media. Sólo Px 1 fue mujer y Px 2 - 4 fueron hombres. La edad mínima de los sujetos de estudio fue de 20 y como máxima 27 teniendo como media 24.2 años. La media de los dientes presentes fue de 26, teniendo un máximo de 28 y como mínimo 25, todos los sujetos de estudio estaban en tratamiento con brackets metálicos con promedio de 20 meses de duración con tratamiento ortodóncico y con una media 2.75 de bandas metálicas en OD 16, 26, 36 y 46. En este caso sólo el Px 2 no presentó bandas metálicas en molares. El Px 1 fue el único sujeto que presentó dos sitios con malposición dental en OD 34 y 44. Los parámetros generales como consumo de antibiótico en los últimos 3 meses y fumador actual presentaron 0% de prevalencia.

Dentro de las características periodontales evaluadas, ninguno de los sujetos de estudio presentó PB con media mayor a 2.4mm y NI con media mayor a 1.2mm. Ninguno de los sujetos evaluados presentó sitios mayores o igual a 5mm de NI, queriendo decir que los datos periodontales fueron concordantes con los criterios de selección establecidos (**tabla 3**).

Los Px 1 y Px 4 presentaron el mayor nivel de placa (63% y 95% respectivamente), a pesar de que el Px 1 fue un paciente clasificado como SP, por el valor de los parámetros periodontales PLA: 63% y ENR: 55%. Los sujetos que presentaron mayor índice de ENR (Px 3: 67% y Px 4: 89%) y SS (Px 3: 11% y Px 4: 41%) fueron los clasificados como pacientes con Gingivitis.

En las **figuras 3 y 4** se observan las imágenes fotográficas dos sujetos de estudio, así como la descripción detallada de la aparatología fija de cada paciente. En la **figura 3** se presenta el paciente SP Px 2, con brackets de autoligado y sin bandas metálicas. El estado de salud periodontal del paciente Px 2 se determinó ya que al sondeo periodontal presentó 0 sitios con ≥ 3 mm de PB/NI. Con presencia de placa con 39%, enrojecimiento gingival de 20% y sangrado al sondeo con 2% de los sitios evaluados (N=168). Se observó la encía rosada, delimitada con festoneado y las papilas interdetales en forma de cuchillo, algunos puntos localizados en la encía marginal con eritema. El estado de enfermedad gingival del G Px 4 se determinó ya que al sondeo periodontal presentó 0 sitios con ≥ 3 mm de PB/NI. Con presencia de placa con 95%, enrojecimiento gingival de 89% y sangrado al sondeo con 41% de los sitios evaluados (N=150). Presentó además la encía marginal con edema y eritema, con pérdida de festoneo.

Un total de 105 muestras de placa dentobacteriana subgingival fueron evaluadas microbiológicamente de los 4 sujetos de estudio. En la **tabla 6 y figura 7** se describe la prevalencia promedio de cada una de las 40 especies evaluadas en los 4 sujetos de estudio.

La tabla 6 se encuentra ordenada por especies representativas de cada uno de los complejos bacterianos. Las especies del complejo azul representaron la menor prevalencia de todas las especies en la mayoría de los sujetos: *A. georgiae* (Px 1: 4%, Px 2: 7% Px 3: 12% y Px 4: 8%), *A. israelii* (Px 1: 68%, Px 2: 57% y Px 3: 12%), *A. naeslundii* (Px 1: 20%, Px 2: 31% Px 3: 12% y Px 4: 50%) y *A. viscosus* (Px 1: 54%, Px 2: 50% Px 3: 42% y Px 4: 54%) (ver **tabla 6**).

Las especies que se encontraron en mayor prevalencia en la mayoría de los sujetos de estudio, fueron principalmente del complejo amarillo: *S. anginosus* (Px 1: 93%, Px 3: 81% y Px 4: 65%), *S. gornodii* (Px 1: 100%, Px 3: 92% y Px 4: 92%), *S. intermedius* (Px 1: 100%, Px 2: 89%, Px 3: 92% y Px 4: 96%) y *S. mitis* (Px 1: 79%, Px 3: 92% y Px4: 92%) (ver **tabla 6**).

Las especies que se encontraron con menor porcentaje de sitios colonizados en los cuatro sujetos de estudio fueron: *A. odontolyticus* (Px 1: 4%, Px 2: 7%, Px 3: 12% y Px 4: 8%) y *V. parvula* (Px 1: 32%, Px 2: 36%, Px 3: 35% y Px 4: 58%) y en mayor porcentaje: *C. gingivalis* (Px 1: 29%, Px 2: 46%, Px 3: 62% y Px 4: 27%) *C. ochracea* (Px 1: 46%, Px 2: 50%, Px 3: 54% y Px 4: 12%), *C. sputigena* (Px 1: 61%, Px 2: 57%, Px 3: 35% y Px 4: 23%) y *E. corrodens* (Px 1: 25%, Px 2: 71%, Px 3: 23% y Px 4: 38%)(ver **figura 7**).

Las únicas especies que se encontraron en mayor porcentaje de sitios colonizados en salud periodontal en comparación a gingivitis fueron: *E. saburreum* (SP: 67.5% y G: 30.5%); *P. loescheii* (SP: 73% y G: 40%) y *C. sputigena* (SP: 59% y G: 46.5%) (ver **tabla 6**).

Las especies que se encontraron en mayor prevalencia en por lo menos tres de los cuatro sujetos evaluados fueron: *P. gingivalis* (Px 1: 71%, Px2: 68% y Px 4: 81%), *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* (Px 1: 93% Px 2: 68% y Px 4: 69%), *A. actinomycetemcomitans* (Px 1: 100% Px 2: 89% y Px 4: 96%), *F. alocis* (Px 1: 92% Px 2: 79%, Px 3: 92% y Px 4: 60) y *S. noxia* (Px 1: 64%, Px 2: 61%, Px 3: 85% y Px 4: 77%) y en menor prevalencia: *T. denticola* (Px 1: 36%, Px 2: 18%, Px 3: 54% y Px 4: 19%) (ver **tabla 6 y figura 7**), *P. acnes* (Px 2: 21%, Px 3: 12% y Px 4: 15%), *G. morbillorum* (Px 2: 7%, Px 3: 0% y Px 4: 23%) y *A. odontolyticus* (Px 1: 4%, Px 2: 7% Px 3: 12 y Px 4: 8%).

En la **tabla 7** se describe la prevalencia promedio del total de las especies evaluada, por muestra en cada uno de los OD de los 4 sujetos de estudio. Se observó una mayor prevalencia de las 40 especies evaluadas, en las muestras de: Px 1, sitios de OD 12(89%), 13(90%), 16(73% + banda) y 17(70%), y Px 2 en OD 11 (88%), 12 (68%), y 13(70%), en Px 3 en OD 11(84%), 17(81%), 26(76%+banda) y en el Px 4 OD 11(97%), 13(95%) y 25(87%).

10. DISCUSIÓN

La aparatología fija en ortodoncia se ha considerado como un factor exógeno modificador de la microbiota subgingival. Sin embargo, no existe en la actualidad algún estudio que defina un perfil microbiológico con una amplia gama de especies colonizadoras de la placa subgingival. El presente estudio, no permitió acercarnos a cuáles son las posibilidades de describir a dos pacientes sanos y dos con gingivitis que, a pesar de su clasificación clínica (SP o G), presentan muchas similitudes en la microbiota.

Clínicamente, ningún sujeto de estudio presentaba periodontitis, sin embargo, el Px 1 que fue clasificado como SP, presentó altos porcentajes en los parámetros clínicos periodontales (PLA y ENR), con lo cual podemos inferir que es un posible candidato para presentar enfermedad gingival por tener una alta prevalencia (>50%) en 22 de las 40 especies evaluadas. La literatura reporta, que el aumento generalizado de especies de la placa subgingival lleva a alteraciones inflamatorias, lo cual puede aumentar el riesgo de presentar enfermedades periodontales. ¹

En la mayoría de los sujetos evaluados, las especies de *A. georgiae*, *A. israelii*, *A. naeslundii* y *A. viscosus* se encuentra en menor prevalencia, a pesar de ser consideradas especies compatibles con salud periodontal. ^{3, 4, 8}. Nuestros resultados no concuerdan con la literatura, ya que dichas especies no se han encontrado modificadas en la flora de pacientes con aparatología fija. En el presente estudio, se puede inferir en el desbalance de la microbiota subgingival, por carecer de especies

periodonto-benéficas. Por otro lado, otro grupo de especies consideradas compatibles con salud periodontal son *Streptococcus* sp.,^{3, 4, 8} mismas que en el presente estudio se encontraron en mayor prevalencia, por lo menos 4 de las 6 especies evaluadas del complejo amarillo. Dicho resultado concuerda con los altos niveles bacterianos de *S. mitis* y *S. gordonii* entre otras especies de *Streptococcus* en el estudio de Andruccioli y col, quienes evaluaron la placa subgingival de sujetos con aparatología fija por medio de la técnica de checkerboard. En este estudio se hace inferencia de la alta predisposición de dichas especies por su relación con la caries dental.

Las especies que se encontraron en mayor prevalencia en por lo menos tres de los cuatro sujetos evaluados fueron: *P. gingivalis*, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. alocis* y *S. noxia*. Sólo una de las 3 especies periodontopatógenas del complejo rojo, se encontró en mayor prevalencia, sin embargo *A. actinomycetemcomitans* y *S. noxia* son también especies relacionadas con una mayor predisposición de los sujetos con aparatología ortodóncica a presentar enfermedades periodontales.^{3, 38, 46, 33, 37} Lo que nos parece interesante del estudio, fue que a pesar de que Px 1 y 2 presentaran SP, tuvieron alta prevalencia de especies relacionadas con periodontitis agresiva como son *A. actinomycetemcomitans* y *F. alocis*⁹, y una especie patógena putativa (*F. nucleatum* subsp. *nucleatum*), con ello se podría pensar que existe una relación con los cambios en el periodonto y las respuestas tisulares cuando se exponen los dientes a fuerzas ortodóncicas, con una flora más relacionada con un tipo de infección crónica o agresiva.^{8,3,1}

En los sujetos con salud periodontal particularmente, se encontraron en mayor prevalencia las especies *E. saburreum*, *P. loescheii* y *C. sputigena* comparado con los pacientes con gingivitis. Lo cual puede indicar que sean especies que participen en la transición de salud enfermedad y en el desequilibrio de la flora, por lo tanto, pueden jugar un papel de patogenicidad putativa, como sucede en pacientes inmunocomprometidos o con diabetes sanos periodontales⁷. Por otro lado, la literatura reporta alta prevalencia de especies como: *E. nodatum* y *C. gracilis* en sujetos con gingivitis ⁴⁷, que aunque no presenten aparatología fija, presentan transición de salud a enfermedad gingival.

En el presente estudio, se evalúa una mayor prevalencia promedio de especies en placa dentobacteriana subgingival, en dientes anteriores superiores tal como afirma Harfin³², quien concluye que tanto la mal posición dental como la aparatología fija, pueden influir en la alteración de la placa subgingival. En el presente estudio los pacientes no presentaron apiñamiento, sin embargo, dos de los sitios con mayor prevalencia del promedio de las 40 bacterias, presentaron bandas metálicas.

Los métodos utilizados para la evaluación de la microbiota subgingival en su mayoría has sido fenotípicos ^{33, 38, 45} y de PCR ^{36, 46}, únicamente existe un reporte con la técnica de checkerboard para dicha evaluación³⁵. La técnica de checkerboard nos ofrece la posibilidad de evaluar de manera cuantitativa la cantidad de bacterias que se tienen, la prevalencia y la proporción representativa de todos los dientes en boca.

11. CONCLUSIONES

En el presente estudio pudimos identificar la importancia de la realización de un periodontograma completo para el análisis de cada sitio evaluado, con la finalidad de presentar un estado real de los parámetros clínicos periodontales (PLA, ENR, PB, NI, SAS y SUP) y por lo tanto una adecuada clasificación periodontal.

El presente estudio nos permitió analizar los resultados concordantes con la literatura mencionada. Existe una mayor predisposición de los sujetos con aparatología fija, con brackets metálicos y tratamiento mayor a doce meses, para presentar enfermedades periodontales, independientemente que su estado periodontal actual sea de salud. Esto se debe al aumento en la prevalencia de *P. gingivalis*, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* y la disminución de especies de *Actinomyces*, lo cual indica el desequilibrio de la flora, aunado a la alta prevalencia de especies como *A. actinomycetemcomitans*, *S. noxia* y *F. alocis*, tanto en salud periodontal como en gingivitis, representando una flora muy particular de especies predominantes en periodontitis agresiva.

Analizando el alcance del presente trabajo, pudimos darnos cuenta de que, como estudio piloto los resultados fueron relevantes, sin embargo, se desearía analizar un mayor número de pacientes tanto sanos como con gingivitis, con el fin de determinar las diferencias significativas entre grupos de estudio.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lindhe J LN, Karing T. *Periodontología clínica e implantología odontológica*. Buenos Aires: Médica Panamericana 2017. Cap. 16 Trauma oclusal: tejidos periodontales. p 317-323. Cap. 20 Periodontitis crónica. p 367-389. Cap 10 Infecciones periodontales. p 191-208. Cap. 19 Enfermedades gingivales inducidas por placa bacteriana. p 365-376.
2. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *Journal of bacteriology* 1994;176:2137-2142.
3. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000 2005;38:135-187.
4. Lindhe J LN, Karing T. *Periodontal Clinical e Implantology*. Buenos Aires: Médica Panamericana 2009. Cap. 14 Factores modificadores. p 285.
5. Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *Journal of clinical periodontology* 2002;29:260-268.
6. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annual review of microbiology* 2000;54:413-437.
7. Rodríguez-Hernández AP. Descripción microbiológica de la placa dentobacteriana subgingival de sujetos mexicanos con diabetes mellitus tipo II. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México 2007. p 62.
8. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology* 1998;25:134-144.
9. Fine DH, Markowitz K, Fairlie K, et al. 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* 2013;51:2850-2861.
10. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology* 2000 2004;34:9-21.
11. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental Gingivitis in Man. *Journal of periodontology* 1965;36:177-187.
12. Trombelli L, Farina R, Manfrini R, Tatakis DN. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis: effect of incisor crown form. *Journal of dental research* 2004;83:728-731.

13. Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. *Ann Periodontol* 1999;4:7-19.
14. Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Sanchez-Vargas LO, Alcantara-Maruri E. Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health. *Journal of periodontology* 2006;77:460-471.
15. Mackler BF, Frostad KB, Robertson PB, Levy BM. Immunoglobulin bearing lymphocytes and plasma cells in human periodontal disease. *Journal of periodontal research* 1977;12:37-45.
16. Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontology 2000* 1997;14:144-157.
17. Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *Journal of clinical periodontology* 2004;31:996-1002.
18. Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Moreno-Borjas JY, Alcantara-Maruri E. Subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects with generalized aggressive periodontitis. *Journal of clinical periodontology* 2006;33:869-877.
19. Lang NP, Tonetti MS, Suter J, Sorrell J, Duff GW, Kornman KS. Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *Journal of periodontal research* 2000;35:102-107.
20. Kornman KS, di Giovine FS. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol* 1998;3:327-338.
21. Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *Journal of periodontology* 2006;77:1289-1303.
22. Perea MA, Campo J, Charlén L, A B. Enfermedad periodontal e infección por VIH: estado actual. *Avances en periodoncia* 2006;18(3):135-147.
23. Lamster IB, Grbic JT, Mitchell-Lewis DA, Begg MD, Mitchell A. New concepts regarding the pathogenesis of periodontal disease in HIV infection. *Ann Periodontol* 1998;3:62-75.
24. Pitttock S, Drumm B, Fleming P, et al. The oral cavity in Crohn's disease. *The Journal of pediatrics* 2001;138:767-771.
25. Miranda-Rius, Ribert R-R. Manifestaciones orales-periodontales de la enfermedad inflamatoria intestinal *RCOE* 2001;6(3):287-292.

26. Diaz-Guzman LM, Castellanos-Suarez JL. Lesions of the oral mucosa and periodontal disease behavior in pregnant patients. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* 2004;9:434-437; 430-433.
27. Kinane DF, Chestnutt IG. Smoking and periodontal disease. Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists 2000;11:356-365.
28. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles. *Journal of clinical periodontology* 2001;28:283-295.
29. Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA. Mechanisms of action of environmental factors--tobacco smoking. *Journal of clinical periodontology* 2005;32 Suppl 6:180-195.
30. Olf M. Stress, depression and immunity: the role of defense and coping styles. *Psychiatry research* 1999;85:7-15.
31. Breivik T. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. *European J of Oral Science* 1996;104:327-334.
32. Harfin JF. *Tratamiento ortodóntico en el adulto*. Argentina: Panamericana 1999. Cap. 18 Interrelaciones ortodóntico-periodontales. p 776-789.
33. Ristic M, Vlahovic Svabic M, Sasic M, Zelic O. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances on periodontal tissues in adolescents. *Orthodontics & craniofacial research* 2007;10:187-195.
34. Baka ZM, Basciftci FA, Arslan U. Effects of 2 bracket and ligation types on plaque retention: a quantitative microbiologic analysis with real-time polymerase chain reaction. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics* 2013;144:260-267.
35. Andruccioli MC, Nelson-Filho P, Matsumoto MA, et al. Molecular detection of in-vivo microbial contamination of metallic orthodontic brackets by checkerboard DNA-DNA hybridization. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics* 2012;141:24-29.
36. Choi DS, Cha BK, Jost-Brinkmann PG, et al. Microbiologic changes in subgingival plaque after removal of fixed orthodontic appliances. *The Angle orthodontist* 2009;79:1149-1155.
37. Blue. Microbiological and clinical periodontal effects of fixed orthodontic appliances in pediatric patients. *NEW MICROBIOLOGICA* 2008;31:209-302.

38. Paolantonio M, Festa F, di Placido G, D'Attilio M, Catamo G, Piccolomini R. Site-specific subgingival colonization by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in orthodontic patients. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics* 1999;115:423-428.
39. Armitage G. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1-6.
40. Haffajee AD, Socransky SS, Lindhe J. Comparison of statistical methods of analysis of data from clinical periodontal trials. *Journal of clinical periodontology* 1983;10:247-256.
41. Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontology 2000* 1994;5:7-25.
42. Smith GL, Socransky SS, Sansone C. "Reverse" DNA hybridization method for the rapid identification of subgingival microorganisms. *Oral microbiology and immunology* 1989;4:141-145.
43. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical biochemistry* 1983;132:6-13.
44. 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. *Analytical biochemistry* 1993;210:235-244.
45. Naranjo AA, Trivino ML, Jaramillo A, Betancourth M, Botero JE. Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics* 2006;130:275 e217-222.
46. Lee M, S. Prevalence of putative periodontopathogens in subgingival dental plaques from gingivitis lesions in Korean orthodontic patients. *The Journal of Microbiology* 2005;3:260-265.
47. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000* 1994;5:78-111.

TABLAS

Tabla 1. Características clínicas de gingivitis. ¹³

Parámetros	Salud gingival	Gingivitis
Color	Rosado pálido (relacionado con la pigmentación mucocutánea)	Rojo brillante
Contorno	Festoneado; encía marginal dentro del espacio cervical e interdental y en forma de filo de cuchillo.	Edema deforma el margen gingival de la encía y está pierde. La papila es bulbosa.
Consistencia	Firme y resiliente	Suave y con edema
Sangrado	Negativo	Positivo
Exudado gingival	Mínimo	Notable aumento

Tabla 2. Estudios microbiológicos subgingivales en pacientes con brackets. ^{33, 35-38, 45}

Autor	Año	Metodo de identificación	Especies evaluadas	Cuentas/prevalencia/proporción
Paolantonio	1999	Identificación fenotípica / TSBV	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Proporción 6.31±0.5
Lee	2005	PCR	<i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>T. forsythia</i> <i>P. gingivalis</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. nigrescens</i> <i>T. denticola</i>	Prevalencia 10.8 48.5 24.7 15.1 47.3 36.3
Naranjo	2006	Identificación fenotípica y sistema de micrométodo TSBV	<i>Fusobacterium</i> sp. <i>P. gingivalis</i>	Proporción 5.70±10.46 0.70±1.40
Ristic	2007	Identificación fenotípica con Kanamycin vacomycin lakes agar sangre y TSVB	<i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. gingivalis</i> <i>F. nucleatum</i>	Prevalencia 0.754 0.754 0.754 0.754
Blue	2008	Nm	<i>A. actinomycetemcomitans</i> <i>A. israelii</i> <i>A. odontolyticus</i> <i>A. viscosus</i> <i>F. nucleatum</i> <i>P. anaerocius</i> <i>P. gingivalis</i> <i>Streptococcus</i> sp.	Prevalencia Nm Nm Nm Nm Nm Nm Nm Nm
Choi	2009	PCR	<i>T. forsythia</i> <i>P. gingivalis</i> <i>E. corrodens</i> <i>T. denticola</i>	Prevalencia 1 1 1 1
Andrucioli	2012	Checkerboard hibridación DNA - DNA	<i>V. parvula</i> <i>L. bucalis</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. mitis</i> <i>S. oralis</i> <i>S. sanguinis</i> <i>C. gingivalis</i> <i>E. corrodens</i> <i>C. gracilis</i> <i>C. showae</i> <i>C. ochracea</i> <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>vicentii</i> <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> <i>F. periodonticum</i> <i>P. intermedia</i> <i>P. melaninogenica</i> <i>P. nigrescens</i> <i>S. noxia</i>	Cuentas 2.0 × 10 ⁷ 1.0 × 10 ⁶ 1.5 × 10 ⁶ 1.0 × 10 ⁶ 1.0 × 10 ⁶ 1.5 × 10 ⁶ 1.5 × 10 ⁶ 1.0 × 10 ⁶ 1.0 × 10 ⁶ 1.0 × 10 ⁶ 1.0 × 10 ⁶ 1.5 × 10 ⁶ 1.25 × 10 ⁶ 1.5 × 10 ⁶ 1.5 × 10 ⁶ 1.0 × 10 ⁶ 2.0 × 10 ⁶ 1.0 × 10 ⁶ 1.0 × 10 ⁶

DNA: Deoxyribonucleic acid; **PCR:** Polymerase chain reaction; **Nm:** No se menciona.

Tabla 3. Criterios de selección de los sujetos de estudio.

Grupo	Edad	No. de dientes	Nivel de inserción	Criterios de exclusión
SP (2)	20 – 27	≤20	≤4 sitios entre 3-4 mm y 0 sitios ≥5mm	Lactancia / embarazo Fumadores actuales Enfermedad de Chron Tratamiento ortodóntico ≤1 año Brackets estéticos Cirugías ortognáticas Corticotomías Minimplantes
G (2)			≥5 sitios 3-4 mm 0 sitios ≥5mm	

SP: Salud periodontal; G: Gingivitis.

Tabla 4. Listado de 40 cepas de referencia empleadas para la elaboración de sondas de DNA.

Especie	ATCC	Complejo	Especie	ATCC	Complejo
<i>Actinomyces georgiae</i>	49285	Azul	<i>Neisseria mucosa</i>	19696	Otros
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	Azul	<i>Parvimonas micra</i>	33270	Naranja
<i>Actinomyces naeslundii</i>	12104	Azul	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406	Otros
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929	Morado	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277	Otros
<i>Actinomyces viscosus</i>	43146	Azul	<i>Prevotella intermedia</i>	25611	Naranja
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> stp.b	43718	No-agrupado	<i>Prevotella loescheii</i>	15930	Otros
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236	Naranja	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845	Otros
<i>Campylobacter rectus</i>	33238	Naranja	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563	Naranja
<i>Campylobacter showae</i>	51146	Naranja	<i>Propionibacterium acnes</i>	6919	Otros
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	Verde	<i>Selenomonas noxia</i>	43541	No-agrupado
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	27872	Verde	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397	Amarillo
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612	Verde	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823	Naranja
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	14266	Otros	<i>Streptococcus gordonii</i>	10558	Amarillo
<i>Eikenella corrodens</i>	23834	Verde	<i>Streptococcus intermedius</i>	27335	Amarillo
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099	Naranja	<i>Streptococcus mitis</i>	49456	Amarillo
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271	Otros	<i>Streptococcus oralis</i>	35037	Amarillo
<i>Filifactor alocis</i>	35896	Otros	<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556	Amarillo
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i>	25586	Naranja	<i>Tannerella forsythia</i>	43037	Rojo
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693	Naranja	<i>Treponema denticola</i>	35405	Rojo
<i>Gemella morbillorum</i>	27824	Rojo	<i>Veillonella parvula</i>	10790	Morado

Las especies se presentan en orden alfabético. ATCC: Número de referencia del American Type Culture Collection (Rockville, MD, EU). Complejo: Las especies fueron agrupadas lo más similarmente posible a la descripción de complejos microbianos en la placa dentobacteriana subgingival⁸ con la siguiente excepción: *C. matruchotii*, *D. pneumosintes*, *E. saburreum*, *E. sulci*, *F. alocis*, *L. buccalis*, *N. mucosa*, *P. asaccharolytica*, *P. endodontalis*, *P. loescheii*, *P. melaninogenica*, *P. acnes* y *S. artemidis* se encuentran agrupados como "Otros".

Tablas 5a y 5 b. Características generales y periodontales de los sujetos de estudio.

5a. Características generales					
	Px 1	Px 2	Px 3	Px 4	Media %
Fecha visita	07-oct-17	06-oct-17	12-sep-17	09-sep-17	NA
Fecha de nacimiento	14-ago-92	18-may-93	04-nov-97	15-may-90	NA
Género	1	0	0	0	15
Edad	25	25	20	27	24
Antibiótico meses	0	0	0	0	0
Fumador actual	0	0	0	0	0
# Dientes presentes	28	28	24	25	26
Tx de brackets metálicos (meses)	13	22	16	30	20
N° Bandas metálicas (16, 26, 36, 46)	2	0	4	5	3
N° OD con apiñamiento dental	2	0	0	0	0.5

PX: Paciente; Género: 1 mujer, 0 hombre; Tx: tratamiento; OD: diente; NA: No aplica.

5b. Características periodontales	Px 1		Px 2		Px 3		Px 4	
	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM
Profundidad de bolsa (PB mm)	1.96	0.05	2.00	0.06	1.92	0.06	2.40	0.07
Nivel de Inserción (NI mm)	0.92	0.04	1.20	0.03	0.96	0.04	0.94	0.05
Número de sitios con NI ≥5	0	0	0	0	0	0	0	0
Placa (PLA %)	63	0.04	39	0.04	47	0.04	95	0.02
Enrojecimiento (ENR %)	55	0.04	20	0.03	67	0.04	89	0.03
Sangrado al Sondeo (SS %)	1	0.01	2	0.01	11	0.03	41	0.04
Supuración (SUP %)	0	0	0	0	0	0	0	0

PX: Paciente; EEM: Error estándar de la media.

Tabla 6. Prevalencia promedio (% sitios colonizados \pm EEM) de las 40 especies bacterianas evaluadas en las muestras de los 4 sujetos de estudio (N= 105).

% de sitios colonizados	Px 1		Px 2		Px 3		Px 4	
	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM
<i>A. georgiae</i>	4	0.04	7	0.05	12	0.06	8	0.05
<i>A. israelii</i>	68	0.09	57	0.10	73	0.09	12	0.06
<i>A. naeslundii</i>	50	0.10	61	0.09	12	0.06	50	0.10
<i>A. viscosus</i>	54	0.10	50	0.10	42	0.10	54	0.10
<i>S. anginosus</i>	93	0.05	64	0.09	81	0.08	65	0.10
<i>S. gordonii</i>	100	0.00	64	0.09	92	0.05	92	0.05
<i>S. intermedius</i>	100	0.00	89	0.06	92	0.05	96	0.04
<i>S. mitis</i>	79	0.08	46	0.10	92	0.05	92	0.05
<i>S. oralis</i>	25	0.08	14	0.07	35	0.10	15	0.07
<i>S. sanguinis</i>	0	0.00	0	0.00	0	0.00	4	0.04
<i>A. odontolyticus</i>	4	0.04	7	0.05	12	0.06	8	0.05
<i>V. parvula</i>	32	0.09	36	0.09	35	0.10	58	0.10
<i>C. gingivalis</i>	29	0.09	46	0.10	62	0.10	27	0.09
<i>C. ochracea</i>	46	0.10	50	0.10	54	0.10	12	0.06
<i>C. sputigena</i>	61	0.09	57	0.10	35	0.10	23	0.08
<i>E. corrodens</i>	25	0.08	71	0.09	23	0.08	38	0.10
<i>C. gracilis</i>	32	0.09	25	0.08	35	0.10	96	0.04
<i>C. rectus</i>	18	0.07	25	0.08	8	0.05	12	0.06
<i>C. showae</i>	29	0.09	39	0.09	31	0.09	12	0.06
<i>E. nodatum</i>	21	0.08	7	0.05	54	0.10	15	0.07
<i>F. nuc nuc</i>	93	0.05	68	0.09	27	0.09	69	0.09
<i>F. periodonticum</i>	32	0.09	36	0.09	69	0.09	15	0.07
<i>P. micra</i>	100	0.00	75	0.08	65	0.10	88	0.06
<i>P. intermedia</i>	64.3	0.09	25	0.08	35	0.10	12	0.06
<i>P. nigrescens</i>	54	0.10	43	0.10	81	0.08	42	0.10
<i>S. constellatus</i>	89	0.06	79	0.08	35	0.10	96	0.04
<i>P. gingivalis</i>	71	0.09	68	0.09	38	0.10	81	0.08
<i>T. forsythia</i>	32	0.09	25	0.08	88	0.06	27	0.09
<i>T. denticola</i>	36	0.09	18	0.07	54	0.10	19	0.08
<i>A. a. b</i>	100	0.00	89	0.06	54	0.10	96	0.04
<i>S. noxia</i>	64	0.09	61	0.09	85	0.07	77	0.08
<i>C. matruchotii</i>	100	0.00	68	0.09	42	0.10	96	0.04
<i>E. saburreum</i>	71	0.09	64	0.09	38	0.10	23	0.08
<i>F. alocis</i>	92	0.05	79	0.08	92	0.05	60	0.10
<i>P. endodontalis</i>	100	0.00	100	0.00	81	0.08	81	0.08
<i>N. mucosa</i>	18	0.07	68	0.09	85	0.07	31	0.09
<i>G. morbillorum</i>	36	0.09	7	0.05	0	0.00	23	0.08
<i>P. loescheii</i>	82	0.07	64	0.09	19	0.08	42	0.10
<i>P. melaninog.</i>	46	0.10	36	0.09	31	0.09	27	0.09
<i>P. acnes</i>	100	0.00	21	0.08	12	0.06	15	0.07

EEM: Error estándar de la media; **A. a. a.:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stp. b. Se marcan casillas con color rosa con prevalencia \geq 80% y con color verde <80%.

Tabla 7. Prevalencia promedio bacterianas (% sitios colonizados \pm EEM) por muestras evaluadas de los 4 sujetos de estudio (N= 105).

OD	Px1	Px2	Px3	Px4
	Media	Media	Media	Media
11	70	88	84	97
12	89	68	57	51
13	90	70	54	95
14	79	45	NOD	NOD
15	69	65	59	51
16	73	65	76	33
17	70	90	81	28
21	38	65	32	49
22	45	38	51	44
23	85	65	38	46
24	53	53	NOD	NOD
25	80	65	51	87
26	43	53	76	28
27	38	68	70	26
31	50	73	68	36
32	55	55	68	24
33	43	48	59	44
34	53	30	NOD	51
35	55	25	54	54
36	60	28	38	56
37	53	18	49	51
41	43	48	51	44
42	50	18	49	44
43	35	18	62	41
44	33	58	38	33
45	38	8	NOD	31
46	40	8	43	28
47	45	13	24	NOD

NOD: No presenta órgano dentario.

FIGURAS

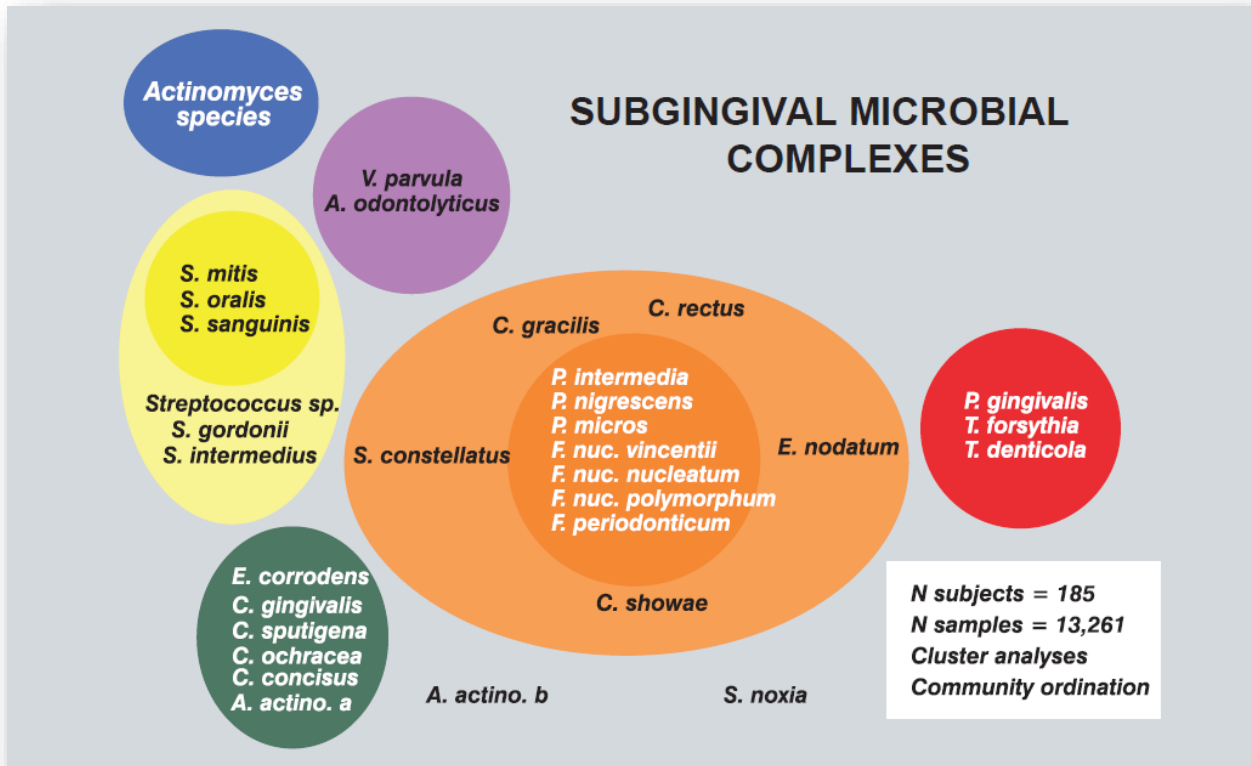


Figura 1. Diagrama de especies bacterianas agrupadas por complejos de la placa dentobacteriana subgingival. Se encuentran agrupados de esta manera por sus asociaciones (coagregación) entre especies. Se pueden reconocer por su periodonto-patogenicidad de izquierda a derecha, siendo los complejos de *Actinomyces*, morado, amarillo y verde representados con especies colonizadoras tempranas de la placa dentobacteriana subgingival, posteriormente el complejo naranja con especies patógenas putativas y por último el complejo rojo, con especies patógenas reconocidas. Así mismo se representan especies no agrupadas, ya que no se asocian con otras bacterias de la biopelícula.⁸

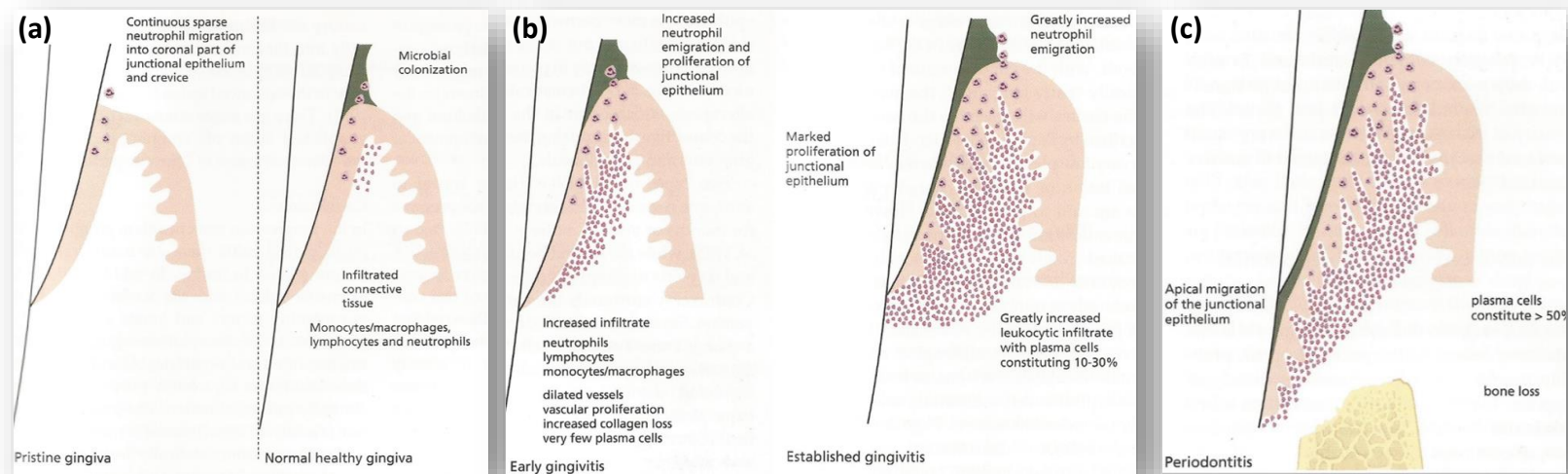


Figura 2. Respuesta inflamatoria en la evolución de las enfermedades periodontales.

- (a) Proceso inflamatorio basal considerado “normal” en salud periodontal. Infiltrado de células inflamatorias primordialmente neutrófilos asociados a epitelio y linfocitos en tejido conectivo.
- (b) Lesión temprana. Infiltrado de leucocitos polimorfonucleares(LPN) al tejido conectivo debido a la quimiotaxis del hospedero. Citocinas proinflamatorias por el aumento de leucocitos y migración a vasos sanguíneos a través del fluido crevicular.
- (c) Lesión avanzada. Infiltrado inflamatorio en tejido conectivo, citocinas proinflamatorias persistentes activación de líneas celulares de destrucción de hueso, daño en las fibras periodontales y migración de la unión cemento esmalte.⁴



Figura 3. Paciente sano periodontal bajo tratamiento de ortodoncia con aparatología fija. El estado de salud periodontal del paciente Px 2 se determinó ya que al sondeo periodontal presentó 0 sitios con ≥ 3 mm de PB/NI. Con presencia de placa con 39%, enrojecimiento gingival de 20% y sangrado al sondeo con 2% de los sitios evaluados (N=168). Se observó la encía rosada, delimitada con festoneado y las papilas interdetales en forma de cuchillo, algunos puntos localizados en la encía marginal con eritema.



Figura 4. Paciente con gingivitis bajo tratamiento de ortodoncia con aparatología fija. El estado de enfermedad gingival del G Px 4 se determinó ya que al sondeo periodontal presentó 0 sitios con ≥ 3 mm de PB/NI. Con presencia de placa con 95%, enrojecimiento gingival de 89% y sangrado al sondeo con 0.41% de los sitios evaluados (N=150). Presentó además la encía marginal con edema y eritema, con pérdida de festoneo.

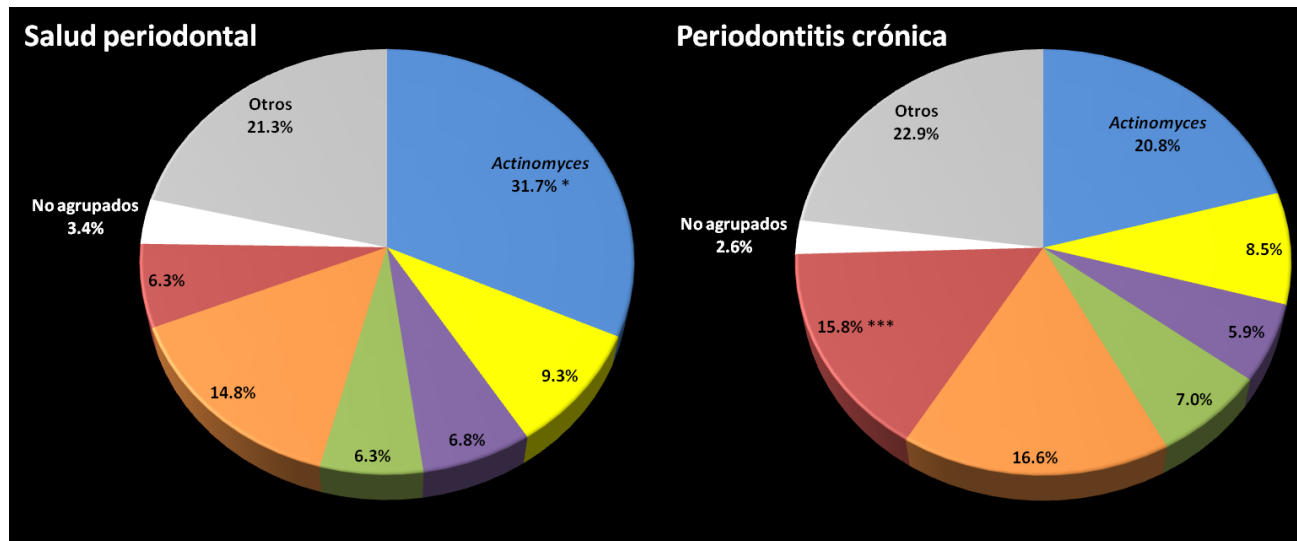


Figura 5. Proporción de complejos bacterianos en condiciones de salud periodontal y periodontitis crónica en la población mexicana. Se encuentra en mayor proporción el complejo azul y “otras especies” en estado de salud periodontal comparado con periodontitis, mientras que en periodontitis se encuentran en mayor proporción especies del complejo rojo, comparado con salud periodontal.¹⁴

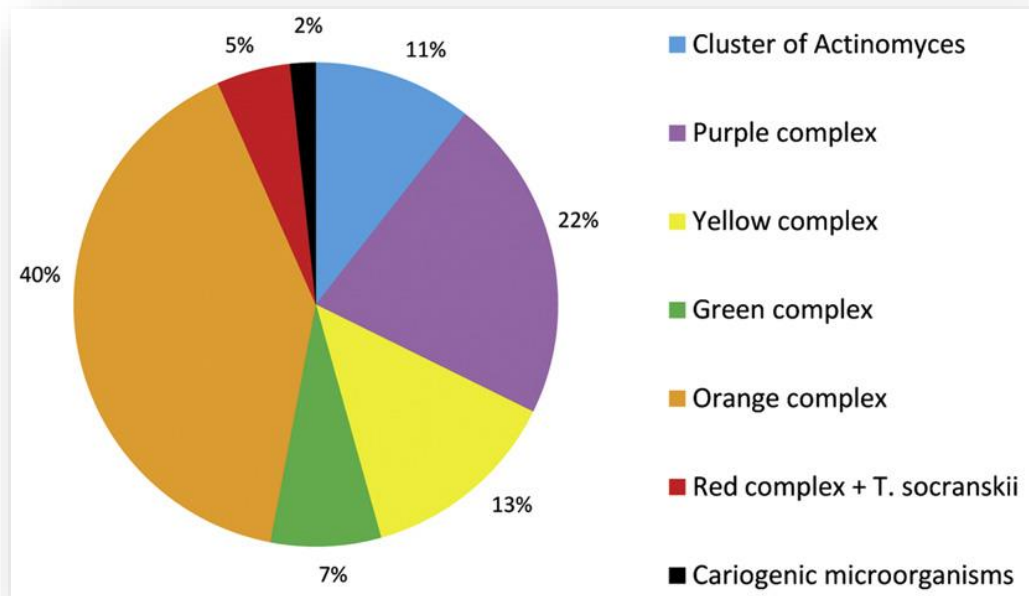


Figura 6. Proporción promedio de complejos bacterianos presentes en la microbiota supragingival de sujetos con brackets metálicos. Se encuentra en mayor proporción los complejos naranja y morado, en menor proporción especies relacionadas con la caries dental.³⁵

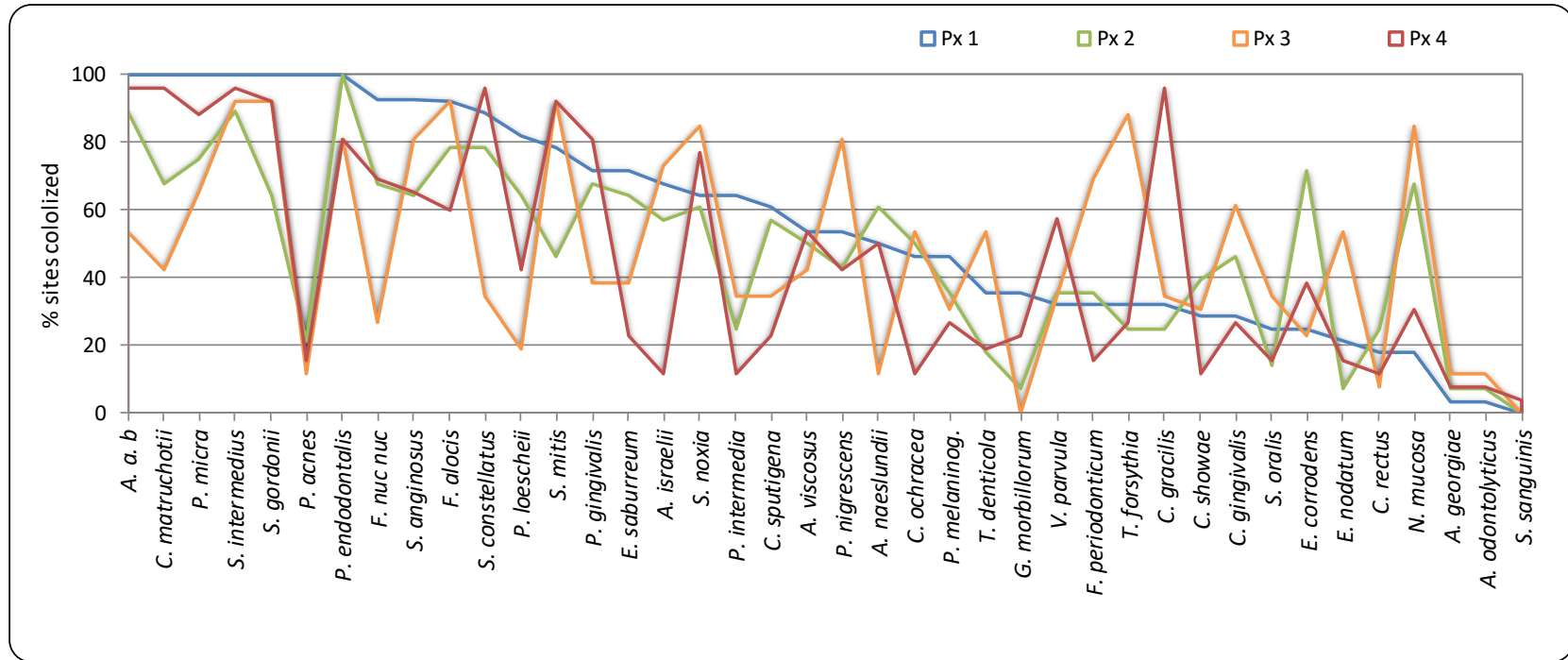


Figura 7. Prevalencia promedio (% sitios colonizados \pm EEM) de las 40 especies bacterianas evaluadas en las muestras de los 4 sujetos de estudio (N=105). El patrón de colores representa a cada uno de los sujetos de estudio (Px1-Px4). Se observa la prevalencia promedio por sitios colonizados de las especies, ordenadas de mayor a menor respecto al Px1.

ANEXOS

ANEXO 1. FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Laboratorio de Genética Molecular
Facultad de Odontología
Universidad Nacional Autónoma de México



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PERIODONCIA (FOLIO NO. 001)

FE-GMLIFO-001 (6)

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Dra. Laurie Ann Jiménez-Fyvie.

CLÍNICOS RESPONSABLES:

- Mtra. Adriana-Patricia Rodríguez-Hernández.
- Esp. Velia Jacobo-Soto.
- Dra. Gaby Esthela-Tiznado.
- Mtra. Ma. de Lourdes Márquez-Corona.

INSTITUCIÓN: Laboratorio de Genética Molecular.
División de Estudios de Posgrado e Investigación.
Facultad de Odontología, UNAM.

TELÉFONO: (044) 55-2699-7530 (horas y días hábiles)

E-MAIL: contacto@labgenmol.onmicrosoft.com

TÍTULO DEL PROYECTO: Factores microbiológicos y genéticos relacionados con las enfermedades periodontales en México (DGAPA # IN213006-3).

INVITACIÓN A PARTICIPAR: Usted está invitado a participar en un estudio de investigación que analiza las bacterias de la boca así como las características genéticas y del sistema de defensa de las personas que padecen enfermedades de las encías.

PROPÓSITO: Usted debe entender que los objetivos del estudio son determinar la presencia y cantidad de bacterias que se encuentran en la boca de personas con diferentes tipos de enfermedades de las encías y comparar las características genéticas y la magnitud de la respuesta del sistema de defensa entre personas con y sin enfermedades de las encías.

PROCEDIMIENTOS: Usted debe entender que para participar en el estudio debe haber nacido en la República Mexicana, no debe padecer ninguna enfermedad sistémica a excepción de diabetes, debe tener por lo menos 20 dientes naturales en la boca, no puede haber recibido ningún tipo de tratamiento periodontal en el pasado, no puede haber recibido una limpieza dental profesional en el último mes y no puede haber tomado ningún tipo de antibiótico en los últimos 3 meses. Asimismo, en el caso de ser mujer, no puede estar embarazada ni lactando.

Usted debe entender que su participación en este estudio de investigación requiere uno o más de los siguientes procedimientos:

- **La realización de una evaluación periodontal completa**, la cual consistirá en medir la profundidad de las pequeñas "bolsas" que se encuentran entre sus dientes y sus encías. Estas medidas serán tomadas con un instrumento especial llamado sonda que será introducido en dichas "bolsas" en 6 lugares diferentes alrededor de cada diente de su boca. Este es un procedimiento de rutina ampliamente utilizado en la práctica dental. Además de lo anterior, se le realizará una evaluación general de la salud de sus encías para saber si sangran, si están inflamadas, si están enrojecidas, etc.
- **La obtención de algunos de sus datos generales y médicos**, lo cual consistirá en el llenado de una historia clínica con preguntas que le serán leídas por el clínico que lo atiende y la medición de su peso, estatura, presión sanguínea, pulso y porcentaje de grasa corporal.

COPIA ARCHIVO



Iniciales del paciente

Círculo de la Investigación Científica
Cd. Universitaria 04510, CDMX.

FE-GMLIFO-005



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PERIODONCIA
(FOLIO NO. 001)

FE-GMLIFO-001 (6)

- **La toma de un máximo de 28 muestras de placa dentobacteriana**, lo cual se realizará tomando con un instrumento dental, una muestra de la película blanquecina que se forma naturalmente sobre la superficie de sus dientes (placa dentobacteriana) de todos los dientes de su boca. Este procedimiento no es doloroso aunque en algunas ocasiones puede ser un poco molesto. Cada muestra de placa dentobacteriana será colocada dentro de un tubo.
- **La toma de 1 muestra de máximo 11 ml de sangre**, lo cual se realizará siguiendo los mismos procedimientos que se llevan a cabo en laboratorios de diagnóstico clínico acreditados. Dicho procedimiento consiste en colocar una liga gruesa ligeramente apretada alrededor de su brazo para facilitar la visualización de sus venas. Posteriormente, se introduce una aguja a una vena de alguno de sus brazos y se deposita la sangre en uno o dos tubos de vidrio conforme sale de la vena. La liga y aguja serán retiradas y el sitio de punción será cubierto con un curita una vez que el clínico determine que ha dejado de sangrar. Este procedimiento puede causarle dolor o molestias principalmente en el sitio de la punción.
- **La toma de 1 muestra de células epiteliales de la mucosa bucal**, lo cual se realizará frotando un algodón sobre la superficie interna de sus mejillas, paladar, labios, encías y por debajo de la lengua durante aproximadamente 1 minuto. Este procedimiento no conlleva ninguna molestia. La muestra será colocada sobre una tarjeta de papel especial.

Usted debe entender que todos los procedimientos serán realizados en una sola visita que tendrá una duración máxima de 2 horas y que en este estudio participarán aproximadamente 500 (quinientas) personas.

Usted debe entender que su participación en el estudio no implica que será sometido a ningún tratamiento diferente o adicional a aquellos tratamientos que su clínico tratante considere necesarios para su caso.

RIESGOS: Usted debe entender que los riesgos que usted corre con su participación en este estudio son mínimos. La evaluación periodontal que se le realizará es la misma que realiza cualquier dentista para determinar la salud de sus encías. Las muestras de placa se tomarán siguiendo procedimientos similares a los que se realizan durante una limpieza dental. La muestra de células epiteliales de la mucosa bucal no conlleva ninguna molestia; y la muestra de sangre puede causarle algunas molestias menores pero no duraderas en el sitio de la punción.

Debe entender que todos los procedimientos serán realizados por profesionales calificados y con experiencia, utilizando procedimientos de seguridad aceptados para la práctica clínica. Todo el personal que le atenderá utilizará guantes desechables, bata y cubrebocas para su propia protección y la de usted. Todos los materiales e instrumental que serán utilizados serán desechables y/o estarán esterilizados para su protección.

BENEFICIOS: Usted debe entender que su participación no le proporcionará ningún beneficio inmediato ni directo. Sin embargo, gracias a su participación, se obtendrá información nueva y más extensa sobre las causas y los factores que intervienen en las enfermedades de las encías en la población de México, lo cual podría ayudar en un futuro no sólo al mejor entendimiento de dichas enfermedades, sino también a la búsqueda y empleo de nuevos tratamientos para nuestra población.

COMPENSACIONES: Usted debe entender que no existe ninguna compensación monetaria por su participación pero que tampoco incurrirá en ningún gasto adicional.

COPIA ARCHIVO



Iniciales del paciente

Circuito de la Investigación Científica
Cd. Universitaria 04510, CDMX.

FE-GMLIFO-005



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PERIODONCIA
(FOLIO NO. 001)

FE-GMLIFO-001 (6)

CONFIDENCIALIDAD: Usted debe entender que toda la información que sea obtenida tanto en sus historiales clínicos como en el análisis de sus muestras será mantenida en estricta confidencialidad. Así mismo, si cualquier publicación resultara de esta investigación, no se le identificará jamás por nombre.

RENUNCIA/RETIRO: Usted debe saber que su participación en el estudio es totalmente voluntaria y que puede decidir no participar o retirarse del estudio en cualquier momento, sin que esto represente algún perjuicio para su atención dental presente ni futura en las clínicas de la Facultad de Odontología de la UNAM. También debe entender que si cualquiera de los responsables de este estudio decidieran no incluirle en la investigación, pueden hacerlo si así lo creyeran conveniente.

DERECHOS: Usted tiene el derecho de hacer preguntas y de que éstas le sean contestadas a su plena satisfacción. Puede hacer sus preguntas en este momento, antes de firmar la presente forma o en cualquier momento en el futuro. Si desea mayores informes acerca de su participación en este estudio de investigación o sobre sus derechos como sujeto de estudio, puede contactar a cualquiera de los responsables llamando al número de teléfono que se encuentra en la parte superior de la primera página de esta forma.

ACUERDO: Al firmar en los espacios provistos a continuación usted constata que ha leído y entendido esta forma de consentimiento y que está de acuerdo con su participación en este estudio. Al terminar la visita recibirá una copia de esta forma.

_____ Nombre del Paciente	_____ Firma del Paciente	_____ Fecha (Día/mes/año)
_____ Nombre del Clínico Responsable	_____ Firma del Clínico Responsable	_____ Fecha (Día/mes/año)

COPIA ARCHIVO



Iniciales del paciente

Circuito de la Investigación Científica
Cd. Universitaria 04510, CDMX.

FE-GMLIFO-005