

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE BIOPELÍCULA DE SUJETOS
PERIODONTALMENTE SANOS**

POR:

C.D. LUIS ALBERTO CAMPOS SÁENZ

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN ESTOMATOLOGÍA**

OPCIÓN PERIODONCIA

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

DICIEMBRE 2024



Análisis microbiológico de biopelícula de sujetos periodontalmente sanos. Tesis presentada por Luis Alberto Campos Sáenz como requisito para obtener el grado de Maestro en Estomatología opción periodoncia. Ha sido aprobada y aceptada por:

M.E.S. Juan Antonio Galache Vega
Director de la Facultad de Odontología

C.D.E.O. Rosa Margarita Aguilar Madrigal
Secretaria de Investigación y Posgrado

MC. Ana Delia Larrinua Pacheco
Directora de tesis

Dr. Carlos Esteban Villegas Mercado
Asesor de tesis

M.C Silvia Ivonne Arzola Rodríguez
Asesora de tesis

Fecha 29 de noviembre del 2024

Agradecimientos

Principalmente muestro mi agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Carlos Villegas Mercado por su paciencia, comprensión y ayuda que han sido indispensables durante el desarrollo de este trabajo de investigación. A la Dra. Ana Delia Larrinua Pacheco por apoyo desde el primer día de la maestría para el desarrollo de mis conocimientos y habilidades clínicas que contribuyeron a dar pie a esta tesis. Así mismo a la M.C. Silvia por confiar, capacitar y su gran apoyo para el trabajo realizado en el laboratorio y aportar con su gran conocimiento a llevar de una manera correcta los procesos y obtener unos resultados confiables. De nuevo agradezco por su tiempo, sugerencias, propuestas y comentarios para el termino de esta tesis.

Dedicatoria

Dedico mi tesis principalmente a mi familia, compañeros, amigos y docentes por ayudarme y motivarme a culminar esta meta.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
INTRODUCCIÓN	X
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. Periodonto	1
4.1.1 Unión Dento-Gingival	2
4.1.2 Cemento	3
4.1.3 Ligamento Periodontal	3
4.1.4 Hueso Alveolar	4
1.2. Salud periodontal	6
1.3. Microbiología periodontal	7
1.4. Microorganismos protectores	9
1.5. Microorganismos desencadenantes	10
1.6. Desarrollo de la Enfermedad Periodontal	11
1.7. Enfermedad periodontal	13
1.7.1 Gingivitis	13
1.7.2 Periodontitis	14
1.7.3 Enfermedades Necrotizantes	16
1.7.4 Abscesos Periodontales	16
1.7.5 Factores Sistémicos	17
2. Antecedentes	18
3. Planteamiento del problema	21
4. Justificación	22
5. Hipótesis	23
6. Objetivo general	24
7. Objetivos específicos	25
8. Metodología	26
8.1. Tipo de estudio	26
8.2. Diseño de estudio	26
8.3. Población de estudio	26
8.4. Lugar de realización	26
8.5. Criterios de selección	27
11.5.1 Criterios de Inclusión	27
11.5.2 Criterios de Exclusión	27
11.5.3 Criterios de Eliminación	27
8.6. Operación de las variables	28
8.7. Materiales	28
8.8. Métodos	29

11.8.1 Toma de Muestra	29
11.8.2 Siembra de Muestras	30
11.8.3 Obtención de Cultivos Puros	30
11.8.4 Caracterización Macroscópica	31
11.8.5 Caracterización Microscópica	31
11.8.6 Caracterización Bioquímica	33
8.9. Análisis estadístico	34
8.10. Aspectos éticos	34
9. Resultados	35
10. Discusión	39
11. Referencias bibliográficas	46
12. Anexos	55
12.1 Anexo 1 Morfología Bacteriana Macroscópica	55
12.2 Anexo 2 API 20A	56
12.3 Anexo 3 API 20 Step	56
12.4 Anexo 4 Historia Clínica	57
12.5 Anexo 5 Consentimiento Informado	59

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Pág.
Figura 1 Tejidos periodontales.....	1
Tabla 1 Operacionalización de variables	28
Figura 2 Odontograma	30
Tabla 2 Resultado.....	35

RESUMEN

Introducción: La enfermedad periodontal se caracteriza por la destrucción progresiva de los tejidos que conforman el aparato de inserción periodontal (AIP): hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento radicular. La enfermedad periodontal tiene una amplia prevalencia a nivel local y global, lo que se traduce en un porcentaje amplio y significativo de la población con destrucción tisular en el AIP. A la fecha se carece de terapias que alcancen la regeneración de todos los tejidos que conforman el AIP. Por este motivo cobran relevancia aquellos proyectos de investigación que centran sus esfuerzos en la prevención de la aparición de la enfermedad periodontal. La identificación de microorganismos orales presentes en pacientes periodontalmente sanos permitirá un entendimiento de las interacciones bacterianas que conservan el estado de salud periodontal. En pacientes periodontalmente sanos se tomaron muestras de biofilm oral, las muestras se sembraron, se caracterizaron macroscópicamente y microscópicamente para pasar a una segunda siembra en condiciones de microaerofilia. Posteriormente se realizó la caracterización bioquímica utilizando las pruebas API 20 A y API 20 STREP. Se muestrearon 15 pacientes con salud periodontal clínica. A partir de las muestras de trabajo se identificaron 11 colonias bacterianas distintas entre las que destacan *Bifidobacterium dentium* la cual es asociada a la reducción de agentes periodontopatogénicos del complejo rojo. y *P. distasonis*, que poseen propiedades antiinflamatorias *in vivo* e *in vitro*. Durante la identificación de microorganismos aislados de biofilm oral de pacientes periodontalmente sanos se encontraron tanto microorganismos desencadenantes de la enfermedad periodontal como microorganismos protectores de la misma (en menor número). Por lo que probablemente puedan actuar como probióticos para prevenir la enfermedad periodontal.

ABSTRACT

Introduction: Periodontal disease is characterized by the progressive destruction of the tissues that conform the Periodontal Attachment Apparatus (PAA): alveolar bone, periodontal ligament and root cementum. Periodontal disease has a wide prevalence at local and global level, which translates into a large and significant percentage of the population with tissue destruction in the PAA. To date, there are no therapies that achieve the regeneration of all the tissues from the PAA. For this reason, those research projects that focus their efforts on preventing the onset of periodontal disease become relevant. The identification of oral microorganisms present in periodontally healthy patients will allow an understanding of the bacterial interactions that maintain periodontal health. Oral biofilm samples were taken from periodontally healthy patients, the samples were cultured, characterized macroscopically and microscopically, and then cultured again under microaerophilic conditions. Biochemical characterization was then performed using the API 20 A and API 20 STREP tests. 15 patients with clinical periodontal health were sampled. From the samples, 11 distinct bacterial colonies were identified, including *Bifidobacterium dentium*, which is associated with the reduction of periodontopathogenic agents of the red complex, and *P. distasonis*, which has anti-inflammatory properties *in vivo* and *in vitro*. During the identification of microorganisms isolated from oral biofilm of periodontally healthy patients, both microorganisms that trigger periodontal disease and microorganisms that protect against it (in smaller numbers) were found. Therefore, they can probably act as probiotics to prevent periodontal disease.

INTRODUCCIÓN

El presente documento de tesis cuenta con una estructura clásica en el área de la salud y las ciencias biomédicas en general. A continuación, se encuentra el marco teórico, en esta sección se recopiló la información más novedosa sobre temas que ayudaran a los futuros lectores a entender el propósito, resultados y conclusiones de este trabajo. Posteriormente se presentan los antecedentes, los cuales son trabajos de investigación previos que tuvieron un papel relevante para el diseño de este proyecto de investigación.

En planteamiento del problema se busca dejar claro que problema y/o brecha de información se identificó en el área de la periodoncia y que fue atendida con nuestro proyecto de investigación. En la justificación buscamos dejar claro la relevancia del proyecto, la pertinencia de realizar esta investigación en este momento y con estas variables, así como las aplicaciones que pueden tener los resultados obtenidos. A continuación, se presenta la hipótesis de trabajo, la cual fue aceptada o rechazada cuando se alcanzaron los objetivos específicos y el objetivo general. Para poder realizar esto, se planteó y ejecuto la metodología descrita, lo cual nos permitió coleccionar y analizar los resultados, mismos que fueron utilizados para elaborar la discusión del documento, en la cual se realiza un análisis de los resultados de mayor relevancia y las aplicaciones que tienen los mismos. Lo cual se engloba en la conclusión del documento.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Periodonto

Según Guo en 2022, el periodonto, se define como los tejidos que soportan y dan revestimiento al diente, el cual se compone por cuatro tejidos: el hueso alveolar, ligamento periodontal, cemento radicular y la encía^[1]. Para un correcto funcionamiento del periodonto se necesita de integridad estructural e interacción entre sus componentes^[2]. En condiciones fisiológicas normales, estos tejidos periodontales rodean y dan sostén a los dientes^[3]. Por la complejidad en composición de este sistema de soporte, si no se encuentra en salud, puede desencadenar varios problemas o situaciones desfavorables para los dientes y la

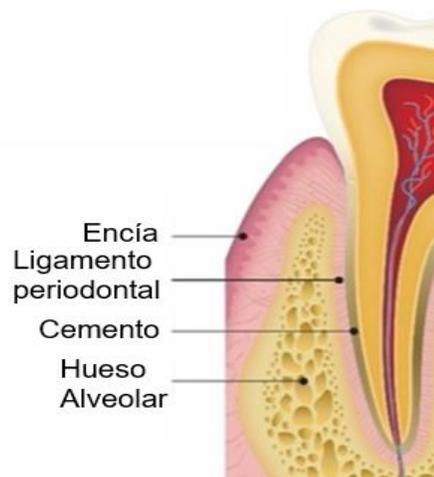


Figura 1. Tejidos periodontales. El periodonto se compone por dos tejidos conectivos blandos (Ligamento periodontal y encía) y dos tejidos mineralizados altamente especializados (hueso alveolar y cemento radicular). Su principal función es anclar los órganos dentarios a los procesos maxilares. Esta función se lleva a cabo mediante hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento radicular (aparato de inserción periodontal). Este aparato de inserción es atacado durante la enfermedad periodontal. Por tal motivo también es la meta dorada de las terapias de regeneración periodontal.

cavidad oral en general^[4]. En la figura 1 podemos observar los tejidos periodontales en un estado de salud^[5].

1.1.1 Unión dentogingival

La unión dentogingival es una estructura compleja y única, la cual es responsable de unir la mucosa oral al diente, esta se divide en tejido epitelial y conectivo^[6].

Tejido epitelial: se compone del epitelio de unión, el epitelio del surco y el epitelio gingival oral^[7]. Entre ellos, el epitelio de unión crea un mecanismo de cierre o sello al adherirse a la superficie del diente por medio de las hemidesmosomas, por lo que actúa como la primer protección ante infecciones bacterianas periodontales^[8]. Sin embargo, los mecanismos de defensa antimicrobianos del epitelio de unión no impiden el desarrollo de lesiones gingivales y periodontales^[9].

Tejido conectivo: El tejido conectivo gingival (también conocido como lámina propia) está compuesto de fibras de colágeno, células y sustancia fundamental (proteoglicanos y glicoproteínas)^[10]. Las células constituyen el 5% del tejido conectivo, las fibras de colágeno el 60% y la sustancia fundamental el 35%^[11]. Las diferentes células encontradas en este tejido incluyen; fibroblastos, mastocitos, macrófagos y células de la inflamación^[12]. La célula predominante son los fibroblastos y son responsables de la formación de fibras colágenas y sustancia fundamental que se encuentran en este tejido^[13].

1.1.2 Cemento

El cemento radicular es tejido conectivo avascular y duro el cual reviste las raíces dentales y su función principal es unir las fibras del ligamento periodontal al diente^[2]. El cemento proporciona unión entre la raíz propiamente dicha, al ligamento periodontal circundante y este a su vez al hueso alveolar^[14]. Se clasifica en cemento celular y acelular, que son distintos en ubicación y función^[15]. El cemento acelular ancla al ligamento periodontal por sus principales fibras a la superficie radicular cervical y es fundamental para la inserción de los dientes y la función periodontal^[16]. El cemento celular recubre la porción apical de la raíz y proporciona una función adaptativa para mantener el diente en su posición oclusal^[17].

1.1.3 Ligamento periodontal

El ligamento periodontal (LPD) es un tejido conectivo blando, principalmente compuesto por colágeno (tipo I, III, V, VI y XII), haces de fibras y células entre las raíces dentales y paredes internas del alveolo^[16]. Los haces de fibras se disponen entre los dientes y hueso, con ambos extremos incrustados en el cemento o hueso alveolar, y se puede clasificar en varios tipos distintos: fibras oblicuas y apicales, fibras horizontales, fibras de la cresta alveolar, y fibras interradiculares^[18]. Tiene un ancho de 0,15 a 0,38 mm, con su parte más delgada alrededor del tercio medio de la raíz, mostrando una disminución progresiva del grosor con la edad^[19].

Es un tejido conectivo particularmente bien adaptado a su función principal, mantiene los dientes en sus alveolos mediante las fibras de Sharpey y permitiéndoles al mismo tiempo soportar las considerables fuerzas de la masticación^[19]. Además, el ligamento periodontal tiene la capacidad de actuar como un receptor sensorial necesario para el correcto posicionamiento del maxilar y mandíbula durante la masticación^[20] y, muy importante, es un reservorio celular para la reparación y homeostasis de los tejidos/regeneración^[21].

1.1.4 Hueso alveolar

Es el tejido óseo en el que se encuentran los alvéolos (cavidades) para órganos dentales, esta compuesto por placas corticales externas (vestibular y palatina o lingual) que son de hueso compacto, una placa central de hueso esponjoso y hueso que recubre el alvéolo (hueso fasciculado)^[20]. En la crestra alveolar se encuentran la placa cortical y el hueso que recubre el alveolo^[22]. El hueso que recubre el alvéolo se denomina específicamente hueso fasciculado (bundle bone) el cual proporciona unión a las fibras del ligamento periodontal, este, generalmente es más delgado en maxilar y más grueso en la porción bucal de premolares y molares en mandíbula^[23]. El hueso esponjoso (o trabecular) que se encuentra en la parte central del proceso alveolar también consiste de hueso dispuesto en laminillas, con presencia de sistemas Haversianos en las trabéculas de mayor tamaño^[24]. La presencia del hueso fasciculado a través de todo el alveolo separa anatómica y fisiológicamente el hueso de soporte del ligamento periodontal^[25].

El hueso alveolar es un tejido óseo único debido a su integración con la dentición y su proximidad a las biopelículas orales, este depende del desarrollo, la erupción y el mantenimiento de los dientes^[26]. Las funciones principales del hueso alveolar son proteger las raíces dental y apoyar la función masticatoria, además funciona como fuente de células madre hematopoyéticas y mesenquimales y es un reservorio de calcio, fósforo y magnesio^[27].

1.2 Salud periodontal

Según Lang en su artículo publicado en 2018, la salud periodontal se define como un estado libre de enfermedad periodontal inflamatoria que permite al individuo funcionar con normalidad sin sufrir ninguna consecuencia (mental o física) como resultado de una enfermedad pasada^[28]. En otras palabras, es no presentar sangrado, hinchazón, dolor o pérdida de inserción de los tejidos periodontales^[29]. Para determinar la salud periodontal hay 3 agentes principales (microbiológicos, huésped y medio ambiente)^[30]. Las posibles interacciones entre especies individuales, entre la biopelícula, el medio ambiente y el huésped se han estudiado principalmente utilizando sistemas modelo *in vitro*^[31]. Si bien estos modelos no pueden imitar por completo el entorno del huésped, proporcionan una base para plantear y probar hipótesis mecánicas de interacciones microorganismo-microorganismo y microorganismo-huésped que contribuyen a la salud y la enfermedad bucal^[32].

Los signos clínicos de salud periodontal son ausencia/mínimo sangrado al sondaje (menos del 10% para una gingivitis localizada o 30% para generalizada^[33]. Movilidad dental no mayor a 0.2 mm y con apoyo radiográfico observar una lámina dura intacta, con ausencia de pérdida ósea en furca y una distancia promedio de 2 mm desde la porción más coronal del hueso (CA) a la unión cemento esmalte (UCE)^[28]. La distancia de la UCE a la CA en un estado de salud periodontal varía entre 1,0 y 3,0 mm^[28, 34].

1.3 Microbiología periodontal

Tanto las superficies dentales como los tejidos blandos de la mucosa oral están colonizados por una de las comunidades microbianas más heterogéneas que se encuentran en el cuerpo humano^[35]. Ocupando el segundo lugar en términos de diversidad de especies y complejidad solo después de la microbiota gastrointestinal^[36]. En esta comunidad microbiana de la cavidad oral podemos encontrar bacterias, hongos y virus^[37]. Las distintas condiciones ambientales en los diferentes sitios de la cavidad oral (dientes, surco gingival, encía adherida, lengua, mucosa, labios y palada) proporcionan varios hábitats diferentes para bacterias específicas que forman comunidades asociadas a la superficie (biopelículas) altamente organizadas estructural y funcionalmente^[38], estas están dentro de una matriz extracelular que las protege y da resistencia^[39].

La comunidad microbiana subgingivales son conglomerados dinámicos^[40]. Estas entidades complejas albergan microorganismos de los 3 dominios de la vida: Bacteria, Arquea y Eucariota^[41]. Las bacterias son el componente más numeroso y diverso del microbiota subgingival, en la actualidad, se han identificado alrededor de 500 especies diferentes en el biofilm subgingival en humanos^[42]. La composición de la comunidad bacteriana subgingival es diferente en salud, gingivitis y periodontitis^[43].

En el estudio realizado por Socransky et al., 1998 en 185 adultos, periodontalmente sanos se observaron consistentemente 5 complejos bacterianos principales^[44]. El primer complejo estaba conformado por *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Bacteroides forsythus* ^[45]. Un segundo complejo constaba de miembros de la subespecie *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* y *Peptostreptococcus micros*, las especies asociadas a este grupo incluyeron: *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Streptococcus constellatus* y *Campylobacter gracilis*^[46]. Un tercer complejo estaba formado por *Streptococcus sanguis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii* y *S. intermedius*^[46]. El cuarto complejo estaba compuesto por 3 especies de *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*^[47]. Y por último un quinto complejo estaba formado por *Veillonella párvula*, *Actinomyces naeslundii* (*A. viscosus*), *Actinomyces odontolyticus*, *Selenomonas noxia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* fueron valores atípicos con poca relación entre sí y con los 5 complejos principales^[48]. El primer complejo se relacionó sorprendentemente con las medidas clínicas de la enfermedad periodontal, en particular la profundidad de la bolsa y el sangrado al sondaje^[44].

1.4 Microorganismos protectores

Existe una interacción entre el huésped y ciertas bacterias que contribuyen al desarrollo del sistema inmunitario y la prevención de la invasión y el crecimiento de microorganismos extraños y potencialmente dañinos^[49]. Hay evidencia de que bacterias, hongos y virus tienen interacciones sinérgicas o antagónicas para mantener la salud o alterar la estabilidad del microbioma oral residente^[50]. Por ejemplo, algunas especies bacterianas de la cavidad oral, como ciertas cepas de *S. mutans*, pueden prevenir la invasión y el posible crecimiento de agentes microbianos al sintetizar pequeños péptidos antimicrobianos conocidos como bacteriocinas^[36]. También, *Candida albicans* tiene acción sinérgica o antagónica con la microbiota bacteriana oral que parece influir en el comportamiento de las bacterias orales y desempeñan un papel protector para las bacterias como *P. gingivalis* y pueden soportar infecciones gingivales bacterianas^[51].

Las bacterias relacionadas con la salud periodontal contienen microorganismos tempranos formadores de colonias, incluidos *Gemella* spp., *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Capnocytophaga*, *Atopobium* spp. y *Fusobacterium nucleatum*,^[52]. Miembros de *Veillonella*, *Streptococcus*, y los géneros *Capnocytophaga* se consideran útiles para el anfitrión, además, investigaciones moleculares muestran un fuerte vínculo entre especies singulares no cultivadas como *Bacteroides oral clon BU063* y salud periodontal^[53]. Se ha

demostrado que muchas cepas de lactobacilos y estreptococos tienen actividad antibacteriana contra patobiontes como *P. gingivalis*, *S. mutans*, *P. intermedia* y *A. actinomycetemcomitans* en investigaciones *in vitro*^[54] así como los *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*^[55].

1.5 Microorganismos desencadenantes

La relación entre la inflamación periodontal y la biopelícula en el surco gingival es fundamental para comprender la patología de la periodontitis^[56]. Ambos cumplen un papel significativo en la etiología y patogénesis de las enfermedades periodontales y ambos actúan con sinergia^[57]. La enfermedad no se origina en un solo patógeno, sino de la interacción cooperativa polimicrobiana y la disbiosis, que perturban la biopelícula ecológicamente estable correlacionada con homeostasis del tejido periodontal^[58].

La periodontitis relacionada con biopelículas es compleja y está compuesta por muchas capas de células^[59]. Tres bacterias anaerobias orales, incluidas *P. gingivalis*, *Treponema denticola* y *Tannerella*, han sido consideradas como factor causante de periodontitis, basándose en sus características de virulencia y una fuerte relación con las partes involucradas en la enfermedad^[60]. Los microorganismos que más se repiten en diferentes estudios son: *P. gingivalis*, *T. forsythia* y *T. denticola* que se encuentran en el complejo rojo de patógenos y se asocian principalmente a sujetos con periodontitis^[61]. Además, los patógenos del

complejo naranja, las especies *Fusobacterium*, *Prevotella* y *Campylobacter*, a menudo están relacionados con la periodontitis^[62]. Algunos patobiontes, como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* o, en particular, *Porphyromonas gingivalis*, han desarrollado métodos sofisticados para perturbar la integridad estructural y funcional del epitelio de unión.^[9]

1.6 Desarrollo de la Enfermedad Periodontal

El paso de salud a enfermedad periodontal se produce debido a las interacciones entre los sistemas inflamatorio e inmunitario del huésped y los complejos bacterianos^[63]. La teoría clásica sugiere que la enfermedad ocurre cuando se altera el balance entre la defensa del huésped y los complejos bacterianos^[64]. Sin embargo, recientemente se han postulado teorías alternativas para explicar el inicio de la enfermedad periodontal^[65]. Entre las que destacan la que menciona que estos complejos bacterianos probablemente respondan de manera diferente entre los individuos periodontalmente sanos y los que desarrollan enfermedad periodontal^[66]. Otra teoría sugiere que los complejos bacterianos son diferentes entre sujetos periodontalmente sanos y sujetos que desarrollan enfermedad periodontal^[67].

La acción de respuesta inmuno-inflamatoria del huésped involucrada para el mantenimiento de la salud periodontal se identifica inicialmente por una inflamación aguda (gingivitis) a la biopelícula supragingival y subgingival, sostenida por la células del sistema inmunológico innato, donde actúan células epiteliales, fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, proteínas del complemento y neuropéptidos^[68]. La eliminación de la biopelícula conduce a la resolución progresiva de la inflamación y al restablecimiento de la homeostasis individual^[69]. Cuando no se resuelve la gingivitis se activa la inmunidad adquirida, este evento ocurre a través del procesamiento y presentación de antígenos por linfocitos, macrófagos y células dendríticas y está regulado por citocinas de inmunidad adaptativa, que incluyen a: interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4) e interferón-gamma (IFN- γ)^[69].

La composición bacteriana de la biopelícula subgingival asociada a la gingivitis y periodontitis es resultado de interacciones dinámicas con su microambiente^[70]. Habitualmente, la composición bacteriana es un conjunto de organismos comensales que coexisten en una armonía relativa^[71]. No obstante, si se altera el entorno, ya sea por la inflamación de los tejidos gingivales u otros procesos, dentro de la biopelícula, un estado de disbiosis puede desencadenar el crecimiento excesivo de componentes más virulentos de la biopelícula, teniendo como resultado un aumento de inflamación periodontal^[72].

1.7 Enfermedad periodontal

1.7.1 Gingivitis

El inicio de esta enfermedad inflamatoria ocurre si la biopelícula dental se acumula por días o semanas sin ser eliminada^[73]. Debido a una pérdida de simbiosis entre los microorganismos presentes en la cavidad oral y el huésped el cual presenta una respuesta inmunoinflamatoria y desarrollo de una disbiosis incipiente^[74]. Las características clínicas de la gingivitis y síntomas de inflamación se limitan a la encía libre y adherida pero no se extienden más allá de la unión mucogingival^[66]. Generalmente se necesita estar presente una alta carga de biopelícula bacteriana para dar inicio o aumentar la magnitud de la lesión (sin embargo, puede variar entre individuos)^[75].

Los principales signos de gingivitis son encías rojas, inflamadas y sangrantes al cepillado o sin motivo aparente^[76]. La gingivitis generalmente no causa ningún dolor ni otros síntomas, por lo que pasa desapercibida durante bastante tiempo^[77]. Si bien la gingivitis no provoca por sí sola la pérdida de dientes, el no atender adecuadamente la gingivitis evoluciona a enfermedad periodontal^[78], la cual, si tiene la capacidad de generar la degradación de tejidos periodontales, lo cual conduce eventualmente a perder prematuramente órganos dentarios^[79].

1.7.2 Periodontitis

La periodontitis o enfermedad periodontal se considera como una inflamación crónica asociada con biopelículas disbióticas y multifactorial que se caracteriza por la degradación progresiva del aparato de inserción dental^[80]. Sus principales signos incluyen la pérdida de soporte del tejido periodontal, que se observa a través de la pérdida de inserción clínica y pérdida ósea alveolar analizada por medio de radiografías, presencia de bolsas periodontales, así como sangrado gingival^[81]. La enfermedad periodontal es un problema importante de salud pública por su alta prevalencia, y porque conduce a la pérdida de dientes y discapacidad, afectando negativamente la estética y la función masticatoria^[80]. La enfermedad periodontal es una proporción importante de disfunción masticatoria y edentulismo, y causa gastos significativos de atención dental, además de tener un impacto negativo considerable en la salud general^[82].

De acuerdo con sus características clínicas y radiográficas se clasifica en:^[80, 83]

- Estadio I: Se pierde el nivel de inserción clínico de 1-2mm, pérdida ósea radiográfica menor al 15%, sin pérdida de órganos dentales por motivos periodontales, profundidad de bolsa ≤ 4 mm, pérdida ósea únicamente horizontal.
- Estadio II: Se pierde el nivel de inserción clínico de 3-4mm, pérdida ósea radiográfica del 15-30%, sin pérdida de órganos dentales por motivos

periodontales, profundidad de bolsa ≤ 5 mm, pérdida ósea únicamente horizontal.

- Estadio III: Pérdida CAL ≥ 5 mm, pérdida ósea radiográfica entre tercio medio y apical de la raíz, ≤ 4 dientes perdidos debido a motivos periodontales, profundidad de bolsa ≥ 6 mm, pérdida ósea vertical ≥ 3 mm y además una o más furca clase II o III.
- Estadio IV: Pérdida CAL ≥ 5 mm, pérdida ósea radiográfica de tercio medio a apical de la raíz, ≥ 5 dientes perdidos por motivos periodontales, profundidad de bolsa ≥ 6 mm, pérdida ósea vertical ≥ 3 mm, furca clase II o III, disfunción masticatoria y necesidad de rehabilitación, trauma oclusal secundario, colapso horizontal, menos de 20 dientes remanentes.

Junto con el estadio se incluye un grado según su progresión y otros factores predisponentes: [80, 81]

- Grado a: Pérdida ósea radiográfica nula dentro de los últimos 5 años, % de hueso perdido/edad < 0.25 , acumulo de biopelícula con bajo nivel de destrucción, no fumador, paciente normoglicémico o no diagnosticado con diabetes.
- Grado b: Pérdida ósea radiográfica < 2 mm a través de los últimos 5 años, % de hueso perdido/edad $0.25-1.0$, destrucción conmensurable con acúmulos de biopelícula, fumador de < 10 cigarrillos diarios, HbA1c $< 7\%$ en pacientes diabéticos.

- Grado c: Pérdida ósea radiográfica ≥ 2 mm a través de los últimos 5 años, % de hueso perdido/edad > 1.0 , destrucción excesiva con depósitos de biopelícula, fumador de ≥ 10 cigarrillos diarios, HbA1c $\geq 7\%$ en pacientes diabéticos.

1.7.3 Enfermedades necrotizantes

Se define a la periodontitis necrosante como un proceso inflamatorio del periodonto, caracterizado por tres características clínicas típicas; sangrado, necrosis de papilas y dolor, además de estar asociadas a alteraciones de la respuesta inmune del huésped, que deben ser consideradas en la clasificación de estas condiciones^[84]. La formación de pseudomembranas, fiebre y/o linfadenopatía se consideran signos y síntomas asociados con esta condición^[80, 85].

1.7.4 Abscesos periodontales

Comúnmente se desarrollan en bolsas periodontales preexistentes y se clasifican dependiendo de su etiología^[86]. Se identifican por la acumulación localizada de materia o líquido purulento dentro de la pared gingival de la bolsa/surco periodontal, provocan una rápida destrucción del tejido que puede afectar el pronóstico dental^[80, 87].

1.7.5 Factores sistémicos

Algunos trastornos y condiciones sistémicos que pueden afectar el aparato periodontal y causar pérdida de inserción periodontal y hueso lo cual tiene un efecto directo sobre la progresión de la periodontitis^[88]. Otros trastornos causan defectos en la encía o tejido conectivo periodontal o instigar cambios metabólicos en el huésped que afectan varios tejidos del aparato periodontal^[89, 90].

Entre estos trastornos podemos encontrar:

- Genéticos^[91, 92].
- Diabetes^[93, 94].
- Obesidad^[95, 96].
- Enfermedades de inmunodeficiencia adquirida^[97, 98].
- Enfermedades inflamatorias^[99, 100].
- Neoplasias^[101, 102].

2. ANTECEDENTES

- Choi, H., et al., *Real-time PCR quantification of 9 periodontal pathogens in saliva samples from periodontally healthy Korean young adults*. J Periodontal Implant Sci, 2018. 48(4): p. 261-271.

En todos los sujetos se detectaron *F. nucleatum* y *E. corrodens*; el número de muestras positivas fue 87 (92,6%), 91 (96,8%) y 90 (95,7%) para *P. gingivalis*, *P. anaerobius* y *C. rectus*, respectivamente. También se detectaron otros patógenos en sujetos periodontalmente sanos. El análisis del número de copias de ADN reveló que el patógeno periodontal más abundante fue *F. nucleatum*, que fue significativamente más prevalente que todas las demás bacterias ($P < 0,001$), seguido de *P. anaerobius*, *P. gingivalis*, *E. corrodens*, *C. rectus*, y *T. denticola*. No se observaron diferencias significativas en la prevalencia de cada bacteria entre hombres y mujeres. Aunque el número de copias de ADN del total de bacterias resulto significativamente mal alto en hombres que en mujeres.

- Nearing JT, DeClercq V, Van Limbergen J, Langille MGI. Assessing the Variation within the Oral Microbiome of Healthy Adults. mSphere. 2020 Sep 30;5(5):e00451-20. doi: 10.1128/mSphere.00451-20. PMID: 32999079; PMCID: PMC7529435.

Se examinó la composición del microbioma oral de la cohorte general que contiene 1049 individuos sanos del atlántico canadiense para comprender cómo las elecciones antropométricas, sociodemográficas y dietéticas podrían alterar la composición del microbioma oral. Se encontraron que 16 géneros tenían una abundancia relativa media superior al 1%, siendo *Veillonella* la mayor contribución media (21,49% ± 0,38%), seguida de *Neisseria* (13,04% ± 0,40%), *Streptococcus* (11,86% ± 0,26%), y *Prevotella 7* (11,55% ± 0,24%).

- Wade W.G. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol. Res.* 2013;69:137–143. doi: 10.1016/j.phrs.2012.11.006

Estudios de Wade^[37] han analizado las modificaciones asociadas con la edad en la distribución y composición de la microbiota periodontal en sujetos periodontalmente sanos, se identificaron varias especies bacterianas en las cavidades bucales de personas mayores periodontalmente sanas. Se ha demostrado que algunas bacterias asociadas con la salud son antagonistas de los patógenos orales. Por ejemplo *Streptococcus salivarius*. La cepa K12 produce una bacteriocina que inhibe el crecimiento de especies gramnegativas que se asocian con periodontitis y halitosis *in vitro*, y se ha demostrado que tiene efectos beneficiosos sobre la halitosis *in vivo*.

- López-Martínez J, Chueca N, Padial-Molina M, Fernandez-Caballero JA, García F, O'Valle F, Galindo-Moreno P. Bacteria associated with periodontal disease are also increased in health. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2020 Nov 1;25(6):e745-e751. doi: 10.4317/medoral.23766. PMID: 32701927; PMCID: PMC7648922.

Curiosamente, las bacterias asociadas con la salud periodontal no desaparecen por completo en la enfermedad, pero sí un cambio en sus proporciones. *Actinomyces* y *Rothia* fueron detectados con mayor frecuencia en salud. Las actinobacterias se encontraron en mayor proporción en la salud. En estado sano, *Rothia dentocariosa* se encontró en mayor abundancia^[103].

- Abusleme L, Hoare A, Hong BY, Diaz PI. Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis. *Periodontol 2000*. 2021 Jun;86(1):57-78. doi: 10.1111/prd.12362. Epub 2021 Mar 10. PMID: 33690899.

Una característica de las bacterias encontradas en salud periodontal es su alta tolerancia a los ambientes oxigenados. Como lo son: *Corynebacterium spp*, *Rothia spp*, *Lautropia mirabilis*, *Kingella oralis*, *Bergeyella spp* y *Neisseria flava* se consideran aerobios, mientras que *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Gemella* y *Capnocytophaga* se consideran anaerobios facultativos^[104].

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La etiología de la enfermedad periodontal a nivel internacional no se ha podido definir o atribuir en su totalidad a un solo factor^[28]. Aunque se sabe que está altamente relacionado con bacterias presentes en la boca y la respuesta del huésped a estos complejos bacterianos^[49]. Los hábitos y costumbres del huésped también pueden tener influencia para que la enfermedad se desarrolle, de igual manera hay una amplia variabilidad entre regiones y grupos poblacionales^[104]. Sin embargo, es importante conocer como responden los pacientes locales ante estas variables que determinan el mantenimiento de la salud periodontal o el desencadenamiento de la enfermedad.

Debido a que microorganismos específicos previenen el inicio de la enfermedad periodontal, el estudio de la microbiota subgingival es un aspecto importante de la investigación periodontal^[53]. La interacción entre la microbiota subgingival y el huésped da lugar a un proceso inflamatorio responsable de la etiología y patogénesis de la enfermedad periodontal o el mantenimiento del estado de salud periodontal^[105]. Estudios realizados en Estados Unidos^[106], América Latina^[107] y Europa^[108] han comprobado que el contenido de la microbiota y la prevalencia de ciertos patobiontes en pacientes con periodontitis podría estar relacionada con el origen étnico y las ubicaciones geográficas^[109]. lo que indica que es importante determinarlo para los pacientes que radican en Chihuahua Capital.

4. JUSTIFICACIÓN

Recientemente ha cobrado mayor relevancia en el área de la periodoncia el entender que factores mantienen el estado de salud periodontal^[28]. Se sospecha que uno de los factores que tienen mayor influencia en conservar la salud periodontal son poblaciones bacterianas específicas que ocupan sitios de adhesión bacteriana e impiden la colonización de microorganismos patogénicos agresivos^[49]. Esto debido a que los máximos avances en el área de periodoncia clínica detienen la progresión de la enfermedad y a lo mucho alcanza una reparación (más nunca regeneración) de alguno de los tejidos periodontales (sin poder regenerar el aparato de inserción)^[110].

La identificación de los microorganismos que ayudan a mantener un estado de salud periodontal permitirá enfocar futuros proyectos de investigación hacia el diseño y elaboración de productos específicos que fomenten la preservación de estos microorganismos, con lo cual se evitaría la colonización periodontal con microorganismos patógenos agresivos, manteniendo el estado de salud periodontal. Esto tendría un impacto positivo tanto en pacientes periodontalmente sanos, como en aquellos que tuvieron un tratamiento periodontal y utilicen estos productos para ayudarles a controlar la población de microorganismos orales.

5. HIPÓTESIS

Los individuos con salud periodontal presentan una carga microbiana específica.

6. OBJETIVO GENERAL

Identificar la carga bacteriana específica de pacientes sanos periodontalmente.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Recuperar microorganismos del microbioma periodontal.
- Identificar los distintos tipos de microorganismos presentes en las muestras.
- Clasificar los microorganismos encontrados.
- Identificar su relación con pacientes en estado de salud periodontal.

8. METODOLOGÍA

8.1 Tipo de estudio

Este trabajo de investigación es observacional (observar microorganismos encontrados sin modificar condiciones iniciales del paciente) y cuantitativo.

8.2 Diseño de estudio

Investigación transversal, al ver los microorganismos al momento de la toma de la muestra.

8.3 Población de estudio

15 pacientes de la Clínica de Posgrado de Periodoncia de la Facultad de Odontología UACH, con salud periodontal. Que aceptaran participar en el proyecto y firmaran su consentimiento informado.

8.4 Lugar de realización

- Historias clínicas y valoración periodontal se realizaron en Clínica de Posgrado de Periodoncia Facultad de Odontología UACH
- Toma de muestra y cultivo y análisis de muestras en Laboratorio de Microbiología III de la Facultad de Ciencias Químicas UACH.

8.5 Criterios de selección

CRITERIOS	ENLISTAR
INCLUSIÓN:	<ul style="list-style-type: none">• Profundidad al sondeo ≤ 4mm.• Sin sangrado al sondeo.• Evaluados dentro de la UACH• Edad 18 a 40 años.• No tratamiento periodontal previo a 2 meses
EXCLUSIÓN:	<ul style="list-style-type: none">• Profundidad al sondeo > 4mm.• Sangrado profuso.• Movilidad dental.• Aparatología ortodoncia o prótesis.• Alto riesgo caries.• Enfermedad sistémica no controlada.• Antibioticoterapia o colutorios.• Fumadores.• Uso de anticonceptivos hormonales.
ELIMINACIÓN:	<ul style="list-style-type: none">• Muestras dañadas durante el procesamiento.

8.6 Operación de las variables

Tabla 1.- Operacionalización de Variables

Variable	Definición conceptual	Definición Operacional	Indicador	Tipo de Variable	Escala de Medición.
Sexo	Características fisiológicas y biológicas que definen a la mujer y al hombre	Clasificación entre hombres o mujeres	Hombre Mujer	Categórica	Hombres y mujeres
Edad	Tiempo que transcurre desde el nacimiento hasta el momento de la referencia	Edad en años referido por los sujetos	Años cumplidos	Cuantitativa continua	Número de años
Numero de Colonias bacterianas	Numero de colonias bacterianas	Rango numérico	Colonias bacterianas	Cuantitativa continua	Numero de colonias

8.7 Materiales

- Para la realización del periodontograma se utilizó una sonda carolina del norte y un espejo intraoral numero 5 marca Hu-friedy, se anotó la información en el periodontograma de <https://www.periodontalchart-online.com/uk/>
- Para la toma de muestras se utilizaron hazas estériles de fabricación propia hechas con ligadura metálica para ortodoncia y tubos de ensayo.

- Para la siembra se utilizaron 2 mecheros Bunsen, asas de nicromo, espátula acanalada, placas agar sangre (MCD LAB) e incubadora Fisher-Scientific Isotemp incubator (U. S. A.)
- Para las pruebas bioquímicas se utilizó API 20A, API 25 S STRIPS, API Susp Ed, VP1 y VP2 reagents, API mineral oil, Zymax 2, ZYM B X2, Ehrlich, Xylene, BCP bromocresol, todo los materiales anteriormente listados son de la casa comercial bioMérieux, así como campana LABCONCO Purifier Class II Biosafety Cabinet (USA)
- Para la tinción de Gram se utilizaron portaobjetos 25x75mm, mechero Bunsen, cristal violeta, Lugol, agua destilada, alcohol, acetona, safranina
- Para la caracterización microscópica se utilizó cubreobjetos de vidrio cuadrados 22x22 mm, portaobjetos 25x75mm de banda esmerilada grosor 0.9-1.1 mm de grosor, aceite de inmersión y microscopio óptico de campo claro Olympus Mod. CX21 (USA).

8.8 Métodos

8.8.1 Toma de muestra

Una semana posterior de haber seleccionado la población del estudio, se les citó para la toma de muestra por duplicado mediante hazas de ligadura de ortodoncia estériles introduciéndolas en el surco gingival vestibular del órgano dental 16 y lingual del 31 (**Fig. 2**)

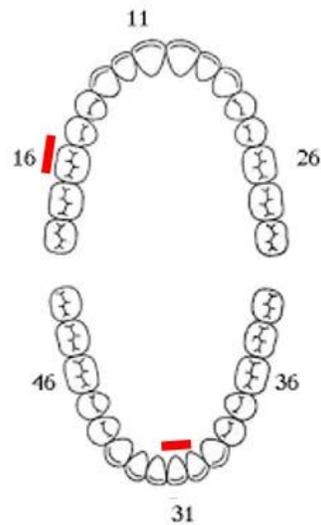


Fig. 2. Odontograma señalando con rojo los sitios donde se tomaron las muestras.

8.8.2 Siembra de muestras

Se preparó un área de trabajo estéril entre 2 mecheros, con las hazas que se tomaron las muestras se sembraron directamente sobre cajas de cultivo con agar sangre, una caja por cada muestra tomada. Se cultivaron a 37° C por 24 a 48 horas, bajo condiciones de microaerofilia (se colocaron los cultivos dentro de un frasco sellado y se encendió una vela para disminuir la cantidad de oxígeno).

8.8.3 Obtención de cultivos puros

Una vez que se obtuvieron los cultivos axénicos se caracterizaron macroscópicamente (observación de morfología colonial) y microscópicamente (tinción de Gram y visualización al microscopio). Los diferentes cultivos microbianos que se observaron con características macroscópicas y microscópicas diferentes

se sembraron en placas de agar sangre y/o Columbia por estriado y se incubaron a 37°C durante 24 a 48 horas, en condiciones de microaerofilia.

8.8.4 Caracterización macroscópica

Se describieron características morfológicas visuales de las colonias bacterianas formadas como (anexo 1): forma, tamaño, color, textura, elevación, bordes, opacidad, superficie, consistencia y hemolisis (descomposición de glóbulos rojos); donde al observar las colonias bacterianas a contraluz fue posible identificar, alfa hemolisis (lisis parcial con color dorado), beta hemolisis (lisis total con un halo amarillo total alrededor de las colonias) y gamma hemolisis (sin hemolisis). En la **Tabla 2** se describen las características de cada una de las cepas.

8.8.5 Caracterización microscópica

Previo a la caracterización microscópica se realizó una tinción de Gram. Este proceso permite diferenciar a las bacterias en dos grandes grupos. Se denominan bacterias Gram positivas a las bacterias que se tiñen color azul-violeta y a las que se decoloran y después se tiñen con safranina, se les designa como bacterias Gram negativas^[11].

Se cree que la diferencia en el color adquirido ambos grupos bacterianos es debido a la diferente composición química de su pared celular. Las bacterias que son Gram positivas tienen en su pared una capa gruesa de peptidoglicano o mureína que va de 20 a 80 nm de espesor, en cambio las bacterias Gram negativas

tienen una capa de peptidoglicano más delgada (2 nm) y una capa más externa de lipoproteínas, lipopolisacáridos, y lípidos^[112]. A continuación, se describe el proceso para realizar la tinción de Gram:

1. Realizar un Frotis de manera regular sobre un portaobjetos.
2. Se fijó con una gota de agua destilada y pasándolo sobre la flama del mechero.
3. Se cubrió con cristal violeta durante 60 segundos, se retira el tinte y el exceso de tinte se enjuaga con agua. El objetivo es eliminar la mancha sin perder el cultivo fijado.
4. Se utilizó una solución de Lugol para cubrir el frotis durante 60 segundos. Este paso se conoce como "fijar el tinte". Se vierte la solución de Lugol y se enjuaga el portaobjetos con agua corriente. Se sacude el exceso de agua de la superficie.
5. Se añadieron al portaobjetos unas gotas de decolorante. Los decolorantes suelen ser disolventes mixtos de etanol y acetona. Este paso se conoce como "tratamiento con solventes". El portaobjetos se enjuagó con agua durante 15 segundos. Para evitar una decoloración excesiva en las células grampositivas, se debe dejar de agregar decolorante tan pronto como el disolvente no adquiera color a medida que fluye sobre el portaobjetos.
6. El frotis se cubrió con safranina durante 60 segundos. La safranina se lavó con agua y el exceso de agua se secó con papel absorbente. El portaobjetos

también se puede secar al aire después de sacudir el exceso de agua y está listo para observarse al microscopio.

Después se realiza el examen macroscópico:

1. El portaobjetos se sometió a un examen al microscopio. En el examen inicial de los portaobjetos se utilizó el objetivo 40X para evaluar la distribución del frotis y luego se examinó utilizando el objetivo 100X en inmersión en aceite.
2. Se observó y se describió la morfología bacteriana, si eran cocos, bacilos en arreglos como cadena, racimos o duplas, Gram positivo o negativo. Se describe cada cepa en la tabla 2.

8.8.6 Caracterización bioquímica

Para obtener un resultado presuntivo de género y especie de cada cepa aislada se realizaron pruebas bioquímicas con el sistema estandarizado API. La galería "API 20 A" (anexo 2) es un sistema estandarizado que incluye 20 ensayos enzimáticos Identificación de bacterias anaerobias en 24-48 horas. En cambio "API 20 STREP" (anexo 3) asocia 20 ensayos bioquímicos con mayor sensibilidad, lo cual permitió realizar un diagnóstico por grupo o especie de la mayoría de los estreptococos, enterococos y otros microorganismos relacionados en 4 o 24 horas.

Se hizo una suspensión bacteriana de cada cepa distinta, con una turbidez ajustada al 3 (9×10^8 UFC/mL) de la escala de McFarland en medio de suspensión API 20A y para las galerías API 20 Strep se ajustó a una escala de McFarland de 4 (12×10^8 UFC/mL).

Posteriormente, se inocularon las cúpulas de las galerías siguiendo los instructivos de cada una de las galerías, donde primero se colocó agua destilada en el recipiente que contendría las galerías, para crear un ambiente de humedad, seguido de esto los pozos se llenaron con el inóculo y colocación de aceite, esto variaba dependiendo los instructivos y la reacción enzimática que se esperaba. Se incubó durante 4 horas las API 20 Strep y 24 horas para las API 20^a, ambas a 37°C para posteriormente leer e interpretar los resultados de las pruebas enzimáticas al ingresar los datos recabados en la base de datos de las galerías API para obtener género y especie presuntivo de cada colonia. Se incluyó el resultado en la **Tabla 2**.

8.9 Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó de manera manual con calculator app de Windows.

8.10 Aspectos éticos

La realización de este estudio no presenta ningún riesgo para los sujetos de este, la toma de muestra se tomó con un consentimiento informado (anexo 4) previo y los datos obtenidos se tratan de manera confidencial, sin asignar a un sujeto en específico los microorganismos obtenidos.

9. RESULTADOS

Tras llenar una historia clínica, consentimiento informado (anexo 4) y valoración intraoral, se hizo una preselección de 34 pacientes, 21 mujeres, 13 hombres, con edad promedio de 23.8 años que satisfacían los criterios de inclusión para la toma de muestra, de los cuales, 15 formaron parte de la muestra de trabajo. Del total de las muestras obtenidas logramos identificar 11 colonias distintas con las siguientes características:

Tabla 2. Caracterización macro y microscópica, prueba catalasa y género y especie presuntivo				
Cepa	Caracterización macroscópica	Catalasa	Caracterización microscópica	Género y especie presuntivo
C1 	Pequeñas, puntiformes, plana, entera, amarilla, opaca, opaca, cremosa. β hemolisis.	-	Cocos en cadenas pequeñas, Gram +	<i>Aerococcus viridans</i>
C2 	Pequeña, puntiforme, plana, entera, blanco, brillante, opaca, cremosa. α hemolisis.	-	Cocos en cadenas medianas, Gram +	<i>Gemella morbillorum</i>
C3	Pequeña, puntiforme, elevada, entera,	-	Cocos individuales y cadenas	<i>Bifidobacterium dentium</i>

	amarilla, brillante, opaca, cremosa. α hemolisis.		pequeñas, Gram +	
C4 	pequeñas, puntiformes, blanco/verdoso, opaca, opaca, cremosa. α hemolisis.	-	Cocos en cadenas pequeñas, Gram +	<i>Gemella morbillorum</i>
C5 	Mediana, circular, elevada, entera, amarilla, brillante, opaco, cremosa. α hemolisis	+	Cocos en cadenas pequeñas, Gram +	<i>Bacteroides distasonis</i> (<i>Parabacteroides</i>)
C6 	Pequeñas, puntiformes, plana, entera, blanca, brillante, opaca, cremosa. α hemolisis	+	Cocos en cadenas pequeñas (algunos racimos) Gram +	<i>Veillonella parvula</i>
C7 	Pequeña, puntiforme, plana, entera, amarilla, brillante, opaca, cremosa. α hemolisis.	-	Cocos individuales y cadenas pequeñas, Gram +	<i>Propionibacterium</i> spp.

<p>C8</p> 	<p>Pequeñas, puntiformes, plana, entera, amarillo, brillante, opaca, cremosa. y hemolisis</p>	<p>-</p>	<p>Cocos en cadenas pequeñas, Gram +</p>	<p><i>Porphyromonas</i> spp</p>
<p>C9</p> 	<p>Pequeñas, puntiformes, plana, entera, amarillo, brillante, opaca, cremosa. α hemolisis</p>	<p>-</p>	<p>Cocos en cadenas medianas, Gram +</p>	<p><i>Streptococcus intermedius</i></p>
<p>C10</p> 	<p>Pequeñas, puntiformes, ligeramente elevadas, ondulada, blanco, brillante, opaca, cremosa. α hemolisis</p>	<p>-</p>	<p>Cocos individuales y cadenas pequeñas, Gram +</p>	<p><i>Actinomyces naeslundii</i></p>
<p>C11</p> 	<p>Pequeñas, puntiformes, plana, entera, blanca, brillante, opaca, cremosa. β hemolisis.</p>	<p>+</p>	<p>Cocos en cadenas largas, Gram +</p>	<p><i>Propionibacterium granulosum</i></p>

Evaluando macro y microscópicamente, por sus características ya descritas a las cepas bacterianas recolectadas de los pacientes que conformaron la población de estudio, nos permitió identificar 11 cepas bacterianas distintas, de las cuales el 100% fueron cadenas pequeñas de cocos, Gram +, solo 3 cepas fueron

positivos a la prueba de catalasa (27.27%), 8 cepas alfa hemolisis (72.72%), 2 beta hemolisis (18.18%) y una cepa sin hemolisis (9.09%).

En las pruebas bioquímicas realizadas a esas 11 cepas *Gemella morbillorum* se repitió, por lo cual quedamos en total con 10 cepas distintas. Las cuales son las siguientes: *Aerococcus viridans*, *Gemella morbillorum*, *Bifidobacterium dentium*, *Bacteroides distasonis* (*Parabacteroide*), *Veillonella parvula*, *Propionibacterium* spp, *Porphyromonas* spp, *Streptococcus intermedius*, *Actinomyces naeslundii* y *Propionibacterium granulosum*.

10. DISCUSIÓN

La enfermedad periodontal ya no debe considerarse una simple infección bacteriana. Más bien, son enfermedades multifactoriales que involucran una interacción compleja entre la microbiota subgingival con la respuesta inmunitaria e inflamatoria del huésped y factores modificadores ambientales^[113]. Se ha informado que los lactantes, los niños, los adolescentes y los adultos con un estado periodontal clínicamente sano tienen un número relativamente elevado de patobiontes^[114]. Por lo tanto, la presencia de bacterias patógenas periodontales no es el único factor que afecta el desarrollo de la enfermedad periodontal^[63].

La biopelícula comensal desempeña un papel protector, como un escudo invisible, contra los patógenos exógenos, participan en la digestión de los alimentos, contribuyen a la síntesis de determinadas vitaminas y pueden ayudar a nuestro sistema inmunológico^[115]. Por lo que es importante comprender la acción que ejercen para mantener la salud periodontal los microorganismos encontrados en esta investigación.

Aerococcus viridans. *Aerococcus* es un género de cocos grampositivos microaerófilos que son α -hemolíticos, catalasa y oxidasa negativos, facultativamente anaeróbios y leucina aminopeptidasa positivos^[116]. La importancia clínica de los aerococos a menudo no se tiene en cuenta o no se informa lo suficiente debido a las dificultades para crecerlos en condiciones de laboratorio,

también pueden identificarse erróneamente y considerarse contaminantes insignificantes^[116].

Gemella morbillorum. En el estudio de Miyochi en 2021 se encontró que la saliva de sujetos sanos contenía una mayor proporción de *G. haemolysans* que la saliva de pacientes con periodontitis. Los ensayos de inhibición del crecimiento indicaron que los componentes proteicos contenidos en el sobrenadante del cultivo de *G. haemolysans* suprimieron directamente el crecimiento de *P. gingivalis*. Este estudio muestra que la presencia de *G. haemolysans* en la saliva se asocia con la salud periodontal y que inhibe el crecimiento de *P. gingivalis in vitro*^[117].

Bifidobacterium dentium. Haruo en el 2022 describió que el uso de diferentes cepas de bifidobacterias condujo a una reducción de los agentes periodontopatógenos clave del complejo rojo; niveles reducidos de citocinas proinflamatorias (p. ej., interleucina [IL]1- β e IL-8) y niveles más altos de citocinas antiinflamatorias (IL-10); niveles aumentados de osteoprotegerina y niveles reducidos de activador del receptor del ligando del factor nuclear kappa-B; y una reducción de la placa dental, sangrado al sondaje, pérdida ósea y pérdida del nivel de inserción^[118].

Bacteroides distasonis (*Parabacteroides*). Se ha demostrado que algunas cepas de *P. distasonis* poseen propiedades antiinflamatorias tanto *in vitro* como *in vivo* y reducen la gravedad de la inflamación. Aunque hay varios estudios que señalan los beneficios de *P. distasonis* y su uso potencial como la próxima generación de probióticos^[119].

Veillonella párvula. Son pequeñas, generalmente no fermentativas, Cocos gramnegativos, anaerobios estrictos. La importancia de *Veillonella spp.* en infecciones humanas es incierto, y generalmente se consideran de baja virulencia. *Veillonella* se ha encontrado en niveles elevados en sitios periodontales y pueden preceder a la aparición de más bacterias periodontopatógenas^[120].

Porphyromonas spp. Es una de las bacterias patógenas de la periodontitis más estudiada, es anaeróbica gran negativa con una capacidad única para modular el sistema inmunológico, se considera un factor etiológico principal en la progresión de la enfermedad periodontal porque secreta varios factores de virulencia y proteasas extracelulares (gingipaína), que destruyen los tejidos blandos que rodean los dientes. En este mismo artículo se sugiere que revertir la disbiosis y aliviar la inflamación periodontal puede ayudar a reducir la degradación de tejido y la pérdida dental^[121].

Streptococcus intermedius. Habitan preferentemente en zonas subgingivales, las superficies interproximales de los dientes en pacientes con periodontitis no tratada, dónde después de la instrumentación de la raíz periodontal, no se informa que se produzca una disminución en su tasa de detección. Aumentos de adrenalina y noradrenalina lo que aumenta el riesgo en el desarrollo y progresión de la periodontitis^[122].

Actinomyces naeslundii. Estas especies son los formadores de placa más importantes entre los miembros del grupo *Actinomyces*. Muchas otras especies de *Actinomyces* están igualmente presentes en el placa supra y subgingival, lo que sugiere su gran capacidad de crecimiento y adaptación en los diferentes entornos condiciones y teniendo en consecuencia un papel importante en la placa formación tanto supra como subgingival. *A. odontolyticus/meyeri*, *A. israelii*, *A. dentalis*, aunque se aislaron con menos frecuencia que *A. naeslundii*, se encuentra con mayor frecuencia en pacientes con enfermedad periodontal crónica, lo que se relaciona a que pueden desempeñar un papel en el cambio de la composición de la placa entre salud y enfermedad^[123].

Propionibacterium granulosum. Son bacterias grampositivas en las infecciones persistentes que afectan la superficie apical extraradicular con formación de biopelículas bacterianas. Las propionibacterium anaerobias/aerotolerantes. Las bacterias que se encuentran con mayor frecuencia

en los conductos radícula, a menudo se ha aislado de infecciones tanto intrarradiculares como extrarradiculares^[124].

Al hacer la investigación del rol que tienen las bacterias encontradas en este proyecto de investigación sobre la progresión de la enfermedad periodontal, observamos algunos microorganismos protectores, pero también microorganismos desencadenantes de la enfermedad. Esto puede ser que los marcadores que caracterizan el proceso inflamatorio en individuos que desarrollan periodontitis sean diferentes de aquellos que presentan gingivitis crónica y nunca evoluciona a gingivitis. Hay diferencias en las proporciones medias de especies subgingivales en muestras de sujetos con periodontitis y sujetos sanos en diferentes países, lo que puede estar relacionado con diferencias en la dieta, la genética, la susceptibilidad a la enfermedad y la manifestación^[125]. También se ha informado que los lactantes, los niños, los adolescentes y los adultos con un estado periodontal clínicamente sano tienen un número relativamente elevado de patobiontes^[114]. Por lo tanto, la presencia de bacterias patógenas periodontales no es el único factor que afecta el desarrollo de la enfermedad periodontal.^[63] Sin embargo, es necesario un estudio complementario al realizado para los sujetos de nuestra comunidad.

Actualmente, la terapia de elección en el tratamiento de la enfermedad periodontal es la eliminación mecánica de la placa dental, que puede ir acompañada o no del uso de adyuvantes, como antisépticos y antibióticos, pero estos solo sirven de manera momentánea y no sirven como terapia a largo plazo o incluso los tratamientos mecánicos como los raspados y alisados solo mejoran de manera temporal de los parámetros periodontales si no se corrige la etiología de la enfermedad. Por lo que prevenir la disbiosis puede ser una alternativa útil por medio de probióticos que permitan la reproducción de microorganismos que mantengan la homeostasis^[36]. Las terapias probióticas/prebióticas son intervenciones no invasivas destinadas para alterar las comunidades de microbiota autóctonas para mejorar la salud.^[126] Esto ya ha sido demostrado en estudios clínicos donde se usan probióticos para mantener la salud periodontal^[127, 128].

Los probióticos para tratar las enfermedades periodontales, se pueden encontrar en diferentes presentaciones como: tabletas, pastillas, pasta de dientes y enjuagues bucales. Siendo las tabletas las más utilizadas^[129]. Se tiene que considerar que aparte de los beneficios y ventajas para la salud de los probióticos, puede haber poblaciones susceptibles, como personas inmunocomprometidas (adultos mayores, mujeres embarazadas y bebés), personas con enfermedades graves y pacientes hospitalizados. Los probióticos pueden afectar directamente al huésped además de interactuar con microorganismos comensales^[130]. Por lo tal es de suma importancia determinar la dosis terapéutica adecuada, Se requieren estudios futuros el efecto a largo plazo de los probióticos^[131].

Definitivamente existe una necesidad urgente de un predictor más sofisticado y preciso de la enfermedad periodontal para poder identificar el inicio de la enfermedad, ya sea por su simple presencia de ciertos microorganismos o por su concentración en relación con los otros^[132]. Debemos centrarnos en comprender mejor la patogénesis de la periodontitis.

Por lo tanto, la salud periodontal no debe considerarse únicamente en el contexto de los niveles y el control de la biopelícula, sino que debe abarcar una consideración y evaluación holísticas de todos los factores responsables de la aparición de la enfermedad, así como de la restauración y el mantenimiento de la salud.^[136]

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guo, H., et al., *Development and regeneration of periodontal supporting tissues*. Genesis, 2022. **60**(8-9): p. e23491.
2. Nanci, A. and D.D. Bosshardt, *Structure of periodontal tissues in health and disease*. Periodontol 2000, 2006. **40**: p. 11-28.
3. Tarnow, D., et al., *A New Definition of Attached Gingiva Around Teeth and Implants in Healthy and Diseased Sites*. Int J Periodontics Restorative Dent, 2021. **41**(1): p. 43-49.
4. Melcher, A.H., *On the repair potential of periodontal tissues*. J Periodontol, 1976. **47**(5): p. 256-60.
5. Dagherery, A. and M.C. Bottino, *Advanced biomaterials for periodontal tissue regeneration*. Genesis, 2022. **60**(8-9): p. e23501.
6. Lu, E.M., *Three-Dimensional Organotypic Systems for Modelling and Understanding Molecular Regulation of Oral Dentogingival Tissues*. Int J Mol Sci, 2024. **25**(21).
7. Sperber, G.H., . *By , , . (ISBN 978-0-7234-3812-0; Intn'l ISBN 978-0-7234-3813-7; eISBN 978-7020-7452; pp. vi + 461; illustrated, soft cover; US\$ 140.00; £64.99)*. 2018. **233**(6): p. 854-854.
8. Nakamura, M., *Histological and immunological characteristics of the junctional epithelium*. Jpn Dent Sci Rev, 2018. **54**(2): p. 59-65.
9. Bosshardt, D.D. and N.P. Lang, *The junctional epithelium: from health to disease*. J Dent Res, 2005. **84**(1): p. 9-20.
10. Yi, G., et al., *A Review of the Functions of Matrix Vesicles in Periodontal Tissues*. Stem Cells Dev, 2021. **30**(4): p. 165-176.
11. Clark, M.B. and D.A. Clark, *Oral Development and Pathology*. Ochsner J, 2018. **18**(4): p. 339-344.
12. AlFatlawi, Z., et al., *Three dimensional (3D) gingival models in periodontal research: a systematic review*. J Mater Sci Mater Med, 2023. **34**(11): p. 58.
13. Fujita, T., et al., *Regulation of defensive function on gingival epithelial cells can prevent periodontal disease*. Jpn Dent Sci Rev, 2018. **54**(2): p. 66-75.
14. Birimiša, M.A., et al., *Forensic determination of dental age by cementum thickness of human teeth*. J Forensic Odontostomatol, 2021. **39**(3): p. 41-48.
15. Liu, J., et al., *Periodontal Bone-Ligament-Cementum Regeneration via Scaffolds and Stem Cells*. Cells, 2019. **8**(6).
16. Yamamoto, T., et al., *Histology of human cementum: Its structure, function, and development*. Jpn Dent Sci Rev, 2016. **52**(3): p. 63-74.
17. Foster, B.L., *On the discovery of cementum*. J Periodontal Res, 2017. **52**(4): p. 666-685.
18. Hirashima, S., et al., *Three-dimensional ultrastructural imaging and quantitative analysis of the periodontal ligament*. Anat Sci Int, 2020. **95**(1): p. 1-11.

19. Zhang, X., et al., *Distribution of undulin, tenascin, and fibronectin in the human periodontal ligament and cementum: Comparative immunoelectron microscopy with ultra-thin cryosections*. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society, 1993. **41**: p. 245-51.
20. Guo, H., et al., *Development and regeneration of periodontal supporting tissues*. 2022. **60**(8-9): p. e23491.
21. de Jong, T., et al., *The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration*. J Periodontal Res, 2017. **52**(6): p. 965-974.
22. Huang, X., et al., *The roles of osteocytes in alveolar bone destruction in periodontitis*. J Transl Med, 2020. **18**(1): p. 479.
23. Omi, M. and Y. Mishina, *Roles of osteoclasts in alveolar bone remodeling*. Genesis, 2022. **60**(8-9): p. e23490.
24. Li, L., et al., *Design of a Haversian system-like gradient porous scaffold based on triply periodic minimal surfaces for promoting bone regeneration*. J Adv Res, 2023. **54**: p. 89-104.
25. Saffar, J.L., J.J. Lasfargues, and M. Cherruau, *Alveolar bone and the alveolar process: the socket that is never stable*. Periodontol 2000, 1997. **13**: p. 76-90.
26. Cho, M.I. and P.R. Garant, *Development and general structure of the periodontium*. Periodontol 2000, 2000. **24**: p. 9-27.
27. Hathaway-Schrader, J.D. and C.M. Novince, *Maintaining homeostatic control of periodontal bone tissue*. Periodontol 2000, 2021. **86**(1): p. 157-187.
28. Lang, N.P. and P.M. Bartold, *Periodontal health*. J Periodontol, 2018. **89 Suppl 1**: p. S9-s16.
29. Nazir, M., et al., *Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance*. ScientificWorldJournal, 2020. **2020**: p. 2146160.
30. Marchesan, J., et al., *An experimental murine model to study periodontitis*. Nat Protoc, 2018. **13**(10): p. 2247-2267.
31. Chiang, C.P., et al., *Clinical outcomes of adjunctive indocyanine green-diode lasers therapy for treating refractory periodontitis: A randomized controlled trial with in vitro assessment*. J Formos Med Assoc, 2020. **119**(2): p. 652-659.
32. Sanz, M., et al., *Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease*. 2017. **44**(S18): p. S5-S11.
33. Trombelli, L., et al., *Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations*. J Clin Periodontol, 2018. **45 Suppl 20**: p. S44-s67.
34. Wikner, S., et al., *The approximal bone height and intrabony defects in young adults, related to the salivary buffering capacity and counts of Streptococcus mutans and Lactobacilli*. Arch Oral Biol, 1990. **35 Suppl**: p. 213s-215s.

35. Johnston, W., et al., *Longitudinal changes in subgingival biofilm composition following periodontal treatment*. J Periodontol, 2023. **94**(9): p. 1065-1077.
36. Di Stefano, M., et al., *Impact of Oral Microbiome in Periodontal Health and Periodontitis: A Critical Review on Prevention and Treatment*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(9).
37. Wade, W.G., *The oral microbiome in health and disease*. Pharmacol Res, 2013. **69**(1): p. 137-43.
38. Bowen, W.H., et al., *Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments*. Trends Microbiol, 2018. **26**(3): p. 229-242.
39. Basavaraju, M., et al., *Quorum quenching: Signal jamming in dental plaque biofilms*. J Dent Sci, 2016. **11**(4): p. 349-352.
40. Xu, W., et al., *Roles of Porphyromonas gingivalis and its virulence factors in periodontitis*. Adv Protein Chem Struct Biol, 2020. **120**: p. 45-84.
41. Dabdoub, S.M., S.M. Ganesan, and P.S. Kumar, *Comparative metagenomics reveals taxonomically idiosyncratic yet functionally congruent communities in periodontitis*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 38993.
42. Curtis, M.A., P.I. Diaz, and T.E. Van Dyke, *The role of the microbiota in periodontal disease*. Periodontol 2000, 2020. **83**(1): p. 14-25.
43. Abusleme, L., et al., *Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis*. 2021. **86**(1): p. 57-78.
44. Socransky, S.S., et al., *Microbial complexes in subgingival plaque*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(2): p. 134-44.
45. Carrouel, F., et al., *Quantitative Molecular Detection of 19 Major Pathogens in the Interdental Biofilm of Periodontally Healthy Young Adults*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 840.
46. Abu Fanas, S., et al., *The prevalence of novel periodontal pathogens and bacterial complexes in Stage II generalized periodontitis based on 16S rRNA next generation sequencing*. J Appl Oral Sci, 2021. **29**: p. e20200787.
47. Gambin, D.J., et al., *Prevalence of red and orange microbial complexes in endodontic-periodontal lesions: a systematic review and meta-analysis*. Clin Oral Investig, 2021. **25**(12): p. 6533-6546.
48. Mulder-van Staden, S., H. Holmes, and J. Hille, *In vivo investigation of diode laser application on red complex bacteria in non-surgical periodontal therapy: a split-mouth randomised control trial*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 21311.
49. Nearing, J.T., et al., *Assessing the Variation within the Oral Microbiome of Healthy Adults*. mSphere, 2020. **5**(5).
50. Baker, J.L., et al., *Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria*. Trends Microbiol, 2017. **25**(5): p. 362-374.

51. Bartnicka, D., et al., *Candida albicans Shields the Periodontal Killer Porphyromonas gingivalis from Recognition by the Host Immune System and Supports the Bacterial Infection of Gingival Tissue*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(6).
52. Bartold, P.M. and T.E. Van Dyke, *An appraisal of the role of specific bacteria in the initial pathogenesis of periodontitis*. J Clin Periodontol, 2019. **46**(1): p. 6-11.
53. Kumar, P., *Diversity of Oral Biofilms in Periodontal Health and Disease*. 2018. p. 9-20.
54. Caccianiga, G., et al., *Low-level laser therapy and invisible removal aligners*. J Biol Regul Homeost Agents, 2016. **30**(2 Suppl 1): p. 107-13.
55. Gibson, G.R., et al., *Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017. **14**(8): p. 491-502.
56. Könönen, E., M. Gursoy, and U.K. Gursoy, *Periodontitis: A Multifaceted Disease of Tooth-Supporting Tissues*. J Clin Med, 2019. **8**(8).
57. Van Dyke, T.E., P.M. Bartold, and E.C. Reynolds, *The Nexus Between Periodontal Inflammation and Dysbiosis*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 511.
58. Mosaddad, S.A., et al., *Oral microbial biofilms: an update*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2019. **38**(11): p. 2005-2019.
59. Jakubovics, N.S., et al., *The dental plaque biofilm matrix*. Periodontol 2000, 2021. **86**(1): p. 32-56.
60. Hajishengallis, G., *Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(1): p. 30-44.
61. Mohanty, R., et al., *Red complex: Polymicrobial conglomerate in oral flora: A review*. J Family Med Prim Care, 2019. **8**(11): p. 3480-3486.
62. Abdulkareem, A.A., et al., *Current concepts in the pathogenesis of periodontitis: from symbiosis to dysbiosis*. J Oral Microbiol, 2023. **15**(1): p. 2197779.
63. Choi, H., et al., *Real-time PCR quantification of 9 periodontal pathogens in saliva samples from periodontally healthy Korean young adults*. J Periodontal Implant Sci, 2018. **48**(4): p. 261-271.
64. Bartold, P.M. and T.E. Van Dyke, *Host modulation: controlling the inflammation to control the infection*. Periodontol 2000, 2017. **75**(1): p. 317-329.
65. Suzuki, S. and S. Yamada, *Epigenetics in susceptibility, progression, and diagnosis of periodontitis*. Jpn Dent Sci Rev, 2022. **58**: p. 183-192.
66. Dahlen, G., O. Fejerskov, and F. Manji, *Current concepts and an alternative perspective on periodontal disease*. BMC Oral Health, 2020. **20**(1): p. 235.
67. Avula, H. and Y. Chakravarthy, *Models of periodontal disease pathogenesis: A journey through time*. J Indian Soc Periodontol, 2022. **26**(3): p. 204-212.
68. Kraft-Neumärker, M., et al., *Full-mouth profile of active MMP-8 in periodontitis patients*. J Periodontal Res, 2012. **47**(1): p. 121-8.

69. Checchi, V., et al., *The Role of Matrix Metalloproteinases in Periodontal Disease*. Int J Environ Res Public Health, 2020. **17**(14).
70. Belibasakis, G.N., et al., *Periodontal microbiology and microbial etiology of periodontal diseases: Historical concepts and contemporary perspectives*. 2000. **n/a**(n/a).
71. Hajishengallis, G. and R.J. Lamont, *Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology*. Mol Oral Microbiol, 2012. **27**(6): p. 409-19.
72. Darveau, R.P., G. Hajishengallis, and M.A. Curtis, *Porphyromonas gingivalis as a potential community activist for disease*. J Dent Res, 2012. **91**(9): p. 816-20.
73. Zini, A., et al., *Effects of an oral hygiene regimen on progression of gingivitis/early periodontitis: A randomized controlled trial*. Can J Dent Hyg, 2021. **55**(2): p. 85-94.
74. Murakami, S., et al., *Dental plaque-induced gingival conditions*. J Periodontol, 2018. **89 Suppl 1**: p. S17-s27.
75. Jepsen, S., et al., *Prevention and control of dental caries and periodontal diseases at individual and population level: consensus report of group 3 of joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases*. J Clin Periodontol, 2017. **44 Suppl 18**: p. S85-s93.
76. Sälzer, S., et al., *Contemporary practices for mechanical oral hygiene to prevent periodontal disease*. Periodontol 2000, 2020. **84**(1): p. 35-44.
77. Yu, S., et al., *Impact of oral health literacy on oral health behaviors and outcomes among the older adults: a scoping review*. BMC Geriatr, 2024. **24**(1): p. 858.
78. Chapple, I.L., et al., *Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis*. J Clin Periodontol, 2015. **42 Suppl 16**: p. S71-6.
79. Elemek, E., *Periodontal disease severity, tooth loss, and periodontal stability in private practice*. Niger J Clin Pract, 2022. **25**(6): p. 931-937.
80. Papapanou, P.N., et al., *Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions*. J Periodontol, 2018. **89 Suppl 1**: p. S173-s182.
81. Tonetti, M.S., H. Greenwell, and K.S. Kornman, *Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition*. J Periodontol, 2018. **89 Suppl 1**: p. S159-s172.
82. Holtfreter, B., et al., *Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies: Proposed standards from the Joint EU/USA Periodontal Epidemiology Working Group*. J Clin Periodontol, 2015. **42**(5): p. 407-12.
83. Needleman, I., et al., *Mean annual attachment, bone level, and tooth loss: A systematic review*. J Periodontol, 2018. **89 Suppl 1**: p. S120-s139.

84. Aaron, S.L. and K.W. DeBlois, *Acute Necrotizing Ulcerative Gingivitis*, in *StatPearls*. 2024, StatPearls Publishing

Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Katy DeBlois declares no relevant financial relationships with ineligible companies.

85. Fine, D.H., A.G. Patil, and B.G. Loos, *Classification and diagnosis of aggressive periodontitis*. *J Periodontol*, 2018. **89 Suppl 1**: p. S103-s119.
86. Yousefi, Y., J. Meldrum, and A.H. Jan, *Periodontal Abscess*, in *StatPearls*. 2024, StatPearls Publishing

Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Jane Meldrum declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Abdul Jan declares no relevant financial relationships with ineligible companies.

87. Herrera, D., et al., *Acute periodontal lesions (periodontal abscesses and necrotizing periodontal diseases) and endo-periodontal lesions*. *J Periodontol*, 2018. **89 Suppl 1**: p. S85-s102.
88. Isola, G., et al., *Periodontal Health and Disease in the Context of Systemic Diseases*. *Mediators Inflamm*, 2023. **2023**: p. 9720947.
89. Albandar, J.M., C. Susin, and F.J. Hughes, *Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic considerations*. *J Periodontol*, 2018. **89 Suppl 1**: p. S183-s203.
90. Jepsen, S., et al., *Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions*. *J Periodontol*, 2018. **89 Suppl 1**: p. S237-s248.
91. Vieira, A.R. and J.M. Albandar, *Role of genetic factors in the pathogenesis of aggressive periodontitis*. *Periodontol 2000*, 2014. **65**(1): p. 92-106.
92. Moutsopoulos, N.M., et al., *Defective neutrophil recruitment in leukocyte adhesion deficiency type I disease causes local IL-17-driven inflammatory bone loss*. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(229): p. 229ra40.
93. Hodge, P.J., et al., *Periodontitis in non-smoking type 1 diabetic adults: a cross-sectional study*. *J Clin Periodontol*, 2012. **39**(1): p. 20-9.
94. Lappin, D.F., et al., *The Influence of Glycated Hemoglobin on the Cross Susceptibility Between Type 1 Diabetes Mellitus and Periodontal Disease*. *J Periodontol*, 2015. **86**(11): p. 1249-59.
95. Blüher, M., *Adipose tissue dysfunction in obesity*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2009. **117**(6): p. 241-50.
96. Thomas, D. and C. Apovian, *Macrophage functions in lean and obese adipose tissue*. *Metabolism*, 2017. **72**: p. 120-143.

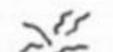
97. Schmidt, J.C., et al., *Treatment of periodontitis as a manifestation of neutropenia with or without systemic antibiotics: a systematic review*. *Pediatr Dent*, 2013. **35**(2): p. E54-63.
98. Ryder, M.I., et al., *Periodontal disease in HIV/AIDS*. *Periodontol 2000*, 2012. **60**(1): p. 78-97.
99. Zhang, Y., et al., *The Association between Periodontitis and Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis*. *Biomed Res Int*, 2021. **2021**: p. 6692420.
100. Fuggle, N.R., et al., *Hand to Mouth: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Association between Rheumatoid Arthritis and Periodontitis*. *Front Immunol*, 2016. **7**: p. 80.
101. Al-Dakkak, I., *The association between cancer treatments and oral diseases*. *Evid Based Dent*, 2011. **12**(1): p. 15-6.
102. Nicolatou-Galitis, O., et al., *Gingival bleeding and jaw bone necrosis in patients with metastatic renal cell carcinoma receiving sunitinib: report of 2 cases with clinical implications*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2012. **113**(2): p. 234-8.
103. López-Martínez, J., et al., *Bacteria associated with periodontal disease are also increased in health*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2020. **25**(6): p. e745-e751.
104. Abusleme, L., et al., *Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis*. *Periodontol 2000*, 2021. **86**(1): p. 57-78.
105. Botero, J.E., et al., *Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population*. *J Periodontol*, 2007. **78**(4): p. 696-704.
106. Eke, P.I., et al., *Periodontitis in US Adults: National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2014*. *J Am Dent Assoc*, 2018. **149**(7): p. 576-588.e6.
107. Fischer, R.G., et al., *Periodontal disease and its impact on general health in Latin America. Section V: Treatment of periodontitis*. *Braz Oral Res*, 2020. **34**(suppl 1): p. e026.
108. Belibasakis, G.N., et al., *Meeting report: The 12(th) European oral microbiology workshop (EOMW) in Stockholm, Sweden*. *Virulence*, 2018. **9**(1): p. 64-69.
109. Zhou, X., et al., *Real-time PCR quantification of six periodontal pathogens in saliva samples from healthy young adults*. *Clin Oral Investig*, 2015. **19**(4): p. 937-46.
110. Kwon, T., I.B. Lamster, and L. Levin, *Current Concepts in the Management of Periodontitis*. *Int Dent J*, 2021. **71**(6): p. 462-476.
111. O'Toole, G.A., *Classic Spotlight: How the Gram Stain Works*. *J Bacteriol*, 2016. **198**(23): p. 3128.

112. Tripathi, N. and A. Sapra, *Gram Staining*, in *StatPearls*. 2024, StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Amit Sapra declares no relevant financial relationships with ineligible companies.
113. Bartold, P.M. and T.E. Van Dyke, *Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts*. *Periodontol* 2000, 2013. **62**(1): p. 203-17.
114. Lamell, C.W., et al., *Acquisition and colonization stability of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in children*. *J Clin Microbiol*, 2000. **38**(3): p. 1196-9.
115. Lasserre, J.F., M.C. Brex, and S. Toma, *Oral Microbes, Biofilms and Their Role in Periodontal and Peri-Implant Diseases*. 2018. **11**(10): p. 1802.
116. Ezechukwu, I., M. Singal, and O. Igbinosa, *Aerococcus Viridans: Case Report, Microbiology, and Literature Review*. *Am J Case Rep*, 2019. **20**: p. 697-700.
117. Miyoshi, T., et al., *Gemella haemolysans inhibits the growth of the periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis*. *Sci Rep*, 2021. **11**(1): p. 11742.
118. Matsubara, V.H., et al., *Probiotic Bifidobacteria in Managing Periodontal Disease: A Systematic Review*. *Int Dent J*, 2023. **73**(1): p. 11-20.
119. Chamarande, J., et al., *Surface Properties of Parabacteroides distasonis and Impacts of Stress-Induced Molecules on Its Surface Adhesion and Biofilm Formation Capacities*. *Microorganisms*, 2021. **9**(8).
120. Leuckfeld, I., et al., *Diversity of Veillonella spp. from subgingival plaque by polyphasic approach*. *Apmis*, 2010. **118**(3): p. 230-42.
121. Gasmi Benahmed, A., et al., *Porphyromonas Gingivalis in the Development of Periodontitis: Impact on Dysbiosis and Inflammation*. *Arch Razi Inst*, 2022. **77**(5): p. 1539-1551.
122. Rams, T.E., et al., *Antibiotic susceptibility of periodontal Streptococcus constellatus and Streptococcus intermedius clinical isolates*. *J Periodontol*, 2014. **85**(12): p. 1792-8.
123. Vielkind, P., et al., *Prevalence of Actinomyces spp. in patients with chronic periodontitis*. *Int J Med Microbiol*, 2015. **305**(7): p. 682-8.
124. Dioguardi, M., et al., *Prevalence of the Genus Propionibacterium in Primary and Persistent Endodontic Lesions: A Systematic Review*. *J Clin Med*, 2020. **9**(3).
125. Haffajee, A.D., et al., *Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations*. *J Clin Periodontol*, 2004. **31**(11): p. 996-1002.
126. Cerdó, T., et al., *The Role of Probiotics and Prebiotics in the Prevention and Treatment of Obesity*. *Nutrients*, 2019. **11**(3).

127. Kuru, B.E., et al., *The Influence of a Bifidobacterium animalis Probiotic on Gingival Health: A Randomized Controlled Clinical Trial*. J Periodontol, 2017. **88**(11): p. 1115-1123.
128. Morales, A., et al., *Microbiological and clinical effects of probiotics and antibiotics on nonsurgical treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo- controlled trial with 9-month follow-up*. J Appl Oral Sci, 2018. **26**: p. e20170075.
129. Shirbhate, U., et al., *Clinical Implications of Probiotics in Oral and Periodontal Health: A Comprehensive Review*. Cureus, 2023. **15**(12): p. e51177.
130. Ayichew, T., et al., *Bacterial probiotics their importances and limitations: a review*. 2017. **4**(2): p. 202.
131. Deandra, F.A., et al., *Probiotics and metabolites regulate the oral and gut microbiome composition as host modulation agents in periodontitis: A narrative review*. Heliyon, 2023. **9**(2): p. e13475.
132. Grover, V., et al., *Clinical Relevance of the Advanced Microbiologic and Biochemical Investigations in Periodontal Diagnosis: A Critical Analysis*. Journal of Oral Diseases, 2014. **2014**: p. 1-11.
133. Attström, R., M. Graf-de Beer, and H.E. Schroeder, *Clinical and histologic characteristics of normal gingiva in dogs*. J Periodontal Res, 1975. **10**(3): p. 115-27.
134. Attström, R., *Presence of leukocytes in crevices of healthy and chronically inflamed gingivae*. J Periodontal Res, 1970. **5**(1): p. 42-7.
135. Lindhe, J. and H. Rylander, *Experimental gingivitis in young dogs*. Scand J Dent Res, 1975. **83**(6): p. 314-26.
136. Zaura, E. and J.M. ten Cate, *Towards understanding oral health*. Caries Res, 2015. **49** Suppl 1: p. 55-61.

12. ANEXOS

12.1 Anexo 1: Morfología bacteriana macroscópica.

Tamaño Grande = mayor 1mm de diámetro Medio = 1mm Pequeño = menos 1mm					
Forma  Circular  Filamentosa  Irregular  Puntiforme  Rizoide  Ovalado					
Elevación  Plana  Elevada  Convexa  Redonda  Centro elevado  Umbilicada					
Margen (borde de la colonia)  Entera  Ondulada  Lobulada  Dentada  Filamentosa  Rizado					
Color Blanco, Negro, Crema, Naranja, etc.					
Apariencia de la superficie Brillante Suave Granular Opaco Rugosa Cremosa					
Densidad (capacidad de ver a través de la colonia) Opaca Transparente Translúcida					
Consistencia (observable al tomar una colonia con asa) Cremosa Viscosa Friable Membranosa					

12.2 Anexo 2: API 20 A



12.3 Anexo 3: API 20 Strep



12.4 Anexo 4: Historia Clínica



Universidad Autónoma de Chihuahua
Facultad de Odontología
Maestría en Estomatología Opción Terminal
Periodoncia



HISTORIA CLÍNICA

Fecha:

Datos generales.

Nombre:	Edad:	1. Sexo: F /M (01/02)
Fecha de Nacimiento:	Ocupación/Semestre en curso:	Cel:
Familiar cercano:		Cel:

Datos heredofamiliares.

Familiares que tengan o hayan tenido enfermedades como:	
1. Diabetes	Si/No (01/02)
2. Hipertensión	Si/No (01/02)
3. Cáncer	Si/No (01/02)
4. Hipertiroidismo	Si/No (01/02)
5. Hipotiroidismo	Si/No (01/02)
6. Síndromes	Si/No (01/02)
7. Hemofilia	Si/No (01/02)

Antecedentes personales patológicos/ no patológicos

Padece alguna de las siguientes condiciones:

8. Hipertensión arterial	Si/No (01/02)	
9. Hipotensión arterial	Si/No (01/02)	
10. Diabetes	Si/No (01/02)	
11. Hipertiroidismo	Si/No (01/02)	
12. Hipotiroidismo	Si/No (01/02)	
13. VIH/SIDA	Si/No (01/02)	
14. Hepatitis	Si/No (01/02)	
15. Hemofilia	Si/No (01/02)	
16. Depresión	Si/No (01/02)	
17. Hemorragias	Si/No (01/02)	
18. Cáncer	Si/No (01/02)	Cual:
19. Alergias	Si/No (01/02)	Cual:
20. Embarazo	Si/No (01/02)	
21. Uso de anticonceptivos orales	Si/No (01/02)	

Hábitos de higiene y alimenticios.

- | | | |
|--|------------------|-------------------------------|
| 22. Tabaquismo | Si/No
(01/02) | Cantidad diaria: |
| 23. Bebidas alcohólicas | Si/No
(01/02) | Cantidad y frecuencia: |
| 24. Consume café | Si/No
(01/02) | Cantidad y frecuencia: |
| 25. Consumo de lácteos | Si/No
(01/02) | Cuál y frecuencia: |
| 26. Visitas al dentista cada 6 meses | Si/No
(01/02) | |
| 27. Higiene bucal de 2 a 3 veces diarias | Si/No
(01/02) | |
| 28. Uso de hilo dental | Si/No
(01/02) | |
| 29. Uso de enjuague bucal | Si/No
(01/02) | Cual: |
| 30. Última limpieza dental profesional realizada: | | |

12.5 Anexo 5 Consentimiento Informado



Universidad Autónoma de Chihuahua
Facultad de Odontología
Maestría en Estomatología Opción Terminal
Periodoncia



Universidad Autónoma de Chihuahua
Facultad de Odontología
Maestría en Estomatología Opción Terminal
Periodoncia



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN BACTERIOLÓGICA.

Título del protocolo: Análisis microbiológico de biopelícula de sujetos sanos periodontalmente. **Investigadores Principales:** C.D. Victor Alejandro Daniels Olivias, C.D. Luis Alberto Campos Saénz

Sede donde se realiza el estudio: Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Chihuahua

Nombre del Paciente: _____

Se le extiende la invitación para participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

¿De qué trata el estudio?

La periodontitis es una de las enfermedades bucodentales que mayor impacto tiene en la salud de la población, según la Organización Mundial de la Salud, a marzo de 2022 afecta al 95% de la población total mundial; es de origen inflamatorio y multifactorial, donde el microbiota normal en cavidad oral al existir un estado de disbiosis (desequilibrio) producen en diferentes estadios las enfermedades periodontales. La enfermedad se manifiesta con sangrado o hinchazón de las encías (gingivitis), dolor y, a

veces, halitosis. En su forma más grave, las encías pueden separarse de los dientes y el hueso de apoyo, lo que provoca que los dientes se aflojen y, a veces, caigan.

En la actualidad, sigue siendo una enfermedad que implica un desafío para el odontólogo general y el periodoncista, debido a la complejidad de las interacciones bacterianas y de los factores que la pueden desencadenar.

Existen patógenos clave de la enfermedad periodontal que dan el quiebre hacia la misma, entre ellos se encuentra la *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *T. forsythia* y *T. dentícola*. En base a estudios científicos y microbiológicos, se ha propuesto que, aun presentando factores desencadenantes claros, existen pacientes que no desarrollan la enfermedad y se dirige como motivo a la competencia bacteriana que puede existir entre los diferentes patógenos orales.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

El fin de esta investigación es indagar sobre la composición microbiológica del biofilm dental, en pacientes donde en base a criterios de inclusión y exclusión y a la clasificación de enfermedades periodontales de 2018, se les considere en estado de salud periodontal, y dirigir el estudio de manera específica a indagar sobre factores y/o microorganismos que se superpone tienen capacidad de disminuir la patogenia de los microorganismos clave de la enfermedad periodontal.



Universidad Autónoma de Chihuahua
Facultad de Odontología
Maestría en Estomatología Opción Terminal
Periodoncia



Universidad Autónoma de Chihuahua
Facultad de Odontología
Maestría en Estomatología Opción Terminal
Periodoncia



BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Al participar en la investigación estará ayudando a comprender de manera más clara el impacto de los factores microbiológicos y no microbiológicos sobre la salud periodontal, para permitir posteriormente dar pie al desarrollo de terapéuticas basadas en la información obtenida que puedan mejorar la salud periodontal de manera más eficiente, actualizada y oportuna.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

En caso de ser candidato para participar en el presente estudio, se le realizara el siguiente procedimiento:

1. Llenado de historia clínica a profundidad, indagando sobre múltiples factores importantes para la veracidad del estudio.
2. Se realizará un sondeo o medición, entre su diente y encía de manera superficial para determinar que presenta salud periodontal.
3. Se le tomaran de 2 a 3 muestras de biofilm periodontal, por medio de instrumentos especiales para la toma, con la finalidad de obtener la mayor cantidad de biofilm de la superficie dental.
4. La muestra se procesará por medio de técnicas microbiológicas, para permitir la colonización en medios específicos de los microorganismos periodontales y posteriormente analizar dichas colonias macroscópicamente y microscópicamente.

RIESGOS ASOCIADOS

Durante el sondeo y toma de muestras, existe la posibilidad de sentir ligera incomodidad, dolor o presentar sangrado mínimo de la encía donde se recolecte la muestra, lo cual disminuirá inmediatamente o en cuestión de pocos días.

ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- La participación en el estudio no le generará costo alguno.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.