



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

PORCENTAJE DE RESISTENCIA A LA ERITROMICINA Y
DESCRIPCIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA PLACA
DENTOBACTERIANA SUBGINGIVAL EN SUJETOS
MEXICANOS CON PERIODONTITIS CRÓNICA

T E S I S
Q U E P R E S E N T A
MARCO ANTONIO SÁNCHEZ REYES
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA

Vo. Bo.
[Firma manuscrita]

TUTOR
DRA. LAURIE ANN XIMÉNEZ FYVIE



MÉXICO, D.F.

2005

M 346504

CRÉDITOS

La presente investigación se pudo llevar a cabo gracias a la infraestructura y apoyo económico del Laboratorio de Genética Molecular del Área de Laboratorios de Investigación de la Facultad de Odontología (LIFO).

Gracias también al apoyo del Área de Periodoncia del Posgrado de la Facultad de Odontología, por facilitar sus instalaciones y la captura acertada de los pacientes con las condiciones idóneas para ésta investigación.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Marco Antonio
Sánchez Reyes

FECHA: 7/7/05

FIRMA: Sánchez Reyes

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a mis padres la C.D. Patricia Reyes Martínez y el C.M.F. Alberto Sánchez Galeana por el amor, confianza y apoyo que me han dado, y por ser tan pacientes conmigo. Muchas gracias.

A mis abuelas Leopoldina Martínez y Edelmira Galeana † que con su apoyo y cariño me han dado recuerdos muy agradables. Sra. Edelmira Galeana del Río descanse en paz y gracias por todo gran señora.

Dra. Laurie Ann Ximénez Fyvie gracias por haber dirigido esta tesis con tanta dedicación y paciencia. Se la dedico con mucho cariño. Gracias por todo lo que ha hecho por mí, es usted un ángel.

A la Dra. Guadalupe Marín y al Dr. Francisco Salcido gracias por sus oportunas observaciones, los buenos comentarios y el tiempo que dedicaron a la revisión de mi tesis.

A todos los miembros del laboratorio de Genética Molecular que me ayudaron en la realización de este trabajo. A Argelia Almaguer a quien deseo mucha suerte en su camino hacia el doctorado. A Yunuen Moreno, Araceli Salgado y Octavio Sánchez por apoyarme en los momentos en que mi horario de clases no me permitía estar en el laboratorio. Al señor Maruri, laboratorista muy dedicado y a la Dra. Velia Jacobo por su supervisión en la toma de las muestras de placa dentobacteriana.

Quiero agradecer a todas esas personas que no tuvieron nada que ver en la realización de este trabajo, pero que son especiales para mí por ser mis amigos: Alejandra Osidach “La güera”, Hiram Hernández “Pared”, Frida Macedo “Frodo”, Guillermo Sánchez

“Memo”, Fabiola Salgado “Faba”, Ezequiel Vélez “El Padrino”, Aurora Valverde
“Pandita”, Emilio “Stoppen” y Rafita “Larry”.

A mi familia, pilar fundamental para alcanzar el éxito y la felicidad.

CONTENIDO

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	
A. Antecedentes bibliográficos	2
Enfermedad periodontal	2
Composición microbiológica de la placa dentobacteriana	4
Antibióticos sistémicos en la terapia periodontal	7
Mecanismos de acción y resistencia bacteriana a la eritromicina	8
B. Objetivos	11
C. Planteamiento y justificación del problema	11
D. Hipótesis	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
A. Diseño experimental	14
B. Población de estudio	14
Criterios de selección	14
Captura de sujetos de estudio	15
C. Evaluación clínica	15
D. Evaluaciones microbiológicas	16
Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de cepas de referencia control	16
Determinación del porcentaje de la flora total cultivable subgingival resistente a la eritromicina	17
Determinación de la composición microbiológica de la placa subgingival	18
1. Recolección y procesamiento de muestras	18
2. Especies bacterianas y condiciones de cultivo	19
3. Purificación de DNA bacteriano y preparación de sondas de DNA	19
4. Hibridaciones DNA-DNA	20
5. Enumeración de especies bacterianas	21
E. Análisis estadístico de datos	21
IV. RESULTADOS	
A. Concentraciones mínimas inhibitorias de cepas de referencia control	23
B. Porcentaje de la microbiota total cultivable resistente a la eritromicina en muestras de placa dentobacteriana subgingival	24
C. Composición microbiológica de la placa dentobacteriana subgingival	25
V. DISCUSIÓN	27
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
VII. TABLAS	38
VIII. FIGURAS	44
IX. ANEXOS	51

I. RESUMEN

Esta investigación se compone de un estudio realizado de manera transversal en donde se analizó la eficacia de la eritromicina “*in vitro*” en muestras de placa dentobacteriana subgingival de sujetos mexicanos con periodontitis crónica con una edad entre los 29 años o más, de manera que fueron evaluadas 40 cepas de referencia con la finalidad de determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de eritromicina; se tomaron 2 muestras de placa dentobacteriana subgingival recolectadas de los sitios distobucales de cualquiera de los primeros molares de cada uno de 5 sujetos de estudio para determinar el porcentaje de la flora total cultivable resistente a la eritromicina y otras 28 muestras de placa dentobacteriana subgingival recolectadas de los sitios mesiobucales de todos los dientes excluyendo los terceros molares de los mismos sujetos de estudio que fueron utilizadas para determinar su composición microbiológica mediante la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA. Los parámetros clínicos incluyen acumulación de placa, enrojecimiento gingival, profundidad de bolsa, nivel de inserción, sangrado al sondeo y supuración al sondeo. Los resultados de la presente investigación demuestran que *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Selenomonas noxia*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas endodontalis*, *Campylobacter gracilis*, *Micromonas micros* y *Fusobacterium nucleatum* fueron resistentes a la eritromicina a concentraciones mayores a 4 µg/ml. *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythensis* presentaron niveles, prevalencia y proporción elevados.

II. INTRODUCCIÓN

A. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

ENFERMEDAD PERIODONTAL

Desde el nacimiento hasta la muerte, la cavidad oral está colonizada por bacterias que se adhieren a sus diferentes superficies como encías, carrillos y dientes por encima y por debajo del margen gingival (Socransky & Haffajee, 1994). La enfermedad periodontal se define como el conjunto de alteraciones morfológico-estructurales y funcionales de los tejidos de soporte del diente, causadas por procesos patológicos de carácter infeccioso (Segatore, 1984).

Al hablar de enfermedad periodontal, es necesario considerar los dos cuadros patológicos que la caracterizan: gingivitis y periodontitis. La primera, es el resultado de la acumulación de microorganismos y sus productos en la placa dentobacteriana, ante los cuales se inicia una respuesta inflamatoria sustancial. La gingivitis puede persistir durante años sin destrucción del ligamento periodontal o evidencia de pérdida ósea. Por otra parte, en la periodontitis se observa destrucción tisular y pérdida ósea en grados variables dependiendo del progreso de la enfermedad (Kinane & Lappin, 2001; Lindhe *et al.*, 1998). Tanto la gingivitis como la periodontitis son infecciones bacterianas endógenas mixtas, es decir, más de una especie bacteriana contribuye al desarrollo de las enfermedades y dichas especies son microorganismos pertenecientes a la flora comensal (Mayrand & Grenier, 1985).

Los procesos inmunológicos en los tejidos periodontales que llevan al desarrollo de dichas enfermedades, son la respuesta a grupos específicos de microorganismos y sus productos, los cuales actúan en la mayoría de los casos por periodos relativamente prolongados (Lindhe *et al.*, 1998). Se estima que alrededor de 400 especies bacterianas diferentes son capaces de colonizar la

boca, y que un individuo puede albergar en la cavidad oral más de 150 especies diferentes en un momento determinado. Las cuentas bacterianas promedio en zonas subgingivales oscilan entre 10^3 en salud y 10^8 en bolsas periodontales profundas (Socransky & Haffajee, 1992).

El potencial patogénico de la placa dentobacteriana ha sido ampliamente estudiado y se conoce que en ella existen cantidades abundantes de productos bacterianos tóxicos como endotoxinas (Hofstad, 1974), ácidos grasos y orgánicos (van Steenberg *et al.*, 1986), leucotoxinas (McArthur *et al.*, 1981) y enzimas solubles capaces de hidrolizar algunos constituyentes de los tejidos (Courant *et al.*, 1965; Gibbons, 1996).

Cabe mencionar, que el grado de patogenicidad de la placa dentobacteriana se ve influenciado principalmente por la presencia y el aumento en número y proporción de bacterias consideradas como periodontopatógenas (Moore & Moore, 1994). Sin embargo, existen diversos factores que influyen en el curso y severidad de la enfermedad. Estos incluyen factores de virulencia bacteriana (Neiders *et al.*, 1989; Shah *et al.*, 1989), el medio ambiente local (Socransky & Haffajee, 1991), la susceptibilidad del huésped mediada por “factores modificadores” como defectos en leucocitos polimorfonucleares y polimorfismos genéticos (Kornman & di Giovine, 1998), el tabaquismo y algunas enfermedades sistémicas como hepatitis, VIH/SIDA y diabetes (Bergstrom & Eliasson, 1987; Greenspan & Greenspan, 1993; Seppala *et al.*, 1993).

Ante el reto microbiano, la enfermedad periodontal inicia con un proceso inflamatorio en donde intervienen componentes del sistema inmunológico tales como los del sistema inmunológico humoral, cuya principal función en infecciones orales es reducir la colonización bacteriana en las superficies mucosas mediante anticuerpos secretados como la inmunoglobulina A (IgA). Así mismo intervienen también, de manera importante, componentes del sistema inmunológico innato solo ó en combinación con células de los sistemas inmunológicos humoral y

celular en donde pueden estar involucrados el eje neutrófilo-anticuerpo-complemento cuya actividad bactericida y secretoria lleva a la producción de enzimas extracelulares y/o el eje linfocito-macrófago-linfocina, cuya acción desencadena una respuesta inmune donde los linfocitos T y B son los principales mediadores (**Genco et al., 1993**). El proceso de destrucción de los tejidos periodontales de soporte es el resultado de la combinación de diversos factores; por un lado, de los efectos tóxicos de los linfocitos, neutrófilos y macrófagos en los tejidos, así como de los productos tóxicos de los fagocitos tales como las colagenasas, lo cual da como resultado mecanismos de defensa incapaces de eliminar los agentes infecciosos (**Colombo et al., 1998**) y por el otro, de la acción de sustancias tóxicas bacterianas (**van Steenberghe et al., 1976**) y de mediadores liberados por las propias células del huésped, por ejemplo, los macrófagos estimulados pueden producir interleucina-1 y PGE₂, las cuales actúan de manera importante sobre la resorción ósea. (**Alexander & Damoulis, 1994**).

COMPOSICIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA PLACA DENTOBACTERIANA

En el contexto de la cavidad bucal los depósitos bacterianos se denominan placa dentobacteriana. En un mm³ de placa dentobacteriana de 1 mg de peso están presentes más de 10⁸ bacterias (**Lindhe et al., 1998**). La placa dentobacteriana es una comunidad microbiana compleja asociada a las superficies bucales conocida como biopelícula (**Wilderer & Characklis, 1989**). En síntesis, la placa dentobacteriana como depósito microbiano natural representa una verdadera biopelícula, que se compone de bacterias en una matriz constituida principalmente por polímeros bacterianos extracelulares, productos salivales y/o exudados gingivales (**Mombelli et al., 1995**).

La primera etapa en la formación de dicha biopelícula comprende adsorción de proteínas salivales en las superficies de apatita. La colonización primaria se da por bacterias facultativas predominantemente Gram positivas como *Streptococcus sanguinis* y especies de *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 altas en prolina (**Gibbons et al., 1990**). En la segunda etapa, se coagregan y multiplican cocos y bacilos tanto Gram positivos como Gram negativos. En la tercera etapa, los receptores superficiales en dichos microorganismos permiten la posterior coagregación de especies predominantemente Gram negativas, que tienen poca capacidad para adherirse directamente a la superficie dental, como son *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* y *Corynebacterium matruchotii* conocidos como colonizadores puente. La heterogeneidad de la placa dentobacteriana crece con el tiempo y maduración de la misma. Gracias a esto, un mayor número de bacterias anaerobias estrictas Gram negativas tales como *Tannerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis* y *Treponema denticola* colonizan en estadios tardíos contribuyendo a la patogenicidad de la biopelícula (**Lindhe et al., 1998; Nishihara & Koseki, 2004**).

La placa dentobacteriana que se asocia a las enfermedades periodontales se compone de un grupo relativamente definido de patógenos periodontales los cuales actúan generalmente en combinación sinérgica. Dentro de dichas especies se incluyen a *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *T. forsythensis*, *P. gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *F. nucleatum*, *Micromonas micros*, *P. intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus intermedius* y *T. denticola*, entre otras (**Haffajee & Socransky, 1994**).

En dos estudios se compararon muestras de placa subgingival tomadas de sujetos con diferentes formas de enfermedad periodontal y de sujetos periodontalmente sanos (**Moore & Moore, 1994; Ximenez-Fyvie et al., 2000**). Los resultados de dichos estudios sugirieron que había una variación en la microbiota subgingival a medida que el estado patológico periodontal progresaba de salud, a gingivitis y a periodontitis. Las especies compatibles con salud incluyeron miembros de los géneros *Actinomyces*, *Streptococcus* y *Veillonella*, mientras que especies de los

géneros *Eubacterium*, *Micromonas*, *Porphyromonas*, *Treponema* y *Tannerella* se detectaron en mayor proporción en sitios enfermos.

El advenimiento de mejores técnicas microbiológicas trajo consigo un mejor entendimiento de las asociaciones bacterianas y el establecimiento de los ahora reconocidos complejos bacterianos en la placa subgingival (**Socransky *et al.*, 1998**). Cinco complejos fueron descritos y se les asignó un color para facilitar su descripción. A continuación, se mencionan algunas de las especies bacterianas incluidas en dichos complejos:

- Complejo Rojo: *T. forsythensis*, *P. gingivalis* y *T. denticola*.
- Complejo Naranja: *F. nucleatum ss nucleatum*, *F. nucleatum ss polymorphum*, *F. nucleatum ss vincentii*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *M. micros*, *E. nodatum*, *C. rectus*, *Campylobacter showae*, *Streptococcus constellatus* y *Campylobacter gracilis*.
- Complejo Amarillo: *S. sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *S. intermedius* y *Streptococcus gordonii*.
- Complejo Verde: *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* y *A. actinomycetemcomitans* serotipo a.
- Complejo Morado: *Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus*.
- Especies no agrupadas: *A. actinomycetemcomitans* serotipo b, *Selenomonas noxia* y *Actinomyces viscosus*.

Las bacterias que forman parte de cada complejo están fuertemente asociadas entre sí, y existen asociaciones específicas de unos complejos con otros; es decir, los complejos rojo y naranja muestran una asociación significativa, mientras que los complejos morado, amarillo y

verde parecen estar más fuertemente asociados unos con otros, que con los complejos naranja y rojo (Socransky *et al.*, 1998).

ANTIBIÓTICOS SISTÉMICOS EN LA TERAPIA PERIODONTAL

Diversos estudios han indicado que el uso de antibióticos en el tratamiento periodontal mejora el resultado terapéutico. Los antibióticos han sido utilizados con éxitos en el tratamiento de periodontitis agresiva y periodontitis crónica (van Winkelhoff *et al.*, 1996). Sin embargo, su utilización en el tratamiento de las enfermedades periodontales es aún controversial, debido principalmente a las discrepancias observadas entre la efectividad de diferentes antimicrobianos para inhibir el crecimiento de patógenos periodontales en estudios *in vitro* e *in vivo*, y a la preocupación por el aumento en los índices globales de resistencia bacteriana a los antibióticos por su uso indiscriminado.

Algunos de los problemas específicos en el uso de antibióticos en la terapia periodontal son:

- El fármaco debe alcanzar una alta concentración en el sitio de la infección (surco gingival).
- Las bacterias periodontales están protegidas contra los antibióticos dentro de la biopelícula.
- La bolsa periodontal como sitio expuesto al exterior está sujeta a la recolonización después de la terapia (Lindhe *et al.*, 1998).

Estos problemas evidencian que el uso de los antibióticos como terapia única puede no ser suficiente para tratar con efectividad la enfermedad, por esa razón es importante la instrumentación mecánica que contribuye a la desorganización de la biopelícula y a la disminución en el volumen de los depósitos microbianos.

Los antibióticos que han sido estudiados para su empleo en la terapia periodontal por vía sistémica son limitados e incluyen principalmente al clorhidrato de tetraciclina, minociclina, doxiciclina, eritromicina, clindamicina, ampicilina, amoxicilina y metronidazol, entre otros (Feres *et al.*, 2001; Feres *et al.*, 1999; van Winkelhoff *et al.*, 2000).

Existen dos factores críticos que deben ser considerados en la elección de antibióticos sistémicos utilizados como tratamiento de las enfermedades periodontales. El primero es la concentración que el antibiótico alcanza en el fluido crevicular (C_{GCF}), la cual proporciona información acerca de los niveles alcanzados por el antibiótico en el hábitat ecológico ocupado por las especies periodontopatógenas. El segundo factor, es la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico, que es una determinación *in vitro* de la concentración capaz de inhibir el crecimiento de las especies bacterianas que intervienen en los procesos patológicos de destrucción del periodonto. La actividad antimicrobiana del agente es entonces definida como la relación que existe entre la C_{GCF} y la CMI (Genco, 1981).

MECANISMOS DE ACCIÓN Y RESISTENCIA BACTERIANA A LA ERITROMICINA

La eritromicina es un antibiótico que fue descubierto en 1952 por McGuire y cols., en los productos metabólicos de una cepa de *Streptomyces erytreus* obtenida de tierra recolectada en el archipiélago filipino (Goodman-Gilman *et al.*, 2000).

La eritromicina es un macrólido que contienen un anillo de lactona multilateral al cual están unidos uno o más desoxiazúcares (Figura 1). La eritromicina suele ser bacteriostática, pero tiene capacidad bactericida a concentraciones altas contra microorganismos sensibles como cocos y bacilos Gram positivos (Slots, 2002).

Los ribosomas bacterianos tienen un coeficiente de sedimentación de 70 unidades Svedberg (S) y se encuentran constituidos por las subunidades 30S y 50S a las cuales pueden

unirse antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas. El proceso de traducción en las bacterias se divide en tres fases: 1) formación de un complejo de iniciación, 2) elongación de la cadena peptídica y 3) terminación y liberación de la proteína sintetizada. El mecanismo de acción de la eritromicina consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas al ligarse en forma reversible a subunidades ribosómicas 50S de microorganismos sensibles, actuando sobre pasos específicos en el proceso de elongación de la cadena peptídica (**Goodman-Gilman et al., 2000**). Además de unirse a la subunidad 50S de los ribosomas, la eritromicina así como otros macrólidos tienen blancos específicos en la fracción 23S del rRNA y en varias proteínas ribosómicas.

Existen evidencias para suponer que la eritromicina no inhibe de manera directa la formación de enlaces peptídicos durante la elongación de la cadena peptídica, sino que bloquea la fase de translocación en la cual una molécula de peptidil-tRNA recién sintetizada se desplaza de un sitio aceptor en el ribosoma al sitio donador (**Menninger, 1985**).

La eritromicina tiene amplio rango de acción contra especies Gram positivas anaerobias facultativas y anaerobias estrictas como *C. gingivalis* y *A. viscosus*. La mayoría de las especies Gram positivas asociadas a la cavidad oral son sensibles a este fármaco. Dichas especies incluyen miembros de los géneros *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus* y muchas cepas de *Actinomyces* son también sensibles. Una gran cantidad de especies Gram negativas son resistentes a la eritromicina debido a su falta de penetración a través de la membrana externa (**Walker, 1996b**). Debido a esto, su utilización clínica ha disminuido en años recientes de manera considerable.

La eritromicina ha sido históricamente el más reconocido de los macrólidos y es ampliamente usada como una alternativa a los β -lactámicos (**Walker, 1996b**). Las concentraciones en suero y fluido crevicular después de una hora de la administración de una

dosis oral de 500 mg de eritromicina son de 0.8 a 9.6 µg /ml y 2 µg/ml, respectivamente (**Slots & Rams, 1990**).

La resistencia a la eritromicina puede ocurrir en ciertas cepas de *Streptococcus* y *Staphylococcus* debido a que éstas adquieren plásmidos que alteran el sitio de unión del agente en la subunidad 50S del ribosoma ó secretan enzimas que inactivan a la eritromicina (**Walker, 1996a**).

Los diferentes mecanismos de resistencia a la eritromicina incluyen el flujo de material genético de una bacteria a otra por medio de plásmidos y transposones, mutaciones y la inactivación del antibiótico de forma natural (resistencia intrínseca). Clínicamente, la forma predominante de resistencia es una alteración por metilación de la adenina en la posición 2058 de la fracción 23S del rRNA o en nucleótidos vecinos a causa de la adenin-N⁶-metiltransferasa, la cual confiere resistencia a todos los macrólidos, así como también a las lincosamidas y estreptograminas (**Leclercq & Courvalin, 1991**). Este tipo de resistencia se da por un grupo de aproximadamente 30 genes llamados *erm* (erythromycin ribosome methylation) (**Neu, 1991**).

Recientemente, se encontraron en bacterias de la cavidad oral los genes *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *erm(F)* y *erm(Q)*, de los cuales *erm (A)*, *(B)* y *(C)* fueron los primeros descritos en cocos Gram positivos. Así mismo, *erm(F)* fue el primero descrito en especies de *Bacteroides*, sin embargo actualmente se ha encontrado presente en un gran número de bacterias de la cavidad oral que incluyen especies Gram positivas aerobias y anaerobias, así como algunas especies Gram negativas. La mayoría de los genes del grupo *erm* están asociados con transposones que generalmente acarrean genes de resistencia cruzada (**Roberts, 2002**).

B. OBJETIVOS

Los objetivos del presente estudio fueron:

- Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de eritromicina para cepas de referencia control.
- Determinar el porcentaje de la microbiota total cultivable resistente a la eritromicina en muestras de placa dentobacteriana subgingival de sujetos mexicanos con periodontitis crónica.
- Describir la composición microbiológica de la placa dentobacteriana subgingival de sujetos mexicanos con periodontitis crónica.

C. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

La meta en el tratamiento de las enfermedades periodontales es la eliminación de los agentes bacterianos que llevan a la pérdida de los tejidos de soporte del diente. Resulta extraño que aún reconociendo la naturaleza infecciosa de las enfermedades periodontales, sea la terapia mecánica la de mayor uso en el tratamiento de dichas enfermedades. La terapia mecánica ha mostrado en términos generales mejores resultados clínicos que la terapia antibiótica (Slots & Ting, 2002). Desde el punto de vista microbiológico, esto contradice los principios terapéuticos de las enfermedades infecciosas. La mejoría clínica que se ha observado con la terapia mecánica, es en realidad el único sustento válido para seguirla utilizando. Aunque existen numerosos estudios que evalúan la efectividad clínica de los tratamientos mecánicos, no existe hasta la fecha una base científica concreta para soportar el uso de los mismos como terapia antimicrobiana. Por otro lado, el uso de los antibióticos en el tratamiento de las enfermedades periodontales ha sido ampliamente estudiado pero la eficacia de estos tratamientos es aún controversial. Algunos

factores que pudieran influir de manera importante sobre la efectividad de dichos tratamientos son:

- La naturaleza compleja de las enfermedades periodontales tanto por la complejidad de especies bacterianas y su organización en la placa dentobacteriana como por los factores relacionados con el huésped.
- Las concentraciones que el antibiótico alcanza en el sitio de acción, es decir, en la bolsa periodontal cuando éste es administrado en dosis terapéuticas adecuadas.
- La expresión de mecanismos de resistencia de las bacterias a los antibióticos.

Un punto importante, es el uso indiscriminado de antibióticos en nuestro país, ya que no existe restricción alguna para la adquisición de los mismos; a esto hay que añadirle que nuestra población en su gran mayoría está acostumbrada a la automedicación por lo que es razonable suponer que un gran porcentaje de la población en México no utiliza las dosis terapéuticas adecuadas y por consecuencia el número de cepas que han desarrollado resistencia a los antibióticos puede ser mucho más alto que el reportado en otros países como Estados Unidos en donde el consumo de antibióticos está estrictamente regulado.

Con el presente trabajo se pretende proporcionar información sobre los índices de resistencia antimicrobiana a la eritromicina en nuestro país de especies bacterianas en la placa subgingival de sujetos con periodontitis crónica, esto con el fin de contribuir al mejor entendimiento de la utilidad de dicho fármaco en el tratamiento de las enfermedades periodontales.

D. HIPÓTESIS

H₁. Un gran porcentaje de especies bacterianas en muestras de placa dentobacteriana subgingival en pacientes mexicanos con periodontitis crónica será resistente a la eritromicina.

H₂. Se identificarán altas proporciones de bacterias periodontopatógenas en muestras de placa subgingival de pacientes mexicanos con periodontitis crónica.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente proyecto de investigación comprendió la realización de un estudio transversal en donde fueron evaluadas un total de 40 cepas de referencia para determinar las CMI de eritromicina, 2 muestras de placa dentobacteriana subgingival de cada uno de 5 sujetos de estudio para determinar el porcentaje de la flora total cultivable resistente a la eritromicina y 28 muestras de placa dentobacteriana subgingival de los mismos sujetos de estudio para determinar su composición microbiológica.

Los sujetos de estudio fueron evaluados en una visita en la que se realizó una evaluación del estado de salud general y periodontal del sujeto, se registraron los datos clínicos periodontales y se realizó la recolección de muestras de placa dentobacteriana. Esta evaluación fue realizada por un mismo clínico para todos los sujetos de estudio.

B. POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de sujetos de estudio consistió de un total de 5 sujetos mexicanos por nacimiento, que no hubieran recibido ningún tipo de tratamiento periodontal en el pasado más allá de profilaxis (limpiezas dentales profesionales).

CRITERIOS DE SELECCIÓN

La **tabla 1** proporciona una descripción de los criterios periodontales utilizados para la selección de los sujetos de estudio. Fueron excluidos del estudio todos los sujetos que presentaron embarazo o que estaban lactando, que hubieran tomado cualquier clase de antimicrobiano sistémico en los 3 meses previos a su evaluación para el estudio o que presentaron

cualquier condición sistémica que pudiera influir sobre el curso o severidad de la enfermedad periodontal tales como diabetes, VIH/SIDA, hemofilia, enfermedades autoinmunes, etc.

CAPTURA DE SUJETOS DE ESTUDIO

Todos los sujetos de estudio provinieron de la población de pacientes que reciben atención en la Clínica de Periodoncia de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM. El propósito y naturaleza del estudio, incluyendo la descripción de procedimientos específicos para el registro de mediciones clínicas y recolección de muestras, fueron explicados a cada sujeto potencial de estudio. Los sujetos recibieron copia de la forma de consentimiento informado. Se pidió a los sujetos que firmaran dicha forma, con lo cual establecieron su entendimiento sobre el estudio y su deseo voluntario de participar (**Anexo 1**).

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 excluyendo los terceros molares (máximo 168 sitios por sujeto dependiendo del número de dientes faltantes) de acuerdo con procedimientos previamente descritos en la literatura (**Haffajee et al., 1983**).

Los parámetros clínicos y el orden de las mediciones se realizó de la siguiente manera:

- | | |
|------------------------------------|---------------------------------|
| 1. Acumulación de placa (0 ó 1) | 4. Nivel de inserción (mm) |
| 2. Enrojecimiento gingival (0 ó 1) | 5. Sangrado al sondeo (0 ó 1) |
| 3. Profundidad de bolsa (mm) | 6. Supuración al sondeo (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” (UNC) 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). Estas medidas fueron registradas dos veces por el mismo clínico y el promedio de las dos mediciones fue utilizado para el análisis de datos. El resto de los parámetros clínicos fueron evaluados en una sola ocasión con mediciones dicotómicas de ausencia (0) ó presencia (1). Las características clínicas de la población de estudio se presentan en la **tabla 2**.

D. EVALUACIONES MICROBIOLÓGICAS

Las evaluaciones microbiológicas se realizaron en el Laboratorio de Genética Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM.

DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS DE CEPAS DE REFERENCIA CONTROL

Para determinar las CMI de diferentes especies bacterianas control, se seleccionaron las 40 cepas de referencia del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) que se presentan en la **tabla 3**. Todas las cepas fueron sembradas sobre placas con agar enriquecido (agar base para *Mycoplasma* (Becton Dickinson, BBL) suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrinada (Laboratorios Microlab S.A. de C.V. México, D.F.), 10 µg/ml de ácido N-acetilmurámico (Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V Toluca, Mex.), 0.3 µg/ml de menadione (Sigma, vitamina K) y 5 µg/ml de hemina (Sigma) libre de antibiótico y con siete diferentes concentraciones de eritromicina (0.5, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 µg/ml) (Sigma). Se permitió el crecimiento de las cepas durante una semana en una cámara de anaerobiosis con atmósfera libre

de oxígeno (80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂) a 35 °C. Posteriormente, se realizó la inspección visual de las placas para determinar las especies que crecieron en las diferentes concentraciones del antibiótico. Este experimento se realizó por duplicado para reducir el rango de error.

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE LA FLORA TOTAL CULTIVABLE RESISTENTE A LA ERITROMICINA

Dos muestras de placa dentobacteriana subgingival fueron recolectadas de los sitios distobucales de cualquiera de los primeros molares en cada sujeto de estudio. Después de secar y aislar el área de muestreo con rollos de algodón, la placa supragingival fue eliminada con una cureta Gracey (Hu-Friedy). Las muestras de placa subgingival fueron tomadas utilizando curetas Gracey estériles y colocadas en tubos de ensayo individuales que contenían 5 ml de medio de transporte de Ringer suplementado con 0.5mg/ml de L-cisteína y 0.0001% de rezasurina, preparado con la técnica de PRAS (Pre-reduced Anaerobically Sterilized).

Las muestras fueron dispersadas mediante sonicación durante 10 segundos con atmósfera libre de oxígeno. Se realizaron 4 diluciones seriales de las muestras dispersadas en medio de transporte de Ringer en atmósfera libre de oxígeno transfiriendo 500 µl a tubos que contenían 5 ml de medio de transporte. 100 µl de cada dilución fueron sembrados por duplicado en placas de agar enriquecido libre de antibiótico y con seis diferentes concentraciones de eritromicina (0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 µg/ml). Todas las placas fueron incubadas en una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂ a 35°C durante 7 días. El tiempo entre la recolección de muestras y el término de su procesamiento no excedió en ningún caso de 30 minutos.

Después de 7 días de incubación, se realizó un conteo visual de las unidades formadoras de colonias (UFCs) que crecieron tanto en las placas con antibiótico como en las placas sin antibiótico en la dilución en la que crecieron entre 30 y 300 colonias. El porcentaje de

microorganismos resistentes al antibiótico fue determinado con base al número de microorganismos que fueron observados en las placas sin antibiótico.

DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA PLACA SUBGINGIVAL

1. Recolección y procesamiento de muestras

Las evaluaciones microbiológicas de la composición de la placa subgingival se realizaron mediante la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA (Socransky *et al.*, 1994). 28 muestras de placa dentobacteriana subgingival fueron recolectadas de los sitios mesiobucales de todos los dientes excluyendo los terceros molares en cada sujeto de estudio. Después de secar y aislar el área de muestreo con rollos de algodón, la placa supragingival fue eliminada con una cureta Gracey (Hu-Friedy). Las muestras de placa subgingival (n = 140) se tomaron utilizando curetas Gracey estériles y colocadas en tubos para microcentrifugación de 1.5 ml que contenían 100 µl de buffer TE pH 7.6 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA). Se agregaron 100 µl de NaOH (0.5 M, Sigma) a cada tubo y las muestras fueron dispersadas. Los tubos fueron hervidos durante 10 min. y el pH neutralizado con 800 µl de acetato de amonio (5 M, Sigma). El DNA de cada muestra fue colocado en uno de los canales abierto de un Minislot-30, concentrado en una membrana de nylon de carga positiva de 15 x 15 cm y fijado a la membrana mediante entrecruzamiento con luz ultravioleta seguido por incubación a 120°C durante 20 min. Dos canales de estándares microbiológicos fueron colocados en cada membrana. Dichos estándares consistieron de mezclas ajustadas a 10^5 y 10^6 células de cultivos puros de todas las cepas bacterianas que fueron analizadas (Tabla 4).

El empleo de la técnica de “checkerboard” permitió la identificación de 40 especies bacterianas en cada una de las 28 muestras de placa dentobacteriana de cada sujeto de estudio en un mismo experimento. Asimismo, fue posible cuantificar los niveles, prevalencia y proporción

de cada una de las 40 especies. De tal manera que los datos microbiológicos obtenidos de cada sujeto de estudio incluyeron 3 matrices de datos (niveles, prevalencia y proporción), cada una con un total de 1,120 posibles puntos de información (40 sondas de DNA x 28 muestras) (**Figura 2**).

2. Especies bacterianas y condiciones de cultivo

La lista de las 40 cepas bacterianas de referencia que fueron utilizadas en el presente estudio para la preparación de sondas de DNA se encuentra en la **tabla 4**. Todas las cepas fueron adquiridas como cultivos liofilizados del ATCC. Las cepas fueron rehidratadas en caldo para *Mycoplasma* y cultivadas en agar enriquecido a 35°C de 3 a 7 días dentro de una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂ (exceptuando *Neisseria mucosa*, cultivada aeróbicamente). Las cepas que se mencionan a continuación fueron sembradas en medios suplementados: *Campylobacter* sp.: agar enriquecido suplementado en la superficie con 0.5 ml de formato (60mg/ml) - fumarato (60mg/ml); *T. denticola*: caldo para *Mycoplasma* suplementado con glucosa (1mg/ml), niacinamida (400µg/ml), tetrahidrocloruro de esparmina (150 µg/ml), isobutirato de sodio (20µg/ml), L-cisteína (1 mg/ml), pirofosfato de tiamina (5 µg/ml) y suero bovino (0.5%).

3. Purificación de DNA bacteriano y preparación de sondas de DNA

El crecimiento después de 3 a 7 días de cultivo fue recolectado y colocado en tubos para microcentrifugación de 1.5 ml que contenían 1 ml de buffer TE pH 7.6. Las células fueron lavadas dos veces mediante centrifugación en buffer TE a 3,500 rpm durante 10 min. Posteriormente, fueron resuspendidas mediante sonicación durante 15 seg. y lisadas a 37°C durante 1 hora ya sea con 10% SDS y proteinasa K (20 mg/ml, Sigma) para las especies Gram negativas, ó con una mezcla enzimática que contenía 15 mg/ml de lisozima (Sigma) y 5 mg/ml de achromopeptidasa (Sigma) en buffer TE (pH 8.0) para las especies Gram positivas. El DNA fue

aislado y purificado utilizando una técnica estándar previamente descrita (Smith *et al.*, 1989). 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 (Tabla 4) mediante el marcaje con digoxigenina (Roche) de 1µg de DNA purificado utilizando la técnica de primers aleatorios (random primer technique) previamente descrita (Feinberg & Vogelstein, 1983).

4. Hibridaciones DNA-DNA

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

5. Enumeración de especies bacterianas

Las membranas fueron bloqueadas mediante su incubación durante 1 hora en buffer bloqueador que contenía 1% de caseína en buffer de maleato (100mM ácido maléico, 150mM NaCl, pH 7.5). Los híbridos fueron detectados incubando las membranas en una dilución de 1:50,000 de anticuerpo contra digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Roche) utilizando la modificación previamente descrita (**Engler-Blum *et al.*, 1993**). Después de ser lavadas, las membranas fueron incubadas en un agente quimioluminiscente de detección (CDP-Star, Roche) a 37°C durante 1 hora y las señales fueron detectadas mediante la exposición de las membranas a películas autoradiográficas dentro de cassettes a temperatura ambiente durante 35 min. Las películas fueron reveladas siguiendo procedimientos estándar y las señales fueron evaluadas visualmente sobre un negatoscopio para determinar la identidad de las cepas aisladas de cada muestra.

E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Se realizó un análisis estadístico descriptivo de los parámetros clínicos evaluados tales como edad, número de dientes faltantes, género, porcentaje de fumadores, profundidad de bolsa, nivel de inserción, acumulación de placa, enrojecimiento gingival, sangrado al sondeo y supuración, los cuales se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM) y rango (**Tabla 2**).

Asimismo, se efectuó la determinación de las CMIs de cada una de las 40 cepas de referencia control. Utilizando el punto de corte sugerido por la National Committee for Laboratory Standards (NCCLS) de 4 μ g/ml, las CMIs fueron utilizadas para determinar la resistencia o sensibilidad a la eritromicina de cada una de las cepas de referencia control (**Tabla 5**).

El porcentaje de resistencia de la microbiota subgingival total cultivable se determinó mediante el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFCs) presentes en las placas sin antibiótico y con 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 $\mu\text{g/ml}$ de eritromicina para cada muestra de cada sujeto de estudio. El número de UFCs en las placas sin antibiótico fue considerado como el 100% de crecimiento para cada muestra, a partir del cual se calculó el porcentaje de crecimiento en cada concentración del antibiótico. Los porcentajes obtenidos para cada concentración del antibiótico fueron promediados entre las muestras de cada sujeto de estudio y después entre el total de la población. Los datos se expresan como media \pm EEM (**Figura 3**). Dichos datos fueron utilizados también para determinar las concentraciones requeridas de eritromicina para inhibir el 10%, 50% y 90% (CMI^{10} , CMI^{50} y CMI^{90}) del crecimiento bacteriano total en la placa subgingival (**Tabla 6**).

Los datos microbiológicos con los que se contaron de cada sujeto de estudio para determinar la composición microbiológica de la placa subgingival fueron las cuentas absolutas de 40 especies bacterianas (**Tabla 4**) en hasta un máximo de 28 muestras de placa subgingival. Los análisis describen la composición microbiológica de la placa subgingival mediante 3 parámetros: cuentas bacterianas $\times 10^5$ (niveles), porcentaje de sitios colonizados (prevalencia) y porcentaje del total de cuentas de las sondas de DNA (proporción). Cada parámetro fue calculado mediante la determinación de los niveles, prevalencia y proporción por separado en cada muestra de cada sujeto de estudio, promediado para cada sujeto de estudio y después entre los sujetos del total de la población. Los niveles y la prevalencia se expresan como media \pm EEM para especies bacterianas individuales (**Figuras 4 y 5**) y la proporción como porcentaje promedio de grupos de microorganismos (**Figuras 6 y 7**).

IV. RESULTADOS

A. CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS DE CEPAS DE REFERENCIA CONTROL

Los resultados obtenidos de este experimento se presentan en la **tabla 5**. Las especies bacterianas *Actinomyces naeslundii* serotipo 1, *A. odontolyticus*, *A. viscosus*, *C. gingivalis* y *C. matruchotii* fueron sensibles a una concentración de 0.5 µg/ml de eritromicina. *Actinomyces israelii*, *Eubacterium saburreum*, *Gemella morbillorum*, *P. intermedia*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus anginosus*, *S. constellatus*, *S. gordonii*, *S. intermedius* y *S. sanguinis* fueron sensibles a una concentración de 1 µg/ml de eritromicina. *C. rectus*, *C. sputigena*, *P. nigrescens*, *S. mitis* y *S. oralis* fueron sensibles a una concentración de 2 µg/ml de eritromicina. *C. showae*, *C. ochracea*, *Eubacterium sulci*, *P. gingivalis*, y *T. forsythensis* fueron sensibles a una concentración de 4 µg/ml de eritromicina. De acuerdo con el punto de corte sugerido por la NCCLS para eritromicina de 4 µg/ml, todas las especies antes mencionadas fueron consideradas sensibles (S) al antibiótico.

Sólo *N. mucosa* fue resistente hasta una concentración de 8 µg/ml de eritromicina. *C. gracilis*, *E. corrodens* y *M. micros* fueron resistentes hasta una concentración de 16 µg/ml de eritromicina. *F. nucleatum* ss *nucleatum*, *F. nucleatum* ss *polymorphum*, *F. nucleatum* ss *vincentii* y *Fusobacterium periodonticum* fueron resistentes hasta una concentración de 32 µg/ml de eritromicina. *A. actinomycetemcomitans* serotipos a y b, *Leptotrichia buccalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella melaninogenica*, *S. noxia* y *V. parvula* fueron resistentes a concentraciones mayores a 32 µg/ml de eritromicina. Todas las especies que

presentaron crecimiento en concentraciones de eritromicina mayores a 4 µg/ml fueron consideradas resistentes (R).

B. PORCENTAJE DE LA MICROBIOTA TOTAL CULTIVABLE RESISTENTE A LA ERITROMICINA EN MUESTRAS DE PLACA DENTOBACTERIANA SUBGINGIVAL

La CMI de eritromicina que se requirió para inhibir tanto el 10% (CMI¹⁰) como el 50% (CMI⁵⁰) del crecimiento de la microbiota total cultivable en las muestras de placa dentobacteriana subgingival fue de 0.5 µg/ml. El crecimiento del 90% de la microbiota total cultivable (CMI⁹⁰) fue inhibido a una concentración de 2 µg/ml de eritromicina. La síntesis de dichos resultados se presentan en la **tabla 6**.

En la **figura 3** se presentan los resultados obtenidos del porcentaje de unidades formadoras de colonias (%UFCs) que crecieron en presencia de diferentes concentraciones de eritromicina (0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 µg/ml).

En promedio el 23.2% de UFCs mostraron crecimiento en presencia de 0.5 µg/ml de eritromicina con un EEM de 8.77%. En presencia de 1 µg/ml de eritromicina el 16.7% de UFCs mostraron crecimiento con un EEM de 5.97%. En placas con 2 µg/ml de eritromicina se obtuvo crecimiento del 9.6% de flora total cultivable con un EEM de 3.57%. El 8.9% del total de UFCs creció en presencia de 4 µg/ml de eritromicina con un EEM de 3.79%. El porcentaje de UFCs considerado como resistentes a una concentración de 8 µg/ml de eritromicina fue del 5.1% con un EEM de 2.64% y finalmente en presencia de 16 µg/ml de eritromicina el porcentaje de la microbiota total cultivable resistente fue de 6.1% con un EEM de 2.80%.

Los resultados del presente estudio, revelaron una tendencia hacia la disminución en el porcentaje de UFCs que mostraron crecimiento en concentraciones crecientes del antibiótico. En promedio, del 5.1% al 6.1% de la flora subgingival total cultivable de sujetos mexicanos con

periodontitis crónica, mostró resistencia a la eritromicina si se considera el punto de corte sugerido por la NCCLS de 4 µg/ml para dicho antibiótico.

C. COMPOSICIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA PLACA DENTOBACTERIANA SUBGINGIVAL

En la **figura 4** se presentan las cuentas promedio $\times 10^5$ (\pm EEM) de 40 especies bacterianas. Todas las especies evaluadas fueron detectadas en muestras de placa subgingival. *Eubacterium saburreum*, *V. parvula*, *P. gingivalis*, *T. forsythensis* y *C. matruchotii* presentaron las cuentas promedio más elevadas. Cabe destacar que los 3 reconocidos periodontopatógenos; *P. gingivalis*, *T. forsythensis* y *T. denticola*, presentaron cuentas promedio por arriba de 6×10^5 (19.4, 13.5 y 6.5×10^5 respectivamente). Otras especies generalmente presentes en niveles elevados en muestras de placa subgingival de sujetos sanos y con enfermedad periodontal tales como *A. viscosus*, *Actinomyces israelii* y *Actinomyces naeslundii* serotipo 1 presentaron cuentas promedio relativamente bajas de 3.2 a 1.3×10^5 .

En la **figura 5** se resume la prevalencia promedio (\pm EEM) de las 40 cepas bacterianas analizadas en los 5 sujetos de estudio. La prevalencia promedio de periodontopatógenos importantes como *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythensis*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *M. micros* y *C. rectus* fue mayor al 50% de los sitios (91%, 86%, 66%, 64%, 54%, 52% y 51% respectivamente). Por otra parte, algunas especies “benéficas” como *S. sanguinis*, *C. ochracea* y *A. naeslundii* 1 se encontraron colonizando un bajo porcentaje de sitios (44% a 31%).

En la **figura 6** se presenta la proporción promedio de grupos de microorganismos. Las 40 especies bacterianas fueron agrupadas de manera similar a la descripción de los complejos bacterianos en la placa subgingival (Socransky *et al.*, 1998), las excepciones se describen en el pie de la figura. En conjunto las especies de los complejos rojo y naranja, comúnmente

reconocidas como patógenos periodontales, representaron el 50.5% de las especies detectadas. La proporción de especies de *Actinomyces* agrupadas en el segmento azul representó únicamente el 5.4% de los microorganismos detectados. El 27.6% de las especies bacterianas detectadas se compuso por microorganismos no clasificados dentro de los complejos bacterianos de la placa subgingival como *C. matruchotii*, *Selenomonas artemidis*, *E. saburreum*, *P. endodontalis*, *N. mucosa*, *E. sulci*, *P. acnes*, *P. melaninogenica*, *G. morbillorum* y *L. buccalis*.

Tomando en consideración la proporción promedio detectada para los 40 microorganismos individuales en muestras de placa subgingival de la población de estudio utilizando la técnica de “checkerboard” y los resultados de los experimentos para determinar las CMI de 40 cepas de referencia, en la **figura 7** se presenta una inferencia de las proporciones promedio de los grupos de microorganismos que pudieron haber sido sensibles y resistentes a la eritromicina en las muestras de placa dentobacteriana. De acuerdo con los resultados de las CMI para cepas de referencia se infirió que el 69.9% y el 30.1% de los microorganismos presentes en muestras de placa subgingival pudieron haber sido representados por especies bacterianas sensibles y resistentes a la eritromicina respectivamente. Asimismo, el 18% de las especies bacterianas en muestras subgingivales pudo haber estado representado por especies resistentes a la eritromicina consideradas como periodontopatógenas.

V. DISCUSIÓN

La presente investigación examinó la eficacia *in vitro* de la eritromicina para inhibir el crecimiento de la microbiota total cultivable subgingival de sujetos mexicanos con periodontitis crónica, con la finalidad de proporcionar información sobre la posible eficacia de dicho antibiótico en la terapia periodontal en nuestro país. A la fecha existen pocos estudios publicados sobre la efectividad de la eritromicina para tratar la periodontitis crónica, y en ninguno de ellos se han evaluado poblaciones mexicanas. En otras partes del mundo, se han realizado estudios sobre la resistencia bacteriana a la eritromicina y otros macrólidos que presentan las especies bacterianas de la placa subgingival. Por ejemplo, un estudio comparativo fue realizado entre residentes de España y Holanda (**van Winkelhoff et al., 2000**). En términos generales dicho estudio sugirió que el uso indiscriminado de los macrólidos genera resistencia bacteriana con los años.

La resistencia bacteriana a los antibióticos se define como el conjunto de mecanismos de la bacteria que le confieren la capacidad de crecer en presencia de antibióticos a los cuales debería ser sensible. Dichos mecanismos bloquean los efectos inhibitorios o bactericidas de los antimicrobianos (**Davison et al., 2000**), y representan un problema de salud pública debido a la continua generación de resistencia bacteriana a los antibióticos a escala global. Este fenómeno debe ser monitoreado periódicamente en diferentes ubicaciones geográficas para permitir el establecimiento de pautas terapéuticas eficaces en el uso de diferentes agentes antimicrobianos.

La eritromicina al igual que otros antibióticos como la penicilina tienen efectos interesantes sobre el periodonto. Algunos de dichos efectos incluyen reducciones en los niveles de placa, el índice gingival, la profundidad de la bolsa periodontal y la carga bacteriana en el fluido crevicular (**Helovuo & Paunio, 1989**). La eritromicina se administra por vía oral y se

absorbe rápidamente por el tracto intestinal, tiene alta solubilidad en lípidos, además de alcanzar altas concentraciones celulares (Yu *et al.*, 1999). Este antibiótico se excreta tanto por la orina como por la bilis y sus principales reacciones secundarias son malestar estomacal, náusea y vómito, y en algunos casos diarrea. Debe evitarse su administración en pacientes con disfunción renal. La eritromicina potencializa los efectos tóxicos de la teofilina y la carbamazepina, por lo que la administración conjunta de dichos fármacos debe evitarse. Así mismo, la eritromicina disminuye los efectos bactericidas de las penicilinas (Slots & Rams, 1990).

El uso de la eritromicina en el tratamiento de las enfermedades periodontales es poco frecuente. Por lo general, la eritromicina se utiliza más frecuentemente en el tratamiento de infecciones respiratorias (Roberts, 2002). Sin embargo, dicho fármaco es el antibiótico de primera elección para pacientes alérgicos a las penicilinas, además de ser una alternativa económica para pacientes de escasos recursos. En un estudio, donde se utilizó la eritromicina *in vitro* para evaluar su capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos de la placa subgingival de sujetos con periodontitis crónica severa y moderada, se observó que la eritromicina fue inefectiva para inhibir el crecimiento de la mayoría de los aislados de las muestras tomadas de sujetos con periodontitis crónica severa, sin embargo, se sugirió que la eritromicina era efectiva para inhibir el crecimiento de la mayoría de los aislados de las muestras tomadas de sujetos con periodontitis crónica moderada (Walker *et al.*, 1983). Esto es difícil de explicar, ya que las especies bacterianas presentes en la microbiota subgingival de individuos con periodontitis crónica severa y moderada no son notablemente distintas. Sin embargo, nuestros resultados revelaron que *A. actinomycetemcomitans*, un microorganismo periodontopatógeno putativo presente en niveles y proporción más elevados en casos de periodontitis crónica severa, fue resistente a la eritromicina. Otros microorganismos presentes en mayores niveles y proporción en casos de periodontitis crónica severa que también presentaron resistencia a la

eritromicina fueron *S. noxia*, *M. micros* y *F. nucleatum*. Esto podría explicar por lo menos en parte el hecho de que se haya reportado que la eritromicina fue más efectiva para tratar la periodontitis crónica moderada, debido a que la mayoría de los microorganismos frecuentes en casos de periodontitis crónica moderada como *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *C. rectus* y *T. forsythensis* fueron sensibles a la eritromicina en el presente estudio (Moore *et al.*, 1983; Moore *et al.*, 1982).

Algunos reportes han sugerido que la eritromicina tiene amplio espectro bactericida contra microorganismos Gram positivos facultativos (Walker, 1996b), por lo que se ha asumido que tiene una efectividad reducida para el tratamiento de la enfermedad periodontal en la que la mayoría de los microorganismos asociados con dicha enfermedad son Gram negativos anaerobios (Genco, 1996). Los resultados de la presente investigación demuestran que *A. actinomycetemcomitans*, *S. noxia*, *E. corrodens*, *F. periodonticum*, *P. melaninogenica*, *P. endodontalis*, *C. gracilis*, *M. micros* y *F. nucleatum* considerados patógenos periodontales putativos (Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000) fueron resistentes a la eritromicina a concentraciones mayores a 4 µg/ml. Otros estudios han reportado también ineficacia de la eritromicina para inhibir el crecimiento de *A. actinomycetemcomitans* (Slots *et al.*, 1980). Cabe mencionar que otras especies periodontopatógenas como *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *C. rectus*, *P. nigrescens* y *T. forsythensis* fueron sensibles a la eritromicina a concentraciones de 4 µg/ml o menos.

Dentro de los resultados más interesantes de esta investigación, se encuentran los arrojados por las identificaciones bacterianas de nuestra población de estudio con periodontitis crónica mediante la técnica de checkerboard para hibridaciones DNA-DNA, en los que se pudo observar que los niveles, prevalencia y proporción de microorganismos periodontopatógenos en promedio fueron muy elevados y que los microorganismos columnares de la placa

dentobacteriana como las especies de *Actinomyces* y *Streptococcus*, que generalmente se encuentran en una proporción más elevada que los demás microorganismos presentes en la placa dentobacteriana tanto en salud como en periodontitis (Dzink *et al.*, 1988; Haffajee *et al.*, 1998; Tanner *et al.*, 1996) se encontraron en niveles, prevalencia y proporción muy bajos. Como se menciona anteriormente en el texto los microorganismos presentes en la cavidad oral se agrupan dentro de diferentes complejos bacterianos. Como se puede observar en la **figura 6**, los microorganismos del complejo rojo, considerados los más periodontopatógenos dominaron dentro de nuestra población de estudio con un 25.5% del total de microorganismos detectados, y muy de cerca siguieron los microorganismos agrupados dentro del complejo naranja, en donde se incluyen especies periodontopatógenas y patógenas putativas como *F. nucleatum*, *C. rectus*, *P. intermedia* y *P. nigrescens* (24.8%). La suma de los porcentajes de dichos complejos bacterianos representó aproximadamente el 50% de los microorganismos detectados en muestras de placa subgingival. Esta cifra fue sorprendente ya que otros estudios muestran que las especies columnares de la placa dentobacteriana como *Actinomyces* y *Streptococcus* deberían representar dicho porcentaje (Socransky *et al.*, 1998). Sin embargo, en nuestra población pudimos determinar que los *Actinomyces* solo representaron un 5.4% de los microorganismos detectados y que los *Streptococcus* agrupados en el complejo amarillo representaron sólo el 2.9%, lo que indica que inclusive en conjunto las especies columnares de la placa dentobacteriana representaron el 8.3% de la microbiota subgingival. Estos datos nos hacen suponer que la microbiota total cultivada de nuestros sujetos mexicanos con periodontitis crónica se componía principalmente por especies periodontopatógenas.

Los resultados de la presente investigación indican que a pesar de que fueron detectados porcentajes bajos de resistencia a la eritromicina en la flora total cultivable de sujetos mexicanos con periodontitis crónica (del 5.1% al 6.1%) y que en promedio el 90% de la microbiota

subgingival fue sensible a la eritromicina, es importante considerar el porcentaje de especies periodontopatógenas y patógenas putativas que fueron resistentes al antibiótico. Haciendo uso de un análisis estadístico en el que se realizó una inferencia de los porcentajes de especies sensibles y resistentes basada en las proporciones promedio de 40 especies bacterianas en la placa subgingival y los resultados de las CMI de cepas de referencia, pudimos determinar que la proporción de especies sensibles y resistentes a la eritromicina pudo haber sido de aproximadamente de 69.9% y 30.1% respectivamente. Sin embargo, del total de especies detectadas, el 18% pudo haber estado representado por microorganismos periodontopatógenos o patógenos putativos resistentes a la eritromicina. Estos hallazgos indican que mientras que los niveles de resistencia a la eritromicina en nuestro país pueden ser bajos, su utilización para el tratamiento de las enfermedades periodontales podría no ser efectiva para el control de dichos padecimientos debido a que un porcentaje importante de especies periodontopatógenas muestran resistencia.

En conclusión, esta investigación contribuyó a demostrar que a diferencia de otros lugares del mundo en donde la eritromicina presenta un alto índice de resistencia bacteriana (**van Winkelhoff *et al.*, 2000**), en nuestro país ese no parece ser el caso. Esto puede deberse a varios factores, siendo una hipótesis razonable que en la actualidad la demanda para el uso de este antibiótico no es tan elevada en México, por lo que su automedicación, abuso y mala utilización son menores que para otros antibióticos como las penicilinas y el metronidazol. No obstante, a pesar de que en la interpretación de los resultados del presente estudio no se pretende apoyar el uso de la eritromicina en la terapia periodontal, es importante señalar que dicho antibiótico podría constituir una opción aceptable para aquellos pacientes alérgicos a las penicilinas y de bajos recursos que padecen casos moderados de periodontitis crónica.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bergstrom J, Eliasson S (1987). Noxious effect of cigarette smoking on periodontal health. *J Periodontal Res* 22: 513-517.
2. Colombo AP, Sakellari D, Haffajee AD, Tanner A, Cugini MA, Socransky SS (1998). Serum antibodies reacting with subgingival species in refractory periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 25: 596-604.
3. Courant PR, Paunio I, Gibbons RJ (1965). Infectivity and hyaluronidase activity of debris from healthy and diseased gingiva. *Arch Oral Biol* 10: 119-125.
4. Davison H, Low J, Woolhouse M (2000). What is antibiotic resistance and how can we measure it? *Trends Microbiol* 8: 554-559.
5. Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD (1988). The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 15: 316-323.
6. Engler-Blum G, Meier M, Frank J, Muller GA (1993). Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. *Anal Biochem* 210: 235-244.
7. Feinberg AP, Vogelstein B (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13.
8. Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Socransky SS (2001). Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol* 28: 597-609.
9. Feres M, Haffajee AD, Goncalves C, Allard KA, Som S, Smith C, *et al.* (1999). Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (I). Effect on the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol* 26: 775-783.

10. Genco R, Goldman H, Cohen W (1993). Periodoncia. México. Interamericana, McGraw Hill. 770.
11. Genco RJ (1981). Antibiotics in the treatment of human periodontal diseases. *J Periodontol* 52: 545-558.
12. Genco RJ (1996). Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol* 67: 1041-1049.
13. Gibbons R (1996). Role of adhesion in microbial colonization of host tissues: a contribution of oral microbiology. *J Dent Res* 75: 866-870.
14. Gibbons RJ, Hay DI, Childs WCd, Davis G (1990). Role of cryptic receptors (cryptitopes) in bacterial adhesion to oral surfaces. *Arch Oral Biol* 35: 107S-114S.
15. Goodman-Gilman A, Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW (2000). Las bases farmacológicas de la terapéutica. México. Mc Graw-Hill Interamericana. II: 1196.
16. Greenspan D, Greenspan J (1993). Oral manifestations of human immunodeficiency virus infection. *Dent Clin North Am* 37: 21-32.
17. Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL, Jr., *et al.* (1998). Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 25: 346-353.
18. Haffajee AD, Socransky SS (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 5: 78-111.
19. Haffajee AD, Socransky SS, Goodson JM (1983). Comparison of different data analyses for detecting changes in attachment level. *J Clin Periodontol* 10: 298-310.
20. Helovuo H, Paunio K (1989). Effects of penicillin and erythromycin on the clinical parameters of the periodontium. *J Periodontol* 60: 467-472.

21. Hofstad T (1974). Antibodies reacting with lipopolysaccharides from *Bacteroides melaninogenicus*, in serum from normal human subjects. *J Infect Dis* 129: 349-352.
22. Kinane D, Lappin D (2001). Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand* 59: 154-160.
23. Kornman KS, di Giovine FS (1998). Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol* 3: 327-338.
24. Leclercq R, Courvalin P (1991). Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1267-1272.
25. Lindhe J, Karring T, Lang NP (1998). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Copenhagen. Munksgaard. 973.
26. Mayrand D, Grenier D (1985). Detection of collagenase activity in oral bacteria. *Can J Microbiol* 31: 134-138.
27. McArthur W, Tsai C, Baehni P, Genco R, Taichman N (1981). Leukotoxic effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Modulation by serum components. *J Periodontal Res* 16: 159-170.
28. Menninger J (1985). Functional consequences of binding macrolides to ribosomes. *J Antimicrob Chemother* 16 Suppl A: 23-34.
29. Mombelli A, Marxer M, Gaberthuel T, Grunder U, Lang N (1995). The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 22: 124-130.
30. Moore WE, Holdeman LV, Cato EP, Smibert RM, Burmeister JA, Ranney RR (1983). Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. *Infect Immun* 42: 510-515.

31. Moore WE, Holdeman LV, Smibert RM, Hash DE, Burmeister JA, Ranney RR (1982). Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infect Immun* 38: 1137-1148.
32. Moore WE, Moore LV (1994). The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000* 5: 66-77.
33. Neiders ME, Chen PB, Suido H, Reynolds HS, Zambon JJ, Shlossman M, *et al.* (1989). Heterogeneity of virulence among strains of *Bacteroides gingivalis*. *J Periodontal Res* 24: 192-198.
34. Neu H (1991). The development of macrolides: clarithromycin in perspective. *J Antimicrob Chemother* 27 Suppl A: 1-9.
35. Nishihara T, Koseki T (2004). Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol 2000* 36: 14-26.
36. Roberts M (2002). Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. *Periodontol 2000* 28: 280-297.
37. Segatore L (1984). Diccionario Médico Teide.
38. Seppala B, Seppala M, Ainamo J (1993). A longitudinal study on insulin-dependent diabetes mellitus and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 20: 161-165.
39. Shah H, Seddon S, Gharbia S (1989). Studies on the virulence properties and metabolism of pleiotropic mutants of *Porphyromonas gingivalis* (*Bacteroides gingivalis*) W50. *Oral Microbiol Immunol* 4: 19-23.
40. Slots J (2002). Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. *J Periodontal Res* 37: 389-398.
41. Slots J, Evans RT, Lobbins PM, Genco RJ (1980). *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Antimicrob Agents Chemother* 18: 9-12.

42. Slots J, Rams TE (1990). Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. *J Clin Periodontol* 17: 479-493.
43. Slots J, Ting M (2002). Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. *Periodontol 2000* 28: 106-176.
44. Smith GL, Socransky SS, Smith CM (1989). Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 4: 47-51.
45. Socransky SS, Haffajee AD (1991). Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *J Periodontol Res* 26: 195-212.
46. Socransky SS, Haffajee AD (1992). The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 63: 322-331.
47. Socransky SS, Haffajee AD (1994). Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000* 5: 7-25.
48. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25: 134-144.
49. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE (1994). "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 17: 788-792.
50. Tanner A, Kent R, Maiden MF, Taubman MA (1996). Clinical, microbiological and immunological profile of healthy, gingivitis and putative active periodontal subjects. *J Periodontol Res* 31: 195-204.
51. van Steenberghe TJ, van der Mispel LM, de Graaff J (1986). Effects of ammonia and volatile fatty acids produced by oral bacteria on tissue culture cells. *J Dent Res* 65: 909-912.
52. van Steenberghe D, Vanherle GV, Fossion E, Roelens J (1976). Crohn's disease of the mouth: report of case. *J Oral Surg* 34: 635-638.

53. van Winkelhoff AJ, Herrera-Gonzales D, Winkel EG, Dellemijn-Kippuw N, Vandembroucke-Grauls CM, Sanz M (2000). Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. A comparison between The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 27: 79-86.
54. van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J (1996). Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol 2000* 10: 45-78.
55. Walker C (1996a). The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. *Periodontol 2000* 10: 79-88.
56. Walker C (1996b). Selected antimicrobial agents: mechanisms of action, side effects and drug interactions. *Periodontol 2000* 10: 12-28.
57. Walker CB, Gordon JM, Socransky SS (1983). Antibiotic susceptibility testing of subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 10: 422-432.
58. Wilderer PA, Characklis WG (1989). Structure and functions of biofilms. 5-17.
59. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS (2000). Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 27: 648-657.
60. Yu VL, Merigan TC, Barriere SL (1999). *Antimicrobial therapy and vaccines*. Baltimore. Williams & Wilkins. 1460.

VII. TABLAS

TABLA 1. Criterios de selección de los sujetos de estudio.

Grupo de Estudio	Edad	Número de Dientes	Nivel de Inserción (NI)
Periodontitis Crónica	≥ 29 años	≥ 20 excluyendo terceros molares y con ≥ 2 primeros molares	≥ 8 sitios con NI ≥ 6 mm

TABLA 2. Características clínicas de la población de estudio (N = 5).

	Media ± EEM*	Rango
Edad (años)	45.2 ± 4.3	30-54
Número de dientes faltantes	5 ± 1.0	1-7
Género (% mujeres)	40	
% fumadores	20	
Profundidad de bolsa promedio (mm)	4.6 ± 0.4	3.7-5.7
Nivel de inserción promedio (mm)	5.3 ± 0.4	4.3-6.6
<i>% sitios con:</i>		
Acumulación de placa	26.9 ± 6.1	15.2-47.7
Enrojecimiento gingival	8.9 ± 5.4	0-29.5
Sangrado al sondeo	52.5 ± 8.2	26.2-75
Supuración	7.8 ± 2.9	0-17.4

*Error estándar de la media.

TABLA 3. Cepas de referencia control empleadas para la determinación de CMIs.

Cepa	Ref.*	Cepa	Ref.*
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> serotipo a	43717	<i>Gemella morbillorum</i>	27824
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> serotipo b	43718	<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	<i>Micromonas micros</i>	33270
<i>Actinomyces naeslundii</i> serotipo 1	12104	<i>Neisseria mucosa</i>	19696
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406
<i>Actinomyces viscosus</i>	43146	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236	<i>Prevotella intermedia</i>	25611
<i>Campylobacter rectus</i>	33238	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845
<i>Campylobacter showae</i>	51146	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	<i>Propionibacterium acnes</i>	6919
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	27872	<i>Selenomonas noxia</i>	43541
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	14266	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823
<i>Eikenella corrodens</i>	23834	<i>Streptococcus gordonii</i>	10558
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271	<i>Streptococcus intermedius</i>	27335
<i>Eubacterium sulci</i>	35585	<i>Streptococcus mitis</i>	49456
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss <i>nucleatum</i>	25586	<i>Streptococcus oralis</i>	35037
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss <i>polymorphum</i>	10953	<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss <i>vincentii</i>	49256	<i>Tannerella forsythensis</i>	43037
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693	<i>Veillonella parvula</i>	10790

*Número de referencia del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA).

TABLA 4. Cepas de referencia utilizadas para la elaboración de sondas de DNA.

Cepa	Ref.*	Cepa	Ref.*
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	†	<i>Micromonas micros</i>	33270
<i>Actinomyces georgiae</i>	49285	<i>Neisseria mucosa</i>	19696
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406
<i>Actinomyces naeslundii</i> serotipo 1	12104	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277
<i>Actinomyces odontolyticus</i> serotipo 1	17929	<i>Prevotella intermedia</i>	25611
<i>Actinomyces viscosus</i>	43146	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563
<i>Campylobacter rectus</i>	33238	<i>Propionibacterium acnes</i>	6919
<i>Campylobacter showae</i>	51146	<i>Selenomonas artemidis</i>	43528
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	<i>Selenomonas noxia</i>	43541
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	27872	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	14266	<i>Streptococcus gordonii</i>	10558
<i>Eikenella corrodens</i>	23834	<i>Streptococcus intermedius</i>	27335
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271	<i>Streptococcus mitis</i>	49456
<i>Eubacterium sulci</i>	35585	<i>Streptococcus oralis</i>	35037
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	‡	<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693	<i>Tannerella forsythensis</i>	43037
<i>Gemella morbillorum</i>	27824	<i>Treponema denticola</i>	35405
<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201	<i>Veillonella parvula</i>	10790

* Número de referencia del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA);

† DNA de los serotipos a (43717) y b (43718) fue combinado para generar una sonda de DNA

‡ DNA de las subespecies *nucleatum* (25586), *polymorphum* (10953) y *vincenti* (49256) fue combinado para generar una sonda de DNA.

TABLA 5. Concentraciones mínimas inhibitorias de cepas de referencia control.

Cepa	CMI	S/R*	Cepa	CMI	S/R*
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> serotipo a	>32	R	<i>Gemella morbillorum</i>	1	S
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> serotipo b	>32	R	<i>Leptotrichia buccalis</i>	>32	R
<i>Actinomyces israelii</i>	1	S	<i>Micromonas micros</i>	16	R
<i>Actinomyces naeslundii</i> serotipo 1	0.5	S	<i>Neisseria mucosa</i>	8	R
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	0.5	S	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	>32	R
<i>Actinomyces viscosus</i>	0.5	S	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	4	S
<i>Campylobacter gracilis</i>	16	R	<i>Prevotella intermedia</i>	1	S
<i>Campylobacter rectus</i>	2	S	<i>Prevotella melaninogenica</i>	>32	R
<i>Campylobacter showae</i>	4	S	<i>Prevotella nigrescens</i>	2	S
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	0.5	S	<i>Propionibacterium acnes</i>	1	S
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	4	S	<i>Selenomonas noxia</i>	>32	R
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	2	S	<i>Streptococcus anginosus</i>	1	S
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	0.5	S	<i>Streptococcus constellatus</i>	1	S
<i>Eikenella corrodens</i>	16	R	<i>Streptococcus gordonii</i>	1	S
<i>Eubacterium saburreum</i>	1	S	<i>Streptococcus intermedius</i>	1	S
<i>Eubacterium sulci</i>	4	S	<i>Streptococcus mitis</i>	2	S
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss <i>nucleatum</i>	32	R	<i>Streptococcus oralis</i>	2	S
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss <i>polymorphum</i>	32	R	<i>Streptococcus sanguinis</i>	1	S
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ss <i>vincentii</i>	32	R	<i>Tannerella forsythensis</i>	4	S
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	32	R	<i>Veillonella parvula</i>	>32	R

*S = sensible, R = resistente. Determinado de acuerdo al punto de corte sugerido por la NCCLS

de 4 µg/ml.

TABLA 6. Concentraciones mínimas inhibitorias de la microbiota total cultivable en muestras de placa dentobacteriana subgingival.

	CMI¹⁰	CMI⁵⁰	CMI⁹⁰
Concentración (µg/ml)	0.5	0.5	2

VIII. FIGURAS

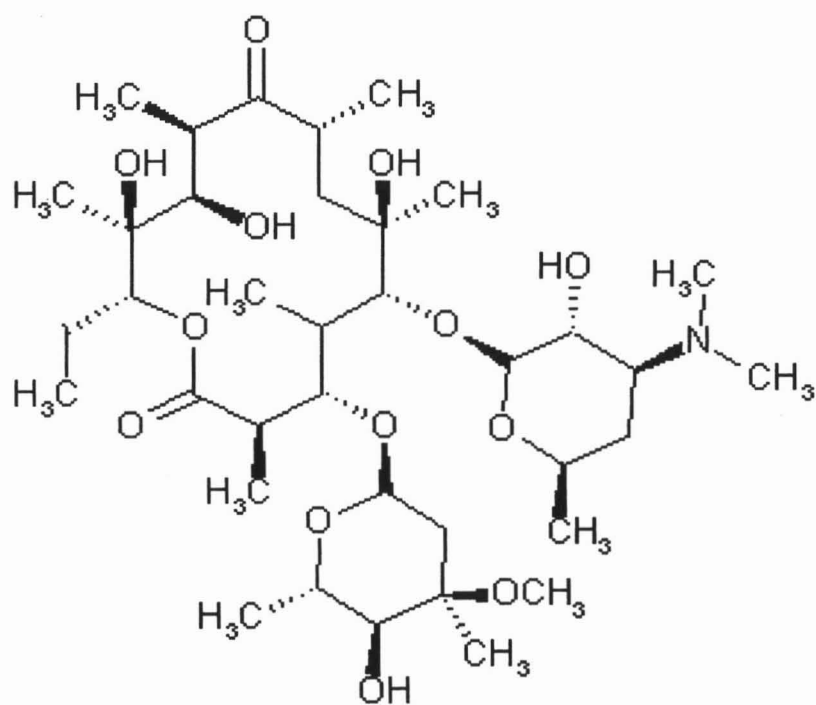


FIGURA 1. Estructura química de la eritromicina.

SONDAS DE DNA

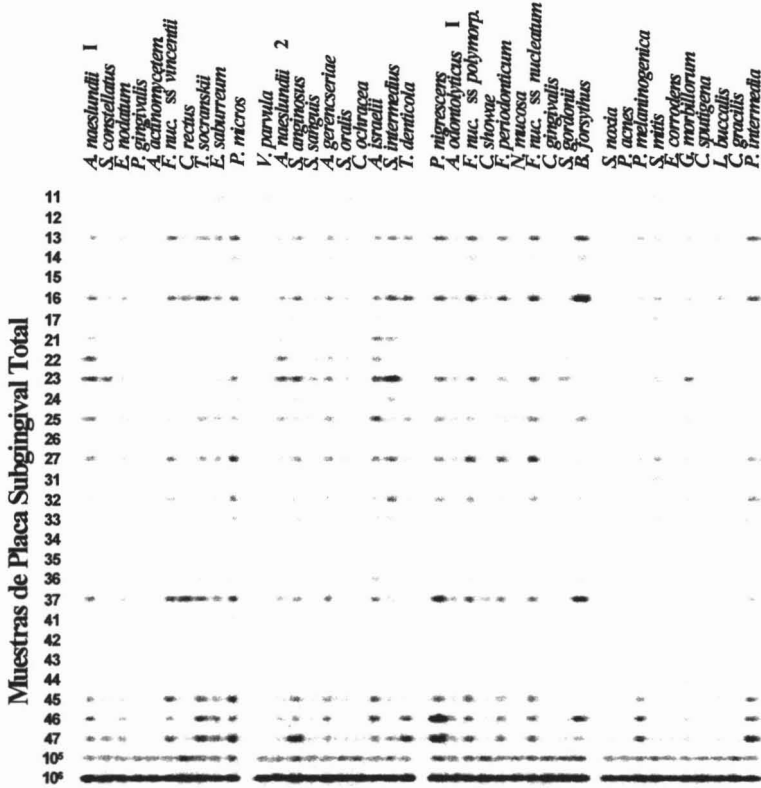


FIGURA 2. La técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA permite la identificación de hasta 40 especies bacterianas en cada una de 28 muestras de placa dentobacteriana en un mismo experimento. Los carriles horizontales contiene las muestras de placa dentobacteriana y perpendicularmente a los mismos, los carriles verticales que atraviesan cada carril horizontal contienen las sondas de DNA. Esta acomodación da como resultado un patrón de tablero de ajedrez (checkerboard) con 1,120 posibles “señales” (puntos negros) que representan identificaciones positivas. Los 2 carriles horizontales en el extremo inferior de la membrana contienen estándares bacterianos con mezclas de las 40 especies evaluadas ajustadas a 10^5 y 10^6 , los cuales permiten la cuantificación de las señales en el resto de la membrana y la comprobación del funcionamiento de las sondas en cada experimento.

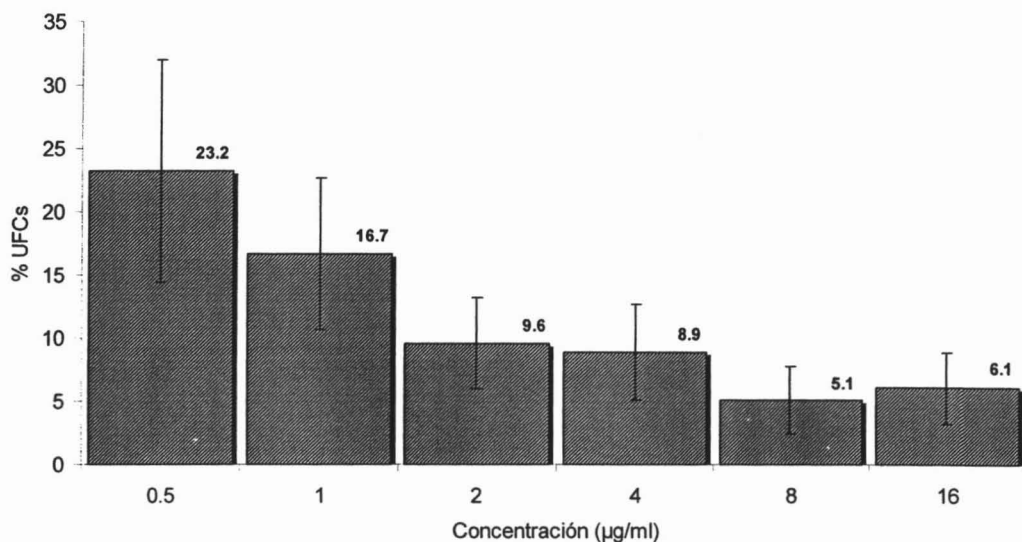


FIGURA 3. Porcentaje promedio (\pm EEM) de unidades formadoras de colonias (UFCs) provenientes de muestras de placa dentobacteriana subgingival de sujetos mexicanos ($N = 5$) que mostraron crecimiento en presencia de 6 concentraciones de eritromicina. El porcentaje promedio de UFCs en cada una de las concentraciones fue determinado en base al total de UFCs detectadas en placas sin antibiótico para cada muestra de cada sujeto de estudio. Dichos porcentajes fueron promediados entre las dos muestras de cada sujeto y posteriormente entre los sujetos de la población.

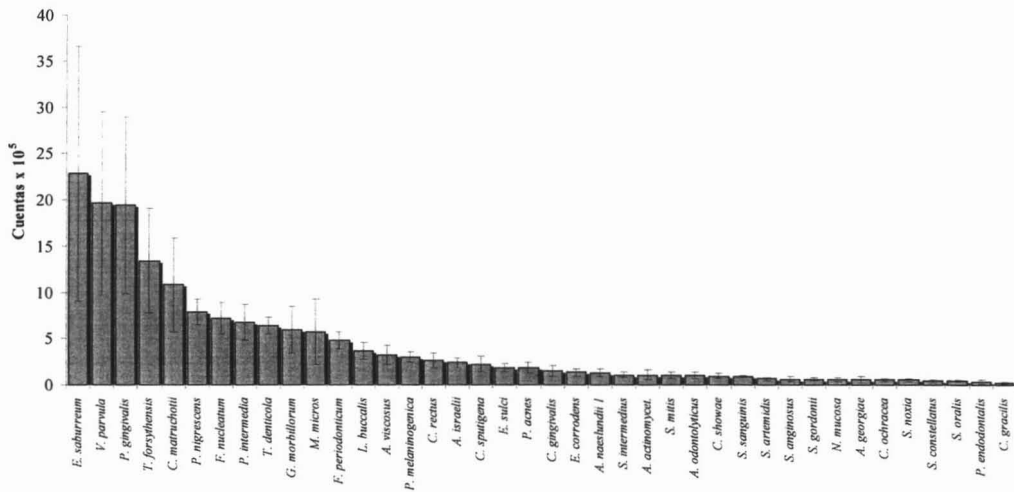


FIGURA 4. Niveles promedio (cuentas $\times 10^5 \pm$ EEM) de cada una de las 40 especies evaluadas en muestras de placa subgingival de 5 sujetos mexicanos con periodontitis crónica. Los niveles fueron calculados para cada especie en cada muestra de placa, promediados entre las muestras de cada sujeto y posteriormente entre los sujetos de la población.

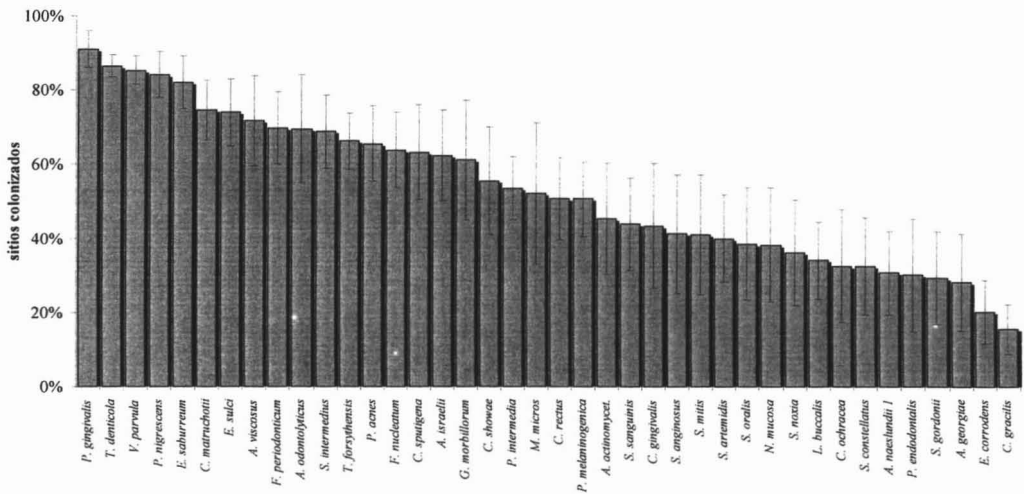


FIGURA 5. Prevalencia promedio (% sitios colonizados \pm EEM) de cada una de las 40 especies evaluadas en muestras de placa subgingival de 5 sujetos mexicanos con periodontitis crónica. La prevalencia fue calculada para cada especie en cada muestra de placa, promediada entre las muestras de cada sujeto y posteriormente entre los sujetos de la población.

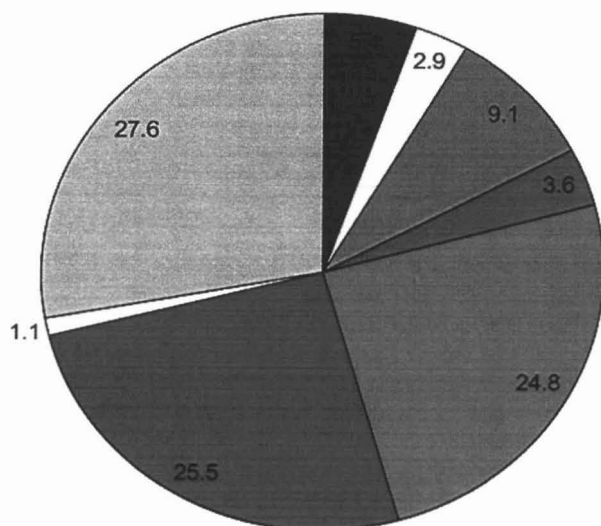


FIGURA 6. Proporción promedio (% de cuentas totales de las sondas de DNA) de complejos bacterianos en 5 sujetos con periodontitis crónica. Las 40 especies bacterianas evaluadas fueron agrupadas de manera similar a la descripción de complejos bacterianos en la placa subgingival (Socransky *et al.*, 1998). Las siguientes excepciones fueron incluidas en la agrupación: *Actinomyces georgiae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* serotipo 1 y *Actinomyces viscosus* se encuentran agrupados en el complejo azul; *Corynebacterium matruchotii*, *Selenomonas artemidis*, *Eubacterium saburreum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Neisseria mucosa*, *Eubacterium sulci*, *Propionibacterium acnes*, *Prevotella melaninogenica*, *Gemella morbillorum* y *Leptotrichia buccalis* se encuentran agrupados en el complejo gris (no clasificados). La proporción de cada grupo de especies bacterianas fue calculada en cada una de las 28 muestras de cada sujeto de estudio, promediada para cada sujeto y después entre los sujetos de la población de estudio.

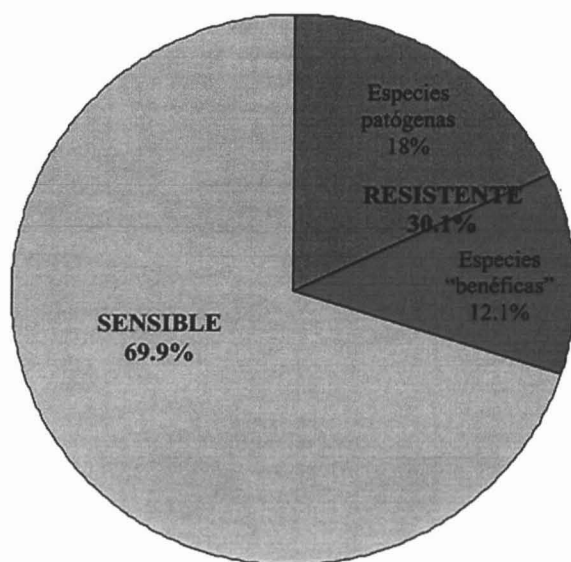


FIGURA 7. Inferencia de las proporción promedio (% de cuentas totales de las sondas de DNA) de especies bacterianas en muestras de placa subgingival de sujetos mexicanos con periodontitis crónica. Las especies fueron agrupadas de acuerdo con los resultados obtenidos en el experimento para determinar las CMIs de cepas de referencia como sensibles o resistentes utilizando el punto de corte sugerido por la NCCLS para eritromicina. La gráfica muestra la proporción de especies "benéficas" y patógenas periodontales que fueron resistentes a la eritromicina. La proporción de cada grupo de especies bacterianas fue calculada en cada una de las 28 muestras de cada sujeto de estudio, promediada para cada sujeto y después entre los sujetos de la población de estudio. La proporción de *Treponema denticola* y *Actinomyces georgiae* no fue considerada para los cálculos de la gráfica debido a que dichas especies no fueron evaluadas en el experimento para determinar CMIs.

IX. ANEXOS

ANEXO 1. Forma de consentimiento informado.

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Dra. Laurie Ann Ximénez-Fyvie.

CLÍNICOS RESPONSABLES: Dra. Velia Jacobo-Soto.

Dra. Argelia Almaguer-Flores.

INSTITUCIÓN: Laboratorio de Genética Molecular

Div. de Estudios de Posgrado e Investigación

Facultad de Odontología, UNAM

TELÉFONOS: 5622-5565 (horas y días hábiles)

04455-2699-7530 (emergencias)

TÍTULO DE LOS PROYECTOS:

Factores microbiológicos y genéticos relacionados con las enfermedades periodontales en México.

(CONACYT # J-34909-M)

Influencia de niveles creviculares de citocinas sobre las enfermedades periodontales en México.

(DGAPA # IN205402)

Espiroquetas periodontales cultivables y no cultivables.

(NIH # DE-10374, NIDCR)

INVITACIÓN A PARTICIPAR: Usted está invitado a participar en cualquiera de tres estudios de investigación que analizan las bacterias de la boca así como las características genéticas y de defensa de las personas que padecen enfermedades de las encías. El primer estudio investiga la relación de algunas bacterias y de la resistencia que tienen las mismas a diferentes antibióticos con las enfermedades de las encías, así como las características genéticas de las personas que padecen dichas enfermedades. El segundo estudio investiga la relación entre

algunas características del sistema de defensa de las personas y el estado de salud de las encías. El tercer estudio investiga el papel que juegan algunas bacterias específicas en las enfermedades de las encías.

PROPÓSITO: Usted debe entender que los objetivos del primer estudio son determinar la presencia y cantidad de bacterias que se encuentran en la boca de personas con diferentes tipos de enfermedades de las encías, determinar la resistencia que tienen dichas bacterias a varios antibióticos y comparar las características genéticas entre personas con y sin enfermedades de las encías. El segundo estudio tiene por objetivo comparar la magnitud de la respuesta del sistema de defensa entre personas con y sin enfermedades de las encías y el tercer estudio tiene por objetivo determinar si los tipos de unas bacterias llamadas espiroquetas son diferentes entre personas con y sin enfermedades de las encías.

PROCEDIMIENTOS: Usted debe entender que para participar en estos estudios debe haber nacido en la República Mexicana, debe encontrarse en buen estado general de salud, debe tener por lo menos 20 dientes naturales en la boca, no puede haber recibido ningún tipo de tratamiento periodontal en el pasado, no puede haber recibido una limpieza dental profesional en el último mes y no puede haber tomado ningún tipo de antibiótico en los últimos 3 meses. Asimismo, en el caso de ser mujer, no puede estar embarazada ni lactando.

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

- La realización de una evaluación periodontal completa, la cual consistirá en medir la profundidad de las pequeñas “bolsas” que se encuentran entre sus dientes y sus encías. Estas medidas serán tomadas con un instrumento especial llamado sonda que será introducido en dichas “bolsas” en 6 lugares diferentes alrededor de cada diente de su boca. Este es un procedimiento de

rutina ampliamente utilizado en la práctica dental. Además de lo anterior, se le realizará una evaluación general de la salud de sus encías para saber si sangran, si están inflamadas, si están enrojecidas, etc.

- La obtención de algunos de sus datos generales y médico, lo cual consistirá en el llenado de una historia clínica con preguntas que le serán leídas por el clínico que lo atienda y la medición de su peso, estatura, presión sanguínea, pulso y porcentaje de grasa corporal.
- La toma de un máximo de 36 muestras de placa dentobacteriana, lo cual se realizará tomando, con un instrumento dental, una muestra de la película blanquecina que se forma naturalmente sobre la superficie de sus dientes (placa dentobacteriana) de todos los dientes de su boca y en algunos casos, dos muestras de un mismo diente. Este procedimiento no es doloroso aunque en algunas ocasiones puede ser un poco molesto. Cada muestra de placa dentobacteriana será colocada dentro de un tubo.
- La toma de 1 muestra de 3 ml de sangre, lo cual se realizará siguiendo los mismos procedimientos que se llevan a cabo en laboratorios de diagnóstico clínico acreditados. Dicho procedimiento consiste en colocar una liga gruesa ligeramente apretada alrededor de su brazo para facilitar la visualización de sus venas. Posteriormente, se introduce una aguja a una vena de alguno de sus brazos y se deposita la sangre en un tubo de vidrio conforme sale de la vena. La liga y aguja serán retiradas y el sitio de punción será cubierto con un curita una vez que el clínico determine que ha dejado de sangrar. Este procedimiento puede causarle dolor o molestias principalmente en el sitio de la punción.
- La toma de 4 muestras de fluido de sus encías, lo cual se realizará colocando una tira de papel en el espacio entre sus dientes y sus encías en 4 dientes de su boca. Este procedimiento no

conlleve ninguna molestia. Cada muestra será medida en un aparato para determinar la cantidad de fluido y colocada en un tubo.

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

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

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

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

BENEFICIOS: Usted debe entender que su participación no le proporcionará ningún beneficio inmediato ni directo. Sin embargo, gracias a su participación, se obtendrá información nueva y más extensa sobre las causas y los factores que intervienen en las enfermedades de las

encias en la población de México, lo cual podría ayudar en un futuro no sólo al mejor entendimiento de dichas enfermedades, sino también a la búsqueda y empleo de nuevos tratamientos para nuestra población.

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

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

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

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

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

_____ Nombre del Sujeto	_____ Firma del Sujeto	_____ Fecha (Dia/mes/año)
_____ Nombre del Clínico Responsable	_____ Firma del Clínico Responsable	_____ Fecha (Dia/mes/año)