



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**PERFILES MICROBIOLÓGICOS SUBGINGIVALES EN
UNA POBLACIÓN INDÍGENA HUICHOLA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA**

PRESENTA:

JOSÉ ALBERTO ISRAEL MADRIGAL ESCALERA

TUTOR:

DRA. LAURIE ANN XIMÉNEZ FYVIE

ASESOR:

DRA. ARGELIA ALMAGUER FLORES





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Antecedentes bibliográficos	3
1.1.1. Formación y desarrollo de la placa dentobacteriana.....	3
1.1.2. Clasificación de las enfermedades periodontales	7
1.1.3. Etiología de las enfermedades periodontales	10
1.2. Objetivos.....	16
1.2.1. Objetivo General.....	16
1.2.2. Objetivos Específicos	17
1.3. Planteamiento y justificación del problema.....	17
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
2.1. Diseño experimental	19
2.2. Criterios de selección	19
2.3. Evaluación clínica	20
2.4. Evaluación Microbiológica.....	20
2.4.1. Recolección y procesamiento de muestras subgingivales	21
2.4.2. Cepas bacterianas.....	21
2.4.3. Preparación de sondas de ADN	22
2.4.4. Hibridaciones ADN-ADN.....	23
2.4.5. Detección y enumeración de especies bacterianas	23
2.5. Análisis estadísticos de datos	24
3. RESULTADOS	26
3.1. Características clínicas	26
3.2. Cuentas bacterianas	26
3.3. Prevalencia	27
3.4. Proporción.....	28
3.4.1. Especies individuales	28
3.4.2. Complejos bacterianos	28
4. DISCUSIÓN.....	29
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
6. TABLAS.....	46
7. FIGURAS.....	51
8. ANEXOS	56

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes bibliográficos

Las enfermedades periodontales son infecciones endógenas mixtas que desencadenan procesos inflamatorios y degenerativos de las estructuras de soporte del diente como la encía, ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento radicular. Dichas enfermedades son causadas por grupos específicos de microorganismos que pertenecen a la microbiota comensal y que se acumulan tanto en la superficie dental como en los surcos gingivales y bolsas periodontales. Se considera que las enfermedades periodontales son el resultado del desequilibrio entre la interacción inmunológica del hospedero y la flora de la placa dentobacteriana que coloniza el surco gingival (Grenier & Mayrand, 1985; Irfan *et al.*, 2001; Tonetti & Mombelli, 1999).

1.1.1. Formación y desarrollo de la placa dentobacteriana

La formación de la placa dentobacteriana es el resultado de una serie de procesos que involucran una variedad de bacterias y componentes de la cavidad bucal del hospedero. Estos procesos comprenden en primer lugar la deposición de la película adquirida que se forma inmediatamente después de la erupción, limpieza y pulido dental (Al-Hashimi & Levine, 1989). La placa dentobacteriana está compuesta de albumina, lisozimas, amilasas, inmunoglobulinas A, proteínas ricas en prolina y mucinas (Li *et al.*, 2004), las cuales pueden influir sobre la selección y establecimiento de la microflora bucal en las diferentes superficies bucales (Gibbons & Hay, 1989; Gibbons *et al.*, 1990; Gibbons, 1996). Algunas glucoproteínas que recubren el tejido epitelial y el esmalte como la fibronectina, actúan como escudo antiadhesivo, repeliendo a las bacterias, existiendo también receptores celulares de carga positiva que atraen microorganismos que tienen carga negativa, los cuales pueden vencer a la fibronectina y fijarse en los tejidos por medio de receptores análogos que provienen de elementos salivales y del fluido crevicular, así como de los desechos bacterianos y de las células (Gibbons *et al.*, 1964; Gibbons & Houte, 1975; Gibbons & Hay, 1989).

El proceso de formación de la placa dentobacteriana continúa cuando la película adquirida es colonizada en primer lugar por bacterias Gram positivas como *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans* y *Actinomyces viscosus* (colonizadores tempranos), esto ocurre mediante la adsorción específica de proteínas específicas localizadas en la superficie bacteriana (adhesinas), o a través de estructuras proteicas fibrosas, llamadas "fimbrias" que interactúan químicamente con los componentes de la película adquirida adsorbidos al esmalte, permitiendo a las bacterias adherirse firmemente a la superficie del diente. La adhesión de los colonizadores tempranos juega un papel fundamental en el desarrollo de la placa dentobacteriana proporcionando un sustrato para la coagregación de los colonizadores

subsecuentes, la mayoría de los cuales carecen de mecanismos para la adhesión directa a las estructuras del diente (Gibbons *et al.*, 1976; Li *et al.*, 2004).

En los estadios iniciales de formación de la placa dentobacteriana existe un predominio de cocos Gram positivos como *S. mutans*, *Streptococcus mitis*, *S. sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Rothia dentocariosa*, *Staphylococcus epidermidis*, seguido por algunos bacilos y filamentos Gram positivos como *A. viscosus*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces gerencseriae* y *Corynebacterium matruchotii* y cocos Gram negativos como *Veillonella parvula* y especies de *Neisseria* (Kolenbrander & J., 1992; Kolenbrander & London, 1993; Kolenbrander, 1995; Socransky & Haffajee, 1992).

Los colonizadores primarios forman una biopelícula por la agregación (la atracción entre células de la misma especie) y la coagregación (la atracción entre células de especies diferentes), provocando la organización funcional de la placa bacteriana y formando estructuras compuestas de distintas morfologías, causando un cambio en el microambiente de aerobico/capnofílico a uno facultativo anaerobio. Las bacterias comienzan a multiplicarse y a interactuar entre ellas, secretando una matriz extracelular, provocando la maduración de la placa dentobacteriana e incorporando a nuevos miembros de distintas especies (Kolenbrander *et al.*, 1990; Kolenbrander, 1995; Whittaker *et al.*, 1996).

La coagregación es altamente selectiva ya que cada tipo bacteriano puede coagregarse con un tipo específico de bacteria. *Actinomyces naeslundii* (una bacteria Gram positiva) puede coagregarse con varios microorganismos Gram positivos (*Streptococcus* sp.) así como con bacterias Gram negativas (*Prevotella* sp. y *Capnocytophaga* sp.). Por otro lado, *Capnocytophaga ochracea*, sólo puede coagregarse con microorganismos Gram positivos y con *Porphyromonas gingivalis* que no puede coagregarse con ninguno de los ya mencionados, mientras que

Fusobacterium nucleatum, puede coagregarse con la mayor parte de las especies endógenas de la placa subgingival (Kolenbrander, 1995; 2000).

La coagregación es mediada por receptores complementarios a adhesinas presentes en microorganismos diferentes. De los cuales un microorganismo puede tener un receptor polisacárido (carbohidratos) y el otro tener una adhesina complementaria (lectina). Las adhesinas o receptores pueden ser tanto factores inhibitorios como factores pro-activos para la congregación (Gibbons & Nygaard, 1970; Gibbons, 1989; Kolenbrander, 1995).

Un papel clave en los procesos cooperativos o de maduración de la placa es jugado por *F. nucleatum* ya que es de los colonizadores “puente” necesarios para garantizar la coagregación entre los colonizadores tempranos y los colonizadores tardíos. En ausencia de *F. nucleatum*, *P. gingivalis* no puede coagregarse con el resto de la microbiota. Por otra parte, la presencia de *F. nucleatum*, permite el crecimiento de anaerobios, aún en el ambiente aerobio de la cavidad bucal (Bradshaw *et al.*, 1998; Socransky & Haffajee, 2005).

La placa dentobacteriana se puede clasificar según su localización en supragingival y subgingival, según sus propiedades en adherente y no adherente, y por su potencial patógeno en cariogénica y periodontopatogénica. La placa dentobacteriana supragingival se encuentra adherida a las superficies dentales por encima del margen libre de la encía y está constituida predominantemente por flora bacteriana sacarolítica Gram positiva, en la cual se encuentran microorganismos cariogénicos, sin embargo, es posible identificar una gran variedad de microorganismos Gram negativos anaerobios de los mismos géneros bacterianos que predominan en la placa subgingival y que se asocian a las enfermedades periodontales. La naturaleza de la placa dentobacteriana subgingival es más compleja que la de la placa supragingival, debido a que en el espacio que se encuentra por debajo del margen libre de la encía, existen dos biopelículas distintas: una asociada a

la superficie dental y la otra en íntima relación con la superficie epitelial que forma la pared externa del surco. En la placa subgingival, predominan espiroquetas y especies Gram negativas. Entre estas dos biopelículas existe una zona de baja densidad celular compuesta por bacterias débilmente unidas que parecen estar en estado plantónico (Haffajee & Socransky, 1994; Kamma *et al.*, 2000a; b; Kononen *et al.*, 1992; Kononen, 1999; Listgarten, 1999; Listgarten, 1994; Nishihara & Koseki, 2004; Socransky & Haffajee, 2002; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000a; b).

Se tienen evidencias científicas concretas de que los componentes microbianos de la placa dentobacteriana supragingival tienen influencia en la prevalencia, proporción y comportamiento de los microorganismos de la placa dentobacteriana subgingival y de que la diferencia fundamental en la composición microbiológica de estos dos tipos de placa dentobacteriana, se debe primordialmente a la presencia de diferentes superficies de adhesión en cada una. Es decir, la placa supragingival únicamente posee una superficie para la adhesión bacteriana (el diente), mientras que la placa subgingival presenta dos superficies que difieren importantemente en su estructura y composición (diente y epitelio). Esto ocasiona que la placa subgingival tienda a presentar una microbiota más compleja que la placa supragingival (Dahlen *et al.*, 1992a; Haffajee & Socransky, 1994; McNabb *et al.*, 1992; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000a; b; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000c).

1.1.2. Clasificación de las enfermedades periodontales

Las enfermedades de los tejidos periodontales se han clasificado en la literatura de diversas maneras. La clasificación de 1993 carecía de los detalles necesarios para una adecuada caracterización del amplio espectro de las enfermedades periodontales encontradas en la práctica clínica, por lo tanto, en 1999 se desarrolló una nueva clasificación para las enfermedades periodontales (Armitage, 1999) y se incluyó una sección sobre enfermedades gingivales y lesiones no existentes en las clasificaciones

de 1989 y 1993. Según la clasificación de 1999 las enfermedades gingivales pueden ser:

Inducidas por la placa dentobacteriana. En este apartado se incluyen las gingivitis asociadas únicamente a placa dental, enfermedades gingivales asociadas a factores sistémicos, enfermedades gingivales asociadas a medicamentos y enfermedades gingivales asociadas a malnutrición.

No inducidas por la placa dentobacteriana. Dentro de este grupo se incluyen enfermedades gingivales de origen bacteriano, de origen viral, de origen fúngico, lesiones gingivales de origen genético, manifestaciones gingivales de condiciones sistémicas, lesiones traumáticas, reacciones a cuerpos extraños y otras no especificadas.

De acuerdo con la clasificación de 1999 las enfermedades periodontales pueden agruparse de la siguiente manera:

1. Periodontitis crónica (localizada o generalizada).
2. Periodontitis agresiva (localizada o generalizada).
3. Periodontitis como una manifestación de enfermedades sistémicas.
 - a. Asociada a desórdenes hematológicos.
 - b. Asociada a desórdenes genéticos.
 - c. Otros no especificados.
4. Enfermedades periodontales necrotizantes.
5. Abscesos periodontales.
6. Periodontitis asociada a lesiones endodóncicas.
7. Deformidades y condiciones desarrolladas o adquiridas.

Gingivitis

La gingivitis es una respuesta inflamatoria caracterizada por enrojecimiento, edema, sangrado, cambio en el contorno del tejido gingival, pérdida del tejido de adaptación del diente e incremento del fluido crevicular, sin destrucción del ligamento periodontal y del hueso alveolar (Armitage, 1999).

La gingivitis, a su vez se clasifica en: Inducida (asociada) por placa bacteriana y la no inducida por placa. Dentro de la primera se encuentra la gingivitis asociada a factores locales o agravada por malnutrición o factores sistémicos, entre los que se mencionan al embarazo, la pubertad y la menstruación. También pueden ser condicionadas por diabetes o medicamentos, especialmente aquellos con efectos anticonvulsionantes e inmunosupresores como los esteroides o anticonceptivos orales. En la gingivitis no inducida por placa se encuentra a la gingivitis asociada a un origen microbiano específico, ya sea bacteriano, viral o fúngico, la de origen genético, aquella que se presenta como manifestación de condiciones sistémicas como reacciones alérgicas y desórdenes mucocutáneos, la ocasionada por lesiones traumáticas, reacciones a cuerpos extraños y otras gingivitis no especificadas. En estos tipos de gingivitis, se detectan, generalmente a las bacterias de la microbiota comensal, pero las cuentas de las mismas pueden llegar a ser 10 ó 20 veces más elevadas que en los surcos sanos (Rose *et al.*, 2000).

La gingivitis es una condición que generalmente antecede a la periodontitis, sin embargo, no todos los casos de gingivitis llevan al desarrollo de la enfermedad periodontal. El paso de gingivitis a periodontitis es debido al aumento en los niveles y proporción de especies bacterianas específicas en la placa dentobacteriana, siendo este el principal factor desencadenante para el desarrollo de la enfermedad periodontal, seguido por la susceptibilidad del hospedero y la selección de bacterias que poseen factores de virulencia específicos (Bascones *et al.*, 2005; Page, 1999).

Periodontitis

Las enfermedades periodontales están caracterizadas por desafíos bacterianos que pueden incitar respuestas inmunológicas destructivas en el hospedero y que conducen a la pérdida progresiva de ligamento periodontal y de hueso alveolar provocando con ello la eventual pérdida de los órganos dentales (Irfan *et al.*, 2001). Algunos estudios han establecido que ciertos tipos de enfermedades periodontales son de progresión cíclica y ocurren en sitios específicos, lo cual se caracteriza por "explosiones de actividad" que ocurren durante periodos cortos de tiempo, seguido por periodos de remisión (Goodson *et al.*, 1982).

Anteriormente, se distinguían como formas de la enfermedad a la periodontitis del adulto y la periodontitis de inicio temprano, sin embargo, la clasificación actual ha eliminado estos términos, sustituyéndolos por periodontitis crónica y periodontitis agresiva, respectivamente. Así mismo, existen otros grupos de clasificación de periodontitis, tales como las que se presentan como una manifestación de enfermedades sistémicas. En todos los casos, en la clasificación actual de las enfermedades periodontales se excluyen criterios como la edad y el ritmo de progresión de la enfermedad como factores útiles para el diagnóstico, y se considera el comportamiento clínico y exámenes de laboratorio como los métodos preferidos para distinguir a cada una de las formas de la enfermedad (Armitage, 1999).

Periodontitis crónica

La periodontitis crónica es definida como una patología infecciosa que presenta periodos prolongados de progresión lenta acompañados por periodos cortos de rápida progresión con pérdida ósea de severidad variable, ocurriendo principalmente en pacientes adultos pero pudiendo presentarse también en niños y adolescentes, ya sea en forma localizada o generalizada. El cálculo subgingival es encontrado frecuentemente en este tipo de enfermedad periodontal y puede estar asociada a factores locales de predisposición y riesgo (Christersson *et al.*, 1992).

Periodontitis agresiva

Por otro lado, la periodontitis agresiva puede ser también localizada o generalizada, pero se caracteriza por una rápida pérdida de inserción y destrucción, existiendo discrepancias entre los depósitos de placa y la severidad en la pérdida de inserción y hueso. En algunos casos se pueden detectar elevadas proporciones de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y en algunas poblaciones también de *P. gingivalis* (Armitage, 1999), sin embargo, diversos estudios han demostrado que la presencia de *A. actinomycetemcomitans* no se relaciona con algunos tipos de periodontitis agresiva tales como la periodontitis agresiva generalizada (Ximenez-Fyvie *et al.*, 2006a).

1.1.3. Etiología de las enfermedades periodontales

La identificación de la o las especies específicas causantes de los diferentes tipos de enfermedad periodontal, ha sido obstaculizada por algunos rasgos únicos de dichas enfermedades. Una de las principales dificultades es la naturaleza endógena de la enfermedad, ya que su desarrollo es consecuencia de los cambios en la proporción de especies bacterianas que normalmente residen en la placa dentobacteriana (Haffajee & Socransky, 1994; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000b; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2006b). De ahí que la enfermedad podría ser causada por el crecimiento excesivo de una o varias especies de la población residente. Se ha demostrado que las especies de *Capnocytophaga* pueden ser detectadas en altos niveles antes del inicio de la gingivitis, mientras que especies de *Prevotella* prevalen en sitios con gingivitis ya establecida. Pudiendo suponer que las especies del género *Capnocytophaga* tienen una mayor probabilidad de ser el agente etiológico mientras que las de *Prevotella* pudieran estar presente como una consecuencia del proceso de enfermedad (Mombelli *et al.*, 1990). Se piensa que la colonización por patógenos oportunistas, contribuye a la naturaleza episódica de progresión de enfermedad, es

decir, no todos los sitios con pérdida ósea demuestran el mismo grado de progresión o de actividad de enfermedad (Goodson *et al.*, 1982; Papapanou, 2002).

Composición microbiológica de la placa dentobacteriana subgingival

La placa dentobacteriana subgingival es un depósito de comunidades microbianas complejas que se adhieren tanto a la superficie dental como al epitelio del surco y constituyen el agente etiológico principal de la mayor parte de las enfermedades periodontales, siendo estas en consecuencia, el punto de enfoque en la prevención y tratamiento de las patologías del periodonto (Lindhe *et al.*, 1998).

Grupos específicos de microorganismos de la placa dentobacteriana subgingival se asocian con el desarrollo de las enfermedades periodontales, estos microorganismos son denominados patógenos periodontales e incluyen a *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*, así como a patógenos putativos tales como *Campylobacter rectus*, *Peptostreptococcus micros*, *Eubacterium nodatum*, *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus intermedius*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, *F. nucleatum* y *Prevotella nigrescens* (Choi *et al.*, 2000; Haffajee & Socransky, 1994; Kamma *et al.*, 1995; Mombelli *et al.*, 2000; Moore & Moore, 1994; Paster *et al.*, 2001; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000b).

Por otro lado, algunas especies bacterianas pueden ejercer de diversas formas, un papel protector en los tejidos periodontales del hospedero. Por ejemplo, pueden actuar de forma pasiva ocupando un nicho que podría, de otra manera, albergar microorganismos patógenos, así mismo, pueden inhibir la adhesión de microorganismos patógenos, su viabilidad, crecimiento y la producción de factores de virulencia por antagonismo metabólico o por inactivación directa. Por ejemplo, la producción de H₂O₂ por *S. sanguinis*, *Streptococcus. uberis* y *A. viscosus* inhibe el crecimiento de *A. actynomicetemcomitans* protegiendo al hospedero de las acciones patogénicas de esta especie (Quirynen *et al.*, 2001).

El grado de patogenicidad de la placa dentobacteriana subgingival está mediado por factores de virulencia que poseen las bacterias periodontopatógenas, estos disminuyen la efectividad de la respuesta inmunológica del hospedero, dañan los tejidos e impiden su reparación. La presencia de cápsulas (factor antifagocitario) y de fimbrias permiten la adhesión y colonización causando diversas reacciones en el sistema de defensa del hospedero por mecanismos tales como la producción de proteasas que inhiben la quimiotaxis de leucocitos polimorfonucleares (PMN), la producción de ácidos grasos volátiles que inhiben la proliferación de linfocitos B y T, la secreción de proteasas contra inmunoglobulinas y la presencia de cápsulas o de lipopolisacáridos (LPS) con efectos antigénicos capaces de inducir la liberación de mediadores de la inflamación y de incrementar la resistencia a la fagocitosis. La destrucción tisular es causada por epiteliotoxinas, exotoxinas contra macrófagos, fosfatasa ácida y alcalina, colagenasa y factores inhibidores fibroblásticos, toxinas oseo-destructivas, factores mitogénicos, la inducción de producción de citocinas, fosfolipasa A, sulfuros volátiles, ácido butírico y amonio, que inhiben la proliferación de fibroblastos gingivales (Bartold, 1991a; b; Garrison & Nichols, 1989; Perova & Shubich, 2006; Sbordone *et al.*, 2000).

Complejos bacterianos en la placa subgingival

En 1998 y 2005 Socransky y cols., describieron cómo las bacterias que colonizar la placa subgingival tienden a agrupandose en complejos bacterianos demostrando una cooperación positiva entre todos los integrantes de la comunidad de acuerdo con las exigencias nutricionales y ambientales. Además, describieron cómo cada complejo puede influir sobre los otros y la relación de cada uno con el estado de salud de los tejidos periodontales. Los microorganismos que pertenecen al complejo rojo muy raras veces pueden ser detectados en ausencia de las especies del complejo de naranja y en cuanto más alta es la cantidad de bacterias del complejo naranja, mayor es la colonización de miembros del complejo rojo (Socransky *et al.*, 1998; Socransky &

Haffajee, 2005). Seis complejos bacterianos de la placa subgingival fueron descritos, como se menciona a continuación:

- Complejo azul: especies de *Actinomyces* exceptuando *Actinomyces odontolyticus*.
- Complejo amarillo: *Streptococcus gordonii*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. oralis* y *S. sanguinis*.
- Complejo morado: *A. odontolyticus* y *V. parvula*.
- Complejo verde: *E. corrodens*, *Capnocytophaga gingivalis*, *C. ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *A. actinomycetemcomitans* serotipo a y *Campylobacter concisus*.
- Complejo naranja: *Campylobacter gracilis*, *C. rectus*, *Campylobacter showae*, *F. nucleatum* ss *vincentii*, *F. nucleatum* ss *polymorphum*, *F. nucleatum* ss *nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *P. micros*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *Streptococcus constellatus* y *E. nodatum*.
- Complejo rojo: *T. forsythia*, *T. denticola* y *P. gingivalis*.

Clínicamente, los complejos azul, morado, amarillo y verde están asociados con bolsas periodontales poco profundas (<3 mm), mientras que los complejos naranja y rojo se relacionan con sitios que presentan sangrado al sondeo y bolsas periodontales profundas (>4 mm), así como con lesiones más avanzadas (Socransky *et al.*, 1998; Socransky & Haffajee, 2005).

Los complejos bacterianos forman comunidades de microorganismos embebidas en un glucocálix, las cuales se encuentran adheridas a la superficie dental y se organizan dentro de una estructura de biopelícula, brindando grandes ventajas en comparación a las bacterias platónicas (Costerton *et al.*, 1999; Costerton *et al.*, 1994; Costerton, 1995; Stoodley *et al.*, 2002). Las biopelículas tienen un alto grado de organización por su arquitectura abierta heterogénea, con canales llenos de agua, algunos de los cuales se extienden por el grosor entero de la biopelícula maximizando

la energía y movimiento de sustancias nutritivas y subproductos de la matriz extracelular (Thomas & Nakaishi, 2006; Wood *et al.*, 2000).

La mayor ventaja que ofrece la estructura de biopelícula a las bacterias sésiles es la protección tanto contra sustancias antibióticas por el potencial de las enzimas que secretan las bacterias al espacio extracelular, como contra las β -lactamasas e inmunoglobulinas, así como contra microorganismos competidores y sustancias potencialmente tóxicas del medio, procedentes del sistema inmunológico del hospedero (Stewart, 2003). Además, la biopelícula facilita la captación de nutrientes, el intercambio metabólico (una especie provee a otra de nutrientes), la eliminación de productos metabólicos potencialmente dañinos y la formación de un ambiente con las condiciones fisicoquímicas apropiadas para el desarrollo de los microorganismos que la conforman (Socransky & Haffajee, 2002).

Una de las características más interesantes de las especies bacterianas que conforman la placa dentobacteriana y otras biopelículas, es la comunicación de célula a célula y de la microcomunidad a la macrocomunidad, misma que contribuye a la regulación de la expresión de determinados genes a través de la acumulación de compuestos señalizadores que median la comunicación intercelular. Esta comunicación dinámica y regulada, llamada "quorum sensing", proporciona un mecanismo a las bacterias para supervisar la presencia de otras y modular la expresión genética en respuesta a cambios en la densidad demográfica microbiana, favoreciendo el crecimiento de bacterias benéficas para la biopelícula e impidiendo el desarrollo de especies competidoras (Camilli & Bassler, 2006).

Microbiota subgingival en diferentes latitudes

La microbiota subgingival ha sido descrita en distintas poblaciones del mundo (Colombo *et al.*, 2002; Craig *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2000; Darout *et al.*, 2002; Gajardo *et al.*, 2005; Haffajee *et al.*, 2004; Lopez *et al.*, 2004; Sanz *et al.*, 2000; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2006a). La mayoría de los estudios han reportado la presencia de las mismas

especies bacterianas, sin embargo, diferencias importantes en la prevalencia y proporción de microorganismos parecen caracterizar la microbiota subgingival en regiones específicas del mundo. Por ejemplo, se ha demostrado una prevalencia más baja de *A. actinomycetemcomitans* en individuos Europeos y Americanos que en sujetos Asiáticos con periodontitis (Ohnishi, 2006; Thiha *et al.*, 2007). Así mismo, se han descrito niveles más elevados de *P. intermedia* en Korea y China que en España y Suecia en individuos con enfermedad periodontal (Choi *et al.*, 2000; Dahlen, 2002; Haffajee *et al.*, 2004). En Brasil se reportó que en la placa subgingival, fueron encontrados los patógenos periodontales clásicos como *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola*, pero además se identificaron algunas especies inusuales como *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y especies de *Bartonella* en pacientes con periodontitis. En la población Brasileña, las especies más frecuentemente detectadas en sitios interproximales fueron *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *E. nodatum* y *F. nucleatum ss vincentii* (Colombo *et al.*, 2002).

La prevalencia de periodontopatógenos parece diferir no sólo entre zonas geográficas sino también entre distintos grupos étnicos dentro de las mismas regiones. En Guatemala fueron estudiados indígenas de comunidades rurales donde los depósitos de placa dentobacteriana y la gingivitis se presentaban de forma extensa. En dicho estudio, no existieron asociaciones entre el estado de salud periodontal y la presencia de patógenos periodontales. Así mismo, en los sitios con mayor profundidad de bolsa fueron encontrados con mayor prevalencia *S. sanguinis*, *A. viscosus* y *F. nucleatum*. En contraste, en pacientes periodontalmente sanos fueron encontrados con mayor prevalencia *A. naeslundii* y *P. micros*. Es importante destacar que *A. actinomycetemcomitans* no fue detectado en ninguna de las muestras analizadas (Dowsett *et al.*, 2002).

Investigaciones de la microbiota subgingival de sujetos mexicanos con enfermedad periodontal revelaron que *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *P. nigrescens*, se

presentaron en altos niveles, a diferencia de los individuos sanos en los que se detectaron proporciones elevadas de especies de *Actinomyces* y *Streptococcus* (Ximenez-Fyvie *et al.*, 2006a; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2006b). La composición de la microbiota de la placa dentobacteriana subgingival ha sido estudiada ampliamente a nivel global, México cuenta con poca documentación en este ámbito, sobre todo en lo que se refiere a las evaluaciones de las diversas etnias que componen una parte significativa de su población. El conocimiento de la microbiota subgingival es fundamental para entender la etiología y patogénesis de la periodontitis, por lo que es importante conocer la flora específica y los factores de virulencia que presentan los microorganismos colonizadores de poblaciones específicas.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo General

Describir la composición microbiológica de la placa subgingival de indígenas de la zona Huichola de Guadalupe Ocotán del Municipio de la Yesca del estado de Nayarit y compararla con aquella de mestizos mexicanos del Distrito Federal y Zona Metropolitana.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Determinar las cuentas bacterianas promedio de 40 especies bacterianas en muestras de placa subgingival de indígenas de la zona Huichola de Guadalupe Ocotán del Municipio de la Yesca del estado de Nayarit y de mestizos mexicanos del Distrito Federal y Zona Metropolitana.
- Determinar la prevalencia promedio de 40 especies bacterianas en muestras de placa subgingival de indígenas de la zona Huichola de Guadalupe Ocotán del Municipio de la Yesca del estado de Nayarit y de mestizos mexicanos del Distrito Federal y Zona Metropolitana.
- Determinar la proporción promedio de 40 especies bacterianas en muestras de placa subgingival de indígenas de la zona Huichola de Guadalupe Ocotán del Municipio de la Yesca del estado de Nayarit y de mestizos mexicanos del Distrito Federal y Zona Metropolitana.
- Comparar las cuentas bacterianas, prevalencia y proporción de 40 especies bacterianas en muestras de placa subgingival de indígenas de la zona Huichola de Guadalupe Ocotán del Municipio de la Yesca del estado de Nayarit y de mestizos mexicanos del Distrito Federal y Zona Metropolitana.

1.2. Planteamiento y justificación del problema

México presenta un panorama social altamente diversificado. Los pueblos indígenas son quienes contribuyen de manera importante con su patrimonio a la riqueza de la nación. Estos pueblos están integrados por más de 12 millones de personas, que constituyen más de la décima parte de la población Mexicana (Comisión-Nacional-para-el-Desarrollo-de-los-Pueblos-Indígenas, 2006), siendo los que más aportan en recursos humanos, naturales, territoriales y culturales, a pesar de estar entre los más pobres de los mexicanos. La comprensión de la microbiota subgingival en estas etnias poco estudiadas ayudará a un mejor entendimiento de los microorganismos que juegan papeles importantes en la enfermedad periodontal en nuestro país, para poder diseñar herramientas terapéuticas y preventivas específicas para el control de dichas enfermedades en dichos grupos étnicos.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Diseño experimental

El presente proyecto de investigación comprendió la realización de un estudio de tipo transversal en donde fueron evaluadas muestras de placa dentobacteriana subgingival de un total de 86 sujetos de estudio. Los sujetos de estudio indígenas fueron capturados y evaluados, en una brigada organizada por el Laboratorio de Genética Molecular de la División de estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología de la UNAM al estado de Nayarit en Junio de 2006; los sujetos mestizos provinieron de la población de individuos que se reciben por primera vez atención dental en la División de Estudios de Posgrado e Investigación y/o la Facultad de Odontología de la UNAM. Todos los sujetos fueron evaluados en una sola visita en la que se realizó una evaluación de su estado de salud médico y periodontal, se registraron los datos clínicos y se realizó la recolección de muestras.

1.2. Criterios de selección

La población de estudio consistió en dos grupos de estudio, el primero de indígenas Huicholes (n=15) y el segundo de mestizos mexicanos (n=71). La **tabla 1** proporciona una descripción de las características generales y clínicas periodontales de los grupos de estudio incluidos en el presente proyecto. Todos los sujetos tuvieron como mínimo ambos padres y 4 abuelos de origen indígena Huichol para el primer grupo y, ambos padres y 2 abuelos mexicanos sin descendencia directa de algún grupo indígena en el caso del segundo grupo (mestizos). Fueron excluidos del estudio todos los sujetos que presentaron embarazo o que estuvieran lactando o que presentaran cualquier condición sistémica que pudiera influir sobre el curso o severidad de la enfermedad periodontal, tales como diabetes, VIH/SIDA, hemofilia, enfermedades autoinmunes. El propósito del estudio fue explicado a cada sujeto de estudio quien recibió copia de la forma de consentimiento informado, aprobada por el

Comité de Ética de la Dependencia, en la que se delinee explícitamente el protocolo del estudio (**anexo 1**). Se pidió a los sujetos que firmaran dicha forma, con lo cual establecieron su deseo voluntario de participar.

1.3. Evaluación clínica

Cada sujeto de estudio recibió una evaluación periodontal completa realizada por clínicos calibrados para este propósito. Todas las mediciones clínicas fueron registradas de 6 sitios por diente (mesiobucal, bucal, distobucal, distolingual, lingual y mesiolingual) de todos los dientes en la boca 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 evaluados y el orden de las mediciones se realizaron de la siguiente manera: **1.** Acumulación de placa (0/1, ausente/presente), **2.** Enrojecimiento gingival (0/1), **3.** Profundidad de bolsa (mm), **4.** Nivel de inserción (NI, mm), **5.** Sangrado al sondeo (0/1) y **6.** Supuración al sondeo (0/1). La profundidad de bolsa y el nivel de inserción fueron registrados al milímetro más cercano utilizando una sonda periodontal “Carolina del Norte” de 15 mm de longitud (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). Estas medidas fueron registradas dos veces por el mismo clínico y el promedio de las dos mediciones fue utilizado para el análisis de datos. El resto de los parámetros clínicos fueron evaluados en una sola ocasión con mediciones dicotómicas de presencia (1) ó ausencia (0).

1.4. Evaluación Microbiológica

Las evaluaciones microbiológicas de las muestras de placa subgingival se realizaron mediante la técnica de “checkerboard” para hibridaciones ADN- ADN (Socransky *et al.*, 1994). El empleo de la técnica de “checkerboard” permitió la identificación de 40 especies bacterianas en cada una de las muestras de placa dentobacteriana de cada sujeto de estudio en un mismo experimento. Asimismo, fue

posible cuantificar 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 ADN x 28 muestras).

1.4.1. Recolección y procesamiento de muestras subgingivales

Un máximo de 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 (Hufriedy). Las muestras de placa subgingival se tomaron utilizando curetas Gracey estériles y se colocaron individualmente en tubos para microcentrifugación de 1.5 ml que contenían 150 µl de buffer TE pH 7.6 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA). Se agregaron 100 µl de NaOH (0.5 M, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) 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 ADN de cada muestra fue colocado en uno de los canales abiertos de un Minislot-30 (Immunelectrics, Cambridge MA, USA) concentrado en una membrana de nylon de carga positiva de 15 x 15 cm (Roche, Indianápolis IN, USA) 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 en mezclas ajustadas a 10^5 y 10^6 células de cultivos puros de todas las cepas bacterianas que fueron analizadas.

1.4.2. Cepas bacterianas

La lista de las 40 cepas bacterianas de referencia que fueron utilizadas en el presente estudio para la preparación de sondas de ADN se encuentra en la **tabla 2**.

Todas las cepas fueron adquiridas como cultivos liofilizados del ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD). Las cepas fueron rehidratadas en caldo para *Mycoplasma* y cultivadas en agar enriquecido (17 g - *Mycoplasma* agar base, 5 ml - solución stock de Hemina, 500 ml - agua destilada UV/UF, 5 ml - vitamina K, 25 ml - sangre de carnero desfibrinada) a 35°C de 3 a 7 días dentro de una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂ (exceptuando *Neisseria mucosa*, cultivada aeróbicamente en agar base sin enriquecimiento). Las cepas que se mencionan a continuación fueron sembradas en medios suplementados: *Campylobacter* sp.: agar enriquecido suplementado en la superficie con 0.5 ml de formato (60 mg/ml) - fumarato (60 mg/ml); *T. denticola*: caldo para *Mycoplasma* suplementado con glucosa (1 mg/ml), niacinamida (400 µg/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%); *T. forsythia*: agar enriquecido suplementado con 10 µg/ml de ácido N-acetilmurámico.

1.4.3. Preparación de sondas de ADN

El crecimiento después de 3 a 7 días de cultivo fue recolectado y colocado en tubos para microcentrifugación de 1.5 ml que contengan 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 contendrá 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 ADN fue aislado y purificado utilizando una técnica estándar previamente descrita (Smith *et al.*, 1989). La concentración de ADN 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 ADN genómico fueron preparadas para las 40 especies bacterianas (**Tabla 2**) mediante el marcaje con digoxigenina (Roche) de 1 µg de ADN purificado utilizando la técnica de primers aleatorios (random primer technique) previamente descrita (Feinberg & Vogelstein, 1983).

1.4.4. Hibridaciones ADN-ADN

Las membranas fueron prehibridizadas a 42°C durante 1 hora en solución de prehibridación que contendrá 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 ARN de levadura (Roche). La membrana con ADN fijado de las muestras de placa dentobacteriana de cada sujeto fue colocada en un Miniblotter-45 (Immunetics) con los canales de las muestras rotados 90° en relación a los canales de hibridación. Esto produce un patrón de tablero de ajedrez (checkerboard) de 30 x 45. Las sondas de ADN 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 ARN 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 ADN. La concentración de cada sonda fue ajustada mediante pruebas preliminares de ensayo y error para que todas las sondas detecten 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.

1.4.5. Detección y 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 posteriormente serán fotografiadas con cámara Digital (Kodak Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA. USA). Con ayuda de un sistema digital de fotodocumentación (DigiDoc. BioRad, CA. USA) se enviaron a un programa (Quantity One. BioRad, CA. USA), en el cual se detectaron y analizaron las señales obtenidas en los checkerboards.

1.5. Análisis estadísticos de datos

Se realizó un análisis estadístico descriptivo y comparativo de los parámetros clínicos evaluados en cada grupo de estudio tales como edad, número de dientes faltantes, género, profundidad de bolsa, nivel de inserción, sitios con NI \geq 5 mm, porcentaje de fumadores, 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 1**). Los parámetros clínicos fueron comparados entre los dos grupos de estudio utilizando la prueba U de Mann-Whitney.

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 cada una de las 40 especies bacterianas evaluadas (**tabla 2**) 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 ADN (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 de cada grupo de estudio. Los niveles y prevalencia se expresan como media \pm EEM para especies bacterianas individuales, y la proporción como media \pm EEM para especies bacterianas individuales y media para grupos de microorganismos (complejos bacterianos). Las diferencias entre los grupos fueron analizadas utilizando la prueba U de Mann-Whitney ajustando para comparaciones múltiples de acuerdo con procedimientos previamente descritos (Socransky *et al.*, 1991). En breve, se calculó un valor de p general de $0.05 = 1 - (1 - k)^{40}$, en donde k fue el valor individual deseado de p. Por lo tanto, para este cálculo, un valor de $p < 0.00127$ se consideró como estadísticamente significativo a una $p < 0.05$. Similarmente, los valores de $p < 0.00025$ y $p < 0.000025$ fueron considerados como diferencias estadísticamente significativas a $p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente.

1. RESULTADOS

1.1. Características clínicas

En la **tabla 1** se muestran las características clínicas de la población de estudio, las cuales se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM) y rango. De los 11 parámetros clínicos evaluados, únicamente se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos de estudio en el porcentaje de sitios con acumulación de placa, presentando el grupo de Huicholes un porcentaje mayor (73.74%) que el grupo de sujetos mestizos (40.03%). Los otros 10 parámetros clínicos no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, incluyendo edad, número de dientes faltantes, género, profundidad de bolsa promedio, nivel de inserción promedio, número de sitios con nivel de inserción ≥ 5 mm, porcentaje de fumadores actuales, porcentaje de sitios con enrojecimiento gingival, sangrado al sondeo y supuración. Esto demuestra una homogeneidad en la distribución de individuos en los grupos de estudio en términos de sus características clínicas.

1.2. Cuentas bacterianas

Los niveles totales promedio o cuentas bacterianas totales $\times 10^5$ de las 40 especies evaluadas en muestras de placa dentobacteriana subgingival de 86 sujetos mexicanos (Huicholes, $n=15$; mestizos, $n=71$) se muestran en la **Figura 1**. El grupo de Huicholes presentó niveles totales promedio de 3.56 veces mayores que el grupo de mestizos. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los grupos de estudio y podría estar relacionada con el aumento en el porcentaje de sitios con acumulación de placa observado en el grupo de Huicholes que se describió en el inciso anterior.

En la **tabla 3** y en la **figura 2** se presentan los niveles promedio o cuentas bacterianas promedio $\times 10^5$ de las 40 especies individuales en cada uno de los grupos de estudio. Todas las especies bacterianas evaluadas fueron detectadas tanto en

sujetos Huicholes como mestizos, sin embargo, 38 de las 40 especies presentaron niveles promedio más elevados en el grupo de Huicholes y las diferencias fueron estadísticamente significativas para un total de 25 especies bacterianas después de ajustar para comparaciones múltiples. Únicamente *P. gingivalis* y *L. buccalis* presentaron niveles promedio más elevados en sujetos mestizos, sin embargo, las diferencias entre grupos para dichas especies no fueron estadísticamente significativas. Las especies que mostraron los niveles promedio más altos en ambos grupos fueron *A. viscosus*, *A. naeslundii* y *C. matruchotii*. Cabe destacar que dichas especies junto con *N. mucosa*, fueron además las que presentaron las diferencias más importantes entre grupos de estudio, pareciendo caracterizar con niveles elevados la microbiota subgingival de sujetos Huicholes. Por otra parte, las especies que presentaron los niveles promedio más bajos en ambos grupos de estudio fueron *A. actinomycetemcomitans*, *Selenomonas noxia*, *C. gracilis* y *Porphyromonas endodontalis*, todas de las cuales fueron detectadas en niveles promedio inferiores a 1.75×10^5 .

1.3. Prevalencia

La prevalencia promedio (% sitios colonizados \pm EEM) de las 40 especies individuales en muestras de placa dentobacteriana subgingival de sujetos Huicholes y mestizos mexicanos se muestra en la **tabla 4** y **figura 3**. Todas las especies tuvieron una prevalencia mayor al 50% en los sujetos Huicholes, presentado este grupo de estudio en promedio de 54.58% a 90.51% de sitios colonizados por alguna de las 40 especies evaluadas. En contraste, el grupo de mestizos presentó en promedio de 12.31% a 58.99% de sitios colonizados por alguna de las especies bacterianas. *N. mucosa*, *T. forsythia*, *S. mitis* y *P. acnes* presentaron la prevalencia más alta en el grupo de Huicholes, mientras que *C. matruchotii*, *A. naeslundii*, *A. viscosus* y *P. gingivalis* fueron las especies más prevalentes en sujetos mestizos.

Cabe destacar que las 40 especies evaluadas presentaron una prevalencia más elevada en individuos Huicholes que en mestizos y que la diferencia entre grupos fue estadísticamente significativa para 29 especies, dentro de las cuales se destacan *N. mucosa*, *P. acnes*, *S. mitis*, *C. ochracea*, *S. noxia*, *S. oralis* y *T. forsythia* ($p < 0.001$) por presentar diferencias mayores a 50% en el porcentaje de sitios colonizados entre los 2 grupos de estudio.

1.4. Proporción

1.4.1. Especies individuales

La proporción promedio (% cuentas totales de sondas de ADN \pm EEM) de las 40 especies individuales se muestran en la **Tabla 5** y **figura 4**. La proporción promedio de 21 de las 40 especies bacterianas fue mayor en los sujetos Huicholes que en los mestizos, sin embargo, las diferencias entre grupos fueron estadísticamente significativas únicamente para *C. ochracea* ($p < 0.05$), *S. oralis* ($p < 0.01$), *N. mucosa* ($p < 0.001$) y *P. acnes* ($p < 0.001$). Las especies con proporciones promedio menores en sujetos Huicholes que en mestizos fueron *L. buccalis*, *P. gingivalis*, *A. viscosus*, *E. saburreum*, *F. nucleatum*, *P. micros*, *V. parvula*, *A. israelii*, *T. denticola*, *G. morbillorum*, *P. nigrescens*, *A. georgiae*, *C. gingivalis*, *P. melaninogenica*, *C. sputigena*, *S. artemidis*, *A. actinomycetemcomitans*, *E. sulci* y *S. constellatus*, sin embargo, únicamente la diferencia en la proporción de *S. artemidis* entre grupos fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

1.4.2. Complejos bacterianos

En la **figura 5** se presenta la proporción promedio (% de cuentas totales de sondas de DNA) de las 40 especies bacterianas agrupadas de manera similar a la descripción de complejos bacterianos en la placa subgingival (Socransky *et al.*, 1998; Socransky & Haffajee, 2005). La proporción de complejos bacterianos fue relativamente similar entre los grupos de estudio, sin embargo, los sujetos mestizos

presentaron una proporción mayor de las especies periodontopatógenas del complejo rojo (no estadísticamente significativo) que el grupo de Huicholes, mientras que estos últimos presentaron una proporción significativamente mayor de las especies de *Streptococcus* del complejo amarillo ($p < 0.05$).

1. DISCUSIÓN

El propósito del presente estudio fue describir la microbiota subgingival de una población indígena aleatoria de origen Huichol y compararla con aquella de sujetos mestizos. Los resultados indicaron que a pesar de que todas las especies bacterianas evaluadas fueron detectadas en ambos grupos de estudio, existen diferencias significativas en la microbiota de la placa subgingival entre estos dos grupos étnicos al comparar poblaciones con parámetros clínicos y periodontales similares.

Está bien demostrado que a mayor acumulación de placa, mayor cantidad de microorganismos, sin embargo, la diferencia entre salud y enfermedad periodontal no radica primordialmente en la carga bacteriana sino en la proporción de microorganismos específicos que se encuentran presentes en la placa. Los microorganismos asociados a las enfermedades periodontales consta de especies como *F. nucleatum*, *F. periodonticum*, *C. rectus*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* y *C. gracilis* (complejo naranja) (Gmur *et al.*, 2004), así como *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. gingivalis* (complejo rojo) y *A. actinomycetemcomitans* que son los microorganismos predominantes en muestras de placa subgingival en individuos con enfermedad periodontal (Socransky *et al.*, 1998; Socransky & Haffajee, 2005). Estos últimos son considerados como los patógenos periodontales más agresivos, por sus factores de virulencia como productos bacterianos, tales como lipopolisacáridos y ácidos teicoicos que acumulados en el tejido periodontal, incitan reacciones inflamatorias que están fuertemente asociadas con reabsorción ósea, bolsas profundas (>5 mm), pérdida de adherencia y sangrado al sondaje (Socransky *et al.*, 1998; Socransky & Haffajee, 2005).

En los sujetos Huicholes las proporciones más elevadas de microorganismos en la placa dentobacteriana subgingival que se detectaron en el presente estudio fueron aquellas de los complejos azul, naranja y amarillo, siendo este último el que presentó

diferencias estadísticamente significativas al ser comparada con la de sujetos mestizos. Así mismo, se encontraron diferencias importantes en algunas de las especies del complejo naranja como *F. nucleatum*, *P. micros*, *P. nigrescens*, *S. constellatus* las cuales presentaron menores proporciones así como *P. intermedia*, *F. periodonticum*, *C. showae*, *C. rectus* y *C. gracilis* con proporciones mayores sin ser estadísticamente significativas en los sujetos Huicholes. Por otra parte, en los sujetos mestizos predominaron los complejos azul, naranja y rojo, coincidiendo este hallazgo con estudios previos en sujetos mexicanos urbanos con enfermedad periodontal (Ximenez-Fyvie *et al.*, 2006a; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2006b).

Socransky y cols. reportaron hallazgos microbiológicos que indicaron que la colonización de especies como *Fusobacterium* sp. y algunas especies del complejo naranja son un prerrequisito para la aparición de los microorganismos patógenos periodontales, en el presente estudio *P. gingivalis*, *T. denticola* y *A. actinomycetemcomitans* mostraron menores proporciones en los sujetos Huicholes al ser comparados con los sujetos mestizos (Socransky *et al.*, 1998). Considerando el poco número de sitios con nivel de inserción ≥ 5 mm en la población de Huicholes, este resultado corrobora los hallazgos de estudios previos en los que se ha observado que *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* (complejo rojo) y *A. actinomycetemcomitans* pueden no encontrarse o estar presentes en escasa proporción en la placa subgingival de sujetos con salud periodontal (Choi *et al.*, 2000; Dahlen *et al.*, 1992b; Dowsett *et al.*, 2002; Haffajee & Socransky, 1994; Kamma *et al.*, 1995; Loesche, 1992; Mombelli *et al.*, 2000; Moore & Moore, 1994; Paster *et al.*, 2001; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000a).

Es interesante que todas las especies evaluadas presentaron una prevalencia mayor al 50% de sitios colonizados en los sujetos Huicholes, sin embargo, la microbiota de ambos grupos fue dominada por *A. naeslundii*, *A. viscosus* y *C. matruchotii*, los cuales también son dominantes en sujetos mexicanos urbanos con

periodontitis crónica, agresiva y con salud periodontal (Ximenez-Fyvie *et al.*, 2006a; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2006b).

Los sujetos Huicholes presentaron parámetros similares a estudios de la placa subgingival en poblaciones de mestizos Mexicanos con salud y con sus respectivos aumentos en prevalencia y proporción en microorganismos del complejo rojo y naranja en sitios con periodontitis ya sea crónica o agresiva (Ximenez-Fyvie *et al.*, 2006a; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2006b), coincidiendo también estudios previos en poblaciones rurales-indígenas y no indígenas de otras partes del mundo (Baelum *et al.*, 2003; Dowsett *et al.*, 2002; Mumghamba *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2007), donde los rasgos clínicos como la acumulación de placa y la presencia de gingivitis son generalizados y abundantes.

Los resultados obtenidos en la población analizada en este estudio presentan un perfil microbiológico similar al de los sujetos en poblaciones de México (Ximenez-Fyvie *et al.*, 2006a; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2006b), Chile (Lopez *et al.*, 2004), Brasil (Colombo *et al.*, 2002), Colombia (Mayorga-Fayad *et al.*, 2007), Guatemala (Dowsett *et al.*, 2002), Suecia (Haffajee *et al.*, 2005), Estados Unidos de Norte América (Haffajee *et al.*, 2004) con diferencias y similitudes tanto en prevalencia como en proporción en distintas especies que integran los complejos bacterianos, particularmente en especies como *A. naeslundii* que es el microorganismo con mayor prevalencia tanto en sujetos Huicholes, sujetos mestizos mexicanos (Ximenez-Fyvie *et al.*, 2006a; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2006b) y sujetos brasileños (Colombo *et al.*, 2002) y con menores proporciones en sujetos de Chile (Lopez *et al.*, 2004), Suecia (Haffajee *et al.*, 2005), Colombia (Mayorga-Fayad *et al.*, 2007) y norteamericanos (Haffajee *et al.*, 2004) siendo más amplias en la comparativa de sujetos Huicholes contra sujetos Chilenos (Lopez *et al.*, 2004).

Las diferencias más notorias con prevalencias menores en *P. gingivalis* y *P. nigrescens* siendo ambas 3 veces menor en sujetos con salud periodontal y

ligeramente mayor o igual en sujetos con enfermedad, *T. forsythia* es 7 veces menor en salud periodontal y 1.4 mayor en enfermedad periodontal y *P. melaninogenica* 8 y 2 veces menor respectivamente en sujetos de Brasil (Colombo *et al.*, 2002) en comparación con los sujetos Huicholes, con números menores *C. rectus*, *Fusobacterium* sp. y *E. corrodens* fueron la especies con mayor prevalencia en sujetos de Colombia (Mayorga-Fayad *et al.*, 2007) contra *N. mucosa*, *T. forsythia* y *S. mitis* en sujetos Huicholes, así como también mayores proporciones de especies como *E. saburreum*, *P. gingivalis* y *C. rectus*; con proporciones menores *S. intermedius*, *S. mitis* y *S. oralis* en sujetos suecos (Haffajee *et al.*, 2005) en comparación con sujetos Huicholes respectivamente, las mayores diferencias proporcionales se da en microorganismos pertenecientes al complejo amarillo en los Huicholes en comparación con sujetos de Brasil (Colombo *et al.*, 2002), Chile (Lopez *et al.*, 2004), Colombia (Mayorga-Fayad *et al.*, 2007), Camerun (Ali *et al.*, 1997), Suecia (Haffajee *et al.*, 2005) y EUA (Haffajee *et al.*, 2004) así como estos sujetos muestran una mayor proporción en integrantes del “complejo rojo” a comparación de los sujetos Huicholes. Estas comparaciones nos remarcan la importancia del papel que juegan los microorganismos patógenos en el desarrollo y presentación de las enfermedades periodontales con un predominio en prevalencia y proporción de la microbiota subgingival.

La prevalencia y proporción de los microorganismos periodontopatógenos así como número de dientes faltantes, profundidad de bolsa, nivel de inserción, enrojecimiento gingival y sangrado al sondeo se muestran mayores en poblaciones asiáticas como Corea (Choi *et al.*, 2000), Tailandia (Papapanou *et al.*, 2002), China (Gmur *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007) en comparación con los sujetos Huicholes.

El consumo del peyote es un factor que podría influir en la ecología subgingival de los sujetos Huicholes, a pesar de que no se sabe a ciencia cierta que tanto puede influir, ya que existe poca información. Se tiene el conocimiento de que el consumo de

Khat o *Catha edulis* que es una planta que tiene efectos anfetaminicos consumida regularmente en Yemen y buena parte del este de África, tiene influencias sobre el perfil microbiano subgingival favoreciendo la presencia de especies que son compatibles con la salud periodontal demostrando diferencias significativamente bajas en la media de profundidad de bolsa, así como aumento significativo de predominio de *S. intermedius*, *V. parvula* y *E. corrodens*; además, de bajos niveles y predominio de microorganismos patógenos en los sujetos que la consumen (Al-Hebshi & Skaug, 2005).

Factores como la localización geográfica, la edad avanzada, la raza, el género, el nivel bajo socioeconómico, desnutrición, la diabetes, fumar, el empleo de medicaciones y la pobre higiene bucal, son relacionados con el desarrollo y gravedad de la enfermedad periodontal ya que contribuyen en la modificación de la ecología de la microbiota subgingival creando una gran variabilidad en la distribución y el comportamiento de microorganismos asociados con la enfermedad, de modo que los diferentes factores de riesgo puedan mantener o agravar el estado de salud en tiempos distintos a lo largo de la vida del individuo (de Macedo *et al.*, 2006; Genco, 1996).

Otro factor importante es la desprotección de las comunidades indígenas en cuanto a la atención odontológica eficiente es un aislamiento tanto cultural como de vías de acceso en que viven la mayoría de las comunidades; debido a la necesidad de protegerse del "ataque de la civilización". A esto se suma la inexistencia de profesionales de la salud oral cerca de las zonas de asentamientos indígenas obligando a los habitantes a realizar desplazamientos hasta poblaciones cercanas a varias horas de camión, o a pie para así tener un servicio odontológico.

Las esporádicas visitas de los servicios de salud departamentales o de instituciones o agremiaciones privadas para realizar "brigadas de salud" convierten a los tratamientos mutilantes tales como exodoncias, en los procedimientos más

realizados en sus diferentes visitas. Esto, debido a las dificultades operativas y logísticas para el desplazamiento tanto de los profesionales como de equipos a estas zonas. A pesar del aislamiento observado, en la mayoría de las comunidades observamos la gran influencia de dieta elaborada (enlatados y productos alimenticios procesados y empacados, refrescos, dulces, etc.) y altamente cariogénica, que día a día ganan más popularidad dentro de los indígenas, desplazando en muchos casos la dieta natural de los pobladores, siendo esta la causante de los altos índices de caries y enfermedad periodontal encontrados en la mayoría de los pobladores rurales.

La composición de la microbiota subgingival de los sujetos Huicholes tiene una prevalencia y proporciones de especies que favorecen el estado de salud periodontal, así como de una gran cantidad de microorganismos del complejo naranja asociados a la gingivitis, con estos resultados, se puede sugerir que los sujetos Huicholes tienen poca predisposición a las enfermedades periodontales. El estudio del comportamiento de la microbiota subgingival en las diversas etnias, así como de la población mexicana en general es escaso, es necesario una mejor comprensión del papel de los microorganismos tanto en la salud como en la enfermedad periodontal, siendo fundamental para formular medidas preventivas más eficaces y terapéuticas acertadas para estos padecimientos que atañen a buena parte de la población mexicana.

1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Hashimi I, Levine MJ (1989). Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle. *Arch Oral Biol* 34(4):289-95.

Al-Hebshi NN, Skaug N (2005). Effect of khat chewing on 14 selected periodontal bacteria in sub- and supragingival plaque of a young male population. *Oral Microbiol Immunol* 20(3):141-6.

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(11):830-5.

Armitage G (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 4(1):1-6.

Baelum V, Pisuithanakan S, Teanpaisan R, Pithpornchaiyakul W, Pongpaisal S, Papapanou PN, *et al.* (2003). Periodontal conditions among adults in Southern Thailand. *J Periodontal Res* 38(2):156-63.

Bartold PM (1991a). Connective tissues of the periodontium. Research and clinical implications. *Aust Dent J* 36(4):255-68.

Bartold PM (1991b). Lipopolysaccharide stimulation of hyaluronate synthesis by human gingival fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol* 36(11):791-7.

Bascones A, Noronha S, Gomez M, Mota P, Gonzalez Moles MA, Villarroel Dorrego M (2005). Tissue destruction in periodontitis: bacteria or cytokines fault? *Quintessence Int* 36(4):299-306.

Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C (1998). Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infect Immun* 66(10):4729-32.

Camilli A, Bassler BL (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* 311(5764):1113-6.

Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Souto R, Rosalem WJ, Mendes MC, *et al.* (2002). Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol* 73(4):360-9.

Comisión-Nacional-para-el-Desarrollo-de-los-Pueblos-Indígenas (2006). Información de los pueblos indígenas de México: Huicholes.

Costerton J, Cook G, Lamont R (1999). The community architecture of biofilms: dynamic structures and mechanisms. In: Newman HN & Wilson M, ed. *Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease*. Eastman Dental Institute, University College London:5-14.

Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G (1994). Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 176(8):2137-42.

Costerton JW (1995). Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 15(3):137-40.

Craig RG, Yip JK, Mijares DQ, Boylan RJ, Haffajee AD, Socransky SS (2003). Destructive periodontal diseases in minority populations. *Dent Clin North Am* 47(1):103-14.

Choi B, Park S, Yoo Y, Choi S, Chai J, Cho K, *et al.* (2000). Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced adult periodontitis patients using a nucleic acid-based approach. *J Periodontol* 71(9):1387-94.

Christersson LA, Grossi SG, Dunford RG, Machtei EE, Genco RJ (1992). Dental plaque and calculus: risk indicators for their formation. *J Dent Res* 71(7):1425-30.

Dahlen G, Lindhe J, Sato K, Hanamura H, Okamoto H (1992a). The effect of supragingival plaque control on the subgingival microbiota in subjects with periodontal disease. *J Clin Periodontol* 19(10):802-9.

Dahlen G, Manji F, Baelum V, Fejerskov O (1992b). Putative periodontopathogens in "diseased" and "non-diseased" persons exhibiting poor oral hygiene. *J Clin Periodontol* 19(1):35-42.

Dahlen G (2002). Microbiology and treatment of dental abscesses and periodontal-endodontic lesions. *Periodontol 2000* 28:206-39.

Darout IA, Albandar JM, Skaug N, Ali RW (2002). Salivary microbiota levels in relation to periodontal status, experience of caries and miswak use in Sudanese adults. *J Clin Periodontol* 29(5):411-20.

De Macedo TC, Costa Mda C, Gomes-Filho IS, Vianna MI, Santos CT (2006). Factors related to periodontal disease in a rural population. *Braz Oral Res* 20(3):257-62.

Dowsett SA, Kowolik MJ, Archila LA, Eckert GJ, LeBlanc DJ (2002). Subgingival microbiota of indigenous Indians of Central America. *J Clin Periodontol* 29(2):159-67.

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(2):235-44.

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

Gajardo M, Silva N, Gomez L, Leon R, Parra B, Contreras A, *et al.* (2005). Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol* 76(2):289-94.

Garrison SW, Nichols FC (1989). LPS-elicited secretory responses in monocytes: altered release of PGE₂ but not IL-1 beta in patients with adult periodontitis. *J Periodontal Res* 24(2):88-95.

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

Gibbons RJ, Kapsimalis B, Socransky SS (1964). The Source of Salivary Bacteria. *Arch Oral Biol* 16:101-3.

Gibbons RJ, Nygaard M (1970). Interbacterial aggregation of plaque bacteria. *Arch Oral Biol* 15(12):1397-400.

Gibbons RJ, Houte JV (1975). Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Annu Rev Microbiol* 29:19-44.

Gibbons RJ, Spinell DM, Skobe Z (1976). Selective adherence as a determinant of the host tropisms of certain indigenous and pathogenic bacteria. *Infect Immun* 13(1):238-46.

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

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

Gibbons RJ, Hay DI, Childs WCd, Davis G (1990). Role of cryptic receptors (cryptitopes) in bacterial adhesion to oral surfaces. *Arch Oral Biol* 35(Suppl):107S-114S.

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

Gmur R, Wyss C, Xue Y, Thurnheer T, Guggenheim B (2004). Gingival crevice microbiota from Chinese patients with gingivitis or necrotizing ulcerative gingivitis. *Eur J Oral Sci* 112(1):33-41.

Goodson JM, Tanner AC, Haffajee AD, Sornberger GC, Socransky SS (1982). Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 9(6):472-81.

Grenier D, Mayrand D (1985). Cytotoxic effects of culture supernatants of oral bacteria and various organic acids on Vero cells. *Can J Microbiol* 31(3):302-4.

Haffajee AD, Socransky SS, Goodson JM (1983). Clinical parameters as predictors of destructive periodontal disease activity. *J Clin Periodontol* 10(3):257-65.

Haffajee AD, Socransky SS (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 5:78-111.

Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS (2004). Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol* 31(11):996-1002.

Haffajee AD, Japlit M, Bogren A, Kent RL, Jr., Goodson JM, Socransky SS (2005). Differences in the subgingival microbiota of Swedish and USA subjects who were periodontally healthy or exhibited minimal periodontal disease. *J Clin Periodontol* 32(1):33-9.

Irfan U, Dawson D, Bissada N (2001). Epidemiology of periodontal disease: a review and clinical perspectives. *J Int Acad Periodontol* 3(1):14-21.

Kamma JJ, Nakou M, Manti FA (1995). Predominant microflora of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis. *J Periodontal Res* 30(1):66-72.

Kamma JJ, Diamanti-Kipiotti A, Nakou M, Mitsis FJ (2000a). Profile of subgingival microbiota in children with primary dentition. *J Periodontal Res* 35(1):33-41.

Kamma JJ, Diamanti-Kipiotti A, Nakou M, Mitsis FJ (2000b). Profile of subgingival microbiota in children with mixed dentition. *Oral Microbiol Immunol* 15(2):103-11.

Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LV (1990). Intrageneric coaggregation among strains of human oral bacteria: potential role in primary colonization of the tooth surface. *Appl Environ Microbiol* 56(12):3890-4.

Kolenbrander PE, J. L (1992). Ecological significance of coaggregation among oral bacteria. *Adv. Microb. Ecol* 12:183-217.

Kolenbrander PE, London J (1993). Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 175(11):3247-52.

Kolenbrander PE (1995). Coaggregations among oral bacteria. *Methods Enzymol* 253:385-97.

Kolenbrander PE (2000). Oral microbial communities: Biofilms, Interactions, and Genetic Systems. *Annu Rev Microbiol* 54:413-437.

Kononen E, Jousimies-Somer H, Asikainen S (1992). Relationship between oral gram-negative anaerobic bacteria in saliva of the mother and the colonization of her edentulous infant. *Oral Microbiol Immunol* 7(5):273-6.

Kononen E (1999). Oral colonization by anaerobic bacteria during childhood: role in health and disease. *Oral Dis* 5(4):278-85.

Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, *et al.* (2004). Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 97(6):1311-8.

Lindhe J, Karring T, Lang P (1998). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Copenhagen: Munksgaard, pp. 973.

Listgarten M (1999). Formation of dental plaque and other oral biofilms. In: Newman HN & Wilson M, ed. *Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease*. Eastman Dental Institute, University College London:187-210.

Listgarten MA (1994). The structure of dental plaque. *Periodontol 2000* 5:52-65.

Loesche WJ (1992). DNA probe and enzyme analysis in periodontal diagnostics. *J Periodontol* 63(12 Suppl):1102-9.

Lopez NJ, Socransky SS, Da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD (2004). Subgingival microbiota of Chilean patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 75(5):717-25.

Mayorga-Fayad I, Lafaurie GI, Contreras A, Castillo DM, Baron A, Aya Mdel R (2007). [Subgingival microbiota in chronic and aggressive periodontitis in Bogota, Colombia: an epidemiological approach]. *Biomedica* 27(1):21-33.

McNabb H, Mombelli A, Gmur R, Mathey-Dinc S, Lang NP (1992). Periodontal pathogens in the shallow pockets of immigrants from developing countries. *Oral Microbiol Immunol* 7(5):267-72.

Mombelli A, Lang NP, Burgin WB, Gusberti FA (1990). Microbial changes associated with the development of puberty gingivitis. *J Periodontal Res* 25(6):331-8.

Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP (2000). Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodontal disease. *J Periodontol* 71(1):14-21.

Moore WE, Moore LV (1994). The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000* 5:66-77.

Mumghamba EG, Markkanen HA, Honkala E (1995). Risk factors for periodontal diseases in Ilala, Tanzania. *J Clin Periodontol* 22(5):347-54.

Nishihara T, Koseki T (2004). Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol 2000* 36:14-26.

Ohnishi M (2006). [Quantitative analysis of periodontal pathogens in aggressive periodontitis patients in a Japanese population]. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 73(1):70-8.

Page RC (1999). Milestones in periodontal research and the remaining critical issues. *J Periodontal Res* 34(7):331-9.

Papapanou PN (2002). Population studies of microbial ecology in periodontal health and disease. *Ann Periodontol* 7(1):54-61.

Papapanou PN, Teanpaisan R, Obiechina NS, Pithpornchaiyakul W, Pongpaisal S, Pisuithanakan S, *et al.* (2002). Periodontal microbiota and clinical periodontal status in a rural sample in southern Thailand. *Eur J Oral Sci* 110(5):345-52.

Paster B, Boches S, Galvin J, Ericson R, Lau C, Levanos V, *et al.* (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 183(12):3770-83.

Perova MD, Shubich MG (2006). Molecular aspects of the pathogenesis of inflammatory-destructive diseases of the periodontium. *Arkh Patol* 68(5):59-63.

Quirynen M, Papaioannou W, van Steenberghe TJ, Dierickx K, Cassiman JJ, van Steenberghe D (2001). Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* strains to cultured epithelial cells from patients with a history of chronic adult periodontitis or from patients less susceptible to periodontitis. *J Periodontol* 72(5):626-33.

Rose LF, Steinberg BJ, Minsk L (2000). The relationship between periodontal disease and systemic conditions. *Compend Contin Educ Dent* 21(10A):870-7.

Sanz M, van WA, Herrera D, DelleMijn-Kippuw N, Simon R, Winkel E (2000). Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Eur J Oral Sci* 108(5):383-92.

Sbordone L, Di Genio M, Bortolaia C (2000). [Bacterial virulence in the etiology of periodontal diseases]. *Minerva Stomatol* 49(10):485-500.

Smith GL, Socransky SS, Sansone C (1989). "Reverse" DNA hybridization method for the rapid identification of subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 4(3):141-5.

Socransky S, Haffajee A (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000 28:12-55.

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S (1991). Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol* 18(10):766-75.

Socransky SS, Haffajee AD (1992). The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 63(4 Suppl):322-31.

Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE (1994). "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 17(4):788-92.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25(2):134-44.

Socransky SS, Haffajee AD (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 38:135-87.

Stewart PS (2003). Diffusion in biofilms. *J Bacteriol* 185(5):1485-91.

Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56:187-209.

Thiha K, Takeuchi Y, Umeda M, Huang Y, Ohnishi M, Ishikawa I (2007). Identification of periodontopathic bacteria in gingival tissue of Japanese periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 22(3):201-7.

Thomas JG, Nakaishi LA (2006). Managing the complexity of a dynamic biofilm. *J Am Dent Assoc* 137 Suppl:10S-15S.

Tonetti MS, Mombelli A (1999). Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol* 4(1):39-53.

Wang QT, Wu ZF, Wu YF, Shu R, Pan YP, Xia JL (2007). Epidemiology and preventive direction of periodontology in China. *J Clin Periodontol* 34(11):946-51.

Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE (1996). Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol* 50:513-52.

Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C (2000). Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res* 79(1):21-7.

Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS (2000a). Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 27(10):722-32.

Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS (2000b). Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 27(9):648-57.

Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Som S, Thompson M, Torresyap G, Socransky SS (2000c). The effect of repeated professional supragingival plaque removal on the composition of the supra- and subgingival microbiota. *J Clin Periodontol* 27(9):637-47.

Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Moreno-Borjas JY, Alcantara-Maruri E (2006a). Subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 33(12):869-77.

Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Sanchez-Vargas LO, Alcantara-Maruri E (2006b). Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health. *J Periodontol* 77(3):460-71.

1. TABLAS

Tabla 1. Características clínicas de la población de estudio (n=86).

	Huicholes (n=15)			Mestizos (n=71)		
	Media	EEM	Rango	Media	EEM	Rango
Edad (años)	42.40	4.23	21-72	37.85	1.49	23-75
Número de dientes faltantes	1.93	0.46	0-5	2.41	0.25	0-7
Género (% mujeres)	66.67			64.79		
Profundidad de bolsa promedio (mm)	2.85	0.17	1.53-3.83	3.04	0.13	1.68-7.06
Nivel de inserción promedio (NI, mm)	2.92	0.19	1.48-4.20	3.25	0.16	1.66-7.37
Sitios con NI≥5 mm	6.47	2.54	0-37	27.62	4.06	0-121
% fumadores actuales	13.33			15.49		
<i>% sitios con:</i>						
Acumulación de placa *	73.74	6.51	27.16-100	40.03	4.32	0-100
Enrojecimiento gingival	18.95	6.36	0-72.84	17.12	3.24	0-100
Sangrado al sondeo	28.56	4.73	0-54.49	29.98	3.46	0-100
Supuración	0.79	0.55	0-8.02	2.55	0.72	0-36.96

* $p < 0.05$, prueba U de Mann-Whitney.

Tabla 2. Cepas de referencia empleadas para la elaboración de sondas de ADN.

Especie	Ref.*	Complejo [†]	Especie	Ref.*	Complejo [†]
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	‡	No agrupado	<i>Neisseria mucosa</i>	19696	Otros
<i>Actinomyces georgiae</i>	49285	Azul	<i>Peptostreptococcus micros</i>	33270	Naranja
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	Azul	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	35406	Otros
<i>Actinomyces naeslundii</i> stp. 1	12104	Azul	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277	Rojo
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929	Morado	<i>Prevotella intermedia</i>	25611	Naranja
<i>Actinomyces viscosus</i>	43146	Azul	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845	Otros
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236	Naranja	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563	Naranja
<i>Campylobacter rectus</i>	33238	Naranja	<i>Propionibacterium acnes</i>	6919	Otros
<i>Campylobacter showae</i>	51146	Naranja	<i>Selenomonas artemidis</i>	43528	Otros
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	Verde	<i>Selenomonas noxia</i>	43541	No agrupado
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	27872	Verde	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397	Amarillo
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612	Verde	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823	Naranja
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	14266	Otros	<i>Streptococcus gordonii</i>	10558	Amarillo
<i>Eikenella corrodens</i>	23834	Verde	<i>Streptococcus intermedius</i>	27335	Amarillo
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271	Otros	<i>Streptococcus mitis</i>	49456	Amarillo
<i>Eubacterium sulci</i>	35585	Otros	<i>Streptococcus oralis</i>	35037	Amarillo
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	§	Naranja	<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556	Amarillo
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693	Naranja	<i>Tannerella forsythia</i>	43037	Rojo
<i>Gemella morbillorum</i>	27824	Otros	<i>Treponema denticola</i>	35405	Rojo
<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201	Otros	<i>Veillonella parvula</i>	10790	Morado

* Número de referencia del American Type Culture Collection (ATCC).

† Especies agrupadas de acuerdo a la descripción de los complejos bacterianos en la placa dentobacteriana subgingival (Socransky *et al.*, 1998; Socransky & Haffajee, 2005). Con las siguientes excepciones: *A. georgiae*, *A. israelii*, *A. naeslundii* 1 y *A. viscosus* agrupados en el complejo azul; *C. matruchotii*, *E. saburreum*, *E. sulci*, *G. morbillorum*, *L. buccalis*, *N. mucosa*, *P. endodontalis*, *P. melaninogenica*, *P. acnes* y *S. artemidis* agrupados como "Otros".

‡ ADN de los serotipos a (43717) y b (43718) fue combinado para generar una sonda de ADN.

§ ADN de las subespecies *nucleatum* (25586), *polymorphum* (10953) y *vincentii* (49256) fue combinado para generar una sonda de ADN.

Tabla 3. Niveles promedio (cuentas bacterianas x10⁵) de 40 especies bacterianas.

Especie	Huicholes (n=15)				Mestizos (n=71)				p<†
	Media	EEM*	Min	Max	Media	EEM*	Min	Max	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	1.74	0.68	0.11	10.64	0.59	0.11	0	5.36	0.05
<i>A. georgiae</i>	3.74	0.74	0.49	9.92	1.77	0.41	0	20.91	0.05
<i>A. israelii</i>	11.58	3.53	1.21	53.68	4.23	1.07	0	66.63	0.05
<i>A. naeslundii</i> 1	29.81	6.19	1.63	78.47	6.70	1.17	0	45.53	0.001
<i>A. odontolyticus</i>	7.85	4.44	1.00	69.51	1.45	0.26	0	11.16	0.01
<i>A. viscosus</i>	20.22	3.91	2.39	55.39	6.71	1.07	0	52.77	0.01
<i>C. gingivalis</i>	7.32	3.97	0	55.13	1.57	0.24	0	9.59	ns‡
<i>C. gracilis</i>	1.39	0.26	0	3.50	0.37	0.07	0	2.76	0.01
<i>C. matruchotii</i>	23.77	4.89	0.99	69.74	5.29	0.67	0	27.97	0.001
<i>C. ochracea</i>	3.11	1.07	0	17.17	0.69	0.15	0	7.66	0.01
<i>C. rectus</i>	3.00	0.80	0.41	10.31	0.84	0.14	0	4.77	0.05
<i>C. showae</i>	4.02	1.91	0.04	30.33	0.66	0.12	0	5.77	0.001
<i>C. sputigena</i>	2.90	1.44	0.01	21.50	1.04	0.17	0	8.04	ns‡
<i>E. corrodens</i>	4.79	1.02	0.26	13.40	1.76	0.29	0	9.79	0.05
<i>E. saburreum</i>	7.70	4.16	0.29	63.94	2.34	0.41	0	16.29	ns‡
<i>E. sulci</i>	7.46	4.79	0.10	73.41	1.82	0.39	0	15.19	ns‡
<i>F. nucleatum</i>	4.40	1.39	0.17	19.51	2.03	0.31	0	12.82	ns‡
<i>F. periodonticum</i>	9.36	4.96	0.21	75.79	1.83	0.33	0	14.89	ns‡
<i>G. morbillorum</i>	6.95	3.06	0	47.51	1.78	0.37	0	17.80	ns‡
<i>L. buccalis</i>	4.09	1.30	0.56	18.88	4.97	0.97	0	45.59	ns‡
<i>N. mucosa</i>	12.88	5.83	0.39	86.77	1.09	0.18	0	6.84	0.001
<i>P. acnes</i>	3.26	0.60	0.55	9.12	1.12	0.28	0	10.11	0.001
<i>P. endodontalis</i>	1.63	1.02	0	15.71	0.24	0.08	0	4.19	0.01
<i>P. gingivalis</i>	3.14	0.79	0	10.47	4.21	0.65	0	30.97	ns‡
<i>P. intermedia</i>	5.14	1.11	0.01	14.93	2.21	0.28	0	8.06	ns‡
<i>P. melaninogenica</i>	3.99	1.02	0.03	14.81	1.38	0.26	0	13.86	0.05
<i>P. micros</i>	5.14	2.94	0.15	45.20	2.67	0.72	0	34.96	ns‡
<i>P. nigrescens</i>	5.69	2.34	0.23	35.54	1.72	0.28	0	9.00	ns‡
<i>S. anginosus</i>	8.54	2.21	0.48	25.98	1.69	0.32	0	12.61	0.01
<i>S. artemidis</i>	3.18	1.03	0.33	14.97	0.65	0.16	0	8.32	0.001
<i>S. constellatus</i>	6.48	2.03	0.21	25.52	1.36	0.26	0	13.60	0.01
<i>S. gordonii</i>	6.54	2.31	0.10	36.15	1.19	0.22	0	8.98	0.01
<i>S. intermedius</i>	7.31	3.84	0	60.07	1.27	0.29	0	14.45	0.01
<i>S. mitis</i>	6.72	1.67	0.54	27.70	1.56	0.29	0	13.99	0.001
<i>S. noxia</i>	1.60	0.27	0.34	3.49	0.48	0.09	0	3.43	0.001
<i>S. oralis</i>	10.23	3.78	0	61.22	1.38	0.33	0	15.74	0.001
<i>S. sanguinis</i>	7.21	1.58	1.21	24.34	2.64	0.71	0	45.02	0.01
<i>T. denticola</i>	3.69	2.05	0	31.70	1.98	0.27	0	7.63	ns‡
<i>T. forsythia</i>	6.34	1.37	0.18	17.86	2.80	0.48	0	19.00	ns‡
<i>V. parvula</i>	14.54	5.70	0.74	89.45	4.24	0.74	0	28.27	ns‡

* Error estándar de la media. † Prueba U de Mann-Whitney. ‡ No significativo después de ajustar para comparaciones múltiples. Las especies bacterianas se encuentran en orden alfabético.

Tabla 4. Prevalencia (% sitios colonizados) de 40 especies bacterianas.

Especie	Huicholes (n=15)				Mestizos (n=71)				p<†
	Media	EEM*	Min	Max	Media	EEM*	Min	Max	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	54.75	6.55	23.08	100	19.31	2.30	0	85.71	0.001
<i>A. georgiae</i>	79.31	7.06	9.52	100	34.46	3.83	0	96.00	0.001
<i>A. israelii</i>	64.43	7.87	9.52	100	39.32	3.58	0	100	ns‡
<i>A. naeslundii</i> 1	81.34	6.49	19.05	100	54.44	3.93	0	100	ns‡
<i>A. odontolyticus</i>	76.81	7.40	9.52	100	32.87	3.88	0	100	0.01
<i>A. viscosus</i>	79.13	6.67	19.05	100	53.77	3.65	0	100	ns‡
<i>C. gingivalis</i>	58.86	10.21	0	100	31.52	3.39	0	96.00	ns‡
<i>C. gracilis</i>	58.48	7.47	0	100	12.31	1.87	0	75.00	0.001
<i>C. matruchotii</i>	81.32	5.83	14.29	100	58.99	3.93	0	100	ns‡
<i>C. ochracea</i>	74.66	8.94	0	100	21.40	2.48	0	92.00	0.001
<i>C. rectus</i>	59.47	8.00	14.81	100	25.57	3.08	0	95.65	0.01
<i>C. showae</i>	72.53	7.09	4.76	100	25.72	2.65	0	75.00	0.001
<i>C. sputigena</i>	57.46	11.34	3.70	100	26.52	3.01	0	100	ns‡
<i>E. corrodens</i>	78.67	8.19	4.17	100	32.54	3.52	0	100	0.001
<i>E. saburreum</i>	54.58	7.80	9.52	100	32.30	3.94	0	100	ns‡
<i>E. sulci</i>	67.32	9.33	9.52	100	32.60	3.67	0	100	0.05
<i>F. nucleatum</i>	63.69	7.27	19.05	100	32.45	3.61	0	100	0.05
<i>F. periodonticum</i>	70.77	7.57	16.67	100	31.62	3.62	0	100	0.01
<i>G. morbillorum</i>	67.96	8.07	0	100	23.36	2.85	0	95.45	0.001
<i>L. buccalis</i>	69.90	8.82	14.29	100	38.38	3.43	0	96.43	ns‡
<i>N. mucosa</i>	90.51	4.84	33.33	100	29.82	3.14	0	100	0.001
<i>P. acnes</i>	83.83	4.31	40.74	100	27.98	3.31	0	100	0.001
<i>P. endodontalis</i>	61.01	8.90	0	100	14.69	2.28	0	85.71	0.001
<i>P. gingivalis</i>	65.47	7.04	0	96.43	43.65	3.98	0	100	ns‡
<i>P. intermedia</i>	70.85	8.05	4.17	100	28.50	3.09	0	96.00	0.01
<i>P. melaninogenica</i>	70.82	8.45	4.17	100	31.27	3.62	0	100	0.01
<i>P. micros</i>	60.64	8.19	9.52	100	28.88	3.72	0	100	0.05
<i>P. nigrescens</i>	61.60	8.78	4.76	100	31.18	3.54	0	100	ns‡
<i>S. anginosus</i>	62.96	8.25	8.33	100	29.67	3.37	0	100	0.05
<i>S. artemidis</i>	69.60	7.86	9.52	100	19.84	2.73	0	100	0.001
<i>S. constellatus</i>	72.06	6.34	19.05	100	32.02	3.34	0	100	0.001
<i>S. gordonii</i>	73.17	6.52	16.67	100	24.66	2.91	0	100	0.001
<i>S. intermedius</i>	75.33	8.18	0	100	27.03	2.95	0	88.46	0.001
<i>S. mitis</i>	84.58	6.50	19.05	100	29.57	3.25	0	100	0.001
<i>S. noxia</i>	75.52	6.83	14.29	100	22.83	2.60	0	100	0.001
<i>S. oralis</i>	78.43	8.05	0	100	27.04	3.18	0	100	0.001
<i>S. sanguinis</i>	77.48	6.25	28.57	100	31.91	3.63	0	100	0.001
<i>T. denticola</i>	72.06	8.29	0	100	30.95	3.34	0	96.00	0.01
<i>T. forsythia</i>	84.89	6.18	23.81	100	34.82	3.20	0	100	0.001
<i>V. parvula</i>	66.94	6.57	19.05	100	36.78	3.82	0	100	ns‡

* Error estándar de la media. † Prueba U de Mann-Whitney. ‡ No significativo después de ajustar para comparaciones múltiples. Las especies bacterianas se encuentran en orden alfabético.

Tabla 5. Proporción (% cuentas totales) de 40 especies bacterianas.

Especie	Huicholes (n=15)				Mestizos (n=71)				p<†
	Media	EEM*	Min	Max	Media	EEM*	Min	Max	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0.46	0.07	0.15	1.01	0.67	0.16	0	7.73	ns‡
<i>A. georgiae</i>	1.13	0.11	0.35	1.73	1.86	0.43	0	20.93	ns‡
<i>A. israelii</i>	2.66	0.74	0.48	12.50	3.63	0.69	0	33.67	ns‡
<i>A. naeslundii</i> 1	13.87	3.15	0.98	46.55	12.41	1.64	0	66.21	ns‡
<i>A. odontolyticus</i>	1.48	0.31	0.33	5.32	1.13	0.23	0	11.24	ns‡
<i>A. viscosus</i>	6.88	0.76	1.23	10.67	9.38	1.27	0	41.64	ns‡
<i>C. gingivalis</i>	1.18	0.28	0	3.85	1.77	0.33	0	16.43	ns‡
<i>C. gracilis</i>	0.85	0.33	0	4.81	0.29	0.06	0	2.22	ns‡
<i>C. matruchotii</i>	10.58	1.99	0.99	27.33	9.07	1.12	0	39.65	ns‡
<i>C. ochracea</i>	1.11	0.29	0	4.68	0.38	0.06	0	2.56	0.05
<i>C. rectus</i>	1.30	0.34	0.12	4.73	0.73	0.15	0	6.27	ns‡
<i>C. showae</i>	1.61	0.46	0.06	6.69	0.81	0.22	0	13.08	ns‡
<i>C. sputigena</i>	0.83	0.20	0	2.77	1.16	0.20	0	10.74	ns‡
<i>E. corrodens</i>	2.57	0.69	0.10	10.10	2.42	0.62	0	38.76	ns‡
<i>E. saburreum</i>	1.21	0.30	0.19	4.38	3.35	0.73	0	35.52	ns‡
<i>E. sulci</i>	1.29	0.34	0.11	5.54	1.48	0.26	0	11.86	ns‡
<i>F. nucleatum</i>	1.02	0.19	0.08	2.40	3.10	0.77	0	43.62	ns‡
<i>F. periodonticum</i>	1.88	0.40	0.14	6.14	1.63	0.26	0	10.20	ns‡
<i>G. morbillorum</i>	1.72	0.26	0	3.84	2.58	0.75	0	46.56	ns‡
<i>L. buccalis</i>	1.24	0.27	0.16	4.12	7.14	1.40	0	62.22	ns‡
<i>N. mucosa</i>	6.20	1.21	0.85	13.98	1.56	0.33	0	14.60	0.001
<i>P. acnes</i>	2.31	0.80	0.24	12.93	1.06	0.26	0	12.93	0.001
<i>P. endodontalis</i>	0.93	0.27	0	3.78	0.27	0.06	0	2.36	ns‡
<i>P. gingivalis</i>	1.08	0.20	0	3.14	6.23	1.03	0	41.49	ns‡
<i>P. intermedia</i>	5.26	2.46	0.02	38.52	3.03	0.45	0	14.91	ns‡
<i>P. melaninogenica</i>	1.32	0.23	0	3.76	1.87	0.38	0	19.98	ns‡
<i>P. micros</i>	0.89	0.20	0.06	2.80	2.70	0.79	0	45.05	ns‡
<i>P. nigrescens</i>	1.07	0.18	0.26	2.72	1.86	0.32	0	15.18	ns‡
<i>S. anginosus</i>	1.89	0.39	0.07	5.66	1.02	0.16	0	7.22	ns‡
<i>S. artemidis</i>	0.93	0.20	0.13	3.09	1.23	0.49	0	25.06	0.05
<i>S. constellatus</i>	1.58	0.28	0.15	4.37	1.77	0.39	0	17.04	ns‡
<i>S. gordonii</i>	2.04	0.36	0.08	5.25	1.12	0.34	0	22.65	ns‡
<i>S. intermedius</i>	1.76	0.34	0	4.62	1.05	0.23	0	9.15	ns‡
<i>S. mitis</i>	3.16	0.56	0.29	7.69	2.67	0.74	0	37.84	ns‡
<i>S. noxia</i>	0.61	0.07	0.23	1.10	0.50	0.10	0	4.97	ns‡
<i>S. oralis</i>	3.53	0.68	0	8.67	0.88	0.16	0	5.35	0.01
<i>S. sanguinis</i>	2.64	0.41	0.39	6.15	1.74	0.32	0	12.41	ns‡
<i>T. denticola</i>	0.92	0.16	0	1.94	1.86	0.28	0	12.64	ns‡
<i>T. forsythia</i>	4.27	1.06	0.37	13.26	3.01	0.47	0	17.42	ns‡
<i>V. parvula</i>	2.83	0.61	0.25	9.11	4.03	0.71	0	33.20	ns‡

* Error estándar de la media. † Prueba U de Mann-Whitney. ‡ No significativo después de ajustar para comparaciones múltiples. Las especies bacterianas se encuentran en orden alfabético.

1. FIGURAS

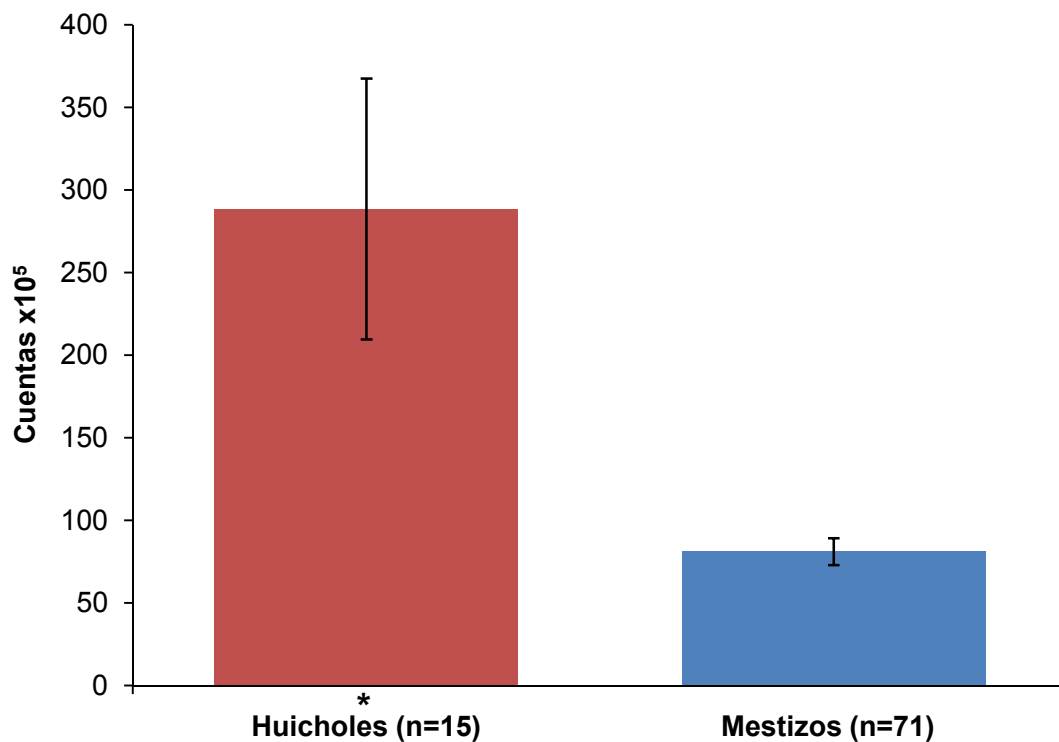


Figura 1. Niveles totales promedio (cuentas bacterianas totales $\times 10^5 \pm$ EEM) de las 40 especies bacterianas evaluadas en muestras de placa dentobacteriana subgingival de 86 sujetos Huicholes y mestizos mexicanos. Los niveles totales fueron calculados determinando los niveles para cada especie en cada muestra de placa, los cuales fueron promediados entre las 28 muestras de cada sujeto de estudio, obteniendo posteriormente la sumatoria del promedio de cuentas de todas las especies evaluadas y finalmente el promedio de las sumatorias entre los sujetos de cada grupo de estudio. * $p < 0.05$ prueba U de Mann-Whitney después de ajustar para comparaciones múltiples.

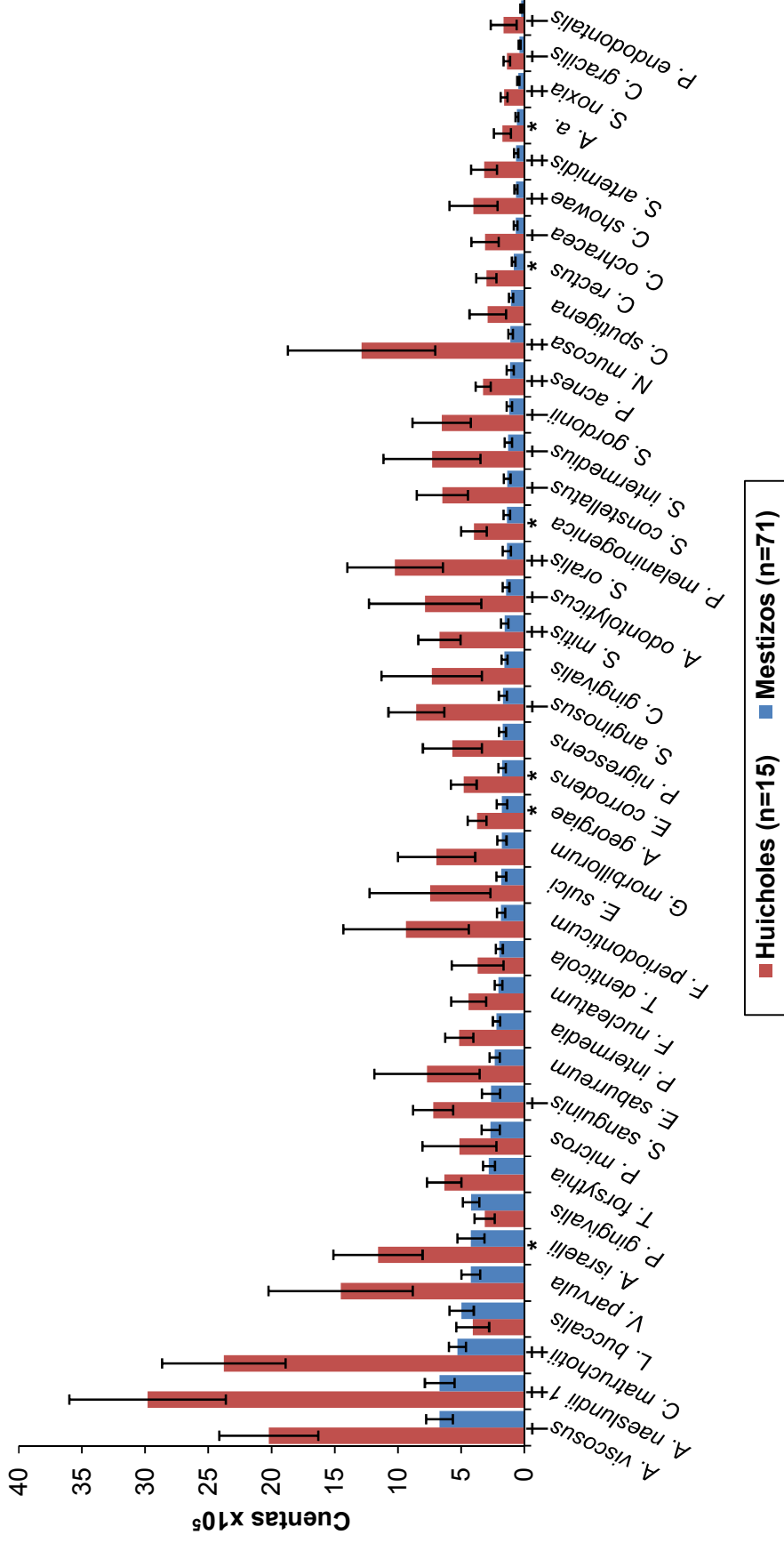


Figura 2. Niveles promedio (cuentas bacterianas $\times 10^5 \pm$ EEM) de especies individuales en muestras de placa dentobacteriana subgingival de 86 sujetos Huicholes y mestizos mexicanos. Los niveles fueron calculados para cada especie en cada muestra de placa, promediados entre las 28 muestras de cada sujeto de estudio y posteriormente entre los sujetos de cada grupo. * $p < 0.05$, † $p < 0.01$ y ‡ $p < 0.001$ prueba U de Mann-Whitney después de ajustar para comparaciones múltiples. Las especies bacterianas se encuentran ordenadas de manera decreciente en relación al grupo de sujetos mestizos.

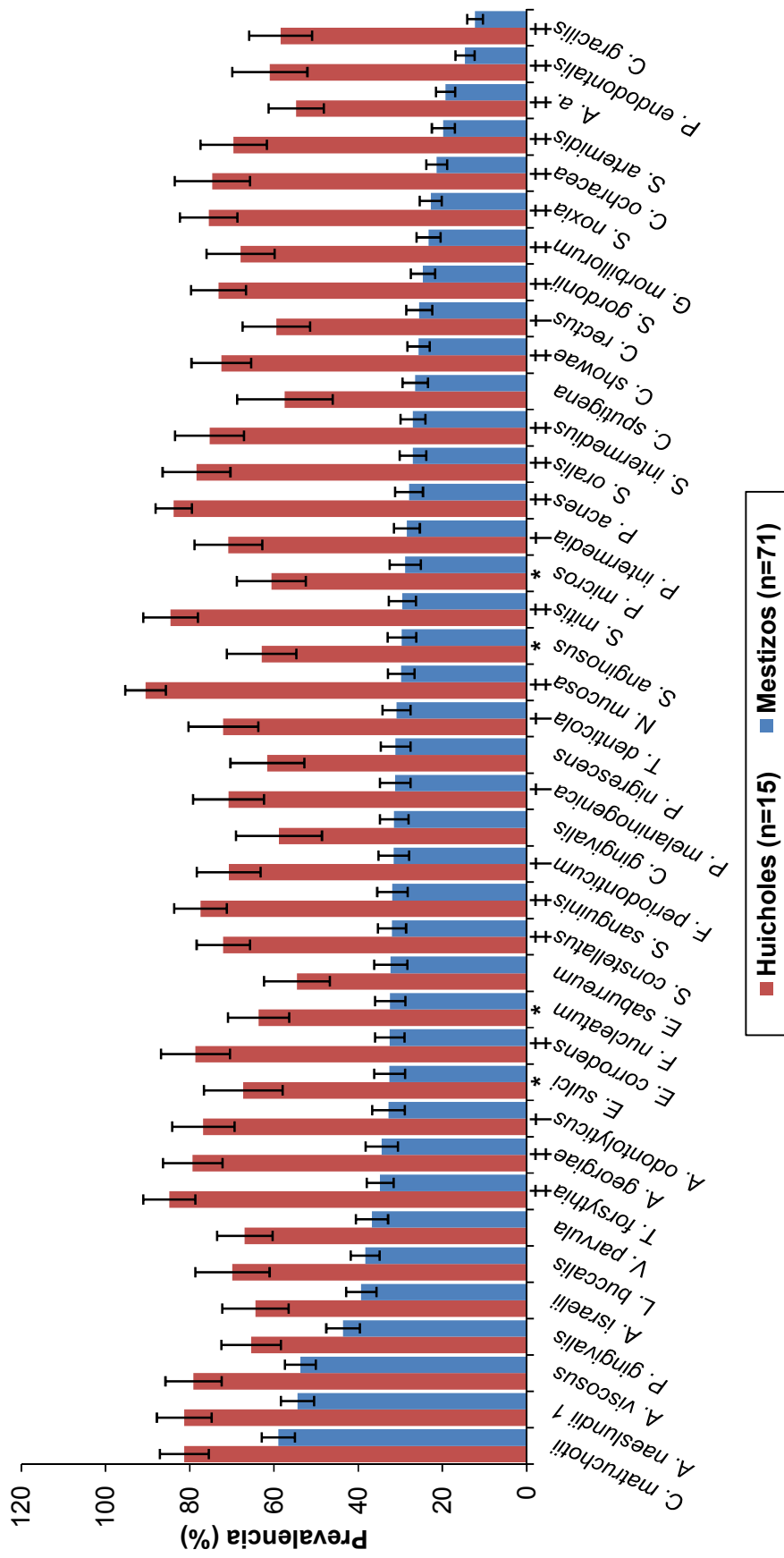


Figura 3. Prevalencia promedio (% sitios colonizados \pm EEM) de especies individuales en muestras de placa dentobacteriana subgingival de 86 sujetos Huicholes y mestizos mexicanos. La prevalencia fue calculada para cada especie en cada muestra de placa, promediada entre las 28 muestras de cada sujeto de estudio y posteriormente entre los sujetos de cada grupo. * $p < 0.05$, † $p < 0.01$ y ‡ $p < 0.001$ prueba U de Mann-Whitney después de ajustar para comparaciones múltiples. Las especies bacterianas se encuentran ordenadas de manera decreciente en relación al grupo de sujetos mestizos.

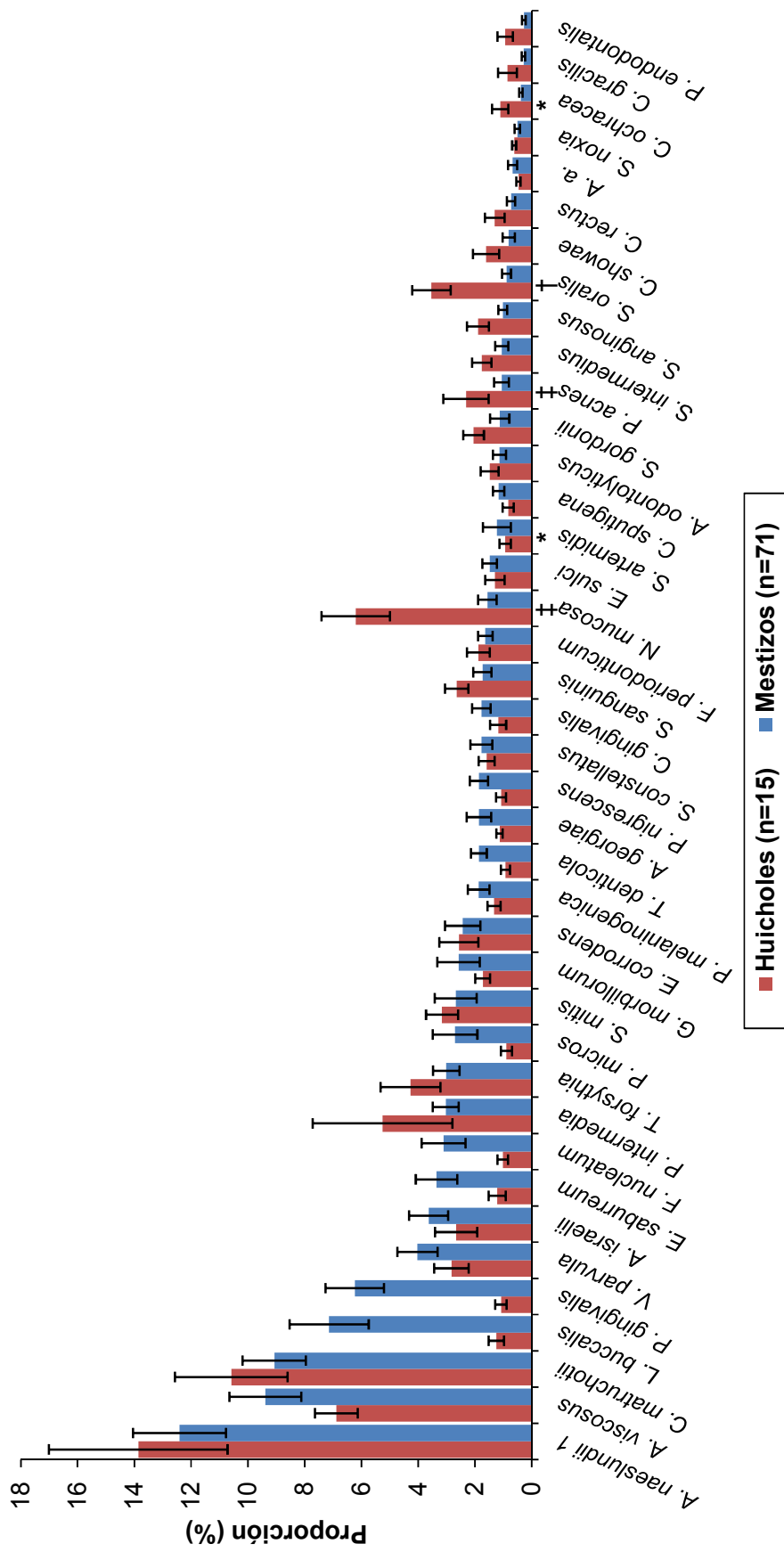


Figura 4. Proporción promedio (% cuentas totales de sondas de ADN ± EEM) de especies individuales en muestras de placa dentobacteriana subgingival de 86 sujetos Huicholes y mestizos mexicanos. La proporción fue calculada para cada especie en cada muestra de placa, promediada entre las 28 muestras de cada sujeto de estudio y posteriormente entre los sujetos de cada grupo. * p<0.05, † p<0.01 y ‡ p<0.001 prueba U de Mann-Whitney después de ajustar para comparaciones múltiples. Las especies bacterianas se encuentran ordenadas de manera decreciente en relación al grupo de sujetos mestizos.

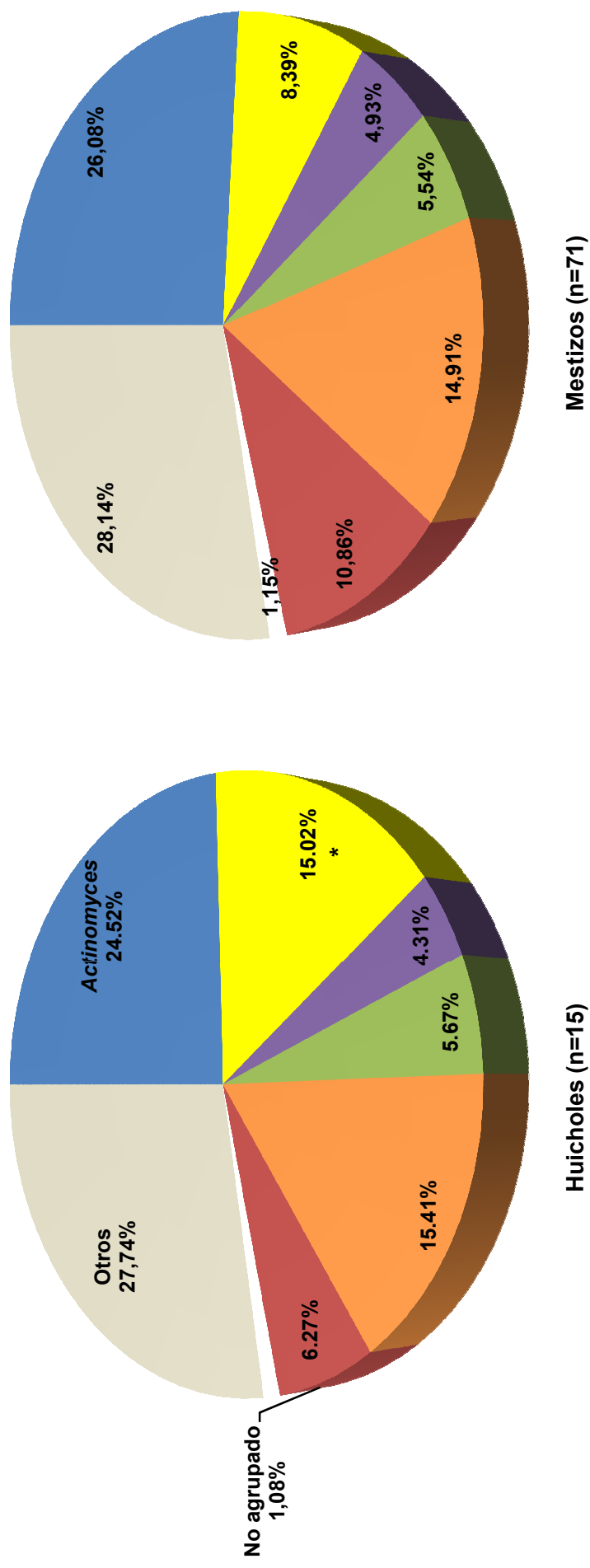


Figura 5. Proporción promedio (% cuentas totales de sondas de ADN) de grupos bacterianos en muestras de placa dentobacteriana subgingival de 86 sujetos Huicholes y mestizos mexicanos. Las 40 especies evaluadas fueron agrupadas en 8 grupos de acuerdo con la descripción de complejos bacterianos en la placa subgingival (Socransky *et al.*, 1998; Socransky & Haffajee, 2005) (las excepciones se describen en la tabla 2). Las proporciones fueron calculadas para cada grupo bacteriano en cada muestra de placa, promediadas entre las 28 muestras de cada sujeto de estudio y posteriormente entre los sujetos de cada grupo. * $p < 0.05$ prueba U de Mann-Whitney después de ajustar para comparaciones múltiples.

1. ANEXOS

Anexo 1. Forma de consentimiento informado.

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Dra. Laurie Ann Ximénez-Fyvie.

CLÍNICOS RESPONSABLES: Dra. Velia Jacobo-Soto.

Dra. Argelia Almaguer-Flores.

Dra. Ma. de Lourdes Márquez C.

Dra. Jazmín Yunuen Moreno Borjas.

Dra. Dolores Carrasco Ortiz.

INSTITUCIÓN: Laboratorio de Genética Molecular

Div. de Estudios de Posgrado e Investigación

Facultad de Odontología, UNAM

TELÉFONO: 5622-5565 (horas y días hábiles)

TÍTULO DEL PROYECTO: Efectos inmunológicos y clínicos de polimorfismos genéticos relacionados con las enfermedades periodontales en México. (DGAPA # IN213006-3)

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

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

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

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

- **La realización de una evaluación periodontal completa**, la cual consistirá en medir la profundidad de las pequeñas “bolsas” que se encuentran entre sus dientes y sus encías. Estas medidas serán tomadas con un instrumento especial llamado sonda que será introducido en dichas “bolsas” en 6 lugares diferentes alrededor de cada diente de su boca. Este es un procedimiento de rutina ampliamente utilizado en la práctica dental. Además de lo anterior, se le realizará una evaluación general de la salud de sus encías para saber si sangran, si están inflamadas, si están enrojecidas, etc.
- **La obtención de algunos de sus datos generales y médicos**, lo cual consistirá en el llenado de una historia clínica con preguntas que le serán leídas por el clínico que lo atienda y la medición de su peso, estatura, presión sanguínea, pulso y porcentaje de grasa corporal.
- **La toma de un máximo de 28 muestras de placa dentobacteriana**, lo cual se realizará tomando con un instrumento dental, una muestra de la película blanquecina

que se forma naturalmente sobre la superficie de sus dientes (placa dentobacteriana) de todos los dientes de su boca. Este procedimiento no es doloroso aunque en algunas ocasiones puede ser un poco molesto. Cada muestra de placa dentobacteriana será colocada dentro de un tubo.

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

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

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

RIESGOS: Usted debe entender que los riesgos que usted corre con su participación en este estudio son mínimos. La evaluación periodontal que se le realizará es la misma que realiza cualquier dentista para determinar la salud de sus encías. Las muestras de placa se tomarán siguiendo procedimientos similares a los que se realizan durante una limpieza dental. La muestra de células epiteliales de la mucosa bucal no 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 encías en la población de México, lo cual podría ayudar en un futuro no sólo al mejor entendimiento de dichas enfermedades, sino también a la búsqueda y empleo de nuevos tratamientos para nuestra población.

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

CONFIDENCIALIDAD: Usted debe entender que toda la información que sea obtenida tanto en sus historiales clínicos como en el análisis de sus muestras será mantenida en estricta

confidencialidad. Así mismo, si cualquier publicación resultara de esta investigación, no se le identificará jamás por nombre.

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

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

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

Nombre del Paciente

Firma del Paciente

Fecha
(Dia/mes/año)

Nombre del Clínico Responsable

Firma del Clínico Responsable

Fecha
(Dia/mes/año)