



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**PORCENTAJE DE RESISTENCIA AL METRONIDAZOL Y
DESCRIPCIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA PLACA
DENTOBACTERIANA SUBGINGIVAL EN SUJETOS
MEXICANOS CON PERIODONTITIS CRÓNICA**

TESIS

QUE PRESENTA:

ARACELI SALGADO MARTÍNEZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

CIRUJANO DENTISTA

TUTOR:

DRA. LAURIE ANN XIMÉNEZ FYVIE



MÉXICO, D.F.

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A la Universidad Nacional Autónoma de
México por abrirme las puertas al
conocimiento.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

A. Antecedentes bibliográficos	1
Enfermedad periodontal	1
Composición microbiológica de la placa dentobacteriana	4
Terapia antibiótica sistémica para el tratamiento de la enfermedad periodontal	6
Usos del metronidazol en la terapia periodontal	7
Metronidazol: mecanismos de acción y resistencia	10
B. Planteamiento y justificación del problema	11
C. Objetivos	11
D. Hipótesis	12

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Diseño experimental	13
B. Población de estudio	13
Criterios de selección	13
Captura de sujetos de estudio	14
C. Evaluación clínica	14
D. Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias de cepas de referencia control	15
E. Determinación del porcentaje de la flora total cultivable subgingival resistente al metronidazol	16
F. Determinación de la composición microbiológica de la placa subgingival	17
Recolección y procesamiento de muestras	17
Especies bacterianas y condiciones de cultivo	18
Purificación de DNA bacteriano y preparación de sondas de DNA	18
Hibridaciones DNA-DNA	19
Enumeración de especies bacterianas	20
G. Análisis estadístico de datos	20

III. RESULTADOS

A. Concentraciones mínimas inhibitorias de cepas de referencia control	23
B. Porcentaje de resistencia de la microbiota total cultivable en muestras de placa dentobacteriana subgingival	23
C. Composición microbiológica de la placa subgingival	24

IV. DISCUSIÓN

26

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

31

VI. TABLAS

42

VII. FIGURAS

48

VIII. ANEXOS

56

I. INTRODUCCIÓN

A. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

ENFERMEDAD PERIODONTAL

El periodonto está formado por encía, ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar, los cuales dan soporte y protección al diente. En estado de salud, la encía es de color rosado pálido, presenta puntilleo y tiene una consistencia firme. El ligamento periodontal está constituido por fibras de tejido conectivo que rodean la superficie radicular y vinculan al cemento radicular con el hueso (Lindhe *et al.*, 1997). Los cambios patológicos más comunes de los tejidos periodontales son los procesos inflamatorios gingivales y la pérdida de tejido óseo, dichos cambios son generados por la acumulación de patógenos periodontales en la placa dentobacteriana (Genco *et al.*, 1993; Genco, 1996; Page, 1991). La gingivitis es un proceso inflamatorio reversible de la encía, causado por la acumulación de placa dentobacteriana en el cual el epitelio de unión, aunque modificado por la enfermedad, se une al diente en su nivel original y no existe pérdida de tejido óseo. En la periodontitis por otra parte, ocurre una lucha entre los agentes patógenos y el huésped dando como resultado los signos y síntomas característicos de la enfermedad tales como la profundización de la bolsa y la migración apical de la inserción (Genco *et al.*, 1993). La acumulación de productos bacterianos presentes en la placa subgingival pueden dañar a los tejidos de soporte del diente directamente. Algunos de dichos productos incluyen enzimas capaces de hidrolizar constituyentes de los tejidos, así como también ácidos grasos y orgánicos, leucotoxinas y endotoxinas que pueden activar respuestas inflamatorias en el huésped.

Ciertos grupos de especies bacterianas como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* y *Treponema denticola* juegan un papel

etiológico fundamental en el desarrollo de enfermedades periodontales (Haffajee & Socransky, 1994; Haffajee *et al.*, 1991b; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000b). La respuesta inmunológica ante dichos patógenos inicia con la presencia de neutrófilos y macrófagos. Posteriormente, se desencadena una respuesta inmune donde los linfocitos T y B son los principales mediadores. Conforme la enfermedad avanza, puede haber presencia de proteínas del complemento y complejos antígeno-anticuerpo (Pihlstrom, 2001; The-American-Academy-of-Periodontology, 2000a; The-American-Academy-of-Periodontology, 2000b; The-American-Academy-of-Periodontology, 2000c), dando como resultado un intento del sistema inmune para eliminar a los agentes infecciosos y las sustancias secretadas por los mismos. Este proceso lleva a la destrucción del ligamento periodontal, provocando resorción del tejido óseo alveolar así como eventualmente a la pérdida de las estructuras de soporte del diente.

Debido a la naturaleza de la enfermedad periodontal, la predicción de la progresión de la enfermedad es importante. Existen estudios que sugieren la presencia de factores que pueden modificar la predisposición en el inicio y avance de la enfermedad periodontal (Craig *et al.*, 2001; Ezzo & Cutler, 2003; Haffajee & Socransky, 2001a; Kornman, 2001; Meisel *et al.*, 2002; Meisel *et al.*, 2003; Preshaw *et al.*, 2004). Estos modificadores se pueden dividir en factores internos (endógenos) y externos. Dentro de los factores modificadores externos para la enfermedad periodontal, se encuentra el tabaquismo. Estudios han demostrado que dicho hábito es un riesgo adicional para la progresión de la enfermedad periodontal (Haffajee & Socransky, 2001b). Comparando sujetos fumadores con no fumadores, en los primeros hubo un deterioro en la efectividad de la terapia periodontal. En la actualidad se considera que el tabaquismo es un factor modificador externo de gran importancia para el inicio y la progresión de la enfermedad periodontal. En un estudio se demostró que los fumadores tenían menos inflamación clínica y sangrado gingival que los no fumadores, esto es de vital importancia ya que se puede enmascarar

la enfermedad periodontal seria en fumadores (Axelsson *et al.*, 1998). En otro estudio, se demostró que la temperatura en la bolsa periodontal es perceptiblemente más alta en sitios sanos y enfermos de fumadores, el aumento en la temperatura de la bolsa reduce los potenciales a corto plazo de óxido-reducción en la placa dentobacteriana (Dinsdale *et al.*, 1997). Los niveles reducidos se asocian a una disminución de leucocitos polimorfonucleares y al aumento en la proporción de bacterias anaerobias (Palmer *et al.*, 2001). En dicho estudio se demostró que se creaba un ambiente subgingival favorable para la colonización y crecimiento de patógenos periodontales anaerobios Gram negativos con el aumento en la temperatura de la bolsa, lo cual fue corroborado en estudios previos (Loesche *et al.*, 1983; Mettraux *et al.*, 1984). Otros factores de riesgo externo son la mala higiene dental, nivel socioeconómico bajo aunado a un nivel de enseñanza bajo, aislamiento geográfico (Fox *et al.*, 1994; Genco, 1996) y enfermedades adquiridas particularmente la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Murray, 1994; Murray *et al.*, 1991).

Los modificadores internos relacionados con la enfermedad periodontal incluyen factores genéticos y enfermedades sistémicas. Los factores genéticos en la enfermedad periodontal se manifiestan en forma agresiva principalmente en adolescentes y niños (Michalowicz *et al.*, 1991). Algunos estudios han reportado específicamente un genotipo polimórfico de los genes que codifican la interleucina 1 alfa y beta (IL-1A e IL-1B) asociado con la severidad de la enfermedad periodontal en no fumadores (Kornman *et al.*, 1997). En un estudio longitudinal se demostró que la combinación del cigarro y los polimorfismos de los genes IL-1A e IL-1B son un factor de riesgo para la enfermedad periodontal (Kornman & di Giovine, 1998; Meisel *et al.*, 2002; Meisel *et al.*, 2003). De las enfermedades sistémicas, la diabetes mellitus tipo I es considerada un importante factor de riesgo de la enfermedad periodontal. La susceptibilidad de los pacientes diabéticos a la destrucción periodontal puede ser multifactorial y depende de los

defectos de las células fagocíticas tales como los leucocitos polimorfonucleares, de los problemas vasculares y de los defectos estructurales de los tejidos periodontales (Genco & Loe, 1993; Grossi *et al.*, 1994). Los indicadores microbianos de riesgo son la presencia en cantidades elevadas de *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *Prevotella intermedia*, *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium nucleatum* (Grossi *et al.*, 1994; Haffajee *et al.*, 1991a; Lindhe *et al.*, 1997; Pihlstrom, 2001; The-American-Academy-of-Periodontology, 2000a; The-American-Academy-of-Periodontology, 2000b; The-American-Academy-of-Periodontology, 2000c; Tsai *et al.*, 2003; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000b).

COMPOSICIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA PLACA DENTOBACTERIANA

La microbiota bucal está constituida por más de 300 especies bacterianas diferentes, que en conjunto conforman la placa adherida a diferentes superficies de la cavidad bucal (Socransky & Haffajee, 1994). En un surco gingival enfermo existen cuentas bacterianas de aproximadamente 10^8 . Los microorganismos de la placa dentobacteriana se encuentran organizados en una estructura que se conoce como biopelícula (Costerton *et al.*, 1987; Costerton *et al.*, 1995; Stoodley *et al.*, 2002), que se ha definido como poblaciones de bacterias agrupadas que se encuentran embebidas dentro de una matriz de exopolisacáridos, que se adhieren entre sí y a una superficie (Costerton *et al.*, 1987; Darveau *et al.*, 1994). En esta biopelícula, se producen una diversidad de productos bacterianos tóxicos tales como, ácidos grasos y orgánicos como el butírico, propiónico, aminas, compuestos volátiles del azufre, indol, amoníaco, glucanos, endotoxinas y antígenos que son capaces de destruir el tejido periodontal (Lindhe *et al.*, 1997; Pihlstrom, 2001). El desarrollo de la biopelícula empieza en las primeras horas después de una limpieza profesional con la formación de la película adquirida que consiste en proteínas y glucoproteínas de la saliva y el fluido crevicular. Sobre dicha película se adhieren algunos grupos

de bacterias conocidas como colonizadores tempranos, que incluyen bacilos pleomórficos anaerobios facultativos Gram positivos como especies de *Actinomyces*, y diversas especies de *Streptococcus* de los cuales *Streptococcus sanguinis* es el más frecuentemente detectado. Dichos colonizadores tempranos, proveen medios favorables para la adhesión y congregación de otras especies bacterianas (Genco *et al.*, 1993; Kolenbrander, 1995; Lindhe *et al.*, 1997). En una segunda etapa, se presenta la coagregación que es producida por las adhesinas proteicas de una bacteria a su receptor ya sea sacárido o proteico específico encontrado en la superficie de otra bacteria. Esta coagregación se da entre especies bacterianas como *Fusobacterium*, *Prevotella* y *Corynebacterium*, los cuales tienen la función de puente entre los colonizadores tempranos que se adhieren al diente y los colonizadores tardíos como *T. forsythensis*, *P. gingivalis*, *T. denticola* y *Selenomonas noxia* entre otros (Darveau *et al.*, 1994; Kolenbrander *et al.*, 1989). Estos grupos de bacterias siguen proliferando y asociándose hasta lograr una mutua interacción y dependencia.

Para un mejor entendimiento de las asociaciones bacterianas, se describieron cinco complejos bacterianos a los cuales se les designaron colores (Socransky *et al.*, 1998). En el estudio se tomaron 13,261 muestras de placa dentobacteriana de 185 pacientes a las cuales se les analizó la presencia de 40 especies bacterianas por medio de sondas de DNA. A continuación, se mencionan algunas de las especies bacterianas incluidas en los complejos (**Figura 1**).

- Complejo Rojo: *T. forsythensis*, *P. gingivalis* y *T. denticola*.
- Complejo Naranja: *F. nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *P. intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Micromonas micros*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis* y *Streptococcus constellatus*.

- Complejo Verde: *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* y *A. actinomycetemcomitans* serotipo a.
- Complejo Morado: *Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus*.
- Complejo Amarillo: *S. sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus intermedius* y *Streptococcus gordonii*.
- No agrupados : *Actinomyces viscosus*, *A. actinomycetemcomitans* serotipo b y *S. noxia*.

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

El conocimiento de la organización y asociaciones de las especies bacterianas que colonizan la placa dentobacteriana, facilita el entendimiento de las interacciones que existen entre ellas y podría llevar a la creación de estrategias más adecuadas y específicas para el control de la enfermedad periodontal.

TERAPIA ANTIBIÓTICA SISTÉMICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Existen dos formas de administración de los antibióticos usados en la terapia periodontal, la administración sistémica y la local. Dos factores críticos 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 se refiere a los niveles alcanzados por el antibiótico en el sitio de colonización de especies periodontopatógenas. El segundo factor es la concentración mínima inhibitoria (CMI) definida como la concentración mínima del antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de las especies

bacterianas *in vitro*. La actividad antimicrobiana entonces se define como la relación que existe entre la C_{GCF} y la CMI (Goodson, 1994).

En la actualidad no existen antibióticos ideales para el tratamiento de las enfermedades periodontales. Aunque un gran número de bacterias bucales son susceptibles a diversos agentes *in vitro*, es difícil determinar la susceptibilidad de dichas especies cuando se encuentran organizadas dentro de una estructura de biopelícula. Además, existe poca información en cuanto a la concentración que diferentes antimicrobianos pueden alcanzar en el fluido crevicular. Por lo tanto, en muchos casos se utilizan combinaciones de diferentes antibióticos para eliminar al mayor número de especies bacterianas de las bolsas periodontales (Genco *et al.*, 1993). Varios estudios han reportado que la efectividad del metronidazol en el tratamiento de las enfermedades periodontales se incrementa significativamente cuando este se utiliza en combinación con amoxicilina (Winkel *et al.*, 2001). Algunos estudios han descrito mejorías clínicas y microbiológicas superiores con la combinación de dichos agentes que cuando estos dos fármacos son utilizados por separado (Serino *et al.*, 2001; Walker & Karpinia, 2002; Winkel *et al.*, 2001).

USOS DEL METRONIDAZOL EN LA TERAPIA PERIODONTAL

El metronidazol es un potente nitroimidazol bactericida. Su uso en odontología es para tratar principalmente gingivitis, gingivitis ulceronecrosante aguda, periodontitis crónica y periodontitis agresiva. Se emplea como tratamiento combinado con la terapia de raspado y alisado radicular y/o cirugía, o bien en combinación con otros antibióticos; de los cuales el más frecuentemente utilizado es la amoxicilina. Algunos estudios sugieren que estas terapias permiten la supresión del crecimiento de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *T. forsythensis* los cuales están presentes en mayor proporción y en números más elevados en sitios con enfermedad periodontal (Beikler *et al.*, 2003; Genco *et al.*, 1993).

Recientemente, se han reportado buenos resultados terapéuticos con la combinación de metronidazol y terapia mecánica ya que disminuyen el sangrado al sondeo y la profundidad de la bolsa (Winkel *et al.*, 2001). La combinación de metronidazol con amoxicilina se ha recomendado para la eliminación de bacterias anaerobias específicas que están presentes en algunos sitios con enfermedad periodontal. Se ha reportado que la utilización del raspado y alisado radicular como tratamiento único elimina la placa y la inflamación gingival pero reduce muy poco la profundidad de la bolsa por lo que se recomienda la terapia antibiótica junto con la terapia mecánica (Bollen & Quirynen, 1996).

Algunos estudios han reportado que el metabolito hidroxilado del metronidazol es el responsable de la supresión de *A. actinomycetemcomitans* por lo que se recomienda como una buena elección para la periodontitis agresiva (Herrera *et al.*, 2002; Lindhe *et al.*, 1997; Sigusch *et al.*, 2001; Walker & Karpinia, 2002). En la periodontitis agresiva el metronidazol pareció mejorar las condiciones clínicas durante 6 meses en comparación con el raspado y alisado por sí solo (Soder *et al.*, 1990a; Soder *et al.*, 1990b). Se comprobó la supresión de *A. actinomycetemcomitans* 18 meses después de la limpieza mecánica en combinación con metronidazol (200mg diarios, durante 10 días) en pacientes con periodontitis agresiva (Saxen & Asikainen, 1993). Otros estudios han sugerido que el tratamiento con metronidazol (750mg a 1g al día por 14 días) reduce la necesidad de cirugía periodontal (Loesche *et al.*, 1992). El tratamiento con metronidazol sistémico (200mg 4 veces al día, por 14 días) en combinación con la terapia mecánica reduce el número de espiroquetas (Loesche *et al.*, 1991). Durante la terapia con metronidazol se reducen las proporciones de *Selenomonas*, espiroquetas, *P. intermedia* y *P. gingivalis* comparada con el raspado y alisado radicular (Loesche *et al.*, 1992). Cuando se combina con amoxicilina, disminuyen los niveles de *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *P. intermedia*

y *A. actinomycetemcomitans* (Buchmann *et al.*, 2003; Feres *et al.*, 2001; Hung & Douglass, 2002; Winkel *et al.*, 2001).

METRONIDAZOL: MECANISMOS DE ACCIÓN Y RESISTENCIA

El descubrimiento de la azomicina (2- nitronidazol) en 1959 (Cosar & Julou, 1959) y la demostración de sus propiedades tricomonocidas fueron los puntos de partida para la síntesis química y el estudio biológico de muchos nitroimidazoles. Como resultado, se sintetizó un compuesto, 1-(β -hidroxietil)-metil-5-nitroimidazol, llamado actualmente metronidazol (Goodman-Gilman *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 1999) (**Figura 2**).

El metronidazol es considerado como un profármaco debido a que necesita activación metabólica por parte de los microorganismos sensibles. Las primeras investigaciones sugirieron que el metronidazol inhibía la síntesis del DNA. Sin embargo, diversos estudios han indicado que el metronidazol reducido genera la pérdida de la estructura helicoidal del DNA. El metronidazol actúa provocando ruptura de la estructura de la molécula de DNA de los microorganismos anaerobios estrictos y no tiene acción contra bacterias aerobias Gram positivas y microaerofílicas (Goodman-Gilman *et al.*, 2000).

Dicho fármaco ingresa a las células por difusión pasiva, su grupo nitro se reduce obligando a las bacterias anaerobias a reducir su acción en el piruvato: en el sistema ferroxidoreductasa, acepta electrones de la cadena transportadora de electrones, se genera un gradiente que conduce a la formación de compuestos intermedios de breve duración, químicamente reactivos. Estos productos transitorios tóxicos actúan recíprocamente con el DNA causando ruptura del filamento y la desestabilización de la hélice, dando como resultado la muerte de la célula. Los productos intermedios citotóxicos se descomponen en productos finales

inactivos incluyendo la acetamida y N-(2-hidroxietil) ácido oxámico (Goodman-Gilman *et al.*, 2000; Land & Johnson, 1997; Lindhe *et al.*, 1997; Nelson, 2003; Yu *et al.*, 1999).

La concentración que alcanza el metronidazol en el fluido crevicular es de 10 a 20 µg/ml de 2 a 4 horas después de una administración oral de 750mg (Notten *et al.*, 1982). En otros estudios se ha descrito la presencia de metronidazol en sangre y fluido crevicular 18 horas después de ser administrado (Britt & Pohlod, 1986).

El metronidazol, en los últimos años, tomó notoriedad por su actividad contra anaerobios Gram negativos como especies de *Bacteroides* tales como: *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron* y *Bacteroides vulgatus*; de *Prevotella* como: *Prevotella melaninogenica*, *P. intermedia*, *Prevotella bivia*, *Prevotella disiens*, *Prevotella oris*, *Prevotella oralis* y *Prevotella buccae*; de *Porphyromonas* como: *P. gingivalis* y *Porphyromonas endodontalis*; y de *Fusobacterium* como *F. nucleatum*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium mortiferum* y *Fusobacterium varium*.

En bacterias Gram positivas tiene acción contra especies de *Clostridium* como: *Clostridium bifermentans*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium novyi* y *Clostridium difficile*, especies de *Actinomyces*; *Lactobacillus*, *Mobiluncus*; y de *Peptostreptococcus* tales como: *Peptostreptococcus magnus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptostreptococcus asaccharolyticus* y *Peptostreptococcus prevotti* así como especies de *Veillonella* y *M. micros*.

Otras bacterias anaerobias facultativas como *Helicobacter pylori*, *Gardnerella vaginalis*, *A. actinomycetemcomitans* y especies de *Capnocytophaga* también son sensibles al metronidazol. El metronidazol actúa contra protozoarios como *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba histolytica* entre otros (Samuelson, 1999; Yu *et al.*, 1999).

La resistencia adquirida al metronidazol es extremadamente rara en bacterias anaerobias; sin embargo, se ha reportado que se puede dar al disminuir la actividad del piruvato:ferroxi

oxido-reductasa en la cual se reduce la activación y la entrada del metronidazol (Narikawa *et al.*, 1991). La resistencia del metronidazol en especies de *Bacteroides* se ha asociado a 5 genes nim A, B, C, D, E y F los cuales pueden estar codificados en el genoma o en plásmidos (Gal & Brazier, 2004), algunos de los plásmidos demostraron ser transferidos por conjugación y tienen el potencial para ser introducidos en especies bacterianas orales como *Bacteroides*, *P. gingivalis* y *P. intermedia* (Trinh & Reysset, 1996). Asimismo, se reportó la resistencia de *H. pylori* debida a una mutación cromosomal en el gen *rdxA* el cual codifica la nitroreductasa NADPH (Samuelson, 1999).

B. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

La meta en el tratamiento de la enfermedad periodontal es la eliminación de los agentes etiológicos. Dicha eliminación puede llevarse a cabo con el empleo de la terapéutica mecánica y/o farmacológica. Sin embargo, en nuestro país el uso indiscriminado de los antibióticos, la falta de control para la adquisición de los mismos y la utilización de dosis terapéuticas inadecuadas, han incrementado la resistencia de cepas bacterianas. Esta investigación está encaminada a la determinación del porcentaje de microorganismos resistentes al metronidazol en la placa dentobacteriana subgingival, siendo éste uno de los tratamientos más comunes para la periodontitis crónica en nuestro país.

C. OBJETIVOS

1. Determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de metronidazol para cepas de referencia control.
2. Determinar el porcentaje de la flora total cultivable resistente al metronidazol en muestras de placa dentobacteriana subgingival de sujetos mexicanos con periodontitis crónica.

3. Describir la composición microbiológica de la placa dentobacteriana subgingival de sujetos mexicanos con periodontitis crónica.

D. HIPÓTESIS

1. Un gran porcentaje de la microbiota subgingival presentará resistencia al metronidazol en pacientes mexicanos con periodontitis crónica.

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

II. 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_s de metronidazol, 2 muestras de placa dentobacteriana subgingival de cada uno de 5 sujetos de estudio para determinar el porcentaje de la flora total cultivable resistente al metronidazol 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.

B. POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población 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.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Para la inclusión de sujetos de estudio se tomaron en cuenta los criterios que se presentan en la **tabla 1**. Fueron excluidos del estudio todos los sujetos que presentaron embarazo o que se encontraban 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 el tipo y 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 en la que se delineó explícitamente el protocolo del estudio (**Anexo 1**). Se pidió a los sujetos 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 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 realizaron 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 se registraron 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 se utilizó para el análisis de datos. El resto de los parámetros clínicos se evaluaron en una sola ocasión con mediciones dicotómicas de presencia (1) ó ausencia (0). Las características clínicas de la población de estudio se presentan en la **tabla 2**.

D. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS DE CEPAS DE REFERENCIA CONTROL

Todas 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.

En la **tabla 3** se presenta una lista de las 40 cepas de referencia del American Type Culture Collection (ATCC) que fueron utilizadas para la determinar las CMI.

Las cepas se sembraron en placas de agar enriquecido (agar base para *Mycoplasma* (Becton Dickinson, Microbiology Systems, BBL®, Sparks, MD, USA) 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, México), 0.3 µg/ml de menadione marca Sigma (vitamina K (Sigma) y 5 µg/ml de hemina (Sigma)) y se incubaron en condiciones anaeróbicas (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂). Las cepas de referencia fueron suspendidas en tubos con caldo de cultivo enriquecido (caldo base para *Mycoplasma*, (Becton Dickinson), 5 µg/ml de hemina (Sigma) y 0.3 µg/ml de menadione (Sigma)) y se diluyeron hasta obtener una densidad óptica (OD) = 1 a 600 nm en un espectrofotómetro. Las cepas se

transfirieron por duplicado a placas con agar enriquecido sin antibiótico y con diferentes concentraciones de metronidazol (0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128µg/ml). Las 40 cepas fueron incubadas a 35°C por 7 días en condiciones anaeróbicas (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂). Transcurrido el tiempo de incubación se analizó visualmente el crecimiento de las cepas en cada concentración del antibiótico.

E. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE LA FLORA TOTAL CULTIVABLE SUBGINGIVAL RESISTENTE AL METRONIDAZOL

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 se tomaron utilizando curetas Gracey estériles y colocadas en tubos de ensayo individuales con 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 5 segundos con flujo constante de nitrógeno. 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 metronidazol (0.5, 1, 2, 4, 8 y 16µg/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 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.

F. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA PLACA SUBGINGIVAL

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 3**).

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

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).

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 min. cada vez a 68°C en buffer de fosfato (0.1x SSC y 0.1% SDS) utilizando un baño con circulación.

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.

G. 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 CMI's de cada una de las 40 cepas de referencia control. Utilizando el punto de corte sugerido por la National Comitee for Laboratory Standards (NCCLS) de 16 µg/ml, las CMI's fueron utilizadas para determinar la resistencia o sensibilidad al metronidazol 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 µg/ml de metronidazol 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 ± EEM (**Figura 4**). Dichos datos fueron utilizados también para determinar las concentraciones requeridas de metronidazol para inhibir el 10%, 50% y 90% (CMI¹⁰, CMI⁵⁰ y CMI⁹⁰) 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 x 10⁵ (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 ± EEM para especies

bacterianas individuales (**Figuras 5 y 6**) y la proporción como porcentaje promedio de grupos de microorganismos (**Figuras 7 y 8**).

III. RESULTADOS

A. CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS DE CEPAS DE REFERENCIA CONTROL

En la **tabla 5** se resumen las CMI de las 40 cepas de referencia control. La susceptibilidad (S) y resistencia (R) de cada cepa están indicadas en las columnas 3 y 6 de la tabla considerando el punto de corte recomendado por la NCCLS para el metronidazol de 16 µg/ml. 24 de las 40 cepas de referencia (60%) fueron resistentes al metronidazol incluyendo las 7 especies de *Streptococcus* y las 4 de *Actinomyces* probadas. Otras especies resistentes incluyeron importantes patógenos periodontales como *A. actinomycetemcomitans* serotipo b, *T. forsythensis*, *M. micros* y *S. noxia*. Sin embargo, otros patógenos periodontales como *A. actinomycetemcomitans* serotipo a, *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *F. nucleatum* fueron sensibles al antibiótico.

La concentración de metronidazol capaz de inhibir el 10% y 50% de la microbiota total cultivable fue de 0.5 µg/ml. Sin embargo, el 90% del crecimiento bacteriano total fue inhibido a una concentración mayor a 16 µg/ml (**Tabla 6**).

B. PORCENTAJE DE RESISTENCIA DE LA MICROBIOTA TOTAL CULTIVABLE EN MUESTRAS DE PLACA DENTOBACTERIANA SUBGINGIVAL

En la **figura 4** se resumen los porcentajes promedio de UFCs que mostraron crecimiento en presencia de cada una de las concentraciones de metronidazol. Del 23.9% al 14.5% de la flora subgingival total cultivable mostró crecimiento en presencia de las 6 concentraciones de metronidazol evaluadas. Se observaron sólo cambios mínimos en el porcentaje promedio de UFCs presentes en las diferentes concentraciones del antibiótico sin una tendencia clara a la disminución en las concentraciones más elevadas.

C. COMPOSICIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA PLACA SUBGINGIVAL

En la **figura 5** 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 *Corynebacterium 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 6** 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 7** 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 representaron 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*, *Eubacterium sulci*, *Propionibacterium acnes*, *P. melaninogenica*, *Gemella morbillorum* y *Leptotrichia 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 8** se presenta una inferencia de las proporciones promedio de los grupos de microorganismos que pudieron haber sido sensibles y resistentes al metronidazol en las muestras de placa dentobacteriana. De acuerdo con los resultados de las CMI para cepas de referencia se infirió que el 55.1% y el 44.9% de los microorganismos presentes en muestras de placa subgingival pudieron haber sido representados por especies bacterianas sensibles y resistentes al metronidazol respectivamente . Asimismo, el 22.7% de las especies bacterianas en muestras subgingivales pudo haber estado representado por especies periodontopatógenas resistentes al metronidazol.

IV. DISCUSIÓN

El metronidazol es un antibiótico con gran actividad bactericida contra un gran número de bacterias anaerobias y microaerófilas (Freeman *et al.*, 1997). Dicho antibiótico, es ampliamente utilizado en combinación con el raspado y alisado radicular y/o algún otro antibiótico, como la amoxicilina, para el tratamiento de las enfermedades periodontales.

Se han publicado diversos artículos sobre las mejorías clínicas después de la administración de metronidazol tales como, la disminución en la profundidad de la bolsa periodontal, la ganancia en el nivel de inserción y la disminución en el sangrado al sondeo (Flemmig *et al.*, 1998; Van Winkelhoff *et al.*, 1989). Asimismo, se han reportado cambios microbiológicos importantes en los que especies bacterianas como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythensis* y *P. intermedia* fueron eliminadas y/o su proporción disminuida después de la administración de metronidazol (Winkel *et al.*, 1997). La proporción de otras especies bacterianas como *A. odontolyticus*, especies de *Fusobacterium*, *E. corrodens* y espiroquetas fue también reducida (Gusberti *et al.*, 1988).

El desarrollo de resistencia al metronidazol por especies bacterianas periodontales, no ha sido reportado. La escasez de información ha llevado a la generalización de que la resistencia al metronidazol por dichas especies bacterianas es rara, sin embargo, en estudios de especies bacterianas asociadas con infecciones en otras partes de organismo se ha descrito la resistencia al metronidazol de especies tales como *B. fragilis* y *H. pylori* (Banatvala *et al.*, 1994; Noach *et al.*, 1994; Samuelson, 1999). Dichos estudio han señalado que la mayoría de las cepas resistentes presenta resistencia de bajo nivel que puede ser vencida aumentando la dosis de metronidazol.

Sin embargo, el conocimiento de los determinantes genéticos relacionados con la resistencia al metronidazol sigue siendo escaso en la actualidad (Bereswill *et al.*, 2003; Haggoud

et al., 2001). A la fecha, se conoce que en algunas especies de *Bacteroides* la resistencia al metronidazol se asocia a la presencia de 5 genes llamados nim A, B, C, D, E y F los cuales pueden ser codificados en el genoma o en plásmidos (Gal & Brazier, 2004), algunos de estos plásmidos pueden ser transferidos por conjugación y tienen el potencial para ser introducidos en una gran diversidad de especies bacterianas incluyendo aquellas que colonizan la cavidad oral (Trinh & Reysset, 1996).

En el presente estudio el porcentaje de resistencia a cada una de las concentraciones de metronidazol evaluadas fue del 23.9% al 14.5% de la flora subgingival total cultivable. Se observaron cambios mínimos en el porcentaje de UFCs resistentes de una concentración a otra del antibiótico y no existió una tendencia a la disminución en las concentraciones mas elevadas como se había esperado. Este hallazgo se contrapone con otros reportes en la literatura en los que se reportó que de 15 a 20 µg/ml de metronidazol eran suficientes para inhibir la mayoría de las bacterias anaerobias encontradas en la placa subgingival (Britt & Pohlod, 1986). En el presente estudio, se determinó que para inhibir el 90% de las bacterias cultivable en muestras subgingivales de la población mexicana se requieren concentraciones superiores a 16 µg/ml. Cabe mencionar que debido a que la concentración máxima evaluada en el presente estudio fue de 16 µg/ml, no fue posible determinar la CMI⁹⁰ exacta, únicamente se pudo confirmar que en promedio fue >16 µg/ml. Sin embargo, considerando que el punto de corte para metronidazol sugerido por la NCCLS es de 16 µg/ml y que las concentraciones que han sido reportadas de metronidazol en el fluido crevicular después de la administración de 750mg por vía oral oscilan entre 10 y 20 µg/ml (Notten *et al.*, 1982). Esto no representa una limitante real en la interpretación de los resultados del presente estudio. Incluso si supusiéramos que la concentración siguiente a 16 µg/ml (32 µg/ml) hubiera sido la CMI⁹⁰, no sería posible inhibir el

crecimiento del 90% de la microbiota subgingival cultivable clínicamente con la administración de dosis terapéuticas de metronidazol.

En la presente investigación se evaluaron 40 cepas de referencia control a diferentes concentraciones (0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 µg/ml) de metronidazol, para determinar cuales eran resistentes considerando el punto de corte recomendado por la NCCLS. Un resultado inesperado fue que 24 de las 40 cepas de referencia (60%) fueron resistentes a 32 µg/ml o más de metronidazol. Debido a que la actividad bactericida del metronidazol se obtiene principalmente contra bacterias anaerobias, se esperaba que algunas de las especies facultativas evaluadas tales como miembros de los géneros *Actinomyces* y *Streptococcus* mostraran resistencia al antibiótico. Los resultados del presente estudio comprobaron esta suposición, lo cual concuerda con reportes previos en la literatura (Feres *et al.*, 2002). Las cuatro especies de *Actinomyces* (*A. israelii*, *A. naeslundii* 1, *A. odontolyticus* y *A. viscosus*) y las 7 especies de *Streptococcus* (*S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. gordonii*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. oralis* y *S. sanguinis*) fueron resistentes a concentraciones de metronidazol de 64 a >128 µg/ml. Sin embargo, otras especies anaeróbicas estrictas como *E. corrodens*, *M. micros*, *P. endodontalis*, *S. noxia* y *T. forsythensis* mostraron también resistencia al fármaco en concentraciones de 64 a >128 µg/ml.

Cabe destacar que aproximadamente el 46% de las cepas de referencia que mostraron resistencia al metronidazol fueron patógenos periodontales putativos o reconocidos, incluyendo *A. actinomycetemcomitans* serotipo b, *E. corrodens*, *M. micros*, *S. noxia* y *T. forsythensis*. En otros estudios se han reportado también CMI's a metronidazol de algunas de las mismas cepas que fueron resistentes en el presente estudio. Sin embargo, no en todos los casos se encontraron coincidencias. *M. micros* fue evaluada en dos estudios en los que se reportaron CMI's de 8 µg/ml (Citron *et al.*, 1995) y 12 µg/ml (Poulet *et al.*, 1999). En un estudio similar se reportó la CMI de 8 µg/ml para *T. forsythensis*. En lo que respecta a *A. actinomycetemcomitans* los reportes son

controversiales. En algunos estudios se determinó la susceptibilidad de dicho microorganismo a metronidazol con una CMI de 8µg/ml (Baker *et al.*, 1985), mientras que en otros se reportó resistencia al mismo antibiótico (Eick *et al.*, 2004; Madinier *et al.*, 1999; Miyake *et al.*, 1995). Una posible explicación de esta discrepancia es que la mayoría de dichos estudios no especificaron el serotipo de *A. actinomycetemcomitans* evaluado. En el presente estudio fueron evaluados los serotipos a y b, y se determinó que el serotipo a era sensible a una concentración de 8 µg/ml, mientras que el serotipo b fue resistente a una concentración de 64 µg/ml.

Otros patógenos periodontales como *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *F. nucleatum* fueron sensibles a concentraciones por debajo del punto de corte sugerido para el metronidazol, lo cuál concuerda con estudios previos en los cuales se reportaron CMIs de metronidazol de 0.122 µg/ml para *P. gingivalis*, 0.98 µg/ml para *P. intermedia* y 0.242 µg/ml para especies de *Fusobacterium* (Hecht *et al.*, 1995; Poulet *et al.*, 1999).

La microbiota subgingival de la población de estudio estuvo predominada tanto en niveles como en prevalencia y proporción por especies consideradas como patógenos periodontales. Algunas de dichas incluyeron *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *P. nigrescens*, *P. intermedia*, *M. micros* y *T. denticola*. Se detectaron niveles, prevalencia y proporción bajos de la mayoría de las especies “benéficas” periodontales tales como *C. matruchotii*, *A. naeslundii* 1, *A. israelii*, *A. odontolyticus* y *A. viscosus*. Este resultado no fue sorprendente debido a que en la población de estudio se incluyeron únicamente sujetos con periodontitis crónica severa. Existe una gran cantidad de información en la literatura en la que se demuestra que en poblaciones con enfermedad periodontal los niveles, prevalencia y proporción de especies patógenas periodontales se encuentran aumentados en comparación a poblaciones periodontalmente sanas y que dicho aumento se da a expensas de las especies “benéficas” periodontales (Ali *et al.*, 1997; Haffajee *et*

al., 1999; Haffajee *et al.*, 1998; Socransky & Haffajee, 1991; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000a; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000b).

Tomando en consideración los resultados de la composición microbiológica de la placa subgingival y de las CMI de cepas de referencia, se pudo inferir que una proporción significativa (22.7%) de las especies que se encontraron en la placa subgingival de sujetos mexicanos con periodontitis crónica, pudieron haber sido patógenos periodontales resistentes al metronidazol. Estos resultados se contraponen a otros estudios en los que se ha reportado una gran efectividad del metronidazol contra patógenos periodontales en poblaciones de otras ubicaciones geográficas (Kleinfelder *et al.*, 1999; Poulet *et al.*, 1999) y concuerdan con un reporte en el que fueron evaluados 9 antibióticos; incluyendo el metronidazol, concluyendo que el medicamento menos efectivo y ante el cual se presentó el porcentaje más elevado de resistencia de microorganismos de la placa subgingival fue el metronidazol (Walker *et al.*, 1983).

En conclusión, los resultados del presente estudio sugieren que para el tratamiento de la periodontitis crónica en la población mexicana, la utilización de metronidazol puede no ser efectiva. Esto es debido a que un alto porcentaje de la flora subgingival total cultivable mostró crecimiento en presencia de metronidazol y no fue posible inhibir el 90% del crecimiento bacteriano con concentraciones de metronidazol por debajo del punto de corte sugerido por la NCCLS. Asimismo, de acuerdo con las concentraciones alcanzables de metronidazol en el fluido crevicular, los presentes resultados indican que no sería posible inhibir el 90% del crecimiento bacteriano con la administración de dosis terapéuticas del antibiótico. Finalmente, de acuerdo con la composición microbiológica de la placa subgingival en la población de estudio y las CMI de las cepas de referencia, se puede inferir que más del 20% de los microorganismos que sobrevivirían en presencia de las concentraciones alcanzables de metronidazol en el fluido crevicular serían importantes patógenos periodontales.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ali RW, Johannessen AC, Dahlen G, Socransky SS, Skaug N (1997). Comparison of the subgingival microbiota of periodontally healthy and diseased adults in northern Cameroon. *J Clin Periodontol* 24: 830-835.
2. Axelsson P, Paulander J, Lindhe J (1998). Relationship between smoking and dental status in 35-, 50-, 65-, and 75- year-old individuals. *J Clin Periodontol* 25: 297-305.
3. Baker PJ, Evans RT, Slots J, Genco RJ (1985). Antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria from the human oral cavity. *J Dent Res* 64: 1233-1244.
4. Banatvala N, Davies G, Abdi Y, Clements L, Rampton D, Hardie J, *et al.* (1994). High prevalence of *Helicobacter pylori* metronidazole resistance in migrants to east London: relation with previous nitroimidazole exposure and gastroduodenal disease. *Gut* 35: 1562-1566.
5. Beikler T, Ehmke B, Wittstock M, Schmidt H, Karch H, Flemmig T (2003). Serum antibody reactivity against recombinant PrtC of *Porphyromonas gingivalis* following periodontal therapy. *J Periodontol Res* 38: 276-281.
6. Bereswill S, Krainick C, Stahler F, Herrmann L, Kist M (2003). Analysis of the *rdxA* gene in high-level metronidazole-resistant clinical isolates confirms a limited use of *rdxA* mutations as a marker for prediction of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 36: 193-198.
7. Bollen CM, Quirynen M (1996). Microbiological response to mechanical treatment in combination with adjunctive therapy. A review of the literature. *J Periodontol* 67: 1143-1158.
8. Britt M, Pohlod D (1986). Serum and crevicular fluid concentrations after a single oral dose of metronidazole. *J Periodontol* 57: 104-107.

9. Buchmann R, Muller R, Van DT, Lange D (2003). Change of antibiotic susceptibility following periodontal therapy. A pilot study in aggressive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 30: 222-229.
10. Citron D, Goldstein E, Kenner M, Burnham L, Inderlied C (1995). Activity of ampicillin/sulbactam, ticarcillin/clavulanate, clarithromycin, and eleven other antimicrobial agents against anaerobic bacteria isolated from infections in children. *Clin Infect Dis* 20 Suppl 2: S356-360.
11. Cosar C, Julou I (1959). Active de 1(hidroxy-2 ethyl)-1 methyl-2nitro-5-imidazol vis-a-vis des in-infections experimantales a *Trichomonas vaginalis*. *Ann Inst Pasteur Paris* 96: 238-241.
12. Costerton J, Cheng K, Geesey G, Ladd T, Nickel J, Dasgupta M, *et al.* (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 41: 435-464.
13. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49: 711-745.
14. Craig RG, Boylan R, Yip J, Bamgboye P, Koutsoukos J, Mijares D, *et al.* (2001). Prevalence and risk indicators for destructive periodontal diseases in 3 urban American minority populations. *J Clin Periodontol* 28: 524-535.
15. Darveau RP, Tanner A, Page RC (1994). The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000* 14: 12-32.
16. Dinsdale C, Rawlinson A, Walsh T (1997). Subgingival temperature in smokers and non-smokers with periodontal disease. *J Clin Periodontol* 24: 761-766.
17. Eggert F, Drewell L, Bigelow J, Speck J, Goldner M (1991). The pH of gingival crevices and periodontal pockets in children, teenagers and adults. *Arch Oral Biol* 36: 233-238.

18. Eick S, Selmann T, Pfister W (2004). Efficacy of antibiotics to strains of periodontopathogenic bacteria within a single species biofilm - an in vitro study. *J Clin Periodontol* 31: 376-383.
19. 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.
20. Ezzo P, Cutler C (2003). Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontol 2000* 32: 24-35.
21. Feinberg AP, Vogelstein B (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13.
22. Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Goodson JM, Socransky SS (2002). Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy. *J Clin Periodontol* 29: 724-735.
23. 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.
24. Flemmig T, Milian E, Karch H, Klaiber B (1998). Differential clinical treatment outcome after systemic metronidazole and amoxicillin in patients harboring *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and/or *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol* 25: 380-387.
25. Fox C, Jette A, McGuire S, Feldman H, Douglass C (1994). Periodontal disease among New England elders. *J Periodontol* 65: 676-684.
26. Freeman C, Klutman N, Lamp K (1997). Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs* 54: 679-708.

27. Gal M, Brazier J (2004). Metronidazole resistance in *Bacteroides* spp. carrying nim genes and the selection of slow-growing metronidazole-resistant mutants. *J Antimicrob Chemother* 54: 109-116.
28. Genco R, Goldman H, Cohen W (1993). Periodoncia. México. Interamericana, McGraw Hill. 770.
29. Genco RJ (1996). Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol* 67: 1041-1049.
30. Genco RJ, Loe H (1993). The role of systemic conditions and disorders in periodontal disease. *Periodontol 2000* 2: 98-116.
31. 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.
32. Goodson J (1994). Antimicrobial strategies for treatment of periodontal diseases. *Periodontol 2000* 5: 142-168.
33. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, *et al.* (1994). Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 65: 260-267.
34. Gusberti F, Syed S, Lang N (1988). Combined antibiotic (metronidazole) and mechanical treatment effects on the subgingival bacterial flora of sites with recurrent periodontal disease. *J Clin Periodontol* 15: 353-359.
35. Haffajee A, Socransky S, Feres M, Ximenez-Fyvie L (1999). 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 255-282.

36. 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.
37. Haffajee AD, Socransky SS (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 5: 78-111.
38. Haffajee AD, Socransky SS (2001a). Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles. *J Clin Periodontol* 28: 283-295.
39. Haffajee AD, Socransky SS (2001b). Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol* 28: 377-388.
40. Haffajee AD, Socransky SS, Lindhe J (1983). Comparison of statistical methods of analysis of data from clinical periodontal trials. *J Clin Periodontol* 10: 247-256.
41. Haffajee AD, Socransky SS, Smith C, Dibart S (1991a). Microbial risk indicators for periodontal attachment loss. *J Periodontal Res* 26: 293-296.
42. Haffajee AD, Socransky SS, Smith C, Dibart S (1991b). Relation of baseline microbial parameters to future periodontal attachment loss. *J Clin Periodontol* 18: 744-750.
43. Haggoud A, M'Hand R, Reysset G, El MDN, Benbachir M, Moumni M (2001). Prevalence and characteristics of nim genes encoding 5-nitroimidazole resistance among Bacteroides strains isolated in Morocco. *Microb Drug Resist* 7: 177-181.
44. Hecht D, Lederer L, Osmolski J (1995). Susceptibility results for the Bacteroides fragilis group: comparison of the broth microdilution and agar dilution methods. *Clin Infect Dis* 20 Suppl 2: S342-345.
45. Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldan S (2002). A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 29 Suppl 3: 136-159; discussion 160-132.

46. Hung H, Douglass C (2002). Meta-analysis of the effect of scaling and root planing, surgical treatment and antibiotic therapies on periodontal probing depth and attachment loss. *J Clin Periodontol* 29: 975-986.
47. Kleinfelder JW, Muller RF, Lange DE (1999). Antibiotic susceptibility of putative periodontal pathogens in advanced periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 26: 347-351.
48. Kolenbrander PE (1995). Coaggregations among oral bacteria. *Methods Enzymol* 253: 385-397.
49. Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LV (1989). Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. *Infect Immun* 57: 3194-3203.
50. Kornman KS (2001). Patients are not equally susceptible to periodontitis: does this change dental practice and the dental curriculum? *J Dent Educ* 65: 777-784.
51. Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, *et al.* (1997). The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol* 24: 72-77.
52. Kornman KS, di Giovine FS (1998). Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol* 3: 327-338.
53. Land K, Johnson P (1997). Molecular mechanisms underlying metronidazole resistance in trichomonads. *Exp Parasitol* 87: 305-308.
54. Lindhe J, Karring T, Lang NP (1997). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Copenhagen. Munksgaard. 973.
55. Loesche W, Gusberti F, Mettraux G, Higgins T, Syed S (1983). Relationship between oxygen tension and subgingival bacterial flora in untreated human periodontal pockets. *Infect Immun* 42: 659-667.

56. Loesche W, Schmidt E, Smith B, Morrison E, Caffesse R, Hujoel P (1991). Effects of metronidazole on periodontal treatment needs. *J Periodontol* 62: 247-257.
57. Loesche WJ, Giordano JR, Hujoel P, Schwarcz J, Smith BA (1992). Metronidazole in periodontitis: reduced need for surgery. *J Clin Periodontol* 19: 103-112.
58. Madinier IM, Fosse TB, Hitzig C, Charbit Y, Hannoun LR (1999). Resistance profile survey of 50 periodontal strains of *Actinobacillus actinomycescomitans*. *J Periodontol* 70: 888-892.
59. Meisel P, Siegemund A, Dombrowa S, Sawaf H, Fanghaenel J, Kocher T (2002). Smoking and polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster (IL-1alpha, IL-1beta, and IL-1RN) in patients with periodontal disease. *J Periodontol* 73: 27-32.
60. Meisel P, Siegemund A, Grimm R, Herrmann FH, John U, Schwahn C, *et al.* (2003). The interleukin-1 polymorphism, smoking, and the risk of periodontal disease in the population-based SHIP study. *J Dent Res* 82: 189-193.
61. Mettraux G, Gusberti F, Graf H (1984). Oxygen tension (pO₂) in untreated human periodontal pockets. *J Periodontol* 55: 516-521.
62. Michalowicz BS, Aeppli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL, *et al.* (1991). Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol* 62: 293-299.
63. Miyake Y, Tsuruda K, Okuda K, Widowati, Iwamoto Y, Suginaka H (1995). In vitro activity of tetracyclines, macrolides, quinolones, clindamycin and metronidazole against periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res* 30: 290-293.
64. Murray P (1994). Periodontal diseases in patients infected by human immunodeficiency virus. *Periodontol 2000* 6: 50-67.
65. Murray P, Winkler J, Peros W, French C, Lippke J (1991). DNA probe detection of periodontal pathogens in HIV-associated periodontal lesions. *Oral Microbiol Immunol* 6: 34-40.

66. Narikawa S, Suzuki T, Yamamoto M, Nakamura M (1991). Lactate dehydrogenase activity as a cause of metronidazole resistance in *Bacteroides fragilis* NCTC 11295. *J Antimicrob Chemother* 28: 47-53.
67. Nelson R (2003). Antibiotic development pipeline runs dry. New drugs to fight resistant organisms are not being developed, experts say. *Lancet* 362: 1726-1727.
68. Noach L, Langenberg W, Bertola M, Dankert J, Tytgat G (1994). Impact of metronidazole resistance on the eradication of *Helicobacter pylori*. *Scand J Infect Dis* 26: 321-327.
69. Notten F, Koek-Van OA, Mikx F (1982). Capillary agar diffusion assay for measuring metronidazole in human gingival crevice fluid. *Antimicrob Agents Chemother* 21: 836-837.
70. Page RC (1991). The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 26: 230-242.
71. Palmer R, Scott D, Wilson R (2001). Tobacco smoking with periodontal disease. *J Clin Periodontol* 28: 895.
72. Pihlstrom B (2001). Periodontal risk assessment, diagnosis and treatment planning. *Periodontol 2000* 25: 37-58.
73. Poulet PP, Duffaut D, Lodter JP (1999). Metronidazole susceptibility testing of anaerobic bacteria associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol* 26: 261-263.
74. Preshaw P, Seymour R, Heasman P (2004). Current concepts in periodontal pathogenesis. *Dent Update* 31: 570-572, 574-578.
75. Samuelson J (1999). Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1533-1541.
76. Saxen L, Asikainen S (1993). Metronidazole in the treatment of localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 20: 166-171.

77. Serino G, Rosling B, Ramberg P, Hellstrom MK, Socransky SS, Lindhe J (2001). The effect of systemic antibiotics in the treatment of patients with recurrent periodontitis. *J Clin Periodontol* 28: 411-418.
78. Sigusch B, Beier M, Klinger G, Pfister W, Glockmann E (2001). A 2-step non-surgical procedure and systemic antibiotics in the treatment of rapidly progressive periodontitis. *J Periodontol* 72: 275-283.
79. Smith GL, Socransky SS, Smith CM (1989). Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 4: 47-51.
80. Socransky SS, Haffajee AD (1991). Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *J Periodontal Res* 26: 195-212.
81. Socransky SS, Haffajee AD (1994). Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000* 5: 7-25.
82. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25: 134-144.
83. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE (1994). "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 17: 788-792.
84. Soder P, Frithiof L, Soder B (1990a). Spirochaetes and granulocytes at sites involved in periodontal disease. *Arch Oral Biol* 35 Suppl: 197S-200S.
85. Soder P, Frithiof L, Wikner S, Wouters F, Engstrom P, Rubin B, *et al.* (1990b). The effect of systemic metronidazole after non-surgical treatment in moderate and advanced periodontitis in young adults. *J Periodontol* 61: 281-288.
86. Stoodley P, Sauer K, Davies D, Costerton J (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56: 187-209.

87. The-American-Academy-of-Periodontology (2000a). Parameter on chronic periodontitis with advanced loss of periodontal support. *J Periodontol* 71: 856-858.
88. The-American-Academy-of-Periodontology (2000b). Parameter on chronic periodontitis with slight to moderate loss of periodontal support. *J Periodontol* 71: 853-855.
89. The-American-Academy-of-Periodontology (2000c). Parameter on plaque-induced gingivitis. *J Periodontol* 71: 851-852.
90. Trinh S, Reysset G (1996). Detection by PCR of the nim genes encoding 5-nitroimidazole resistance in *Bacteroides* spp. *J Clin Microbiol* 34: 2078-2084.
91. Tsai C, Wolff L, Germaine G, Hodges J (2003). A rapid DNA probe test compared to culture methods for identification of subgingival plaque bacteria. *J Clin Periodontol* 30: 57-62.
92. Van Winkelhoff A, Rodenburg J, Goene R, Abbas F, Winkel E, de Graaff J (1989). Metronidazole plus amoxicillin in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *J Clin Periodontol* 16: 128-131.
93. Walker C, Karpinia K (2002). Rationale for use of antibiotics in periodontics. *J Periodontol* 73: 1188-1196.
94. Walker CB, Gordon JM, Socransky SS (1983). Antibiotic susceptibility testing of subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 10: 422-432.
95. Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden GA (2001). Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 28: 296-305.
96. Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Vangsted T, Van der Velden U (1997). Effects of metronidazole in patients with "refractory" periodontitis associated with *Bacteroides forsythus*. *J Clin Periodontol* 24: 573-579.

97. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS (2000a). Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 27: 648-657.
98. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS (2000b). Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 27: 722-732.
99. Yu VL, Merigan TC, Barriere SL (1999). Antimicrobial therapy and vaccines. Baltimore. Williams & Wilkins. 1460.

VI. TABLAS

Tabla 1. Criterios de selección de 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 CMI's.

Especie	Cepa*	Especie	Cepa*
<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

*Cepas 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.

Especie	CMI	S/R*	Especie	CMI	S/R*
<i>A. actinomycetemcomitans a</i>	8	S	<i>G. morbillorum</i>	>128	R
<i>A. actinomycetemcomitans b</i>	64	R	<i>L. buccalis</i>	1	S
<i>A. israelii</i>	128	R	<i>M. micros</i>	>128	R
<i>A. naeslundii 1</i>	128	R	<i>N. mucosa</i>	>128	R
<i>A. odontolyticus 1</i>	> 128	R	<i>P. gingivalis</i>	0.5	S
<i>A. viscosus</i>	> 128	R	<i>P. endodontalis</i>	64	R
<i>C. gracilis</i>	2	S	<i>P. intermedia</i>	0.5	S
<i>C. rectus</i>	2	S	<i>P. melaninogenica</i>	0.5	S
<i>C. showae</i>	> 128	R	<i>P. nigrescens</i>	1	S
<i>C. gingivalis</i>	32	R	<i>P. acnes</i>	>128	R
<i>C. ochracea</i>	8	S	<i>S. noxia</i>	>128	R
<i>C. sputigena</i>	32	R	<i>S. anginosus</i>	>128	R
<i>C. matruchotii</i>	> 128	R	<i>S. constellatus</i>	>128	R
<i>E. corrodens</i>	> 128	R	<i>S. gordonii</i>	64	R
<i>E. saburreum</i>	0.5	S	<i>S. intermedius</i>	>128	R
<i>E. sulci</i>	1	S	<i>S. mitis</i>	>128	R
<i>F. nucleatum ss nucleatum</i>	0.5	S	<i>S. oralis</i>	>128	R
<i>F. nucleatum ss polymorphum</i>	0.5	S	<i>S. sanguinis</i>	>128	R
<i>F. nucleatum ss vincentii</i>	0.5	S	<i>T. forsythensis</i>	>128	R
<i>F. periodonticum</i>	0.5	S	<i>V. parvula</i>	16	S

*S = sensible, **R** = resistente. Determinado de acuerdo al punto de corte sugerido por la NCCLS de 16 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	>16

VII. FIGURAS

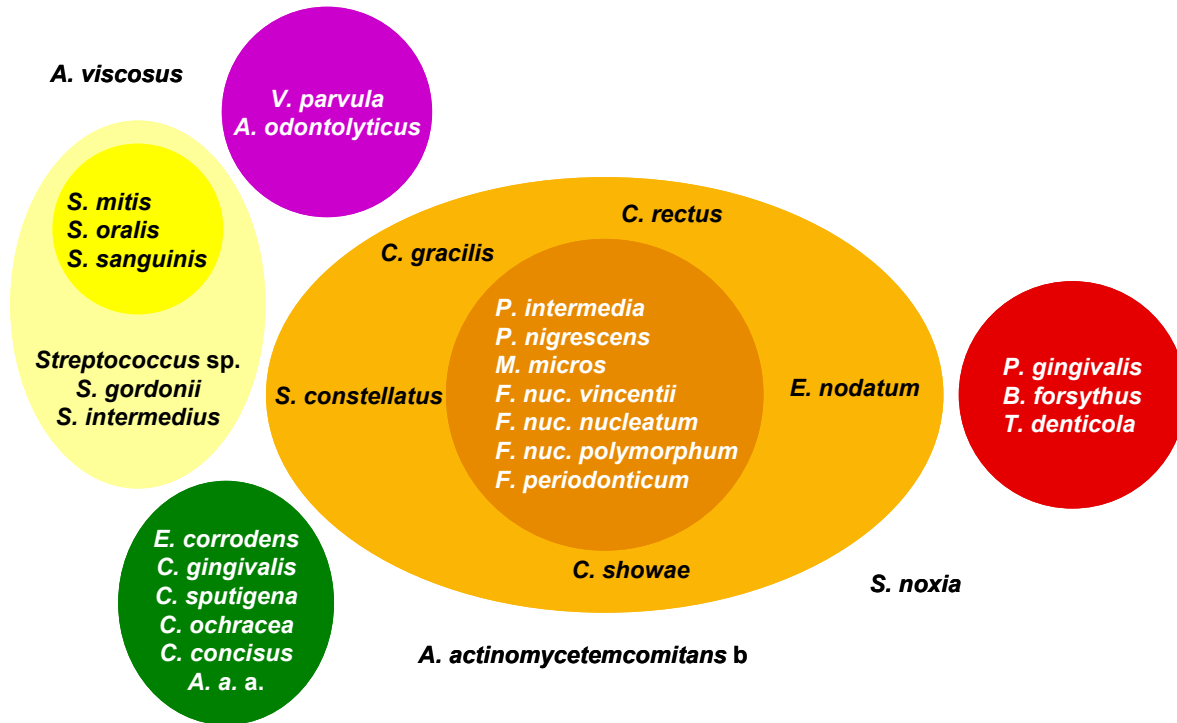


Figura 1. Se analizaron 13,261 muestras de placa dentobacteriana de 185 pacientes para determinar la presencia de 40 especies bacterianas por medio de sondas de DNA (Socransky *et al.*, 1998). Cinco complejos bacterianos fueron descritos de acuerdo con las asociaciones entre diferentes especies. Cada complejo fue designado con un color para facilitar su descripción. Algunas especies bacterianas no tuvieron asociaciones suficientemente fuertes con otras para ser incluidas dentro de algún complejo. Dichas especies fueron *Actinomyces viscosus*, *A. actinomycetemcomitans* serotipo b y *S noxia*. Las asociaciones entre complejos están representadas por la posición de los mismos en la figura.

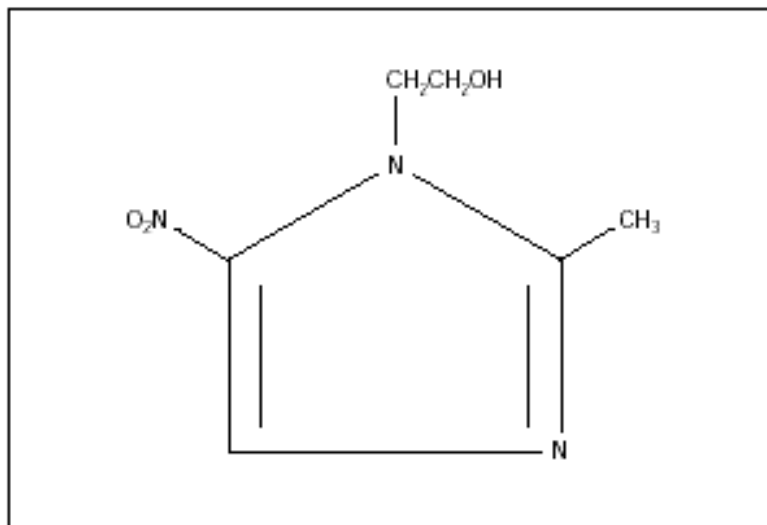


Figura 2. Estructura del metronidazol (1-(β -hidroxietil)-metil-5-nitroimidazol).

SONDAS DE DNA

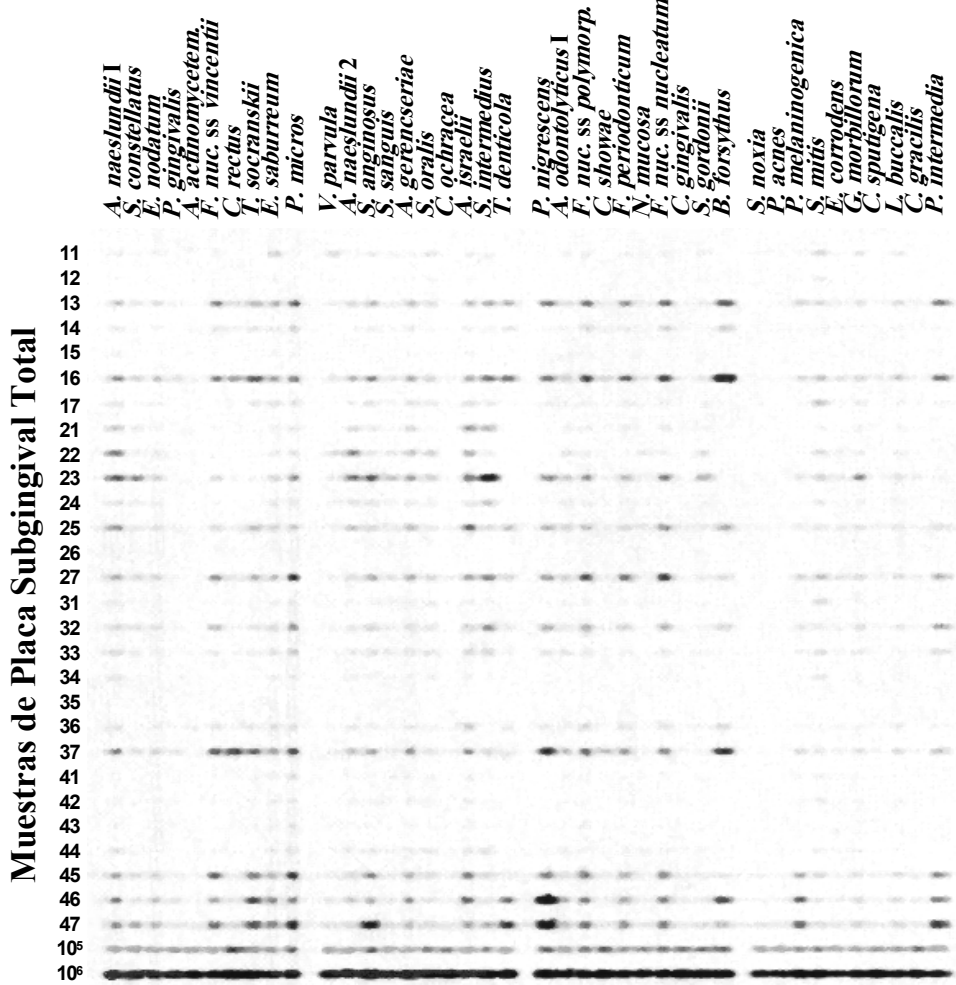


Figura 3. La técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA permite la identificación de hasta 40 especies bacterianas en cada una de 28 muestras de placa dentobacteriana en un mismo experimento. Los carriles horizontales contiene las muestras de placa dentobacteriana y perpendicularmente a los 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.

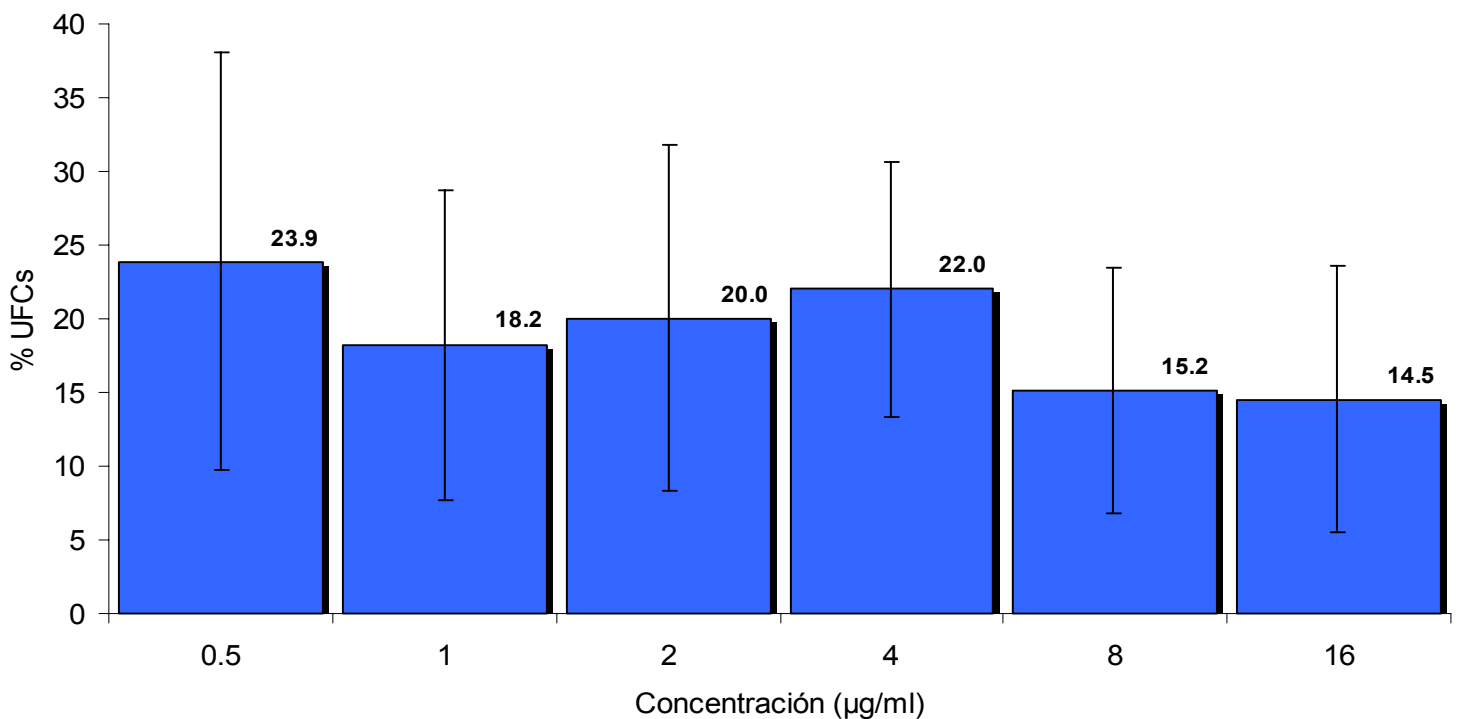


Figura 4. Porcentaje promedio (\pm EEM) de unidades formadoras de colonias (UFCs) provenientes de muestras de placa dentobacteriana subgingival de sujetos mexicanos ($N = 5$) que mostraron crecimiento en presencia de 6 concentraciones de metronidazol. El porcentaje promedio de UFCs en cada una de las 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.

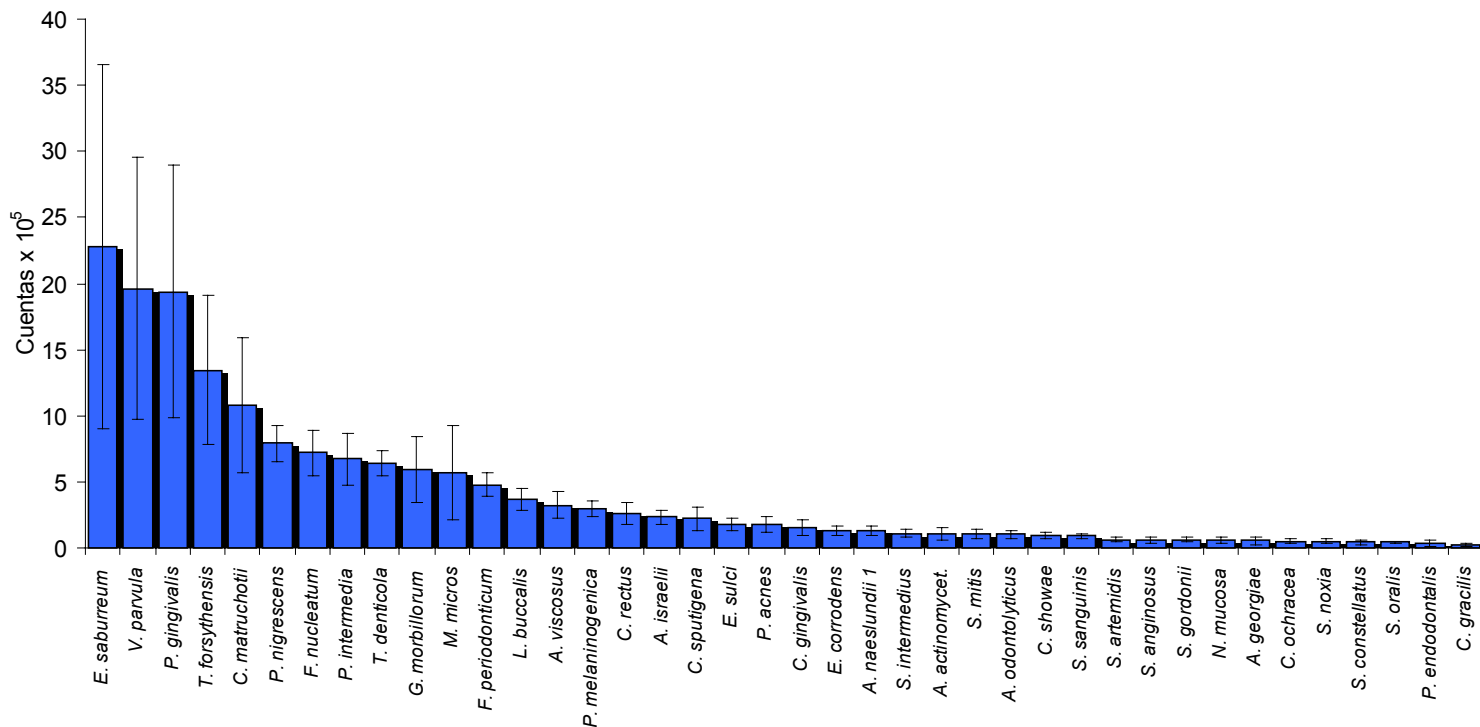


Figura 5. Niveles promedio (cuentas $\times 10^5 \pm$ EEM) de cada una de las 40 especies evaluadas en muestras de placa subgingival de 5 sujetos mexicanos con periodontitis crónica. Los niveles fueron calculados para cada especie en cada muestra de placa, promediados entre las muestras de cada sujeto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

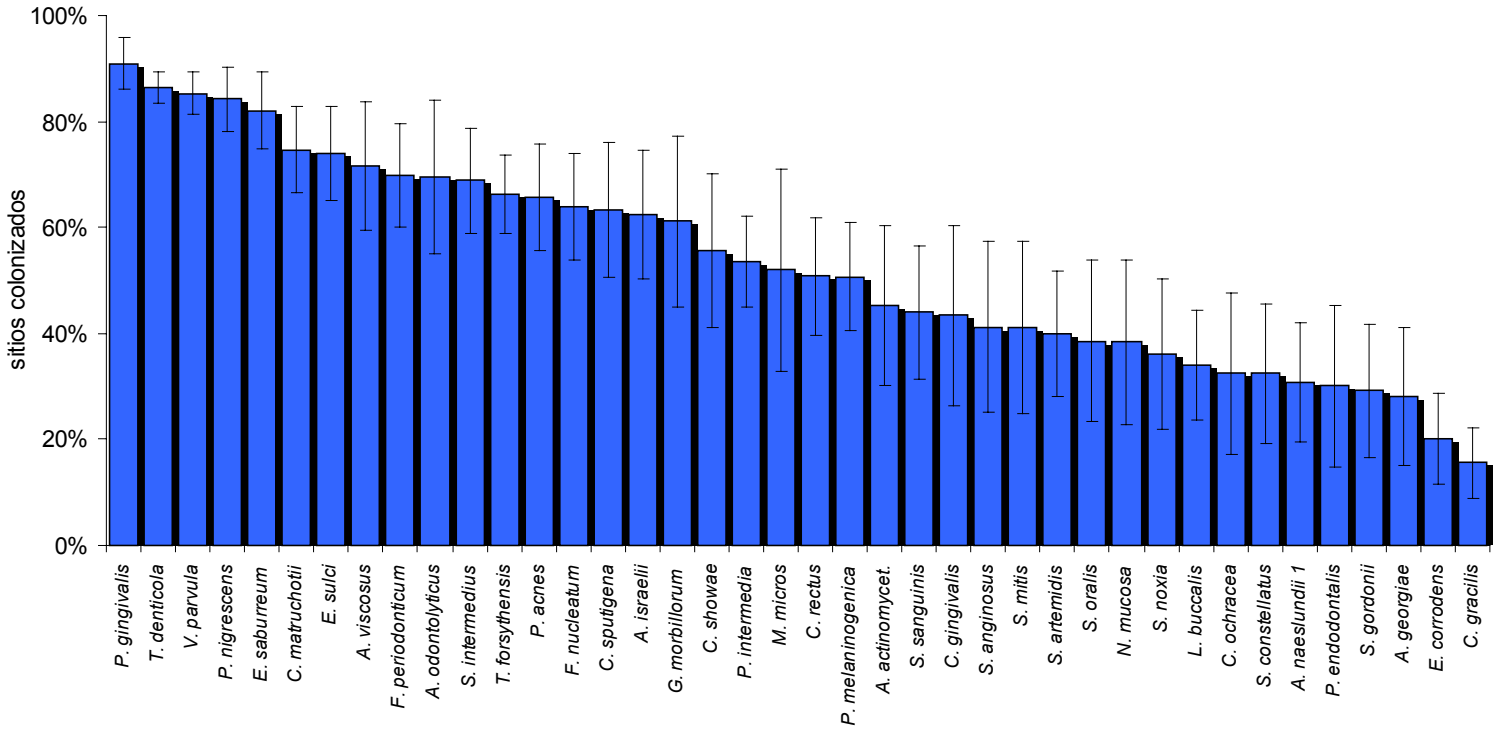


Figura 6. Prevalencia promedio (% sitios colonizados \pm EEM) de cada una de las 40 especies evaluadas en muestras de placa subgingival de 5 sujetos mexicanos con periodontitis crónica. La prevalencia fue calculada para cada especie en cada muestra de placa, promediada entre las muestras de cada sujeto y posteriormente entre los sujetos de la población.

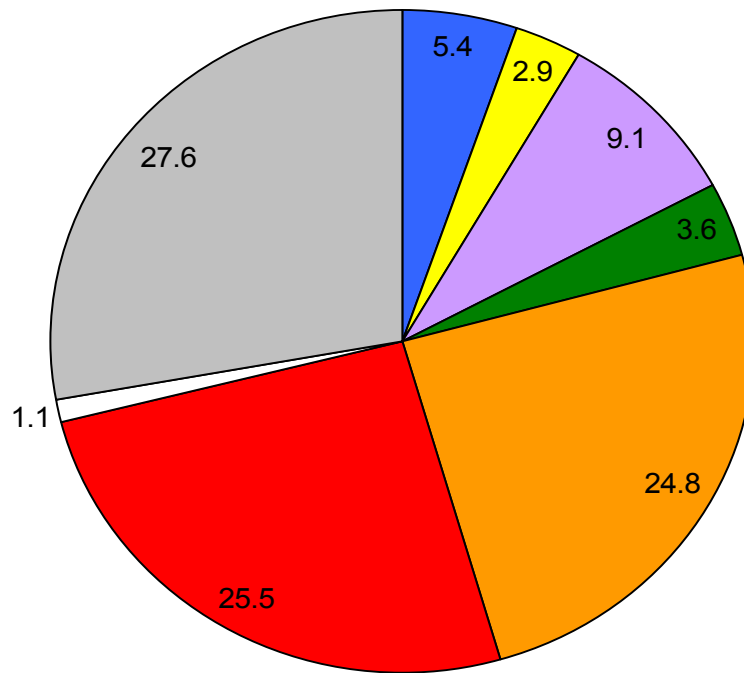


Figura 7. Proporción promedio (% de cuentas totales de las sondas de DNA) de complejos bacterianos en 5 sujetos con periodontitis crónica. Las 40 especies bacterianas evaluadas fueron agrupadas de manera similar a la descripción de complejos bacterianos en la placa subgingival (Socransky *et al.*, 1998). 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.

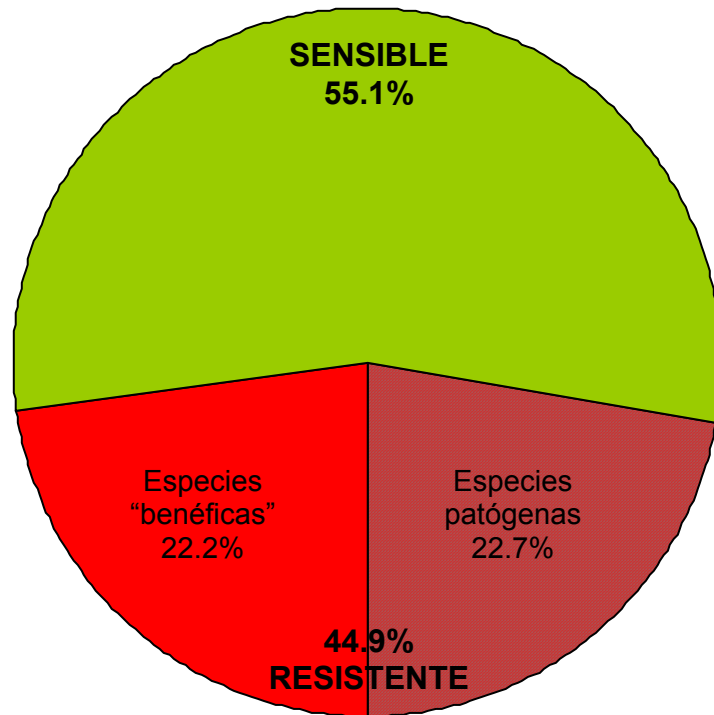


Figura 8. Inferencia de las proporción promedio (% de cuentas totales de las sondas de DNA) de especies bacterianas en muestras de placa subgingival de sujetos mexicanos con periodontitis crónica. Las especies fueron agrupadas de acuerdo con los resultados obtenidos en el experimento para determinar las CMI de cepas de referencia como sensibles o resistentes utilizando el punto de corte sugerido por la NCCLS para metronidazol. La gráfica muestra la proporción de especies "benéficas" y patógenas periodontales que fueron resistentes al metronidazol. 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 CMI.

VIII. 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)

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, R. (1998). **Sexualidad de la Gente Joven**, México: Mexfam.
- Aguilar G. (1994). "Educación de la sexualidad en la adolescencia". **Antología de la Sexualidad Humana**. Tomo III. México: Porrúa.
- Aldana, A. (1998). "La sexualidad y las enfermedades de transmisión sexual". **Antología de la Sexualidad Humana**. Tomo III. México: Porrúa
- Alvarez-Gayou, J. (1986). **Sexoterapia Integral**. México: Manual Moderno
- Amigo, V. (1998). **Manual de Psicología de la Salud**. España: Pirámide.
- Amuchástegui, A. (2001). **Virginidad e Iniciación Sexual en México**. México: EDAMEX
- Aramburu, C. (1993). **Los Jóvenes y los Programas en Salud y Sexualidad en América Latina**. México: MEXFAM
- Bernal, E. (200). **Miradas Sobre el Aborto**. México:GIRE
- Bernstein, A. (1986). México: Mc. Graw-Hill.
- Boring, E. (1979). **Historia de la Psicología Experimental**. México: Trillas
- Buela-Casal, G. (1991). **Manual de Psicología Clínica Aplicada**. México: Siglo XXI
- Buela-Casal, G. (1996). **Manual de Evaluación en Psicología Clínica y de la Salud**. España: Editorial Siglo XXI.
- Brett, G. (1963). **Historia de la Psicología**. Buenos Aires: Paidós
- Bustos, R. (1994). "La formación del género" **Antología de la Sexualidad Humana**. Tomo I. México: Porrúa
- Carrillo, M. (1989). **La Sociología**. México: Jocamar
- Chandiramani, R. (2002) **Boletín Informativo para Jóvenes**. México: Católicas por el Derecho a Decidir.
- Chapela, L. (2000). **Hablemos de Sexualidad en Familia**. México: MEXFAM
- Chaplin, F. y Krawiec, T. (1978). **Sistemas y Teorías**. México: Interamericana
- Ciparros, A. (1990). **Historia de la Psicología**. Perú: Ceac.

- Confer, J. (1980). **Adolescencia. Generación Presionada**. Colombia: Harper & Row Latinoamericana, S.A.
- Craig G. (1989). **Desarrollo Psicológico**. México: Prentice Hall.
- Deval, J. (1994). **El Desarrollo Humano**. México: Prentice Hall.
- Díaz, A. (2001). **Promoción de la Salud y Cambio Social**. España: Masson
- Fernandez-Ríos, L. (1994). **Manual de Psicología Preventiva**. México: Siglo XXI
- Flores, A. (2002) **Boletín Informativo para Jóvenes**. México: Católicas por el Derecho a Decidir
- Galvez, V. (2002) **Boletín Informativo para Jóvenes**. México: Católicas por el Derecho a Decidir A. C.
- Greene, W. (1998). **Educación para la Salud**. México: Interamericana
- Grief, E. y Ullman, K. (1982). The psychological Impact of Menarche on Early Adolescent Females. A review of the literature. **Child Development**. 5 (3), 1413-1430.
- Harsch, C. (1997). **La Identidad del Psicólogo**. México: Trillas.
- Horrocks, J. (1993). **Psicología de la Adolescencia**. México: Trillas.
- Jáuregui, R. (1998). **Promoción de la Salud y Prevención de la Enfermedad**. Argentina: Panamericana
- Jay, L. (1988). **Psicoterapias Contemporáneas**. Bilbao: Declée de Brouwer.
- Kazdín, A. (1989). **Historia de la Modificación de la Conducta**. Bilbao: Declée de Brouwer.
- Kissling, F. (1997). **El Vaticano y las Políticas de Salud Reproductiva**. Londres: Católicas por el Derecho a Decidir A.C.
- Lagarde, M. (1998). "La Regularización social del género". **Antología de la Sexualidad Humana**. Tomo I. México: Porrúa
- Lara, C. (1994) "Masculinidad y Feminidad" **Antología de la Sexualidad Humana**. Tomo I. México: Porrúa
- Lazo, C. (1995). **Perspectiva Hacia el Siglo XXI: La Nueva Cultura de la Salud Sexual**. México: MEXFAM
- Mayén, H. (1997). **Hablemos de Sexualidad**. México: MEXFAM

- Mc Kinney, J.; Fitzgerald, H. y Strommen, E. (1982). **Psicología del Desarrollo**. México: Manual Moderno.
- Ochoa, T. (2000) **La Población**. México: Ediciones 2000
- Pick, W. (1994). **Antología de la Sexualidad Humana**. Tomo III. México: Porrúa
- Pick, W. (1992). **Planeando tu Vida**. Programa de Educación Sexual para Adolescentes. México: Planeta.
- Phares, J. (1996). **Psicología Clínica: Conceptos Métodos y Practica**. México: El Manual Moderno S.A de C.V.
- Rodríguez, R. (1994). **Antología de la Sexualidad Humana**. Tomo III. México: Porrúa
- Sánchez, R. (2003) **Taller de Capacitación para Prestadores de Servicios de Salud**. Católicas por el Derecho a Decidir
- Schneider, P. (18). **Psicología Aplicada a la Práctica Médica**
- Tubau, M. (1995). **Enciclopedia de la Adolescencia**. Tomo 3. España: Credito Reimo.
- Vargas, B. (2002). **Revista Electrónica de Psicología**. Disponible en www.iztacala.unam.mx/carreras/psicología
- Vargas, D. (1993). **Educación para la salud**. México: Interamericana
- Venegas D. (2003). **“Sexualidad de la Gente Joven”**. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México FES Zaragoza, México.