



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Odontología
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Laboratorio de Genética Molecular

**Descripción de la Composición Microbiológica
de Lesiones Periapicales**

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Odontológicas

PRESENTA

CD. Ricardo González-Plata Rivera

TUTORA

Dra. Laurie Ann Ximénez Fyvie



México D.F.

2009



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

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Antecedentes.....	2
Patogenia de las lesiones periapicales.....	4
Metas de la terapia endodóntica.....	11
Factores microbiológicos asociados con padecimientos endodónticos.....	14
Planteamiento del problema y justificación.....	20
Objetivo general.....	21
Objetivos específicos.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
DISEÑO EXPERIMENTAL	22
Captura de sujetos de estudio.....	22
Criterios de selección	23
Población y muestras de estudio	23
Recolección y procesamiento de muestras	24
Evaluación microbiológica.....	25
Especies bacterianas y condiciones de cultivo	25
Purificación de DNA y preparación de sondas	26
Hibridaciones DNA-DNA	27
Detección y cuantificación de microorganismos	28
Análisis estadístico de datos	29
RESULTADOS	30
Estadísticas descriptivas	30
Cuentas bacterianas	30
Prevalencia	30
Proporción	31
Estadísticas comparativas	32
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
TABLAS	68
FIGURAS	92
ANEXOS	102
Anexo 1. Formato de consentimiento informado.....	102
Anexo 2. Índice de tablas y figuras.....	107

RESUMEN

Durante algunos años, diversos estudios han tratado de describir la composición microbiológica de conductos radiculares infectados. Sin embargo, diferentes problemas técnicos como la obtención de muestras contaminadas, la inaccesibilidad de las áreas de muestreo y la dificultad para recuperar en cultivo una muestra representativa dada la alta proporción de especies anaerobias estrictas y fastidiosas, han imposibilitado derivar resultados contundentes. **Objetivos:** el propósito de este estudio fue determinar y describir la composición microbiológica de lesiones periapicales utilizando la técnica de “checkerboard” (tablero de ajedrez) para hibridaciones DNA-DNA. Esta técnica molecular permite la identificación simultánea de una multitud de especies microbianas en un gran número de muestras clínicas, además de su cuantificación. **Materiales y métodos:** un total de 54 muestras de lesiones periapicales provenientes de 27 sujetos de estudio fueron evaluadas microbiológicamente para determinar los niveles, prevalencia y proporción de 38 especies bacterianas. **Resultados:** 37 de las 38 especies evaluadas fueron detectadas. El 50% de las especies evaluadas (19 de 38) fueron detectadas en más del 50% de los sujetos. *Actinomyces naeslundii* sp. 1, *Streptococcus intermedius*, *Eubacterium sulci*, *Corynebacterium matruchotii*, *Leptotrichia buccalis*, *Streptococcus sanguinis*, *Parvimonas micra* y *Eubacterium saburreum* juntos comprendieron el 73.6% del total de MO detectados. Las 3 especies del complejo rojo (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*), consideradas como patógenos, representaron menos del 1% de la microbiota total. **Conclusiones:** Los resultados del estudio sugieren una complejidad microbiológica significativamente superior a la previamente descrita por estudios tradicionales de cultivo y un posible rol en la patogenia de las lesiones periapicales por un grupo dominado principalmente por especies Gram positivas.




INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

Desde 1894, cuando W. D. Miller reportó en sus observaciones que algunas bacterias podían ser recuperadas de pulpas necróticas, los microorganismos (MO) han sido considerados sumamente importantes para el desarrollo de inflamación en los tejidos pulpares y periapicales (**Miller 1894**). Hace más de 40 años, se demostró evidentemente el papel esencial de las bacterias en la periodontitis apical. En un simple estudio, dejando expuestos tejidos pulpares de ratas libres de bacterias y ratas con una microflora oral normal, se demostró que se desarrollaba una necrosis pulpar y una destrucción ósea únicamente en los animales con microflora oral (**Takehashi et al. 1965**).


Diversos estudios han descrito la composición microbiológica de conductos radiculares infectados. Sin embargo, diferentes problemas técnicos como la obtención de muestras contaminadas, la inaccesibilidad de las áreas de muestreo y la dificultad para recuperar en cultivo una muestra representativa dada la alta proporción de especies anaerobias estrictas y fastidiosas, han imposibilitado derivar resultados contundentes (**Leavitt et al. 1958, Shovelton & Sidaway 1960, Winkler & van Amerongen 1959**). En 1966 se propusieron avances significativos en el desarrollo de procedimientos para la recolección de muestras y el cultivo de MO fastidiosos (**Möller 1966**). Esto condujo a la identificación de nuevas especies bacterianas que no habían sido previamente detectadas debido a las limitaciones en las metodologías previas. Estudios subsecuentes demostraron un número elevado de especies bacterianas y una alta proporción de bacterias anaerobias



obligadas en conductos radiculares infectados en humanos y en animales de experimentación (**Fabricius et al. 1982, Kantz & Henry 1974, Wittgow & Sabiston 1975**).

Existen pocos estudios bacteriológicos de especímenes obtenidos de dientes con lesiones periapicales (**Nair et al. 1990**). En la mayoría de dichos estudios, se utilizaron únicamente técnicas histológicas y en muy pocos casos fueron identificadas las bacterias intrarradiculares. Cuando la técnica histopatológica fue combinada con métodos bacteriológicos e inmunológicos, se demostró que algunas especies bacterianas pertenecientes al género *Actinomyces* y *Arachnia* podían permanecer en los tejidos periapicales por largos periodos de tiempo y este hallazgo fue asociado con la mala cicatrización periapical en dientes obturados endodónticamente (**Figdor et al. 1992**).

Sin embargo, los reportes sobre la microbiología de lesiones periapicales son aún contradictorios. Esto puede ser debido a la imposibilidad de definir clínicamente los diferentes tipos de lesiones periapicales, a la utilización de técnicas microbiológicas inadecuadas para el cultivo e identificación de especies anaeróbicas y al manejo inapropiado de muestras de estudio. Algunas de las técnicas para la recolección de muestras periapicales resultan en la contaminación ya sea a través del conducto radicular o debido a manipulaciones óseas antes de la toma de muestras (**Vigil et al. 1997**). Por lo tanto, a pesar de que se ha aceptado por largo tiempo que las bacterias, juegan un papel importante en el desarrollo y persistencia de lesiones periapicales, no existen actualmente patógenos consenso asociados con este tipo de lesiones ni existen reportes extensos que




describan la microbiota asociada con dichas lesiones (**Block et al. 1976, Grossman 1959, Langeland et al. 1977, Shindell 1961**).

Patogenia de las lesiones periapicales

El establecimiento de bacterias u otros MO en un hospedero toma lugar a través de un fenómeno llamado *colonización*. La colonización ocurre si las condiciones bioquímicas y físicas en el huésped son favorables para el crecimiento y desarrollo de dichos MO. La colonización permanente en una relación simbiótica con el huésped que resulta del establecimiento de una flora bacteriana en una superficie. Estos MO pueden participar en muchas relaciones benéficas para el huésped pero pueden también actuar como patógenos oportunistas provocando enfermedades. La enfermedad infecciosa se establece si dichos MO provocan un daño al hospedero produciendo determinados signos y síntomas. Las enfermedades pulpar y periapical son el resultado de la colonización de patógenos oportunistas en la cavidad pulpar y los tejidos periapicales.

Los MO tienen varias vías de entrada hacia la pulpa dental. Si el esmalte o el cemento se ha perdido por caries, trauma, etc., los MO pueden invadir la pulpa a través de los túbulos dentinarios expuestos, multiplicándose dentro de los túbulos permeables (**Hoshino 1992**). Los túbulos dentinarios se extienden desde la pulpa hasta las uniones esmalte-dentina y cemento-dentina. Los diámetros aproximados de estos túbulos son de 2.5 μm cerca de la pulpa y de 1 μm en las uniones dentina-esmalte. También se ha visto que existen alrededor de 15,000 túbulos por mm^2 en la dentina que se ubica cerca de la unión cemento-dentinal. La permeabilidad de estos túbulos se reduce por medio de la



formación de dentina peritubular y de la dentina secundaria o reparativa (**Weber 1974**). En muchas ocasiones las bacterias son precedidas en los túbulos por sus subproductos y los productos de desecho que actúan como irritantes a la pulpa dental (**Bergenholtz 1982, Mejare et al. 1987**).


Las bacterias y sus subproductos pueden acceder a la región periapical a través de infecciones primarias o secundarias. Las infecciones primarias son causadas por caries, fracturas dentales, enfermedad periodontal o microfiltración a través de restauraciones coronales. Las infecciones secundarias son generalmente consideradas como fracasos endodónticos. Estas infecciones son asociadas a la persistencia de MO viables dentro del sistema de conductos y/o en la región periapical, y son principalmente originadas por la remoción incompleta del tejido pulpar o microfiltración de los materiales de obturación endodónticos (**Siqueira Junior 2001**).

Es necesario mencionar que el estado pulpar es un factor importante en cuanto a la susceptibilidad de una invasión microbiana. Por ejemplo, una pulpa vital es muy resistente a la invasión microbiana; es decir, la penetración pulpar de la flora oral en una pulpa sana, es relativamente lenta o puede ser bloqueada por completo. En ocasiones, una exposición pulpar es seguida de inflamación local, necrosis y penetración bacteriana de hasta 2 mm después de 2 semanas de la comunicación. En contraste con lo anterior, una pulpa necrótica es rápidamente invadida y colonizada por bacterias (**Cvek 1978**).

Por otra parte, debido a la estrecha relación entre la pulpa y el periodonto (debida a la presencia de túbulos dentinarios, conductos laterales o accesorios, conductos


cavorradiculares, etc.), la enfermedad pulpar y sus irritantes pueden afectar al ligamento periodontal y a los tejidos circundantes. De manera inversa, la remoción del cemento radicular durante la terapia periodontal puede exponer los túbulos dentinarios a la flora bucal, lo que en ocasiones permite que los MO penetren en el tejido pulpar **(Bergenholtz & Lindhe 1978)**. La producción del barro dentinario durante la manipulación de la raíz, así como los iones de calcio y fósforo de la saliva, pueden retardar la invasión de los MO bucales a través de los túbulos dentinales. Un estudio reciente demostró el desarrollo de pulpitis irreversible, penetración bacteriana hacia los túbulos dentinarios y la aparición de sensibilidad térmica a causa del raspado y alisado radicular en la terapia periodontal **(Wong et al. 1989)**.

Por lo general, se cree que la infección a través de los túbulos dentinarios se produce como consecuencia de un frente bacteriano que avanza lentamente. La mayoría de los autores han opinado que las bacterias productoras de ácido (generalmente Gram positivas), invaden los túbulos y desmineralizan las paredes. Las especies proteolíticas siguen a las anteriores y actúan sobre la matriz orgánica del diente, la cual es degradada en los túbulos dentinales agrandados. Los ácidos y otros metabolitos, así como los productos tóxicos se difunden con mayor rapidez que las bacterias, con lo cual los odontoblastos resultan afectados. Existen reportes en donde se evaluó la capacidad de las bacterias anaeróbicas que suelen aislarse en las infecciones endodónticas, para penetrar en los túbulos dentinales, determinando que todas las especies de bacterias comprobadas eran capaces de hacerlo a menor o mayor grado **(Siqueira et al. 1996)**.



La vía de entrada más común de bacterias hacia la pulpa es a través de lesiones cariosas. Las bacterias asociadas a la caries, no tienen motilidad pero avanzan a través de los túbulos por medio de división celular (fisión binaria) auxiliadas por el movimiento del fluido tubular. Se ha visto que en las capas profundas de la caries, estas bacterias son predominantemente anaeróbicas estrictas **(Ando & Hoshino 1990)**. En una exposición pulpar por caries, numerosas especies de MO oportunistas pueden invadir el tejido pulpar dañado y colonizar las zonas de necrosis. Esto permite una selección de MO por el ecosistema asociado con las infecciones de origen endodóntico **(Sundqvist 1992a, Sundqvist 1992b)**.


Al igual que otros tejidos conjuntivos, la pulpa reacciona a las agresiones con respuestas inflamatorias inespecíficas que inician con una respuesta celular innata caracterizada por la presencia de neutrófilos y monocitos. Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) característicos de una inflamación aguda son quimiotácticamente atraídos al área. La acumulación de PMN provoca la formación de abscesos locales, por lo que la pulpa puede mantenerse inflamada por un largo tiempo o sufrir una necrosis súbita. Se sabe que la respuesta pulpar está relacionada directamente a la virulencia de las bacterias, la respuesta del huésped, la circulación local y la capacidad para eliminar toxinas **(Van Hassel 1971)**. Debido a que la pulpa se encuentra rodeada de tejido duro, esta sufre normalmente de aumento en la presión cuando las células inflamatorias extravasadas y los fluidos se acumulan, provocando una estasis vascular y una necrosis por hipoxia. El aumento de presión, interfiere con las funciones normales de



las células, haciendo que estas sean más susceptibles al daño o a la muerte (**Van Hassel 1971**).

La inflamación periapical puede presentarse antes de que la pulpa esté totalmente necrótica. Los productos bacterianos, los mediadores de la inflamación y el deterioro del tejido pulpar pasan el foramen apical y provocan una respuesta inflamatoria crónica desde los vasos en el ligamento periodontal. Ello explica la posible presencia de radiolucencia periapical, existiendo todavía algún tejido vital remanente en el conducto radicular. La respuesta inflamatoria periapical es una extensión de la inflamación pulpar y de la necrosis (**Moller et al. 1981**). La inflamación apical crónica es una respuesta inmunológica persistente de baja intensidad debida a las bacterias y sus productos, que se encuentran en el conducto radicular. Esta lesión suele ser asintomática pero puede ser observada radiográficamente como una radiolucidez apical. Histológicamente, la lesión se caracteriza por el predominio de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, rodeados por una cápsula fibrosa compuesta por colágena, fibroblastos y terminaciones capilares. Pueden estar presentes también cuerdas o hebras de epitelio proliferante. Esta lesión no suele ser puramente crónica en su naturaleza, ya que pueden observarse también PMN dispersos a lo largo de la lesión (**Moller et al. 1981**).


Debido a la falta de circulación en una pulpa necrótica, los mecanismos naturales de defensa se encuentran ausentes o comprometidos. El sistema de conductos radiculares se convierte en un ambiente donde en un grupo restringido de bacterias se encuentran presentes. El fluido tisular y las células degradadas provenientes del tejido necrótico



forman un substrato de nutrientes (polipéptidos y aminoácidos) esenciales para los MO. Estos nutrientes, así como la baja tensión de O₂ y las interacciones bacterianas son la clave ecológica para determinar las bacterias que predominarán.

Las condiciones ambientales favorecen el crecimiento de anaerobios capaces de metabolizar péptidos y aminoácidos en lugar de carbohidratos. El crecimiento de una especie bacteriana puede depender de que otra especie comensal aporte un nutriente esencial como subproducto metabólico. Así mismo, relaciones antagonistas ocurren entre géneros bacterianos. Algunos subproductos como el amonio pueden funcionar como nutriente o como toxina dependiendo de la especie bacteriana que lo produce y de su concentración en el ecosistema. Las bacteriocinas también se encuentran presentes, estas son proteínas semejantes a los antibióticos que las bacterias producen y que actúan inhibiendo el crecimiento de otras especies (**Sundqvist 1992b**). Se ha demostrado que la hemina y la vitamina K (elementos esenciales para el crecimiento de ciertas especies de *Prevotella* y *Porphyromonas*), podrían ser suministradas por las bacterias Gram positivas en las infecciones mixtas (**Socransky & Gibbons 1965**).

Las bacterias producen enzimas que funcionan como proteasas, así como factores de diseminación que neutralizan inmunoglobulinas y moléculas del complemento (**Sundqvist et al. 1985, Sundqvist et al. 1984**). Las bacterias Gram negativas producen vesículas extracelulares que son llamadas endotoxinas libres o fragmentos externos de la membrana. Estas contienen enzimas que afectan a las células del hospedero y están involucradas en procesos de hemaglutinación, hemólisis, adhesión bacteriana y



actividades proteolíticas. Tienen también determinantes antigénicos en su superficie similares a las bacterias de donde provienen y pueden protegerlas neutralizando a los anticuerpos específicos contra estas **(Kinder & Holt 1989)**. Las bacterias anaeróbicas pueden producir ácidos grasos de cadenas cortas tales como ácido propiónico, butírico e isobutírico. Estos pueden afectar la quimiotaxis de neutrófilos, degranulación, quimioluminiscencia, fagocitosis y otros procesos intracelulares **(Eftimiadi et al. 1991)**.

Algunos factores de virulencia asociados con bacterias incluyen estructuras tales como fimbrios (pilis), cápsulas, vesículas extracelulares, lipopolisacáridos (LPS), enzimas, ácidos grasos de cadenas cortas y productos de bajo peso molecular como amonio y sulfato de hidrógeno. Los fimbrios o pilis pueden producir relaciones sinérgicas con otras bacterias, así como adherirse a superficies específicas y coagregarse con otras bacterias. Los LPS se encuentran en la superficie de la membrana externa de la pared celular de bacterias Gram negativas y se mantienen como antígenos no-específicos que en ocasiones no pueden ser neutralizados por los anticuerpos. Cuando estas sustancias son liberadas, actúan como endotoxinas. En lo que se refiere a las lesiones periapicales, existe una relación entre la presencia de endotoxinas y el tamaño de la lesión. Así mismo, la concentración de endotoxinas en dientes sintomáticos con lesiones periapicales y exudado, es mayor que en dientes asintomáticos **(Dwyer & Torabinejad 1980, Horiba et al. 1991)**.

El desarrollo de lesiones periapicales crea una barrera natural dentro del cuerpo y previenen la invasión de los MO. El tejido óseo es reabsorbido y sustituido por un tejido



granulomatoso constituido por elementos de defensa tanto celulares (fagocitos) como moleculares (anticuerpos y moléculas del complemento) **(Siqueira Junior & de Uzeda 1997)**. Se ha reportado que en el foramen apical existe una densa pared compuesta por PMN o en ocasiones, un tejido epitelial que impide la propagación de MO hacia los tejidos periapicales **(Ramachandran Nair 1987)**. Muy pocos MO patógenos pueden traspasar dichas barreras. De cualquier manera, los subproductos bacterianos pueden ser difundidos a través de estas barreras de defensa y pueden tener la capacidad de inducir o perpetuar las lesiones periapicales.

Recientemente, se ha generado gran interés, en el estudio del papel que desempeñan los MO persistentes en el tejido periapical en los casos de fracasos endodónticos. Diversos estudios han reportado la presencia de dichos MO, tanto en dientes tratados como no-tratados endodónticamente **(Tronstad et al. 1990a, Tronstad et al. 1987)**. Debido a que los MO establecidos en los tejidos periapicales son inaccesibles al tratamiento de conductos convencional (no-quirúrgico), la infección extrarradicular puede ser un factor potencial en el fracaso de la terapia endodóntica.

Metas de la terapia endodóntica

Se ha establecido que la filtración coronal es una de las causas principales de fracaso endodóntico **(Saunders & Saunders 1994)**. Existen algunas situaciones en donde los conductos obturados pueden ser contaminados desde la cavidad oral. Entre estas figuran la microfiltración a través de restauraciones temporales o permanentes, la fractura o pérdida de las restauraciones, la fractura de la estructura dentaria, la caries recurrente



comunicada con el material de obturación y la demora en la colocación de la restauración permanente **(Siqueira et al. 1999)**. En dichas circunstancias, si la obturación no impide la filtración de la saliva, los MO invaden y recolonizan el sistema de conductos. Por lo que si las bacterias y sus productos alcanzan los tejidos periapicales, estos pueden inducir y/o perpetuar la enfermedad periapical.


La recontaminación del conducto por filtración coronal ocurre a través de la disolución del sellador a causa de la saliva, o bien debida a la percolación salival en la interface entre el sellador y las paredes del conducto (particularmente si el barro dentinario se encuentra presente) y/o entre el sellador y la gutapercha **(Siqueira et al. 1999)**. Adicionalmente, los espacios y otros defectos de la obturación que normalmente no son detectados radiográficamente, pueden ser responsables de la rápida recontaminación del sistema de conductos.

Algunos estudios han revelado que sin importar la técnica de obturación o el material empleado, una total recontaminación del sistema de conductos puede ocurrir después de un corto período **(Siqueira et al. 1999)**. Una vez que el sellado coronal se pierde, los MO y sus productos pueden alcanzar los tejidos periapicales a través de los conductos laterales o deltas apicales, poniendo en peligro el resultado del tratamiento.

Clínicamente es imposible determinar si el sistema de conductos se encuentra contaminado. Por lo tanto, desde el punto de vista clínico, la exposición coronal de la obturación endodóntica a la saliva por un período relativamente corto de tiempo (30 días o más) debe ser considerada como una indicación para efectuar un retratamiento. Cuando

la obturación endodóntica está terminada, una restauración temporal se coloca hasta que se decide realizar la restauración final. Los cementos temporales son hidrosolubles y tienen baja resistencia a la compresión por lo que estos deben ser reemplazados lo más pronto posible con la restauración definitiva.

El principal objetivo del tratamiento endodóntico es la eliminación de MO del conducto radicular y la prevención de la reinfección. Sin embargo, los tratamientos endodónticos pueden fracasar y las causas de estos fracasos en algunas ocasiones son especulativas. Se ha sugerido que diversos factores locales y sistémicos contribuyen a dichos fracasos. Los factores locales incluyen infecciones persistentes provenientes del conducto, procedimientos clínicos deficientes que dan como resultado una instrumentación pobre del conducto radicular, instrumentos fracturados dentro del conducto, obturaciones incompletas o sobre extendidas y ciertas características morfológicas del diente que pueden afectar a los procedimientos clínicos. La resolución periapical también puede estar afectada por ciertas condiciones sistémicas en donde la resistencia general del tejido y su potencial de reparación pueden ser pobres. Cualquiera que sea el caso, está extensamente documentado que el factor decisivo que afecta el resultado a largo plazo de los tratamientos de conductos y la resolución de lesiones periapicales es la persistencia de microorganismos en el conducto radicular **(Nair et al. 1990)**.



Factores microbiológicos asociados con padecimientos endodónticos

La íntima asociación entre los MO y las patologías de origen endodóntico, fue demostrada evidentemente en animales de experimentación (**Kakehashi et al. 1965**). De igual manera, en otro estudio se analizaron los efectos de la microbiota bucal comensal y de la mono infección por *Streptococcus mutans* sobre la pulpa y los tejidos perirradiculares de ratas comunes y gnotobióticas. Los resultados mostraron que la gravedad de la inflamación pulpar y perirradicular estaba directamente relacionada con la cantidad de MO existentes en los conductos radiculares y con el tiempo en que estos tejidos estaban expuestos a los mismos (**Korzen et al. 1974**). Se ha demostrado que los MO y sus productos son los responsables directos de las lesiones en los tejidos y de las respuestas inmunológicas que las originan. La pérdida extensa de hueso se asocia a la infección perirradicular y a la activación del complemento por LPS de bacterias Gram negativas aisladas de conductos infectados (**Stashenko et al. 1992**).

De las más de 500 especies bacterianas reconocidas como parte de la flora bucal comensal, sólo un pequeño grupo son comúnmente aisladas de cavidades pulpares infectadas, predominando anaerobios estrictos con algunos anaerobios facultativos y escasamente algunos aerobios obligados (**Sundqvist 1992b**). Cabe señalar que de las anteriores; a la fecha, sólo un pequeño grupo han sido asociadas con infecciones periapicales (**Gatti et al. 2000**). Diversas especies bacterianas (especialmente anaerobios estrictos) son difícilmente cultivables. A la fecha, se han descrito un gran número metodologías para el estudio de tales MO, las cuales difieren en relación al medio de transporte, medio de cultivo, técnica de muestreo, tipo de incubación y método de

identificación. En las primeras investigaciones publicadas sobre la composición microbiológica de infecciones endodónticas, se reportó una baja incidencia de bacterias anaeróbicas, mientras que en los estudios posteriores se informó de una prevalencia del 90% de estas bacterias en los conductos radiculares infectados (**Kantz & Henry 1974, Sundqvist et al. 1985**). En estudios realizados mediante técnicas de cultivo, la proporción de muestras sin crecimiento puede exceder el 50%, y se ha estimado que entre el 30% y el 80% de las especies bacterianas pueden no ser recuperadas dependiendo de la proporción de MO no-viable, no-cultivable y fastidiosos presente (**Mombelli et al. 1989, Sundqvist et al. 1998**). Por lo tanto, es posible que la microbiota asociada con infecciones endodónticas y la prevalencia de ciertas especies patógenas putativas pudieran haber sido subestimadas en dichos estudios.

A la fecha, estudios de la composición microbiológica de conductos infectados y lesiones periapicales han fallado en proporcionar un consenso en cuanto a las especies asociadas con dichas infecciones. Diversos métodos moleculares y de cultivo tradicionales han sido utilizados para la detección de especies bacterianas provenientes de dientes con lesiones periapicales persistentes. Mientras que un gran número de estudios basados en métodos de cultivo han reportado una microbiota predominada por especies Gram positivas facultativas (**Cheung & Ho 2001, Pinheiro et al. 2003**), otros basados en métodos moleculares, han reportado una microbiota predominada por especies Gram negativas estrictamente anaeróbicas tales como miembros de los géneros *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Tannerella*, *Capnocytophaga* y *Veillonella* (**Lana et al. 2001, Peters et al. 2002**).

Las técnicas modernas de cultivo han sido importantes para demostrar la asociación de MO oportunistas con enfermedades pulpares y periapicales. La tecnología anaeróbica actual provee un ambiente favorable para el crecimiento de anaerobios estrictos fastidiosos. Por ejemplo, en un estudio, se reportó que una gran variedad de bacterias aisladas de conductos radiculares infectados fueron anaerobios estrictos (**Sundqvist 1992a**). MO anaerobios estrictos han sido aislados e identificado en los 5 mm apicales de conductos infectados por exposiciones pulpares cariosas y con lesión periapical presente (**Baumgartner & Falkler 1991**). La presencia de anaerobios estrictos sugiere que un proceso selectivo en favor del crecimiento de anaerobios ha tomado lugar. La proporción relativa de anaerobios estrictos contra facultativos se incrementa con el tiempo de evolución así como las cuentas bacterianas de los mismos (**Fabricius et al. 1982**).

La información concerniente a la detección molecular de bacterias provenientes de dientes con fracasos endodónticos son limitados y para algunas especies en particular, varían considerablemente. Las técnicas moleculares tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la secuenciación de la porción 16S del RNA ribosomal (16S rRNA) y el uso de sondas de DNA ofrecen ventajas significativas sobre los métodos tradicionales de cultivo. Dichas técnicas proveen un medio para la rápida enumeración de bacterias y no requieren del aislamiento de dichos MO en cultivo, lo que significativamente incrementan la proporción de especies no-cultivables o fastidiosas que pueden ser examinadas. La técnica de “checkerboard” (tablero de ajedrez) para hibridaciones DNA-DNA fue descrita en 1994 (**Socransky et al. 1994**). En contraste con otros métodos moleculares de identificación, tiene la ventaja de permitir la detección simultánea de una multitud de

especies microbianas en un gran número de muestras clínicas y muy importantemente de permitir no sólo la identificación de especies sino también su cuantificación, haciendo a la técnica particularmente ideal para la evaluación de muestras proveniente de la cavidad oral. La técnica de “checkerboard” tiene la característica adicional de que los contaminantes microbianos no son cultivados y su DNA no es amplificado como en otras técnicas moleculares. Dado que el número de MO contaminantes, en el caso de estar presentes, no se incrementa, estos se encuentran generalmente en números que están por debajo de los límites de detección de la técnica (aproximadamente 10^4 células). En la **tabla 1** se resumen algunas características generales de la técnica de “checkerboard”. Dicha técnica ha sido empleada principalmente para evaluar la microbiota asociada con las enfermedades periodontales por sus cualidades de cuantificación e identificación simultánea (**Colombo et al. 1999, Ximenez-Fyvie et al. 2006**). Recientemente la técnica ha sido empleada en un número pequeño de estudios para evaluar muestras de infecciones de origen endodóntico (**Moraes et al. 2002, Siqueira et al. 2002**).

Existen estudios que reconocen la sinergia de una correlación positiva entre diferentes especies bacterianas. Se ha reportado una elevada relación sinérgica entre *Treponema denticola* y *Porphyromonas gingivalis* (**Simonson et al. 1992**), y una fuerte correlación positiva entre *Fusobacterium nucleatum* y *Parvimonas micra*, así como entre *Porphyromonas endodontalis*, *Selenomonas sputigena* y *Campylobacter rectus* (antes *Wolinella recta*) (**Sundqvist 1992a**).




La microbiota asociada a lesiones periapicales difiere marcadamente de aquella reportada en conductos radiculares infectados de dientes no tratados endodónticamente (infecciones primarias). Dicha diferencia parece estar relacionada con la diversidad de especies que tienden a colonizar cada uno de estos tejidos. Las infecciones endodónticas primarias se caracterizan por presentar una flora típicamente mixta, en la que los bacilos anaeróbicos Gram negativos predominan. Por otra parte, en lesiones periapicales se ha reportado que normalmente la flora está formada por pocas especies bacterianas, generalmente por Gram positivos y sin predominio aparente de anaerobios o facultativos. En un estudio en el que se examinaron fracasos endodónticos, se reportó una media de 1.6 especies bacterianas por conducto. Las especies anaeróbicas constituyeron el 51% de las especies recuperadas en cultivo. En dicho estudio, *Enterococcus faecalis* fue detectado en el 29% de los casos **(Möller 1966)**. En otro estudio, se observó una media de 1.3 especies bacterianas por conducto y el 42% de las especies eran anaeróbicas estrictas. *E. faecalis* fue detectado en el 38% de los conductos infectados. Mientras que esta especie facultativa se ha encontrado en números bajos y en pocos casos de infecciones primarias, se ha aislado frecuentemente de infecciones secundarias y/o persistentes. *E. faecalis* ha demostrado ser resistente a diversos medicamentos, incluyendo el hidróxido de calcio **(Siqueira Junior & de Uzeda 1996, Siqueira Junior et al. 1999)**. Por lo tanto, cuando *E. faecalis* se establece en el conducto radicular, su erradicación por métodos convencionales puede ser extremadamente difícil **(Molander et al. 1998)**.

La microbiota asociada a dientes con tratamientos deficientes, normalmente contiene un gran número de especies bacterianas predominando anaerobios estrictos y es

muy similar a la encontrada en dientes que presentan infecciones primarias (**Sundqvist et al. 1998**). Esto probablemente ocurre porque los MO causales de la infección inicial, persisten en el conducto después de realizar el tratamiento de conductos inadecuadamente. El tratamiento de conductos utiliza métodos quimiomecánicos de debridación para destruir dicho ecosistema microbiano. Esto es logrado a través del proceso de limpieza y conformación del conducto radicular con el uso de antimicrobianos como irrigantes. La obturación endodóntica suprime a la cavidad pulpar como reservorio de infección.


A pesar de que no se ha establecido una correlación absoluta de cualquiera de las especies identificadas en infecciones endodónticas con los signos y síntomas de las mismas, las bacterias de pigmentación negra han sido las especies bacterianas más frecuentemente implicadas en los estudios microbiológicos. Se ha reportado que *Porphyromonas gingivalis* y *Porphyromonas endodontalis* han sido aisladas únicamente de infecciones en abscesos periapicales agudos. *Prevotella intermedia* fue identificada tanto en infecciones asintomáticas como sintomáticas, y ha sido la especie más comúnmente aislada de conductos radiculares junto con *Prevotella nigrescens*. En la **tabla 2** se presenta una síntesis de la clasificación actual de especies pertenecientes a los géneros *Porphyromonas* y *Prevotella* (anteriormente *Bacteroides*).



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las investigaciones realizadas en años recientes han contribuido sustancialmente al entendimiento de los procesos biológicos y patológicos de la enfermedad periapical. Sin embargo, existen aún deficiencias importantes en el conocimiento de dicha enfermedad. Varios estudios han demostrado que los principales MO que colonizan los sitios de infecciones de tipo endodóntico son bacterias anaerobias Gram negativas. Sin embargo, no existen evidencias científicas que señalen los MO específicos causantes de lesiones periapicales o que estén relacionados con la patogenia de estas enfermedades. Existen muchos reportes en la literatura en que se señalan los MO que causan lesiones periapicales.

Lo cierto es, que se ha demostrado ampliamente que las lesiones periapicales son infecciones en las que coloniza una diversidad de especies bacterianas, sin embargo, sólo algunas especies en particular predominan y son capaces de causar enfermedad. Durante más de un siglo, el cultivo tradicional ha sido el método de diagnóstico estándar para determinar qué especies bacterianas son responsables de ciertas enfermedades. Sin embargo, este no es un método adecuado cuando se analizan muestras con un porcentaje elevado de especies fastidiosas. Se ha estimado que aproximadamente el 30% de las especies que forman parte de la microbiota oral alberga son bacterias desconocidas o no-cultivables. Es por esto que se puede asumir que existe un gran número de patógenos no definidos o que han sido subestimados en estudios basados en técnicas de cultivo tradicional.



Durante la última década, los métodos de identificación moleculares, han sido de gran ayuda para la identificación de patógenos putativos relacionados con procesos patológicos endodónticos. Sin embargo, es necesario ampliar la información existente para contribuir al mejor entendimiento de dichas enfermedades y poder llegar a consensos en cuanto a los microorganismos que intervienen específicamente en su patogenia.



OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente estudio fue determinar y describir la composición de la flora microbiana de lesiones periapicales utilizando la técnica de “checkerboard” (tablero de ajedrez) para hibridaciones DNA-DNA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar, describir y evaluar las diferencias microbiológicas entre las muestras tomadas del ápice radicular y la lesión.
2. Determinar, describir y evaluar las diferencias microbiológicas entre las muestras tomadas de dientes anteriores y posteriores.
3. Determinar, describir y evaluar las diferencias microbiológicas entre las muestras tomadas de pacientes masculinos y femeninos.
4. Determinar, describir y evaluar las diferencias microbiológicas entre las muestras tomadas de pacientes fumadores y no fumadores.




MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un estudio clínico de tipo transversal en el que se analizaron microbiológicamente un total de 54 muestras periapicales provenientes de 27 sujetos de estudio. Los sujetos fueron evaluados en dos visitas con un intervalo de 1 semana entre cada visita. En la primera visita se realizó una evaluación del estado de salud general y endodóntico de los sujetos, y se determinó si cumplían con los criterios de selección. En la segunda, se realizó una cirugía periapical durante la cual se recolectaron las muestras. Todas las muestras fueron evaluadas para determinar los niveles, prevalencia y proporción de 38 especies bacterianas utilizando la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA (Socransky *et al.* 1994).

CAPTURA DE SUJETOS DE ESTUDIO

Todos los sujetos incluidos en el estudio fueron pacientes que solicitaron atención en la clínica de Endodoncia de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM. El propósito y naturaleza del estudio, incluyendo los procedimientos específicos para la recolección de información y muestras, fueron explicados a cada sujeto potencial de estudio. Los sujetos recibieron copia de la forma de consentimiento informado en la que se delineó explícitamente el protocolo del estudio (Anexo 1). Se pidió a los sujetos que firmaran dicha forma, con lo cual establecieron su entendimiento sobre el estudio y el deseo voluntario de participar.



CRITERIOS DE SELECCIÓN

En el estudio se incluyeron tanto hombres como mujeres mayores de 20 años. Se seleccionaron sujetos que presentaran lesiones periapicales visibles radiográficamente de por lo menos 3 mm de diámetro y tratamiento de conductos radiculares terminado por lo menos 1 año antes de ser evaluados para el estudio. Todas las muestras provinieron de lesiones periapicales que mostraron ausencia de cortical ósea al momento del levantamiento del colgajo, suficientemente amplia para permitir la recolección de la muestra sin necesidad de efectuar algún otro tipo de manipulación en la zona.

Fueron excluidos del estudio todos los sujetos que presentaban embarazo o estuvieran en periodo de lactancia, que hubieran tomado cualquier clase de antimicrobiano sistémico en los 3 meses previos a su evaluación para el estudio, que presentaran cualquier condición sistémica que pudiera influir sobre el curso o severidad de la lesión periapical (diabetes, SIDA, hemofilia, enfermedades autoinmunes, etc.), y que presentaran lesiones combinadas endoperiodontales, fístulas o cualquier otro tipo de comunicación aparente entre la cavidad bucal y la zona periapical.

POBLACIÓN Y MUESTRAS DE ESTUDIO


La población de estudio consistió en un total de 27 sujetos con un rango de edades de 22 a 62 años y un promedio de 38.74 años. El 55.56% de los sujetos de estudio fueron mujeres y el 22.2% eran fumadores. En total se recolectaron y procesaron 54 muestras (2 por paciente); 27 de las cuales fueron tomadas del ápice y 27 de la lesión periapical. Las



muestras provinieron de 28 dientes anteriores y 26 posteriores. En la **tabla 3** se presenta una descripción general de los casos y muestras incluidas en el estudio.

RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Previo a la cirugía, se instruyó a los sujetos que realizaran dos enjuagues repetidos durante 30 segundos cada uno con 15 ml de gluconato de clorhexidina al 0.12% (Peridex, Zila Pharmaceuticals, Phoenix, AZ). Después de colocar anestesia local, el área fue aislada con gasas y lavada con 10 ml de una solución de yodo-povidona al 8%. El sitio quirúrgico fue enjuagado con solución salina antes de efectuar la incisión y el levantamiento del colgajo. Las muestras fueron recolectadas con curetas Gracey estériles (Hu-Friedy, Chicago, IL) inmediatamente después de efectuar el levantamiento del colgajo, sin realizar algún otro tipo de manipulación adicional del área. Una de las muestras fue tomada del ángulo postero-superior o inferior de la lesión y la otra de la porción apical de la superficie radicular. Cada muestra fue colocada en un tubo para microcentrifugación individual de 1.5 ml, que contenía 150 μ l de amortiguador TE pH 7.6 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA). Se agregó 100 μ l de NaOH (0.5 M) a cada tubo y las muestras fueron dispersadas con vórtex. Las muestras fueron hervidas en un baño de agua durante 10 minutos y el pH fue neutralizado agregando 800 μ l de acetato de amonio (5 M). El DNA de cada muestra fue colocado en uno de los canales abiertos de un Minislot-30 (Immunelectrics, Cambridge, MA), concentrado en una membrana de nylon de carga positiva de 15 x 15 cm (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y fijado a la membrana mediante entrecruzamiento bajo luz ultravioleta seguido por incubación a 120°C durante 20 minutos. El Minislot-30




permitió depositar 28 muestras y dos estándares microbiológicos en canales individuales en una sola membrana de nylon. Los estándares microbiológicos consistieron en mezclas ajustadas a 10^5 y 10^6 células de cultivos puros de cada una de las 38 especies bacterianas que fueron analizadas con las sondas de DNA (**tabla 4**).

EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA

Las evaluaciones microbiológicas se realizaron en el Laboratorio de Genética Molecular de la División de Estudios de Postgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM mediante la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA (**Socransky *et al.* 1994**) (**Figura 1**).

Especies bacterianas y condiciones de cultivo

La lista de las 38 cepas de referencia que fueron utilizadas en el presente estudio para la preparación de sondas de DNA se presenta en la **tabla 4**. Todas las cepas fueron adquiridas como cultivos liofilizados del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Los cultivos liofilizados fueron rehidratados en caldo para *Mycoplasma* (BBL, Becton Dickinson & Co., Cockeysville, MD). Todas las cepas, con excepción de *Tannerella forsythia*, las 3 especies de *Campylobacter* y *Treponema denticola*, fueron cultivadas en agar de soya tripticasa (BBL) suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrinada, 0.3 µg/ml de menadiona (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y 5 µg/ml de hemina (Sigma) a 35°C bajo condiciones de anaerobiosis (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂). Para el cultivo de *T. forsythia* se utilizó el medio anteriormente descrito suplementado adicionalmente con 10 µg/ml de ácido N-acetil-murámico (NAM, Sigma). Las especies de



Campylobacter fueron cultivadas también en el mismo medio que fue suplementado en la superficie con 200 µL de solución de formato/fumarato (6% c/u, pH 7.0). *T. denticola* fue cultivada en caldo para *Mycoplasma* suplementado con 0.05 mg/ml de ácido tioglicólico, 1 mg/ml de L-cisteína-HCl, 0.026 mg/ml de L-aspargina, 2.1 mg/ml de glucosa, 0.3% de solución de pirofosfato de tiamina (2 mg/ml cocarboxilasa), 0.2% de solución VFA (ácido isobutírico, ácido metilbutírico, ácido isovalérico, ácido valérico 0.5% c/u en NaOH 0.1 M) y 2% de suero de conejo.


Purificación de DNA y preparación de sondas

Las cepas bacterianas fueron cultivadas bajo condiciones anaeróbicas sobre la superficie del agar (excepto *T. denticola* que fue cultivada en caldo) durante 3 a 7 días. El crecimiento fue recolectado y colocado en tubos para microcentrifugación de 1.5 ml que contenían 1 ml de amortiguador TE pH 7.6. Las células fueron lavadas dos veces mediante centrifugación en amortiguador TE pH 7.6 a 3,500 rpm durante 10 minutos cada vez. Las células fueron lisadas a 37°C durante 1 hora con 10% SDS y proteinasa K (20 mg/ml) (Sigma) para las especies Gram negativas o con una mezcla de 15 mg/ml de lisozima (Sigma) y 5 mg/ml de acromopeptidasa (Sigma) en amortiguador TE pH 8.0 para las especies Gram positivas. Las células fueron resuspendidas mediante sonicación durante 15 segundos e incubadas a 37°C durante 1 hora. El DNA fue aislado y purificado utilizando la técnica previamente descrita (**Smith et al. 1989**). La concentración de DNA fue determinada mediante mediciones espectrofotométricas a 260 nm. La pureza de las preparaciones fue valorada mediante el cálculo de la relación entre las mediciones de 260 nm y 280 nm. Las sondas de DNA genómicos fueron preparadas para las 38 especies

bacterianas marcando 1 µg de DNA purificado con digoxigenina (Roche) utilizando la técnica de marcaje de iniciadores aleatorios (random primer technique) previamente descrita (**Feinberg & Vogelstein 1983**).

Hibridaciones DNA-DNA

Las membranas fueron prehibridizadas a 42°C durante 2 horas en solución de prehibridación que contenía 50% de formamida, 5x citrato salino estándar (SSC) (1x SSC: NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM pH 7.0), 1% caseína, 5x solución Denhardt, fosfato de sodio 25 mM pH 6.5 y 0.5 mg/ml de RNA de levadura (Roche). La membrana con DNA fijado fue colocada en un Miniblotter-45 (Immuntics) con los canales de las muestras rotados 90° en relación a los carriles de este segundo aparato. Esto produjo un patrón de tablero de ajedrez ("checkerboard") de 30 x 45. Las sondas de DNA fueron diluidas a una concentración aproximada de 20 ng/ml en solución de hibridación (45% formamida, 5x SSC, 1x solución Denhardt, fosfato de sodio 20 mM pH 6.5, 0.2 mg/ml RNA de levadura, 10% sulfato de dextrano y 1% caseína), colocadas en carriles individuales del Miniblotter-45 e hibridizadas 16 horas a 42°C con el aparato sellado dentro de una bolsa de plástico para evitar la evaporación de las sondas de DNA. La concentración de cada sonda fue ajustada previamente mediante pruebas de ensayo y error para lograr que cada una detectara un intervalo de células entre 10^4 y 10^7 . Las membranas fueron sometidas a dos lavados de alta astringencia durante 20 minutos cada vez a 68°C en amortiguador de fosfato (0.1x SSC, 0.1% SDS) utilizando un baño con circulación tipo Disk-wisk (Schleicher and Schuell, Keene, NH).



Detección y cuantificación de microorganismos

Las membranas fueron bloqueadas mediante 1 hora de incubación en amortiguador bloqueador que contenía 1% de caseína en amortiguador de maleato (ácido maléico 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5). Los híbridos fueron detectados incubando las membranas en una dilución de 1:50,000 de un anticuerpo contra digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina durante 30 minutos (Roche) utilizando una modificación previamente descrita **(Engler-Blum *et al.* 1993)**. Después de ser lavadas, las membranas fueron incubadas en el agente quimioluminiscente de detección CDP-Star (Roche) durante 5 minutos a temperatura ambiente y las señales fueron detectadas mediante la exposición de las membranas a películas autoradiográficas BioMax-ML (Eastman Kodak, Rochester, NY) dentro de cassettes (Eastman Kodak) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las películas fueron reveladas siguiendo procedimientos de rutina. Las películas fueron digitalizadas utilizando el sistema de foto-documentación DigiDoc (BioRad Laboratorios, Hercules, CA) y analizadas con el software Quantity One (BioRad). Las señales fueron ajustadas sustrayéndoles el promedio más dos desviaciones estándar del resultado debido a la nitidez obtenida (ruido de fondo) detectada en los 3 carriles vacíos y fueron convertidas a cuentas absolutas por comparación con las señales de los estándares bacterianos en la misma membrana a 10^5 y 10^6 .

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

Los datos microbiológicos con los que se contaron para cada sujeto de estudio fueron las cuentas absolutas de las 38 especies bacterianas evaluadas en cada una de las dos muestras. Los análisis describieron los datos microbiológicos dentro de la población

de estudio ($n=27$ sujetos), expresando la información de 3 formas: niveles (cuentas bacterianas $\times 10^5$), prevalencia (% de muestras colonizadas) y proporción (% del total de cuentas bacterianas). Cada parámetro fue calculado para cada especie bacteriana, promediando posteriormente las dos muestras de cada sujeto y finalmente, calculando el promedio entre los sujetos de la población de estudio. Los datos para cada uno de los parámetros se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM).

Adicionalmente, se realizaron análisis comparativos para evaluar las diferencias microbiológicas entre las muestras tomadas del ápice y de la lesión, de dientes anteriores y posteriores, de sujetos del género masculino y femenino, y de individuos fumadores y no-fumadores. La significancia de las diferencias entre grupos con respecto a los niveles, prevalencia y proporción de especies bacterianas fue calculada utilizando la prueba U de Mann-Whitney.



RESULTADOS

ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS

Las **tablas 5-7** y **figuras 2-4** presentan las medias de niveles, prevalencia y proporción (\pm EEM) respectivamente, de las 38 especies individuales evaluadas en muestras de lesiones periapicales de 27 sujetos de estudio.

Cuentas bacterianas

Todas las especies analizadas fueron detectadas con excepción de *Campylobacter gracilis*. Las cuentas bacterianas totales promedio en muestras de lesiones periapicales fueron de 136.2 ± 35.4 ($\times 10^5$). Las especies que presentaron las cuentas bacterianas promedio más elevadas fueron *Eubacterium sulci* ($18.7 \pm 7.1 \times 10^5$), *Actinomyces naeslundii* serotipo 1 ($17.3 \pm 6.3 \times 10^5$), *Streptococcus sanguinis* ($15.0 \pm 6.2 \times 10^5$), *Corynebacterium matruchotii* ($13.9 \pm 6.0 \times 10^5$), *Actinomyces israelii* ($12.5 \pm 5.5 \times 10^5$), *Actinomyces odontolyticus* ($11.2 \pm 5.7 \times 10^5$), *Streptococcus mitis* ($10.6 \pm 5.6 \times 10^5$) y *Capnocytophaga gingivalis* ($10.3 \pm 7.6 \times 10^5$).

Prevalencia

El 50% de las especies evaluadas (19 de 38) fueron detectadas en más del 50% de los sujetos. *Actinomyces odontolyticus*, *Corynebacterium matruchotii*, *Actinomyces naeslundii* serotipo 1, *Eubacterium sulci*, *Leptotrichia buccalis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus constellatus* y *Eubacterium saburreum* fueron las especies bacterianas que exhibieron la más alta prevalencia. La especie más prevalente fue *C. gingivalis* ($78.6\% \pm 10.1\%$). Las otras 2 especies de *Capnocytophaga* evaluadas (*C.*



sputigena y *C. ochracea*) representaron una de las más bajas prevalencias entre las especies evaluadas ($32.1\% \pm 11.2\%$ y $7.4\% \pm 4.3\%$, respectivamente) junto con *Neisseria mucosa* ($16.7\% \pm 6.3\%$), *Selenomonas noxia* ($16.7\% \pm 7.2\%$), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ($20.4\% \pm 7.2\%$), *Prevotella nigrescens* ($23.8\% \pm 8.9\%$), *Selenomonas artemidis* ($25.9\% \pm 7.2\%$), *Treponema denticola* ($28.6\% \pm 8.1\%$), *Propionibacterium acnes* ($31.0\% \pm 9.4\%$), *Actinomyces georgiae* ($31.5\% \pm 8.1\%$) y *Tannerella forsythia* ($33.3\% \pm 8.7\%$).

Proporción

A. naeslundii stp. 1, *S. intermedius*, *E. sulci*, *C. matruchotii*, *L. buccalis*, *S. sanguinis*, *P. micra* y *E. saburreum* juntos comprendieron el 73.6% del total de MO detectados. El 26.4% restante estuvo conformado por 30 de las 38 especies evaluadas, de las cuales, 21 representaron menos del 2% de las cuentas bacterianas totales. Algunas de dichas especies fueron *E. corrodens*, *T. forsythia*, *P. endodontalis*, *S. noxia*, *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *P. nigrescens*, comúnmente consideradas como patógenos putativos en infecciones endodónticas. *C. gingivalis* representó una proporción promedio de 2.8% ($\pm 1.8\%$) del total de las cuentas bacterianas detectadas. Algunas de las especies que presentaron prevalencias bajas, representaron también únicamente pequeñas proporciones de las cuentas bacterianas totales (*P. gingivalis* $0.42\% \pm 0.19\%$, *C. ochracea* $0.04\% \pm 0.04\%$, *N. mucosa* $0.06\% \pm 0.02\%$, *P. nigrescens* $0.06\% \pm 0.02\%$, *A. actinomycetemcomitans* $0.08\% \pm 0.04\%$, *S. noxia* $0.08\% \pm 0.04\%$, *T. denticola* $0.3\% \pm 0.16\%$, *C. sputigena* $0.36\% \pm 0.26\%$ y *S. artemidis* $0.43\% \pm 0.20\%$).

La proporción promedio (\pm EEM) de grupos de MO se presenta en la **tabla 8 y figura 5**. Las especies de *Streptococcus* agrupadas en el complejo amarillo y aquellas agrupadas en el complejo “otros” representaron el porcentaje mayor del total de MO (27.03% y 26.1%, respectivamente). En conjunto, dichos complejos representaron más del 50% de las cuentas bacterianas totales. Las 4 especies de *Actinomyces* incluidas en el complejo azul y los patógenos putativos del complejo naranja también representaron proporciones relativamente altas en muestras de lesiones periapicales (19.16% y 18.30%, respectivamente) que en conjunto sumaron cerca del 40% de la flora total. En conjunto las especies de los complejos morado, verde y rojo, así como las especies no-agrupadas *A. actinomycetemcomitans* y *S. noxia*, representaron únicamente el 9.38% del total de MO detectados. Interesantemente, las 3 especies del complejo rojo (*P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola*), consideradas como patógenos, representaron menos del 1% de la microbiota total.

ESTADÍSTICAS COMPARATIVAS

En la **tabla 9** se muestran los niveles promedio $\times 10^5$ (\pm EEM) de las 38 especies bacterianas provenientes de muestras obtenidas de la superficie radicular (ápice) y de la lesión periapical. Todas las especies evaluadas exceptuando a *C. sputigena*, *E. saburreum*, *L. buccalis*, *S. artemidis*, *S. noxia*, *S. anginosus*, *S. gordonii*, *S. intermedius*, *S. mitis* y *S. oralis*, presentaron cuentas bacterianas promedio mayores en muestras del ápice que de la lesión. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas para ninguna de las especies evaluadas. En la tabla mencionada, así como en la **figura 6**, se presentan las cuentas bacterianas promedio totales de muestras tomadas del ápice y de la

lesión. A pesar de que las diferencias entre los 2 tipos de muestras no fueron estadísticamente significativas, las muestras provenientes del ápice tendieron a presentar cuentas totales superiores a las de las muestras tomadas de la lesión (164.89 ± 41.28 y $107.47 \pm 33.61 \times 10^5$, respectivamente).

En la **tabla 10** se presentan los valores promedio de prevalencia (\pm EEM) de las 38 especies individuales en muestras del ápice y de la lesión. 17 de las 38 especies (44.7%) evaluadas fueron detectadas en más del 50% de las muestras tanto del ápice como de la lesión. Las especies más prevalentes en muestras tomadas de la lesión fueron *C. gingivalis* ($85.7\% \pm 14.3\%$), *C. matruchotii* ($74.1\% \pm 8.6\%$) y *F. nucleatum* ($71.4\% \pm 12.5\%$). En contraste, en las muestras provenientes del ápice *A. naeslundii* stp. 1, *A. odontolyticus* y *E. sulci* fueron las especies más prevalentes ($81.5\% \pm 7.6\%$, $81.0\% \pm 8.8\%$ y $81.0\% \pm 8.8\%$, respectivamente). Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas para ninguna de las especies evaluadas.

En la **tabla 11** se resumen los promedios (\pm EEM) y estadísticas relativas a la proporción de especies en muestras tomadas del ápice y de la lesión periapical. En lo que respecta al ápice, 3 MO representaron más del 10% de la flora total detectada. *E. sulci* fue el de mayor proporción ($15.05\% \pm 5.52\%$), seguido por *A. naeslundii* stp. 1 ($13.79\% \pm 3.58\%$) y *S. intermedius* ($12.61\% \pm 5.32\%$). Sin embargo, *E. sulci* que presentó la mayor proporción en el ápice, presentó una proporción bastante menor en muestras provenientes de la lesión ($5.47\% \pm 1.71\%$). En lo que respecta a la lesión, *A. naeslundii* stp. 1 fue el MO que representó la mayor proporción de las especies evaluadas ($14.27\% \pm$

4.08%), seguido por *S. intermedius* (13.88% \pm 5.57) y *C. matruchotii* (11.77% \pm 3.38%). Las diferencias en la proporción de especies no fueron estadísticamente significativas entre muestras del ápice y de la lesión.

En la **tabla 12** se resumen las proporciones promedio de complejos bacterianos en muestras de ápice y de lesión. No se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de muestra para ninguno de los complejos bacterianos. Los complejos “otros”, amarillo, azul y naranja representaron las proporciones más elevadas tanto en muestras tomadas del ápice como de la lesión. En conjunto, dichos complejos representaron el 89.82 % y 91.41% de la flora total en muestras del ápice y de la lesión, respectivamente.

En la **tabla 13** se presentan los niveles promedio $\times 10^5$ (\pm EEM) de las 38 especies individuales en muestras de dientes anteriores y posteriores. De las 38 especies evaluadas, únicamente 3 (*A. naeslundii* stp. 1, *P. micra* y *S. artemidis*) mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), todas presentando cuentas más elevadas en dientes posteriores. En la **figura 6**, se presentan las cuentas bacterianas promedio totales de muestras tomadas de dientes anteriores y de posteriores. A pesar de que las diferencias entre los 2 tipos de muestras no fueron estadísticamente significativas, las muestras provenientes de dientes posteriores tendieron a presentar cuentas totales superiores a las de las muestras tomadas de dientes anteriores (168.02 \pm 40.16 y 106.62 \pm 35.15 $\times 10^5$, respectivamente).



En la **tabla 14** se representan las medias de prevalencia (\pm EEM) de las 38 especies individuales en muestras de dientes anteriores y dientes posteriores. 11 de las especies evaluadas (28.9%) fueron detectadas en más del 50% de las muestras tomadas de dientes anteriores, mientras que 21 de las 38 especies fueron identificadas en más del 50% de las muestras provenientes de dientes posteriores. *L. buccalis*, *V. parvula* y *S. artemidis* fueron detectadas en un porcentaje significativamente mayor ($p < 0.05$) en muestras de dientes posteriores que de dientes anteriores. La especie más prevalente en las muestras tomadas de los dientes anteriores fue nuevamente *C. gingivalis* encontrándose en el 100% de las muestras. En contraste, la especie con mayor prevalencia en los dientes posteriores fue *L. buccalis* con 91.7% (\pm 8.3%).

En la **tabla 15** se muestra la proporción promedio (\pm EEM) de especies individuales en dientes anteriores y posteriores. En las muestras de dientes posteriores, sólo *A. naeslundii* stp. 1 presentó una proporción mayor al 10% (18.6% \pm 4.4%), mientras que en muestras de dientes anteriores *S. intermedius*, *L. buccalis*, *E. sulci* y *C. matruchotii* representaron proporciones superiores al 10% de la flora total (19.4% \pm 6.8%, 13.0% \pm 7.2%, 12.7% \pm 4.9% y 10.4% \pm 2.9%, respectivamente). Únicamente *S. artemidis* presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con una proporción mayor en muestras tomadas de dientes posteriores. 22 de las 38 especies evaluadas (57.9%), representaron una proporción menor al 2% en muestras de dientes posteriores.

La **tabla 16** muestra las proporciones promedio de complejos bacterianos en muestras de dientes anteriores y posteriores. El complejo que representó la mayor



proporción en el grupo de dientes anteriores fue el amarillo ($31.30\% \pm 6.45\%$). Dicho complejo bacteriano, junto con los complejos morado, verde, y “otros”, representaron proporciones mayores en dientes anteriores que en posteriores. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. El complejo azul (*Actinomyces* sp.), representó una proporción significativamente mayor ($p < 0.01$) en muestras provenientes de dientes posteriores que en las de dientes anteriores ($25.97\% \pm 4.93\%$ y $12.84\% \pm 3.39\%$, respectivamente). Individualmente, la proporción de *S. artemidis* (complejo “otros”) también fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en muestras de dientes posteriores que de dientes anteriores.

En la **tabla 17** se presentan los niveles promedio ($\times 10^5$) de las 38 especies bacterianas en muestras de pacientes de los género masculino y femenino. 17 de las especies bacterianas evaluadas (44.7%), incluyendo a varios patógenos putativos como *P. intermedia*, *E. corrodens*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. nigrescens*, *S. noxia* y *A. actinomycetemcomitans*, presentaron cuentas bacterianas promedio mayores en sujetos del género femenino que del género masculino. Sin embargo, estas diferencias sólo fueron estadísticamente significativas para *F. nucleatum* ($p < 0.01$) y *S. artemidis* ($p < 0.05$). Por otra parte, en el grupo de sujetos masculinos, los niveles promedio de *V. parvula*, *S. anginosus* y *C. gingivalis* fueron significativamente mayores ($p < 0.01$, $p < 0.05$ y $p < 0.05$, respectivamente) que en el grupo de sujetos del género femenino. En la **figura 6**, se presentan las cuentas bacterianas promedio totales en muestras tomadas de hombres y mujeres. Fue interesante observar que a pesar de que individualmente cerca del 45% de las especies evaluadas presentaron cuentas más elevadas en mujeres que en hombres, las

cuentas bacterianas totales promedio en el grupo de hombres fueron casi del doble que en las mujeres (184.33 ± 67.72 y $97.66 \pm 32.57 \times 10^5$, respectivamente). La diferencia entre los 2 grupos, sin embargo, no fue estadísticamente significativa.

En la **tabla 18** se presentan las medias de prevalencia (\pm EEM) de las 38 especies individuales en muestras periapicales de hombres y de mujeres. En el grupo de hombres, 30 de las 38 especies bacterianas (78.9%) presentaron una prevalencia mayor que en el grupo de mujeres. Sin embargo, las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas para *F. nucleatum* ($p < 0.01$), *S. artemidis* ($p < 0.05$), *S. anginosus* ($p < 0.05$), *S. constellatus* ($p < 0.05$) y *V. parvula* ($p < 0.01$). La especie con mayor prevalencia en hombres fue *C. gingivalis* encontrándose en el 100% de los sujetos. *F. periodonticum*, *C. matruchotii*, *A. naeslundii* stp. 1, *L. buccalis*, *E. sulci*, *S. gordonii*, *E. corrodens*, *A. odontolyticus*, *S. intermedius*, *C. gingivalis*, *S. sanguinis* y *S. oralis*, fueron detectados en más del 50% de los sujetos tanto del género masculino como femenino.

En la **tabla 19** y **figura 7** se muestra la proporción promedio (\pm EEM) de especies individuales en muestras de sujetos masculinos y femeninos. *S. intermedius*, *C. matruchotii*, *E. sulci*, *A. naeslundii* stp. 1 y *L. buccalis* fueron las especies con proporciones más elevadas tanto en el grupo de hombres como de mujeres. *E. saburreum* ($p < 0.05$), *V. parvula* ($p < 0.001$), *C. gingivalis* ($p < 0.05$), *S. anginosus* ($p < 0.05$) y *F. nucleatum* ($p < 0.01$) fueron las únicas especies que presentaron proporciones significativamente diferentes entre los grupos, todas con proporciones más elevadas en hombres.



En la **tabla 20** y **figura 8** se muestran las proporciones promedio de complejos bacterianos en muestras de pacientes masculinos y femeninos. Los complejos amarillo, azul, naranja y “otros”, presentaron las proporciones más elevadas tanto en hombres como en mujeres. En conjunto, estos 4 complejos representaron del 85.7% al 94.5% de la microbiota total en ambos grupos. Sin embargo, el grupo de hombres tendió a exhibir una proporción menor del complejo naranja y de las especies de *Actinomyces* incluidas en el complejo azul, así como una proporción mayor de las especies patógenas del complejo rojo que el grupo de mujeres. El complejo morado presentó una proporción significativamente mayor ($p<0.05$) en sujetos del género masculino, e individualmente, también *E. saburreum* ($p<0.05$) incluida en el complejo “otros”.

En la **tabla 21** se muestran los niveles promedio de cuentas bacterianas $\times 10^5$ (\pm EEM) de las 38 especies individuales en sujetos fumadores y no-fumadores. En esta comparación, se observó que 15 de las 38 especies (39.47%) mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, todas de las cuales presentaron niveles más altos en sujetos fumadores. Dichas especies fueron *E. saburreum* ($p<0.05$), *T. denticola* ($p<0.01$), *P. nigrescens* ($p<0.05$), *A. odontolyticus* ($p<0.05$), *C. showae* ($p<0.01$), *P. endodontalis* ($p<0.05$), *F. periodonticum* ($p<0.05$), *N. mucosa* ($p<0.05$), *S. gordonii* ($p<0.05$), *T. forsythia* ($p<0.05$), *S. noxia* ($p<0.001$), *P. acnes* ($p<0.01$), *S. mitis* ($p<0.05$), *E. corrodens* ($p<0.01$) y *C. sputigena* ($p<0.05$). Las cuentas totales promedio en el grupo de fumadores fueron de $214.51 \pm 94.29 \times 10^5$, mientras que en el grupo de no-fumadores fueron de $113.80 \pm 36.65 \times 10^5$ (**figura 6**). Las diferencias entre grupos con respecto a las cuentas bacterianas totales, no fueron estadísticamente significativas.

En la **tabla 22** se representa la prevalencia promedio (\pm EEM) de las 38 especies individuales en sujetos fumadores y no-fumadores. Al igual que en los niveles promedio descritos en el párrafo que antecede, 15 de las 38 especies evaluadas (39.47%) mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. En todos los casos, la prevalencia fue mayor en sujetos fumadores. Dichas especies fueron *A. naeslundii* stp. 1 ($p < 0.05$), *E. saburreum* ($p < 0.05$), *A. georgiae* ($p < 0.05$), *C. ochracea* ($p < 0.05$), *T. denticola* ($p < 0.01$), *P. nigrescens* ($p < 0.05$), *C. showae* ($p < 0.01$), *N. mucosa* ($p < 0.05$), *S. gordonii* ($p < 0.05$), *T. forsythia* ($p < 0.01$), *S. noxia* ($p < 0.001$), *P. acnes* ($p < 0.001$), *S. mitis* ($p < 0.05$), *E. corrodens* ($p < 0.05$) y *C. sputigena* ($p < 0.05$). Las especies más prevalentes en las muestras tomadas de pacientes no-fumadores fueron *C. gingivalis* (78.6% \pm 10.1%), *C. matruchotii* (78.6% \pm 8.1%), *L. buccalis* (72.7% \pm 12.4%) y *E. sulci* (70.6% \pm 8.6%). Las especies más prevalentes en el grupo de fumadores fueron *A. naeslundii* stp. 1, *A. odontolyticus*, *E. corrodens*, *E. saburreum*, *P. acnes*, *S. gordonii* y *S. mitis* encontrándose en el 100% de los sujetos.

En la **tabla 23** y la **figura 9** se muestra la proporción promedio (\pm EEM) de las 38 especies bacterianas individuales en pacientes fumadores y no-fumadores. *A. naeslundii* stp. 1, *S. intermedius* y *L. buccalis* representaron la proporción más alta de especies tanto en sujetos fumadores como no-fumadores. En conjunto, estas especies representaron del 33.9% al 43.8% de la microbiota total detectada en ambos grupos. 8 de las especies evaluadas presentaron diferencias estadísticamente significativas en la proporción promedio entre los grupos. De las anteriores, *S. mitis* ($p < 0.05$), *P. acnes* ($p < 0.01$), *T. forsythia* ($p < 0.05$), *T. denticola* ($p < 0.01$), *C. showae* ($p < 0.05$), *S. noxia* ($p < 0.001$) y *N.*

mucosa ($p < 0.05$) representaron proporciones más elevadas de la flora total en sujetos fumadores. Únicamente, *C. matruchotii* representó una proporción significativamente mayor en muestras de sujetos no-fumadores ($p < 0.05$).

En la **tabla 24** y **figura 10** se muestran las proporciones promedio de complejos bacterianos en sujetos fumadores y no-fumadores. En el grupo de sujetos fumadores los complejos bacterianos predominantes fueron el amarillo ($37.09\% \pm 4.39\%$) y el azul ($22.75\% \pm 9.16\%$). En sujetos fumadores estos dos complejos representaron cerca del 60% de la flora total detectada. Los sujetos fumadores presentaron proporciones mayores que los no-fumadores también de los complejos morado, verde y rojo, así como de las especies incluidas en “no-agrupados” (*S. noxia* y *A. actinomycetemcomitans*). Las diferencias fueron estadísticamente significativas únicamente para los “no-agrupados” ($p < 0.05$). Los sujetos no-fumadores, presentaron proporciones mayores que los fumadores de los complejos naranja y “otros”. Las diferencias fueron estadísticamente significativas sólo para 3 de las especies individuales incluidas en el complejo “otros”, una de las cuales (*C. matruchotii*, $p < 0.05$), presentó una proporción mayor en el grupo de no-fumadores y las otras 2 (*N. mucosa*, $p < 0.05$ y *P. acnes* $p < 0.01$) en el grupo de fumadores.



DISCUSIÓN

En la actualidad, se considera que la principal causante del fracaso endodóntico es la filtración bacteriana. El papel de las bacterias en la iniciación de la inflamación pulpar y periapical ha sido ampliamente documentada y discutida a través del tiempo (**Kakehashi et al. 1965, Sundqvist 1992a, Sundqvist 1992b**). Sin embargo, al no existir a la fecha, un consenso del papel que juegan microorganismos específicos en estas patologías, una de las preguntas que merece las consideraciones más importantes en este campo es: ¿Cuáles son los microorganismos específicos que están involucrados en la etiología y patogenia de las enfermedades pulpares y periapicales?

Definir especies patogénicas para la mayoría de las infecciones en la cavidad oral representa un reto significativo. Las biopelículas adheridas a las superficies orales alojan una gran diversidad de MO. Una biopelícula puede ser definida como una población bacteriana adherida a un substrato orgánico o inorgánico, rodeada de productos microbianos extracelulares que forman una matriz (**Costerton et al. 1995**). Los agentes etiológicos de las afecciones orales más comunes como caries, enfermedad periodontal y periodontitis apical se originan de dichas biopelículas y se sabe que colonizan la placa tanto en poblaciones sanas y enfermas (**Ximenez-Fyvie et al. 2000**).

En contraste con la descripción microbiológica de especies relacionados con caries o enfermedad periodontal, los estudios de lesiones periapicales, no tienen la posibilidad de contar con muestras de tejidos sanos que sirvan como control, contra las cuales se



podiera obtener una comparación de sitios sanos contra enfermos. Por lo que definir especies patogénicas en estas lesiones es adicionalmente complicado.

Una de las vías para determinar el posible papel de los MO específicos en la patogénesis de las lesiones periapicales, fue establecer puntos de corte para las especies bacterianas evaluadas en cuanto a sus niveles, prevalencia y proporción. En el presente estudio, establecimos dichos puntos de corte en $\geq 5 \times 10^5$ para niveles, $\geq 50\%$ para prevalencia y $\geq 2\%$ para proporción (**figuras 5, 6 y 7**). Estos 3 parámetros fueron considerados en conjunto para la interpretación de los datos. Nuestros resultados sugieren las lesiones periapicales presentan una microbiota similar a la descrita para ciertas formas de enfermedad periodontal (**Haffajee et al. 1998**). Este hallazgo no es extraño considerando que los MO que colonizan el conducto radicular, las lesiones periapicales y el espacio subgingival se originan de las mismas biopelículas bucales. Este perfil se caracteriza por una gran cantidad de Gram positivos, en particular especies de *Actinomyces* y *Streptococcus* y bajos niveles de patógenos “clásicos” como *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola*. En el presente estudio se determinó que el género *Streptococcus* dominó la microbiota de las muestras representando más del 30% de proporción total de especies. 4 de las 7 especies de este género fueron también individualmente predominantes (*S. sanguinis*, *S. intermedius*, *S. constellatus* y *S. mitis*) (**tabla 7**). La mayoría de los patógenos endodónticos, tales como *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* y *T. denticola*, estuvieron presentes en un alto porcentaje de sujetos pero fueron detectados en niveles cerca del límite bajo de resolución del ensayo utilizado (10^4). Así mismo, su proporción en todos los casos fue menor al 0.7% de las cuentas promedio totales (**figura**

4). Por lo tanto, aunque un gran número de estudios han asociado a *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *P. endodontalis* y *T. denticola* con infecciones de origen endodóntico (**Gatti et al. 2000, Siqueira et al. 2001b, Sunde et al. 2000**), no fue posible determinar una relación directa entre dichas especies y las lesiones periapicales en la presente investigación.

Nuestros resultados sugieren una posible relación de especies Gram positivas como *A. naeslundii* stp. 1, *E. sulci*, *C. matruchotii*, *S. sanguinis*, *P. micra*, *E. saburreum*, *A. odontolyticus* y *A. israelii*, así como de algunas Gram negativas como *C. gingivalis* y *F. periodonticum*. Individualmente, todas estas especies fueron detectadas en más del 50% de los sujetos, en niveles por arriba de 5×10^5 y representaron proporciones de más del 2% del total de la flora. Otras especies posiblemente relacionadas incluyeron *S. intermedius*, *S. constellatus*, *L. buccalis*, *V. parvula* y *S. mitis*, todas de las cuales fueron detectadas por arriba de los puntos de corte en 2 o más de los parámetros establecidos.

Existen cerca de 50 especies bacterianas diferentes que han sido aisladas de lesiones periapicales (**Sundqvist 1992b**); sin embargo, existen estudios con técnicas de cultivo que muestran un bajo número de especies detectadas por muestra (1 a 4) y una proporción consistentemente alta de muestras sin crecimiento (15-35%) o con un solo MO presente (16-45%) (**Cheung & Ho 2001, Pinheiro et al. 2003**). La técnica de checkerboard para hibridaciones DNA-DNA, a diferencia de otras técnicas, permite la detección simultánea de un número alto de especies microbianas en un gran número de muestras clínicas. Dicha prueba puede ser definida para una alta sensibilidad y especificidad de las sondas genómicas utilizadas dentro de la prueba (**Socransky et al. 1998**). Se ha demostrado en


estudios previos, que el 92% de las sondas, no expresan reacciones cruzadas entre especies heterogéneas bajo las condiciones del estudio **(Socransky et al. 1998)**.

Estudios recientes sugieren que la detección e identificación de bacterias en infecciones endodónticas puede ser dependientes de la técnica utilizada **(Chan et al. 2004)**. Se ha documentado ampliamente que el uso de técnicas moleculares para el análisis de MO en muestras provenientes de la cavidad oral permite una recuperación significativamente mayor de especies que las técnicas de cultivo tradicionales **(Papapanou et al. 1997, Sunde et al. 2000)**. Esto es debido principalmente a la naturaleza de los MO que colonizan las diferentes superficies de la cavidad oral y la relativamente alta proporción de especies incultivables y fastidiosas presentes en dichas muestras **(Paster et al. 2001)**. Al día de hoy, un gran número de técnicas moleculares han sido empleadas para la detección y cuantificación de especies bacterianas en muestras de origen endodóntico incluyendo: secuenciación de la porción 16S del RNA ribosomal **(Munson et al. 2002)**, PCR **(Siqueira et al. 2001a, Siqueira et al. 2002)** y la hibridación DNA-DNA **(Gatti et al. 2000, Sunde et al. 2000)**. La secuenciación de la porción 16S del RNA ribosomal y la técnica de PCR son métodos altamente específicos con costos razonables; sin embargo, estas técnicas no permiten la cuantificación de bacterias, y sólo permiten la identificación de un número limitado de especies en un número limitado de muestras. Más aún, ambas técnicas requieren amplificación del espécimen, lo cual puede resultar en la detección o sobrerrepresentación de especies externas o contaminantes. Esto es un problema potencial particularmente grave cuando las muestras se toman de sitios en los que se encuentra presente una flora endógena mixta altamente compleja como en la cavidad

bucal. La amplificación del DNA contaminante cuando se utilizan técnicas que requieren la amplificación del espécimen puede resultar en un alto porcentaje de falsos positivos.

Utilizando la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA, en el presente estudio fue posible determinar que el 57.4% de las muestras obtenidas contenían entre 9 y 35 especies bacterianas diferentes (14 ± 10.7) (**tabla 6**). Nuestros resultados concuerdan con los reportados de estudios previos en los que mediante la misma técnica mostraron una detección de entre 10 y 33 MO diferentes en cada muestra y una prevalencia promedio de especies del 75% (**Gatti et al. 2000**). Los resultados tanto del presente estudio como del anteriormente citado, concuerdan con los publicados por otro grupo utilizando métodos moleculares para la detección microbiológica (**Munson et al. 2002**).

En el presente estudio el 97% de las especies evaluadas fueron detectadas (**tabla 6**). Se encontraron 37 diferentes MO, dentro de los cuales existió un predominio de anaerobios facultativos y Gram positivos tales como especies de *Actinomyces* y *Streptococcus*. Estos resultados sugieren una complejidad microbiana significativamente superior a la anteriormente descrita en otras publicaciones en las que se emplearon métodos tradicionales de cultivo (**Sundqvist 1992b**). Los resultados que aquí se presentan son similares a los reportados en otros estudios en los que se utilizaron métodos moleculares similares (**Gatti et al. 2000, Siqueira et al. 2001c, Sunde et al. 2000**). Sin embargo, algunos MO como *T. forsythia* y *A. actinomycetemcomitans* para los cuales se han reportado altas prevalencias en algunos de los estudios anteriormente citados, no mostraron una prevalencia similar en la presente investigación con excepción del grupo de



pacientes fumadores. *T. forsythia* estuvo presente en promedio sólo en el 33% de las muestras y *A. a.* únicamente en el 20% (**figura 3**). A pesar de que una gran cantidad de *P. endodontalis* ha sido previamente reportada en muestras de infecciones endodónticas (**Sunde et al. 2000**), esta especie patógena putativa presentó una prevalencia del 5.7% en este estudio.


En el presente estudio, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a prevalencia, niveles o proporción de las especies microbianas obtenidas de las muestras individuales tomadas de la superficie radicular y la zona más posterior de la lesión (**tablas 9-11**). Lo anterior sugiere una distribución homóloga de MO dentro de dichas lesiones. Estos resultados contrastan con los reportados en otro estudio (**Chan et al. 2004**). Una posible explicación podría ser el esparcimiento de MO debido a la sobre-manipulación de la zona de muestreo. En el estudio anteriormente citado, el tejido granulomatoso fue removido y seccionado. Las muestras en el presente estudio fueron obtenidas antes de realizar cualquier manipulación de la lesión.

En el espacio periapical ciertos grupos de especies bacterianas, utilizan uno o más mecanismos para evadir a los sistemas de defensa del huésped (**Siqueira Junior et al. 1999, Sundqvist 1992a**). Ciertos MO han desarrollado mecanismos que les permiten subsistir en un ambiente inhóspito. Por lo tanto, dichas especies pueden evadir la respuesta inmune de defensa, evitando su destrucción por fagocitos, causando inmunosupresión, cambiando sus cubiertas antigénicas e induciendo una proteólisis de anticuerpos (**Siqueira Junior et al**). Estos MO tienen la habilidad de sobrepasar los

sistemas de defensa del organismo y por lo tanto inducir una infección extrarradicular. Es actualmente reconocido que algunas especies de *Actinomyces*, así como *Propionibacterium propionicum*, pueden estar implicados en infecciones extrarradiculares **(Ramachandran Nair & Schroeder 1984, Sakellariou 1996, Sjogren et al. 1988, Sundqvist & Reuterving 1980)**.

Sin embargo, probablemente uno de los mecanismos bacterianos más significativos de defensa contra las células del organismo es la organización de dichos MO dentro la estructura de las biopelículas. Organizados en biopelículas, los MO muestran mayor resistencia tanto a los agentes antimicrobianos utilizados como a los mecanismos de defensa del organismo que aquellos que se encuentran en estado planctónico **(Costerton 1995, Costerton et al. 1994)**. En un estudio se reportó la presencia de biopelículas bacterianas adyacentes al foramen periapical y colonias bacterianas localizadas dentro de granulomas periapicales **(Tronstad et al. 1990b)**. Estos resultados sugieren que la organización bacteriana en biopelículas permite la evasión de los mecanismos de defensa del organismo y por lo tanto facilita la persistencia de lesiones periapicales.


Algunos estudios han demostrado que algunos espacios dentro de los conductos se mantienen lejos o libres de la preparación quimiomecánica sin importar la técnica y los instrumentos utilizados para ésta **(Lin et al. 1991, Siqueira et al. 1997)**. Estas zonas contaminadas pueden contener bacterias y tejido necrótico aún cuando radiográficamente la obturación endodóntica parezca adecuada. Se sabe que una



obtención radiográficamente aceptable no necesariamente asegura la completa limpieza y/o el sellado del sistema de conductos (**Lin et al. 1991**).

Factores como el ecosistema local influye también durante el tratamiento de conductos, ya que permiten que ciertos MO subsistan y dependiendo de otros factores puedan inducir el fracaso endodóntico. Dichas influencias son afectadas por las medidas de desinfección intraconducto (preparación quimiomecánica y medicación intraconducto) y la baja disponibilidad de sustrato dentro del conducto radicular (**Siqueira et al. 1996**).

Para sobrevivir en un conducto obturado, los MO deben soportar los procedimientos de desinfección y adaptarse al medio ambiente donde existen pocos nutrientes. Por lo tanto pocas especies que tienen dicha capacidad pueden estar involucradas en el fracaso endodóntico. Bacterias localizadas en espacios como deltas apicales, ramificaciones, istmos, túbulos dentinarios e irregularidades en algunas ocasiones pueden no ser afectadas por procedimientos de desinfección (**Siqueira et al. 1996**). Es probable que el aporte de nutrientes, a bacterias provenientes de las ramificaciones y deltas apicales, puedan permanecer inalterados aún con el tratamiento de conductos. Sin embargo, el aporte nutricional puede reducirse drásticamente. En dichas zonas anatómicas, las bacterias que quedan atrapadas en las obturaciones usualmente mueren o son imposibilitadas para acceder a los tejidos perirradiculares. Aún así, algunas especies probablemente sobreviven por períodos relativamente largos, debido a los residuos de los sustratos procesados en los tejidos y a las células muertas. Si el tratamiento de conductos falla en proveer un sellado adecuado, la filtración de fluidos



titulares puede proveer el substrato para el crecimiento bacteriano. Si estas bacterias alcanzan un número significativo y logran alcanzar la región periapical, éstas continuarán inflamando los tejidos periapicales. El hecho de que algunos estudios hayan reportado dientes con lesiones periapicales persistentes indican que los MO obtienen su nutrición de los tejidos periapicales **(Molander *et al.* 1998, Sjogren *et al.* 1997, Sundqvist *et al.* 1998)**.

La habilidad de las bacterias para sobrevivir en dichas condiciones es importante ya que cursan por largos períodos de abstinencia. Diversos sistemas regulatorios juegan un papel esencial en la habilidad de dichas bacterias para contrarrestar dichas condiciones. Estos sistemas están bajo el control de determinados genes, cuya transcripción es activada mediante condiciones de abstinencia. Por ejemplo, en el caso de falta de N₂, la activación del operón *Ntr* permite a las bacterias, que requieren amonio como una fuente de nitrógeno, metabolizar pequeñas cantidades de amonio. Cuando existen grandes cantidades de amonio, el operón del gen *Ntr* es reprimido. Por otro lado, algunas bacterias facultativas pueden activar otro tipo de sistema como el operón *Arc* (regulador de la respiración aeróbica), compuesto por el gen *arcA* y el gen *arcB*, en condiciones de bajas concentraciones de oxígeno molecular. Como consecuencia, las vías metabólicas son activadas en donde permiten la utilización de un electrón terminal alternativo para el metabolismo respiratorio, por lo que pueden cambiar su respiración de aeróbica a anaeróbica. Otro ejemplo es el operón *Crp*, en donde la baja concentración de glucosa, permite que algunas bacterias pueden activar el sistema catabólico represor, controlado por los genes *cya* (adenilciclase) y *crp* (proteína catabólica represora) que inducen la síntesis de enzimas para la utilización de varias fuentes de carbón orgánico. Cuando

disminuye la cantidad de fosfato debido a las bajas concentraciones de fosfato inorgánico, las células activan estos genes para la utilización de compuestos orgánicos de fosfato y para la búsqueda de fosfato inorgánico **(Siqueira Junior 2001)**.

Dependiendo de la disponibilidad de nutrientes dentro del sistema de conductos radiculares y la habilidad de sobrevivir en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes, los MO remanentes pueden morir o mantenerse viables. En dichos casos, la proliferación puede estar aumentada o disminuida.

El fracaso endodóntico atribuido a los MO remanentes ocurrirá únicamente si estos poseen suficientes mecanismos de patogenicidad o se encuentran en un número significativo y obtienen una vía directa al tejidos periapicales para inducir o mantener la lesión periapical.

Es bien sabido que los procedimientos de desinfección intraconducto o los antibióticos administrados sistémicamente no pueden afectar fácilmente a las bacterias localizadas afuera del foramen apical. La colocación de medicamentos en los tejidos periapicales para eliminar MO y destruir las biopelículas no es un procedimiento muy adecuado, ya que es prácticamente imposible diagnosticar clínicamente infecciones extrarradiculares y por otro lado la mayoría de los medicamentos endodónticos son citotóxicos y/o sus efectos pueden ser neutralizados después de extruírlos apicalmente. Se ha comprobado que se requiere una pérdida mínima del 30% de estructura ósea para ser observada radiográficamente. Es por esto que muchos pacientes no son diagnosticados adecuadamente en su porción periapical ya que son dependientes de la exposición

radiográfica, tiempos de revelado y una evaluación visual subjetiva por parte del clínico. El desarrollo de una estrategia no quirúrgica para combatir las biopelículas parece cuestionable. Por lo tanto, se pudiera sugerir que las infecciones extrarradiculares, deberían ser tratadas mediante cirugía periapical.

Se ha observado que el índice de éxito de los tratamientos de conductos disminuye considerablemente cuando existe cierta sobreobturación (**Sjogren et al. 1990**). Muchos de los materiales utilizados en los tratamientos de conductos son biocompatibles o muestran una ligera citotoxicidad antes de su colocación (**Araki et al. 1993**). Varios estudios han demostrado que la gutapercha utilizada para la obturación del sistema de conductos es bien tolerada por los tejidos. Se ha observado que el exceso de obturación no tiene impacto en el pronóstico a largo plazo de casos vitales (**Sjogren et al. 1990**). Además de los materiales que contienen paraformaldehído, la citotoxicidad del sellador se reduce significativamente o se elimina completamente después de su colocación. Por lo tanto, es poco probable que la mayoría de los materiales endodónticos contemporáneos sean capaces de mantener una inflamación periapical en ausencia de una infección endodóntica concomitante. Este hecho es reafirmado por el alto índice de éxito de los dientes sin lesión periapical aún en casos de sobreobturación (**Lin et al. 1992, Sjogren et al. 1997**). Inicialmente, los MO pueden estar ausentes o presentes en bajas cantidades en estos casos, sin embargo, la sobreobturación debe ser evitada ya que posibles complicaciones post operatorias como las agudizaciones o dolor (con/sin aumento de volumen en zona de ápice) posterior al tratamiento se pueden presentar, esto es por la gran cantidad de material (dentina, irrigantes, material de obturación, etc.) que se extruye


a través del foramen apical. Por lo tanto el fracaso asociado con dientes sobreobturados es usualmente causado por una infección concomitante intra y/o extrarradicular. En la mayoría de los casos, el sellado apical es inadecuado en estos dientes. La percolación de los fluidos tisulares ricos en glicoproteínas hacia el interior del conducto puede proveer substrato a los MO residuales, que pueden proliferar y alcanzar un número suficiente para inducir o perpetuar una lesión periapical. Otro fenómeno que es igualmente frecuente en la mayoría de los dientes sobreobturados, es la sobreinstrumentación que precede normalmente a la sobreobturación. En dientes con pulpas necróticas, la sobreobturación induce el desplazamiento de dentina infectada, bacterias o detritus hacia los tejidos periapicales. En esta situación, los MO son físicamente protegidos contra los mecanismos de defensa y por lo tanto pueden sobrevivir dentro de las lesiones y perpetuar la inflamación periapical. La presencia de dentina infectada o restos de cemento radicular en la lesión periapical han sido asociados con la falta de resolución de la lesión **(Siqueira Junior 2001)**.

Sólo uno de los factores discutidos anteriormente, la infección radicular, puede ser manejado a través del retratamiento endodóntico. Por otra parte, aunque el conocimiento de la causa del fracaso endodóntico facilitaría la elección de una terapia adecuada, este conocimiento no puede establecerse hasta después de un tratamiento quirúrgico. De cualquier manera asumiendo que la infección intrarradicular persistente es la causa de fracaso más común, vale la pena repetir el tratamiento de conductos antes de pensar en la cirugía periapical. Sin embargo, es esencial mantener las medidas para el control y la prevención de la infección, esto para maximizar el éxito del retratamiento de

conductos. Debiendo incluir en el nuevo tratamiento la estricta asepsia, la completa preparación quimiomecánica del sistema de conductos, utilizar un nuevo protocolo de irrigación, la medicación intraconducto, el adecuado sellado dentro del sistema de conductos y asegurar el sellado coronal. La restauración permanente debe ser colocada lo antes posible. El índice de éxito de los retratamientos para dientes con lesión periapical puede alcanzar casi el 2/3 de los casos (62-67%) pero aún dependiente de otros factores como son el nivel de obturación radiográfica dentro de los 2 mm apicales, del protocolo de tratamiento utilizado y del estado preoperatorio del diente (**Sjogren et al. 1997**). En cuanto al tamaño de la lesión periapical se observó en este estudio que no tienen ninguna influencia en cuanto al resultado del tratamiento. Por lo tanto, es recomendable repetir el tratamiento de conductos, particularmente cuando el tratamiento previo se percibe lejos de los estándares aceptados.

Se ha concluido en algunos estudios que el tamaño preoperatorio de la lesión periapical no tiene influencia en el resultado del tratamiento a largo plazo y no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la resolución de de lesiones mayores y menores a 5 mm. Se concluyó que eran dependientes del tiempo de observación en revisiones de control y podían resolverse hasta casi 10 años después (**Sjogren et al. 1990, Strindberg 1966**).

En el presente estudio, los análisis realizados mostraron altos niveles, así como, mayor prevalencia y proporción bacteriana en el grupo de fumadores que en el grupo de no fumadores, obteniendo diferencias significativas en las 3 comparaciones. Estos



resultados confirman los encontrados en estudios anteriores en donde ciertos MO mostraron una alta prevalencia en el grupo fumador en comparación al grupo no fumador **(Axelsson et al. 1998, Haffajee & Socransky 2001)**. 15 de 38 (39.47%) especies bacterianas mostraron diferencias significativas cuando se compararon individualmente. Las diferencias entre grupos con respecto a las cuentas bacterianas totales, no fueron estadísticamente significativas aunque en el grupo de fumadores tendieron a ser mayores **(figura 6)**. Ciertas especies (*A. naeslundii* sp. 1, *A. odontolyticus*, *E. corrodens*, *E. saburreum*, *P. acnes*, *S. gordonii* y *S. mitis*) se encontraron en el 100% de las muestras obtenidas del grupo de fumadores. Estudios previos han sugerido que las mayores diferencias entre grupos fumadores y no fumadores se encuentran en la prevalencia de algunas especies y no en sus niveles y proporciones **(Axelsson et al. 1998, Haffajee & Socransky 2001) (tabla 22)**.

En cuanto a la proporción promedio de especies individuales y de complejos bacterianos observamos nuevamente una alta proporción en el grupo fumador con algunas diferencias significativas. Las especies *S. mitis*, *P. acnes*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *S. noxia* y *N. mucosa* fueron las especies que mostraron diferencias significativas en los análisis de niveles, prevalencia y proporción en el grupo de fumadores. Estos resultados son similares a algunos estudios en los que se ha reportado que los MO pertenecientes al complejo rojo como *T. denticola* y *T. forsythia* presentan una alta prevalencia en el grupo de fumadores **(Haffajee & Socransky 2001, Schenkein et al. 1993, Umeda et al. 1998)**.



Diversos estudios han demostrado que existen variables genéticas y demográficas que pueden influenciar los factores de riesgo asociados a la enfermedad periodontal y por consiguiente determinar la composición de la flora bacteriana presente en la placa dentobacteriana (**Schenkein et al. 1993, Umeda et al. 1998**). Factores de riesgo externos tales como educación, dieta, nutrición, hábitos (fumadores) y lugar de residencia pueden ser predisponentes para la colonización oral de patógenos putativos.

Con respecto a los resultados obtenidos en cuestión del género de los pacientes, en donde observamos una mayor cantidad de cuentas bacterianas en el grupo masculino pero sin diferencias estadísticamente significativas (**figura 6**), podemos concluir que existe cierta predisposición por algunas especies bacterianas hacia uno u otro género en particular. Los resultados de prevalencia y proporción nos muestran una clara predisposición bacteriana sobre el grupo masculino (**tablas 18 y 19**). Es interesante notar que casi el 80% de las especies evaluadas tuvieron una prevalencia mayor en hombres que en mujeres. Sin embargo, sólo 5 especies (*F. nucleatum*, *S. artemidis*, *S. anginosus*, *S. constellatus* y *V. parvula*) presentaron diferencias estadísticamente significativas. *C. gingivalis* fue la especie más prevalente del género masculino encontrándose en el 100% de las muestras. Estudios anteriores han mostrado que las características demográficas son factores predisponentes para obtener una flora específica en ciertas circunstancias pero no han encontrado diferencias con respecto al género de los sujetos estudiados (**Schenkein et al. 1993, Umeda et al. 1998**). Otros estudios han mostrado que los grupos del género femenino cuando se comparan contra el género masculino presentan generalmente mejor estado periodontal con respecto al grupo masculino. Estos estudios

han sugerido que el género es un factor de riesgo para que ciertas especies bacterianas prevalezcan, principalmente las causantes de la enfermedad periodontal (**Brown *et al.* 1996, Christersson *et al.* 1992, Genco 1996**).




CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados del presente estudio sugieren que la microbiota de lesiones periapicales es dominada principalmente por especies Gram positivas, en particular del género *Streptococcus* y *Actinomyces*. Los patógenos clásicos como *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola* no fueron detectados en una cantidad y proporción suficientemente altas para sugerir un su participación en la enfermedad periapical. Se podría pensar que algunas especies Gram positivas consideradas como parte de la flora endógena de la cavidad oral pudieran jugar un papel patogénico en dichas infecciones. Los datos aquí presentados sugieren una complejidad de MO mayor a la anteriormente descrita en estudios de cultivo tradicionales.

En cuanto a la comparación de las muestras individuales tomadas de la superficie radicular y la zona más posterior de la lesión, en el presente estudio, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a prevalencia, niveles o proporción de las especies microbianas utilizadas. Lo anterior sugiere una distribución semejante de MO dentro de dichas lesiones. Por otro lado, los resultados de las comparaciones realizadas entre dientes anteriores y posteriores no muestran diferencias estadísticamente significativas con excepción de *S. artemidis*, en donde observamos que existe una clara predisposición de esta especie por los dientes posteriores.

La flora bacteriana observada en pacientes fumadores mostró diferencias con la flora observada en pacientes no fumadores, en donde observamos diferencias significativas en todos los análisis realizados para algunas especies en particular. El grupo



de pacientes fumadores presentó altos niveles, mayor prevalencia y proporción de la flora microbiana con respecto al grupo no fumador.

Con respecto a las comparaciones realizadas entre géneros, el género masculino parece presentar predisposición a la colonización de ciertas especies bacterianas consideradas como factores de riesgo para el desarrollo de ciertos tipos de infecciones bucales principalmente de origen periodontal. Se pudo observar que existió una clara predisposición bacteriana hacia el grupo masculino en donde ciertas especies prevalecieron y se colonizaron en altos niveles.

La detección de una cantidad mayor de bacterias con el método de hibridación DNA-DNA que con los métodos tradicionales de cultivo, indica que la microflora de dientes con fracaso endodóntico puede ser definida con amplitud utilizando los métodos moleculares actuales.






REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ando N, Hoshino E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentin. *Int Endod J* **1990**; 23(1): 20-27.
- Araki K, Suda H, Barbosa SV, Spangberg LS. Reduced cytotoxicity of a root canal sealer through eugenol substitution. *J Endod* **1993**; 19(11): 554-557.
- Axelsson P, Paulander J, Lindhe J. Relationship between smoking and dental status in 35-, 50-, 65-, and 75- year-old individuals. *J Clin Periodontol* **1998**; 25(4): 297-305.
- Baumgartner JC, Falkler WA, Jr. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod* **1991**; 17(8): 380-383.
- Bergenholtz G. Oral bacteria and periapical inflammation. *Tandlakartidningen* **1982**; 74(22): 1272-1275.
- Bergenholtz G, Lindhe J. Effect of experimentally induced marginal periodontitis and periodontal scaling on the dental pulp. *J Clin Periodontol* **1978**; 5(1): 59-73.
- Block RM, Bushell A, Rodrigues H, Langeland K. A histopathologic, histobacteriologic, and radiographic study of periapical endodontic surgical specimens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **1976**; 42(5): 656-678.
- Brown LJ, Brunelle JA, Kingman A. Periodontal status in the United States, 1988-1991: prevalence, extent, and demographic variation. *J Dent Res* **1996**; 75: 672-683.
- Colombo AP, Haffajee AD, Smith CM, Cugini MA, Socransky SS. Discrimination of refractory periodontitis subjects using clinical and laboratory parameters alone and in combination. *J Clin Periodontol* **1999**; 26(9): 569-576.
- Costerton JW. Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* **1995**; 15(3): 137-140.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **1995**; 49: 711-745.
- Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* **1994**; 176(8): 2137-2142.
- Cvek M. A clinical report on partial pulpotomy and capping with calcium hydroxide in permanent incisors with complicated crown fracture. *J Endod* **1978**; 4(8): 232-237.
-

- Chan S, Mohammed N, Dobeck JM, White RR, Socransky SS, Skobe Z. Evaluation of the whole genome DNA-DNA hybridization technique to identify bacteria in histological sections of periradicular lesions. *J Endod* **2004**; 30(7): 518-522.
- Cheung GS, Ho MW. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol* **2001**; 16(6): 332-337.
- Christersson LA, Grossi SG, Dunford RG, Machtei EE, Genco RJ. Dental plaque and calculus: risk indicators for their formation. *J Dent Res* **1992**; 71(7): 1425-1430.
- Dwyer TG, Torabinejad M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat. *J Endod* **1980**; 7(1): 31-35.
- Eftimiadi C, Stashenko P, Tonetti M, *et al.* Divergent effect of the anaerobic bacteria by-product butyric acid on the immune response: suppression of T-lymphocyte proliferation and stimulation of interleukin-1 beta production. *Oral Microbiol Immunol* **1991**; 6(1): 17-23.
- Engler-Blum G, Meier M, Frank J, Muller GA. Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. *Anal Biochem* **1993**; 210(2): 235-244.
- Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Moller AJ. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scand J Dent Res* **1982**; 90(2): 134-144.
- Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **1983**; 132(1): 6-13.
- Figdor D, Sjogren U, Sorlin S, Sundqvist G, Nair PN. Pathogenicity of *Actinomyces israelii* and *Arachnia propionica*: experimental infection in guinea pigs and phagocytosis and intracellular killing by human polymorphonuclear leukocytes *in vitro*. *Oral Microbiol Immunol* **1992**; 7(3): 129-136.
- Gatti JJ, Dobeck JM, Smith C, White RR, Socransky SS, Skobe Z. Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA-DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol* **2000**; 16(5): 197-204.
-

- Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol* **1996**; 67: 1041-1049.
- Grossman LI. Bacteriologic status of periapical tissue in 150 cases of infected pulpless teeth. *J Dent Res* **1959**; 38: 101-104.
- Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, *et al.* Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* **1998**; 25(5): 346-353.
- Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol* **2001**; 28(5): 377-388.
- Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **1991**; 71(4): 492-495.
- Hoshino E. Bacterial invasion of non-exposed dental pulp. *Int Endodont J* **1992**; 25(1): 2-50.
- Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **1965**; 20: 340-349.
- Kantz WE, Henry CA. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non-vital teeth in man. *Arch Oral Biol* **1974**; 19(1): 91-96.
- Kinder SA, Holt SC. Characterization of coaggregation between *Bacteroides gingivalis* T22 and *Fusobacterium nucleatum* T18. *Infect Immun* **1989**; 57(11): 3425-3433.
- Korzen BH, Krakow AA, Green DB. Pulpal and periapical tissue responses in conventional and monoinfected gnotobiotic rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **1974**; 37(5): 783-802.
- Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, *et al.* Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. *Oral Microbiol Immunol* **2001**; 16(2): 100-105.
- Langeland K, Block RM, Grossman LI. A histopathologic and histobacteriologic study of 35 periapical endodontic surgical specimens. *J Endod* **1977**; 3(1): 8-23.
-


- Leavitt JM, Naidor IJ, Shugaevsky P. The bacterial flora of root canals as disclosed by a culture medium for endodontics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **1958**; 11: 302-308.
- Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gangler P, Langeland K. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **1991**; 71(5): 603-611.
- Lin LM, Skribner JE, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. *J Endod* **1992**; 18(12): 625-627.
- Mejare I, Mejare B, Edwardsson S. Effect of a tight seal on survival of bacteria in saliva-contaminated cavities filled with composite resin. *Endod Dent Traumatol* **1987**; 3(1): 6-9.
- Miller WD. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. *Dental Cosmos* **1894**; 36: 505-528.
- Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* **1998**; 31(1): 1-7.
- Möller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* **1981**; 89(6): 475-484.
- Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth *Odontol Tidskr* 1966;74(5): 1-380.
- Mombelli A, Minder CE, Gusberti FA, Lang NP. Reproducibility of microscopic and cultural data in repeated subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* **1989**; 16(7): 434-442.
- Moraes SR, Siqueira JF, Jr., Colombo AP, Rjcas I, de S, Domingues R. Comparison of the effectiveness of bacterial culture, 16S rDNA directed polymerase chain reaction, and checkerboard DNA-DNA hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic infections. *J Endod* **2002**; 28(2): 86-89.
-
- 

- Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res* **2002**; 81(11): 761-766.
- Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* **1990**; 16(12): 580-588.
- Papapanou PN, Madianos PN, Dahlen G, Sandros J. "Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. *Eur J Oral Sci* **1997**; 105(5): 389-396.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, *et al.* Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* **2001**; 183(12): 3770-3783.
- Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. *Int Endod J* **2002**; 35(8): 698-702.
- Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* **2003**; 36: 1-11.
- Ramachandran Nair PN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* **1987**; 13(1): 29-39.
- Ramachandran Nair PN, Schroeder HE. Periapical actinomycosis. *J Endod* **1984**; 10(12): 567-570.
- Sakellariou PL. Periapical actinomycosis: report of a case and review of the literature. *Endod Dent Traumatol* **1996**; 12(3): 151-154.
- Saunders WP, Saunders EM. Influence of smear layer on the coronal leakage of Thermafil and laterally condensed gutta-percha root fillings with a glass ionomer sealer. *J Endod* **1994**; 20(4): 155-158.
- Schenkein HA, Burmeister JA, Koertge TE, *et al.* The influence of race and gender on periodontal microflora. *J Periodontol* **1993**; 64(4): 292-296.
-

- Shindell E. A study of some periapical roentgenolucencies and their significance. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **1961**; 14: 1057-1065.
- Shovelton DS, Sidaway DA. Infection in root canals. *Br Dent J* **1960**; 108: 115-118.
- Simonson LG, McMahon KT, Childers DW, Morton HE. Bacterial synergy of *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* in a multinational population. *Oral Microbiol Immunol* **1992**; 7(2): 111-112.
- Siqueira JF, Jr., Araujo MC, Garcia PF, Fraga RC, Dantas CJ. Histological evaluation of the effectiveness of five instrumentation techniques for cleaning the apical third of root canals. *J Endod* **1997**; 23(8): 499-502.
- Siqueira JF, Jr., De Uzeda M, Fonseca ME. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod* **1996**; 22(6): 308-310.
- Siqueira JF, Jr., Rjcas IN, Oliveira JC, Santos KR. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA-directed polymerase chain reaction. *J Endod* **2001a**; 27(3): 164-167.
- Siqueira JF, Jr., Rjcas IN, Oliveira JC, Santos KR. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod* **2001b**; 27(9): 563-566.
- Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Lopes HP, de Uzeda M. Coronal leakage of two root canal sealers containing calcium hydroxide after exposure to human saliva. *J Endod* **1999**; 25(1): 14-16.
- Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **2001c**; 92(4): 451-457.
- Siqueira JF, Rocas IN, De Uzeda M, Colombo AP, Santos KR. Comparison of 16S rDNA-based PCR and checkerboard DNA-DNA hybridisation for detection of selected endodontic pathogens. *J Med Microbiol* **2002**; 51(12): 1090-1096.
- Siqueira Junior JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* **2001**; 34(1): 1-10.
-

- Siqueira Junior JF, de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod* **1996**; 22(12): 674-676.
- Siqueira Junior JF, de Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endod* **1997**; 23(3): 167-169.
- Siqueira Junior JF, Lima KC, Magalhaes FA, Lopes HP, de Uzeda M. Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *J Endod* **1999**; 25(5): 332-335.
- Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* **1997**; 30(5): 297-306.
- Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* **1990**; 16(10): 498-504.
- Sjogren U, Happonen RP, Kahnberg KE, Sundqvist G. Survival of *Arachnia propionica* in periapical tissue. *Int Endod J* **1988**; 21(4): 277-282.
- Smith GL, Socransky SS, Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* **1989**; 4(1): 47-51.
- Socransky SS, Gibbons RJ. Required role of *Bacteroides melaninogenicus* in mixed anaerobic infections. *J Infect Dis* **1965**; 115: 247-253.
- Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* **2005**; 38: 135-187.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* **1998**; 25(2): 134-144.
- Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* **1994**; 17(4): 788-792.
- Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod* **1992**; 18(9): 422-426.
-

- Strindberg LZ. Effect of an antibacterial dressing in conservative root canal treatment. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* **1966**; 76(2): 151-165.
- Sunde PT, Tronstad L, Eribe ER, Lind PO, Olsen I. Assessment of periradicular microbiota by DNA-DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol* **2000**; 16(5): 191-196.
- Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* **1992a**; 7(5): 257-262.
- Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* **1992b**; 18(9): 427-430.
- Sundqvist G, Carlsson J, Herrmann B, Tarnvik A. Degradation of human immunoglobulins G and M and complement factors C3 and C5 by black-pigmented *Bacteroides*. *J Med Microbiol* **1985**; 19(1): 85-94.
- Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **1998**; 85(1): 86-93.
- Sundqvist G, Reuterving CO. Isolation of *Actinomyces israelii* from periapical lesion. *J Endod* **1980**; 6(6): 602-606.
- Sundqvist GK, Carlsson J, Herrmann BF, Hofling JF, Vaatainen A. Degradation *in vivo* of the C3 protein of guinea-pig complement by a pathogenic strain of *Bacteroides gingivalis*. *Scand J Dent Res* **1984**; 92(1): 14-24.
- Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endod Dent Traumatol* **1990a**; 6(2): 73-77.
- Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J. Extraradicular endodontic infections. *Endod Dent Traumatol* **1987**; 3(2): 86-90.
- Tronstad L, Kreshtool D, Barnett F. Microbiological monitoring and results of treatment of extraradicular endodontic infection. *Endod Dent Traumatol* **1990b**; 6(3): 129-136.
- Umeda M, Chen C, Bakker I, Contreras A, Morrison JL, Slots J. Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *J Periodontol* **1998**; 69(10): 1111-1118.
- Van Hassel HJ. Physiology of the human dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **1971**; 32(1): 126-134.
-

- Vigil GV, Wayman BE, Dazey SE, Fowler CB, Bradley DV, Jr. Identification and antibiotic sensitivity of bacteria isolated from periapical lesions. *J Endod* **1997**; 23(2): 110-114.
- Weber DF. Human dentine sclerosis: a microradiographic survey. *Arch Oral Biol* **1974**; 19(2): 163-169.
- Winkler KC, van Amerongen J. Bacteriologic results from 4000 root canal cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **1959**; 12: 857-875.
- Wittgow WC, Jr., Sabiston CB, Jr. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. *J Endod* **1975**; 1(5): 168-171.
- Wong R, Hirsch RS, Clarke NG. Endodontic effects of root planing in humans. *Endod Dent Traumatol* **1989**; 5(4): 193-196.
- Ximenez-Fyvie LA, Almaguer-Flores A, Jacobo-Soto V, Lara-Cordoba M, Sanchez-Vargas LO, Alcantara-Maruri E. Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health. *J Periodontol* **2006**; 77(3): 460-471.
- Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* **2000**; 27(9): 648-657.
-
- 

TABLAS

TABLA 1. Características de la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA.

Aplicación	Ventajas	Desventajas
Identificación y cuantificación de microorganismos específicos	Tiempo Costo Manejo sencillo de muestras No limitado a especies cultivables Alto número de muestras y especies analizadas Cuantificación	No es posible realizar pruebas de susceptibilidad

Tabla 2. Clasificación de especies representativas de los géneros *Porphyromonas* y *Prevotella*.

<i>Porphyromonas</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Prevotella</i>
Pigmentación negra Asacarolíticas	Pigmentación negra Sacarolíticas	No pigmentadas Sacarolíticas
<i>P. asaccharolytica</i>	<i>P. melaninogenica</i>	<i>P. buccae</i> *
<i>P. cantoniae</i>	<i>P. denticola</i>	<i>P. bivia</i>
<i>P. endodontalis</i> *	<i>P. loescheii</i> †	<i>P. oralis</i>
<i>P. gingivalis</i> *	<i>P. intermedia</i> *	<i>P. oris</i>
<i>P. uenonis</i>	<i>P. nigrescens</i> *	<i>P. oulorum</i>

*Asociadas con signos y síntomas clínicos. †Usualmente de pigmentación negra.

Tabla 3. Descripción general de casos y muestras.

Resumen de casos y muestras			
	Media	EEM	Rango
Edad (años)	38.74	± 2.16	22 - 62
Género (% mujeres)	55.56		
Fumadores actuales (%)	22.22		
<i>n</i> =			
Sujetos	27		
Muestras	54		
Muestras de ápice	27		
Muestras de lesión periapical	27		
Muestras de dientes anteriores	28		
Muestras de dientes posteriores	26		

EEM: error estándar de la media.

Tabla 4. Cepas de referencia utilizadas para la preparación de sondas de DNA.

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

Cepas de referencia del American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA). En la columna del lado derecho se indica el complejo bacteriano en el que se agrupó a cada especie para algunos de los análisis de datos. La agrupación siguió las descripciones de complejos bacterianos en la placa subgingival (**Socransky & Haffajee 2005, Socransky et al. 1998**). Con las siguientes excepciones: *A. georgiae*, *A. israelii*, *A. naeslundii* stp 1 y *A. viscosus* fueron agrupados en el complejo azul; *C. matruchotii*, *E. saburreum*, *E. sulci*, *L. buccalis*, *N. mucosa*, *P. endodontalis*, *P. acnes* y *S. artemidis* fueron agrupados como "Otros". *El DNA de los serotipos a (43717) y b (43718) fue combinado para generar una sonda de DNA individual. †El DNA de las subespecies nucleatum (25586), polymorphum (10953) y vincentii (49256) fue combinado para generar una sonda de DNA individual. **stp.**: serotipo. **ID**: número de referencia.

Tabla 5. Niveles promedio (cuentas bacterianas x 10⁵ ± EEM) de 38 especies bacterianas en 54 muestras de lesiones periapicales.

Niveles promedio			
	Media	EEM	Rango
Cuentas totales	136.18 ± 35.37		0.10 - 655.04
<i>A. georgiae</i>	1.06 ± 0.52		0 - 10.00
<i>A. israelii</i>	12.50 ± 5.49		0 - 100
<i>A. naeslundii</i> 1	17.33 ± 6.30		0 - 100
<i>A. odontolyticus</i>	11.22 ± 5.67		0 - 100
<i>A. viscosus</i>	2.43 ± 0.74		0 - 10.00
<i>A. a.</i>	0.14 ± 0.08		0 - 2.08
<i>C. gracilis</i>	0 ± 0		0 - 0
<i>C. rectus</i>	0.65 ± 0.27		0 - 6.58
<i>C. showae</i>	0.78 ± 0.28		0 - 3.16
<i>C. gingivalis</i>	10.33 ± 7.59		0.05 - 55.00
<i>C. ochracea</i>	0.19 ± 0.19		0 - 5.00
<i>C. sputigena</i>	0.49 ± 0.26		0 - 3.16
<i>C. matruchotii</i>	13.87 ± 6.02		0 - 100
<i>E. corrodens</i>	1.51 ± 0.72		0 - 10.00
<i>E. saburreum</i>	5.58 ± 3.87		0 - 55.00
<i>E. sulci</i>	18.69 ± 7.13		0 - 100
<i>F. nucleatum</i>	2.53 ± 1.86		0 - 50.00
<i>F. periodonticum</i>	6.00 ± 3.88		0 - 55.00
<i>L. buccalis</i>	2.82 ± 1.02		0 - 10.00
<i>N. mucosa</i>	0.23 ± 0.12		0 - 2.08
<i>P. micra</i>	7.85 ± 4.25		0 - 100
<i>P. endodontalis</i>	0.72 ± 0.26		0 - 3.16
<i>P. gingivalis</i>	0.47 ± 0.23		0 - 3.16
<i>P. intermedia</i>	3.10 ± 1.92		0 - 51.58
<i>P. nigrescens</i>	0.20 ± 0.11		0 - 2.08
<i>P. acnes</i>	3.55 ± 2.60		0 - 55.00
<i>S. artemidis</i>	0.55 ± 0.37		0 - 10.00
<i>S. noxia</i>	0.18 ± 0.10		0 - 2.08
<i>S. anginosus</i>	1.28 ± 0.55		0 - 10.00
<i>S. constellatus</i>	1.39 ± 0.43		0 - 10.00
<i>S. gordonii</i>	2.30 ± 0.86		0 - 10.00
<i>S. intermedius</i>	2.23 ± 0.65		0 - 10.00
<i>S. mitis</i>	10.63 ± 5.61		0 - 100
<i>S. oralis</i>	3.47 ± 2.05		0 - 55.00
<i>S. sanguinis</i>	14.99 ± 6.24		0 - 100
<i>T. forsythia</i>	0.91 ± 0.49		0 - 10.00
<i>T. denticola</i>	0.88 ± 0.49		0 - 10.00
<i>V. parvula</i>	3.34 ± 2.04		0 - 55.00

EEM: error estándar de la media. **A. a.:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabla 6. Prevalencia promedio (% muestras colonizadas \pm EEM) de 38 especies bacterianas en 54 muestras de lesiones periapicales.

Prevalencia promedio			
	Media	EEM	Rango
<i>A. georgiae</i>	0.31 \pm 0.08		0 - 1.00
<i>A. israelii</i>	0.57 \pm 0.09		0 - 1.00
<i>A. naeslundii</i> 1	0.74 \pm 0.07		0 - 1.00
<i>A. odontolyticus</i>	0.69 \pm 0.09		0 - 1.00
<i>A. viscosus</i>	0.50 \pm 0.09		0 - 1.00
<i>A. a.</i>	0.20 \pm 0.07		0 - 1.00
<i>C. gracilis</i>	0 \pm 0		0 - 0
<i>C. rectus</i>	0.44 \pm 0.09		0 - 1.00
<i>C. showae</i>	0.40 \pm 0.10		0 - 1.00
<i>C. gingivalis</i>	0.79 \pm 0.10		0.50 - 1.00
<i>C. ochracea</i>	0.07 \pm 0.04		0 - 1.00
<i>C. sputigena</i>	0.32 \pm 0.11		0 - 1.00
<i>C. matruchotii</i>	0.76 \pm 0.08		0 - 1.00
<i>E. corrodens</i>	0.61 \pm 0.11		0 - 1.00
<i>E. saburreum</i>	0.61 \pm 0.12		0 - 1.00
<i>E. sulci</i>	0.74 \pm 0.07		0 - 1.00
<i>F. nucleatum</i>	0.35 \pm 0.08		0 - 1.00
<i>F. periodonticum</i>	0.68 \pm 0.08		0 - 1.00
<i>L. buccalis</i>	0.69 \pm 0.11		0 - 1.00
<i>N. mucosa</i>	0.17 \pm 0.06		0 - 1.00
<i>P. micra</i>	0.58 \pm 0.09		0 - 1.00
<i>P. endodontalis</i>	0.57 \pm 0.12		0 - 1.00
<i>P. gingivalis</i>	0.54 \pm 0.12		0 - 1.00
<i>P. intermedia</i>	0.35 \pm 0.08		0 - 1.00
<i>P. nigrescens</i>	0.24 \pm 0.09		0 - 1.00
<i>P. acnes</i>	0.31 \pm 0.09		0 - 1.00
<i>S. artemidis</i>	0.26 \pm 0.07		0 - 1.00
<i>S. noxia</i>	0.17 \pm 0.07		0 - 1.00
<i>S. anginosus</i>	0.41 \pm 0.09		0 - 1.00
<i>S. constellatus</i>	0.61 \pm 0.09		0 - 1.00
<i>S. gordonii</i>	0.61 \pm 0.11		0 - 1.00
<i>S. intermedius</i>	0.67 \pm 0.09		0 - 1.00
<i>S. mitis</i>	0.45 \pm 0.10		0 - 1.00
<i>S. oralis</i>	0.59 \pm 0.08		0 - 1.00
<i>S. sanguinis</i>	0.63 \pm 0.08		0 - 1.00
<i>T. forsythia</i>	0.33 \pm 0.09		0 - 1.00
<i>T. denticola</i>	0.29 \pm 0.08		0 - 1.00
<i>V. parvula</i>	0.52 \pm 0.10		0 - 1.00

EEM: error estándar de la media. **A. a.:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabla 7. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales \pm EEM) de 38 especies bacterianas en 54 muestras de lesiones periapicales.

Proporción promedio			
	Media	EEM	Rango
<i>A. georgiae</i>	0.78 \pm 0.35		0 - 8.07
<i>A. israelii</i>	3.74 \pm 1.39		0 - 25.93
<i>A. naeslundii</i> 1	14.03 \pm 3.56		0 - 63.46
<i>A. odontolyticus</i>	4.57 \pm 1.83		0 - 32.14
<i>A. viscosus</i>	1.17 \pm 0.28		0 - 4.05
<i>A. a.</i>	0.08 \pm 0.04		0 - 0.86
<i>C. gracilis</i>	0 \pm 0		0 - 0
<i>C. rectus</i>	1.60 \pm 1.21		0 - 32.94
<i>C. showae</i>	0.68 \pm 0.28		0 - 5.52
<i>C. gingivalis</i>	2.81 \pm 1.85		0.04 - 13.71
<i>C. ochracea</i>	0.04 \pm 0.04		0 - 1.07
<i>C. sputigena</i>	0.36 \pm 0.26		0 - 3.57
<i>C. matruchotii</i>	9.10 \pm 2.38		0 - 46.31
<i>E. corrodens</i>	1.83 \pm 0.62		0 - 6.76
<i>E. saburreum</i>	5.91 \pm 3.59		0 - 51.25
<i>E. sulci</i>	10.26 \pm 2.91		0 - 44.39
<i>F. nucleatum</i>	0.86 \pm 0.44		0 - 10.70
<i>F. periodonticum</i>	3.89 \pm 1.09		0 - 14.68
<i>L. buccalis</i>	8.66 \pm 3.39		0 - 45.45
<i>N. mucosa</i>	0.06 \pm 0.02		0 - 0.35
<i>P. micra</i>	6.13 \pm 2.12		0 - 43.36
<i>P. endodontalis</i>	0.66 \pm 0.32		0 - 4.49
<i>P. gingivalis</i>	0.42 \pm 0.19		0 - 2.55
<i>P. intermedia</i>	2.72 \pm 1.18		0 - 23.81
<i>P. nigrescens</i>	0.06 \pm 0.03		0 - 0.62
<i>P. acnes</i>	1.41 \pm 0.73		0 - 14.51
<i>S. artemidis</i>	0.43 \pm 0.20		0 - 4.05
<i>S. noxia</i>	0.08 \pm 0.04		0 - 0.66
<i>S. anginosus</i>	0.86 \pm 0.49		0 - 12.66
<i>S. constellatus</i>	4.63 \pm 1.58		0 - 26.40
<i>S. gordonii</i>	1.63 \pm 0.78		0 - 11.30
<i>S. intermedius</i>	13.24 \pm 4.76		0 - 100
<i>S. mitis</i>	4.97 \pm 2.17		0 - 32.91
<i>S. oralis</i>	1.97 \pm 0.55		0 - 8.98
<i>S. sanguinis</i>	6.25 \pm 1.59		0 - 34.24
<i>T. forsythia</i>	0.63 \pm 0.34		0 - 6.76
<i>T. denticola</i>	0.31 \pm 0.16		0 - 3.42
<i>V. parvula</i>	2.85 \pm 1.21		0 - 26.40

EEM: error estándar de la media. **A. a.:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabla 8. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales \pm EEM) de complejos bacterianos en 54 muestras de lesiones periapicales.

Complejos bacterianos			
	Media	EEM	Rango
<i>Actinomyces</i> sp.	19.16 \pm 4.12		0 - 84.44
Complejo amarillo	27.03 \pm 4.57		0 - 100
Complejo morado	6.40 \pm 1.87		0 - 32.14
Complejo verde	1.90 \pm 0.64		0 - 13.71
Complejo naranja	18.30 \pm 2.36		0 - 43.36
Complejo rojo	0.95 \pm 0.36		0 - 8.24
No-agrupados	0.13 \pm 0.05		0 - 0.86
Otros:	26.11 \pm 3.58		0 - 69.64
<i>C. matruchotii</i>	9.10 \pm 2.38		0 - 46.31
<i>E. saburreum</i>	5.91 \pm 3.59		0 - 51.25
<i>E. sulci</i>	10.26 \pm 2.91		0 - 44.39
<i>L. buccalis</i>	8.66 \pm 3.39		0 - 45.45
<i>N. mucosa</i>	0.06 \pm 0.02		0 - 0.35
<i>P. endodontalis</i>	0.66 \pm 0.32		0 - 4.49
<i>P. acnes</i>	1.41 \pm 0.73		0 - 14.51
<i>S. artemidis</i>	0.43 \pm 0.20		0 - 4.05

EEM: error estándar de la media.

Tabla 9. Niveles promedio (cuentas bacterianas x 10⁵ ± EEM) de especies individuales en muestras tomadas del ápice y de la lesión periapical.

Niveles promedio	Apice		Lesión		M-W (p=)
	Media	EEM	Media	EEM	
Cuentas totales	164.89 ± 41.28		107.47 ± 33.61		0.2992
<i>A. georgiae</i>	1.06 ± 0.52		1.05 ± 0.52		0.5076
<i>A. israelii</i>	18.77 ± 7.97		6.23 ± 4.31		0.7465
<i>A. naeslundii</i> 1	20.83 ± 7.43		13.84 ± 6.02		0.4029
<i>A. odontolyticus</i>	15.76 ± 7.72		6.69 ± 4.73		0.3028
<i>A. viscosus</i>	2.62 ± 0.79		2.23 ± 0.74		0.3664
<i>A. a.</i>	0.17 ± 0.12		0.12 ± 0.06		0.7865
<i>C. gracilis</i>	0 ± 0		0 ± 0		1.0000
<i>C. rectus</i>	0.85 ± 0.39		0.46 ± 0.17		0.2095
<i>C. showae</i>	0.86 ± 0.30		0.71 ± 0.27		0.7215
<i>C. gingivalis</i>	17.30 ± 13.89		3.35 ± 1.77		0.7929
<i>C. ochracea</i>	0.37 ± 0.37		0.01 ± 0.01		0.9696
<i>C. sputigena</i>	0.45 ± 0.24		0.53 ± 0.31		0.7812
<i>C. matruchotii</i>	13.88 ± 6.02		13.85 ± 6.02		0.8671
<i>E. corrodens</i>	1.54 ± 0.71		1.48 ± 0.74		0.4438
<i>E. saburreum</i>	2.33 ± 0.93		8.84 ± 7.05		0.9618
<i>E. sulci</i>	25.53 ± 9.32		11.85 ± 6.44		0.2613
<i>F. nucleatum</i>	4.36 ± 3.70		0.70 ± 0.39		0.8867
<i>F. periodonticum</i>	9.24 ± 7.04		2.76 ± 1.09		0.9812
<i>L. buccalis</i>	2.00 ± 0.84		3.02 ± 1.14		0.9331
<i>N. mucosa</i>	0.25 ± 0.16		0.20 ± 0.16		0.6839
<i>P. micra</i>	9.41 ± 5.27		6.29 ± 3.82		0.8707
<i>P. endodontalis</i>	0.91 ± 0.34		0.53 ± 0.24		0.6803
<i>P. gingivalis</i>	0.48 ± 0.23		0.45 ± 0.24		0.4613
<i>P. intermedia</i>	4.85 ± 3.68		1.34 ± 0.61		0.3766
<i>P. nigrescens</i>	0.26 ± 0.16		0.15 ± 0.08		0.5104
<i>P. acnes</i>	5.64 ± 4.74		1.45 ± 0.67		0.8415
<i>S. artemidis</i>	0.49 ± 0.37		0.61 ± 0.38		0.5436
<i>S. noxia</i>	0.16 ± 0.15		0.20 ± 0.09		0.2292
<i>S. anginosus</i>	1.18 ± 0.53		1.38 ± 0.61		0.7477
<i>S. constellatus</i>	1.57 ± 0.53		1.16 ± 0.41		0.8235
<i>S. gordonii</i>	2.26 ± 0.94		2.35 ± 0.95		0.8856
<i>S. intermedius</i>	2.15 ± 0.67		2.31 ± 0.67		0.8727
<i>S. mitis</i>	10.60 ± 6.51		10.65 ± 6.50		0.8902
<i>S. oralis</i>	1.80 ± 0.61		5.14 ± 3.68		0.9210
<i>S. sanguinis</i>	16.59 ± 6.85		13.40 ± 6.05		0.7011
<i>T. forsythia</i>	1.03 ± 0.51		0.79 ± 0.50		0.4800
<i>T. denticola</i>	0.99 ± 0.51		0.77 ± 0.49		0.5275
<i>V. parvula</i>	5.33 ± 3.69		1.35 ± 0.53		0.6846

Las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas para ninguna de las especies evaluadas (prueba U de Mann-Whitney, **M-W**). **EEM**: error estándar de la media. **A. a.**: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabla 10. Prevalencia promedio (% muestras colonizadas \pm EEM) de especies individuales en muestras tomadas del ápice y de la lesión periapical.

Prevalencia promedio	Apice		Lesión		M-W (p =)
	Media	EEM	Media	EEM	
<i>A. georgiae</i>	0.37 \pm 0.09		0.26 \pm 0.09		0.3838
<i>A. israelii</i>	0.57 \pm 0.11		0.57 \pm 0.11		1.0000
<i>A. naeslundii</i> 1	0.81 \pm 0.08		0.67 \pm 0.09		0.2185
<i>A. odontolyticus</i>	0.81 \pm 0.09		0.57 \pm 0.11		0.0992
<i>A. viscosus</i>	0.59 \pm 0.10		0.41 \pm 0.10		0.1776
<i>A. a.</i>	0.22 \pm 0.08		0.19 \pm 0.08		0.7378
<i>C. gracilis</i>	0 \pm 0		0 \pm 0		1.0000
<i>C. rectus</i>	0.56 \pm 0.10		0.33 \pm 0.09		0.1035
<i>C. showae</i>	0.43 \pm 0.11		0.38 \pm 0.11		0.7561
<i>C. gingivalis</i>	0.71 \pm 0.18		0.86 \pm 0.14		0.5302
<i>C. ochracea</i>	0.07 \pm 0.05		0.07 \pm 0.05		1.0000
<i>C. sputigena</i>	0.36 \pm 0.13		0.29 \pm 0.13		0.6911
<i>C. matruchotii</i>	0.78 \pm 0.08		0.74 \pm 0.09		0.7525
<i>E. corrodens</i>	0.71 \pm 0.13		0.50 \pm 0.14		0.2543
<i>E. saburreum</i>	0.64 \pm 0.13		0.57 \pm 0.14		0.7040
<i>E. sulci</i>	0.81 \pm 0.09		0.67 \pm 0.11		0.2982
<i>F. nucleatum</i>	0.33 \pm 0.09		0.37 \pm 0.09		0.7777
<i>F. periodonticum</i>	0.64 \pm 0.13		0.71 \pm 0.13		0.6911
<i>L. buccalis</i>	0.75 \pm 0.13		0.62 \pm 0.14		0.4800
<i>N. mucosa</i>	0.19 \pm 0.09		0.14 \pm 0.08		0.6825
<i>P. micra</i>	0.62 \pm 0.10		0.54 \pm 0.10		0.5782
<i>P. endodontalis</i>	0.57 \pm 0.14		0.57 \pm 0.14		1.0000
<i>P. gingivalis</i>	0.64 \pm 0.13		0.43 \pm 0.14		0.2643
<i>P. intermedia</i>	0.41 \pm 0.10		0.30 \pm 0.09		0.3970
<i>P. nigrescens</i>	0.29 \pm 0.10		0.19 \pm 0.09		0.4741
<i>P. acnes</i>	0.33 \pm 0.11		0.29 \pm 0.10		0.7416
<i>S. artemidis</i>	0.22 \pm 0.08		0.30 \pm 0.09		0.5384
<i>S. noxia</i>	0.10 \pm 0.07		0.24 \pm 0.10		0.2197
<i>S. anginosus</i>	0.44 \pm 0.10		0.37 \pm 0.09		0.5832
<i>S. constellatus</i>	0.58 \pm 0.10		0.63 \pm 0.09		0.6977
<i>S. gordonii</i>	0.64 \pm 0.13		0.57 \pm 0.14		0.7040
<i>S. intermedius</i>	0.67 \pm 0.09		0.67 \pm 0.09		1.0000
<i>S. mitis</i>	0.48 \pm 0.11		0.43 \pm 0.11		0.7594
<i>S. oralis</i>	0.63 \pm 0.09		0.56 \pm 0.10		0.5832
<i>S. sanguinis</i>	0.67 \pm 0.09		0.59 \pm 0.10		0.5766
<i>T. forsythia</i>	0.38 \pm 0.11		0.29 \pm 0.10		0.5178
<i>T. denticola</i>	0.33 \pm 0.11		0.24 \pm 0.10		0.4997
<i>V. parvula</i>	0.52 \pm 0.10		0.52 \pm 0.10		1.0000

Las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas para ninguna de las especies evaluadas (prueba U de Mann-Whitney, **M-W**). **EEM**: error estándar de la media. **A. a.**: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabla 11. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales \pm EEM) de especies individuales en muestras tomadas del ápice y de la lesión periapical.

Proporción promedio	Apice		Lesión		M-W ($p =$)
	Media	EEM	Media	EEM	
<i>A. georgiae</i>	0.93 \pm 0.47		0.63 \pm 0.31		0.4309
<i>A. israelii</i>	5.03 \pm 2.24		2.44 \pm 0.77		0.9726
<i>A. naeslundii</i> 1	13.79 \pm 3.58		14.27 \pm 4.08		0.5706
<i>A. odontolyticus</i>	5.75 \pm 2.32		3.38 \pm 1.70		0.3131
<i>A. viscosus</i>	1.25 \pm 0.30		1.09 \pm 0.34		0.3047
<i>A. a.</i>	0.07 \pm 0.03		0.08 \pm 0.05		0.7774
<i>C. gracilis</i>	0 \pm 0		0 \pm 0		1.0000
<i>C. rectus</i>	2.15 \pm 1.61		1.06 \pm 0.83		0.1460
<i>C. showae</i>	0.64 \pm 0.28		0.72 \pm 0.48		0.7023
<i>C. gingivalis</i>	4.05 \pm 2.93		1.56 \pm 0.80		0.8473
<i>C. ochracea</i>	0.08 \pm 0.08		0.00 \pm 0.00		0.9696
<i>C. sputigena</i>	0.32 \pm 0.21		0.40 \pm 0.30		0.6577
<i>C. matruchotii</i>	6.43 \pm 1.73		11.77 \pm 3.38		0.5305
<i>E. corrodens</i>	2.81 \pm 1.00		0.84 \pm 0.38		0.1418
<i>E. saburreum</i>	4.98 \pm 2.95		6.83 \pm 4.44		1.0000
<i>E. sulci</i>	15.05 \pm 5.52		5.47 \pm 1.71		0.2279
<i>F. nucleatum</i>	1.11 \pm 0.80		0.61 \pm 0.31		0.8632
<i>F. periodonticum</i>	3.79 \pm 1.87		4.00 \pm 1.27		0.4834
<i>L. buccalis</i>	6.34 \pm 3.11		11.00 \pm 6.86		0.9339
<i>N. mucosa</i>	0.07 \pm 0.03		0.05 \pm 0.03		0.6841
<i>P. micra</i>	6.80 \pm 2.68		5.46 \pm 1.98		0.7899
<i>P. endodontalis</i>	0.89 \pm 0.63		0.43 \pm 0.23		0.7740
<i>P. gingivalis</i>	0.50 \pm 0.26		0.35 \pm 0.18		0.3092
<i>P. intermedia</i>	2.81 \pm 1.32		2.64 \pm 1.79		0.4231
<i>P. nigrescens</i>	0.07 \pm 0.03		0.06 \pm 0.04		0.5222
<i>P. acnes</i>	2.00 \pm 1.28		0.82 \pm 0.39		0.7240
<i>S. artemidis</i>	0.12 \pm 0.07		0.74 \pm 0.35		0.4320
<i>S. noxia</i>	0.04 \pm 0.04		0.11 \pm 0.07		0.2079
<i>S. anginosus</i>	0.71 \pm 0.45		1.01 \pm 0.55		0.7706
<i>S. constellatus</i>	3.23 \pm 1.56		6.13 \pm 2.63		0.8542
<i>S. gordonii</i>	1.70 \pm 0.72		1.56 \pm 0.93		0.7046
<i>S. intermedius</i>	12.61 \pm 5.32		13.88 \pm 5.57		0.6215
<i>S. mitis</i>	4.48 \pm 2.06		5.46 \pm 3.46		0.7938
<i>S. oralis</i>	1.30 \pm 0.51		2.64 \pm 0.93		0.7813
<i>S. sanguinis</i>	6.60 \pm 1.54		5.89 \pm 1.91		0.5227
<i>T. forsythia</i>	0.87 \pm 0.50		0.39 \pm 0.23		0.5095
<i>T. denticola</i>	0.24 \pm 0.12		0.39 \pm 0.22		0.6933
<i>V. parvula</i>	1.74 \pm 0.73		3.95 \pm 2.16		0.9854

Las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas para ninguna de las especies evaluadas (prueba U de Mann-Whitney, **M-W**). **EEM**: error estándar de la media. **A. a.**: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabla 12. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales \pm EEM) de complejos bacterianos en muestras tomadas del ápice y de la lesión periapical.

Complejos bacterianos	Apice		Lesión		M-W ($p =$)
	Media	EEM	Media	EEM	
<i>Actinomyces</i> sp.	20.26 \pm 4.52		18.06 \pm 4.21		0.5664
Complejo amarillo	25.59 \pm 5.07		28.48 \pm 5.63		0.8150
Complejo morado	6.21 \pm 2.13		6.58 \pm 2.44		0.5300
Complejo verde	2.76 \pm 0.95		1.05 \pm 0.40		0.1864
Complejo naranja	18.24 \pm 3.20		18.37 \pm 2.98		0.8624
Complejo rojo	1.12 \pm 0.43		0.78 \pm 0.32		0.3359
No-agrupados	0.10 \pm 0.04		0.17 \pm 0.07		0.7035
Otros:	25.72 \pm 4.54		26.50 \pm 4.89		0.9379
<i>C. matruchotii</i>	6.43 \pm 1.73		11.77 \pm 3.38		0.5305
<i>E. saburreum</i>	4.98 \pm 2.95		6.83 \pm 4.44		1.0000
<i>E. sulci</i>	15.05 \pm 5.52		5.47 \pm 1.71		0.2279
<i>L. buccalis</i>	6.34 \pm 3.11		11.00 \pm 6.86		0.9339
<i>N. mucosa</i>	0.07 \pm 0.03		0.05 \pm 0.03		0.6841
<i>P. endodontalis</i>	0.89 \pm 0.63		0.43 \pm 0.23		0.7740
<i>P. acnes</i>	2.00 \pm 1.28		0.82 \pm 0.39		0.7240
<i>S. artemidis</i>	0.12 \pm 0.07		0.74 \pm 0.35		0.4320

Las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas para ninguna de las especies evaluadas (prueba U de Mann-Whitney, **M-W**). **EEM**: error estándar de la media.

Tabla 13. Niveles promedio (cuentas bacterianas x 10⁵ ± EEM) de especies individuales en muestras tomadas de dientes anteriores y posteriores.

Niveles promedio	Anterior		Posterior		M-W (p=)
	Media	EEM	Media	EEM	
Cuentas totales	106.62 ± 35.15		168.02 ± 40.16		0.0948
<i>A. georgiae</i>	0.49 ± 0.21		1.67 ± 0.71		0.2692
<i>A. israelii</i>	6.35 ± 4.96		17.24 ± 7.09		0.1623
<i>A. naeslundii</i> 1 *	6.32 ± 3.55		29.20 ± 8.62		0.0360
<i>A. odontolyticus</i>	18.13 ± 8.91		6.05 ± 4.14		0.2978
<i>A. viscosus</i>	1.41 ± 0.59		3.53 ± 0.88		0.1110
<i>A. a.</i>	0.09 ± 0.05		0.21 ± 0.13		0.9411
<i>C. gracilis</i>	0 ± 0		0 ± 0		1.0000
<i>C. rectus</i>	0.50 ± 0.19		0.82 ± 0.39		0.6523
<i>C. showae</i>	0.83 ± 0.31		0.75 ± 0.26		0.4281
<i>C. gingivalis</i>	27.55 ± 24.26		3.44 ± 1.46		0.3449
<i>C. ochracea</i>	0.36 ± 0.36		0.01 ± 0.01		0.9696
<i>C. sputigena</i>	0.16 ± 0.10		0.82 ± 0.35		0.4046
<i>C. matruchotii</i>	9.22 ± 4.89		18.87 ± 6.97		0.1147
<i>E. corrodens</i>	0.91 ± 0.34		2.11 ± 0.94		0.5497
<i>E. saburreum</i>	8.39 ± 7.09		2.78 ± 0.89		0.1376
<i>E. sulci</i>	23.96 ± 9.88		14.74 ± 6.74		0.9376
<i>F. nucleatum</i>	4.09 ± 3.57		0.85 ± 0.42		0.1540
<i>F. periodonticum</i>	2.03 ± 0.93		9.97 ± 7.01		0.8876
<i>L. buccalis</i>	2.18 ± 1.01		2.91 ± 1.03		0.1381
<i>N. mucosa</i>	0.24 ± 0.18		0.22 ± 0.14		1.0000
<i>P. micra</i> *	4.81 ± 3.56		11.40 ± 5.63		0.0381
<i>P. endodontalis</i>	0.84 ± 0.35		0.60 ± 0.23		0.9035
<i>P. gingivalis</i>	0.31 ± 0.12		0.62 ± 0.30		0.6585
<i>P. intermedia</i>	4.81 ± 3.56		1.25 ± 0.54		0.8151
<i>P. nigrescens</i>	0.12 ± 0.08		0.27 ± 0.14		0.7589
<i>P. acnes</i>	0.91 ± 0.59		5.52 ± 4.15		0.2767
<i>S. artemidis</i> *	0.11 ± 0.06		1.02 ± 0.53		0.0440
<i>S. noxia</i>	0.07 ± 0.06		0.26 ± 0.14		0.8600
<i>S. anginosus</i>	0.86 ± 0.40		1.75 ± 0.71		0.2118
<i>S. constellatus</i>	0.79 ± 0.23		2.00 ± 0.64		0.1053
<i>S. gordonii</i>	1.75 ± 0.96		2.86 ± 0.90		0.2808
<i>S. intermedius</i>	1.21 ± 0.40		3.34 ± 0.84		0.2326
<i>S. mitis</i>	6.19 ± 5.53		13.95 ± 6.81		0.1760
<i>S. oralis</i>	4.47 ± 3.56		2.39 ± 0.69		0.0863
<i>S. sanguinis</i>	11.92 ± 5.89		18.31 ± 7.01		0.2078
<i>T. forsythia</i>	1.52 ± 0.77		0.45 ± 0.22		0.7269
<i>T. denticola</i>	0.59 ± 0.28		1.09 ± 0.58		0.7017
<i>V. parvula</i>	4.70 ± 3.57		1.87 ± 0.63		0.0716

* $p < 0.05$ prueba U de Mann-Whitney (M-W). EEM: error estándar de la media. *A. a.*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabla 14. Prevalencia promedio (% muestras colonizadas \pm EEM) de especies individuales en muestras tomadas de dientes anteriores y posteriores.

Prevalencia promedio	Anterior		Posterior		M-W ($p =$)
	Media	EEM	Media	EEM	
<i>A. georgiae</i>	0.25 \pm 0.08		0.38 \pm 0.10		0.2917
<i>A. israelii</i>	0.45 \pm 0.11		0.65 \pm 0.10		0.1715
<i>A. naeslundii</i> 1	0.64 \pm 0.09		0.85 \pm 0.07		0.0915
<i>A. odontolyticus</i>	0.78 \pm 0.10		0.63 \pm 0.10		0.2950
<i>A. viscosus</i>	0.43 \pm 0.10		0.58 \pm 0.10		0.2805
<i>A. a.</i>	0.21 \pm 0.08		0.19 \pm 0.08		0.8427
<i>C. gracilis</i>	0 \pm 0		0 \pm 0		1.0000
<i>C. rectus</i>	0.43 \pm 0.10		0.46 \pm 0.10		0.8093
<i>C. showae</i>	0.50 \pm 0.12		0.33 \pm 0.10		0.2820
<i>C. gingivalis</i>	1.00 \pm 0		0.70 \pm 0.15		0.2337
<i>C. ochracea</i>	0.07 \pm 0.05		0.08 \pm 0.05		0.9392
<i>C. sputigena</i>	0.29 \pm 0.13		0.36 \pm 0.13		0.6911
<i>C. matruchotii</i>	0.71 \pm 0.09		0.81 \pm 0.08		0.4268
<i>E. corrodens</i>	0.57 \pm 0.14		0.64 \pm 0.13		0.7040
<i>E. saburreum</i>	0.43 \pm 0.14		0.79 \pm 0.11		0.0574
<i>E. sulci</i>	0.72 \pm 0.11		0.75 \pm 0.09		0.8413
<i>F. nucleatum</i>	0.25 \pm 0.08		0.46 \pm 0.10		0.1071
<i>F. periodonticum</i>	0.79 \pm 0.11		0.57 \pm 0.14		0.2332
<i>L. buccalis</i> *	0.46 \pm 0.14		0.92 \pm 0.08		0.0169
<i>N. mucosa</i>	0.17 \pm 0.09		0.17 \pm 0.08		1.0000
<i>P. micra</i>	0.46 \pm 0.10		0.71 \pm 0.09		0.0786
<i>P. endodontalis</i>	0.57 \pm 0.14		0.57 \pm 0.14		1.0000
<i>P. gingivalis</i>	0.50 \pm 0.14		0.57 \pm 0.14		0.7098
<i>P. intermedia</i>	0.36 \pm 0.09		0.35 \pm 0.10		0.9333
<i>P. nigrescens</i>	0.22 \pm 0.10		0.25 \pm 0.09		0.8363
<i>P. acnes</i>	0.22 \pm 0.10		0.38 \pm 0.10		0.2950
<i>S. artemidis</i> *	0.14 \pm 0.07		0.38 \pm 0.10		0.0448
<i>S. noxia</i>	0.17 \pm 0.09		0.17 \pm 0.08		1.0000
<i>S. anginosus</i>	0.32 \pm 0.09		0.50 \pm 0.10		0.1862
<i>S. constellatus</i>	0.50 \pm 0.10		0.72 \pm 0.09		0.1054
<i>S. gordonii</i>	0.57 \pm 0.14		0.64 \pm 0.13		0.7040
<i>S. intermedius</i>	0.68 \pm 0.09		0.65 \pm 0.10		0.8487
<i>S. mitis</i>	0.33 \pm 0.11		0.54 \pm 0.10		0.1847
<i>S. oralis</i>	0.50 \pm 0.10		0.69 \pm 0.09		0.1545
<i>S. sanguinis</i>	0.61 \pm 0.09		0.65 \pm 0.10		0.7250
<i>T. forsythia</i>	0.33 \pm 0.11		0.33 \pm 0.10		1.0000
<i>T. denticola</i>	0.33 \pm 0.11		0.25 \pm 0.09		0.5589
<i>V. parvula</i> *	0.36 \pm 0.09		0.69 \pm 0.09		0.0147

* $p < 0.05$ prueba U de Mann-Whitney (M-W). EEM: error estándar de la media. *A. a.*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabla 15. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales \pm EEM) de especies individuales en muestras tomadas de dientes anteriores y posteriores.

Proporción promedio	Anterior		Posterior		M-W ($p =$)
	Media	EEM	Media	EEM	
<i>A. georgiae</i>	0.74 \pm 0.45		0.83 \pm 0.32		0.3232
<i>A. israelii</i>	2.05 \pm 1.09		5.03 \pm 1.91		0.1483
<i>A. naeslundii</i> 1	9.79 \pm 3.06		18.60 \pm 4.40		0.0536
<i>A. odontolyticus</i>	7.86 \pm 2.85		2.09 \pm 1.15		0.1041
<i>A. viscosus</i>	0.85 \pm 0.28		1.51 \pm 0.35		0.1489
<i>A. a.</i>	0.09 \pm 0.05		0.06 \pm 0.03		0.8440
<i>C. gracilis</i>	0 \pm 0		0 \pm 0		1.0000
<i>C. rectus</i>	2.72 \pm 1.71		0.40 \pm 0.15		0.9242
<i>C. showae</i>	1.20 \pm 0.61		0.29 \pm 0.10		0.3031
<i>C. gingivalis</i>	6.91 \pm 5.02		1.17 \pm 0.37		0.3201
<i>C. ochracea</i>	0.08 \pm 0.08		0.00 \pm 0.00		0.9392
<i>C. sputigena</i>	0.06 \pm 0.03		0.66 \pm 0.35		0.3755
<i>C. matruchotii</i>	10.38 \pm 2.93		7.72 \pm 2.46		0.8822
<i>E. corrodens</i>	1.98 \pm 0.87		1.67 \pm 0.72		0.9245
<i>E. saburreum</i>	3.09 \pm 1.58		8.73 \pm 4.98		0.1551
<i>E. sulci</i>	12.68 \pm 4.89		8.45 \pm 3.68		0.6816
<i>F. nucleatum</i>	0.98 \pm 0.76		0.73 \pm 0.34		0.1440
<i>F. periodonticum</i>	3.58 \pm 1.34		4.21 \pm 1.82		0.8153
<i>L. buccalis</i>	13.04 \pm 7.20		4.13 \pm 1.17		0.4554
<i>N. mucosa</i>	0.05 \pm 0.03		0.07 \pm 0.03		0.9065
<i>P. micra</i>	4.78 \pm 2.08		7.70 \pm 2.63		0.1026
<i>P. endodontalis</i>	1.05 \pm 0.65		0.27 \pm 0.10		0.6667
<i>P. gingivalis</i>	0.50 \pm 0.27		0.35 \pm 0.16		0.8845
<i>P. intermedia</i>	4.24 \pm 2.04		1.10 \pm 0.53		0.6849
<i>P. nigrescens</i>	0.04 \pm 0.02		0.08 \pm 0.04		0.7082
<i>P. acnes</i>	0.46 \pm 0.36		2.12 \pm 1.12		0.2384
<i>S. artemidis</i> *	0.08 \pm 0.05		0.80 \pm 0.36		0.0432
<i>S. noxia</i>	0.01 \pm 0.01		0.12 \pm 0.07		0.8143
<i>S. anginosus</i>	1.02 \pm 0.62		0.69 \pm 0.30		0.2891
<i>S. constellatus</i>	2.88 \pm 1.32		6.76 \pm 2.89		0.1268
<i>S. gordonii</i>	0.84 \pm 0.41		2.42 \pm 1.06		0.2971
<i>S. intermedius</i>	19.41 \pm 6.80		6.61 \pm 2.62		0.6275
<i>S. mitis</i>	4.09 \pm 3.64		5.63 \pm 2.22		0.2213
<i>S. oralis</i>	2.11 \pm 0.88		1.82 \pm 0.59		0.2297
<i>S. sanguinis</i>	5.71 \pm 1.34		6.83 \pm 2.09		0.8940
<i>T. forsythia</i>	0.66 \pm 0.33		0.61 \pm 0.42		0.7390
<i>T. denticola</i>	0.19 \pm 0.09		0.40 \pm 0.21		0.7499
<i>V. parvula</i>	2.59 \pm 1.34		3.12 \pm 1.90		0.0947

* $p < 0.05$ prueba U de Mann-Whitney (M-W). EEM: error estándar de la media. *A. a.*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabla 16. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales \pm EEM) de complejos bacterianos en muestras tomadas de dientes anteriores y posteriores.

Complejos bacterianos	Anterior		Posterior		M-W ($p =$)
	Media	EEM	Media	EEM	
<i>Actinomyces</i> sp. †	12.84 \pm 3.39		25.97 \pm 4.93		0.0076
Complejo amarillo	31.30 \pm 6.45		22.44 \pm 3.47		0.6772
Complejo morado	7.65 \pm 2.39		5.05 \pm 2.13		0.6970
Complejo verde	2.08 \pm 0.87		1.71 \pm 0.57		0.4329
Complejo naranja	18.17 \pm 3.18		18.44 \pm 2.98		0.8015
Complejo rojo	0.80 \pm 0.28		1.12 \pm 0.47		0.8534
No-agrupados	0.10 \pm 0.05		0.17 \pm 0.07		0.5180
Otros:	27.06 \pm 4.88		25.09 \pm 4.51		0.8761
<i>C. matruchotii</i>	10.38 \pm 2.93		7.72 \pm 2.46		0.8822
<i>E. saburreum</i>	3.09 \pm 1.58		8.73 \pm 4.98		0.1551
<i>E. sulci</i>	12.68 \pm 4.89		8.45 \pm 3.68		0.6816
<i>L. buccalis</i>	13.04 \pm 7.20		4.13 \pm 1.17		0.4554
<i>N. mucosa</i>	0.05 \pm 0.03		0.07 \pm 0.03		0.9065
<i>P. endodontalis</i>	1.05 \pm 0.65		0.27 \pm 0.10		0.6667
<i>P. acnes</i>	0.46 \pm 0.36		2.12 \pm 1.12		0.2384
<i>S. artemidis</i> *	0.08 \pm 0.05		0.80 \pm 0.36		0.0432

* $p < 0.05$ y † $p < 0.01$ prueba U de Mann-Whitney (M-W). EEM: error estándar de la media. *A. a.*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabla 17. Niveles promedio (cuentas bacterianas x 10⁵ ± EEM) de especies individuales en muestras tomadas de pacientes masculinos y femeninos.

Niveles promedio	Masculino		Femenino		M-W (p=)
	Media	EEM	Media	EEM	
Cuentas totales	184.33 ± 67.72		97.66 ± 32.57		0.4945
<i>A. georgiae</i>	1.41 ± 0.85		0.77 ± 0.66		0.3363
<i>A. israelii</i>	10.27 ± 8.19		14.93 ± 7.55		0.6385
<i>A. naeslundii</i> 1	15.25 ± 8.68		19.00 ± 9.21		0.8062
<i>A. odontolyticus</i>	16.80 ± 10.67		6.16 ± 4.92		0.4557
<i>A. viscosus</i>	3.10 ± 1.22		1.89 ± 0.93		0.2865
<i>A. a.</i>	0.14 ± 0.07		0.15 ± 0.14		0.4095
<i>C. gracilis</i>	0 ± 0		0 ± 0		1.0000
<i>C. rectus</i>	0.57 ± 0.26		0.72 ± 0.44		0.7586
<i>C. showae</i>	0.74 ± 0.41		0.82 ± 0.39		0.8809
<i>C. gingivalis</i> *	23.86 ± 15.60		0.18 ± 0.11		0.0323
<i>C. ochracea</i>	0.01 ± 0.01		0.33 ± 0.33		0.4745
<i>C. sputigena</i>	0.45 ± 0.31		0.53 ± 0.44		1.0000
<i>C. matruchotii</i>	26.78 ± 12.78		3.53 ± 1.10		0.5885
<i>E. corrodens</i>	1.12 ± 0.53		1.89 ± 1.38		1.0000
<i>E. saburreum</i>	9.27 ± 7.63		1.89 ± 1.42		0.2181
<i>E. sulci</i>	27.33 ± 13.20		10.84 ± 6.23		0.4144
<i>F. nucleatum</i> †	1.51 ± 0.73		3.34 ± 3.33		0.0073
<i>F. periodonticum</i>	9.60 ± 7.69		2.41 ± 1.29		0.5187
<i>L. buccalis</i>	4.95 ± 2.12		1.49 ± 0.81		0.1846
<i>N. mucosa</i>	0.26 ± 0.21		0.19 ± 0.15		0.8597
<i>P. micra</i>	10.80 ± 8.95		5.69 ± 3.64		0.3393
<i>P. endodontalis</i>	0.67 ± 0.44		0.77 ± 0.31		0.3647
<i>P. gingivalis</i>	0.39 ± 0.17		0.54 ± 0.44		0.5551
<i>P. intermedia</i>	0.77 ± 0.56		4.96 ± 3.40		0.2275
<i>P. nigrescens</i>	0.16 ± 0.11		0.25 ± 0.19		0.5366
<i>P. acnes</i>	0.63 ± 0.36		6.20 ± 4.93		0.7472
<i>S. artemidis</i> *	0.39 ± 0.19		0.67 ± 0.67		0.0478
<i>S. noxia</i>	0.16 ± 0.08		0.19 ± 0.19		0.5400
<i>S. anginosus</i> *	2.04 ± 0.91		0.68 ± 0.67		0.0243
<i>S. constellatus</i>	1.49 ± 0.37		1.32 ± 0.72		0.0785
<i>S. gordonii</i>	2.90 ± 1.50		1.71 ± 0.92		0.9486
<i>S. intermedius</i>	2.82 ± 0.96		1.77 ± 0.88		0.3453
<i>S. mitis</i>	1.32 ± 0.40		19.09 ± 10.24		0.7372
<i>S. oralis</i>	6.52 ± 4.48		1.03 ± 0.66		0.1879
<i>S. sanguinis</i>	31.31 ± 12.74		1.94 ± 0.88		0.1325
<i>T. forsythia</i>	1.38 ± 1.01		0.49 ± 0.22		0.4928
<i>T. denticola</i>	1.42 ± 1.00		0.38 ± 0.22		0.4816
<i>V. parvula</i> †	6.49 ± 4.48		0.82 ± 0.53		0.0076

* $p < 0.05$ y † $p < 0.01$ prueba U de Mann-Whitney (M-W). EEM: error estándar de la media. *A. a.*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabla 18. Prevalencia promedio (% muestras colonizadas \pm EEM) de especies individuales en muestras tomadas de pacientes masculinos y femeninos.

Prevalencia promedio	Masculino		Femenino		M-W ($p =$)
	Media	EEM	Media	EEM	
<i>A. georgiae</i>	0.42 \pm 0.14		0.23 \pm 0.10		0.2925
<i>A. israelii</i>	0.63 \pm 0.13		0.50 \pm 0.13		0.4893
<i>A. naeslundii</i> 1	0.75 \pm 0.10		0.73 \pm 0.11		0.8870
<i>A. odontolyticus</i>	0.75 \pm 0.13		0.64 \pm 0.12		0.4069
<i>A. viscosus</i>	0.58 \pm 0.14		0.43 \pm 0.12		0.3997
<i>A. a.</i>	0.29 \pm 0.13		0.13 \pm 0.08		0.3569
<i>C. gracilis</i>	0 \pm 0		0 \pm 0		1.0000
<i>C. rectus</i>	0.50 \pm 0.14		0.40 \pm 0.11		0.5818
<i>C. showae</i>	0.35 \pm 0.13		0.45 \pm 0.14		0.6210
<i>C. gingivalis</i>	1.00 \pm 0		0.63 \pm 0.13		0.0662
<i>C. ochracea</i>	0.13 \pm 0.09		0.03 \pm 0.03		0.3955
<i>C. sputigena</i>	0.36 \pm 0.18		0.29 \pm 0.15		0.8301
<i>C. matruchotii</i>	0.75 \pm 0.12		0.77 \pm 0.11		0.8079
<i>E. corrodens</i>	0.57 \pm 0.17		0.64 \pm 0.14		0.7841
<i>E. saburreum</i>	0.79 \pm 0.15		0.43 \pm 0.17		0.1265
<i>E. sulci</i>	0.80 \pm 0.11		0.68 \pm 0.10		0.3378
<i>F. nucleatum</i> †	0.63 \pm 0.13		0.13 \pm 0.08		0.0033
<i>F. periodonticum</i>	0.57 \pm 0.13		0.79 \pm 0.10		0.2246
<i>L. buccalis</i>	0.70 \pm 0.20		0.69 \pm 0.13		0.8713
<i>N. mucosa</i>	0.20 \pm 0.11		0.14 \pm 0.07		0.7890
<i>P. micra</i>	0.77 \pm 0.12		0.43 \pm 0.12		0.0603
<i>P. endodontalis</i>	0.43 \pm 0.17		0.71 \pm 0.15		0.2200
<i>P. gingivalis</i>	0.64 \pm 0.18		0.43 \pm 0.17		0.3733
<i>P. intermedia</i>	0.29 \pm 0.13		0.40 \pm 0.11		0.4467
<i>P. nigrescens</i>	0.20 \pm 0.13		0.27 \pm 0.12		0.5343
<i>P. acnes</i>	0.35 \pm 0.15		0.27 \pm 0.12		0.7447
<i>S. artemidis</i> *	0.42 \pm 0.12		0.13 \pm 0.08		0.0436
<i>S. noxia</i>	0.20 \pm 0.11		0.14 \pm 0.10		0.5707
<i>S. anginosus</i> *	0.63 \pm 0.14		0.23 \pm 0.11		0.0356
<i>S. constellatus</i> *	0.83 \pm 0.11		0.43 \pm 0.13		0.0314
<i>S. gordonii</i>	0.57 \pm 0.17		0.64 \pm 0.14		0.7841
<i>S. intermedius</i>	0.71 \pm 0.13		0.63 \pm 0.12		0.6883
<i>S. mitis</i>	0.65 \pm 0.15		0.27 \pm 0.12		0.0703
<i>S. oralis</i>	0.67 \pm 0.13		0.53 \pm 0.11		0.4127
<i>S. sanguinis</i>	0.67 \pm 0.13		0.60 \pm 0.11		0.6496
<i>T. forsythia</i>	0.40 \pm 0.12		0.27 \pm 0.12		0.3946
<i>T. denticola</i>	0.35 \pm 0.13		0.23 \pm 0.10		0.4755
<i>V. parvula</i> *	0.83 \pm 0.11		0.27 \pm 0.12		0.0041

* $p < 0.05$ y † $p < 0.01$ prueba U de Mann-Whitney (M-W). EEM: error estándar de la media. *A. a.*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabla 19. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales \pm EEM) de especies individuales en muestras tomadas de pacientes masculinos y femeninos.

Proporción promedio	Masculino		Femenino		M-W ($p =$)
	Media	EEM	Media	EEM	
<i>A. georgiae</i>	1.26 \pm 0.69		0.40 \pm 0.28		0.2497
<i>A. israelii</i>	2.59 \pm 1.22		4.99 \pm 2.62		0.6176
<i>A. naeslundii</i> 1	6.21 \pm 1.79		20.29 \pm 5.84		0.2312
<i>A. odontolyticus</i>	4.26 \pm 2.09		4.84 \pm 3.02		0.3966
<i>A. viscosus</i>	1.50 \pm 0.45		0.90 \pm 0.34		0.3371
<i>A. a.</i>	0.11 \pm 0.07		0.04 \pm 0.04		0.3423
<i>C. gracilis</i>	0 \pm 0		0 \pm 0		1.0000
<i>C. rectus</i>	0.56 \pm 0.27		2.44 \pm 2.18		0.7017
<i>C. showae</i>	0.51 \pm 0.27		0.84 \pm 0.49		0.7942
<i>C. gingivalis</i> *	5.97 \pm 3.89		0.44 \pm 0.22		0.0339
<i>C. ochracea</i>	0.00 \pm 0.00		0.07 \pm 0.07		0.4745
<i>C. sputigena</i>	0.56 \pm 0.50		0.16 \pm 0.14		0.7235
<i>C. matruchotii</i>	12.01 \pm 4.68		6.77 \pm 2.09		0.9220
<i>E. corrodens</i>	1.55 \pm 0.94		2.10 \pm 0.86		0.6533
<i>E. saburreum</i> *	11.07 \pm 6.82		0.74 \pm 0.57		0.0387
<i>E. sulci</i>	10.56 \pm 4.27		10.00 \pm 4.18		0.7513
<i>F. nucleatum</i> †	1.04 \pm 0.48		0.72 \pm 0.71		0.0053
<i>F. periodonticum</i>	3.23 \pm 1.95		4.56 \pm 1.09		0.1102
<i>L. buccalis</i>	5.94 \pm 3.36		10.35 \pm 5.18		0.5095
<i>N. mucosa</i>	0.06 \pm 0.04		0.05 \pm 0.03		0.8599
<i>P. micra</i>	3.76 \pm 1.77		7.86 \pm 3.43		0.6146
<i>P. endodontalis</i>	0.23 \pm 0.11		1.09 \pm 0.61		0.1963
<i>P. gingivalis</i>	0.55 \pm 0.35		0.30 \pm 0.18		0.5565
<i>P. intermedia</i>	0.57 \pm 0.44		4.45 \pm 2.01		0.1479
<i>P. nigrescens</i>	0.04 \pm 0.03		0.08 \pm 0.06		0.4269
<i>P. acnes</i>	0.47 \pm 0.35		2.26 \pm 1.33		0.7472
<i>S. artemidis</i>	0.44 \pm 0.26		0.42 \pm 0.30		0.0716
<i>S. noxia</i>	0.10 \pm 0.07		0.06 \pm 0.05		0.4797
<i>S. anginosus</i> *	1.58 \pm 1.04		0.28 \pm 0.27		0.0159
<i>S. constellatus</i>	6.79 \pm 2.89		2.90 \pm 1.63		0.0797
<i>S. gordonii</i>	2.42 \pm 1.53		0.84 \pm 0.29		0.7483
<i>S. intermedius</i>	13.33 \pm 8.84		13.17 \pm 5.16		0.7108
<i>S. mitis</i>	1.20 \pm 0.67		8.40 \pm 3.89		0.7374
<i>S. oralis</i>	2.12 \pm 0.91		1.85 \pm 0.69		0.7108
<i>S. sanguinis</i>	9.46 \pm 2.89		3.68 \pm 1.47		0.1271
<i>T. forsythia</i>	1.13 \pm 0.70		0.18 \pm 0.10		0.3228
<i>T. denticola</i>	0.53 \pm 0.33		0.11 \pm 0.06		0.3293
<i>V. parvula</i> ‡	6.12 \pm 2.45		0.23 \pm 0.15		0.0008

* $p < 0.05$, † $p < 0.01$ y ‡ $p < 0.001$ prueba U de Mann-Whitney (M-W). EEM: error estándar de la media. *A. a.*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabla 20. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales \pm EEM) de complejos bacterianos en muestras tomadas de pacientes masculinos y femeninos.

Complejos bacterianos	Masculino		Femenino		M-W ($p =$)
	Media	EEM	Media	EEM	
<i>Actinomyces</i> sp.	11.56 \pm 3.02		25.24 \pm 6.72		0.2934
Complejo amarillo	28.90 \pm 8.10		25.54 \pm 5.30		0.9611
Complejo morado *	9.67 \pm 2.97		3.78 \pm 2.25		0.0335
Complejo verde	2.73 \pm 1.30		1.24 \pm 0.48		0.6191
Complejo naranja	14.73 \pm 2.94		21.17 \pm 3.45		0.1874
Complejo rojo	1.71 \pm 0.73		0.35 \pm 0.17		0.1205
No-agrupados	0.19 \pm 0.09		0.09 \pm 0.05		0.2044
Otros:	30.52 \pm 5.70		22.59 \pm 4.51		0.2831
<i>C. matruchotii</i>	12.01 \pm 4.68		6.77 \pm 2.09		0.9220
<i>E. saburreum</i> *	11.07 \pm 6.82		0.74 \pm 0.57		0.0387
<i>E. sulci</i>	10.56 \pm 4.27		10.00 \pm 4.18		0.7513
<i>L. buccalis</i>	5.94 \pm 3.36		10.35 \pm 5.18		0.5095
<i>N. mucosa</i>	0.06 \pm 0.04		0.05 \pm 0.03		0.8599
<i>P. endodontalis</i>	0.23 \pm 0.11		1.09 \pm 0.61		0.1963
<i>P. acnes</i>	0.47 \pm 0.35		2.26 \pm 1.33		0.7472
<i>S. artemidis</i>	0.44 \pm 0.26		0.42 \pm 0.30		0.0716

* $p < 0.05$ prueba U de Mann-Whitney (**M-W**). **EEM**: error estándar de la media. **A. a.**: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabla 21. Niveles promedio (cuentas bacterianas x 10⁵ ± EEM) de especies individuales en muestras tomadas de pacientes fumadores y no-fumadores.

Niveles promedio	No-fumador		Fumador		M-W (p =)
	Media	EEM	Media	EEM	
Cuentas totales	113.80 ± 36.65		214.51 ± 94.29		0.2805
<i>A. georgiae</i>	0.66 ± 0.49		2.45 ± 1.58		0.0569
<i>A. israelii</i>	16.32 ± 7.24		1.66 ± 0.58		0.8031
<i>A. naeslundii</i> 1	16.51 ± 6.91		20.22 ± 16.02		0.2912
<i>A. odontolyticus</i> *	4.42 ± 3.19		40.15 ± 23.46		0.0337
<i>A. viscosus</i>	1.59 ± 0.67		5.35 ± 2.10		0.1629
<i>A. a.</i>	0.13 ± 0.10		0.19 ± 0.11		0.1392
<i>C. gracilis</i>	0 ± 0		0 ± 0		1.0000
<i>C. rectus</i>	0.55 ± 0.31		1.03 ± 0.47		0.1684
<i>C. showae</i> †	0.38 ± 0.21		2.50 ± 0.67		0.0049
<i>C. gingivalis</i>	10.33 ± 7.59		NA ± NA		NA
<i>C. ochracea</i>	0.24 ± 0.24		0.03 ± 0.02		0.0693
<i>C. sputigena</i> *	0.06 ± 0.05		1.56 ± 0.68		0.0342
<i>C. matruchotii</i>	16.68 ± 7.64		4.03 ± 1.95		0.8141
<i>E. corrodens</i> †	0.42 ± 0.20		4.22 ± 2.02		0.0081
<i>E. saburreum</i> *	1.48 ± 0.98		15.85 ± 13.05		0.0179
<i>E. sulci</i>	16.81 ± 7.14		26.71 ± 24.43		0.3911
<i>F. nucleatum</i>	3.20 ± 2.38		0.19 ± 0.16		1.0000
<i>F. periodonticum</i> *	1.59 ± 0.96		17.04 ± 12.81		0.0383
<i>L. buccalis</i>	3.18 ± 1.18		0.82 ± 0.77		0.5510
<i>N. mucosa</i> *	0.10 ± 0.09		0.77 ± 0.45		0.0134
<i>P. micra</i>	9.98 ± 5.47		0.78 ± 0.32		0.8763
<i>P. endodontalis</i> *	0.33 ± 0.17		1.69 ± 0.59		0.0263
<i>P. gingivalis</i>	0.44 ± 0.32		0.54 ± 0.18		0.0816
<i>P. intermedia</i>	3.07 ± 2.44		3.20 ± 1.70		0.1319
<i>P. nigrescens</i> *	0.15 ± 0.12		0.41 ± 0.23		0.0247
<i>P. acnes</i> †	0.78 ± 0.47		15.31 ± 13.24		0.0057
<i>S. artemidis</i>	0.55 ± 0.48		0.53 ± 0.35		0.0977
<i>S. noxia</i> ‡	0.00 ± 0.00		0.91 ± 0.39		0.0000
<i>S. anginosus</i>	0.99 ± 0.55		2.30 ± 1.62		0.1783
<i>S. constellatus</i>	0.92 ± 0.30		3.07 ± 1.50		0.1764
<i>S. gordonii</i> *	0.94 ± 0.65		5.73 ± 1.64		0.0125
<i>S. intermedius</i>	2.37 ± 0.81		1.76 ± 0.63		0.5330
<i>S. mitis</i> *	6.75 ± 4.19		27.10 ± 24.30		0.0201
<i>S. oralis</i>	1.24 ± 0.51		11.29 ± 8.88		0.1088
<i>S. sanguinis</i>	9.43 ± 5.24		34.47 ± 20.73		0.2157
<i>T. forsythia</i> *	0.32 ± 0.15		3.44 ± 2.29		0.0117
<i>T. denticola</i> †	0.25 ± 0.15		3.54 ± 2.24		0.0039
<i>V. parvula</i>	1.42 ± 0.59		10.06 ± 9.00		0.3529

* $p < 0.05$, † $p < 0.01$ y ‡ $p < 0.001$ prueba U de Mann-Whitney (M-W). EEM: error estándar de la media. *A. a.*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabla 22. Prevalencia promedio (% muestras colonizadas \pm EEM) de especies individuales en muestras tomadas de pacientes fumadores y no-fumadores.

Prevalencia promedio	No-fumador		Fumador		M-W ($p =$)
	Media	EEM	Media	EEM	
<i>A. georgiae</i> *	0.21 \pm 0.07		0.67 \pm 0.21		0.0401
<i>A. israelii</i>	0.56 \pm 0.10		0.58 \pm 0.20		0.8809
<i>A. naeslundii</i> 1 *	0.67 \pm 0.09		1.00 \pm 0		0.0416
<i>A. odontolyticus</i>	0.62 \pm 0.10		1.00 \pm 0		0.0706
<i>A. viscosus</i>	0.45 \pm 0.10		0.67 \pm 0.21		0.3142
<i>A. a.</i>	0.14 \pm 0.07		0.42 \pm 0.20		0.1195
<i>C. gracilis</i>	0 \pm 0		0 \pm 0		1.0000
<i>C. rectus</i>	0.38 \pm 0.09		0.67 \pm 0.21		0.1880
<i>C. showae</i> *	0.29 \pm 0.10		0.88 \pm 0.13		0.0178
<i>C. gingivalis</i>	0.79 \pm 0.10		NA \pm NA		NA
<i>C. ochracea</i> *	0.02 \pm 0.02		0.25 \pm 0.17		0.0480
<i>C. sputigena</i> *	0.15 \pm 0.08		0.75 \pm 0.25		0.0326
<i>C. matruchotii</i>	0.79 \pm 0.08		0.67 \pm 0.21		0.6630
<i>E. corrodens</i> *	0.45 \pm 0.12		1.00 \pm 0		0.0153
<i>E. saburreum</i> *	0.45 \pm 0.14		1.00 \pm 0		0.0314
<i>E. sulci</i>	0.71 \pm 0.09		0.88 \pm 0.13		0.3879
<i>F. nucleatum</i>	0.33 \pm 0.09		0.42 \pm 0.20		0.6967
<i>F. periodonticum</i>	0.65 \pm 0.11		0.75 \pm 0.14		0.6353
<i>L. buccalis</i>	0.73 \pm 0.12		0.50 \pm 0		0.2746
<i>N. mucosa</i> *	0.09 \pm 0.05		0.50 \pm 0.20		0.0172
<i>P. micra</i>	0.53 \pm 0.11		0.75 \pm 0.17		0.3008
<i>P. endodontalis</i>	0.45 \pm 0.14		0.88 \pm 0.13		0.0971
<i>P. gingivalis</i>	0.40 \pm 0.15		0.88 \pm 0.13		0.0813
<i>P. intermedia</i>	0.26 \pm 0.08		0.67 \pm 0.21		0.0689
<i>P. nigrescens</i> *	0.12 \pm 0.07		0.75 \pm 0.25		0.0111
<i>P. acnes</i> ‡	0.15 \pm 0.07		1.00 \pm 0		0.0009
<i>S. artemidis</i>	0.19 \pm 0.07		0.50 \pm 0.18		0.0774
<i>S. noxia</i> ‡	0.03 \pm 0.03		0.75 \pm 0.14		0.0001
<i>S. anginosus</i>	0.33 \pm 0.10		0.67 \pm 0.21		0.1459
<i>S. constellatus</i>	0.60 \pm 0.11		0.67 \pm 0.21		0.7350
<i>S. gordonii</i> *	0.45 \pm 0.12		1.00 \pm 0		0.0153
<i>S. intermedius</i>	0.64 \pm 0.10		0.75 \pm 0.17		0.6811
<i>S. mitis</i> *	0.32 \pm 0.10		1.00 \pm 0		0.0109
<i>S. oralis</i>	0.52 \pm 0.10		0.83 \pm 0.11		0.1463
<i>S. sanguinis</i>	0.60 \pm 0.10		0.75 \pm 0.17		0.4245
<i>T. forsythia</i> †	0.21 \pm 0.07		0.88 \pm 0.13		0.0043
<i>T. denticola</i> †	0.18 \pm 0.07		0.75 \pm 0.14		0.0065
<i>V. parvula</i>	0.48 \pm 0.11		0.67 \pm 0.21		0.4190

* $p < 0.05$, † $p < 0.01$ y ‡ $p < 0.001$ prueba U de Mann-Whitney (M-W). EEM: error estándar de la media. *A. a.*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabla 23. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales \pm EEM) de especies individuales en muestras tomadas de pacientes fumadores y no-fumadores.

Proporción promedio	No-fumador		Fumador		M-W ($p =$)
	Media	EEM	Media	EEM	
<i>A. georgiae</i>	0.76 \pm 0.42		0.85 \pm 0.53		0.1689
<i>A. israelii</i>	4.80 \pm 1.82		0.72 \pm 0.32		0.3560
<i>A. naeslundii</i> 1	12.55 \pm 3.71		19.21 \pm 9.83		0.3500
<i>A. odontolyticus</i>	3.33 \pm 1.99		9.81 \pm 3.95		0.0878
<i>A. viscosus</i>	0.94 \pm 0.29		1.97 \pm 0.67		0.2513
<i>A. a.</i>	0.08 \pm 0.05		0.04 \pm 0.03		0.2408
<i>C. gracilis</i>	0 \pm 0		0 \pm 0		1.0000
<i>C. rectus</i>	1.90 \pm 1.56		0.56 \pm 0.33		0.3927
<i>C. showae</i> *	0.65 \pm 0.35		0.82 \pm 0.12		0.0465
<i>C. gingivalis</i>	2.81 \pm 1.85		NA \pm NA		NA
<i>C. ochracea</i>	0.05 \pm 0.05		0.01 \pm 0.01		0.0693
<i>C. sputigena</i>	0.03 \pm 0.02		1.18 \pm 0.83		0.0503
<i>C. matruchotii</i> *	11.26 \pm 2.90		1.53 \pm 0.63		0.0262
<i>E. corrodens</i>	1.51 \pm 0.65		2.63 \pm 1.52		0.2558
<i>E. saburreum</i>	6.81 \pm 5.02		3.65 \pm 1.88		0.3168
<i>E. sulci</i>	11.34 \pm 3.46		5.67 \pm 4.05		0.5306
<i>F. nucleatum</i>	1.08 \pm 0.56		0.07 \pm 0.06		0.7978
<i>F. periodonticum</i>	3.56 \pm 0.94		4.74 \pm 3.33		0.7773
<i>L. buccalis</i>	8.20 \pm 3.89		11.20 \pm 7.35		0.5532
<i>N. mucosa</i> *	0.03 \pm 0.02		0.17 \pm 0.07		0.0184
<i>P. micra</i>	7.11 \pm 2.64		2.84 \pm 2.54		0.7560
<i>P. endodontalis</i>	0.71 \pm 0.45		0.54 \pm 0.07		0.1157
<i>P. gingivalis</i>	0.48 \pm 0.26		0.29 \pm 0.18		0.5629
<i>P. intermedia</i>	3.05 \pm 1.49		1.60 \pm 0.88		0.4050
<i>P. nigrescens</i>	0.05 \pm 0.04		0.12 \pm 0.08		0.0563
<i>P. acnes</i> †	0.63 \pm 0.35		4.75 \pm 3.34		0.0057
<i>S. artemidis</i>	0.50 \pm 0.25		0.18 \pm 0.13		0.2816
<i>S. noxia</i> ‡	0.00 \pm 0.00		0.39 \pm 0.14		0.0000
<i>S. anginosus</i>	0.87 \pm 0.62		0.80 \pm 0.54		0.2002
<i>S. constellatus</i>	5.47 \pm 1.99		1.67 \pm 0.86		0.9523
<i>S. gordonii</i>	0.77 \pm 0.32		3.78 \pm 2.51		0.1182
<i>S. intermedius</i>	13.20 \pm 5.72		13.39 \pm 8.52		0.8826
<i>S. mitis</i> *	3.87 \pm 2.16		9.65 \pm 7.08		0.0465
<i>S. oralis</i>	1.67 \pm 0.59		3.04 \pm 1.33		0.0866
<i>S. sanguinis</i>	4.92 \pm 1.34		10.91 \pm 5.32		0.2637
<i>T. forsythia</i> *	0.27 \pm 0.17		2.17 \pm 1.58		0.0202
<i>T. denticola</i> †	0.10 \pm 0.05		1.19 \pm 0.75		0.0074
<i>V. parvula</i>	2.94 \pm 1.50		2.52 \pm 1.68		0.6207

* $p < 0.05$, † $p < 0.01$ y ‡ $p < 0.001$ prueba U de Mann-Whitney (M-W). EEM: error estándar de la media. *A. a.*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabla 24. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales \pm EEM) de complejos bacterianos en muestras tomadas de pacientes fumadores y no-fumadores.

Complejos bacterianos	No-fumador		Fumador		M-W ($p =$)
	Media	EEM	Media	EEM	
<i>Actinomyces</i> sp.	18.14 \pm 4.71		22.75 \pm 9.16		0.4477
Complejo amarillo	24.16 \pm 5.62		37.09 \pm 4.39		0.0800
Complejo morado	5.64 \pm 2.04		9.06 \pm 4.66		0.7230
Complejo verde	1.72 \pm 0.69		2.55 \pm 1.68		0.9054
Complejo naranja	20.53 \pm 2.76		10.53 \pm 3.00		0.0906
Complejo rojo	0.53 \pm 0.23		2.43 \pm 1.30		0.1220
No-agrupados *	0.09 \pm 0.05		0.30 \pm 0.12		0.0303
Otros:	29.20 \pm 4.27		15.29 \pm 3.70		0.0706
<i>C. matruchotii</i> *	11.26 \pm 2.90		1.53 \pm 0.63		0.0262
<i>E. saburreum</i>	6.81 \pm 5.02		3.65 \pm 1.88		0.3168
<i>E. sulci</i>	11.34 \pm 3.46		5.67 \pm 4.05		0.5306
<i>L. buccalis</i>	8.20 \pm 3.89		11.20 \pm 7.35		0.5532
<i>N. mucosa</i> *	0.03 \pm 0.02		0.17 \pm 0.07		0.0184
<i>P. endodontalis</i>	0.71 \pm 0.45		0.54 \pm 0.07		0.1157
<i>P. acnes</i> †	0.63 \pm 0.35		4.75 \pm 3.34		0.0057
<i>S. artemidis</i>	0.50 \pm 0.25		0.18 \pm 0.13		0.2816

* $p < 0.05$ y † $p < 0.01$ prueba U de Mann-Whitney (M-W). EEM: error estándar de la media. *A. a.*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

FIGURAS

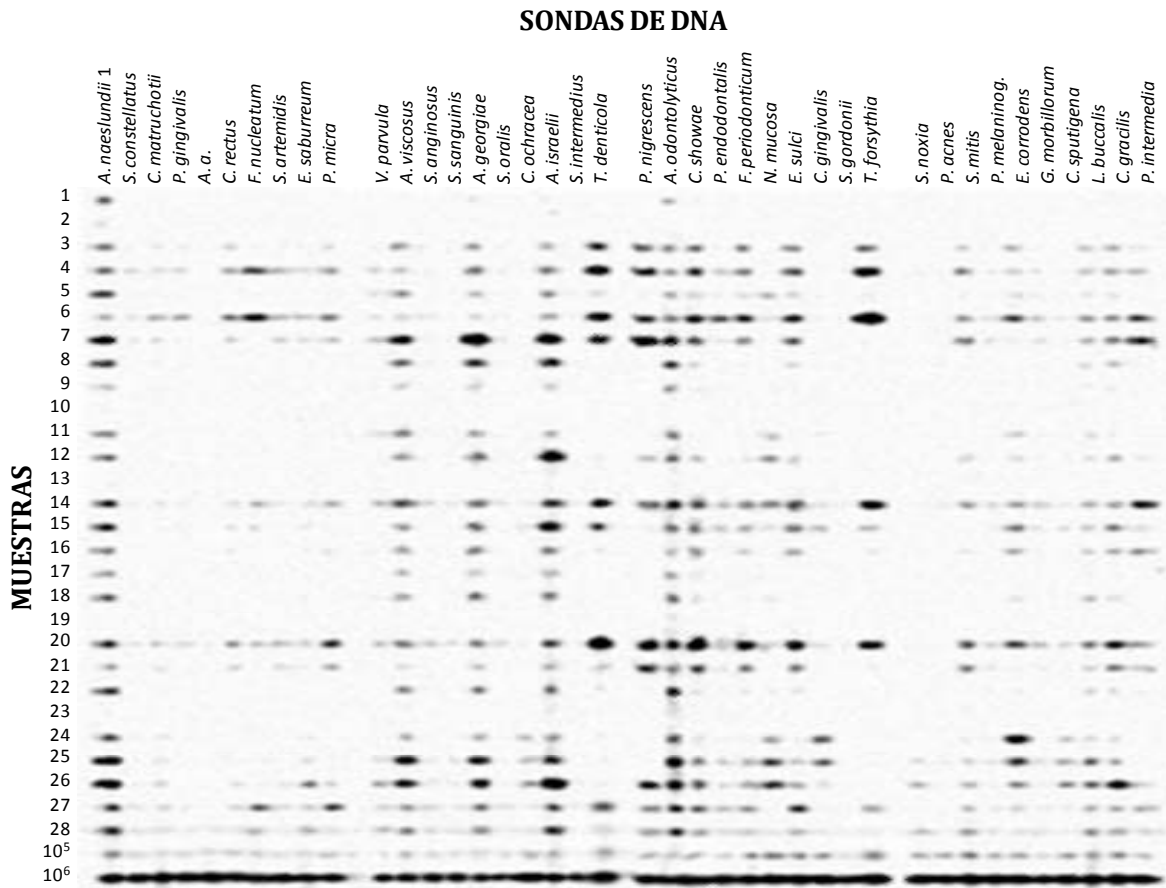


Figura 1. Imagen autorradiográfica de una membrana de nylon procesada mediante la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA donde se muestran las señales producidas por la detección y cuantificación de 40 especies bacterianas en cada una de 28 muestras. **A. a.:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

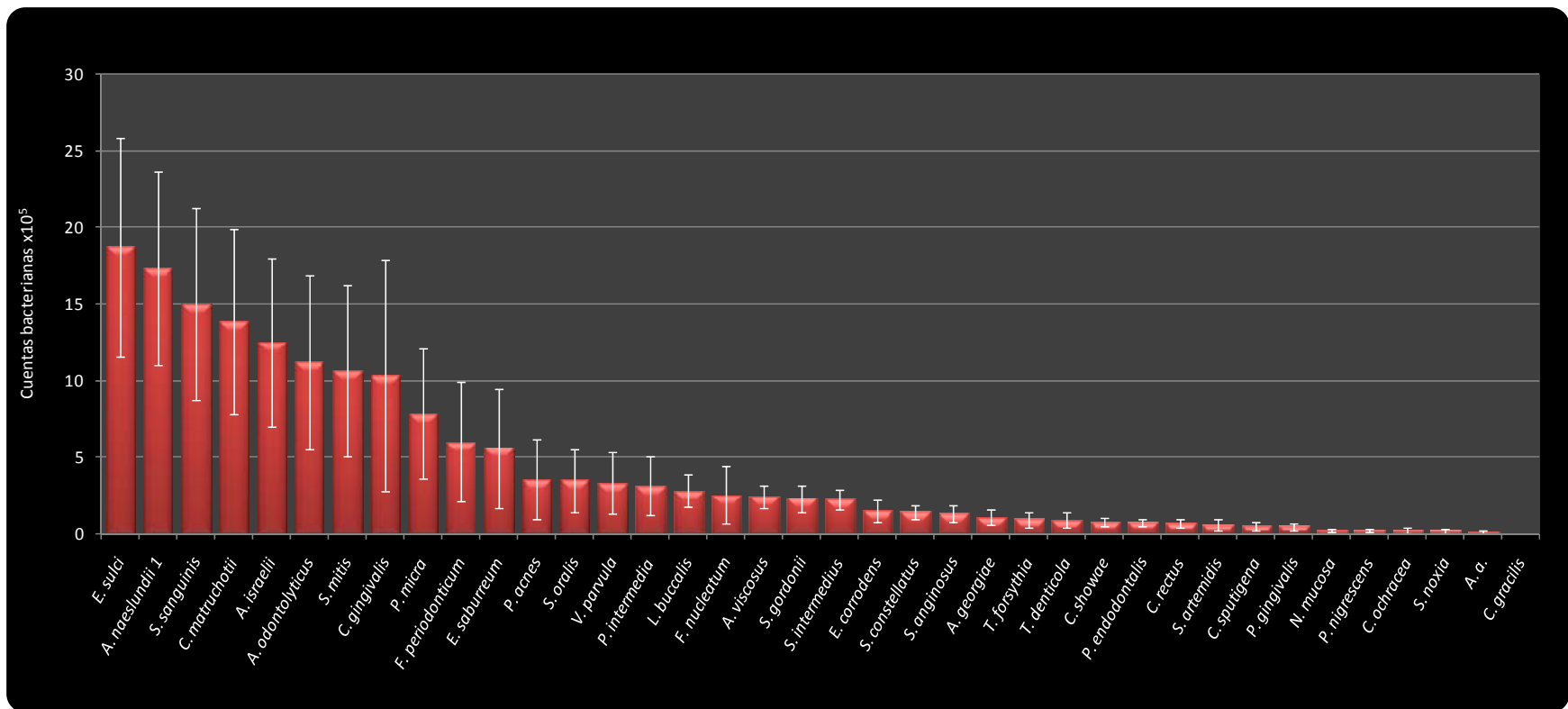


Figura 2. Niveles promedio (cuentas bacterianas x 10⁵ ± EEM) de las 38 especies individuales en 54 muestras periapicales provenientes de 27 sujetos de estudio. Los niveles promedio fueron calculados determinando las cuentas de cada especie bacteriana en cada muestra, promediadas entre las 2 muestras de cada sujeto y posteriormente entre los 27 sujetos de estudio. Los datos graficados en la presente figura se presentan en la **tabla 5. A. a.:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

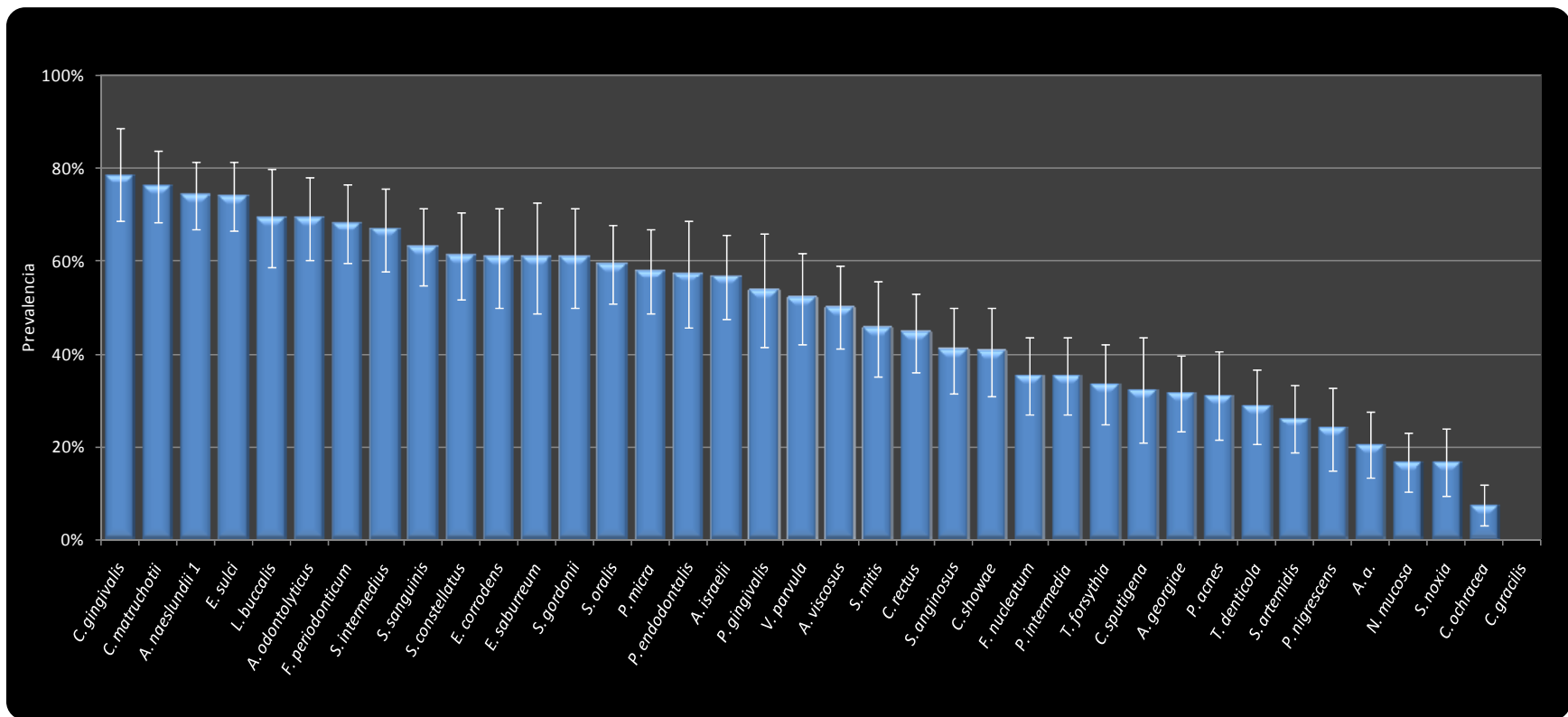


Figura 3. Prevalencia promedio (% sitios colonizados \pm EEM) de 38 especies individuales en 54 muestras periapicales provenientes de 27 sujetos de estudio. La prevalencia fue calculada para cada especie en cada una de las muestras, promediada entre las 2 muestras de cada sujeto y posteriormente entre los 27 sujetos de estudio. Los datos graficados en la presente figura se presentan en la **tabla 6**. **A. a.:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

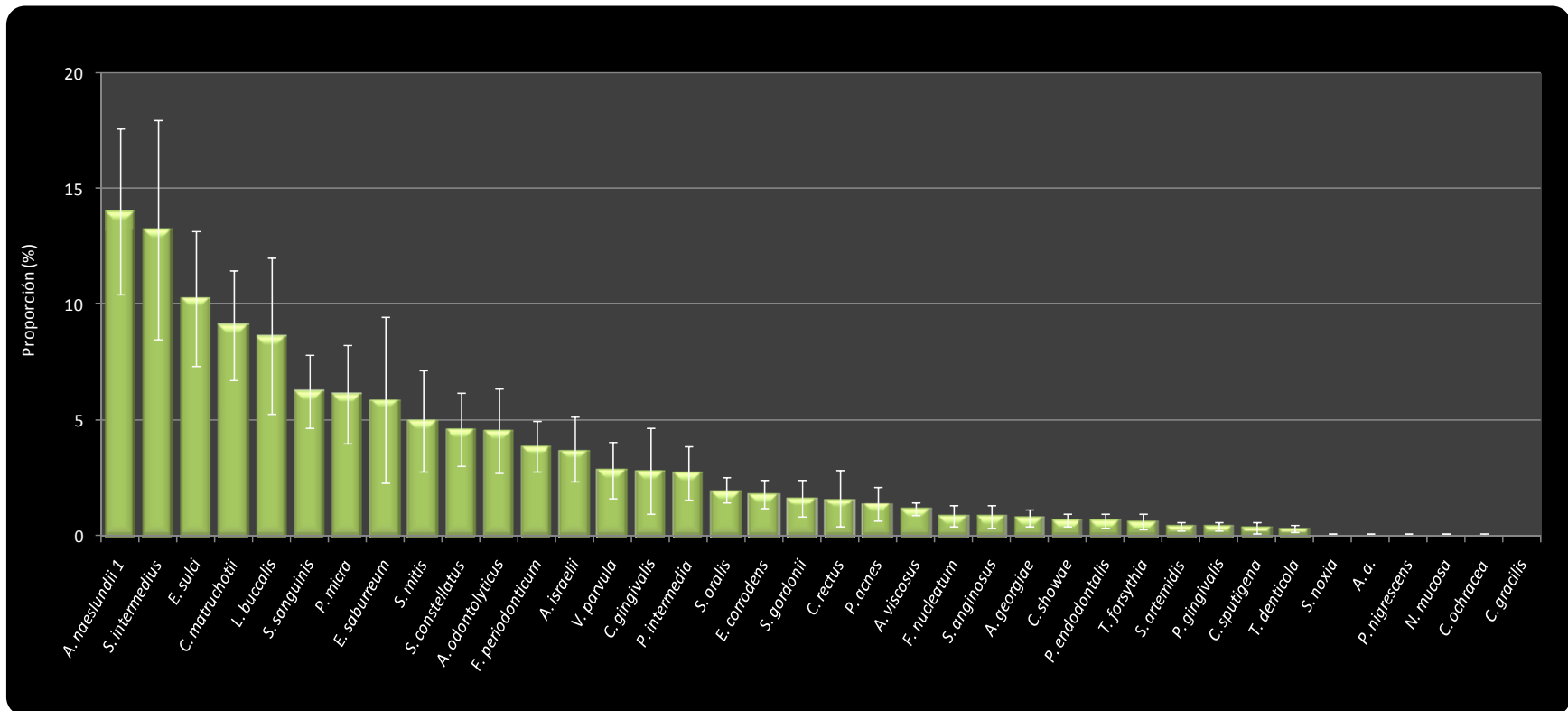


Figura 4. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales \pm EEM) de las 38 especies individuales en 54 muestras periapicales provenientes de 27 sujetos de estudio. Las proporciones fueron calculadas para cada especie en cada una de las muestras, promediadas entre las 2 muestras de cada sujeto y posteriormente entre los 27 sujetos de estudio. Los datos graficados en la presente figura se presentan en la **tabla 7. A. a.:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

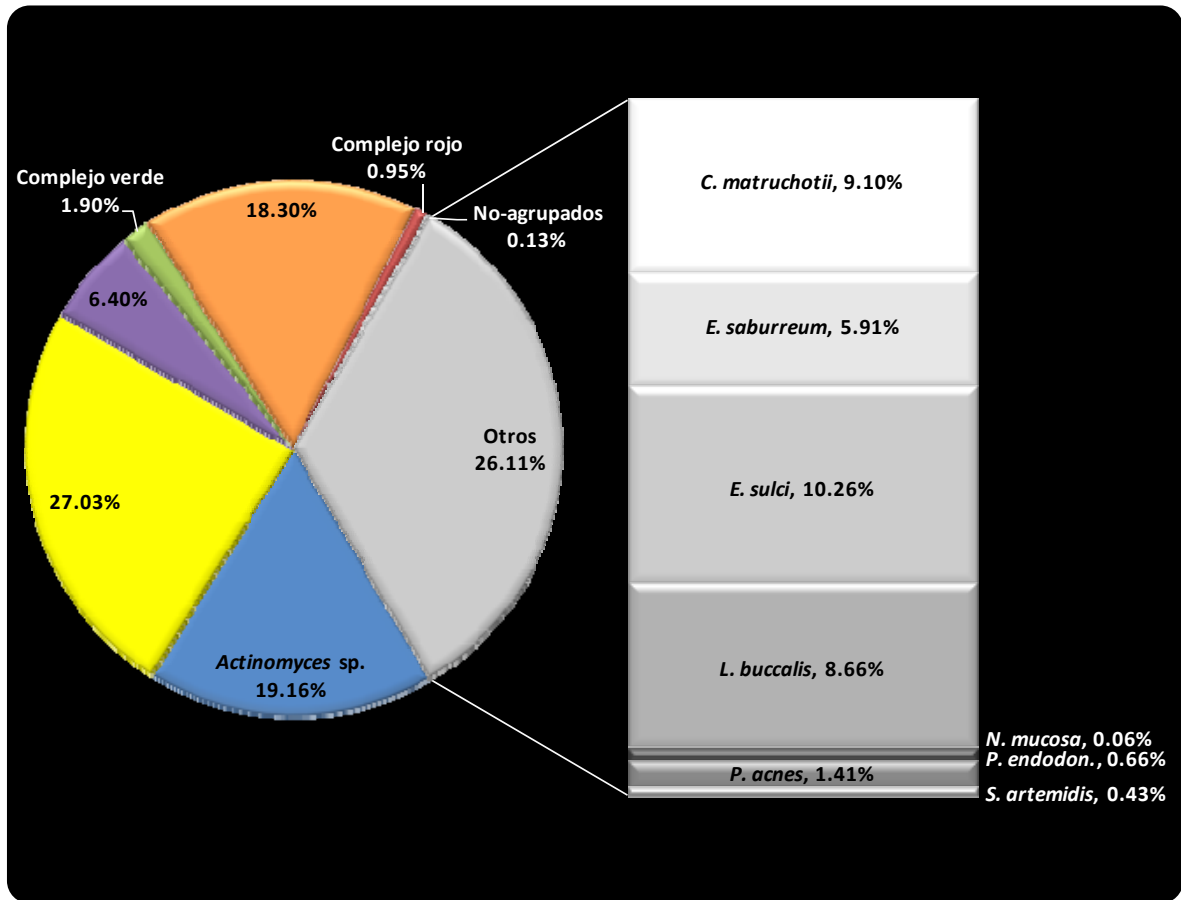


Figura 5. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales) de complejos bacterianos en muestras periapicales de 54 sujetos de estudio. Las 38 especies evaluadas fueron agrupadas en 8 complejos de acuerdo con la descripción de complejos bacterianos en la placa subgingival (**Socransky & Haffajee 2005, Socransky et al. 1998**) (las excepciones se describen en la **tabla 8**). Las proporciones fueron calculadas para cada complejo bacteriano en cada una de las muestras tomadas, promediadas entre las 2 muestras de cada sujeto y posteriormente entre los 27 sujetos de estudio. Los datos graficados en la presente figura se presentan en la **tabla 8**. *P. endodon.*: *Porphyromonas endodontalis*.

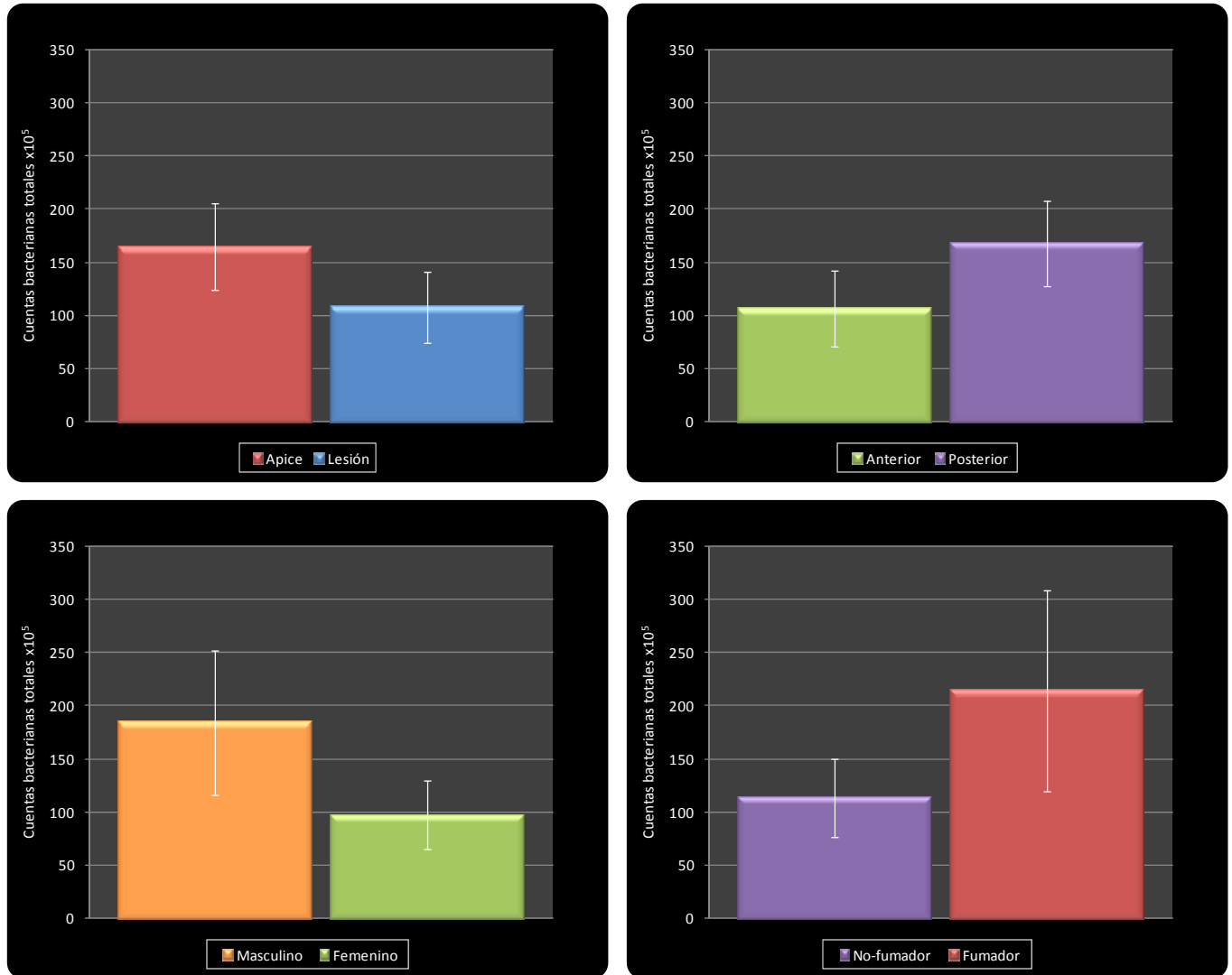


Figura 6. Histogramas comparativos de las cuentas bacterianas totales promedio ($\times 10^5 \pm$ EEM) de las especies evaluadas en 54 muestras periapicales provenientes de 27 pacientes. Cada gráfica muestra la comparación entre las cuentas bacterianas totales detectadas en muestras o sujetos, de acuerdo con 4 parámetros de comparación distintos: muestras tomadas del ápice vs. de la lesión periapical (superior izquierda), muestras tomadas de dientes anteriores vs. posteriores (superior derecha), sujetos del género masculino vs. femenino (inferior izquierda), y sujetos no-fumadores vs. fumadores (inferior derecha). Las diferencias en las cuentas totales promedio no fueron estadísticamente significativas para ninguna de las comparaciones (prueba U de Mann-Whitney). Los datos graficados en la presente figura se presentan en las **tablas 9, 13, 17 y 21**.

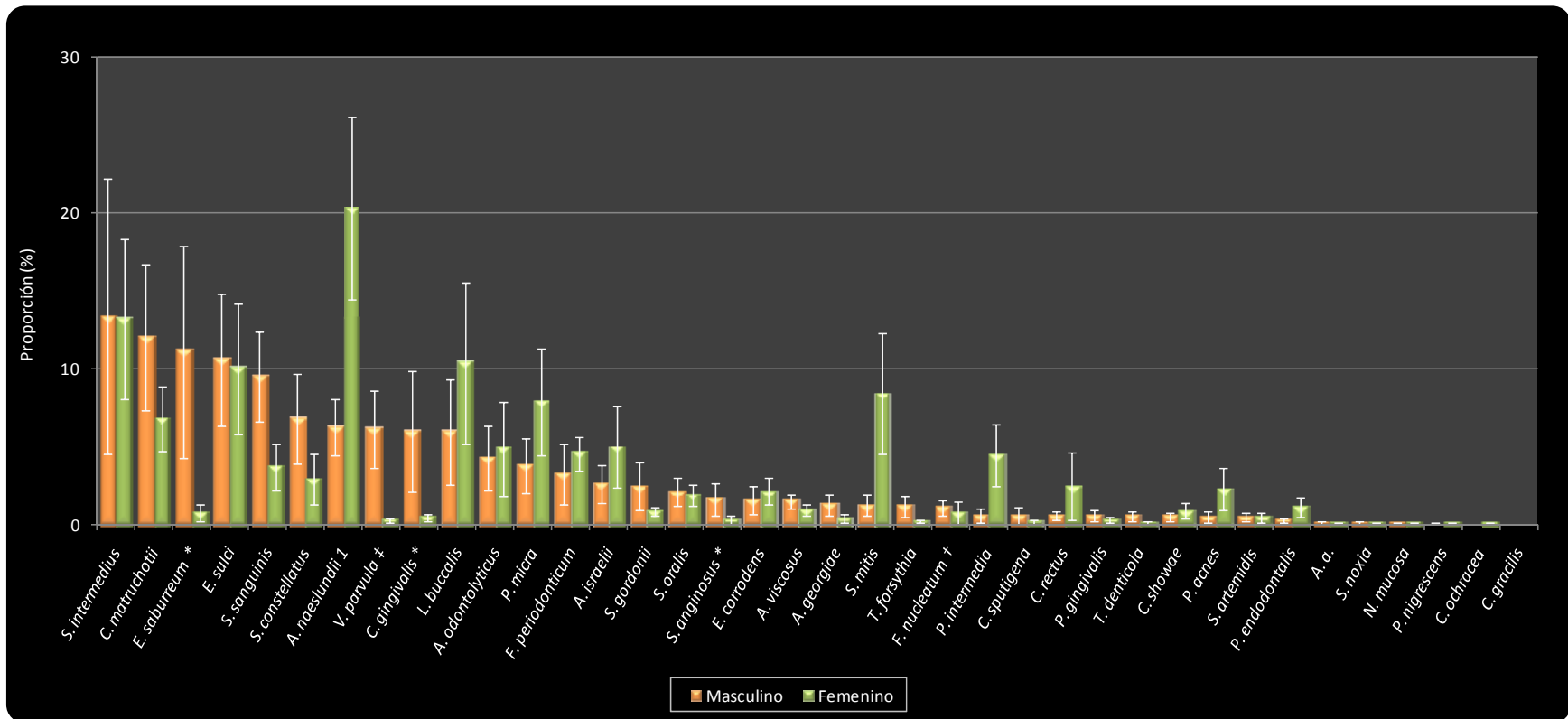


Figura 7. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales \pm EEM) de las 38 especies individuales en muestras periapicales de sujetos de los géneros masculino y femenino. Los datos se presentan en orden decreciente en relación a las proporciones detectadas en el grupo de sujetos del género masculino. Los datos graficados en la presente figura se presentan en la **tabla 19**. * $p < 0.05$, † $p < 0.01$ y ‡ $p < 0.001$ prueba U de Mann-Whitney. **A. a.:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

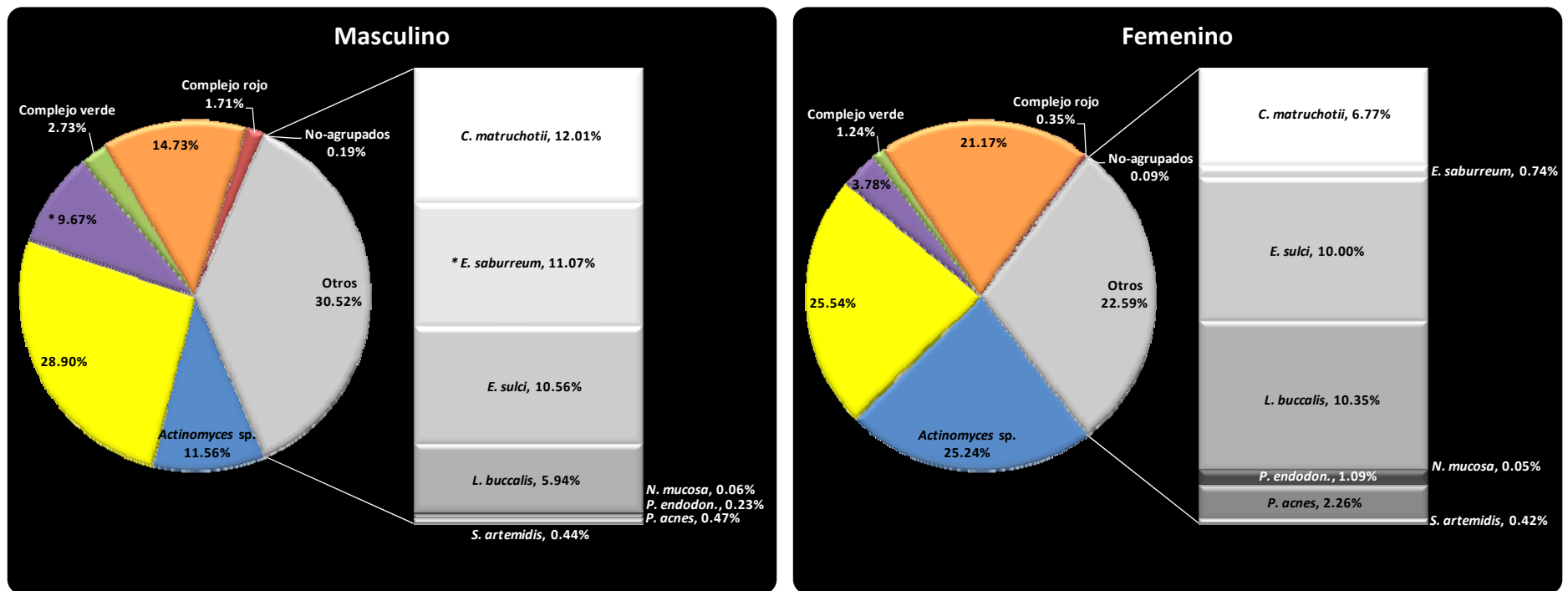


Figura 8. Gráficas comparativas de proporciones promedio (% de cuentas bacterianas totales) de complejos bacterianos en muestras periapicales de sujetos de los géneros masculino y femenino. Las 38 especies evaluadas fueron agrupadas en 8 complejos de acuerdo con la descripción de complejos bacterianos en la placa subgingival (Socransky & Haffajee 2005, Socransky *et al.* 1998) (las excepciones se describen en la **tabla 8**). Los datos graficados en la presente figura se presentan en la **tabla 20**. * $p < 0.05$ prueba U de Mann-Whitney. *P. endodon.*: *Porphyromonas endodontalis*.

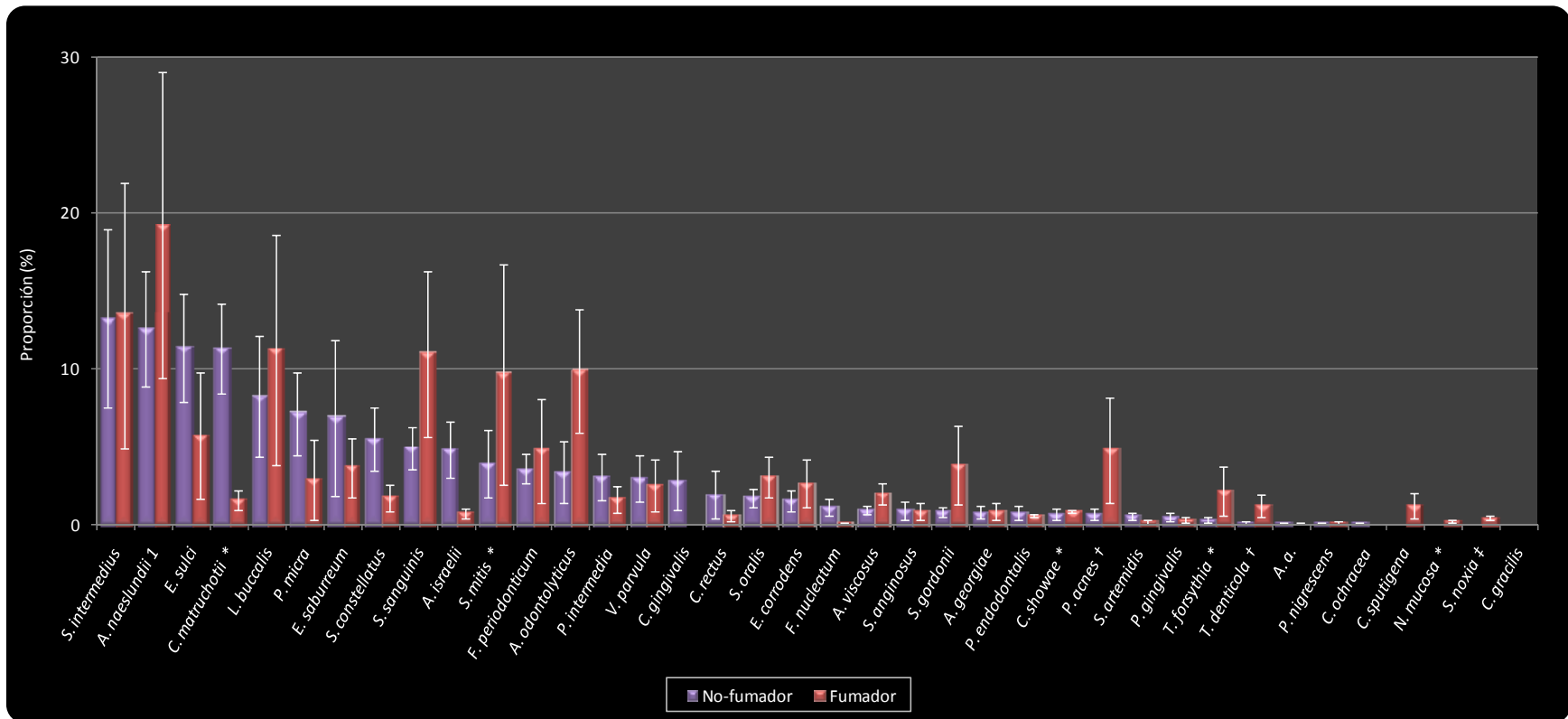


Figura 9. Proporción promedio (% de cuentas bacterianas totales ± EEM) de las 38 especies individuales en muestras periapicales de sujetos fumadores y no-fumadores. Los datos se presentan en orden decreciente en relación a las proporciones detectadas en el grupo de sujetos no-fumadores. Los datos graficados en la presente figura se presentan en la **tabla 23**. * $p < 0.05$, † $p < 0.01$ y ‡ $p < 0.001$ prueba U de Mann-Whitney. **A. a.:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

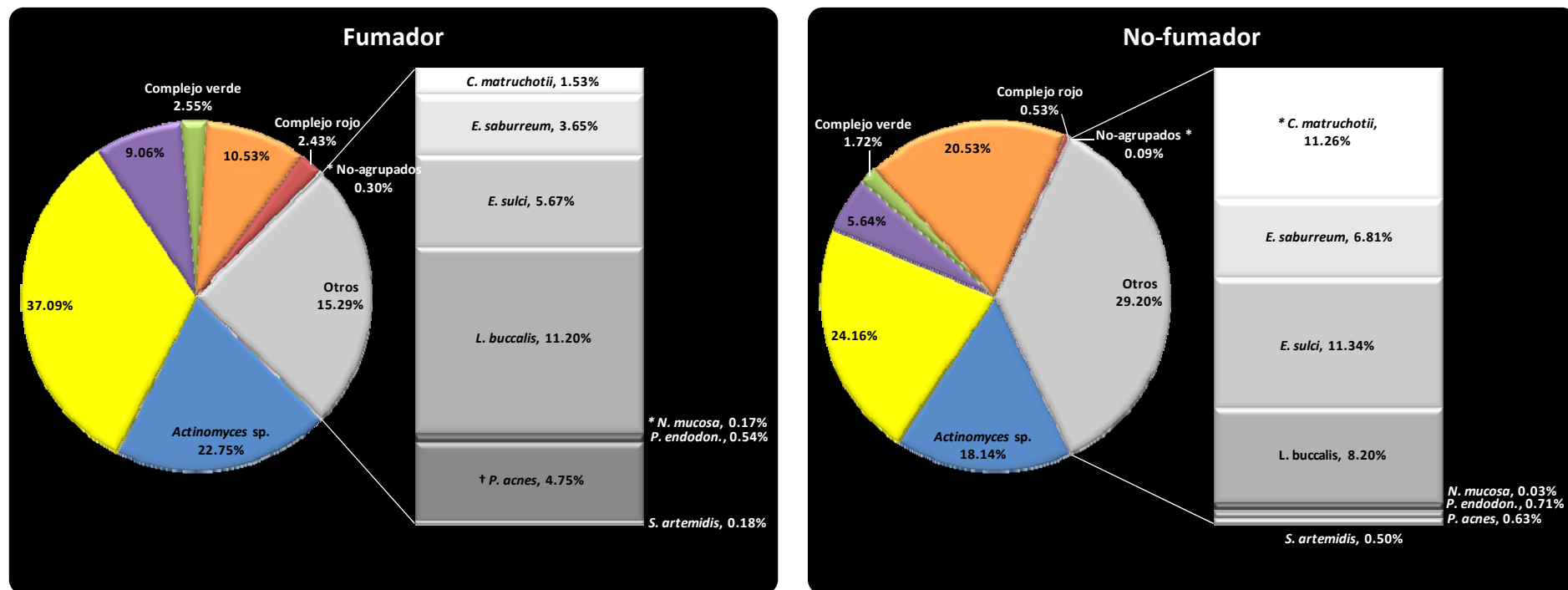


Figura 10. Gráficas comparativas de proporciones promedio (% de cuentas bacterianas totales) de complejos bacterianos en muestras periapicales de sujetos fumadores y no-fumadores. Las 38 especies evaluadas fueron agrupadas en 8 complejos de acuerdo con la descripción de complejos bacterianos en la placa subgingival (Socransky & Haffajee 2005, Socransky *et al.* 1998) (las excepciones se describen en la **tabla 8**). Los datos graficados en la presente figura se presentan en la **tabla 24**. * $p < 0.05$ y † $p < 0.01$ prueba U de Mann-Whitney. *P. endodon.*: *Porphyromonas endodontalis*.

ANEXOS

ANEXO 1. FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Dra. Laurie Ann Ximénez-Fyvie

CLÍNICOS RESPONSABLES: CD. Ricardo González-Plata Rivera

INSTITUCIÓN: Laboratorio de Genética Molecular
Div. de Estudios de Posgrado e Investigación
Facultad de Odontología, UNAM

TELÉFONOS: 5622-5565-Laboratorio y 5639-2202-Clínica (horas y días hábiles)

TÍTULO DEL PROYECTO: Descripción de la composición microbiológica de lesiones periapicales.

Documento de acuerdo a la norma oficial mexicana (NOM) para la prevención y control de enfermedades bucales NOM-013-SSA2-1994.

INVITACIÓN A PARTICIPAR: Usted está invitado a participar en un estudio de investigación para determinar cuáles son los microorganismos que se encuentran en las lesiones periapicales de sujetos Mexicanos.

PROPÓSITO: Usted debe entender que el objetivo del estudio es determinar cuáles son los microorganismos que están involucrados en la formación de lesiones periapicales en la población Mexicana. Esta información es importante para el mejor entendimiento de las enfermedades endodónticas en México y el diseño de nuevas estrategias de tratamiento.

PROCEDIMIENTOS: Usted debe entender que para participar en el estudio debe haber nacido en la República Mexicana y vivido en ella por lo menos durante los último 10



años, debe tener más de 20 años y encontrarse en buen estado de salud general. Además, debe haber recibido tratamiento completo de endodoncia hace un año o más, no puede haber tomado ningún tipo de antibiótico en los últimos 3 meses y debe haber sido programado para la realización de cirugía periapical por su clínico tratante. 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 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 atiende y la medición de su peso, estatura, presión sanguínea, pulso y porcentaje de grasa corporal.
- **La realización de una evaluación endodóntica y periodontal del diente afectado**, la cual consistirá en la toma de una o más radiografías y la medición de 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 del diente afectado. Este es un procedimiento de rutina ampliamente utilizado en la práctica dental.
- **La toma de 2 (dos) muestras de su lesión periapical**, lo cual llevará aproximadamente 15 (quince) minutos adicionales al tiempo de la cirugía. las muestras serán tomadas durante la realización de procedimientos quirúrgicos de




rutina sin que esto represente la necesidad de someterse a procedimientos o tratamientos diferentes a aquellos que se seguirían normalmente si no estuviera participando en el estudio. Cada muestra será colocada dentro de un tubo.

Usted debe entender que en este estudio participarán 50 (cincuenta) personas y que los análisis de laboratorio que se realizarán sobre sus muestras consistirán única y exclusivamente en el análisis microbiológico para detectar la presencia de diferentes especies de bacterias bucales, en especial aquellas que están implicadas en las enfermedades endodónticas.

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. Las evaluaciones que se le realizarán son las mismas que realiza cualquier dentista para determinar la salud de su diente. Las muestras se tomarán durante la cirugía, por lo que usted no será sometido a procedimientos adicionales a los que se emplean normalmente durante este tipo de tratamiento. En caso de presentarse alguna complicación o daño debido al procedimiento quirúrgico esta deberá ser atendida y resuelta por el odontólogo tratante y no por los integrantes del laboratorio. El odontólogo tratante será la persona responsable del resultado de la cirugía y de sus cuidados post operatorios.




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 endodónticas 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 a los números de teléfono que se encuentran en la parte superior de la primera página de esta forma.

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

_____ Nombre del Paciente	_____ Firma del Paciente	_____ Fecha (Día/mes/año)
_____ Nombre del Clínico Responsable	_____ Firma del Clínico Responsable	_____ Fecha (Día/mes/año)

ANEXO 2. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1.

Características de la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA.....69

TABLA 2.

Clasificación de especies representativas de los géneros *Porphyromonas* y *Prevotella*70



TABLA 3.	
Descripción general de casos y muestras	71
TABLA 4.	
Cepas de referencia utilizadas para la preparación de sondas de DNA.....	72
TABLA 5.	
Niveles promedio de 38 especies bacterianas en 54 muestras de lesiones periapicales.....	73
TABLA 6.	
Prevalencia promedio de 38 especies bacterianas en 54 muestras de lesiones periapicales.....	74
TABLA 7.	
Proporción promedio de 38 especies bacterianas en 54 muestras de lesiones periapicales.....	75
TABLA 8.	
Proporción promedio de complejos bacterianos en 54 muestras de lesiones periapicales.....	76
TABLA 9.	
Niveles promedio de especies individuales en muestras tomadas del ápice y de la lesión periapical.....	77
TABLA 10.	
Prevalencia promedio de especies individuales en muestras tomadas del ápice y de la lesión periapical.....	78
TABLA 11.	
Proporción promedio de especies individuales en muestras tomadas del ápice y de la lesión periapical.....	79
TABLA 12.	
Proporción promedio de complejos bacterianos en muestras tomadas del ápice y de la lesión periapical.....	80
TABLA 13.	
Niveles promedio de especies individuales en muestras tomadas de dientes anteriores y posteriores.....	81
TABLA 14.	
Prevalencia promedio de especies individuales en muestras tomadas de dientes anteriores y posteriores.....	82
TABLA 15.	
Proporción promedio de especies individuales en muestras tomadas de dientes anteriores y posteriores.....	83



TABLA 16.	Proporción promedio de complejos bacterianos en muestras tomadas de dientes anteriores y posteriores	84
TABLA 17.	Niveles promedio de especies individuales en muestras tomadas de pacientes masculinos y femeninos	85
TABLA 18.	Prevalencia promedio de especies individuales en muestras tomadas de pacientes masculinos y femeninos	86
TABLA 19.	Proporción promedio de especies individuales en muestras tomadas de pacientes masculinos y femeninos	87
TABLA 20.	Proporción promedio de complejos bacterianos en muestras tomadas de pacientes masculinos y femeninos	88
TABLA 21.	Niveles promedio de especies individuales en muestras tomadas de pacientes fumadores y no-fumadores.....	89
TABLA 22.	Prevalencia promedio de especies individuales en muestras tomadas de pacientes fumadores y no-fumadores.....	90
TABLA 23.	Proporción promedio de especies individuales en muestras tomadas de pacientes fumadores y no-fumadores.....	91
TABLA 24.	Proporción promedio de complejos bacterianos en muestras tomadas de pacientes fumadores y no-fumadores.....	92
FIGURA 1.	Imagen autorradiográfica de una membrana de nylon procesada mediante la técnica de “checkerboard” para hibridaciones DNA-DNA.....	93
FIGURA 2.	Niveles promedio de las 38 especies individuales en 54 muestras periapicales provenientes de 27 sujetos de estudio	94
FIGURA 3.	Prevalencia promedio de 38 especies individuales en 54 muestras periapicales provenientes de 27 sujetos de estudio	95
FIGURA 4.	Proporción promedio de las 38 especies individuales en 54 muestras periapicales provenientes de 27 sujetos de estudio	96

FIGURA 5.	
Proporción promedio de complejos bacterianos en muestras periapicales de 54 sujetos de estudio.....	97
FIGURA 6.	
Histogramas comparativos de las cuentas bacterianas totales promedio de las especies evaluadas en 54 muestras periapicales provenientes de 27 pacientes (ápice vs. lesión, anteriores vs. posteriores, masculino vs. femenino y no-fumadores vs. fumadores)	98
FIGURA 7.	
Proporción promedio de las 38 especies individuales en muestras periapicales de sujetos de los géneros masculino y femenino.....	99
FIGURA 8.	
Gráficas comparativas de proporciones promedio de complejos bacterianos en muestras periapicales de sujetos de los géneros masculino y femenino.....	100
FIGURA 9.	
Proporción promedio de las 38 especies individuales en muestras periapicales de sujetos fumadores y no-fumadores.....	101
FIGURA 10.	
Gráficas comparativas de proporciones promedio de complejos bacterianos en muestras periapicales de sujetos fumadores y no-fumadores.....	102

