

447



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

“PREVALENCIA DE *ACTINOBACILLUS ACTINOMYCETEMCOMITANS* EN UNA POBLACIÓN INFANTIL MEXICANA PERIODONTALMENTE SANA”

T E S I N A
Q U E P R E S E N T A :
MARGARITA RESÉNDIZ TREJO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
CIRUJANA DENTISTA

2897690

DIRECTORA DE TESINA:
DRA. LAURIE ANN XIMENEZ FYVIE



MEXICO, D.F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Con agradecimiento, admiración y respeto
a mi asesora y directora de tesina
Dra. Laurie Ann Ximénez Fyvie

Con agradecimiento al Q.F.B. Fernando Franco Martínez
por la oportunidad que me brindó.

Agradezco al Dr. Gilberto Méndez Lecanda
por su confianza

Agradezco al doctor Alfredo Garcilazo por su apoyo incondicional, y por ser maestro y al mismo tiempo amigo.

Con todo mi cariño e infinito amor
a mi madre, por todos sus cuidados , amor,
confianza y apoyo que deposita en mi
y por haber sido mi fuerza e inspiración.

Con cariño a mis hermanos y tías
que gracias a su estímulo y sacrificio
debo el haber logrado la culminación
de mis sueños.

Con admiración y amor a Arturo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

A. OBJETIVOS	1
B. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	1
1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS	1
2. DEFINICIÓN Y ESTRUCTURA DE LA PLACA DENTOBACTERIANA	2
3. COMPOSICIÓN DE LA PLACA DENTOBACTERIANA	4
4. COLONIZACIÓN TEMPRANA DE ESPECIES PERIODONTOPATÓGENAS	7
5. CARACTERÍSTICAS DEL PERIODONTO EN NIÑOS	9
6. <i>ACTINOBACILLUS ACTINOMYCETEMCOMITANS</i> EN LA PLACA DENTOBACTERIANA ...	10
C. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	13
D. HIPÓTESIS	14

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. DISEÑO EXPERIMENTAL	15
B. POBLACIÓN DE ESTUDIO	15
1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	15
2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	16
3. CAPTURA DE SUJETOS DE ESTUDIO	16
C. EVALUACIÓN CLÍNICA	17
D. EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA	18
1. ESPECIES BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO	18
2. PURIFICACIÓN DE DNA BACTERIANO Y PREPARACIÓN DE SONDAS DE DNA	18
3. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	19
4. HIBRIDACIONES DNA-DNA	21
5. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	22
E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS	23

III. RESULTADOS

A. CUENTAS BACTERIANAS ($\times 10^5$)	25
B. PREVALENCIA	27
C. PROPORCIÓN	28

IV. CONCLUSIONES

30

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

32

VI. ANEXO

46

VII. FIGURAS

50

I. INTRODUCCION

A. OBJETIVOS

El objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia, niveles y proporción de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en una población infantil mexicana periodontalmente sana.

B. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Actinobacillus actinomycetemcomitans fue el primero microorganismo aislado de una lesión actinomicótica cervicofacial, en 1912. Inicialmente fue clasificado como *Bacterium actinomycetemcomitans*. En 1921, el microorganismo fue reclasificado como *Bacterium comitans* por Lieske y finalmente designado *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en 1929.

El nombre de *actinomycetemcomitans* fue designado por las asociaciones frecuentemente reportadas de la presencia del microorganismo con especies del género *Actinomyces*, especialmente en lesiones actinomicóticas con *Actinomyces israelii*. (85).

En los años 50s, se estableció la relación entre la acumulación de placa y la enfermedad periodontal. Con pocas excepciones, durante dicha década, se comenzó a tomar en cuenta la hipótesis que la enfermedad periodontal era causada por la acumulación de placa. Se pensaba que la composición de la placa era similar de sujeto a sujeto y entre sitios en un mismo sujeto. Se

pensaba también que la abundante acumulación de placa era causa de la gingivitis y que la gingivitis evolucionaba posteriormente hasta periodontitis.

La introducción del concepto de la placa como causa de la enfermedad periodontal tomó fuerza desde la detección de una espiroqueta específica en lesiones de gingivitis ulceronecrosantes, y la demostración de la transmisión de enfermedad periodontal en un modelo de hamster (85).

2. DEFINICIÓN Y ESTRUCTURA DE LA PLACA DENTOBACTERIANA

La placa dentobacteriana se define como la acumulación microbiana no mineralizada que se adhiere tenazmente a las superficies de los dientes, tejidos blandos, restauraciones y aparatos protésicos en la cavidad bucal (36, 38, 40, 41).

La placa dentobacteriana es una estructura compleja formada por grupos de especies bacterianas organizadas en una estructura denominada biopelícula (9-12, 39, 66). La formación de la placa dentobacteriana está mediada por la capacidad de adhesión (21, 22, 24) y coagregación (37, 38, 40, 42-44) de las especies bacterianas que la colonizan, así como por la capacidad de adaptación de los microorganismos para cambiar las condiciones ambientales y crear equilibrios que promueven o inhiben su supervivencia en el ecosistema.

Las primeras bacterias que colonizan la superficie dental generalmente son bacilos y cocos Gram-positivos, principalmente miembros de los géneros *Streptococcus* y *Actinomyces* que se adhieren a la superficie

dental a través de un mecanismo de adhesión bioquímica proteína-proteína entre los fimbrios de las bacterias y las proteínas salivales ácidas con alto contenido de prolina (21, 23, 25). Conforme la placa madura, se agregan bacterias de otros géneros tales como *Fusobacterium*, *Corynebacterium* y *Capnocytophaga* sobre las cuales se coagregan los colonizadores tardíos de la placa como miembros de los géneros *Porphyromonas*, *Treponema*, *Selenomonas* y *Bacteroides*, entre otros (1, 6, 7, 34, 37, 38, 42). Estos grupos de bacterias continúan proliferando y asociándose hasta formar una estructura en donde las bacterias colonizan interactuando y dependiendo unas de otras.

Actualmente, se tienen evidencias científicas extensas de que la placa dentobacteriana es el factor etiológico primordial de las enfermedades periodontales (30, 70, 78-81, 83). El potencial patogénico de la placa dentobacteriana ha sido ampliamente estudiado y se conoce que en la placa dentobacteriana existen cantidades abundantes de productos bacterianos tóxicos como endotoxinas (65), ácidos grasos y orgánicos (2), leucotoxinas (87) y enzimas solubles capaces de hidrolizar algunos constituyentes de los tejidos (65, 69). El grado de patogenicidad de la placa dentobacteriana se ve influenciado además por diversos factores como la presencia y el aumento en la cantidad de bacterias consideradas periodontopatógenas (61, 66, 82) así como de sus factores de virulencia (12, 50, 58, 82), el medio ambiente local (49, 53) y la susceptibilidad del huésped (3, 4, 18, 19, 26, 28, 32, 47, 54, 93, 100)

3. COMPOSICIÓN DE LA PLACA DENTOBACTERIANA

Se reconoce que la cavidad oral de un individuo puede estar colonizada por aproximadamente 150 a 400 especies bacterianas diferentes a la vez y que las cuentas bacterianas en un surco subgingival sano son de aproximadamente 10^3 mientras que en un surco enfermo son de 10^8 aproximadamente (30, 83). Sin embargo, se considera actualmente que el número de especies que pueden iniciar la enfermedad periodontal destructiva se limita a posiblemente tan solo un grupo de 10 a 30 especies.

A pesar de la gran complejidad de especies microbianas en la placa dentobacteriana, en la actualidad se reconocen únicamente a cuatro microorganismos como periodontopatógenos: *Actinobacillus actinomycesemcomitans*, asociado principalmente a casos de periodontitis juvenil localizada; *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* y *Treponema denticola*, asociados principalmente a periodontitis del adulto, clasificada recientemente como periodontitis crónica (8).

Un individuo periodontalmente sano tiene, en términos generales, una microflora bucal similar a la que presenta un individuo con enfermedad periodontal, en cuanto al tipo y diversidad de especies bacterianas que colonizan la placa subgingival. Sin embargo, existen diferencias importantes en la cantidad, proporción y prevalencia de dichas especies en poblaciones con diferentes estados de salud periodontales (29, 96, 97).

Tanner y cols. (88, 90, 92) analizaron muestras de placa subgingival tomadas de sujetos con diferentes formas de enfermedad periodontal y de sujetos periodontalmente sanos. Observaron que había una variación en la microbiota subgingival a medida que el estado periodontal progresaba de salud a gingivitis y a periodontitis. Las especies compatibles con salud incluyeron miembros del género *Actinomyces*, *Streptococcus* y *Veillonella*, mientras que especies Gram-negativas y de los géneros *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus*, *Porphyromonas*, *Treponema* y *Bacteroides* se detectaron en mayor proporción en sitios enfermos.

Otros estudios sobre la composición microbiológica de la placa dentobacteriana en poblaciones con diferentes estados de salud periodontal, han contribuido también al entendimiento de la complejidad de especies que colonizan la placa dentobacteriana y de sus funciones en este hábitat. Newman y cols. (59, 60, 62) demostraron que la composición microbiológica de muestras de placa subgingival de sitios con enfermedad periodontal difiere sustancialmente de aquella que puede ser identificada en sitios sanos de pacientes con periodontitis juvenil localizada. Así mismo, Tañer y cols. y Slots y cols (73-75, 89-91) demostraron que la microflora en sitios enfermos de pacientes con periodontitis del adulto difiere de la microflora en sitios sanos de los mismos pacientes y de sitios enfermos de pacientes con periodontitis juvenil localizada.

Durante muchos años, las descripciones de la composición microbiológica de la placa subgingival se basaron en descripciones de la

prevalencia, niveles o proporciones de especies individuales. El reconocimiento de que las enfermedades periodontales son provocadas por grupos específicos de microorganismos que forman parte de una flora comensal compleja, ha dirigido el enfoque de los dichos estudios hacia la evaluación de poblaciones a grupos de especies bacterianas que pueden, potencialmente tener papeles similares en el ecosistema microbiano de la placa dentobacteriana.

La primera descripción extensa de grupos de microorganismos asociados en la placa subgingival, fue publicada en 1998 por Socransky y cols. (84). El estudio describió las asociaciones entre especies bacterianas para facilitar el entendimiento de sus relaciones biológicas en la placa subgingival. 13,261 muestras de placa dentobacteriana de 185 pacientes fueron analizadas para determinar la presencia de 40 especies bacterianas por medio de sondas de DNA. Se observó que ciertas especies tendían a asociarse y estos grupos fueron denominados complejos microbianos. Se describieron 5 complejos y se les asignó un color para facilitar su descripción (Figura 9):

◊ **Complejo rojo:**

Bacteroides forsythus

Porphyromonas gingivalis

Treponema denticola

◊ **Complejo naranja:**

F. nucleatum ss *nucleatum*

F. nucleatum ss *vincentii*

F. nucleatum ss *polymorphum*

Prevotella intermedia

Prevotella nigrescens

Peptostreptococcus micros

Eubacterium nodatum

Campylobacter rectus

Campylobacter showae

Campylobacter gracilis

Streptococcus constellatus

◊ **Complejo amarillo:**

Streptococcus sanguinis

Streptococcus oralis

Streptococcus mitis

Streptococcus intermedius

Streptococcus gordonii

◊ **Complejo verde:**

Capnocytophaga gingivalis

Capnocytophaga ochracea

Capnocytophaga sputigena

Campylobacter concisus

Eikenella corrodens

A. actinomycetemcomitans a

◊ **Complejo morado:**

Veillonella parvula

Actinomyces odontolyticus

4. COLONIZACIÓN TEMPRANA DE ESPECIES PERIODONTOPATÓGENAS

La cavidad bucal puede estar colonizada por bacterias anaeróbicas antes de la erupción de los dientes (17, 45). Se cree, sin embargo que la erupción de los dientes primarios contribuye a la colonización bacteriana, proporcionando superficies adicionales para la adhesión bacteriana. Algunos estudios han demostrado que la colonización temprana de especies anaeróbicas hace muy similar la composición de la placa dentobacteriana en poblaciones infantiles y adultas (13, 55). Moore y cols. (57) observaron que algunos microorganismos Gram-negativos en la flora subgingival eran más frecuentes en poblaciones infantiles que en poblaciones adultas. Por otra

parte, algunos otros estudios sugieren que algunas especies periodontopatógenas son colonizadores tardíos de la placa dentobacteriana y que su prevalencia y proporción se incrementa hasta la adolescencia (35, 95, 101).

Actualmente se considera que los efectos terminales de la enfermedad periodontal, observados en adultos, tienen un comienzo temprano en la vida. La enfermedad gingival en niños puede progresar y poner en peligro el periodonto del adulto. Könönen y cols. (46) analizaron la composición microbiológica de muestras de placa dentobacteriana de 21 niños con dentición primaria con edad promedio de 32 meses, así como de niños edéntulos con edad promedio de 3 meses. Observaron que ninguno de los niños evaluados presentaron *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ni *Porphyromonas gingivalis*, sin embargo, tanto los niños edéntulos como los que tenían dentición primaria, presentaron otras especies patógenas putativas como *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella intermedia* y *Fusobacterium nucleatum*.

En otro estudio, se comparó la prevalencia de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en niños Finlandeses y Vietnamitas (33). Se determinó que la prevalencia del microorganismo en niños Vietnamitas fue de 78% mientras que en niños Finlandeses de 13%, sugiriendo que la prevalencia de este tipo de microorganismos puede variar significativamente no sólo con la edad sino también con las condiciones generales en diferentes poblaciones de estudio.

Lamell y cols (48), estudiaron la adquisición y colonización de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* en niños periodontalmente sanos entre 0 y 18 años y determinaron que ambos microorganismos podían ser encontrados en la población estudiada, inclusive en los niños más pequeños menores de 1 año.

5. CARACTERÍSTICAS DEL PERIODONTO EN NIÑOS

El desarrollo de la dentición y ciertas características metabólicas generales son propias de la niñez. Durante este periodo de la vida, pueden observarse también alteraciones gingivales y periodontales que son propias de la niñez. La encía en la dentición primaria es rosa pálido, firme y lisa o punteada, y la profundidad promedio del surco gingival es de 2.1 mm.

El hueso alveolar en la dentición primaria suele presentar radiográficamente una cortical alveolar destacada en la etapa de germinación y durante la erupción dental. Las trabéculas del hueso alveolar son más escasas y gruesas, y los espacios medulares son más amplios que en los adultos. Así mismo, las crestas de los tabiques interdetales son planas.

Durante la erupción dental, se producen cambios fisiológicos en el periodonto que pueden confundirse con enfermedad gingival como el abultamiento gingival pre-eruptivo, la formación del margen gingival y la prominencia normal del margen gingival. Sin embargo, existen también una serie de enfermedades del periodonto asociadas con la niñez como la gingivitis marginal crónica en donde la encía presenta cambios de color,

tamaño, consistencia y textura superficial características de inflamación crónica. La causa más común de este trastorno es la irritación local.

La mayor parte de los casos de gingivitis en niños son causados por la mala higiene dental, ya que la placa dentobacteriana parece formarse con mayor rapidez en niños entre 8 y 12 años.

6. *ACTINOBACILLUS ACTINOMYCETEMCOMITANS* EN LA PLACA DENTOBACTERIANA

Actinobacillus actinomycetemcomitans fue establecido como uno de los principales patógenos de la periodontitis juvenil localizada a mediados de la década de los 80s (5, 14, 20, 27, 52, 56, 63, 94).

Actinobacillus actinomycetemcomitans es un bacilo Gram-negativo, delgado, no esporulado, no mótil, y microaerófilico de aproximadamente 0.4 x 1.0 μ m (64). En su superficie pueden observarse, en ocasiones, microvesículas que sobresalen del contorno celular e incluso aparecen separadas del mismo.

El microorganismo se desarrolla en medios con suero o sangre, en condiciones anaerobias o en una atmósfera aerobia que contenga del 5 al 10% de CO₂. Produce catalasa y superóxido dismutasa. Su crecimiento se ve estimulado cuando a los medios de cultivo se les añade bicarbonato de sodio al 1%.

En agar sangre las colonias son pequeñas, blancas grisáceas o translúcidas, lisas, adherentes y no hemolíticas. Se han descrito dos medios sólidos selectivos en cuya composición se incluye bacitracina, vancomicina

y/o verde malaquita (51, 72). Todas las cepas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* fermentan glucosa, fructosa y maltosa, pero no sacarosa o lactosa y reducen nitrato. Se reconocen ocho biotipos en base a sus reacciones con galactosa, manitol y xilosa. Entre sus productos metabólicos terminales se encuentran el ácido láctico, succínico, acético y propiónico.

Actualmente se reconocen cinco serotipos (a, b, c, d y e) y más de 13 genotipos (64). La mayoría de las cepas productoras de leucotoxinas pertenecen al serotipo b. Los serotipos a y b son los que se encuentran con mayor frecuencia en la cavidad oral, siendo el serotipo c el que suele aislarse de cuadros clínicos extraorales.

La colonización de la cavidad bucal por *Actinobacillus actinomycetemcomitans* está mediada por los fimbrios del microorganismo y las interacciones que establece con otras bacterias. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* puede ser aislado a partir de muestras de placa dentobacteriana supra y subgingival de individuos periodontalmente sanos, así como de pacientes con periodontitis del adulto (29, 85, 96, 97). Sin embargo, los niveles y proporciones más elevados del microorganismo han sido reportados en pacientes con periodontitis juvenil localizada (76, 98).

Diversos factores de virulencia han sido asociados con la patogenicidad de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Algunos de dichos factores se describen a continuación:

Leucotoxinas

Destruyen neutrófilos y monocitos, alterando las defensas en el surco gingival. En algunos individuos, inducen la formación de anticuerpos neutralizantes, impidiendo la progresión de los procesos periodontales (99).

Factores inhibidores de la función leucocitaria

En ausencia de leucotoxinas, estos microorganismos pueden no ser fagocitados. Así pese a ser opsonizados por anticuerpos u otros componentes séricos, cepas no leucotóxicas, elaboran compuestos que inhiben la quimiotaxis leucocitaria. Incluso, algunas cepas poseen receptores para Fc para las familia de las IgGs, con lo que las células fagocíticas no pueden unirse a los antígenos a través de opsoninas. También la formación de catalasa y superóxido dismutasa pueden bloquear los mecanismos de destrucción celulares dependientes del peróxido de hidrógeno y del superóxido.

Factores inhibidores de fibroblastos , células endoteliales y epiteliales

Estudios *in vitro* han demostrado que *Actinobacillus actinomycetemcomitans* puede inhibir la síntesis de DNA, RNA y proteínas, cuando el microorganismo es co-cultivado con fibroblastos o células endoteliales. La inhibición fibroblástica puede interferir en la formación de colágena y, como consecuencia, el restablecimiento tisular se vería disminuido. Por otra parte, en presencia de este microorganismo las células

epiteliales disminuyen su proliferación y capacidad de adhesión al material plástico inerte de los cultivos celulares.

Endotoxinas

Los lipopolisacáridos de la pared celular de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ejercen una potente acción endotóxica con los efectos biológicos característicos de este tipo de toxinas (67, 68, 71)

Invasión tisular

Se ha descrito una epitelio-toxina que favorece la invasión tisular por *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Esto, aunado a la producción de colagenasa por esta bacteria, favorece su progresión en los tejidos

C. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Actualmente, se cuenta con información limitada en la que se describan las edades de adquisición y colonización de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Mientras que algunos estudios sugieren que la adquisición puede ocurrir inclusive antes de la erupción dental, otros contradicen estos hallazgos. Aun más, existen claras evidencias de que la prevalencia y adquisición de microorganismos en la placa dentobacteriana pueden variar significativamente entre poblaciones. Hasta la fecha, se carece de información que describa la composición microbiológica de la placa subgingival en la población infantil mexicana.

Conocer la edad de adquisición y la prevalencia de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, así como de otras especies periodonto-patógenas en la población infantil mexicana periodontalmente sana, podría contribuir no sólo al conocimiento de la etiología las enfermedades periodontales en nuestro país, si no que también al establecimiento de medidas terapéuticas y preventivas adecuadas para nuestra población

D. HIPÓTESIS

El microorganismo *Actinobacillus actinomycetemcomitans* coloniza la placa dentobacteriana subgingival a temprana edad en la población mexicana.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. DISEÑO EXPERIMENTAL

En el presente proyecto de investigación se realizó un estudio de tipo transversal en donde fueron evaluadas un total de 2 muestras de placa dentobacteriana subgingival de cada uno de 42 sujetos de estudio.

Los sujetos de estudio fueron evaluados en una sola visita, en la que se realizó una evaluación de su estado de salud periodontal, se registraron los datos clínicos periodontales y se recolectaron las muestras de placa dentobacteriana. Todas las muestras de placa dentobacteriana (n = 84) fueron evaluadas microbiológicamente para determinar la prevalencia y niveles de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

B. POBLACIÓN DE ESTUDIO

1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

La población de sujetos de estudio consistió en 42 sujetos mexicanos por nacimiento, hombres o mujeres, de 3 a 11 años de edad, con dentición temporal o mixta, que no recibieron tratamiento periodontal en el pasado, que no tomaron antibióticos sistémicos en los 3 meses previos a la recolección de muestras y que fueron considerados periodontalmente sanos.

La tabla que se presenta a continuación proporciona una descripción de la población que fue incluida en la presente investigación:

Grupo de Estudio	No. Sujetos	Edad	Dentición	Profundidad de Bolsa (P.B.)	Nivel de Inserción (N.I.)
Niños periodontalmente sanos	42	3 a 11 años	Temporal o Mixta	Menos de 4 sitios con P.B. \geq 4 mm	Menos de 4 sitios con N.I. = 3 mm y 0 (cero) sitios con N.I. \geq 4 mm

2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Fueron excluidos del estudio todos los sujetos cuyos padres no accedieron voluntariamente a su participación en el estudio o se negaron a firmar las formas de consentimiento informado, así como todos aquellos que tomaron cualquier clase de antimicrobiano sistémico en los 3 meses previos a la recolección de muestras para el estudio.

3. CAPTURA DE SUJETOS DE ESTUDIO

Todos los sujetos de estudio provinieron de la población de pacientes que reciben atención en la clínica de Odontopediatría de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

El propósito y naturaleza del estudio fueron explicados a los padres o tutores de cada sujeto potencial de estudio por el clínico tratante. Dichas personas recibieron copias de la forma de consentimiento informado (Anexo) para la toma de muestras subgingivales en la que se delineó explícitamente el protocolo del estudio

Después de haber leído, entendido y aclarado cualquier duda sobre el estudio, su participación y las formas de consentimiento informado, se pidió a

los padres o tutores que firmaran dicha forma, con lo cual establecieron su entendimiento sobre el estudio y el deseo voluntario de participar.

C. EVALUACIÓN CLÍNICA

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

Todas las mediciones clínicas fueron tomadas en una sola visita y registradas de 6 sitios por diente (mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesiolingual) de todos los dientes en la boca de cada sujeto de estudio de acuerdo con procedimientos previamente descritos en la literatura (31).

Los parámetros clínicos evaluados y el orden de las mediciones fueron realizados de la siguiente manera:

- | | |
|------------------------------------|---------------------------------|
| 1. Enrojecimiento gingival (0 ó 1) | 4. Supuración al sondeo (0 ó 1) |
| 2. Profundidad de bolsa (mm) | 5. Nivel de inserción (mm) |
| 3. Sangrado al sondeo (0 ó 1) | 6. Acumulación de placa (0 ó 1) |

La profundidad de bolsa y el nivel de inserción fueron registrados al mm más cercano utilizando una sonda periodontal "Carolina del Norte" de 15 mm de longitud con marcas en intervalos de 1 mm y marcas distintivas en los intervalos de 5 mm (Hu-Friedy, Chicago, IL).

D. EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA

Las evaluaciones microbiológicas fueron realizadas en el Laboratorio de Genética Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM mediante la técnica de "Checkerboard" para hibridaciones DNA-DNA (86) (Figura 1). El empleo de dicha técnica permitió la identificación de hasta 40 especies bacterianas en cada una de 28 muestras de placa dentobacteriana en un mismo experimento. Así mismo, fue posible cuantificar los niveles y prevalencia de la especie evaluada.

1. ESPECIES BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* fueron adquiridas como cultivos liofilizados del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) (serotipo a: ATCC # 43717, serotipo b: ATCC # 43718). Estas fueron rehidratadas en caldo para *Mycoplasma* (Difco Lab., Detroit, MI) y crecidas en agar de soya tripticaseína con 5% de sangre defibrinada de borrego, a 35°C dentro de una cámara de anaerobiosis (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂).

2. PURIFICACIÓN DE DNA BACTERIANO Y PREPARACIÓN DE SONDAS DE DNA

Las cepas bacterianas fueron cultivadas bajo condiciones anaeróbicas sobre superficies de agar durante 7 días. El crecimiento fue recolectado y colocado en tubos para microcentrifugación de 1.5 ml que contenían 1 ml de

buffer TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.6). Las células fueron lavadas dos veces mediante centrifugación en buffer TE a 3,500 rpm durante 10 min. Las células fueron lisadas con 10% SDS y proteinasa K (20 mg/ml) (Sigma). Posteriormente, fueron resuspendidas mediante sonicación durante 15 seg. e incubadas a 37°C durante 1 hora. El DNA fue aislado y purificado utilizando la técnica descrita por Smith y cols. (77). La concentración de DNA fue determinada mediante mediciones espectrofotométricas de la absorbancia a 260 nm. La pureza de las preparaciones fue valorada mediante el cálculo de la relación entre las mediciones de las absorbancias a 260 nm y 280 nm. Las sondas de DNA genómicas fueron preparadas para las 40 especies bacterianas marcando 1 µg de DNA purificado con digoxigenina (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) utilizando la técnica de marcaje de primers aleatorios (random primer technique) previamente descrita (16).

3. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de placa dentobacteriana subgingival fueron recolectadas de 2 sitios en cada sujeto de estudio y analizadas microbiológicamente mediante la técnica de "Checkerboard" para hibridaciones DNA-DNA (86). Las muestras de placa subgingival fueron recolectadas después de realizar las mediciones clínicas anteriormente descritas en el texto, en la misma visita.

Después de secar y aislar el área de muestreo con rollos de algodón, la placa supragingival fue eliminada con una cureta Gracey (Hu-Friedy). Las muestras de placa subgingival fueron tomadas de los sitios mesio bucales de los segundos molares inferiores temporales o bien de los primeros molares inferiores permanentes según el caso, utilizando curetas Gracey (Hu-Friedy) estériles. Las muestras fueron colocadas en tubos para microcentrifugación de 1.5 ml individuales que contenían 150 μ l de buffer TE (pH 7.6). Se agregaron 100 μ l de 0.5 M NaOH a cada tubo y las muestras fueron dispersadas con vortex

Las muestras fueron hervidas en un baño de agua durante 10 min. y el pH fue neutralizado 800 μ l de 5 M acetato de amonio. El DNA de cada muestra fue colocado en uno de los canales abierto de un Minislot-30 (Immuntics, Cambridge, MA), concentrado en una membrana de nylon de carga positiva de 15 x 15 cm (Boehringer Mannheim) y fijado a la membrana mediante entrecruzamiento bajo luz ultravioleta seguido por incubación de la membrana a 120°C durante 20 min. El Minislot-30 permitió la deposición de 28 muestras de placa y dos estándares microbiológicos en canales individuales en una sola membrana de nylon de 15 x 15 cm. Dos canales de estándares microbiológicos fueron colocados en cada membrana. Dichos estándares consistieron de mezclas ajustadas a 10^5 y 10^6 células de cultivos puros de las dos cepas bacterianas que fueron analizadas con las sondas de DNA.

4. HIBRIDACIONES DNA-DNA

Las membranas fueron colocadas a 42°C durante 1 hora en solución de prehibridación que contenía 50% de formamida, 5 x citrato salino estándar (SSC) (1 x SSC = 150 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio, pH 7.0), 1 % caseína, 5 x solución Denhardt, 25 mM fosfato de sodio (pH 6.5) y 0.5 mg/ml de RNA de levadura (Boehringer Mannheim).

La membrana con DNA fue colocada en un Miniblotter-45 (Immunetics) con los canales de las muestras rotados 90° en relación a los carriles de este segundo aparato. Esto produjo un patrón de tablero de ajedrez (checkerboard) de 30 x 45. Las sondas para los serotipos a y b de *A. actinomycetemcomitans* fueron mezcladas para obtener una sola sonda capaz de detectar a ambos serotipos del microorganismo. Dicha sonda de DNA fue diluida a una concentración de aproximadamente 20 ng/ml en solución de hibridación (45% formamida, 5 x SSC, 1 x solución Denhardt, 20 mM fosfato de sodio (pH 6.5), 0.2 mg/ml de RNA de levadura, 10 % sulfato de dextrano y 1% caseína), colocada en uno de los carriles individuales del Miniblotter-45 e hibridizada toda una noche a 42°C con el aparato sellado dentro de una bolsa de plástico para evitar evaporación de las sondas de DNA. Esta concentración fue ajustada previamente para lograr que todas la sonda detectara un rango de células entre 10^4 y 10^7 . Las membranas fueron lavadas dos veces a alta astringencia durante 20 min, cada vez a 68°C en buffer de fosfato (0.1 x SSC, 0.1% SDS) utilizando un baño con circulación tipo Disk Whisk (Schleicher and Schuell, Keene, NH).

5. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Las membranas fueron bloqueadas mediante incubación durante 1 hora en buffer bloqueador que contenía 1% de caseína en buffer de maleato (100 mM ácido maléico, 150 mM NaCl, pH 7.5). Los híbridos fueron detectados incubando las membranas en una dilución de 1:15,000 de un anticuerpo contra digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim) utilizando la modificación descrita por Engler-Blum y cols. (15) Después de ser lavadas, las membranas fueron incubadas en el agente quimioluminiscente de detección LumiPhos (Lumigen, Southfield, MI) a 37°C durante 1 hora y las señales fueron detectadas mediante la exposición de las membranas a películas autoradiográficas dentro de cassettes a temperatura ambiente durante 35 min.

Las películas fueron reveladas siguiendo procedimientos estándar y las imágenes fueron capturadas con el sistema de documentación de geles DigiDoc (BioRad). Las señales fueron evaluadas utilizando el programa Quantity One (BioRad) comparando los valores de la intensidad de las señales de cada sonda en cada muestra ajustados en una curva de regresión lineal construida a partir de los valores registrados de los estándares microbiológicos a 10^5 y 10^6 . Todos los valores fueron expresados como cuentas $\times 10^5$.

E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Los datos microbiológicos fueron expresados como media \pm error estándar de la media, mediante 2 parámetros: prevalencia (% de sitios colonizados) y niveles (cuentas bacterianas $\times 10^5$) para la totalidad de la población de estudio, y para 3 grupos de edades dentro de la población (sujetos de 3 a 5 años, 6 a 8 años y 9 a 11 años).

La prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* fue calculada para cada muestra, promediada entre las muestras de cada sujeto y después entre los sujetos de cada grupo de edad de la población. Las diferencias estadísticas entre los grupos de edades fueron analizadas utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Figura 3).

Para comparar los niveles o cuentas bacterianas, los datos fueron expresados como cuentas $\times 10^5$ del microorganismo en cada muestra. Estas cuentas fueron promediadas para un mismo sujeto y después entre los sujetos de cada grupo de edades dentro de la población. Las diferencias estadísticas entre los grupos de sujetos fueron analizadas de acuerdo con el procedimiento descrito para el análisis de la prevalencia, utilizando la prueba no-paramétrica de Kruskal-Wallis (Figura 2).

Adicionalmente, las cuentas bacterianas y prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* fueron comparadas con las obtenidas para un grupo de microorganismos implicados en la etiología de las enfermedades periodontales (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella*

intermedia, *Selenomonas noxia* y *Treponema denticola*) apartir de las muestras de placa dentobacteriana subgingival de los mismos sujetos de estudio. Dichos resultados fueron comparados entre los grupos de edades utilizando la prueba de Kruskal-Wallis (Figuras 4 y 5) y entre *A. actinomycetemcomitans* y cada microorganismo mediante la prueba de Wilcoxon (Figuras 6 y 7). Un último análisis final fue efectuado para describir las proporciones de grupos de microorganismos en la población total (Figura 8).

III. RESULTADOS

A. CUENTAS BACTERIANAS (X 10⁵)

La figura 2 presenta los resultados obtenidos del total de la población de estudio (n = 42), así como de 3 grupos de edades extraídos de la población (3 a 5 años, n = 11; 6 a 8 años, n = 20, 9 a 11 años, n = 11), los cuales se expresan como media \pm EEM de cuentas bacterianas x 10⁵. Se observó una tendencia hacia el aumento en las cuentas promedio de *A. actinomycetemcomitans*, que fue proporcional al aumento en la edad de los sujetos de estudio. Sin embargo, las diferencias entre las tres poblaciones no fueron estadísticamente significativas mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Las cuentas bacterianas promedio de *A. actinomycetemcomitans* en la totalidad de la población fueron de $0.13 \pm 0.03 \times 10^5$.

La figura 4 presenta resultados comparativos de los niveles promedio de *A. actinomycetemcomitans* y 5 microorganismos considerados como importantes periodontopatógenos (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Selenomonas noxia* y *Treponema denticola*) en los 3 grupos de edades. Los resultados se expresan como cuentas bacterianas promedio x 10⁵ \pm EEM. Del conjunto de microorganismos evaluados, *A. actinomycetemcomitans* presentó las cuentas promedio más bajas en los grupos de edades de 6 a 8 ($0.16 \pm 0.05 \times 10^5$) y de 9 a 11 años

($0.13 \pm 0.06 \times 10^5$). Las cuentas bacterianas promedio de *T. denticola* y *B. forsythus* en el grupo de 3 a 5 años fueron las más elevadas de los microorganismos evaluados ($0.76 \pm 0.20 \times 10^5$ y $0.39 \pm 0.05 \times 10^5$, respectivamente). Las cuentas bacterianas de cada uno de los 6 microorganismos evaluados fueron comparadas entre los 3 grupos de edades utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las especies.

La figura 6 presenta las cuentas promedio $\times 10^5$ de las 6 especies anteriormente descritas para cada grupo de edades de la población. Dentro de un mismo grupo de edad, las cuentas promedio de cada microorganismo fueron comparadas con las cuentas de *A. actinomycetemcomitans* mediante la prueba de Wilcoxon. Con excepción de las cuentas promedio de *Prevotella intermedia* en el grupo de 3 a 5 años, ninguna de las especies evaluadas presentaron cuentas promedio menores a las observadas para *A. actinomycetemcomitans*. En el grupo de 3 a 5 años, las cuentas promedio de *Treponema denticola* fueron significativamente más elevadas que las cuentas de *A. actinomycetemcomitans* ($p < 0.05$). En los tres grupos de edades las cuentas promedio de *Bacteroides forsythus* fueron significativamente más elevadas que las cuentas de *A. actinomycetemcomitans* (3 a 5 años, $p < 0.01$; 6 a 8 años, $p < 0.001$; 9 a 11 años, $p < 0.01$). En el grupo de 6 a 8 años, las cuentas promedio de *Selenomonas noxia* y *Porphyromonas gingivalis* fueron también

significativamente mayores que las de *A. actinomycetemcomitans* ($p < 0.01$). Así mismo, *Selenomonas noxia* presentó cuentas significativamente mayores que *A. actinomycetemcomitans* en el grupo de 9 a 11 años ($p < 0.05$)

B. PREVALENCIA

La figura 3 presenta las medias de prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* obtenidas del total de la población de estudio ($n = 42$), así como de 3 grupos de edades extraídos de la población (3 a 5 años, $n = 11$; 6 a 8 años, $n = 20$; 9 a 11 años, $n = 11$). Los resultados se expresan como media \pm EEM del porcentaje de sitios colonizados. El total de la población presentó en promedio *A. actinomycetemcomitans* en el 36.9% de los sitios. A pesar de que los datos en los diferentes grupos de edades sugieren una tendencia hacia el aumento en la prevalencia del microorganismo con el aumento de la edad, estos resultados no fueron estadísticamente significativos

La prevalencia promedio de 5 periodontopatógenos (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Selenomonas noxia* y *Treponema denticola*) y de *A. actinomycetemcomitans*, en los 3 grupos de edades se presenta en la figura 5. Una observación notable fue la presencia de *B. forsythus* en el 100% de los sitios, independientemente de la edad. En comparación con otros microorganismos periodontopatógenos *A. actinomycetemcomitans*, presentó una prevalencia similar a la de *P. gingivalis* y mayor únicamente a la observada para *Prevotella intermedia*.

Mediante la prueba de Kruskal-Wallis se determinó que la diferencia en la prevalencia de los 6 microorganismos evaluados para cada grupo de edad no fue estadísticamente significativa.

La figura 7 presenta la prevalencia promedio de las 6 especies anteriormente descritas para cada grupo de edades de la población. Dentro de un mismo grupo de edad, la prevalencia promedio de cada microorganismo fue comparada con la prevalencia de *A. actinomycetemcomitans* mediante la prueba de Wilcoxon. De los 6 microorganismos evaluados, *P. intermedia* presentó la prevalencia más baja en los 3 grupos de edad, la cual fue significativamente menor que la de *A. actinomycetemcomitans* en los grupos de 6 a 8 años ($p < 0.01$) y de 9 a 11 años ($p < 0.05$). En los 3 grupos de edades la prevalencia de *B. forsythus* fue significativamente mayor que la de *A. actinomycetemcomitans* ($p < 0.01$). En el grupo de 3 a 5 años, la prevalencia de *T. denticola* fue mayor a la de *A. actinomycetemcomitans* ($p < 0.05$). Así mismo en el grupo de 9 a 11 años la prevalencia de *S. noxia* fue también mayor ($p < 0.05$).

C. PROPORCIÓN

La figura 8 muestra las proporciones promedio de 40 especies bacterianas, incluyendo a *A. actinomycetemcomitans*, agrupadas como especies periodonto-benéficas, patógenas putativas, periodonto-patógenas y no clasificadas, de acuerdo a su papel en la patología de las enfermedades

periodontales. Los datos incluyen las proporciones promedio de microorganismos en el total de la población de estudio.

El grupo de especies periodonto-benéficas representaron la proporción más elevada (59.46%) de especies en la placa dentobacteriana subgingival mientras que el grupo de especies periodonto-patógenas representó la proporción más baja (1.81%). *A. actinomycetemcomitans* representó únicamente el 0.1% del total de microorganismos detectados por las sondas de DNA en las muestras de placa dentobacteriana evaluadas.

IV. CONCLUSIONES

En el presente estudio, se evaluaron los niveles, prevalencia y proporciones de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en una población infantil mexicana periodontalmente sana. Los resultados fueron comparados entre poblaciones de diferentes edades y con los resultados obtenidos para otras especies implicadas también en la patogenia de las enfermedades periodontales.

La prevalencia de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en la población infantil mexicana fue de aproximadamente el 40% de los sitios, con la menor prevalencia observada en poblaciones de 3 a 5 años. Sin embargo, el microorganismo fue detectado en niños de todas las edades, lo cual sugiere que la colonización de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en la placa dentobacteriana de nuestra población ocurre en etapas tempranas de la vida y que la prevalencia en la población infantil mexicana es similar a la que ha sido reportada para adultos en poblaciones distintas a la nuestra.

Un hallazgo interesante fue la detección de todas las especies periodontopatógenas evaluadas en la población infantil. Las proporciones de dichas especies en la placa dentobacteriana fueron bajas, lo cual coincide con los resultados de otras investigaciones realizadas en niños y adultos periodontalmente sanos. Sin embargo, la prevalencia de especies tales como *Bacteroides forsythus* y *Treponema denticola*, excede significativamente la

prevalencia que ha sido reportada para estos microorganismos en otras poblaciones.

En conclusión, los resultados de la presente investigación sugieren que la temprana adquisición y alta prevalencia de especies periodontopatógenas en la población infantil mexicana podrían ser, por lo menos en parte, las causas de la elevada prevalencia observada de enfermedades periodontales severas en la población mexicana adulta.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amano A, Fujiwara T, Nagata H et al. Prophyromonas gingivalis fimbriae mediate coaggregation with Streptococcus oralis through specific domains. *J Dent Res* 1997; 76 (4): 852-7.
2. Amdur BH, Szabo EI, Socransky SS. Fatty acids of Gram-positive bacterial rods from human dental plaque. *Arch Oral Biol* 1978; 23 (1): 23-9.
3. Axelsson P, Paulander J, Lindhe J. Relationship between smoking and dental status in 35-, 50-, 65-, and 75- year-old individuals. *J Clin Periodontol* 1998; 25 (4): 297-305.
4. Beck JD, Koch GG, Zambon JJ, Genco RJ, Tudor GE. Evaluation of oral bacteria as risk indicators for periodontitis in older adults. *J Periodontol* 1992; 63 (2): 93-9.
5. Berthold P, Listgarten MA. Distribution of Actinobacillus actinomycetemcomitans in localized juvenile periodontitis plaque: an electron immunocytochemical study. *J Periodontal Res* 1986; 21 (5): 473-85.
6. Ciardi JE, McCray GF, Kolenbrander PE, Lau A. Cell-to-cell interaction of Streptococcus sanguis and Propionibacterium acnes on saliva-coated hydroxyapatite. *Infect Immun* 1987; 55 (6): 1441-6.
7. Cisar JO, Kolenbrander PE, McIntire FC. Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of Actinomyces viscosus or Actinomyces naeslundii. *Infect Immun* 1979; 24 (3): 742-52.

8. Consensus-Report. Periodontal diseases: Pathogenesis and microbial factors. World Workshop in Periodontics. *Annals of Periodontol* 1996; 1 : 926-932.
9. Costerton JW. Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 1995; 15 (3): 137-40.
10. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49 : 711-45.
11. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 1994; 176 (8). 2137-42.
12. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000* 1994; 14 : 12-32.
13. Delaney JE, Ratzan SK, Kornman KS. Subgingival microbiota associated with puberty: studies of pre-, circum-, and postpubertal human females. *Pediatr Dent* 1986; 8 (4): 268-75.
14. DiRienzo JM, Slots J. Genetic approach to the study of epidemiology and pathogenesis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. *Arch Oral Biol* 1990; 35 (Suppl): 79S-84S.
15. Engler-Blum G, Meier M, Frank J, Muller GA. Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables

higher sensitivity than 32P-based hybridizations. *Anal Biochem* 1993; 210 (2): 235-44.

16. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983; 132 (1): 6-13

17. Frisken KW, Higgins T, Palmer JM. The incidence of periodontopathic microorganisms in young children. *Oral Microbiol Immunol* 1990; 5 (1). 43-5.

18. Genco RJ. Assessment of risk of periodontal disease. *Compendium* 1994; Suppl (18): S678-83; quiz S714-7.

19. Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol* 1996; 67 (10 Suppl): 1041-9.

20. Genco RJ, Zambon JJ, Murray PA. Serum and gingival fluid antibodies as adjuncts in the diagnosis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontal disease. *J Periodontol* 1985; 56 (11 Suppl): 41-50.

21. Gibbons RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res* 1989; 68 (5): 750-60.

22. Gibbons RJ. Role of adhesion in microbial colonization of host tissues: a contribution of oral microbiology. *J Dent Res* 1996; 75 (3): 866-70.

23. Gibbons RJ, Hay DI. Adsorbed salivary acidic proline-rich proteins contribute to the adhesion of *Streptococcus mutans* JBP to apatitic surfaces. *J Dent Res* 1989; 68 (9): 1303-7.

24. Gibbons RJ, Hay DI, Childs WCd, Davis G. Role of cryptic receptors (cryptitopes) in bacterial adhesion to oral surfaces. *Arch Oral Biol* 1990; 35 (Suppl): 107S-114S.
25. Gibbons RJ, Hay DI, Cisar JO, Clark WB. Adsorbed salivary proline-rich protein 1 and statherin: receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces. *Infect Immun* 1988; 56 (11): 2990-3.
26. Grossi SG, Skrepcinski FB, DeCaro T, Zambon JJ, Cummins D, Genco RJ. Response to periodontal therapy in diabetics and smokers. *J Periodontol* 1996; 67 (10 Suppl) 1094-102.
27. Gustke CJ. A review of localized juvenile periodontitis (LJP): Part I. Clinical features, epidemiology, etiology, and pathogenesis. *Gen Dent* 1998; 46 (5): 491-7.
28. Haber J. Smoking is a major risk factor for periodontitis. *Curr Opin Periodontol* 1994; : 12-8.
29. Haffajee A, Socransky S, Feres M, Ximenez-Fyvie L. Plaque microbiology in health and disease. In: Newman HN & Wilson M, ed. *Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease*. Eastman Dental Institute, University College London 1999; : 255-282.
30. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994; 5 : 78-111.

31. Haffajee AD, Socransky SS, Goodson JM. Comparison of different data analyses for detecting changes in attachment level. *J Clin Periodontol* 1983; 10 (3): 298-310.
32. Hassell TM, Harris EL. Genetic influences in caries and periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6 (4): 319-42.
33. Holtta P, Alaluusua S, Saarela M, Asikainen S. Isolation frequency and serotype distribution of mutans streptococci and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and clinical periodontal status in Finnish and Vietnamese children. *Scand J Dent Res* 1994; 102 (2): 113-9.
34. Hughes CV, Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LV. Coaggregation properties of human oral *Veillonella* spp : relationship to colonization site and oral ecology. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54 (8): 1957-63.
35. Keistrup J. The incidence of *bacteroides melanogenicus* in human gingival sulci, and its prevalence in the oral cavity at different ages. *Periodontics* 1966; 4 (1): 14-8.
36. Kolenbrander PE. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. *Annu Rev Microbiol* 1988; 42 : 627-56.
37. Kolenbrander PE. Coaggregation of human oral bacteria: potential role in the accretion of dental plaque. *J Appl Bacteriol* 1993; 74 (Suppl): 79S-86S.

38. Kolenbrander PE. Coaggregations among oral bacteria *Methods Enzymol* 1995; 253 : 385-97.
39. Kolenbrander PE. ORAL MICROBIAL COMMUNITIES: Biofilms, Interactions, and Genetic Systems. *Annu Rev Microbiol* 2000, 54 : 413-437.
40. Kolenbrander PE, Andersen RN, Holdeman LV. Coaggregation of oral Bacteroides species with other bacteria. central role in coaggregation bridges and competitions. *Infect Immun* 1985; 48 (3): 741-6.
41. Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LV. Intrageneric coaggregation among strains of human oral bacteria: potential role in primary colonization of the tooth surface. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56 (12): 3890-4.
42. Kolenbrander PE, Ganeshkumar N, Cassels FJ, Hughes CV. Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. *Faseb J* 1993; 7 (5): 406-13.
43. Kolenbrander PE, J. L. Ecological significance of coaggregation among oral bacteria. *Adv. Microb. Ecol* 1992; 12 : 183-217.
44. Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow. oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 1993; 175 (11). 3247-52.
45. Kononen E, Asikainen S, Jousimies-Somer H. The early colonization of gram-negative anaerobic bacteria in edentulous infants. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7 (1) 28-31.

46. Kononen E, Asikainen S, Saarela M, Karjalainen J, Jousimies-Somer H. The oral gram-negative anaerobic microflora in young children: longitudinal changes from edentulous to dentate mouth. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9 (3): 136-41.
47. Kornman KS, di Giovine FS. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol* 1998; 3 (1): 327-38.
48. Lamell CW, Griffen AL, McClellan DL, Leys EJ. Acquisition and colonization stability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in children. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (3): 1196-9.
49. Listgarten MA. Pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol* 1986; 13 (5): 418-30.
50. Listgarten MA. The role of dental plaque in gingivitis and periodontitis. *J Clin Periodontol* 1988; 15 (8): 485-7.
51. Mandell RL, Socransky SS. A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1981; 52 (10): 593-8.
52. Mandell RL, Tripodi LS, Savitt E, Goodson JM, Socransky SS. The effect of treatment on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1986; 57 (2): 94-9.

53. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 1995; 15 (3): 169-75.
54. Michalowicz BS. Genetic risk factors for the periodontal diseases. *Compendium* 1994; 15 (8): 1036, 1038, 1040 passim.
55. Moore LV, Moore WE, Cato EP et al. Bacteriology of human gingivitis. *J Dent Res* 1987; 66 (5): 989-95.
56. Moore WE, Holdeman LV, Cato EP et al. Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infect Immun* 1985; 48 (2): 507-19.
57. Moore WE, Holdeman LV, Smibert RM et al. Bacteriology of experimental gingivitis in children. *Infect Immun* 1984; 46 (1): 1-6
58. Neiders ME, Chen PB, Suido H et al. Heterogeneity of virulence among strains of *Bacteroides gingivalis*. *J Periodontol Res* 1989; 24 (3): 192-8.
59. Newman HN. Plaque and chronic inflammatory periodontal disease. A question of ecology. *J Clin Periodontol* 1990; 17 (8): 533-41.
60. Newman MG. Anaerobic oral and dental infection. *Rev Infect Dis* 1984; 6 Suppl 1 : S107-14.
61. Newman MG. Current concepts of the pathogenesis of periodontal disease. Microbiology emphasis. *J Periodontol* 1985; 56 (12): 734-9.

62. Newman MG, Marinho VC. Assessing bacterial risk factors for periodontitis and peri-implantitis: using evidence to enhance outcomes. *Compendium* 1994; 15 (8): 958, 960, 962 passim; quiz 972.
63. Novak MJ, Novak KF. Early-onset periodontitis. *Curr Opin Periodontol* 1996; 3 : 45-58.
64. Olsen I, Shah HN, Gharbia SE. Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol 2000* 1999; 20 : 14-52.
65. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 1991; 26 (3 Pt 2): 230-42.
66. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000* 1997; 14 : 216-48.
67. Page RC, Sims TJ, Engel LD et al. The immunodominant outer membrane antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is located in the serotype-specific high-molecular-mass carbohydrate moiety of lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1991; 59 (10): 3451-62.
68. Perry MB, MacLean LL, Gmur R, Wilson ME. Characterization of the O-polysaccharide structure of lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b. *Infect Immun* 1996; 64 (4): 1215-9.

69. Persson GR, DeRouen TA, Page RC. Relationship between gingival crevicular fluid levels of aspartate aminotransferase and active tissue destruction in treated chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res* 1990; 25 (2): 81-7.
70. Savitt ED, Socransky SS. Distribution of certain subgingival microbial species in selected periodontal conditions. *J Periodontal Res* 1984; 19 (2): 111-23.
71. Sims TJ, Moncla BJ, Page RC. Serum antibody response to antigens of oral gram-negative bacteria by cats with plasma cell gingivitis-pharyngitis. *J Dent Res* 1990; 69 (3): 877-82.
72. Slots J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 1982; 15 (4): 606-9.
73. Slots J. Microbiology in periodontics. *Tandlaegebladet* 1986; 90 (18): 794-8.
74. Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1995; 20 Suppl 2 : S304-7.
75. Slots J, Bragd L, Wikstrom M, Dahlen G. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and

Bacteroides intermedius in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol* 1986; 13 (6): 570-7.

76. Slots J, Feik D, Rams TE. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides intermedius* in human periodontitis: age relationship and mutual association. *J Clin Periodontol* 1990; 17 (9): 659-62.

77. Smith GL, Socransky SS, Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 1989; 4 (1): 47-51.

78. Socransky SS. Microbial agents and production of oral diseases. *J Dent Res* 1968; 47 (6): 923-4.

79. Socransky SS. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J Dent Res* 1970; 49 (2): 203-22

80. Socransky SS. Microbiology of periodontal disease -- present status and future considerations. *J Periodontol* 1977; 48 (9): 497-504.

81. Socransky SS. Microbiology of plaque. *Compend Contin Educ Dent* 1984; Suppl (5): S53-6.

82. Socransky SS, Haffajee AD. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *J Periodontal Res* 1991; 26 (3 Pt 2): 195-212.

83. Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000* 1994; 5 : 7-25.

84. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25 (2): 134-44.
85. Socransky SS, Haffajee AD, Ximenez-Fyvie LA, Feres M, Mager D Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. *Periodontol 2000* 1999; 20 : 341-62.
86. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 1994; 17 (4): 788-92.
87. Taichman NS, Simpson DL, Sakurada S, Cranfield M, DiRienzo J, Slots J. Comparative studies on the biology of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin in primates. *Oral Microbiol Immunol* 1987; 2 (3): 97-104.
88. Tanner A. Microbial etiology of periodontal diseases. Where are we? Where are we going? *Curr Opin Dent* 1992; 2 : 12-24.
89. Tanner A, Kent R, Maiden MF, Taubman MA. Clinical, microbiological and immunological profile of healthy, gingivitis and putative active periodontal subjects. *J Periodontal Res* 1996; 31 (3): 195-204.
90. Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL, Jr. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998; 25 (2): 85-98.

91. Tanner A, Stillman N. Oral and dental infections with anaerobic bacteria: clinical features, predominant pathogens, and treatment. *Clin Infect Dis* 1993; 16 Suppl 4 : S304-9.
92. Tanner AC, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol* 1979; 6 (5): 278-307.
93. Taylor GW, Burt BA, Becker MP et al. Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1996; 67 (10 Suppl): 1085-93.
94. Vandestein GE, Williams BL, Ebersole JL, Altman LC, Page RC. Clinical, microbiological and immunological studies of a family with a high prevalence of early-onset periodontitis. *J Periodontol* 1984; 55 (3): 159-69.
95. Wojcicki CJ, Harper DS, Robinson PJ. Differences in periodontal disease-associated microorganisms of subgingival plaque in prepubertal, pubertal and postpubertal children. *J Periodontol* 1987; 58 (4): 219-23.
96. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis [In Process Citation]. *J Clin Periodontol* 2000; 27 (9): 648-57.
97. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis [In Process Citation]. *J Clin Periodontol* 2000; 27 (10). 722-32

98. Zambon JJ, Christersson LA, Slots J. Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *J Periodontol* 1983; 54 (12): 707-11.
99. Zambon JJ, DeLuca C, Slots J, Genco RJ. Studies of leukotoxin from Actinobacillus actinomycetemcomitans using the promyelocytic HL-60 cell line. *Infect Immun* 1983; 40 (1): 205-12.
100. Zambon JJ, Grossi SG, Machtei EE, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J Periodontol* 1996; 67 (10 Suppl): 1050-4.
101. Zambon JJ, Reynolds HS, Slots J. Black-pigmented Bacteroides spp. in the human oral cavity. *Infect Immun* 1981; 32 (1): 198-203.

VI. ANEXO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR

Investigador Responsable: Dra. Laurie Ann Ximénez Fyvie

Número de Teléfono: 56-22-55-65 (Laboratorio)

FORMA DE CONSENTIMIENTO

Prevalencia de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, en muestras de placa subgingival de una población infantil mexicana

INVITACIÓN A PARTICIPAR: Se me ha pedido que mi hijo (a) participe en un estudio de investigación para determinar cuales son las bacterias que se encuentran en la placa dentobacteriana de niños Mexicanos

PROPÓSITO: El objeto del estudio es determinar a que edad colonizan la cavidad bucal especies de microorganismos responsables de las enfermedades periodontales. Esta información es importante para el mejor entendimiento de la enfermedad periodontal en México y el diseño de nuevas estrategias de tratamiento.

PROCEDIMIENTOS: Entiendo que para participar en el estudio mi hijo (a) debe haber nacido en la República Mexicana, debe tener entre 3 y 11 años de edad, debe encontrarse en buen estado de salud general, no debe presentar ningún padecimiento periodontal, no puede haber recibido ningún tipo de tratamiento periodontal en el pasado y no puede haber tomado ningún tipo de antibiótico en los últimos 3 meses.

Entiendo que el protocolo de investigación implica una evaluación periodontal completa y la toma de 2 muestras de placa dentobacteriana, lo cual llevará aproximadamente 30 minutos.

Entiendo que las muestras serán tomadas durante la realización de procedimientos dentales de rutina sin que esto represente la necesidad de que mi hijo (a) se someta a procedimientos o tratamientos diferentes a aquellos que se seguirían normalmente si no estuviera participando en el estudio.

Entiendo también que no incurriré en ningún gasto adicional por su participación en el estudio.

Entiendo que los análisis de laboratorio que se realizarán sobre sus muestras de placa dentobacteriana consistirán única y exclusivamente en el análisis microbiológico para detectar la presencia de diferentes especies de bacterias bucales, en especial aquellas que están implicadas en la enfermedad periodontal.

Entiendo que en el estudio participarán en total aproximadamente 168 (ciento sesenta y ocho) niños.

RIESGOS/MITIGACIONES: Entiendo que la evaluación periodontal y la toma de muestras se llevarán a cabo durante la realización de procedimientos dentales de rutina y que no se realizará ningún procedimiento adicional o distinto a aquel que el odontopediatra de mi hijo (a) realizará para el diagnóstico o tratamiento de su padecimiento, por lo que su participación en el estudio no implica ningún riesgo o efecto secundario adicional a aquellos que normalmente conllevan dichos procedimientos de rutina. Entiendo también que todos los procedimientos para la toma de muestras serán realizados por profesionales calificados y con experiencia, utilizando procedimientos de seguridad aceptados para la práctica clínica.

BENEFICIOS: Entiendo que la participación de mi hijo (a) en el estudio no le proporcionará ningún beneficio inmediato ni directo. Sin embargo, gracias a su participación en el estudio, se obtendrá información nueva y más extensa sobre las causas de la enfermedad periodontal en la población de México, lo cual podría ayudar en un futuro no sólo al mejor entendimiento de dicha enfermedad, sino también a la búsqueda y empleo de nuevos tratamientos para nuestra población.

COMPENSACIONES: Entiendo que no existe ninguna compensación o remuneración por su participación en el estudio y que tampoco incurriré en ningún gasto adicional.

CONFIDENCIALIDAD: Entiendo que toda la información que sea obtenida tanto en el historial clínico como en el análisis de las muestras de placa dentobacteriana será mantenida en estricta confidencialidad y que si cualquier publicación resultara de esta investigación, a mi hijo (a) no se le identificará jamás por su nombre.

RENUNCIA/RETIRO: Estoy de acuerdo en que la participación de mi hijo (a) en el estudio es totalmente voluntaria y que puedo decidir que no participe o que se retire del estudio en cualquier momento si así lo decido, sin que esto represente algún perjuicio para su atención dental presente ni futura. También entiendo que si el investigador responsable del estudio decidiera no incluirlo en la investigación, puede hacerlo si así lo creyera conveniente.

DERECHOS DEL SUJETO: Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas y estas se me han contestado a mi satisfacción. Entiendo que si yo deseara mayores informes acerca de la participación de mi hijo (a) en este proyecto de investigación o sobre sus derechos como sujeto de estudio, puedo contactar al investigador responsable de este proyecto llamando al número de teléfono que se encuentra en la parte superior de la primera página de esta forma.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

ACUERDO: He leído y entendido esta forma de consentimiento. Estoy de acuerdo en que mi hijo (a) participe en este estudio. Al firmar en los espacios provistos a continuación, recibiré una copia de esta forma.

Nombre del niño

Firma del padre, madre, tutor o
responsable del niño

Fecha

Nombre del clínico responsable

Firma del clínico responsable

Fecha

Dra. Laurie Ann Jiménez Fyvie

Nombre del investigador
responsable

Firma del investigador
responsable

Fecha

MUESTRAS

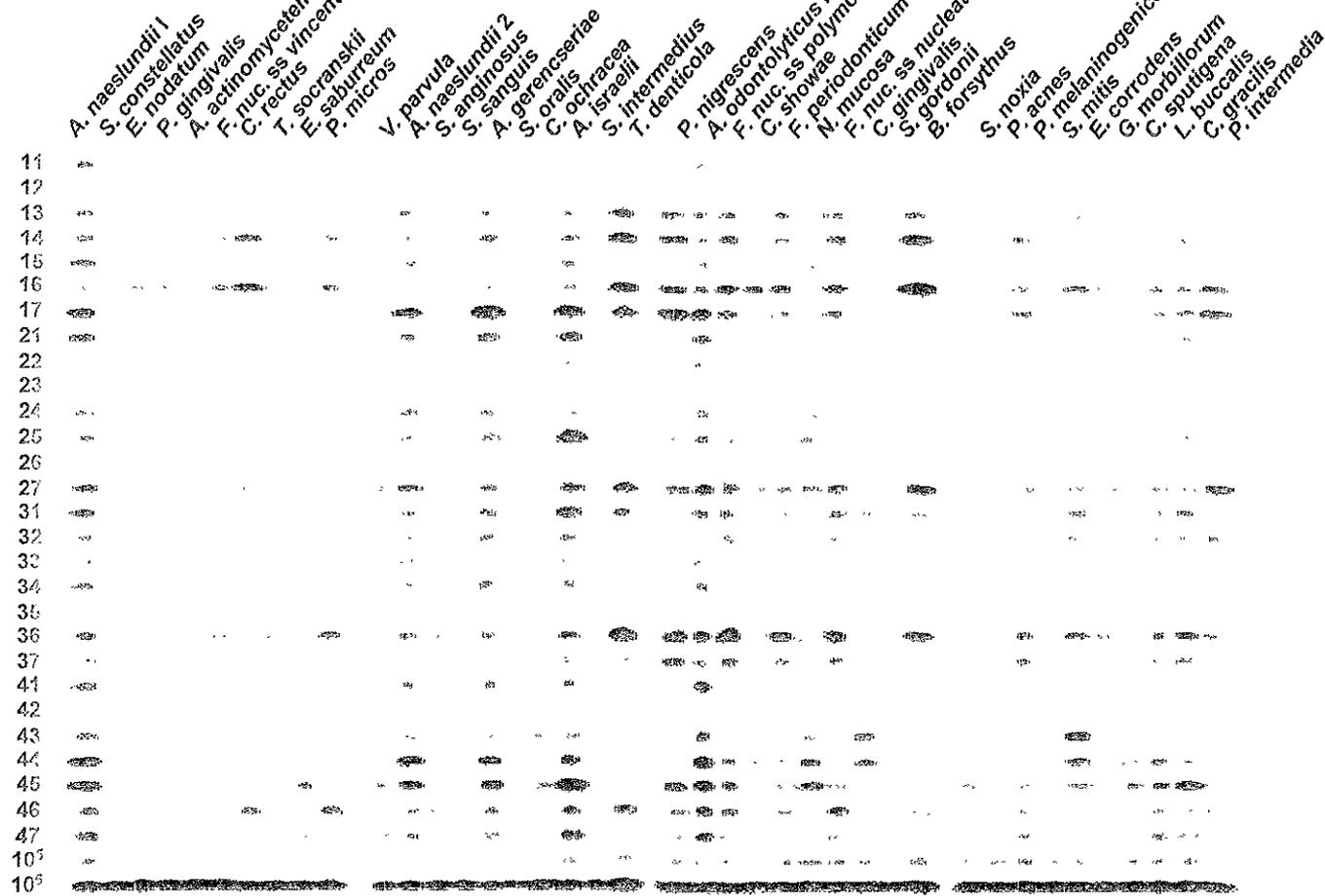
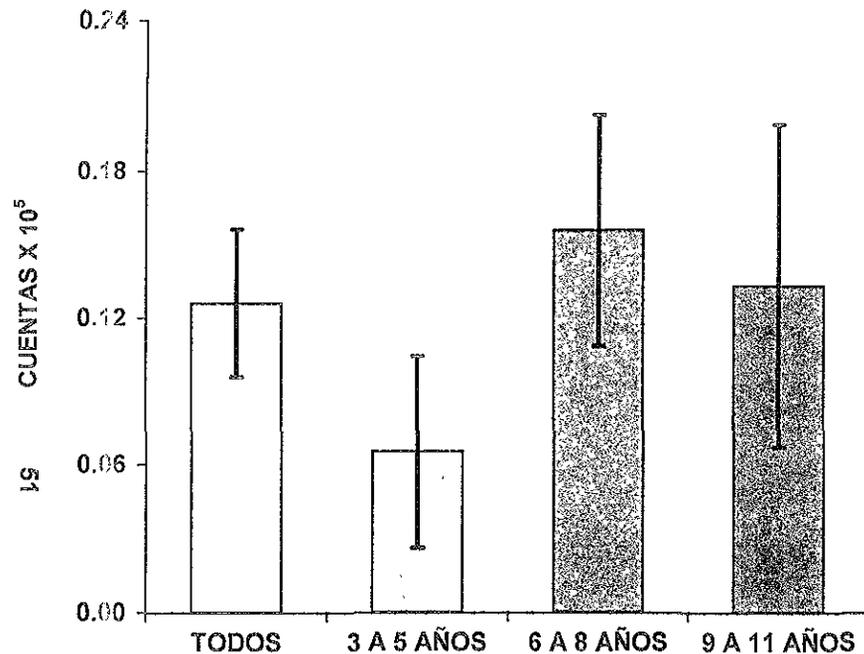


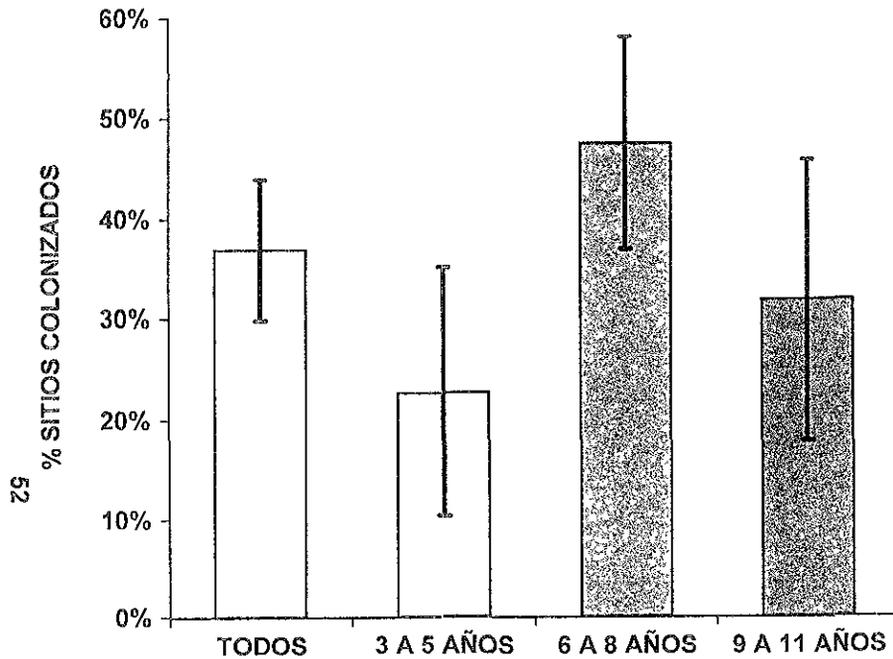
Figura 1. Imagen de membrana procesada con la técnica de "Checkerboard" para hibridaciones DNA-DNA mostrando las reacciones de 40 sondas de DNA en 28 muestras de placa dentobacteriana subgingival. Los últimos 2 carriles muestras estándares mixtos de células a 10^5 y 10^6 .



	n =	Media	EEM
TODOS	42	0.13	0.03
3 A 5 AÑOS	11	0.07	0.04
6 A 8 AÑOS	20	0.16	0.05
9 A 11 AÑOS	11	0.13	0.07

EEM - Error estándar de la media

Figura 2. Cuentas promedio x 10⁵ (\pm EEM) de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en muestras de placa subgingival de una población infantil mexicana. Las cuentas promedio fueron determinadas en cada muestra de los sujetos de estudio, promediadas para un mismo sujeto y después para la población total o grupos de edades dentro de la población.



	n =	Media	EEM
TODOS	42	36.9%	7.0%
3 A 5 AÑOS	11	22.7%	12.4%
6 A 8 AÑOS	20	47.5%	10.6%
9 A 11 AÑOS	11	31.8%	13.9%

EEM - Error estándar de la media

Figura 3. Prevalencia promedio (% de sitios colonizados) de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* en muestras de placa subgingival de una población infantil mexicana. La prevalencia fue determinada para cada sujeto de estudio y promediada para la población total o grupos de edades dentro de la población.

6 A 8 AÑOS (n = 20)	Media	0.16	0.44	0.32	0.18	0.57	0.41
	EEM	0.05	0.05	0.09	0.11	0.14	0.11
9 A 11 AÑOS (n = 11)	Media	0.13	0.51	0.29	0.22	0.50	0.31
	EEM	0.07	0.06	0.15	0.20	0.19	0.12

EEM - Error estándar de la media

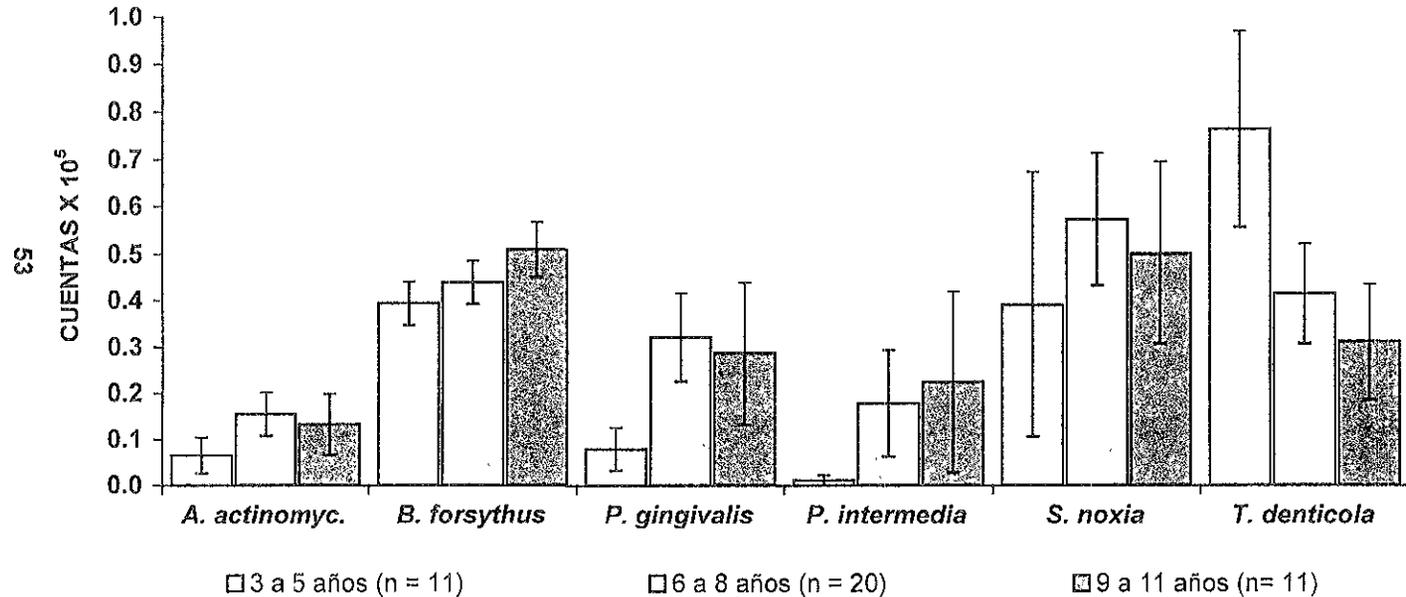


Figura 4. Cuentas promedio x 10⁵ (± EEM) de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Selenomonas noxia* y *Treponema denticola* en muestras de placa subgingival de una población infantil mexicana. Las cuentas promedio fueron determinadas en cada muestra de los sujetos de estudio, promediadas para un mismo sujeto y después para los grupos de edades dentro de la población.

		EEM	12.4%	0.0%	12.4%	4.5%	13.2%	12.2%
6 A 8 AÑOS (n = 20)	Media		47.5%	100.0%	47.5%	12.5%	67.5%	57.5%
	EEM		10.6%	0.0%	9.2%	6.2%	9.8%	10.4%
9 A 11 AÑOS (n = 11)	Media		31.8%	100.0%	36.4%	13.6%	72.7%	45.5%
	EEM		13.9%	0.0%	15.2%	7.0%	14.1%	14.2%

EEM - Error estándar de la media

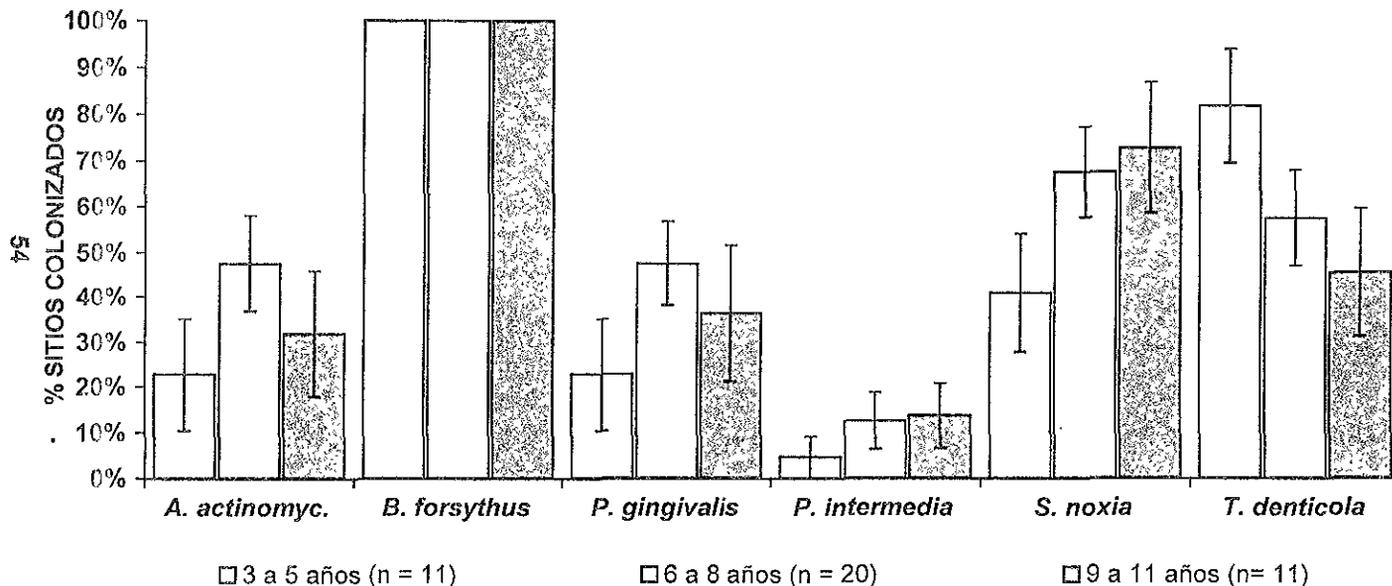


Figura 5. Prevalencia promedio (% de sitios colonizados) de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Selenomonas noxia* y *Treponema denticola* en muestras de placa subgingival de una población infantil mexicana. La prevalencia fue determinada para cada sujeto de estudio y promediada los grupos de edades dentro de la población.

	media	EEM	Wilcoxon		media	EEM	Wilcoxon		media	EEM	Wilcoxon
<i>T. denticola</i>	0.76	0.21	p < 0.05	<i>T. denticola</i>	0.41	0.11	NS	<i>T. denticola</i>	0.31	0.12	NS
<i>B. forsythus</i>	0.39	0.05	p < 0.01	<i>B. forsythus</i>	0.44	0.05	p < 0.001	<i>B. forsythus</i>	0.51	0.06	p < 0.01
<i>S. noxia</i>	0.39	0.28	NS	<i>S. noxia</i>	0.57	0.14	p < 0.01	<i>S. noxia</i>	0.50	0.19	p < 0.05
<i>P. gingivalis</i>	0.08	0.05	NS	<i>P. gingivalis</i>	0.32	0.09	p < 0.01	<i>P. gingivalis</i>	0.29	0.15	NS
<i>A. actinomyc.</i>	0.07	0.04	NA	<i>A. actinomyc.</i>	0.16	0.05	NA	<i>A. actinomyc.</i>	0.13	0.07	NA
<i>P. intermedia</i>	0.01	0.01	NS	<i>P. intermedia</i>	0.18	0.11	NS	<i>P. intermedia</i>	0.22	0.20	NS

NS - Diferencia no estadísticamente significativa. NA - No aplica EEM - Error estándar de la media

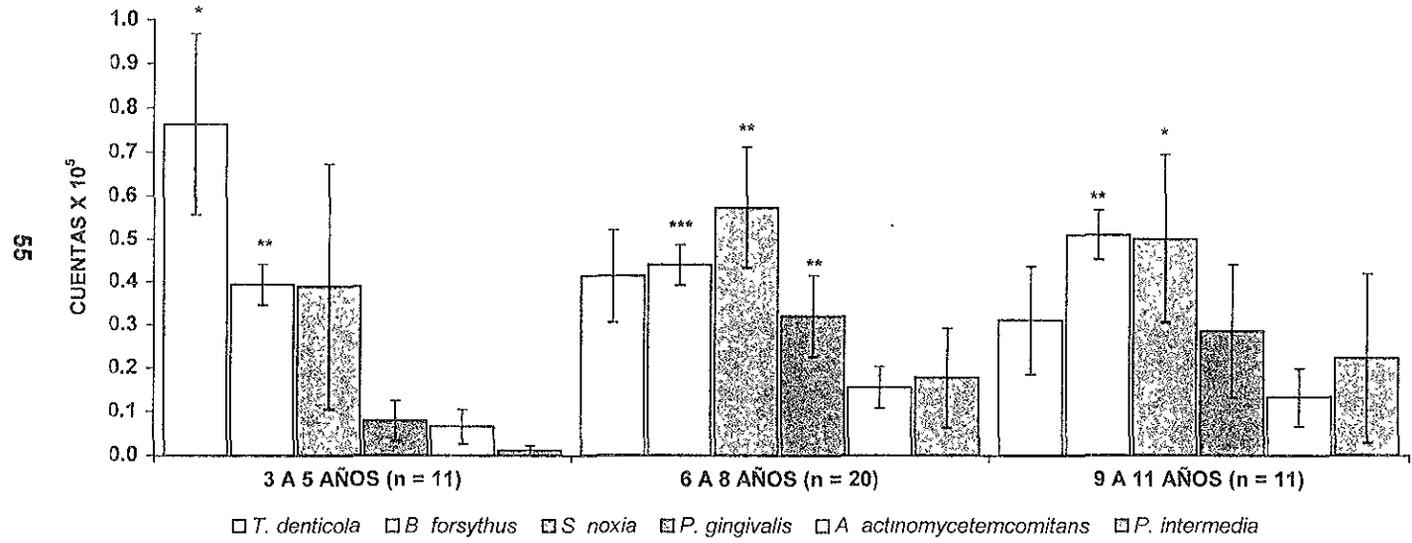


Figura 6. Cuentas promedio x 10⁵ (± EEM) de *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Selenomonas noxia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* en muestras de placa subgingival. Las cuentas promedio fueron determinadas en cada muestra de los sujetos de estudio, promediadas para un mismo sujeto y después para los grupos de edades dentro de la población. Las diferencias entre las cuentas promedio de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y cada uno de los 5 microorganismos evaluados dentro de cada población fueron determinadas utilizando la prueba de Wilcoxon. * - p < 0.05, ** - p < 0.01, *** - p < 0.001.

<i>B. forsythus</i>	100.0%	0.0%	p < 0.01	<i>B. forsythus</i>	100.0%	0.0%	p < 0.01	<i>B. forsythus</i>	100.0%	0.0%	p < 0.01
<i>T. denticola</i>	81.8%	12.2%	p < 0.05	<i>T. denticola</i>	57.5%	10.4%	NS	<i>T. denticola</i>	45.5%	14.2%	NS
<i>S. noxia</i>	40.9%	13.2%	NS	<i>S. noxia</i>	67.5%	9.8%	NS	<i>S. noxia</i>	72.7%	14.1%	p < 0.05
<i>A. actinomyc.</i>	22.7%	12.4%	NA	<i>A. actinomyc.</i>	47.5%	10.6%	NA	<i>A. actinomyc.</i>	31.8%	13.9%	NA
<i>P. gingivalis</i>	22.7%	12.4%	NS	<i>P. gingivalis</i>	47.5%	9.2%	NS	<i>P. gingivalis</i>	36.4%	15.2%	NS
<i>P. intermedia</i>	4.5%	4.5%	NS	<i>P. intermedia</i>	12.5%	6.2%	p < 0.01	<i>P. intermedia</i>	13.6%	7.0%	p < 0.05

NS - Diferencia no estadísticamente significativa. NA - No aplica EEM - Error estándar de la media

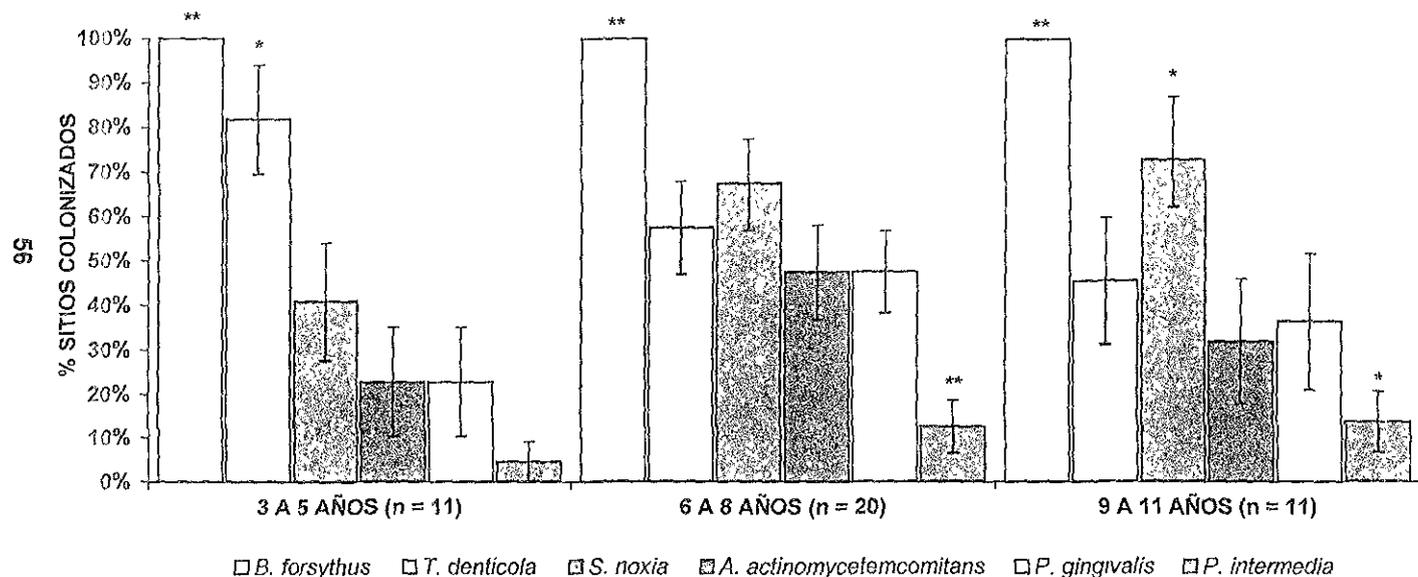


Figura 7. Prevalencia promedio (% de sitios colonizados) de *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Selenomonas noxia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* en muestras de placa subgingival. La prevalencia fue determinada para cada sujeto de estudio y promediada para cada grupo de edades dentro de la población. Las diferencias entre la prevalencia de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y cada uno de los 5 microorganismos evaluados dentro de cada población fueron determinadas utilizando la prueba de Wilcoxon. * - p < 0.05, ** - p < 0.01.

<i>A. naeslundii</i> 1	20.39	<i>C. rectus</i>	0.19	<i>P. gingivalis</i>	0.16	<i>C. matricularis</i>	0.11
<i>S. constollatus</i>	2.55	<i>F. nucleatum</i>	0.37	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0.10	<i>S. artemidis</i>	0.27
<i>V. parvula</i>	4.99	<i>P. micros</i>	3.88	<i>T. denticola</i>	0.88	<i>E. saburreum</i>	3.50
<i>A. naeslundii</i> 2	13.58	<i>S. anginosus</i>	1.48	<i>B. forsythus</i>	0.66	<i>N. mucosa</i>	1.84
<i>S. sanguinis</i>	1.12	<i>S. intermedius</i>	0.86			<i>P. acnes</i>	0.45
<i>A. georgiae</i>	2.10	<i>P. nigrescens</i>	1.28			<i>G. morbillorum</i>	4.16
<i>S. oralis</i>	0.57	<i>C. showae</i>	0.92			<i>L. buccalis</i>	7.93
<i>C. ochracea</i>	0.81	<i>P. endodontalis</i>	1.00				
<i>A. israelii</i>	11.27	<i>F. periodonticum</i>	0.60				
<i>A. odontolyticus</i>	1.12	<i>C. gracilis</i>	0.02				
<i>C. gingivalis</i>	0.77	<i>P. intermedia</i>	0.10				
<i>S. gordonii</i>	0.10	<i>S. noxia</i>	0.52				
<i>S. mitis</i>	0.05	<i>F. sulci</i>	0.90				
<i>C. sputigena</i>	0.05	<i>P. melaninogenica</i>	0.75				
		<i>E. corrodens</i>	1.26				
TOTAL	59.46	TOTAL	14.13	TOTAL	1.81	TOTAL	24.60

57

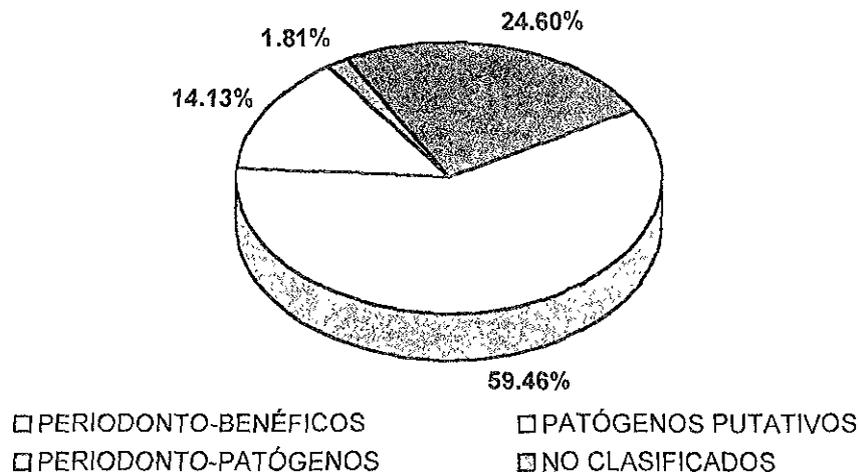


Figura 8. Proporción promedio de grupos de microorganismos en muestras de placa dentobacteriana subgingival de una población infantil mexicana periodontalmente sana (n = 42). Los valores se expresan como porcentajes promedio.

A. naeslundii 2
(*A. viscosus*)

V. parvula
A. odontolyticus

S. mitis
S. oralis
S. sanguinis

C. gracilis

C. rectus

Streptococcus sp.
S. gordonii
S. intermedius

S. constellatus

E. nodatum

P. gingivalis
B. forsythius
T. denticola

58

E. corrodens
C. gingivalls
C. sputigena
C. ochracea
C. concisus
(*A. A.*)

C. showae

S. noxia

A. actinomycetemcomitans b

Figura 9. Complejos bacterianos en la placa subgingival. Los datos en esta figura resumen las asociaciones entre especies bacterianas en muestras de placa dentobacteriana subgingival. Adaptado de Socransky y cols. 1998 (84).