



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS MICROBIOLÓGICOS PARA
ENFERMEDADES PERIODONTALES.

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:

LAURA ITZEL RAMOS FUENTES

TUTOR: C.D. LUIS ALEJANDRO HERNÁNDEZ LÓPEZ

MÉXICO, D.F.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

“Enseñarás a volar, pero no volarán tu vuelo.
Enseñarás a soñar, pero no soñarán tu sueño.
Enseñarás a vivir, pero no vivirán tu vida.
Sin embargo, en cada vuelo, en cada sueño, en cada vida,
Perdurará siempre la huella del camino enseñado.”

Gracias principalmente a **Dios** por permitirme llegar hasta esta etapa de mi vida y por lo afortunada que he sido al encontrar en mi camino a todas las personas, que de algún modo contribuyeron para que yo sea la persona que soy hoy en día.

Gracias a mis padres **Laura** y **Antonio** por su apoyo incondicional, por impulsarme a seguir adelante, a no rendirme, por estar conmigo siempre a pesar de mis errores, por todos los valores que me han inculcado, los consejos y regaños, por su amor y cuidado desde que llegue a este mundo, desde el jardín de niños hasta la universidad estuvieron ahí acompañándome, desvelándose haciendo tareas, forrando libretas, firmando boletas, gracias por compartir cada minuto de mi vida y por brindarme una gran familia.

Gracias a **Brenda** y a **Arely** por compartir su vida conmigo por ser mis mejores amigas, por sus consejos, su cariño y su apoyo, a **Dylan** y a **Natalia** por alegrar mis días, a **Anthony** y a **Ivan**, por compartir momentos conmigo.
Gracias a mi abuela **Esther** por su gran apoyo, por su cariño, por alimentarnos y ayudarme a cuidar a mi hijo, cuando tenía que estar en la facultad, gracias a mi abuelo **Antonio**. A mis abuelos, **Mario** y **Angélica** porque fueron los pilares de mi familia, los que me dieron una mamá maravillosa.

Y como olvidar el gran apoyo, dedicación y amor de **Edson** mi hijo y **Jesús** mi esposo, por sus noches de desvelo, por acompañarme a hacer mis tareas, por ser mis pacientes durante la carrera, por aguantar mi mal genio o cuando llegaba estresada después de un largo día de escuela, por aguantar el descuido y el poco tiempo que les he dedicado, simplemente gracias. Ustedes son mi principal motor.

Gracias a cada uno de los maestros y doctores que contribuyeron en mi formación académica, a los pacientes que colaboraron.
Gracias a toda mi familia en general, primos, tíos, etc., a mis amigos, conocidos, de los que al menos algún consejo recibí y también a los que no creyeron en mí, porque gracias a ellos tuve el orgullo y el coraje para impulsarme a seguir.
Este logro no sólo es mío es de cada uno de ustedes que nunca me dejaron sola, que me aman y me ayudan a ser una mejor persona día con día.
Es un gran privilegio pertenecer a la máxima casa de estudios del país

“Orgullosamente **UNAM**, Orgullosamente **Facultad de Odontología**.”

ÍNDICE

A. INTRODUCCIÓN.....	5
1. Resumen.....	5
2. Justificación	7
3. Objetivo.....	8
3.1 General	8
3.2 Específicos.....	8
B. MARCO TEÓRICO.....	9
1. Diversidad de la microbiota oral.....	9
1.1 Biopelícula dental: determinantes tempranos de la formación de placa	10
1.2 Microbiología en la salud periodontal.....	15
1.3 Microbiología en la enfermedad periodontal	17
1.4 Complejos microbianos subgingivales	19
1.5 Asociación bacteriana con la salud y con la enfermedad.....	21
2. Periodontograma para el diagnóstico periodontal.....	23
2.1 Índice periodontal de Russel forma OMS	23
2.2 Índice de Necesidad de Tratamiento Periodontal Comunitario	24
3. Métodos fenotípicos para el diagnóstico microbiológico	29
3.1 Cultivo de bacterias orales.....	30
3.1.1 Medios de cultivo	34
3.2 Microscopia de inmunofluorescencia	34
4. Métodos inmunológicos para el diagnóstico microbiológico	35
4.1 Inmunoensayo con fluorescencia de concentración de partículas	35
4.1.1 Con gránulos de poliestireno	35
4.1.2 Con células bacterianas	36
4.2 Inmunoensayo de membranas.....	36
4.3 Marcadores de sangre periférica para patógenos periodontales	37
5. Métodos genéticos para el diagnóstico microbiológico	37
5.1 Recuperación de DNA bacteriano de muestras clínicas	37
5.2 Detección por PCR	38
5.2.1 Cebador	39
5.2.2 Ensayo de PCR	39
5.3 QPCR, PCR cuantitativa	41
5.4 Ensayos de hibridación de DNA	43
5.4.1 Análisis en tablero de ajedrez de todo el genoma	44
5.4.2 Análisis en tabla de ajedrez	44
5.4.3 Hibridación en microarreglos	45
5.5 Clonación del gen 16S ribosómico y análisis de secuencias	46
5.6 Secuenciación de nueva generación	49
5.7 Análisis de secuencias metagenómico	50

5.8 Genómica unicelular	52
6. Laboratorios de investigación para el diagnóstico periodontal.....	53
6.1 Laboratorio de Genética Molecular (LGM) UNAM	54
C. DISCUSIÓN	57
D. CONCLUSIONES.....	60
E. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y ELECTRÓNICAS	61

A. INTRODUCCIÓN.

1. Resumen.

Existen hasta 600 especies diferentes de bacterias que colonizan la cavidad bucal y que afectan el delicado equilibrio de las interacciones entre el huésped y las bacterias, que lleva a la salud o a la enfermedad. La infección periodontal inicia con patógenos bucales invasivos específicos que colonizan las biopelículas de placa dental en la superficie radicular del diente.¹

Los factores locales y sistémicos también modulan la susceptibilidad de un individuo a la periodontitis. Este desafío crónico de los microorganismos virulentos lleva a la destrucción de los tejidos blandos y duros del soporte dentario del periodonto, incluido el hueso alveolar, el cemento radicular del diente y el ligamento periodontal.¹

Aunque la periodontitis se inicia con la microbiota subgingival, se acepta que los mediadores de la degradación de tejido conectivo se generan en gran medida mediante la respuesta del huésped a la infección patogénica.²

En un huésped susceptible, los factores microbianos de virulencia activan la liberación de enzimas derivadas del huésped y las citocinas proinflamatorias que pueden llevar a la destrucción del tejido periodontal. Para la gravedad de la enfermedad son cruciales las implicaciones de los productos secundarios relacionados con la microbiota (como la endotoxina) sobre la inducción de la respuesta inmune innata, una señalización de receptor tipo Toll (TLR), la generación de los patrones moleculares relacionados con patógenos (PAMP) y su papel en la patogénesis de la enfermedad periodontal.²

Dada la etiología compleja de las enfermedades periodontales, cualquier prueba genética quizá solo sea útil en parte de los pacientes o las poblaciones. El conocimiento de los factores genéticos específicos de riesgo o de los biomarcadores inflamatorios permite a los clínicos dirigir la prevención y el tratamiento con bases ambientales hacia los individuos más susceptibles a la

enfermedad. Además las relaciones entre la infección periodontal y las enfermedades sistémicas, como la cardiovascular, la osteoporosis u otras enfermedades subrayan la idea de que la periodontitis representa una enfermedad poligénica de varias etiologías que interactúa con otras enfermedades inflamatorias crónicas.¹

Por tanto se pretende realizar una propuesta para implementar un adecuado diagnóstico microbiológico, en la Clínica de Recepción, Evaluación y Diagnóstico Presuntivo de la Facultad de Odontología de la UNAM, implementando un periodontograma básico, diferente al que se maneja en la CREDP, que facilite el control periodontal comunitario.

Por lo cual será necesario que el profesional de la salud conozca las diferencias entre la microbiota oral en pacientes sanos y en pacientes enfermos periodontalmente y logre identificar los diferentes métodos de diagnóstico microbiológico, en este trabajo citaremos algunos métodos de diagnóstico microbiológico clásicos y no menos importantes, como lo son el cultivo bacteriano y la microscopía, y técnicas moleculares de identificación bacteriana que se encuentra dentro de lo más actual, por ejemplo: detección por PCR, PCR cuantitativa, hibridación de DNA, secuenciación de nueva generación, por mencionar algunos, igualmente describiremos las técnicas de cada uno de éstos métodos y su importancia para la odontología actual.

2. JUSTIFICACIÓN.

Diariamente acuden a la Facultad de Odontología de la UNAM muchos pacientes buscando una adecuada atención odontológica.

El primer paso es dirigirse a la CREDP (Clínica de Recepción, Evaluación y Diagnóstico Presuntivo) para obtener su carnet y una ruta de tratamiento, para posteriormente ser remitidos a las diferentes clínicas de la Facultad.

Una cantidad sumamente importante de pacientes son remitidos a la clínica de periodoncia de la Facultad de Odontología, debido a problemas periodontales leves y severos. Lo cual resulta demasiado complicado determinar ya que no se cuenta con un adecuado y más directo análisis periodontal en la CREDP. Como un periodontograma básico o comunitario, que determine la gravedad de la enfermedad periodontal y a su vez se puede remitir al paciente a realizar una prueba de diagnóstico microbiológico para posteriormente continuar con su atención clínica.

3. OBJETIVOS.

3.1 General.

Realizar una búsqueda amplia sobre el panorama en cuanto a diagnósticos microbiológicos para poder detectar la enfermedad periodontal y así poder remitir adecuadamente desde la CREDP (Clínica de Recepción, Evaluación y Diagnóstico Presuntivo) de la Facultad de Odontología (de la UNAM).

3.2 Particulares.

3.2.1 Con este trabajo, pretendo realizar una propuesta para implementar un adecuado diagnóstico microbiológico, en la Clínica de Recepción, Evaluación y Diagnóstico Presuntivo de la Facultad de Odontología de la UNAM.

3.2.2 Implementar un periodontograma básico, diferente al que se maneja en la CREDP, que facilite el control periodontal comunitario.

3.2.3 Que el profesional de la salud conozca las diferencias entre la microbiota oral en pacientes sanos y en pacientes enfermos periodontalmente.

3.2.4 Identificando los diferentes métodos de diagnóstico microbiológico.

3.2.5 Conociendo las técnicas en las que se llevan a cabo dichos diagnósticos.

3.2.6 Identificando la cantidad y las especies de microorganismos que se requieren para saber que nos enfrentamos ante un paciente enfermo.

3.2.7 Estar a la vanguardia en las pruebas microbiológicas y moleculares que se realizan en la actualidad.

B. MARCO TEÓRICO.

1. Diversidad de la microbiota oral.

Hace más de 300 años, Antón Van Leeuwenhoek observó, mediante su microscopio, una enorme serie de “animálculos” en la placa dental humana. Desde entonces los microbiólogos han intentado aislar y catalogar las especies de la microbiota bucal. Con el advenimiento de los métodos anaerobios para cultivar bacterias, han sido aisladas, clasificadas y denominadas más de 250 especies. La diversidad de los morfotipos de la microbiota bucal puede verse en microfotografías electrónicas de las biopelículas dentarias (fig. 1). Inicialmente, los investigadores se centraron en las especies asociadas con las enfermedades, tales como la gingivitis, la periodontitis juvenil localizada (actualmente denominada periodontitis agresiva) y la periodontitis crónica, e identificaron a los principales agentes patógenos de estas enfermedades: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* (anteriormente llamada *Bacteroides forsythus*) y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.^{3,4,5}

En 1998 Socransky et al, propusieron que las enfermedades bucales podían ser mejor comprendidas centrándose en el consorcio de microorganismos, más que en los microorganismos por separado. Estos autores identificaron siete conjuntos de bacterias, o complejos, observados juntos de forma repetida en la periodontitis. Sugirieron que el complejo más patógeno comprendía a *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *Treponema denticola* (complejo rojo), que dependía de la colonización inicial de la bolsa por un complejo de microbios de algún modo menos patógenos, denominado el complejo naranja. Estos complejos bacterianos fueron definidos por Socransky et al basándose en el análisis de los perfiles microbianos de más de 13,000 muestras de placa procedentes de 185 individuos, utilizando sondas de ADN en análisis de hibridación en damero. Socransky y Haffajee han revisado los

recientes estudios que asocian las especies y los complejos con una variedad de enfermedades bucales.^{6,7}



Fig. 1. Microfotografía electrónica de barrido de la placa bacteriana. Nótese la gran cantidad de formas y tamaños bacterianos. Barra: 10 µm (Cortesía de Z. Skobe, The Forsyth Institute). Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal Microbial ecology. Periodontol 2000 2007: 17: 81.

1.1 Biopelícula dental: determinantes tempranos de la formación de placa.

La placa bacteriana dental, debido a su importancia clínica y a su accesibilidad para la investigación in vivo constituye una de las comunidades de biopelículas más estudiadas y mejor comprendidas. Las investigaciones han mostrado que el desarrollo de esta comunidad microbiana es un proceso que implica la cooperación y la competencia entre una comunidad de microorganismos enormemente diversa.¹

Un determinante crítico de la colonización bacteriana de cualquier superficie es la capacidad de las bacterias de adherirse a esa superficie. La

adhesión bacteriana a tejidos del huésped puede ocurrir por una variedad de mecanismos. Un mecanismo general implica fuerzas inespecíficas (p. ej., fuerzas iónicas, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van Der Waals) entre las superficies microbianas y del huésped. Otro mecanismo implica interacciones específicas o estereoquímicas entre adhesinas de la superficie bacteriana y los componentes del huésped en la película. Estas últimas interacciones, similares a las interacciones anticuerpo-antígeno o enzima-sustrato, dependen del reconocimiento de formas moleculares entre proteínas. Estas interacciones son altamente específicas y, cuando se superponen a las fuerzas inespecíficas, explican en parte la colonización selectiva de los tejidos del huésped. El receptor puede ser otra proteína o un carbohidrato (a menudo unido a un glucolípido o glucoproteína).²

Se piensa que la maduración de la placa dental, es decir, la etapa del desarrollo de la placa posterior a la adhesión bacteriana inicial, depende en gran medida de la adsorción de bacterias presentes en la saliva a bacterias ya adheridas al diente. Este fenómeno se ha estudiado *in vitro* permitiendo interactuar a dos o más cepas de distintas especies, con el resultado de agrupamiento de los dos tipos celulares. Esto puede ocurrir entre dos especies en solución (coagregación) o entre una bacteria en solución que se adhiere a otra ya adherida (coadhesión) (fig. 2).¹

Muchos estudios sobre la microbiología bucal se han centrado en determinar la organización espacial y el desarrollo de la placa, examinando la sucesión de microorganismos durante el crecimiento de la biopelícula. Diversas y excelentes revisiones han analizado la estructura y la composición de las comunidades bucales. Está claro que la placa no es simplemente una capa de sarro que contienen microorganismos, sobre la superficie del diente, sino que representa una comunidad microbiana estructurada, interdependiente.^{9, 10, 11, 12}

Aunque el desarrollo de la placa bacteriana sobre la superficie dentaria es compleja y depende de factores tanto espaciales como temporales, puede ser descrita en tres pasos distintos:

Formación de una “película” (pellicle) condicionante sobre el esmalte dentario. Adherencia de bacterias –célula a película o célula a superficie- (colonizadores primarios).

Interacciones de célula a célula entre los colonizadores medios y tardíos, y entre éstos y los colonizadores primarios.^{13,14}

Las investigaciones de histomorfología microscopía electrónica, cultivo y biología molecular de la placa dental han aportado importante información sobre la composición microbiológica de la placa en la salud y en diversos estados patológicos. Ahora se estima que más de 700 especies tienen el potencial de habitar la cavidad oral humana. Debe hacerse notar que estudios recientes en que se usaron métodos moleculares independientes de cultivo se sugiere que muchos de los tipos genéticos no son cultivables.¹

Este enfoque también ha sugerido que en la patogenia de las enfermedades bucales podrían intervenir bacterias hasta ahora no reconocidas como patógenos del ser humano. Por ejemplo, algunos miembros del grupo TM7, una división descrita hace poco de las bacterias conocidas sólo a partir de estudios de secuencias de DNA ribosómico de 16S en el ambiente, se han identificado como miembros prominentes de la placa dental subgingival. Este fenotipo se encontró originalmente en sistemas de tratamiento de aguas residuales de sedimento. Tales observaciones sugieren que muchos de los experimentos previos en que sólo se identificaron bacterias cultivables relacionadas con la salud y con estados patológicos pudieran no haber dado un cuadro preciso de la diversidad microbiana relacionada con esos estados clínicos.²

Los colonizadores iniciales o tempranos de la placa son especies comensales como *estreptococos* (*Streptococcus sanguis*, *Streptococcus gordonii* y *Streptococcus oralis*) y *actinomyetos*. La salud bucal comienza a

deteriorarse conforme la placa es colonizada por otras especies. La placa relacionada con gingivitis es un tanto más gruesa que la formada en sitios sanos normales. Las bacterias en capas más profundas a menudo tienen aspecto lisado ("fantasmas"). Son comunes los depósitos mineralizados dentro de la placa dentobacteriana (que con el tiempo se convierten en cálculos). Las mayores proporciones de bacterias filamentosas y Gramnegativas (p. ej. *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Selenomonas sputigena*, *Campylobacter sputorum* y *Haemophilus parainfluenzae*) residen en la placa dentobacteriana.¹

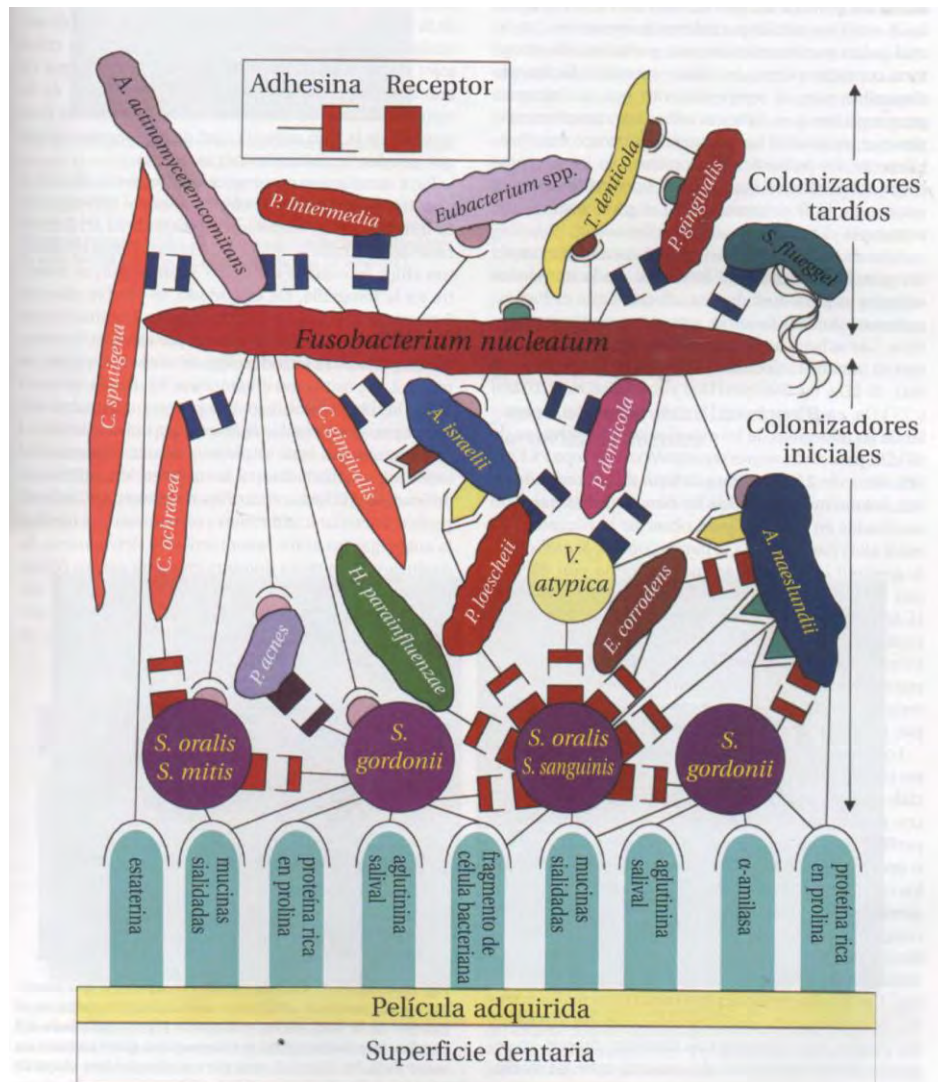


Fig. 2. Modelo espacio temporal de colonización bacteriana bucal; se muestra el reconocimiento de los receptores de la película salival por las primeras bacterias colonizadoras y coagregaciones entre los colonizadores iniciales, fusobacterias y colonizadores tardíos de la superficie dentaria.⁷

Se sabe que cada coagregación representada se produce de un modo emparejado. Se propone que estas interacciones, en conjunto, representan el desarrollo de la placa bacteriana. Comenzando desde abajo, los colonizadores primarios se unen a través de las adhesinas (líneas de color negro con el extremo redondo) a los receptores salivales complementarios (columnas verticales de color azul verdoso con la parte superior redonda) en la película adquirida, recubriendo la superficie dentaria. Los colonizadores secundarios se unen a las bacterias previamente unidas. La unión secuencial produce la aparición de nuevas superficies nacientes que conectan con la siguiente célula pareja de coagregación. Los diferentes tipos de coagregación se muestran como conjuntos complementarios de símbolos de diferentes formas. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal Microbial ecology. Periodontol 2000 2007: 17: 63.

1.2 Microbiología en la salud periodontal.

La recuperación de microorganismos de sitios periodontalmente sanos es mínima, en comparación con la de los sitios enfermos. Las bacterias relacionadas con la salud periodontal son, sobre todo especies facultativas Grampositivas y miembros de los géneros *Streptococcus* y *Actinomyces* (p. ej. *S. sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*). También se encuentran pequeñas proporciones de especies Gramnegativas, con más frecuencia *P. intermedia*, *F. nucleatum* y *Campylobacter*, especies de *Neisseria* y *Veillonella*. Estudios microscópicos indican la presencia de pocas espiroquetas y bastoncillos móviles.¹

Se ha propuesto que ciertas especies bacterianas son protectoras o benéficas para el huésped, incluidas *S. sanguinis*, *Veillonella parvula* y *Campylobacter ochraceus*. Por lo general se encuentran en cantidades elevadas en sitios periodontales que no muestran pérdida de inserción (sitios inactivos), pero en cantidades bajas en sitios donde hay destrucción periodontal activa. Tal vez estas especies evitan la colonización y proliferación de microorganismos patogénicos. Como ya se mencionó, un mecanismo para lo anterior, es la producción de H₂O₂ de *S. sanguinis*; se sabe que el H₂O₂ es letal para las células de *A. actinomycetemcomitans*. Estudios clínicos han mostrado que los sitios con niveles elevados de *C. ochraceus* y *S. sanguinis* se relacionan con una mayor ganancia de inserción después de la terapia, lo que apoya más este concepto.²

Según se muestra en la figura 3, algunas especies tales como los miembros de los géneros *Gemella*, *Granulicatella*, *Streptococcus* y *Veillonella* son comunes en todas las zonas de la cavidad oral.⁷

En la mayoría de los microorganismos de salud periodontal existe una capacidad simbiótica de mantener relaciones con el huésped, que se basan en beneficios mutuos.¹⁵

Los microorganismos que están presentes en la cavidad oral sana incluyen; *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Eubacteria*, *Lactobacterium*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus* y *Propionibacterium*.¹⁵

Estas bacterias contribuyen a una salud periodontal probablemente siguiendo mecanismos, ocupando nichos pasivamente, evitando de este modo colonizar a los agentes patógenos:

Previenen el crecimiento de patógenos.

Previenen a los patógenos de producir factores de virulencia.

Degradan factores de virulencia producidas por patógenos.¹⁵

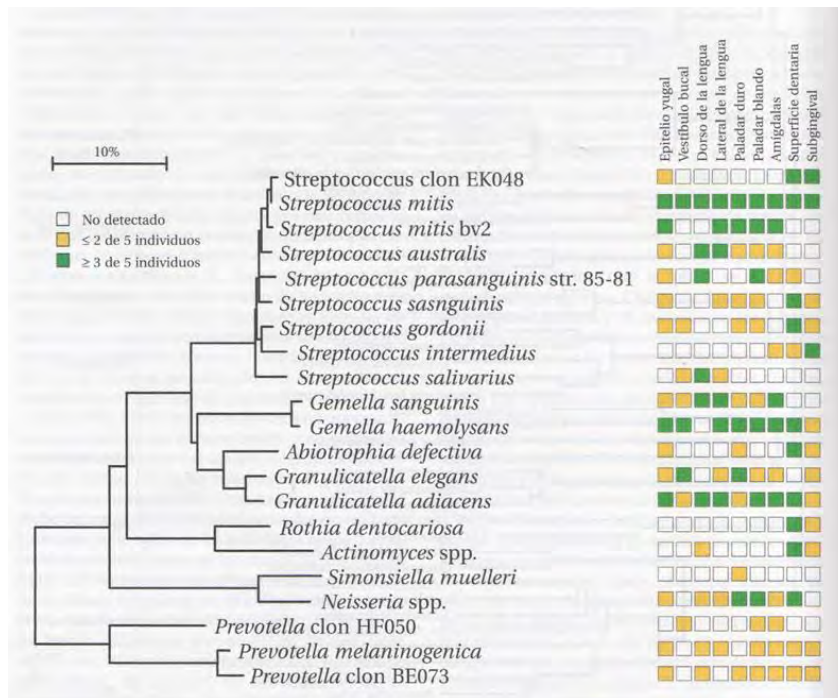


Fig. 3. Especies predominantes en la cavidad bucal y su asociación con zonas específicas. La distribución de especies bacterianas en las zonas bucales de los individuos está indicada en las columnas de cuadros a la derecha del árbol. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal Microbial ecology. Periodontol 2000 2007: 17: 84.

1.3 Microbiología en la enfermedad periodontal.

Algunos microorganismos han sido identificados recientemente como patógenos periodontales.¹⁵

Postulados de Socransky:

Las enfermedades periodontales no son causadas por un solo organismo, la piedra angular de los postulados de Koch. En efecto, estas entidades de la enfermedad son el resultado de infecciones mixtas.¹⁵

Es mejor identificar bacterias periodontopatógenas, los postulados de Koch fueron reemplazados con los postulados de Socransky (1992), estos incluyen el seguimiento:

- 1) El microorganismo debe estar presente en una proporción elevada en sitios activos de la enfermedad.
- 2) La eliminación del microorganismo se asocia con la remisión de la enfermedad.
- 3) Los microorganismos poseen factores de virulencia para iniciar y agravar la enfermedad.
- 4) La respuesta inmune celular o humoral debe ser indicativa de enfermedad.
- 5) La implantación experimental del microorganismo dentro del surco gingival de un animal de experimentación debe inducir la enfermedad, inflamación, daño en el tejido conectivo y pérdida ósea.
- 6) Después del tratamiento se debe eliminar el patógeno putativo de la lesión periodontal.

Patógenos implicados en el desajuste periodontal:

<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
<i>Tannerella forsythia</i>
<i>Eikenella corrodens</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Peptostreptococcus micros</i>
<i>Porphyromonas gingivalis</i>

<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Campylobacter rectus</i>
<i>Selenomas sp</i>
<i>Eubacterium sp</i>
<i>Espiroquetas</i>

1.4 Complejos microbianos subgingivales.

Un punto de referencia en el estudio realizado por Socransky et al (1998), examinó acerca de 13000 muestras de placa subgingival de 185 sujetos adultos y utilizó el método de hibridación DNA y técnicas para ordenar las comunidades para demostrar la presencia de grupos específicos de microbios dentro de la placa dental (ver fig. 4).¹⁵

La presencia y niveles de 40 taxas subgingivales están determinadas en las muestras de placa, utilizando sondas de DNA genómico y la hibridación DNA-DNA (checkerboard).¹⁵

1er complejo (rojo): *Bacteroides forsythus* (*Tannerella forsythia*), *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola*.

2do complejo (naranja): *Eubacterium nodatum*, *C. rectus*, *Campylobacter showae*, *Streptococcus constellatus*, *Campylobacter gracilis*, *F. nucleatum*, *Fusobacterium polymorphum*, *Porphyromona intermedia*, *Porphyromona micros*, *Porphyromona nigrescens*.

3er complejo (amarillo): *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *Streptococcus intermedius*.

4to complejo (verde): *Campylobacter gingivalis*, *Campylobacter sputigena*, *C. ochracea*, *Campylobacter concisus*, *E. corrodens*, *A. actinomycetemcomitans* serotipo a.

5to complejo (morado): *V. parvula*, *Actinomyces odontolyticus*.

6to Complejo (azul): *A. actinomycetemcomitans* serotipo b, *Selenomonas noxia* y *A. naeslundii* (*A. viscosus*) tienen poca relación con los 5 complejos principales.

Fuera de estos grupos las especies de *Actinomyces* del complejo amarillo, verde y morado son colonizadores tempranos de la superficie dental, cuyo crecimiento usualmente precede a la multiplicación de los predominantes complejos Gram negativos, rojo y naranja.¹⁵

Los complejos rojo y naranja se componen de la especie que se cree es el mayor agente etiológico en la enfermedad periodontal.¹⁵

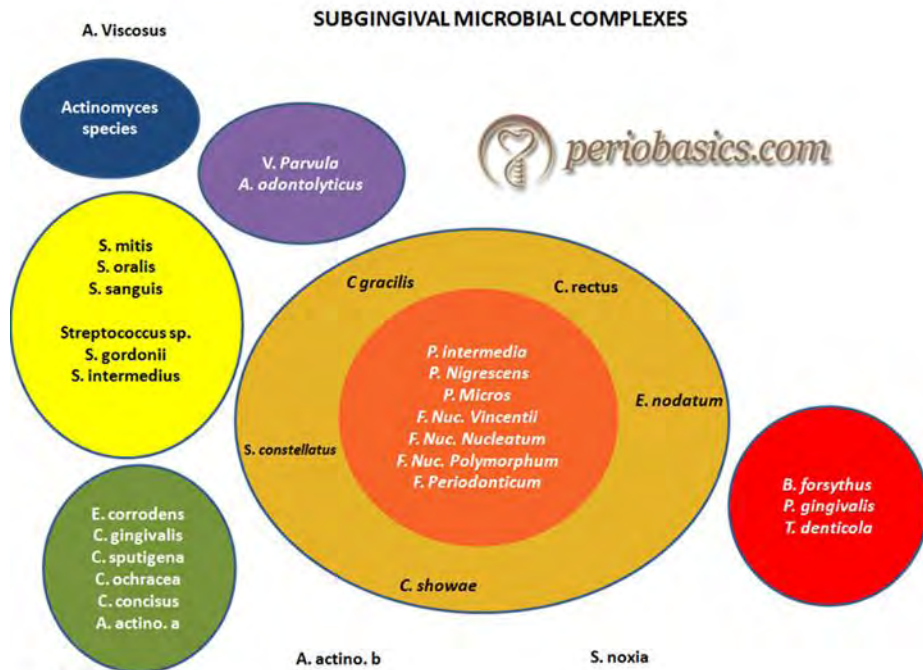


Fig. 4. Complejos microbianos subgingivales. Amarillo: especies de *Streptococcus* orales, con capacidad para coagregar entre especies del mismo género. Púrpura: *Actinomyces odontolyticus* y *Veillonella parvula* (único gram-negativo y anaerobio entre los colonizadores primarios). Azul: todas las especies de *Actinomyces* excepto *A. viscosus*. Verde: bacilos gram-negativos anaerobios facultativos. Naranja: complejo puente. Primeros colonizadores secundarios. Todos anaerobios y mayormente gram-negativos (excepto *Streptococcus constellatus*, *Peptostreptococcus micros* y *Eubacterium nodatum*, que son gram-positivos). Inicia la etapa de remodelación de la placa supragingival. Rojo: anaerobios más fuertemente asociados con periodontitis. Periobasics.com

1.5 Asociación bacteriana con la salud y con la enfermedad.

La etiología bacteriana de las enfermedades periodontales ha sido recientemente revisada en detalle.⁷

El centro de este trabajo ha sido definir la amplitud de la diversidad en la bolsa periodontal y otras zonas en la cavidad bucal, principalmente sobre la

base de los análisis de secuencia del ARNr 16S. Estos estudios, incluso los proyectos de secuenciación a gran escala, están comenzando a mostrar las asociaciones de especies específicas con la salud y con la enfermedad.⁷

Paster et al. identificaron varios agentes patógenos putativos, además de las especies más clásicas, como *P. gingivalis*, *T. denticola* y *T. forsythia*, que están consideradas como las bacterias más relacionadas con la periodontitis. En estudios posteriores, basados en la reacción en cadena de la polimerasa, Kumar et al. demostraron que muchas de estas especies, incluidas aquellas que todavía no han podido cultivarse in vitro, estaban específicamente asociadas con la salud o con la enfermedad.^{5,6,7,16,17}

No obstante, para establecer de un modo más definitivo las asociaciones bacterianas con los estados de salud y de enfermedad bucal, deben determinarse los perfiles de grandes cantidades de muestras clínicas. Entre las técnicas adecuadas para los estudios clínicos a gran escala se incluyen los ensayos de hibridación en damero o los análisis de micromatrices de DNA. Las sondas de DNA basadas en el ARNr 16S han sido diseñadas y validadas para más de 200 especies cultivables y no cultivables, utilizando la hibridación en damero de captación inversa. Para examinar simultáneamente la diversidad bucal esencialmente completa en una sola hibridación, hemos cambiado recientemente de la hibridación en damero sobre membranas de nylon a la hibridación en micromatrices sobre portaobjetos de cristal, denominada micromatriz de identificación de microbios bucales humanos (HOMIM, Human oral Microbe Identification Microarray). Brevemente, las sondas oligonucleótidos basadas en el ARNr 16S se sujetan de forma covalente a un portaobjetos recubierto de aldehído a través de enlaces amida. Los genes de ARNr 16S son multiplicados por reacción en cadena de la polimerasa del DNA aislado de los cultivos bacterianos o muestras clínicas. Los productos multiplicados se marcan con un colorante fluorescente durante la reacción en cadena de la polimerasa. Cuando el DNA bacteriano marcado

hibrida a una mancha específica de una especie sobre el portaobjetos, esto proporciona una señal fluorescente que puede ser leída con un escáner láser. En la actualidad, el método HOMIM permite la identificación de 200 especies predominantes cultivables y no cultivables.^{18,19,20,21}

2. Periodontograma para el diagnóstico periodontal.

2.1 Índice periodontal de Russel forma OMS revisado (IP- R).

En el IP-R solo se registra el valor asignado al diente más gravemente afectado de cada individuo examinado.²²

La clasificación del estado periodontal se realiza siguiendo los criterios de Russell.

Con este índice se puede determinar rápidamente tanto la prevalencia como la gravedad de las periodontopatías de una población.

La calificación de 8 se asigna cuando se observa algún diente que posee movilidad, migración patológica y pérdida de la función.

El valor 6 se aplica cuando la mayor gravedad está dada por la presencia de alguna bolsa periodontal.

Se registra la calificación 2 cuando el signo más grave que se encuentre es la inflamación gingival y rodea completamente algún diente, sin embargo, cuando esa inflamación no rodea completamente al diente, la calificación es 1.

Si no existen signos de inflamación periodontal marcamos 0 para ese individuo.

2.2 Índice de Necesidad de Tratamiento Periodontal Comunitario, INTCP.

Conocido por sus siglas en inglés (COMMUNITY PERIODONTAL INDEX OF TREATMENT NEEDS: CPITN), y también como Índice Periodontal de la Comunidad (IPC) como aparece en el Manual de Encuestas de la OMS.²²

Fue desarrollado por un grupo de trabajo a petición de la FDI/OMS, en 1979, como método de encuesta para investigar condiciones periodontales. Finalmente fue analizado y descrito en 1982 por Ainamo y colaboradores. Para su realización se diseñó la Sonda de la OMS, la cual tiene como características de poco peso, con una punta esférica de 0.5 mm, con una banda negra de 2 mm, ubicada entre los 3.5-5.5 mm, y anillos a 8.5 y 11.5 mm de la punta esférica.²²

Sus ventajas son simplicidad, rapidez en el examen y uniformidad internacional. Registra las condiciones periodontales más comunes y tratables: sangrado e inflamación gingival, bolsa periodontal y cálculos. Permite conocer las necesidades de tratamiento en las poblaciones.²²

Divide la boca en seis sextantes definidos por los dientes:

17-14	13-23	24-27
37-34	33-43	44-47

Un sextante sólo se debe examinar si hay dos o más dientes presentes que no están indicados para extracción.

Los dientes que se consideran para la obtención del Índice son:

En los adultos de 20 años o más:

17 16 11 26 27

47 46 31 36 37

Los molares se examinan en pares, y solo se registra una calificación (la más altas) solo se registra una calificación para cada sextante.

Los dos molares en cada sextante posterior se aparean para la anotación y, de faltar uno, no se realiza una sustitución. Sí no existe en el sextante los dientes índices que ameriten el examen, se examinan el resto de los dientes presentes en ese sextante y se anota la puntuación más alta como la correspondiente al sextante.

En el caso de las personas menores de 20 años, sólo se examinan seis dientes índices:

16 11 26

46 31 36

Esta modificación se realiza a fin de evitar la puntuación de alteraciones asociadas al proceso de exfoliación y erupción dentaria. Los segundos molares tienen alta frecuencias de falsas bolsas (no inflamatorias, asociadas a falsas bolsas).

Por este mismo motivo, cuando se examinan niños menores de 15 años no se deben anotar las bolsas, o sea, sólo se recoge lo referente a sangramiento y cálculos.

Los criterios que se tienen en cuenta son:

PUNTAJE CRITERIOS

Código 0. Tejido sano	Si no hallan necesidades de tratamiento (bolsas, cálculos, sangrado).
Código 1. Sangrado observado durante o después del sondaje.	Nota: Si no se observan bolsas patológicas o cálculos pero aparece sangrado después del sondaje suave, se registra el código 1 para el sextante.
Código 2. Cálculos u otros factores retentivos de la placa tales como coronas mal adaptadas o bordes deficientes de obturaciones.	Nota. Si no hay profundidad de bolsas que lleguen o pasen al área coloreada de la sonda INTPC pero es detectado cálculo supra o subgingival u otros factores retentivos de placa, se asigna el código 2.
Código 3. Bolsas patológicas de 4 ó 5, o sea cuando el margen gingival se encuentra en el área negra de la sonda.	Nota: si la bolsa más profunda encontrada en el diente o dientes designados en un sextante es de 4 ó 5 mm se registra el código 3, no hay necesidad para examinar cálculos o sangrado gingival.
Código 4. Bolsa patológica de 6 mm o más, no está visible el área negra de la sonda INTPC.	Código X. Cuando solamente hay un diente presente o ninguno en un sextante (se excluyen los 3ros molares al menos que estos funcionen en lugar de los segundos molares).

A partir de los valores obtenidos se sacan los porcentajes y los promedios de sanos y afectados en la población para cada una de las condiciones o criterios. Algunos investigadores no recomiendan la obtención de promedios pues refieren que se pierde información necesaria para la planificación de tratamientos, lo cual es uno de los objetivos de su aplicación.

Aclaración:

Bolsas Falsas

En los pacientes menores de 20 años de edad, se omiten los 2dos molares como dientes índices para disminuir el riesgo de registrar bolsas falsas, o sea de origen no-inflamatorio, pueden medir 6 ó más mm y registrarse erróneamente como una indicación de necesidad de tratamiento como código 4.

También en los niños menores de 15 años, dada la presencia de dientes recién brotados, el examen de los 6 dientes índices deberá incluir solamente las calificaciones para el sangramiento y el cálculo. Pueden presentarse también falsas bolsas en la zona retromolar de los sujetos adultos.²²

Dientes excluidos:

Se excluyen de las calificaciones del INTPC los dientes índices (o sustitutos), cuando exista la decisión de extraerlos por cualquier causa.

Sustitución de dientes índices perdidos o excluidos.

Reglas que debe aplicar:

1. Recuerde que deben estar presentes dos o más dientes en funciones en un sextante para que este pueda ser calificado.
2. Si en un sextante posterior, uno de los dos dientes índices no se encuentra presente o tiene que ser excluido, el registro se basará en el examen del diente índice remanente.

3. Si ambos dientes índices de un sextante posterior están ausentes o excluidos del examen, será necesario examinar todos los dientes remanentes en el sextante y asignarle la calificación más alta encontrada.
4. En los sextantes anteriores, si el diente 11 es excluido, sustitúyase por el 21, si el 21 está excluido será necesario determinar la calificación peor en los dientes remanentes. De manera similar, sustitúyase por el diente 41 si falta el 31.
5. En los sujetos menores de 20 años, si falta el 1er molar o tiene que ser excluido, se examinará el premolar adyacente más cercano.
6. Si faltan todos los dientes de un sextante o solo queda un diente en función, se registrará el sextante como perdido.
7. Un solo diente en un sextante se considerará como diente perteneciente al sextante adyacente y sujeto a las reglas para ese sextante. Si el diente que se encuentra solo es un diente índice se registrará la peor calificación de dientes índices.

Los criterios que se tienen en cuenta para el establecimiento de los tratamientos a partir de las necesidades determinadas son:

NTO:	Un registro del código 0 (sano) o X (perdido) para todos los seis sextantes indica que no hay necesidad de tratamiento.
NT1:	Un código de 1 ó mayor indica la necesidad de mejorar la higiene bucal personal de ese individuo.
NT2:	a) Un código de 2 indica la necesidad de una profilaxis de los dientes y remoción

	<p>de factores retentivos de la placa. Además el paciente necesita instrucción de la higiene bucal.</p> <p>b) Bolsas leves o moderadas (4 ó 5 código 3). La higiene bucal y el detartraje reducirán la inflamación y la profundidad de las bolsas, haciéndose el alisamiento radicular.</p>
NT3:	<p>Un sextante calificado de 4 (bolsas de 6 ó más mm) puede ser no tratado exitosamente por medio del detartraje profundo y medidas eficientes de higiene bucal, por lo que se asigna el código 4 como "tratamiento complejo" el cual puede resolver el detartraje profundo, el aislamiento radicular y tratamiento quirúrgico más complejo.</p>

Para realizar el INTPC se recomienda una muestra mínima de 25 a 30 personas como unidad de muestreo básica en cualquier sitio de examen y para cada grupo de edades.²²

3. Métodos fenotípicos para el diagnóstico microbiológico.

Es bien conocido que las bacterias son esenciales para el desarrollo de la periodontitis, aunque sólo un pequeño número de estas, estará relacionada

con la etiología y progresión de la infección periodontal. El problema radica en que en el caso de la enfermedad periodontal no está demostrado una relación directa causa – efecto entre bacterias específicas y enfermedad periodontal; es decir, las bacterias son importantes, pero insuficientes para el desarrollo de la enfermedad periodontal, ya que en este proceso influyen otros factores que son los llamados factores modificadores de la enfermedad, los cuales podemos agruparlos en genéticos, ambientales y sistémicos y que pueden afectar tanto a la edad de comienzo de la enfermedad como al patrón de destrucción, tasa de progresión, respuesta al tratamiento, frecuencia y gravedad de la recurrencia. Así pues, el hecho de utilizar métodos de diagnóstico microbiológicos no indica que al analizar bacterias periodontales estemos necesariamente analizando enfermedad periodontal, ya que existen bacterias periodontales presentes en bolsas sin que por ello exista una pérdida de inserción o pérdida ósea. De todas formas, sí existe evidencia suficiente, demostrando que la presencia de ciertas bacterias periodontales aumenta el riesgo de una posible pérdida de inserción. Bacterias como *P. gingivalis* o *T. forsythia* aumentan el riesgo relativo de pérdida de inserción en un valor de 1,59 y 2,45, respectivamente.^{23,24,25}

Así pues, aun teniendo en cuenta la importancia que posee en la etiología de la enfermedad los factores genéticos, inmunológicos y ambientales, las bacterias son necesarias para que el proceso de inflamación se inicie y se perpetúe, por lo que su identificación se hace necesaria para definir la etiología e instaurar el tratamiento adecuado.²⁵

3.1 Cultivo de bacterias orales.

Los diversos habitantes bacterianos de la cavidad oral tienen un amplio espectro de necesidades físicas y químicas, no todas las bacterias son cultivables (fig. 5). Para cultivar con éxito bacterias en el laboratorio, las

condiciones de cultivo deben ajustarse para satisfacer estos variados requerimientos.

El esquema general para el cultivo de bacterias orales (fig. 6) es coleccionar una muestra y colocarla de inmediato en un medio para transporte. Después se le lleva al laboratorio para su procesamiento. Las bacterias tienden a agruparse entre sí, de modo que suele dispersarse por agitación o vórtex (agitador mecánico) antes de sembrarlas en cajas de Petri. Hay muchas más bacterias en una muestra oral de las que pueden cultivarse en una sola placa, de modo que suelen realizarse diluciones en serie antes de sembrar a fin de obtener colonias bien delimitadas en lugar de una masa sólida de bacterias. El hábitat natural de las especies orales es de alrededor de 37° C, por lo que las bacterias orales suelen cultivarse en incubadoras. Una vez que se obtienen colonias de bacterias a partir de una muestra clínica, pueden aislarse para reproducirlas en cultivos puros tomando una colonia y subcultivándola.²⁶

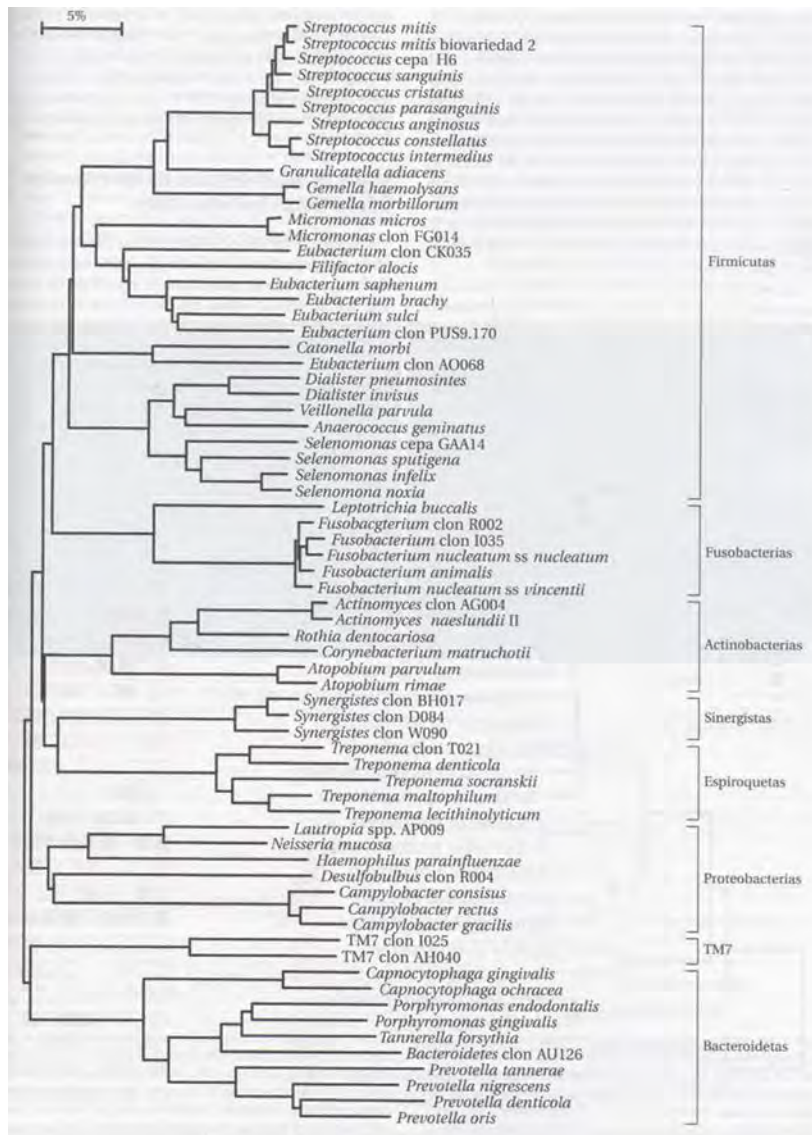


Fig. 5. Árbol filogenético de las especies predominantes cultivables y todavía no cultivables de la bolsa periodontal. La barra marcada representa un 5% de diferencia en secuencias nucleótidas.

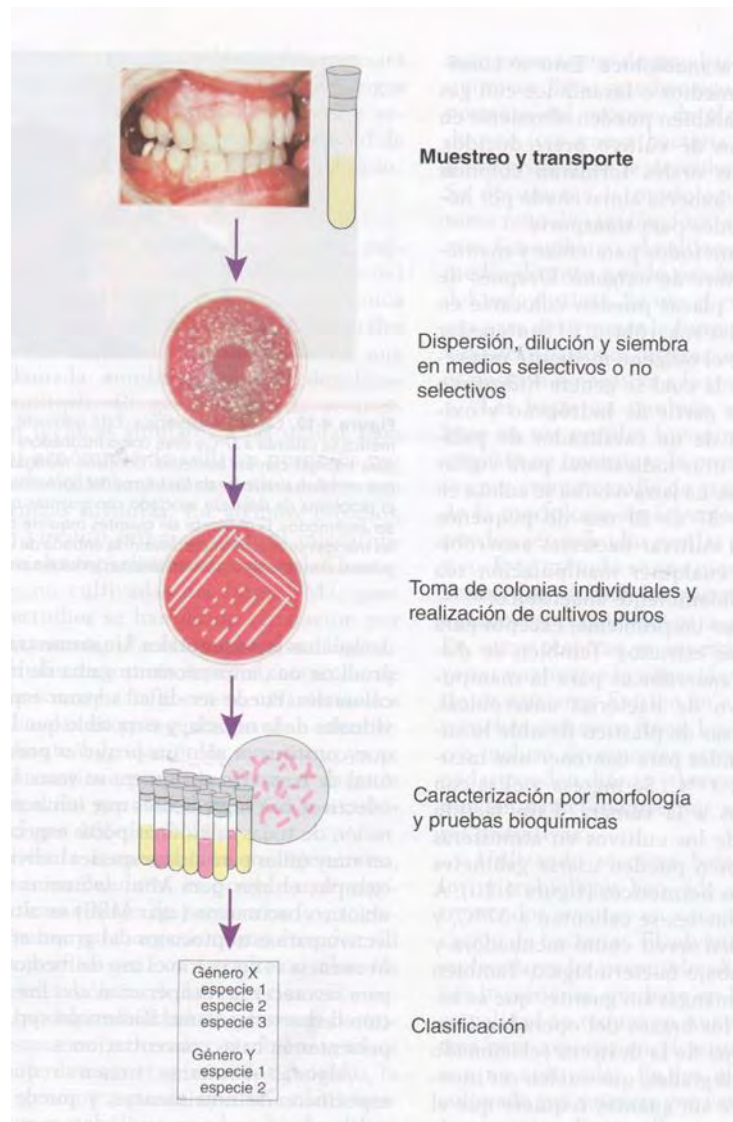


Fig. 6. Proceso para identificación y clasificación de bacterias por cultivo. Las muestras se colectan y colocan de inmediato en un medio para transporte. Las bacterias se dispersan por agitación o sindicación antes de sembrarlas en cajas de Petri. En una muestra oral hay muchas más bacterias de las que pueden cultivarse en una placa, de modo que por lo general se realizan diluciones en serie antes de sembrar, a fin de obtener colonias bien definidas en lugar de una masa sólida de bacterias. Los microorganismos pueden aislarse para obtener cultivos puros tomando una colonia y subcultivándola. Las bacterias se caracterizan y clasifican mediante pruebas bioquímicas y de otros tipos. Richard JL, George NH, Howard FJ. Microbiología e inmunología oral. Ed Manual Moderno ASM Press, American Society, México 2015: 1: 89.

3.1.1 Medios de cultivo.

El cultivo en medios no selectivos de amplio espectro como el agar sangre permite el desarrollo de muchas especies orales. Una muestra oral suele producir una impresionante gama de morfologías coloniales. Puede ser difícil separar especies individuales de la mezcla, y es posible que las especies que constituyen sólo un pequeño porcentaje del total de bacterias ni siquiera se vean. Los medios selectivos con ingredientes que inhiben la proliferación de todas salvo unas pocas especies pueden ser muy útiles para aislar especies individuales. Por ejemplo, el agar para *Mitis salivarius* más el antibiótico bacitracina (agar MSB) es altamente selectivo para *estreptococos* del grupo *mutans*. Con frecuencia es necesario el uso de medios selectivos para favorecer la recuperación con fines de detección de bacterias, como *Bacteroides*, que están presentes en bajas concentraciones.²⁷

Algunas bacterias tienen requerimientos específicos de nutrientes y puede ser difícil cultivarlas a menos que esos requerimientos se determinen y los medios de cultivo se complementen con ellos. *T. forsythia*, un microorganismo fuertemente relacionado con periodontitis, tiene el requerimiento metabólico de ácido N-acetilmurámico, un componente de la pared celular que la mayoría del resto de las bacterias sintetizan. No fue sino hasta que se reconoció este requerimiento cuando fue posible aislar *T. forsythia* en cultivo. Los requerimientos nutricionales específicos de muchas especies han eludido hasta ahora a los microbiólogos orales; con base en datos de clonación y secuenciación del gen 16S, menos de la mitad de las bacterias orales conocidas se han cultivado.²⁶

3.2 Microscopía de inmunofluorescencia.

Se trata de una prueba consistente en tomar una muestra de placa subgingival e incubarla con anticuerpos monoclonales, suero anti IgG y

fluoresceína para la formación de complejos antígeno-anticuerpo, los cuales se detectan como positivos o negativos para las bacterias estudiadas mediante microscopia y un fluorómetro, cuantificando las especies individuales, consiguiendo niveles de detección bacteriana de 10^4 .^{30,31}

Mediante estas técnicas se ha estudiado la asociación entre bacterias como *P.gingivalis* y *Bacillus forsythus* y su relación con la profundidad de bolsa. Uno de los mayores problemas de esta técnica son las reacciones cruzadas entre bacterias específicas con bacterias no cultivables de las bolsas periodontales o con bacterias no orales.³²

Inmunofluorescencia directa (IFD). Usa un anticuerpo marcado con isotiocianato de fluoresceína, que permite la identificación de antígenos bacterianos o virales en las muestras clínicas. Se usa en la detección de virus respiratorios (influenza, parainfluenza, adenovirus, virus sincicial respiratorio), virus herpes, sarampión y parotiditis, así como en bacterias como *Bordetella pertussis*, *Rickettsia rickettsia* y *Chlamydia trachomatis*. Es una técnica muy sensible, que requiere de sueros de muy buena calidad y de personal adiestrado.³³

Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Usa el suero del paciente para investigar anticuerpos. Este suero es incubado en presencia de un antígeno específico. Para la visualización del completo resultante, se utiliza un anticuerpo antiglobulina humana, marcado con isotiocianato de fluoresceína.³³

4. Métodos inmunológicos para el diagnóstico microbiológico.

4.1 Inmunoensayo con fluorescencia de concentración de partículas.

4.1.1 Con gránulos de poliestireno.

Utiliza gránulos de poliestireno como sustrato, recubiertos por anticuerpos específicos y que reaccionan con la muestra de placa

seleccionada. Mediante un fluorómetro se detecta una señal fluorescente que detecta el número relativo de bacterias presentes en la muestra.³²

4.1.2 Con células bacterianas.

Una modificación del método anterior consiste en usar células bacterianas. Los gránulos de poliestireno son sustituidos por células bacterianas unidas a los diferentes anticuerpos monoclonales específicos frente a los lipopolisacáridos de las especies periodontales en estudio. Esta técnica presenta una sensibilidad del 97 –100% y una especificidad del 57 – 92% dependiendo de la especie en estudio y un límite de detección de 104 en cultivos mixtos.³⁴

4.2 Inmunoensayo de membranas.

Es un método disponible de forma comercial, Evalusite®, cuyo objetivo es la detección en clínica de tres patógenos periodontales:

A. actinomycetemcomitans, *P. gingivalis*, *P. intermedia*. La muestra del paciente se enfrenta contra los anticuerpos específicos de estas 3 especies. Los complejos antígeno - anticuerpos formados sobre la membrana de un pocillo se detectan por adición de un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente, junto con un sustrato enzimático coloreado. Los punteados separados nos indican la presencia de las tres especies diferentes, mientras que la intensidad del color indica el número relativo de bacterias.³⁵

El test nos indica resultados positivos o negativos y se puede realizar en 10 minutos. El límite de detección para las tres especies varía entre 104 y 105 células bacterianas.³⁶

4.3 Marcadores de sangre periférica para patógenos periodontales.

Son técnicas que intentan detectar la respuesta que producen las bacterias en el organismo. Tienen un valor tanto para implicar a ciertas especies de patógenos como para determinar clínicamente su estatus infeccioso. Mediante estas técnicas se detectan anticuerpos en suero frente a *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, revelando fluctuaciones en los niveles de anticuerpos en respuesta al tratamiento periodontal. Hoy en día parecen ser más fiables otras técnicas microbiológicas pero no se descarta la posibilidad de poder identificar mediante pruebas serológicas a individuos con susceptibilidad a padecer algún tipo de enfermedad periodontal.^{36,37}

5. Métodos genéticos para el diagnóstico microbiológico.

5.1 Recuperación de DNA bacteriano de muestras clínicas.

Para extraer el DNA de la célula bacteriana de moda que pueda analizarse, la pared celular bacteriana debe lisarse sin dañar el DNA. Hay varios métodos para lisar las bacterias, los cuales pueden causar diferencias relativas en rendimiento de diferentes microorganismos. Los métodos que permiten una alta recuperación de un grupo de bacterias pueden no tener rendimientos similares de DNA de otros grupos. Existen varios estuches comerciales o kits para aislar DNA bacteriano, que usan una variedad de métodos a fin de lisar las células, aunque esos estuches a menudo están dirigidos a bacterias Gramnegativas. Una técnica común consiste en usar detergente y proteinasa k para lisar paredes celulares bacterianas. Esta manera de abordaje del material genético por lo general lisa un amplio espectro de bacterias, pero algunos datos sugieren que algunas bacterias Gram positivas, como los *estreptococos*, son resistentes a este método. Debido a ello, se usa principalmente para muestras subgingivales.²⁶

En los últimos años se ha hecho más popular el empleo del golpeteo con perlas de cristal. Las bacterias se mezclan con una suspensión de diminutas cuentas de vidrio. Las perlas se proyectan a través de las bacterias por vibración en un aparato muy parecido a un triturador de amalgama. El tiempo de la vibración y la composición de las perlas pueden variarse para hacer el proceso más o menos intenso. De este modo se lisan incluso las bacterias más resistentes. Sin embargo, debe tenerse cuidado de recuperar las especies bacterianas más frágiles, como las *espiroquetas*.²⁷

Por lo general, se evita centrifugar las bacterias, porque el DNA de las bacterias lisadas se perderá. El golpeteo con cuentas se ha convertido en el método de elección para aislar DNA de muestras supragingivales que es probable que contengan altas concentraciones de *estreptococos*. Es de esperar que sigan desarrollándose nuevos métodos en un esfuerzo por obtener un perfil de DNA más representativo de las complejas muestras bacterianas orales.²⁷

La preparación de DNA bacteriano para análisis molecular después de lisis puede realizarse de varias maneras. El método más simple consiste en usar el lisado directamente en la PCR o en algún análisis alternativo. Sin embargo, el uso de preparados crudos puede ser problemático por lo que el DNA suele purificarse⁽¹³⁾.

Se dispone de estuches comerciales para el aislamiento de DNA de pequeños volúmenes de muestra, y se usan ampliamente. Muchos de ellos se basan en la adhesión de DNA a sílice (vidrio pulverizado) y la eliminación de impurezas por lavado.²⁸

5.2 Detección por PCR.

Cada método basado en DNA que no requiere cultivo utiliza la PCR en algún punto durante el procedimiento. La amplificación del DNA por PCR ha permitido la detección de bacterias presentes en muy bajas concentraciones,

en teoría tan bajas como una sola célula bacteriana. La PCR también he hecho posible realizar análisis detallados extensos con muestras muy pequeñas.²⁶

Uno de los métodos más simples para identificar bacterias consiste en usar cebadores específicos de una especie en una PCR. Esto permite la amplificación específica del DNA de una especie objetivo incluso en presencia de cientos de especies diferentes. Puede emplearse para detectar especies cultivables y aun no cultivadas.²⁶

5.2.1 Cebador.

Con la disponibilidad de datos de secuencias de DNA para los genes 16S de miles de bacterias, es posible diseñar cebadores específicos de especie sin ningún trabajo de laboratorio y realizar una prueba virtual de su especificidad. Primero, se descargan secuencias de especies estrechamente emparentadas desde cualquiera de varias bases de datos disponibles y se alinean, tras lo cual se identifican regiones que sean exclusivas de la especie de interés. La secuencia candidata para la construcción del cebador puede verificarse entonces contra la base completa de GenBank para confirmar su unicidad. La probabilidad de que haya bacterias aún no descubiertas que contengan la supuesta secuencia única es cada día más pequeña, debido a la disponibilidad de más secuencias del gen 16S de más especies. Sin embargo, aún es teóricamente posible que especies desconocidas puedan experimentar hibridación cruzada con los cebadores elegidos.²⁶

5.2.2 Ensayo de PCR.

La presencia o ausencia de un producto de la PCR específico de especie en una muestra suele determinarse mediante electroforesis en gel de agarosa (fig.7). También es posible la detección muy rápida para ensayos clínicos con sistemas de PCR cuantitativos monitoreados en tiempo real que

detectan cuando durante la reacción aparece un producto de amplificación. La PCR en tiempo real se describe con más detalle en la siguiente sección. También es común realizar ensayos de PCR basados en genes distintos del 16S que son exclusivos de una bacteria individual. Un ejemplo es el gen de la leucotoxina de *A. actinomycetemcomitans*, una bacteria relacionada con formas localizadas de periodontitis agresiva.²⁷

La PCR es un método en extremo sensible y eficiente para identificar bacterias orales. Una vez que se identifican y prueban cebadores únicos, pueden analizarse grandes cantidades de muestras. Este es el método más rápido, simple y sensible para detectar la presencia de bacterias. Sin embargo, este método no proporciona información cuantitativa. La PCR cuantitativa en tiempo real, una adaptación de la PCR en la que se usa tecnología de monitoreo especializada, permite la vigilancia de las concentraciones bacterianas. Esta técnica solo puede monitorear una especie a la vez (a excepción del PCR Multiplex). Estos métodos dirigidos están siendo sustituidos con rapidez por métodos abiertos capaces de identificar cualquier especie presente en la muestra.²⁸

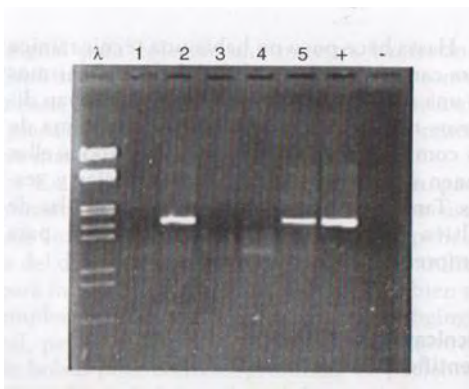


Fig. 7. Cromatografía en gel de agarosa que muestran los resultados de PCR con cebadores 16S ribosómicos específicos para *Porphyromonas gingivalis* en cinco muestras clínicas y testigos positivos y negativos. En el carril λ se muestran marcadores de tamaño. Se detectó *P. gingivalis* en las muestras 2 y 5. Richard JL, George NH, Howard FJ. Microbiología e inmunología oral. Ed Manual Moderno ASM Press, American Society, México 2015: 1: 80.

5.3 QPCR, PCR cuantitativa.

La PCR puede usarse para determinar si una muestra oral contiene una especie bacteriana, pero normalmente no da información cuantitativa. Esto se debe a que la cantidad final de producto en una PCR no depende de manera directa de la cantidad de DNA objetivo en la muestra original. Sin embargo, con la adición de un colorante indicador fluorescente, es posible vigilar el avance de la reacción en tiempo real y obtener información cuantitativa. Un método de PCR cuantitativa de uso común es el sistema TaqMan (fig8). Para el ensayo TaqMan, además de los dos cebadores necesarios para la PCR se agrega una sonda de oligonucleótido.²⁶

Esta sonda se une a la plantilla interna en los dos cebadores. La sonda tiene dos colorantes fluorescentes unidos, un indicador en el extremo 5' y un atenuador en el extremo 3'. Cuando la sonda está intacta, debido a la proximidad de los dos colorantes, la fluorescencia debida al indicador está atenuada. El sistema TaqMan se basa en la actividad de 5' a 3' exonucleasa de la DNA polimerasa Taq, la enzima usada en la PCR. Durante la fase de extensión de la PCR, la sonda que está hibridada corriente abajo del cebador se escinde en nucleótidos, liberando el colorante indicador del atenuador. La señal fluorescente resultante, que es proporcional a la cantidad de síntesis de DNA, se mide con un fluorómetro conectado al termociclador de la PCR. Las muestras con cantidades desconocidas de bacterias pueden compararse con una curva estándar para determinar la cantidad de secuencia que se tiene como la secuencia blanco (target) presente en la muestra original (fig. 9). Los termocicladores de PCR en tiempo real pueden medir la fluorescencia en 96 muestras de manera simultánea.²⁷

Una alternativa al método TaqMan de PCR cuantitativa es usar un colorante que sólo emite fluorescencia cuando está unido a DNA bicatenario, como el verde SYBR (SYBER GREEN). Es posible medir la cantidad de síntesis de nuevo DNA agregando este colorante se coloca con la mezcla de

la PCR y vigilando la aparición de la señal fluorescente durante la PCR. Se generan curvas estándares a partir de cantidades conocidas del DNA blanco (target). Si bien el método del verde SYBR es más fácil de aplicar y menos costoso que el método TaqMan, es más propenso a señales espurias (ruido o "artefacto") como resultado de la amplificación de DNA extraño. Por lo tanto el método TaqMan se usa más a menudo para mezclas complejas de secuencias de DNA similares, como las muestras orales.²⁸

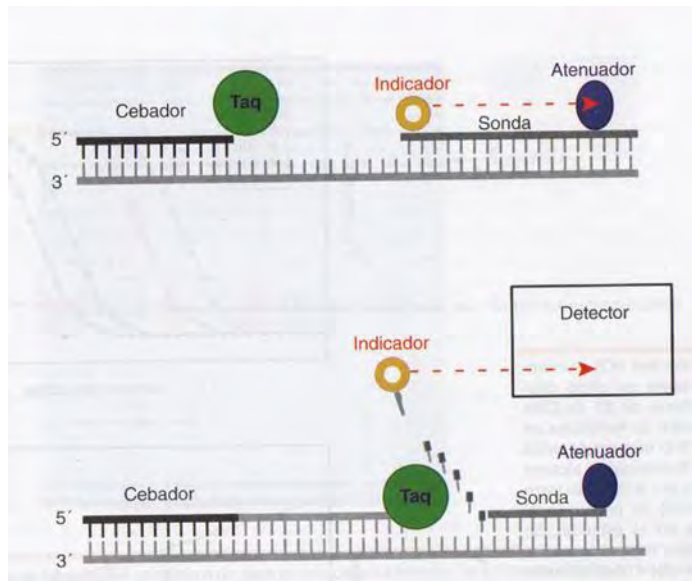


Fig. 8. Método TaqMan para la PCR en tiempo real. Richard JL, George NH, Howard FJ. Microbiología e inmunología oral. Ed Manual Moderno ASM Press, American Society, México 2015: 1: 80.

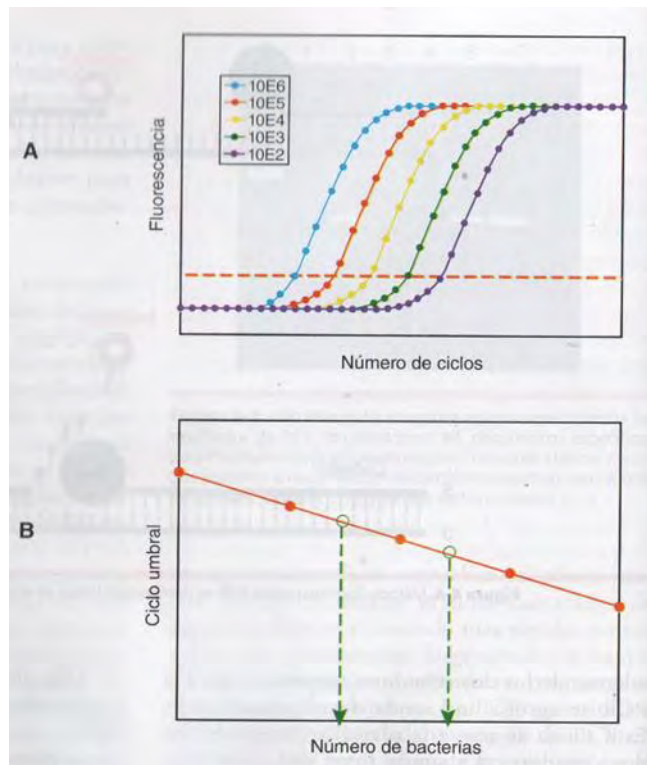


Fig. 9. (A) Medición por PCR en tiempo real de la fluorescencia en cinco diluciones seriadas (en factores de 10) de DNA bacteriano. La fluorescencia se monitorea en cada ciclo durante la PCR. El número de ciclos requeridos para que la fluorescencia alcance el nivel de umbral indicado por la línea de trazo discontinuo (ciclo umbral) es proporcional a la cantidad de DNA en el estándar. Se detecta fluorescencia más temprano en las muestras con más DNA. (B) Curva estándar obtenida al graficar el número de bacterias en los estándares diluidos serialmente contra el ciclo umbral determinado en la parte A. Esta curva estándar se usa para determinar la concentración de DNA en las muestras. El ciclo umbral para las muestras (círculos verdes) se ajusta a la línea y se usa para calcular el número de bacterias en la muestra (flechas verdes).

5.4 Ensayos de hibridación de DNA.

Debido a la complejidad de la comunidad microbiana oral, para estudiar la etiología bacteriana de las infecciones orales es necesario identificar muchas especies de bacterias de una sola muestra. El análisis en tablero de ajedrez es un ensayo de hibridación de DNA que se desarrolló para identificar muchas especies bacterianas de una muestra al mismo tiempo.²⁶

5.4.1 Análisis en tablero de ajedrez de todo el genoma.

Para este análisis se usan sondas de hibridación específicas de especie de todo el genoma. El DNA de muestras bacterianas se une a membranas de nylon en largas tiras. Sondas específicas de especie construidas a partir de DNA de todo el genoma se etiquetan e hibridan en largas tiras a ángulos rectos con las muestras, lo cual crea un patrón de tablero de ajedrez. Con este método es posible analizar 30 a 40 muestras para investigar la presencia de 30 a 40 especies al mismo tiempo. Con testigos que contengan cantidades conocidas de DNA, esta técnica puede hacerse semicuantitativa.²⁸

Con este tipo de análisis en tablero de ajedrez sólo pueden analizarse especies cultivadas, dado que deben construirse sondas de DNA de todo el genoma. Esta técnica también puede estar sujeta a reactividad cruzada con especies estrechamente emparentadas con la especie blanco, debido a la presencia de la sonda de secuencias que no son específicas de especie, a pesar del cuidado ejercido al hacer sondas originales para minimizarla reactividad cruzada. Con la técnica en tablero de ajedrez es posible generar grandes cantidades de datos en un tiempo relativamente corto, lo cual permite comparar múltiples especies en estudios que implican tamaños muestras muy grandes.^{27,28}

5.4.2 Análisis en tabla de ajedrez.

En esta modificación de la técnica en tablero de ajedrez original, como sondas de hibridación se emplean oligonucleótidos homólogos a genes 16s ribosómicos en lugar de las sondas de todo el genoma (fig. 10). Debido a que es la sonda y no la muestra, lo primero que se une a la membrana, este método a veces se llama tablero de ajedrez de captura inversa. La PCR con cebadores 16S universales etiquetados se usa para amplificar y marcar muestras antes de hibridación. Este método tiene el potencial de ser más específico que el

método en tablero de ajedrez original. Sin embargo, puede ser difícil de encontrar condiciones de hibridación que funcionen bien para las muchas sondas distintas usadas en el ensayo.²⁶

La técnica de captura inversa ofrece la ventaja de que pueden hacerse sondas para especies que nunca se han cultivado siempre que se haya determinado la secuencia del gen 16S.²⁷

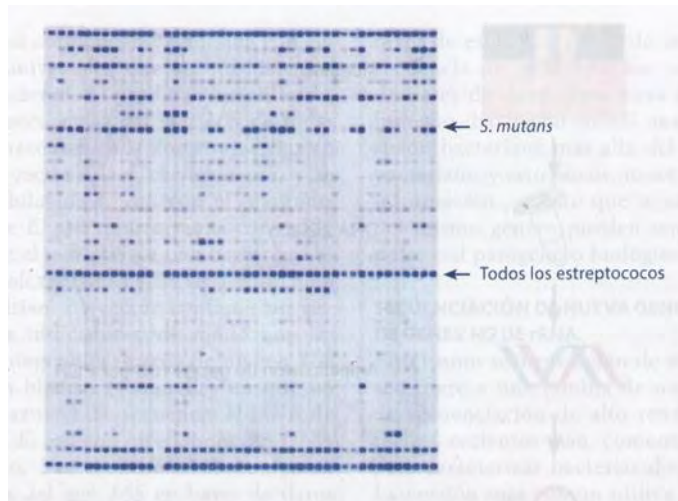


Fig.10. Mancha de hibridación en tablero de ajedrez con captura inversa. Se aplicaron sondas en las filas (horizontales), y luego las muestras y estándares se hibridaron en las columnas (verticales). Cada punto de la mancha representa la hibridación de una sonda con una muestra. La intensidad del punto es proporcional a la cantidad de DNA en la muestra. Las columnas señaladas con flechas indican una sonda de *S. mutans* que dio resultados positivos para la mayoría de las muestras, y una sonda estreptocócica de múltiples especies que dio un resultado positivo para todas las muestras probadas. Becker MR, J Clin Microbiol. 2002, 40: 1001-1009

5.4.3 Hibridación en microarreglos.

Las micromatrices son esencialmente una miniaturización del método en tablero de ajedrez, lo que permitiría a los investigadores sondear cantidades extremadamente grandes de especies al mismo tiempo. Los microarreglos tienen el potencial de identificar cantidades casi ilimitadas de

especies en muestras orales complejas. El objetivo último es establecer matrices que contengan sondas de cada especie presente en la cavidad oral. Los microarreglos basadas en secuencias del gen 16S son limitados por la cantidad y diversidad de secuencias en genes 16S lo cual sucede con los mismos métodos de hibridación anteriores.²⁶

5.5 Clonación del gen 16S ribosómico y análisis de secuencias.

El método de clonación del gen 16S y análisis de secuencias (fig. 11) es una técnica molecular abierta que permite identificar cualquier bacteria presente en una muestra, sin importar si puede cultivarse o se descubrió antes. Este método se basa en la amplificación con PCR de DNA de una comunidad con cebadores 16S universales que se hibridan con todas las bacterias. El producto amplificado que contiene secuencias del gen 16S de todas las bacterias presentes en la muestra, se liga a un plásmido (vector) de *Escherichia coli*, y se transfectan células de *E. coli* con el plásmido. Cada célula de *E. coli* transformada con éxito, ahora contiene el gen 16S de una bacteria. Las células de *E. coli* transformadas se siembran en medios de cultivo. El vector contiene un sistema de genes indicadores, de modo que las colonias con integración exitosa de un gen 16S bacteriano son blancas (y aquellas en que no se insertó son azules). Se secuencian el DNA de las colonias de *E. coli* con inserciones del DNA 16S bacteriano. Las secuencias se comparan con secuencias del gen 16S en bases de datos públicas para la identificación de especies bacterianas. Las secuencias que no concuerdan con las correspondientes en una base de datos pública pueden indicar el descubrimiento de una nueva especie. El número de bacterias que se han encontrado en la cavidad oral casi se ha duplicado con los resultados de este método. Es posible usar clonación y secuenciación del gen 16S como una técnica cuantitativa si se emplean condiciones que mantienen la composición original de los genes 16S.²⁸

Pueden seleccionarse subgrupos de bacterias para clonación y secuenciación usando un cebador o iniciador específico de subgrupo antes de la clonación. Esto es análogo a usar un cebador o iniciador de subgrupo antes de la clonación. Esta técnica dirigida, ha sido útil para identificar muchas de las especies de *Bacteroides* spp. Y treponemas que están presentes en bajas concentraciones en la biopelícula subgingival.²⁷

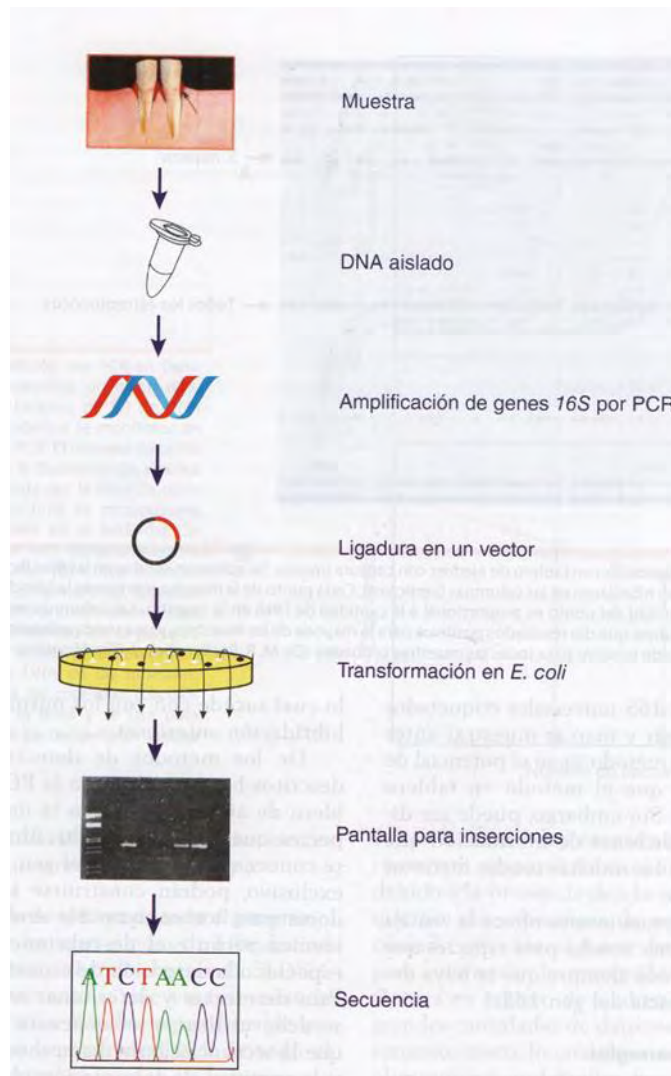


Fig. 11. Clonación y secuenciación de genes 16S bacterianos. Se aísla el DNA de las muestras y se amplifica el gen 16S del r RNA de todas las bacterias presentes en la muestra. Los fragmentos del gen 16S se ligan en un plásmido (vector) de *E. coli*, y otras células de *E. coli* transformadas se siembran y se cultivan. El vector contiene un sistema de genes indicadores, de modo que las colonias con integración exitosa del gen 16S bacteriano son blancas (las que carecen de las inserciones son azules). El DNA de las colonias de *E. coli* con inserciones de DNA del gen 16S bacteriano se secuencian para la identificación de especies bacterianas. Richard JL, George NH, Howard FJ. Microbiología e inmunología oral. Ed Manual Moderno ASM Press, American Society, México 2015: 1: 84.

5.6 Secuenciación de nueva generación.

El término secuenciación de nueva generación se refiere a una familia de nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento que en fechas recientes han comenzado a aplicarse para caracterizar bacterias de muestras orales. La versión más común utiliza la tecnología de secuenciación Roche 454, también conocida como pirosecuenciación.²⁹

En el proceso de la pirosecuenciación, como en la clonación del gen 16S, se aísla el DNA de todo el genoma de muestras orales y se realiza la PCR con cebadores universales que amplifican genes 16S de todas las especies. Sin embargo, los cebadores para pirosecuenciación tienen dos componentes adicionales no presentes en cebadores de clonación. Inmediatamente adyacente a la región complementaria al gen 16S hay una secuencia “código de barras” corta. Esta secuencia varía entre las distintas versiones del cebador o iniciador que se usen en diferentes muestras. Por lo tanto, pueden mezclarse múltiples muestras y secuenciarse en un solo carril del secuenciador. Después de que se generan los datos, la secuencia 16S a la muestra apropiada. Durante la preparación, se fijan moléculas individuales de DNA a cuentas y se amplifican en la cuenta. Estas perlas se distribuyen en una placa, de modo que toda la mezcla de DNA puede secuenciarse junta, lo cual evita el proceso intensivo en mano de obra de clonar cada molécula por separado. Cada cebador contiene además una secuencia adaptadora que se usa durante el proceso 454. El Human Microbiome Project (<http://www.hmpdacc.org>) ha publicado secuencias 16S cebadoras y código de barras adecuadas en internet. Hay cebadores del Human Microbiome Project disponibles para dos regiones distintas de gen 16S.²⁷

En la actualidad, la secuenciación 454 puede generar hasta un millón de lecturas de secuencia en una corrida, con longitudes de lectura de 500 a 600 bases. Las mejoras están incrementando tanto el número de secuencias

por corrida como la longitud de lectura. Por lo tanto, esta tecnología permite investigar poblaciones bacterianas a profundidad.²⁹

El gran número de lecturas de secuencia generadas con el método 454 pueden procesarse mediante un ducto bioinformático para identificar las bacterias presentes en la muestra y la cantidad relativa de cada una. Los conjuntos de datos deben filtrarse para eliminar secuencias erróneas y ruido o interferencias. Los primeros estudios realizados antes de que se usaran de manera sistemática estos filtros sobreestimaban mucho el número de especies encontradas en cada muestra.²⁶

Aunque hasta ahora se han usado menos, otras tecnologías de secuenciación de alto rendimiento pueden emplearse para secuenciación del gen 16S y análisis de comunidades microbianas. Una es el sistema “Ion Torrent”, una tecnología nueva que tiene algunas semejanzas con la secuenciación 454 y que está desarrollándose con rapidez. Otra es el sistema Illumina, que puede proporcionar cantidades muy altas de lecturas de secuencia, pero con longitud de lectura un tanto más corta.²⁷

5.7 Análisis de secuencias metagenómico.

Un metagenoma es la mezcla de todos los genomas presentes en una población de organismos. Los científicos han demostrado, a través de esfuerzos como la Global Ocean Sampling Expedition, que es posible obtener indicios sobre poblaciones bacterianas (incluidos organismos no cultivados) secuenciando y analizando metagenomas de modo muy parecido a como se hace con los genomas de organismos individuales. Tales esfuerzos han ayudado en gran medida, a la reducción en costos en la secuenciación de nuevas generaciones.²⁶

El protocolo general para la secuenciación metagenómica es similar al de la secuenciación de nueva generación de genes 16S, excepto que se preparan fragmentos al azar de DNA en vez de secuencias blanco del gen 16S.

Esto suele implicar la ligadura de secuencias adaptadoras específicas al DNA genómico. En la actualidad el método preferido es la secuenciación Illumina. La versión actual permite decodificar miles de millones de bases por corrida, con longitudes de extremos pareados de más de 100 bases. Las secuencias pueden leerse desde cada extremo, lo cual duplica la cantidad de lectura de secuencia a partir de cada fragmento.²⁸

El análisis de los enormes conjuntos de datos obtenidos por secuenciación metagenómica puede realizarse por varios métodos. Uno es analizar lecturas de secuencia directamente. Cada lectura se compara con bases de datos de secuencias de DNA para identificar la función del gen que contiene la secuencia. Comparar cada secuencia con datos de bases de genomas completos permite identificar la fuente de cada fragmento. En la actualidad hay disponibles cientos de secuencias de genomas completos de bacterias orales, y continuamente se agregan más. Las lecturas de secuencias que codifican RNA ribosómicos pueden identificarse y buscarse en bases de datos de genes 16S para determinar el origen. Un análisis del carácter taxonómico de la muestra debe dar indicios sobre la población, aunque la resolución puede ser menor que con métodos que producen lecturas más largas.²⁹

También es posible examinar las lecturas crudas en busca de su potencial codificante. Dado que los genomas bacterianos tienden a estar muy densamente empacados con genes que codifican proteínas, muchas de las lecturas crudas provendrán de regiones que codifican proteínas. Pueden investigarse mediante un módulo del programa BLAST llamado BLASTx. Este módulo traduce interrogantes sobre ácidos nucleicos en los seis marcos de lectura, y busca semejanzas de secuencia en una base de datos de secuencias proteínicas como Genbank nr. Este método puede encontrar semejanzas que pudieran no ser evidentes al nivel de ácidos nucleicos. Con

este enfoque, es posible obtener no sólo información taxonómica sino también información funcional acerca de las proteínas codificadas.²⁷

Si la secuenciación metagenómica se realiza con la suficiente profundidad, quizá sea posible realizar ensamblaje de secuencias con las lecturas de secuencia de nueva generación. En este proceso se identifican superposiciones entre lecturas (llamadas “contigs” en inglés o “cántigo”) y se usan para discernir la secuencia de fragmentos más largos. Se han usado extensamente algoritmos de ensamblaje de secuencias en todo el genoma de organismos aislados. En algunos casos los mismos algoritmos se aplican a metagenomas, aunque hay algunos problemas que pueden dificultar los ensamblajes metagenómicos. Debido a estos problemas, en fechas recientes se ha realizado mucha investigación sobre algoritmos de ensamblaje específicos para metagenomas. Un ensamblaje exitoso de contigs largos puede permitir el estudio de genes y operones completos y ayudar a la identificación taxonómica y funcional.²⁷

La cantidad de información de secuencias que puede generarse sigue aumentando a ritmo acelerado. Esto está cambiando el centro de interés hacia métodos de genoma completo que pueden definir mejor la especie e identificar procesos metabólicos que ocurren en determinadas condiciones. Información de secuencias más detallada permitirá identificar al nivel de subespecie o cepa. Esto hará posible determinar diferencias dentro de especies y la composición genómica de poblaciones mixtas, mejorando la comprensión del modo en que diferentes bacterias trabajan juntas en una comunidad polimicrobiana para establecer un ambiente saludable o causar enfermedad.²⁹

5.8 Genómica unicelular.

Una manera más de estudiar bacterias no cultivadas consiste en realizar secuenciación del genoma de células individuales. Esta técnica implica aislar células bacterianas individuales y luego amplificar sus genomas

mediante una técnica llamada amplificación por desplazamiento múltiple. El genoma puede secuenciarse con técnicas similares a las usadas para secuencias genómicas de cultivos puros. Es posible aislar células bacterianas individuales con varias técnicas distintas. En algunos estudios se usó un circuito integrado (chip) microfluídico especialmente diseñado para aislar bacterias orales no cultivadas del filum TM7, pero en otros estudios se han usado separación por flujo o micromanipulación para aislar células.²⁶

Las células de interés especial, como las de microorganismos hasta ahora no caracterizados o las implicadas en patogenicidad, pueden identificarse mediante hibridación in situ, con anticuerpos específicos o después de una amplificación genómica, por PCR y secuenciación del gen 16S de rRNA.²⁸

Como en la secuenciación metagenómica, en genomas unicelulares es posible usar algoritmos de ensamblaje de secuencias y programas diseñados para organismos cultivados. El análisis de perfiles génicos da indicios sobre las funciones metabólicas de las especies poco estudiadas. La disponibilidad de genomas de microorganismos no cultivados también ayudará al análisis de datos metagenómicos. Además, la secuencia genómica puede ayudar a identificar deficiencias metabólicas que han hecho difícil el cultivo y por tanto ayudar a diseñar condiciones para cultivar la bacteria con éxito.²⁶

6. Laboratorios de investigación para el diagnóstico periodontal.

En los últimos años se ha realizado un esfuerzo considerable por caracterizar el microbioma humano, incluido el Human Microbiome Project patrocinado por los National Institutes of Health. Con este esfuerzo intensivo, la cavidad oral es una de las regiones más exhaustivamente caracterizadas del cuerpo humano. El desarrollo de bases de datos de secuencias del gen 16S como CORE (www.microbiome.osu.edu) y el HOMD (www.homd.org) ha permitido la identificación precisa de bacterias a nivel de especie a partir de información de la secuencia del gen 16S. En contraste, la falta de bases de

datos para otras áreas del cuerpo humano, ha hecho difícil analizar la composición bacteriana más allá del nivel de género bacteriano, puesto que se sabe que especies del mismo género pueden tener muy distinto potencial patógeno o biológico de otros tipos.²⁸

6.1 Laboratorio de Genética Molecular (LGM) UNAM.

El Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México (LGM-FO-UNAM) fue fundado en agosto de 1999. El equipo está conformado por investigadores/profesores, especialistas clínicos, alumnos desde el nivel de bachillerato hasta el de doctorado, y técnicos de laboratorio, dedicados a la investigación científica clínica y básica, la docencia, y el suministro de servicios auxiliares clínicos, de investigación y de capacitación, en los campos de microbiología y genética humana, relacionados principalmente con las enfermedades periodontales.³⁸

El LGM-FO-UNAM mantiene un sistema de gestión de la calidad certificado desde 2006 por el Instituto Mexicano de Normalización y Certificación, A.C. (IMNC), de conformidad con las normas ISO9001:2008 y NMX-CC-9001-IMNC-2008, para el suministro de los servicios:

- Diagnóstico e Identificación Microbiológica
- Capacitación en Investigación Clínica Odontológica

La certificación forma parte del sistema de gestión de la calidad del Laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología (LIFO), que incluye a los Laboratorios de Bioquímica, Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados, Genética Molecular, Materiales Dentales y Patología Bucal, y tiene la función de elaborar productos y proporcionar servicios a la comunidad odontológica nacional e internacional.

Uno de los enfoques de investigación principales es el descubrimiento y evaluación de variaciones genéticas –principalmente de tipo SNP, conocidas también como polimorfismos de nucleótido único– que pueden determinar diferencias importantes entre los seres humanos en cuanto a su riesgo y susceptibilidad a presentar enfermedades inflamatorias crónicas como la diabetes mellitus tipo 2 y la enfermedad periodontal, así como en cuanto a su respuesta ante terapias y medicamentos específicos. Nuestro objetivo es entender el papel que juegan tales variaciones en la presentación de enfermedades, para desarrollar herramientas útiles de diagnóstico y pronóstico de riesgo genético, que contribuyan a mejorar el manejo de pacientes siguiendo estrategias preventivas y terapéuticas dentro de la tendencia actual del cuidado de la salud personalizado.³⁸

A la fecha, se han evaluado genéticamente a más de 350 individuos mexicanos para determinar la presencia de variaciones de tipo SNP y VNTR (número variable de repeticiones en tándem) en genes que codifican para citocinas inflamatorias como IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF y LT α , entre otras, analizando su distribución general en mexicanos mestizos e indígenas (mazahuas, otomís y huicholes), y sus posibles asociaciones con la diabetes mellitus tipo 2, y las enfermedades periodontales crónica y agresiva. El LGM ha contribuido a la base de datos pública *dbSNP – Short Genetic Variations* del National Center for Biotechnology Information (NCBI), parte de la información genética que ha generado sobre genotipos, frecuencias y ensayos de 8 variaciones de tipo SNP en un total de 277 individuos mexicanos sistémicamente sanos; mestizos, mazahuas y huicholes; periodontalmente sanos, y con enfermedad periodontal crónica y agresiva.³⁸

Algunos de los proyectos vigentes son:

- Factores microbiológicos y genéticos relacionados con las enfermedades periodontales en México.
- Identificación de perfiles genéticos polimórficos de citocinas inflamatorias relacionados con la periodontitis crónica y agresiva.

- Evaluación de perfiles genéticos polimórficos relacionados con la diabetes mellitus tipo 2 en la población mexicana.
- Descripción de la composición microbiológica subgingival en diabetes mellitus tipo 2 y periodontitis crónica.
- Efectos clínicos y microbiológicos de la administración de probióticos de *Lactobacillus reuteri* en enfermedad periodontal.
- Descripción de la composición microbiológica de conductos radiculares con necrosis pulpar sin lesión periapical.
- Descripción de los perfiles microbianos en micro-implantes exitosos y fallidos en sujetos mexicanos por medio de la técnica de checkerboard para hibridaciones DNA-DNA.

C. DISCUSIÓN.

Se han propuesto diversos métodos para utilizar las valoraciones de la composición de la microbiota subgingival para guiar al tratamiento periodontal. La técnica de Keyes (tratamiento periodontal modulado, modificado), utiliza la microscopia de contraste de fase para determinar los criterios de valoración para la fase antiinfecciosa del tratamiento periodontal. Entre estos criterios de valoración se incluyó la reducción en la proporción de espiroquetas y bacilos móviles en las muestras de placa subgingival.³⁹

Otros métodos incluyeron los complementos diagnósticos en la consulta, tales como la prueba de la benzoil-DL-arginina-2-naftilamida tripsinoide (BANA) o la evaluación de la presencia y las concentraciones relativas de las especies escogidas como objetivo, así como las determinaciones (por parte de los laboratorios comerciales) de sensibilidad antibiótica de las muestras de placa bacteriana o cepas clínicas bucales.^{40,41,42}

Los laboratorios comerciales utilizaron las técnicas de cultivo, sondas de DNA y PCR. Las pruebas diagnósticas fueron acogidas con gran entusiasmo por muchos clínicos, pero finalmente este entusiasmo decayó, debido a la percepción de que los resultados de las pruebas microbiológicas tenían un escaso impacto sobre las decisiones terapéuticas.

Deben cumplirse dos condiciones para justificar la necesidad de las pruebas diagnósticas microbianas. La primera es que la composición de la microbiota subgingival difiera suficientemente entre los individuos con periodontitis, para justificar la determinación de su composición. La segunda es que el conocimiento de la composición microbiana pueda afectar la elección de los tratamientos, de modo de aumentar las probabilidades de una mejor evolución clínica y microbiológica.

La primera condición se cumple claramente, en cuanto a que la microbiota subgingival difiere notablemente de un individuo a otro, aunque pueden observarse patrones comunes para subgrupos de individuos.

La segunda condición se cumple con menos claridad. Si bien los laboratorios comerciales a menudo ofrecen una guía “informal”, basada en los análisis microbianos de las muestras de placa subgingival, el valor de esta guía no ha sido rigurosamente comprobado, cita el autor.⁴³

El diagnóstico microbiológico de la enfermedad periodontal es una valiosa herramienta en el tratamiento de la periodontitis, la composición de la flora subgingival y los niveles de especies patógenas difieren entre individuos así como de un sitio a otro. El objetivo de las pruebas microbiológicas debe ir encaminado a desarrollar el tratamiento más adecuado para el perfil microbiano específico del paciente. Las reducciones en el complejo patógeno del individuo serán de esta forma, mayores y más fáciles de mantener, lo que llevará a una estabilidad clínica prolongada.²⁴

Creemos que las pruebas microbiológicas deberían constituir una importante herramienta en el tratamiento de las infecciones periodontales. La composición de la microbiota subgingival y las concentraciones de las especies patógenas difieren de un individuo a otro, e incluso, de un sitio a otro. También está claro que ningún tratamiento único será eficaz para todos los individuos, y las directrices para un tratamiento adecuado deberían optimizar los aspectos relacionados con el pronóstico y la eficacia terapéutica. Retrospectivamente, puede ser desafortunado que la capacidad del campo para realizar pruebas diagnósticas microbiológicas haya precedido, por muchos años, al conocimiento de cómo utilizar los datos resultantes de estas pruebas para fundamentar las decisiones terapéuticas. Los estudios que relacionan la naturaleza de la microbiota subgingival con la elección del tratamiento se encuentra en sus fases iniciales. Lamentablemente, parece existir una desgana por parte de las organizaciones de financiamiento para

subvencionar estudios clínicos que aborden las relaciones entre el diagnóstico y el tratamiento.⁴³

Creo que es de suma importancia estar a la vanguardia en cuanto a métodos y nueva tecnología, por tanto es importante que el odontólogo actual tome en cuenta la posibilidad de emprender un camino hacia el conocimiento de los métodos genéticos que se realizan hoy en día.

Debemos realizar técnicas genéticas para el diagnóstico de la enfermedad periodontal y todo lo que esto conlleva, por lo cual será necesario que el odontólogo tenga el conocimiento necesario, conozca las diferencias entre la microbiota oral en pacientes sanos y en pacientes enfermos periodontalmente, para poder así interpretar los resultados de cualquier método genético. Ya que, para que haya salud periodontal, no es necesario, ni adecuado, eliminar todas las bacterias, debido a que algunas, son benéficas para el individuo, se trata de mantener un equilibrio entre las bacterias en la cavidad oral.

D. 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.

La aplicación de métodos de laboratorio para la identificación de patógenos periodontales, siempre en estrecha relación con otros métodos empleados para el diagnóstico de la enfermedad periodontal, posibilita un mejor manejo y seguimiento de los pacientes. Los continuos progresos en el campo de la microbiología periodontal y métodos de diagnóstico por laboratorio, permiten un mejor entendimiento de la compleja ecología microbiana que existe a nivel subgingival y ayuda a definir las interacciones existentes entre las bacterias y el huésped con enfermedad periodontal activa.

E. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y ELECTRÓNICAS.

1. Carranza, F. "Periodontología clínica de Glickman". Editorial Interamericana. México. 1986: 4:150-160.
2. Dzink JL, Tanner AC, Haffajee AD, et al: Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions, J Clin Periodontol 1985, 12: 648.
3. Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000 1994: 5: 66-77.
4. Slots J. Subgingival microflora and periodontal disease. J Clin Periodontol 1979: 6: 351-382.
5. Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. Periodontol 2000 1994: 5: 7-25.
6. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998: 25: 134-144.
7. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal Microbial ecology. Periodontol 2000 2005: 38: 135-187.
8. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among oral bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 2002: 66: 486-505
9. Burne RA, Quivey RG Jr, Marquis RE. Physiologic homeostasis and stress responses in oral biofilms. Methods Enzymol 1999: 310: 441-460
10. Dibdin G, Wimpenny J. Steady-state biofilm: practical and theoretical models. Methods Enzymol 1999: 310: 296-322

11. Kolenbrander PE, Ganeshkumar N, Cassels FJ, Hughes CV. Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. *FASEB J* 1993;7: 406-413
12. Kolenbrander PE, Andersen RN, Kazmerzak K, Wu R, Palmer RJ Jr. Spatial organization of oral bacteria in biofilms. *Methods Enzymol* 1999: 310: 322-332
13. Marsh PD. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am* 1999: 43: 599-614
14. Singleton S, Treloar R, Warren P, Watson GK, Hodgson R, Allison C. Methods for microscopic characterization of oral biofilms: analysis of colonization, microstructure, and molecular transport phenomena. *Adv Dent Res* 1997: 11: 133-149
15. <http://periobasics.com/microbiology-of-periodontal-diseases.html>
16. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001: 183: 3770-3783.
17. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res* 2003: 82: 338-344.
18. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, Boches SK, Dewhirst FE, Griffen AL. Molecular analysis of bacterial species associated with early childhood caries. *J Clin Microbiol* 2002: 40: 1001-1009.
19. Boches SK, Lee AM, Paster BJ, Dewhirst FE. Development of a human oral microbe identification microarray. *J Dent Res* 2004: 83 (Spec Issue A): abstract no 2263.

20. Boches SK, Lee AM, Paster BJ, Dewhirst FE. Development of a human oral microbe identification microarray. *J Dent Res* 2006; 85: (Spec Issue A): abstract no 838.
21. Paster BJ, Bartoszyk IM, Dewhirst FE. Identification of oral streptococci using PCR-based, reverse-capture checkerboard hybridization. *Methods Cell Sci* 1998; 20: 223-231.
22. 1. Carranza, F. "Periodontología clínica de Glickman". 4° edición. Editorial Interamericana. México. 1986.
2. Carlos JP, Wolfe MD, Kingman A: The extent and severity index: a simple method for use in epidemiologic studies of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 500-505.
3. Brown L, Brunelle J, Kingman: Periodontal status in the United States, 1988-91: Prevalence, Extent and Demographic Variation. *Journal of Dental Research* 1996; 75: 672-683.
4. Albandar JM, Streckfus CF, Adesanya MR, Winn DM: Cigar, pipe, and cigarette smoking as risk factors for periodontal disease and tooth loss. *J Periodontol* 2000; 71:1874-1881.
5. Burt A, Ismail A, Eklund S: Periodontal disease, tooth loss, and oral hygiene among older Americans. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 1985; 13: 93-96.
6. Colimon KM: Fundamentos de Epidemiología Ediciones Díaz de Santos, S.A. España, 1990.
7. Loe H, Silness J: Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and Severity. *Acta Odont Scand* 1963; 21(6):533-551.
8. Loe H: The Gingival Index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontology* 1967; 38 (supp. 3): 610-616.

9. OMS: Encuestas de Salud Buco Dental. Métodos Básicos. Cuarta Edición. Ginebra, 1997.
10. Baelum V, Luan WM, Chen X, Fejerskov O: A 10-year study of the progression of destructive periodontal disease in adult and elderly Chinese. J Periodontol 1997; 68(11):1033-1042
11. Loe H, Silness J: Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. Acta Odont Scand 1964; 22 (1):112-135.
12. Carranza F/A, Periodontología Clínica de Glickman II Ed. Pp 109 - 127 Editorial Pueblo y Educación. Ciudad de la Habana, 1983. Normas de periodontología, la Habana. Ministerio de salud Pública Dpto. Nacional de estomatología 1983.
13. Mena A, Riviera L: Epidemiología Bucal (Conceptos Básicos). OFEDO – UDUAL. Caracas, Venezuela, 1991.
14. Sosa M, Mojáiber A: Municipios por la Salud. Dirección Nacional de Estomatología. MINSAP. Cuba, 1998.
15. Colectivo de autores. Guías Prácticas. Cap. 8. Indicadores epidemiológicos. MINSAP. 2004.
16. Programa Nacional de Atención Estomatológica Integral a la Población. Dirección Nacional de Estomatología. Febrero 2003
17. Colectivo de autores. Higiene y epidemiología para Estudiantes de Estomatología. Cap. 10. Epidemiología de la Caries Dental. Pág. 150-158
18. Von Wowern N, Klausen G, Kollerup G: Osteoporosis: a risk factor in periodontal disease. Journal of Periodontology 1994; 65: 1134-1138.

19. Katz, McDonald, Stookey. Odontología Preventiva en acción. Editorial Científico Técnico.1997
20. Sosa M, Mojáiber A: Análisis de la Situación de Salud en las Comunidades. "Componente Bucal". Una Guía para su ejecución". Dirección Nacional de Estomatología. MINSAP. Cuba, 1998.
23. Armitage, G.C.: "Periodontal diseases: Diagnosis." *Annals of Periodontology*.1996; 1(1):37-53.
24. Carasol, M.; Aláñez, F.J.; Herrera, J.I.; Sanz, M.: "El diagnóstico microbiológico de las enfermedades periodontales I. Relación con la etiopatogenia." *Periodoncia* 1997; 7(4):215-26.
25. Grossi, S.G.; Zambon, J.J.: "Assessment of risk for periodontal disease I. Risk indicator for attachment loss." *J Periodontol* 1994; 65:260-67.
26. Richard JL, George NH, Howard FJ. Microbiología e inmunología oral. Ed Manual Moderno ASM Press, American Society, México 2015: 1.
27. Griffen AL, Beall CJ, Firestone ND, Gross EL, DiFranco JM, Hardman JH, Vriesendorp B, Faust RA, Janies DA, Leys EJ. Human Microbiome Project Consortium, Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 2012. 486: 204-214.
28. Griffen AL, Beall CJ, Firestone ND, Gross EL, DiFranco JM, Hardman JH, Vriesendorp B, Faust RA, Janies DA, Leys EJ. CORE: a phylogenetically-curated 16S r DNA database of the core oral microbiome. *PLoS one* 6: e 19051
29. Jousimies-Somer H, Sutter VL, Wadsworth-KTL, *Anaerobic Bacteriology Manual*, Star publishing, 2002: 6.
30. Carasol, M.; Aláñez, F.J.; Herrera, J.I.; Sanz, M.: "El diagnóstico microbiológico de las enfermedades periodontales III. Nuevas tecnologías para la detección de patógenos." *Periodoncia* 1998; 8 (2):12-8.

31. Zambon, J.J.; Reynolds, H.S.; Chen. L.; Genco, R.L.: "Rapid identification of periodontal pathogen in subgingival dental plaque. Comparison of indirect immunofluorescence microscopy with bacterial culture for detection of bacteriodes gingivalis." J Periodontol 1985, Suppl: 32-40.
32. Zambon, J.J.; Haraszthy, V.: "The laboratory diagnosis of periodontal infections." Periodontology 2000,1995; 7:69-82.
- 33.<http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/boletin/html/laboratorio/laboratorio03.html>
34. Wolf, L.F.; Anderson, L.; Sandberg, G.P.: "Bacterial concentration fluorescence immunoassay (BCFIA) for the detection of periodontal pathogens in plaque." J Periodontol 1991; 63:1093-1101.
35. Snyder, B.; Zambon, J.J.; Reynolds, H.: "Clinical significance of EVALUSITE TM periodontal test sensitivity in adult periodontitis." J Dent Res 1994; 73:305-12.
36. Tew, J.G.; Marshall, D.R.; Moore, W.; Best, A.M.; Palcanis, K.G.; Ranney, R.R.: "Serum antibody reactive with predominant microorganisms in the subgingival flora of young adults with generalized severe periodontitis." Infect Immun.1985; 48:303-304.
37. Schenk, K.: "IgA, IgG and IgM serum antibodies against lipopolysacharide from bacteriodes gingivalis in periodontal health and disease." J Periodontol Res 1985; 20:368-77.
38. <http://labgenmol-fo-unam.com/>
39. Keyes PH. Microbiologically monitored and modulated periodontal therapy. Gen Dent 1985: 33: 105-115.
40. Listgarten MA, Loomer PM. Microbial identification in the Ann Periodontol 2003: 8: 182-192.
41. Loesche WJ, Giordano J, Hujoel PP. The utility of the BANA test for monitoring anaerobic infections due to spirochetes (*Treponema denticola*) in periodontal disease. J Dent Res 1990: 69: 1696-1702.

42. Loesche WJ, Lopatin DE, Giordano J, Alcoforado G, Hujoel PP. Comparison of the benzoyl-BL-argininenaphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Bacteriodes forsythus*. J Clin Microbiol 1992; 30: 427-433.
43. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal Microbial ecology. Periodontol 2000 2007; 17: 210.